# ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมะเขือเทศ

# Antioxidation Activity and Some Biochemical Properties of Endophytic Bacteria from *Lycopersicon esculentum* Mill.


ชนิกานต์ กาญจนสมจิตต์

ณิชชาพัณณ์ ขันทรัพย์

อรณิชา สถานสุข


โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

# ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมะเขือเทศ

# Antioxidation Activity and Some Biochemical Properties of Endophytic Bacteria from *Lycopersicon esculentum* Mill.


ชนิกานต์ กาญจนสมจิตต์

ณิชชาพัณณ์ ขันทรัพย์

อรณิชา สถานสุข


โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ANTIOXIDATION ACTIVITY AND SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Lycopersicon esculentum* Mill.

CHANIKHAN KANJANASOMJIT
NITCHAPAN KANSAP
AORNNICHA SATHANSUK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENTOF
THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY PROGRAM
DEPARTMENT OF BIOLOGY , FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมะเขือเทศ<br>Antioxidation activity andsome biochemical properties of endophytic bacteria from *Lycopersicon esculentum* Mill. | |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวชนิกานต์ กาญจนสมจิตต์ | 56050823 |
| | นางสาวณิชชาพัณณ์ ขันทรัพย์ | 56050831 |
| | นางสาวอรณิชา สถานสุข | 56050950 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) | |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา | |
| **ปีการศึกษา** | 2559 | |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | อาจารย์ ธนาวดี ก่ออานันต์ | |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2559

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ดร.สมพิศ สอนโยธา<br>ประธานกรรมการ | |
| ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม<br>กรรมการ | |
| อ.ธนาวดี ก่ออานันต์<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมะเขือเทศ<br>Antioxidation activity and some biochemical properties of endophytic bacteria from *Lycopersicon esculentum* Mill. |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวชนิกานต์ กาญจนสมจิตต์ รหัสนักศึกษา 56050823<br>นางสาวณิชชาพัณณ์ ขันทรัพย์ รหัสนักศึกษา 56050831<br>นางสาวอรณิชา สถานสุข รหัสนักศึกษา 56050950 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2559 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | อาจารย์ ธนาวดี ก่ออานันต์ |


## บทคัดย่อ

การศึกษาการแยกแบคทีเรียจากผลมะเขือเทศ สมบัติต้านอนุมูลอิสระ การจำแนกสายพันธุ์ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและค่าความแปรปรวนของข้อมูลด้วยOne way ANOVA และการเก็บรักษาเพื่อให้ใช้ได้อย่างเหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระของเอนโดไฟต์ที่เป็นแบคทีเรียจากมะเขือเทศ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่เติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5–15 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5–15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์ที่ได้จากส่วนใสของสารละลายแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดคือ 208.58±0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดคือ 69.28±0.07% ส่วนสารสกัดเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ที่สกัดจากเซลล์แห้งด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดคือ 36.93±0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดคือ 35.23±0.18% นอกจากนี้ การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วย analytical profile idex (API) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต TM21 มีแนวโน้มที่จะเป็นแบคทีเรียชนิด *Bibersteinia trehalosi* (API 20E) และแบคทีเรียไอโซเลต TM4 มีแนวโน้มที่จะเป็นแบคทีเรียชนิด *Brevundimonas vesicularis* (API 20 NE) ซึ่งต้องมีการศึกษาลำดับเบสบน 16sRNA ให้แน่ชัดต่อไป


**คำสำคัญ :** มะเขือเทศ, API, ฟีนอลิก, อนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Title** | Antioxidation activity and some biochemical properties of endophytic bacteria from *Lycopersicon esculentum* Mill. | | | |
| **Student** | CHANIKHAN | KANJANASOMJIT | Student ID | 56050823 |
| | NITCHAPAN | KANSAP | Student ID | 56050831 |
| | AORNNICHA | SATHANSUK | Student ID | 56050950 |
| **Degree** | Bachelor of Science (Biotechnology) | | | |
| **Department** | Biology | | | |
| **Faculty** | Science | | | |
| **University** | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) | | | |
| **Academic Year** | 2016 | | | |
| **Advisor** | ThanavadeeKor-arnan | | | |



## Abstract

The study of bacterial endophytes from tomato, antioxidation activity, classification, optimization of antioxidant production and culture maintenance of bacterial endophytes from tomatoand statistic analysis with one way ANOVA.Nutrient broth (NB) supplement with mung bean flour at 5-15 g/L and NB supplement with potato flour at 5-15g/L respectively. It was found that, extracellular metabolite from supernatant of bacterial solution of NB supplement with potato flour containe higher total phenolics content (TPC) about 208.58±0.08 µg/mL and DPPH scavenging activity was 69.28 ± 0.07%. The intracellular metabolite extract with 95% ethanol form dry cells of NB supplement with potato flour have 36.93 ± 0.18 ug/mL of TPC and DPPH scavenging activity was 35.23 ± 0.18%. Moreover, ananalytical profile idex (API) of TM21 and TM4 were *Bibersteinia trehalosi* (API 20E) and *Brevundimonas vesicularis*(API 20 NE) respectively, which will be confirmed the 16S rRNA gene sequencing in the next study.


**Keyword:** Tomato, API, Phenolics, Antioxidation activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณดังนี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ธนาวดี ก่ออานันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษาอย่างใกล้ชิด คอยเสนอแนะแนวทางแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง รวมทั้งขอขอบพระคุณคณะกรรมการโครงงานพิเศษ อาจารย์ปรำจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่นๆที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ให้ความช่วยเหลือคณะผู้จัดทำในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ในการให้ความอนุเคราะห์เรื่องการเบิก-คืนอุปกรณ์สารเคมี และให้ข้อแนะนำระหว่างการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรุ่นพี่ รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายดูแลอาคารที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการให้สามารถทำโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ผู้มีพระคุณรวมถึงผู้ที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ชนิกานต์ กาญจนสมจิตต์
ณิชชาพัณณ์ ขันทรัพย์
อรณิชา สถานสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

Abstract ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฐ

สัญลักษณ์ ..... ฒ

บทที่1 บทนำ ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ..... 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย ..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2

บทที่2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 3

2.1 มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) ..... 3

2.2 นิยามและความหมายของเอนโดไฟต์ (Endophyte) ..... 5

2.3 การเกิดอนุมูลอิสระ ..... 6

2.3.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชันกับการเกิดอนุมูลอิสระ ..... 6

2.3.2 การเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต ..... 6

2.3.3 การเกิดออกซิเดชันในอาหาร ..... 9

2.4 อนุมูลอิสระ (Free radical) ..... 11

2.4.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ ..... 11

2.4.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ ..... 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 อันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ....12
2.4.4 การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ....13
2.5 ระบบการต้านอนุมูลอิสระ....13
2.5.1 ระบบของเอนไซม์....14
2.5.2 ระบบของสารคีเลทโลหะ (Metal chelators)....15
2.5.3 ระบบของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)....15
2.6 สารประกอบฟีนอล ....23
2.6.1 สารประกอบฟีนอลหรือสารฟีนอลิก....23
2.6.2 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล....25
2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ....28
2.7 การวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน....28
2.7.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals Scavenging, DPPH)....28
2.7.2 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดลิโนลีอิค (Antioxidant activity)....29
2.7.3 การวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)....30
2.7.4 การวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันโดยการฟอกจางสีเบตาแคโรทีน (Beta Carotene Bleaching, BCB) ....31
2.7.5 การวิเคราะห์การจับกับเฟอรัสไอออน (Ferrous ion Chelating Assay, FIC)....31
2.8 การคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ....32
2.8.1 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate)....32
2.8.2 การทำให้เชื้อกระจาย (spread plate)....32
2.8.3 การเทเพลท (pour plate) ....33
2.9 การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain)....34
2.10 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส(Cytochrome oxidase enzyme) .....35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme) .....36
2.12 การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย Analytical Profile Idex (API) .....36
2.12.1 ชุดทดสอบ API 20 E .....37
2.12.2ชุดทดสอบ API 20 NE .....37
2.13 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย .....38
2.13.1 พลังงาน (Energy) .....38
2.13.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources) .....38
2.13.3 แหล่งของอิเล็กตรอน (Electron Sources) .....39
2.13.4 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources) .....39
2.13.5 แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส .....39
2.13.6 ไอออนของโลหะหนัก .....39
2.13.7 วิตามิน .....39
2.14 เทคนิคการคงสภาพและการเก็บรักษาเชื้อ .....39
2.14.1 การเก็บรักษาในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ .....40
2.14.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพแห้ง (drying) .....40
2.14.3 การเก็บจุลินทรีย์ในสภาพแช่แข็ง (freezing) .....41
2.14.4 การเก็บจุลินทรีย์โดยวิธีไลโอฟีไลเซชัน (lyophilization) .....41
2.14.5 การเก็บรักษาเชื้อภายใต้น้ำมัน .....41
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....41
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....43
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ .....43
3.1.1 วัสดุ .....43
3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ .....43
3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....43
3.1.4 เชื้อแบคทีเรีย .....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง....44
3.2.1 การถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากหัวเชื้อบริสุทธิ์....44
3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย....45
3.2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase enzyme)....45
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme)....46
3.2.5 การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย Analytical Profile Idex(API)....46
3.2.6 การเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์....47
3.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(Total phenolic content)....48
3.2.8 การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)....51
3.2.9 การเก็บรักษาจุลินทรีย์....52
3.2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ....52
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล....53
4.1 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร NA....53
4.2 ผลการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์....57
4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase enzyme)....60
4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme)....62
4.5 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธีAnalytical Profile Idex (API)...64
4.5.1 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 E....64
4.5.2 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 NE....66
4.6 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์....68
4.7 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(Total phenolic content).....70

4.9 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical).....78

บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัยและข้อเสนอแนะ.....88

5.1 สรุปผลการทดลอง.....88

5.2 ข้อเสนอแนะ.....90

ภาคผนวก.....94

ภาคผนวก ก.....95

ภาคผนวก ข.....96

ภาคผนวก ค.....97

ภาคผนวก ง.....109

ภาคผนวก จ.....114

ภาคผนวก ฉ.....126

ภาคผนวก ช.....182

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

2.1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง....12
2.2 การต้านอนุมูลอิสระที่จัดเป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์....14
2.3 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลกลุ่มต่าง ๆ....24
3.1 แสดงการเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นในช่วง 20 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....49
3.2 แสดงการเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นในช่วง20 – 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....50
4.1 แสดงผลการศึกษาลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร NA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต....53
4.2 แสดงผลการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลตโดยการย้อมสีแบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า....58
4.3 แสดงผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต....61
4.4 แสดงผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต....62
4.5 แสดงผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 E....64
4.6 แสดงผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 NE....66
4.7 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน....68
4.8 แสดงน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน....69
4.9 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน....71
4.10 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน....74
4.11 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน....79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน.....82
ผ-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....99
ผ-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....101
ผ-3 แสดงการแปรผลของชุดทดสอบ API 20 E.....109
ผ-4 แสดงการแปรผลของชุดทดสอบ API 20 NE.....111
ผ-5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรของสารสกัดภายนอกเซลล์.....114
ผ-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรของสารสกัดภายในเซลล์.....116
ผ-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารสกัดภายนอกเซลล์.....119
ผ-8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารสกัดภายในเซลล์.....122
ผ-9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....125
ผ-10 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB.....126
ผ-11 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....128
ผ-12 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....130
ผ-13 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....132
ผ-14 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....134
ผ-15 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....136
ผ-16 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....138
ผ-17 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB.....140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ-18 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....142
ผ-19 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....144
ผ-20 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....146
ผ-21 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....148
ผ-22 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....150
ผ-23 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....152
ผ-24 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB.....154
ผ-25 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....156
ผ-26 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....158
ผ-27 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....160
ผ-28 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....162
ผ-29 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....164

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ-30 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....166
ผ-31 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB.....168
ผ-32 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....170
ผ-33 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....172
ผ-34 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....174
ผ-35 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร.....176
ผ-36 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....178
ผ-37 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร.....180

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

**รูปที่** **หน้า**

2.1 อนุกรมวิธานของมะเขือเทศ....3
2.2 มะเขือเทศ....4
2.3 โครงสร้างไลโคปีน (Lycopene)....5
2.4 โครงสร้างโซลานีน (Solanine)....5
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ....16
2.6 โครงสร้างของวิตามินอีหรือแอลฟาโทโคฟีรอล....17
2.7 โครงสร้างของวิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก....18
2.8 โครงสร้างของวิตามินเอและเบต้าแคโรทีน....19
2.9 โครงสร้างตัวอย่างอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์....20
2.10 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอล....25
2.11 โครงสร้างพื้นฐานและการระบุตำแหน่งคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลฟลาโวนอยด์....27
2.12 สูตรโครงสร้างของ quercetin....27
2.13 โครงสร้างของสาร DPPH ที่เป็นอนุมูลอิสระและไม่เป็นอนุมูลอิสระ....29
2.14 กรดไขมันลิโนลีอิก....30
2.15 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate)....32
2.16 การทำให้เชื้อกระจาย (spread plate)....33
2.17 การเทเพลท (pour plate)....34
2.18 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (a) และแบคทีเรียแกรมลบ (b)....35
2.19 ชุดทดสอบ API 20 E....37
2.20 ชุดทดสอบ API 20 NE....38
4.1 ผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 E หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง....64
4.2 ผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 NE หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง....66
4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน....72
4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน....73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน.....75
4.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน.....76
4.7 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน.....80
4.8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน.....81
4.9 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน.....83
4.10 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน.....84
ผ-1 ความขุ่นของสารละลายเชื้อเทียบกับสารละลาย McFarland standard No. 0.5.....98
ผ-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร .....99
ผ-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร .....102
ผ-4 สีมาตรฐาน (color check) ตามแบบชุดทดสอบ API 20 E.....109
ผ-5 สีมาตรฐาน (color check) ตามแบบชุดทดสอบ API 20 NE.....111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สัญลักษณ์

| คำย่อ/สัญลักษณ์ | คำอธิบาย |
|---|---|
| TM | มะเขือเทศ |
| NB | อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth |
| NA | อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar |
| % | เปอร์เซ็นต์ |
| ppm | หนึ่งส่วนในล้านส่วน (Part Per Million) |
| g | กรัม |
| mg | มิลลิกรัม |
| mg/ml | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร |
| µg/ml | ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเขือเทศเป็นพืชผักที่มีประโยชน์มากมาย เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร การแปรรูปอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องปรุงรสและขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจากมะเขือเทศประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญ คือ ไลโคปีน (Lycopene) สารชนิดสามารถช่วยลดอัตราการเกิดมะเร็งและช่วยชะลอความแก่ได้ไลโคปีนมีสีแดงจะพบในปริมาณตั้งแต่ 0.9-9.30 กรัมต่อมะเขือเทศสดน้ำหนัก 100 กรัม ซึ่งอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ จึงสามารถช่วยต้านอนุมูลอิสระและช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกายได้ ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยในการไหลเวียนเลือด นอกจากนี้ มะเขือเทศยังมีวิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญอีกหลายอย่างเช่น วิตามินซี วิตามินเค ธาตุโพแทสเซียมและโบรอน ทำให้มีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น ใช้ห้ามเลือด ลดอาการข้อบวม ลดไข้ เป็นยาระบาย ลดเส้นเลือดดำขอดและรักษานิ่วในไตหรือในถุงน้ำดี

เอนโดไฟต์ที่เจริญได้ในเนื้อเยื่อพืชก็อาจเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์เช่นกัน ซึ่งต้องมีขั้นตอนการแยกเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์ การจำแนกชนิดของเอนโดไฟต์ และการผลิตสารเมตาบอไลต์ แตกต่างจากสมุนไพรที่ใช้ได้ง่ายกว่า แต่จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่พบสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ที่สำคัญได้หลายชนิด เช่น สารที่มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย มีฤทธิ์จำเพาะต่อแบคทีเรียดื้อยา มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของหน้าวัว มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว มีการพบสาร ecomycin ในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Pseudomonas viridiflava* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อยีสต์ *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 และ ATCC90013 เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์เบื้องต้นที่แยกได้จากมะเขือเทศ ซึ่งเป็นพืชผักที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงและหาได้ง่ายในท้องถิ่น โดยศึกษาการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ด้วยสมบัติทางชีวเคมี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้น การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชวิทยาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อจำแนกชนิดของเอนโดไฟต์เบื้องต้นด้วยสมบัติทางชีวเคมี

1.2.2 เพื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านออกซิเดชันจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์โดยการเติมแป้งถั่วเขียวและแป้งมันฝรั่ง

1.2.3 เพื่อเก็บรักษาเอนโดไฟต์ ไว้ใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากหัวเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ปรับสภาวะการหมักที่เหมาะสมต่อการสกัดสารเมตาบอไลต์เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากผลมะเขือเทศ

1.4.2 ทำให้ได้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงที่แยกได้จากผลมะเขือเทศ

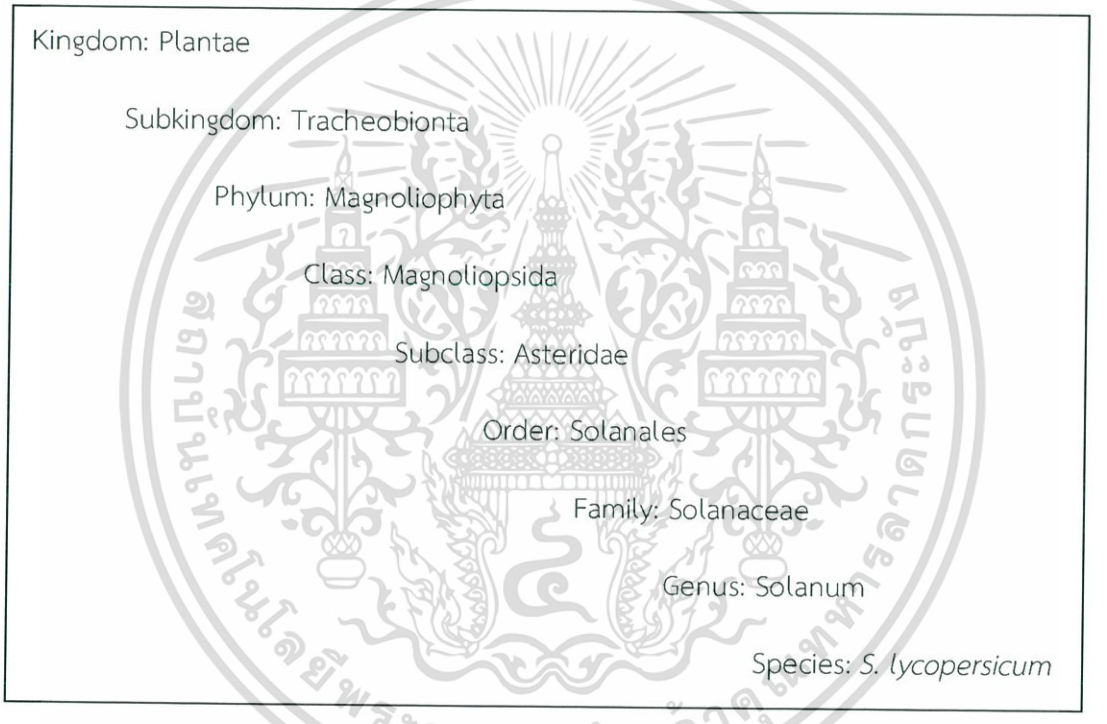
1.4.2ทำให้สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียที่เป็นเอนโดไฟต์ไว้ใช้ประโยชน์ได้ในเวลาที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) (นิกรพันธุ์, 2538)

มะเขือเทศเป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการบริโภค จัดอยู่ในตระกูล Solanaceaeพืชในตระกูลนี้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเช่น มันฝรั่งยาสูบและ พริกพืชทั้งหมดในตระกูลนี้มีประมาณ 2,000 ชนิด ประเทศบริเวณอเมริกา ยุโรป และประเทศไทยนิยมบริโภคมะเขือเทศมาก

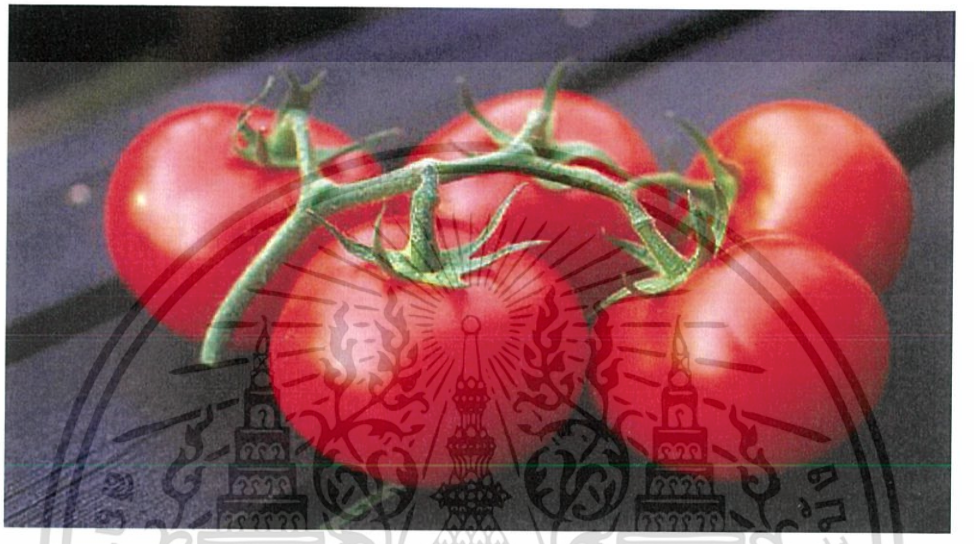



**รูปที่** 2.1 อนุกรมวิธานของมะเขือเทศ

ลักษณะที่สำคัญ คือ ใบมีลักษณะเป็นใบแบบสลับมีทั้งใบธรรมดาและใบหยัก ใบกว้าง เส้นใบไม่ขนาน เป็นใบเดี่ยวรูปห่อหรือรูปไข่ เรียงสลับกัน ขนาดใบกว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 3-10 เซนติเมตร ขอบใบหยักเป็นซี่ห่างๆ สีของดอกมีสีเหลืองออกเป็นช่อ ๆ ละ 5 ดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้รวมกันเป็นหลอดครอบเกสรตัวเมีย เกิดการผสมพันธุ์ตัวเองพบว่า การผสมพันธุ์ของมะเขือเทศต้องการอากาศเย็นโดยเฉพาะอุณหภูมิตอนกลางคืนไม่ควรสูงกว่า 21 องศาเซลเซียสบางพันธุ์มีความสามารถทนร้อนได้เป็นพิเศษที่อาจผสมพันธุ์ได้ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้ส่วนของผลเป็นแคปซูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเบอร์รี่ ผลมะเขือเทศจะฉ่ำน้ำมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ผลสุกมีสีแดง ผิวบาง เป็นมันลำต้นมีลักษณะเป็นพุ่มและเจริญเติบโตรวดเร็ว มีขนปกคลุม มีกลิ่นเฉพาะตัว การผสมเกสรจะผสมตัวเองเป็นส่วนใหญ่ อาจมีแมลงช่วยผสมทำให้เกิดการผสมข้ามได้ อาจพบสารพิษที่เป็นอัลคาลอยด์ (Alkaloid) เช่น โซลานีน (solanine) เช่น ในหัวมันฝรั่งที่ผิวเปลือกมีสีเขียว

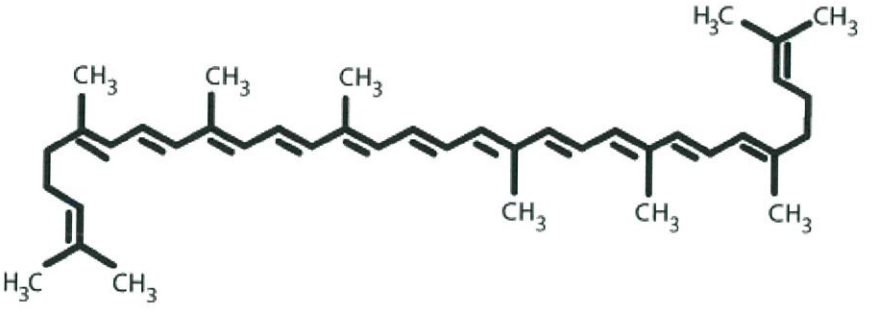


**รูปที่ 2.2** มะเขือเทศ

**ที่มา** : http://linnaeus.nrm.se/flora/di/solana/lycop/lycoesc5.jpg

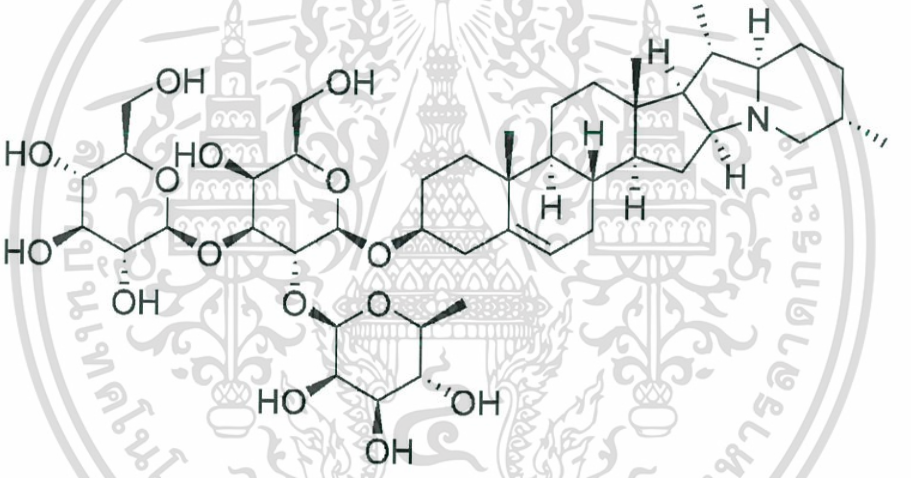
มะเขือเทศมีสารสำคัญที่ช่วยลดอัตราการเกิดมะเร็งและช่วยชะลอความแก่ โดยจะมีสารสำคัญคือ สารไลโคปีน (Lycopene) เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ที่มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย สารไลโคปีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ มะเขือเทศยังมีวิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญอีกหลายอย่างเช่น วิตามินซี วิตามินเค ธาตุโพแทสเซียม และโบรอน ยังมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น ผลและน้ำคั้นทำให้เกิดอาการอาเจียนในเด็กที่ได้รับสารพิษ ใช้ห้ามเลือด ลดอาการข้อบวม ลดไข้ เป็นยาระบาย ลดเส้นเลือดดำขอดและรักษานิ่วในไตหรือในถุงน้ำดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างไลโคปีน (Lycopene)

ที่มา : http://sirinpharmacy.exteen.com/images/chem_structure.jpg



รูปที่ 2.4 โครงสร้างโซลานีน (Solanine)

ที่มา :

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Solanine_chemical_structure.png

## 2.2 นิยามและความหมายของเอนโดไฟต์ (Endophyte) (มั่นยืนและคณะ, 2555)

เอนโดไฟต์ (endophyte) คือสิ่งมีชีวิตประเภทรา แบคทีเรีย รวมทั้งแอคติโนมัยซีสที่อาศัยอยู่ภายในหรือระหว่างเนื้อเยื่อพืชทั้งพืชน้ำ และพืชบกที่แข็งแรงโดยไม่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งอาจอยู่อาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งชีวิตหรือเพียงบางช่วงชีวิตก็ได้ และแบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆ โดยไม่ก่ออันตรายให้แก่พืชหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช

แบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ทั้งพืชน้ำ และพืชบก โดยมีช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช อาจอยู่ในส่วนราก ลำต้น กิ่งหรือใบ สามารถใช้ชีวิตร่วมกับพืชได้หลายรูปแบบ ความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดไฟต์กับพืชเป็นการอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพากัน (mutualism neutral symbiotic) โดยเอนโดไฟต์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ สามารถป้องกันโรคให้กับพืชอาศัย อีกทั้งเป็นต้นแบบในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่างๆในธรรมชาติ บางชนิดนอกจากผลิตสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) แล้วยังสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondarymetabolite) ในกลุ่มของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น ต้านเชื้อรา (antifungal) ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ที่ก่อโรคในคน สัตว์หรือในพืช

## 2.3 การเกิดอนุมูลอิสระ

### 2.3.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชันกับการเกิดอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาที่มีการให้อิเล็กตรอน ซึ่งสารที่ให้อิเล็กตรอนจะมีเลขออกซิเดชันเพิ่มขึ้น เรียกว่า เกิดออกซิเดชัน สารที่ให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่น เรียกว่า ตัวรีดิวซ์

ออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่มีการย้ายอิเล็กตรอนจากสารหนึ่ง ปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่จะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ทำลายเซลล์ได้ เซลล์ในร่างกายของมนุษย์จะถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสร้างอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและอวัยวะได้ เพราะอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารประกอบของเซลล์ร่างกาย ได้แก่ กรดนิวคลีอิก โปรตีน กรดอะมิโนอิสระ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ทำให้กลไกต่างๆ ในร่างกายทำงานผิดปกติอนุมูลอิสระเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคและความชรา เป็นเหตุให้พืชและสัตว์จะมีระบบที่ซับซ้อนและสารต้านอนุมูลอิสระไว้คอยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีต่อองค์ประกอบของเซลล์ เช่น มีสารกลูต้าไทโอน วิตามินซี วิตามินอี รวมถึงเอนไซม์ เช่น คะตะเลส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และเปอร์ออกซิเดสต่าง ๆ เพื่อเป็นสารช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน

### 2.3.2 การเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต

สารอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ภายในร่างกายเพื่อให้ตัวเองเสถียร แหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในตัวคนมี 2 แหล่ง ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. จากภายในร่างกาย ได้แก่ กระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกาย การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกาย การสร้างสารเคมีที่หลงเหลือจากกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในร่างกายและเกิดขึ้นในเซลล์ เช่น กระบวนการสลายไขมันในร่างกาย

2. จากแหล่งภายนอกร่างกายที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ความเครียด การติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส รังสี สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียและเขม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ ยาฆ่าแมลง เป็นต้น

การเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจนอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{\cdot}$) และอนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่น ๆ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปอร์ออกซีไนเตรท ($ONOO^-$) แม้ว่าโครงสร้างไม่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระแต่เป็นสารที่ได้จากปฏิกิริยาต่อเนื่องที่มีอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ สารที่ได้อยู่ในรูปอนุมูลเหล่านี้มีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก และมีความเป็นพิษสูงจึงมีการบัญญัติศัพท์ใหม่ให้ครอบคลุมทั้งอนุมูลอิสระและสารที่ว่านี้ว่า “สารความไวสูง” (วัชระคุปต์และคณะ, 2549)

**สภาวะการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย**

1. **ความผิดปกติของระบบการทำงานของไมโตคอนเดรีย** สารที่มีความไวสูง (Reactive species, RS) เกิดขึ้นจากการเผาผลาญภายในไมโตคอนเดรียโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันและเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเกิดออโตออกซิเดชันภายในโมเลกุล ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์เกิดในไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มนิวเคลียส เอนโดพลาสมิกเรคูลัมและเปอร์อกซิโซม อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{\cdot}$) เป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เป็นอันตรายและพบมากที่สุดภายในเซลล์อนุมูล $O_2^{\cdot}$ เกิดขึ้นจากการรั่วของอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโตคอนเดรียและจากเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตซอลและเอนไซม์ที่อยู่ที่เมมเบรน เช่น แซนทีนออกซิเดส ไซโตโครมพี 450 และฟอสโฟไลเปสเอ-2 อนุมูล $O_2^{\cdot}$ สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระที่มีอันตรายที่สุด ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) และสารที่เกี่ยวข้องที่ไวต่อปฏิกิริยาคือ เปอร์ออกซีไนเตรท ($ONOO^-$)

2. **กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาท** กรดอะมิโน เช่น กรดกลูตามิก และ กรดแอสปาร์ติก รวมทั้งอนุพันธ์ของกรดอะมิโนทั้งสองนี้เป็นกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาท เมื่อมีกรดกลูตามิกในปริมาณมากผิดปกติมีผลทำให้แคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งนำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระจากหลายทิศทาง เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นจากการปลดปล่อยกรดอะราชิโดนิกพร้อมด้วยอนุมูล และจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์แซนทีนดีไฮโดรจีเนสไปเป็นแซนทีนออกซิเดส นอกจากนี้การผ่านเข้าออกของแคลเซียมจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกซิไดซ์ซินเทสทำให้ไนตริกออกไซด์ในเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อแคลเซียมในเซลล์มีปริมาณมากจะเข้าสู่ไมโตคอนเดรียทำให้เกิดอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. เมตาบอลิซึมของสารสื่อประสาท** เมทาบอลิซึมของโดพามีนและสารสื่อประสาทในสมองอื่น ๆ ทำให้ได้ผลผลิตอนุมูลอิสระหรือสารที่เป็นอันตรายหรือเป็นพิษ ในสภาวะของการเกิดโรคพบว่ามีระดับของโดพามีนเพิ่มขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์สามารถทำให้สมองถูกทำลายได้ พิษของโดพามีนเกิดจากโดพามีนถูกออกซิไดซ์แล้วได้ผลผลิต คือ อนุมูลอิสระ สารประกอบควิโนนที่เป็นพิษและสารเมลานีน เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (MAO) จะเปลี่ยนโดพามีนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ แม้ว่าปราศจากเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดโดพามีนสามารถเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เช่นกันจากการเกิดออโตออกซิเดชัน

**4. สารพิษทำลายเซลล์ประสาท** ความเป็นพิษหรือฤทธิ์ทำลายเซลล์ประสาทมีสาเหตุมาจากความสามารถในการทำให้เกิดอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่มีความไวสูง สันนิษฐานว่าการเกิดอนุมูลอิสระอาจเป็นกลไกในช่วงสุดท้ายของการออกฤทธิ์ของสารพิษกลุ่มนี้ สารที่สามารถทำให้เกิดภาวการณ์ออกซิไดซ์ในสมอง ได้แก่ ปรอท โทลูอีน 6-OHDA สารไซยาไนด์ในปริมาณที่ไม่ทำให้ตาย เป็นต้น สารพิษทำลายเซลล์ประสาท เช่น 1-methy-4-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ผ่านเข้าสู่สมองกลายเป็น 1-methy-4-phenylpyridinium ($MPP^+$) และผ่านเข้าสู่เซลล์ประสาท ออกฤทธิ์ยับยั้งการหายใจ ทำให้เกิดภาวะออกซิไดซ์ยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งนำไปสู่การออกซิเดชันสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ

**5. ภาวะขาดเลือด** ในช่วงต้นของภาวะขาดเลือดชั่วขณะและเซลล์หรือเนื้อเยื่อยังไม่ตาย เลือดและออกซิเจนกลับมาหล่อเลี้ยงเซลล์ใหม่ ทำให้สารไฮโปรแซนทีนถูกเปลี่ยนเป็นแซนทีนและกรดยูริค ทั้งสารไฮโปรแซนทีนและแซนทีนเมื่อมีออกซิเจนและแซนทีนออกซิเดสรวมอยู่ด้วยจะกระตุ้นการเกิดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) ทำให้เกิดการเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) สามารถทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์อย่างรวดเร็ว ได้สารพิษเปอร์ออกซีไนเตรท ($ONOO^-$) ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่ง

**ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์**

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

**1. ปฏิกิริยาขั้นต้น (Initiation step)**

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ แสง รังสี และอาจเกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์รวมถึงโมเลกุลที่มีความว่องไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO) และ ซิงเกลตออกซิเจน ($^1O_2$) ซึ่งหมายถึง ออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต้นของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 1

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} \qquad \text{สมการ 1}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. ปฏิกิริยาขั้นต่อเนื่อง (Propagation step)**

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาขั้นต้นจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในปฏิกิริยาขั้นต่อเนื่อง โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียงหรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะพื้น ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการที่ 2 – 4

$$RH + R^{1\cdot} \longrightarrow R^{\cdot} + R^{1}H \qquad \text{สมการ 2}$$

$$R^{\cdot} + {}^{3}O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot} \qquad \text{สมการ 3}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot} \qquad \text{สมการ 4}$$

**3. ปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย (Termination step)**

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียรจึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 5 และ 6

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR + O_2 \qquad \text{สมการ 5}$$

$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow ROOR \qquad \text{สมการ 6}$$

**2.3.3 การเกิดออกซิเดชันในอาหาร**

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและไขมัน มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารมาก เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนและเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง หรือ ออโตออกซิเดชัน โดยออกซิเจนเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไขมันและน้ำมันเกิดปฏิกิริยาที่พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยิ่งถ้ามีพันธะคู่มากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะยิ่งเกิดขึ้นได้เร็วมากอีกด้วย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบลูกโซ่ของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนและอนุมูลอิสระ เกิดเป็นสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้จะสลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็ก ๆ ที่ทำให้มีกลิ่นเหม็นหืนและเกิดเป็นสารอนุมูลอิสระที่เริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปอีกด้วย

**ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในอาหาร**

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและไขมันในอาหารเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถแบ่งออกเป็นขั้นต่าง ๆ ได้ 3 ขั้นตอนเหมือนการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตและมีรายละเอียดดังนี้

**1. ปฏิกิริยาขั้นต้น (Initiation step)**

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในช่วงต้น โมเลกุลของออกซิเจนจะทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหาร เกิดการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมตรงตำแหน่งพันธะคู่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลไฮโดรคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วถ้ามีตัวกระตุ้นที่เหมาะสม เช่น แสง ความร้อน และโลหะ ในขณะเดียวกันตัวกระตุ้นดังกล่าวอาจจะทำให้เกิดการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหารได้ โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอาหารและได้อนุมูลอิสระที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากเช่นกัน

$$\underset{\text{โมเลกุลของกรดไขมัน}}{RH} \longrightarrow \underset{\text{อนุมูลอิสระ}}{R^{\cdot}+H^{\cdot}}$$

**2. ปฏิกิริยาขั้นต่อเนื่อง (Propagation step)**

ปฏิกิริยาเพิ่มเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับออกซิเจนได้อนุมูลของเปอร์ออกซีไฮโดรเปอร์ออกไซด์และอนุมูลไฮโดรคาร์บอน อนุมูลใหม่ที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเดชันตัวอื่น ๆ ออกซิเดชันในอากาศตามปกติจะอยู่ในสภาพทริเพลต ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในสภาพซิง-เกลต แต่จะเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายกับอนุมูลอิสระที่เกิดจากรังสี แสงอัลตราไวโอเลต ความร้อน หรือเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับออกซิเจนหรือไอออนของโลหะทรานซิชันเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกไซด์และกระตุ้นให้เกิดออโตออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ออกซิเจนที่อยู่ในรูปทริ-เพลตสามารถเปลี่ยนไปเป็นออกซิเจนซิงเกลตเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงและมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์และฮีม เป็นสารตั้งต้นอยู่ ออกซิเจนซิงเกลตจะทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ ทำให้เกิดออโตออกซิเดชันในสภาวะที่มีแสง

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot}$$
$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot}$$

**3. ปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย (Termination step)**

ปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายเป็นปฏิกิริยาของสองโมเลกุลของสารประกอบที่ไม่คงตัวจากปฏิกิริยาเพิ่มรวมตัวกัน แล้วเกิดเป็นสารประกอบที่มีความคงตัว ซึ่งจะสลายตัวให้สารประกอบที่มีคาร์บอนต่ำ เช่น อัลดีไฮด์คีโตนและกรดที่ระเหยง่าย ทำให้เกิดกลิ่นหืนในอาหาร

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RR$$
$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR + O_2$$
$$RO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow ROOR$$
$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow ROOR$$
$$2RO^{\cdot} + 2ROO^{\cdot} \longrightarrow 2ROOR + O_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ RH แทนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีไฮโดรเจนเกาะกับคาร์บอนที่ติดกับพันธะคู่

$R^{\cdot}$ แทนอนุมูลอิสระ

ROOH แทนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

## 2.4 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ เป็นโมเลกุลหรืออนุภาคที่ไม่เสถียรเนื่องจากรับหรือขาดอิเล็กตรอนไป 1 อิเล็กตรอน ปกติธาตุต่าง ๆ ที่อยู่ในโมเลกุลที่เสถียรจะต้องมีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่มีการสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนมาอีกหนึ่งตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่เสถียร เมื่อโมเลกุลนั้นไม่เสถียรจึงต้องแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น ๆ ที่เสถียรอยู่เป็นลูกโซ่

### 2.4.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ

อนุมูล หรือ อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุลหรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทอลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง แต่ละอิเล็กตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละวงโคจรหรือออร์บิทอล การหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะเป็นแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\cdot}$ อนุมูล $A^{\cdot-}$ และอนุมูล $A^{+\cdot}$ อนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวตัวอื่น ดังนั้น อนุมูลอิสระจึงมีความว่องไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ

ก. การแตกตัวของพันธะโควาเลนท์แบบไม่โอไลซิส

$$A : B \longrightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{\cdot-}$$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)

$$A \longrightarrow A^{+\cdot}$$

### 2.4.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาทในทางชีววิทยาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ และ กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ แสดงดังตาราง 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.1** อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

| อนุมูลอิสระ | สารที่เกี่ยวข้อง |
|---|---|
| **Reactive oxygen species (ROS, RS)** | |
| Superoxide, Superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$ | $H_2O_2$ , Ozone ($O_3$) |
| Hydroxyl, $^{\cdot}OH$ | Hypobromous acid (HOBr) |
| Hydroperxyl, $HO_2^{\cdot}$ | Hypochlorous acid (HOCl) |
| Peroxyl, $RO_2^{\cdot}$ | Singlet oxygen ($O_2$) |
| Alkoxyl, $RO^{\cdot}$ | Organic peroxides (ROOH) |
| Carbonate, $CO_3^{\cdot-}$ | Peroxynitrite($ONOO^-$) |
| Carbon dioxide, $CO_2^{\cdot-}$ | Peroxynitrous acid (ONOOH) |
| **Reactive nitrogen species (RNS)** | |
| Nitric oxide, $NO^{\cdot}$ | Nitrous acid ($HNO_2$) |
| Nitrogen dioxide, $NO_2{\cdot}NO_2^{\cdot}$ | Nitrosylcation($NO^+$) |
| | Nitroxyl anion ($NO^-$) |
| | Dinitrogentetrachloride($N_2O_4$) |
| | Dinitrogen trioxide ($N_2O_3$) |
| | Peroxynitrite($ONOO^-$) |
| | Peroxynitrous acid (ONOOH) |
| | Nitronium(nitryl) cation($NO_2^+$) |
| | Alkyl peroxynitrites(ROONO) |
| **Reactive chlorine species (RCS)** | |
| Atomic chlorine, Cl | Hypochlorous acid (HOCl) |
| | NitrylZnitroniumX chloride ($NO_2Cl$) |
| | Chloramines Chlorine gas ($Cl_2$) |
| **Others** | |
| Thioyl radical (RS·) | |

ที่มา : โอภาและคณะ (2550)

### 2.4.3 อันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายเองและในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จะเกิดภาวการณ์ออกซิเดชันมากเกินขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์ เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจึงเกิดการทำลายโมเลกุลอื่น ๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกาย เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า รอบดวงตา และผิวพรรณ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยต่าง ๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้น ๆ มาก่อน รวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก อัลไซเมอร์ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และ มะเร็ง เป็นต้น

**2.4.4 การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ** (บังอรและศศิลักษณ์, 2549)

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตรายในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือ สามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลอิสระมีมากเกินสมดุลและเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นในร่างกายได้

กลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ได้แก่ เอนไซม์ สารต้านอนุมูลอิสระ และสารคีเลทโลหะ

## 2.5 ระบบการต้านอนุมูลอิสระ

ร่างกายจำเป็นต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง คือ ระบบการต้านอนุมูลอิสระหรือระบบสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ สารคีเลทโลหะ สารต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.5.1 ระบบของเอนไซม์** (โอภาและคณะ, 2549)

เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำเพื่อชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสารตั้งต้นเหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ

**เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซม์ดิสมิวเตส (SOD)** เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย คือ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) โดยเปลี่ยนอนุมูล $O_2^{\cdot-}$) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

$$2\ O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

**เอนไซม์คะตะเลส (CAT)** เอนไซม์คะตะเลสเป็นเอนไซม์ที่มีฮีม คือ เฟอร์ริโฟโตพอพิวริน เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์คาตาเลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนฮีม 4 หน่วยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 60 กิโลดาลตัน การจัดเรียงของหน่วยทั้งสี่เป็นแบบเตทตระฮีดรัล ดังนั้นเอนไซม์คาตาเลสจึงมีฮีมจำนวน 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุล เอนไซม์คา-ตาเลสทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน

$$H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{CAT} H_2O + O_2$$

**เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPX)** เอนไซม์ออกซิเดสจะมีธาตุซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีกลูตาไทโอน (GSH) ร่วมในปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์นี้ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากสภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPX} ROH + GSSH + H_2O$$

**ตารางที่ 2.2** การต้านอนุมูลอิสระที่จัดเป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์

| ประเภท | สารต้านอนุมูลอิสระ |
|---|---|
| สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ | catalase (CAT)<br>superoxide dismutase (SOD)<br>glutathione peroxidase (GPX)<br>glutathionereductase (GR) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| | glutathione s-transferase (GST) |
| สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายแต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ | glutathione haptoglobin<br>lipoic acid hemopexin<br>ceruloplasmin uric acid<br>albumin bilirubin<br>transferrin cysteine |
| สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ | Tocopherols carotenoids<br>ascorbic acid steroids<br>ubiquinonesthiols<br>inosinetaurine<br>pyruvate gallic acid<br>flavonoids trolox<br>BHT BHA |

ที่มา : http://www.stkc.go.th

**2.5.2 ระบบของสารคีเลทโลหะ (Metal chelators)**

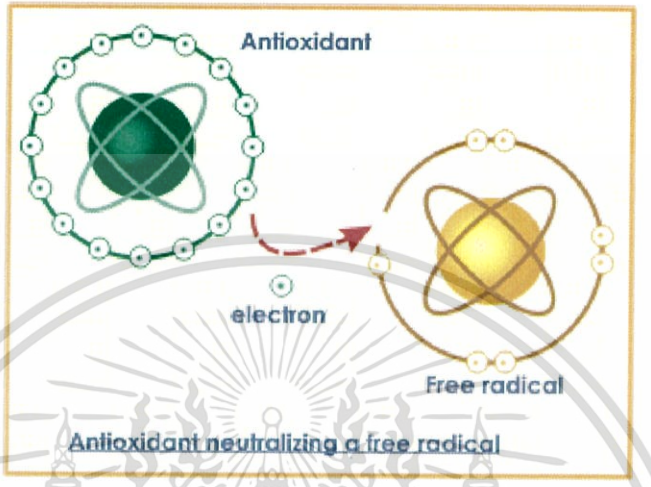
สารที่ทำหน้าที่คีเลทโลหะเป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ทั้งนี้เนื่องจากโลหะทรานซิชัน เช่น เหล็ก ทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารที่ทำหน้าที่คีเลทโลหะในร่างกายส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่จับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกิดอนุมูลไฮดรอกซี (OH) เข้ามารวมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเกิดอนุมูลอิสระได้ โปรตีนที่จับกับโลหะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะในร่างกาย มีดังนี้ คือ ทรานเฟอร์ริน เฟอร์ริตินแลคโตเฟอร์ริน เซรูโลพลาสมินฮีโมแพล็กซินแฮบโทโกลบินและอัลบูมิน ในร่างกายธาตุเหล็กจะถูกเก็บสะสมในรูปของเฟอร์ริติน เฟอร์ริตินคือ โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 460 กิโลดาลตัน มีไอออนเหล็ก ($Fe^{3+}$) จำนวน 2 ไอออนจับอยู่หรือในรูปแลคโตเฟอร์ริน ธาตุเหล็กยังสามารถรวมตัวกับโปรตีนอื่น ๆ ด้วยแรงจับที่แน่นกว่า ได้แก่ ฮีโมโกลบิน ไมโอโกลบิน และเฟอร์โร-ดอกซิน ธาตุทองแดงจะเคลื่อนย้ายไปทั่วร่างกายในรูปเซรูโลพลาสมิน นอกจากนี้ยังมีสารคีเลทโลหะที่ใช้สำหรับในการบำบัดและรักษาโรคโดยควบคุมระดับปริมาณของธาตุเหล็กในผู้ป่วย คือ เดสเฟอร์ริออกซามีน

**2.5.3 ระบบของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)** (โอภาและคณะ, 2549)

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นคำศัพท์ที่แปลมาจากคำว่า Antiradical ปัจจุบันคำศัพท์นี้ได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล เพื่อให้ถูกต้องตรงกับการทำงานและอาจใช้คำว่าสารแอนติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิแดนท์แทน สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงหรือให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระทำให้อนุมูลอิสระเสถียรเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ ดังรูป 2.5




**รูปที่** 2.5 สารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ

ที่มา : http://www.knowabouthealth.com

สารขจัดอนุมูลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริค บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูล ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบต้าแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลสารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมา มีโครงสร้างและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน เช่น วิตามินอี มีโครงสร้างเคมีที่ละลายไขมันได้ดี ดังนั้นจึงสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ที่เมมเบรนได้ วิตามินอีจัดเป็นสารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ วิตามินอีจะทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลลิพิดเปอร์ออกซีและได้เป็นอนุมูลวิตามินอี (T-O˙) อนุมูล (T-O˙) เป็นอนุมูลที่มีความไวต่ำทำให้ไม่สามารถเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่อไปได้ วิตามินซีละลายน้ำได้ดีมีหน้าที่เปลี่ยนอนุมูล (T-O˙) ทำให้ได้วิตามินอีกลับคืนโดยการรับอิเล็กตรอนจากอนุมูล (T-O˙) อนุมูลวิตามินซีจะถูกขับออกทางปัสสาวะ

สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่มีในธรรมชาติ เช่น กรดอัลฟาไลโพอิค เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งสามารถดูดซึมจากอาหารเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้วก็จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไดไฮโดรไลโพเอท ทั้งกรดอัลฟาไลโพอิค และไดไฮโดรไลโพเอท จัดเป็นตัวกำจัดอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงต่ออนุมูลต่าง ๆ เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) ไนตริกออกไซด์ (NO) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) สารทั้งสองนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนสารที่ได้ทำหน้าที่ไปแล้วให้เวียนกลับคือไปทำหน้าที่ใหม่ ไดไฮโดรไลโพเอทสามารถรีดิวซ์กลูตาไทโอนไดซัลไฟต์ ดีไฮโดร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอสคอร์บิคและอนุมูลเซมิดีไฮโดรแอสคอร์บิคหรือยูบิควิโนน กลับเป็นสสารต้านอนุมูลอิสระคืนดังเดิม สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้จะรีดิวซ์อนุมูลวิตามินอีทำให้ได้วิตามินอีกลับคืนมาใหม่

นอกจากนี้ในอาหาร เช่น ผลไม้ ผักและสมุนไพร ที่มีสารโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดคาเฟอิคในกาแฟ เลสเวอราทอลในไวน์แดง เคอร์คูรินในขมิ้น แคปไซวินในพริกขี้หนู นอกจากสารโพลีฟีนอลแล้ว สารฟลาโว-นอยด์ที่พบในพืชต่าง ๆ มากกว่า 5,000 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็นประเภทได้อย่างน้อย 10 กลุ่มในทางเคมี สารฟลาโวนอยด์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ได้แก่ คาเทชิน และ เคอร์ซีติน

สารต้านอนุมูลอิสระในอุดมคติควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ

1. มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการเข้าจับอนุมูลอิสระโดยตรงและกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดสิ้นไป

2. สามารถเกิดทำปฏิกิริยาคีเลทกับโลหะได้

3. เป็นสารต้านออกซิเดชันได้

4. ไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน

**2.5.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ**

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนซ์ที่รู้จักกันดี ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบต้าแคโรทีน วิตามินเอและพฤกษเคมี (Phytochemical) เช่น โพลีฟีนอล ไอโซฟลาโวน เป็นต้น

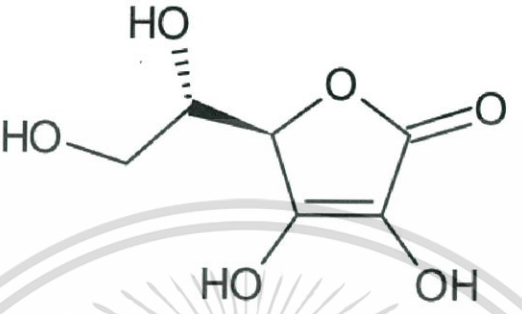
**วิตามินอี (Vitamin E)** เป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมันจึงพบมากในน้ำมันพืชต่างๆ แหล่งอาหารสำคัญที่พบ ได้แก่น้ำมันจากจมูกข้าวสาลี น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกคำฝอย เมล็ดดอกทานตะวัน เมล็ดอัลมอนด์ จมูกข้าวสาลี

**รูปที่ 2.6** โครงสร้างของวิตามินอีหรือแอลฟาโทโคฟีรอล

ที่มา : http://www.thailantern.com/main/boards/index.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**วิตามินซี (Vitamin C)** มีมากในพืช ผักสีเขียวและผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง พริกหยวก ส้ม มะนาว สับปะรด ฝรั่ง มะขามป้อม มะละกอสุก พริกชี้ฟ้าเขียว บร็อคโคลี ผักคะน้า ยอดสะเดา ใบปอ ผักหวาน ผักกาดเขียว




**รูปที่** 2.7 โครงสร้างของวิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก

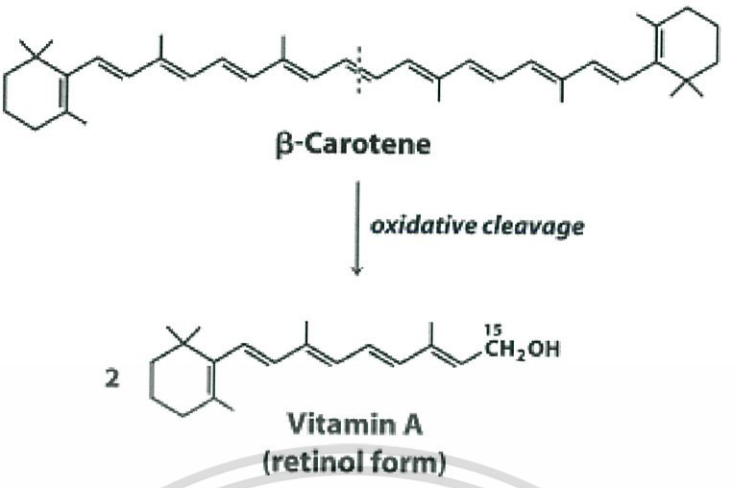
ที่มา : http://www.thailantern.com/main/boards/index.php

**สารประกอบซีลีเนียม (Selenium-Se complex)** จะอยู่ในรูปของสารเชิงซ้อนกับเอนไซม์ในร่างกาย เช่น selenium-glutathione peroxidase (SeGPx) ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปอด ลำไส้และต่อมลูกหมาก (ถ้าร่างกายมีซีลีเนียมมากไปจะเป็นอันตรายได้ซึ่งหมายถึง มีการรับเอาธาตุซีลีเนียมเข้ามาโดยตรง) พบมากในอาหารทะเล ปู ปลา กุ้ง หอย ปลาทูน่า เนื้อสัตว์และตับ บะหมี่ เนื้อแดง เนื้อไก่ไข่ ขนมปังโฮลวีต เมล็ดดอกทานตะวันและถั่วต่างๆ

**วิตามินเอ (Vitamin A)** พบมากในตับหมู ตับไก่ ไข่ น้ำนม พืชผักที่มีสีเขียวเข้ม ผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม ได้แก่ ผักตำลึง ผักบุ้ง ผักกวางตุ้ง ฟักทอง มะม่วงสุก มะเขือเทศ

**แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)** ได้แก่ เบต้าแคโรทีนลูทีนและไลโคพีน ซึ่งสารที่มีบทบาทสำคัญ คือ เบต้าแคโรทีน (ระบบการทำงานของร่างกายสามารถเปลี่ยนเบต้าแคโรทีนเป็นวิตามินเอได้) พบมากในผักที่มีสีเขียวเข้ม เช่น ผักตำลึง ผักกวางตุ้ง ผักบุ้ง บร็อคโคลี ผักผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น ฟักทอง มะม่วงสุก มะละกอสุก มะเขือเทศ แครอท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



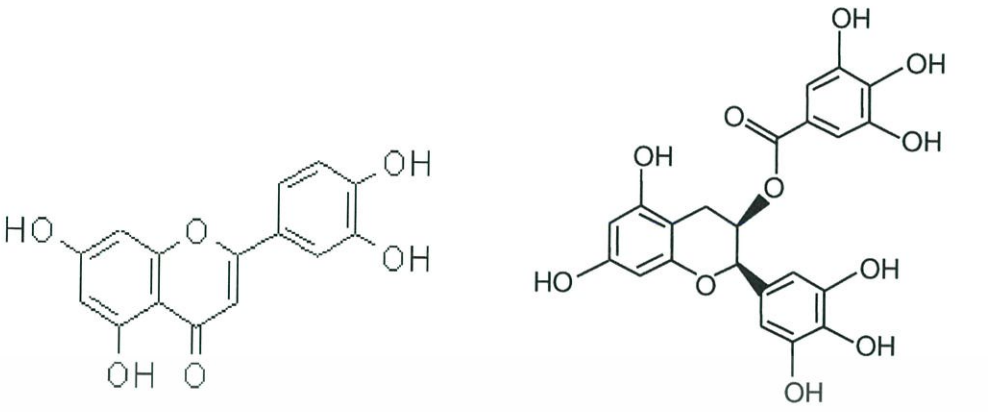

**รูปที่** 2.8 โครงสร้างของวิตามินเอและเบต้าแคโรทีน

ที่มา : http://www.thailantern.com/main/boards/index.php

**สารกลุ่มโพลีฟีนอล** (Polyphenolics) จัดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอกและพบมากในธรรมชาติ ได้แก่ พืช ผัก ผลไม้ ชาเขียว ช็อกโกแลต และไวน์แดง ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด นับจากโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิกฟีนิลโปรพานอยด์และฟลาโวนอยด์ จนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น

**อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์** (Flavonoid derivatives) พบมากในพืชจำพวกชา กาแฟ โดยเฉพาะใบชาเขียว และเมล็ดกาแฟสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Luteolin (-)-Epigallocatechin-3-gallate

**รูปที่ 2.9** โครงสร้างตัวอย่างอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

ที่มา : http://ar.iiarjournals.org/content/30/7/2519/F1.large.jpg

**2.5.3.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ**

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน อนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายจะถูกกำจัดด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะจับกับอนุมูลอิสระแล้วเกิดอนุมูลตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ขึ้นมาอีก เนื่องจากเกิดการรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร แสดงวงจรการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งและการควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สามารถเขียนสมการแสดงการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดังนี้

$$HOO^{\bullet} + AntH \longrightarrow HOOH + Ant^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + AntH \longrightarrow ROOH + Ant^{\bullet}$$

$$O^{\bullet-} + AntH \longrightarrow HOO^{-} + Ant^{\bullet}$$

$$O^{\bullet-} + AntH \longrightarrow HOO^{\bullet} + Ant^{\bullet}$$

**2.5.3.3 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ**

สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งสารจากธรรมชาติ เช่น กรดอะมิโน กรดแอสคอร์บิค แคโรทีนอยด์ฟลาโวนอยด์ แทนนิน โทโคฟีรอล เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น บีเอชเอ บีเอชที ทีบีเอชคิว เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (Primary antioxidant)

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ทำหน้าที่หยดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสารสังเคราะห์ บีเอชเอ บีเอชที ทีบีเอชคิวและอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2. สารกำจัดหรือดูดซับออกซิเจน (Oxygen scavenger)

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิคหรือวิตามินซี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

3. สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ (Secondary antioxidant)

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไตรโพรพิเนตและกรดไตรโพรพินิค ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

4. เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Enzymic antioxidant)

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆซึ่งแบ่งเป็นเอนไซม์ปฐมภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (primary antioxidant enzyme) และเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (auxiliary antioxidant enzyme) สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$)

5. สารคีเลตหรือซีเควสแทรนท์ (Chelating agentorsequestrant)

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดซิตริกกรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

**2.5.3.4 ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดธรรมชาติ**

1. วิตามินอีจากธรรมชาติ

วิตามินอีจากธรรมชาติอยู่ในรูดี-โทโคฟีรอลหรือดี-อัลฟา-โทโคฟีรอล ส่วนวิตามินอีสังเคราะห์จะอยู่ในรูปดีแอล-โทโคฟีรอลจากงานวิจัยพบว่า วิตามินอีในรูปดี-ฟอร์มซึ่งได้จากธรรมชาติมีผลดีต่อร่างกายมนุษย์อย่างน้อยสองเท่าเมื่อเทียบกับวิตามินอีในรูปดีแอล-ฟอร์ม ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ วิตามินอีมีความสามารถในการจับอนุมูลออกซิเจนอิสระ ซึ่งช่วยป้องกันเซลล์ถูกทำลายและยังช่วยเสริม สร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ

2. สารสกัดจากชาเขียว (Green tea extract)

ชาเขียวเป็นชาที่พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบในชาเขียว มีชื่อว่า อีพิแกลโลคาเทชิน แกลเลท หรือ อีซีซีจี (EpigallocatechinGallate, ECCG) ซึ่งเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ ช่วยป้องกันการทำลายของเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิสระ ซึ่งมีผลในการป้องกันโรคหัวใจ โรคฟันและเหงือก รวมถึงช่วยควบคุมกลูโคสเมตาบอลิซึมให้เป็นไปตามปกติ ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ ECCG สูงกว่าวิตามินซีและวิตามินอีถึง 25-1,000 เท่า

3. สารสกัดจากโรสแมรี (Rosemary extract)

โรสแมรีเป็นสมุนไพรที่ใช้เพื่อให้กลิ่นและรสชาติในอาหารของอเมริกาและยุโรป โรสแมรี (*Rosmarinus officinalis* L.) มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดโรสแมรีนิคคาร์โนซอล และกรดคาร์โนสิค ซึ่งสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการชะลอและป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้สารสกัดโรสแมรี เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ลดการเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และได้ยอมรับให้ผู้ผลิตอาหารสามารถใช้สารสกัดโรสแมรีเพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารชนิดต่างๆได้อย่างปลอดภัย ข้อดีของสารสกัดโรสแมรี คือ สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 240 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสำหรับเติมในน้ำมันทอดหรือขนมขบเคี้ยว

4. สารสกัดจากทับทิม (Pomegranate extract)

ทับทิมเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ กรดอีลาจิค (ellagic acid) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับอนุมูลอิสระสูงมาก จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากทับทิมช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจ โดยไปลดและป้องกันเซลล์ถูกทำลายนอกจากนี้ สารสกัดจากทับทิมยังช่วยลดความดันโลหิตโดยยับยั้งการทำงานของแอนจิโอเทนซัน คอนเวอติง เอนไซม์ (angiotension converting enzyme, ACE)

5. สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract)

สารสกัดจากเมล็ดองุ่นประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด สารที่สำคัญ คือ โอลิโกเมอริกโปรไซอะนิดิน (oligomericprocyanidins, OPCs) และเรสเวอราทรอล (resveterol) ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซีและวิตามินอีถึงห้าสิบเท่า ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีสรรพคุณที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยรักษาอาการที่มีต้นเหตุมาจากอนุมูลอิสระ เช่น อาการปวด อักเสบ หลอดเลือดเปราะ นอกจากนี้งานวิจัยยังพบว่า OPCs ช่วยทำให้ผิวใส ระบบการหมุนเวียนเลือดเป็นปกติ ช่วยป้องกันคอลลาเจนถูกทำลายซึ่งเป็นสาเหตุของการเหี่ยวย่นเมื่ออายุมากขึ้น ดังนั้น จึงได้มีการนำสารสกัดองุ่นมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ครีมบำรุงผิว

6. ไลโคปีน (Lycopene)

ไลโคปีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ พบมากในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ นักวิจัยพบว่าไลโคปีนซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงมากสามารถลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งและโรคหัวใจ นักวิจัยได้ทดลองในกลุ่มผู้ชาย 50,000 คน โดยให้รับประทานมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศมากกว่า 10 ครั้งต่อสัปดาห์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสามารถลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. วิตามินซี

นอกจากประโยชน์ในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยป้องกันโรคหวัดและบรรเทาอาการภูมิแพ้แล้ว วิตามินซียังช่วยสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจน เพิ่มความยืดหยุ่นให้กับผิวพรรณ คลายความเครียด ความอ่อนเพลีย แก้สภาวะการเป็นหมันในผู้ชาย โดยช่วยเพิ่มความแข็งแรงและปริมาณของตัวอสุจิอีกด้วย

8. สารสกัดจากใบแปะก๊วย

พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบแปะก๊วย เป็นผลมากจากสารในกลุ่มฟลาโวนไกลโคไซด์ที่มีอยู่กว่า 20 ชนิดในใบแปะก๊วย ซึ่งช่วยต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้ ทั้งนี้นอกจากคุณสมบัติอันโดดเด่นในการป้องกันการเสื่อมของเซลล์สมองและช่วยบำรุงสุขภาพสมองอย่างมีประสิทธิภาพ คุณสมบัติในการเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตทั่วร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่สมองยังช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดอุดตันได้

9. กรดอัลฟาไลโปอิค

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาตินี้ทำหน้าที่สำคัญๆหลายอย่างในร่างกาย การใช้เป็นอาหารเสริมมีบทบาทสำคัญในการช่วยปรับปรุงกระบวนการเผาผลาญน้ำตาลให้เป็นพลังงาน จึงช่วยป้องกันและบรรเทาโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานได้

10. ลูติน

เป็นสารธรรมชาติพบได้มากในพืชผักที่มีสีเขียวเข้ม เช่น ผักกาดเขียว ผักปวยเล้ง ในชีวิตประจำวันนอกจากจะต้องเผชิญกับรังสียูวีในแสงแดดที่กระทบต่อดวงตาโดยตรงแล้ว ยังต้องเผชิญกับแสงจากหน้าจอคอมพิวเตอร์และหน้าจอทีวีวันละหลายๆชั่วโมง เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ในตาอ่อนแอ เสื่อมสภาพหรือตาบอดได้ ซึ่งการรับประทานลูตินจะช่วยป้องกันการเสื่อมของจุดรับภาพและจอประสาทตาได้ดี เพราะมีส่วนร่วมในการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ

11. โคเอนไซม์คิวเทน

มีหน้าที่หลักในกระบวนการสร้าพลังงานในระดับเซลล์ เพื่อให้เซลล์ต่างๆของร่างกายทำงานได้อย่างปกติ หากร่างกายขาดเอนไซม์คิวเทนถึงร้อยละ 75 ก็อาจเสียชีวิตได้ ทั้งนี้เซลล์ที่ต้องการพลังงานสูงและมีความต้องการโคเอนไซม์คิวเทนมากเป็นพิเศษ ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์สมอง เพื่อให้มีความตื่นตัว เพิ่มทักษะในการจดจำและผ่อนคลายจากความตึงเครียด ส่วนเซลล์ผิวหนังต้องการโคเอนไซม์คิวเทนเพื่อช่วยฟื้นฟูความสดใส

## 2.6 สารประกอบฟีนอล (บัวสด, 2549)

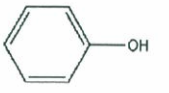
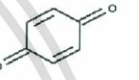
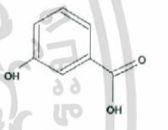
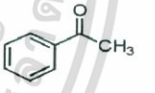
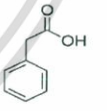
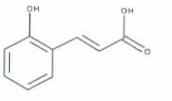
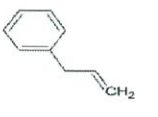
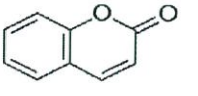
### 2.6.1 สารประกอบฟีนอลหรือสารฟีนอลิก

สารประกอบจำพวกฟีนอลิก เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช มีหลายกลุ่มที่สำคัญเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิกและแทนนิน เป็นต้น ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก แทนที่

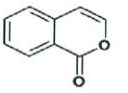
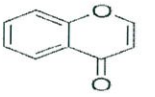
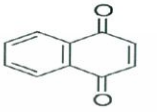
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยไฮดรอกซี กรุ๊ป โดยมากจะเป็นสารที่มีขั้ว ละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปรวมกับหมู่ไฮดรอกซิล น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ เอมีน และไขมัน

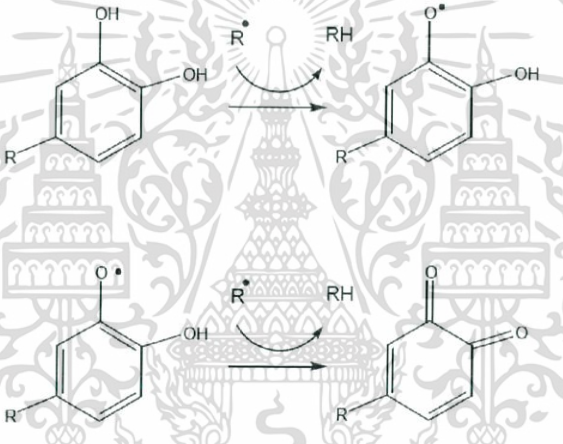
**ตารางที่ 2.3 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลกลุ่มต่าง ๆ**

| กลุ่ม | สูตรอย่างง่าย | โครงสร้างพื้นฐาน |
|---|---|---|
| Simple phenols | $C_6$ |  |
| Benzoquinones | $C_6$ |  |
| Phenolic acids | $C_6$-$C_1$ |  |
| Acetophenones | $C_6$-$C_2$ |  |
| Phenylacetic acids | $C_6$-$C_2$ |  |
| Hydroxycinnamic acids | $C_6$-$C_3$ |  |
| Phenylpropenes | $C_6$-$C_3$ |  |
| Coumarins | $C_6$-$C_3$ |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| Isocoumarins | $C_6$-$C_3$ |  |
| Chromones | $C_6$-$C_3$ |  |
| Naphthoquinones | $C_6$-$C_4$ |  |

ที่มา : บัวสด (2549)




**รูปที่ 2.10** กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอล

ที่มา : http://www.lib.ubu.ac.th/jdb/jubon/pdfjubon/jubon-2006-08-02.76-88.pdf

### 2.6.2 ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระและการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลต่างๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$ROO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROOH + PP^{\bullet}$$
$$RO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROH + PP^{\bullet}$$

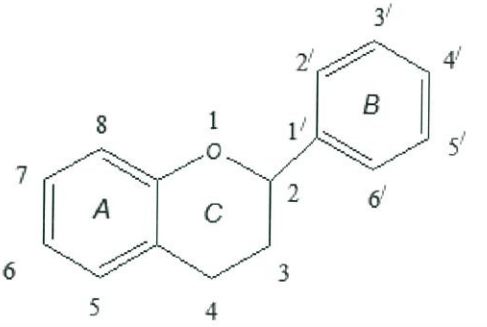
เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีความเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น นอกจากนั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นๆได้ จึงทำให้สารประกอบฟีนอลสามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระได้ถึงสองเท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROOPP$$
$$RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow PP$$

สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้นสามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น เมล็ด (ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวและงา) ผล (องุ่น ส้ม และพริกไทยดำ) ใบ (ชาและเครื่องเทศต่างๆ) และส่วนอื่นๆ (มันเทศ หัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ ฟลาโวนอยด์

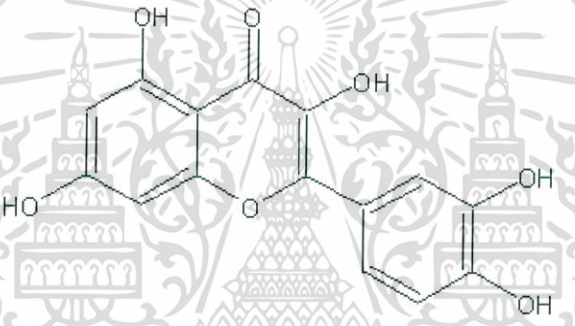
จากการทดลองพบว่าทั้งฟลาโวนอยด์ และ อนุพันธ์กรดซินนามิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีมากในอาหารที่เป็นไขมันและไขมันผสมกับน้ำ และปัจจัยอื่นๆที่ส่งเสริมคุณสมบัติดังกล่าวคือ ตำแหน่งและจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลและโครงสร้างอื่นของโมเลกุลตัวอย่าง เช่น โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ แสดงในรูป 2.11 หมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวน B ซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ในการพิจารณาความสมารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ในกรณีของฟลาโวนอยด์นั้นพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหล่งpara(C4′) วงแหวน B มีผลให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันมากกว่าที่ตำแหน่ง ortho(C2′ และC6′) ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง meta (C3′ และC5′) จะไม่มีสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C5 (วงแหวน A) และ 4-keto group (C=O ที่คาร์บอนตัวที่ 4 ของวงแหวน C) (รูป 2.11) จะเป็นกลุ่มของquercetin ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยากับโลหะ ซึ่งเป็นการช่วยลดการเกิดออกซิเดชันได้อีกทางหนึ่ง ส่วนหมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวน A (รูป2.11) ตำแหน่ง C5 และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C3 และพันธะคู่ระหว่าง C2 และ C3 ในวงแหวน C (รูป 2.11) จะมีผลเล็กน้อยต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่** 2.11 โครงสร้างพื้นฐานและการระบุตำแหน่งคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลฟลาโวนอยด์

ที่มา : บัวสด (2549)




**รูปที่** 2.12 สูตรโครงสร้างของ quercetin

ที่มา : บัวสด (2549)

ในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืช เช่น ผัก ผลไม้ ธัญพืชต่างๆ น้ำผลไม้ ไวน์ เบียร์ ชาและกาแฟจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องจากการสร้างสารประกอบฟีนอลของพืชจะมีปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระสามารถนิยามความหมายของคำว่า สารต้านออกซิเดชันได้ โดยอาศัยหลักพื้นฐาน 2 ข้อดังนี้

1. ที่ความเข้มข้นต่ำ สารตั้งต้นจะถูกชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้

2. อนุมูลอิสระที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสัมพันธ์กับความจุของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถหาได้โดยวิธี Folin-Ciocalteuเป็นการศึกษาการเกิดสีโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายในสภาวะเป็นด่าง หรือในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10) และสาร Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก ($H_3PMo_{12}O_{40}$) และกรดฟอสฟอทังสเทนติก ($H_3PW_{12}O_{40}$) ถูกรีดิวซ์โดยฟีนอลิกไฮดรอกซิล กรุ๊ป ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เกิดเป็นทังสเตนและโมลิบดินัมบลู ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานและรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกหรือ GAE (Gallic Acid Eequivalents)

$C_6H_5OH$ + $Na_2CO_3$ FC reagent ⟶ (Mo-W complex)

สารฟีนอลิก สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน

## 2.7 การวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน

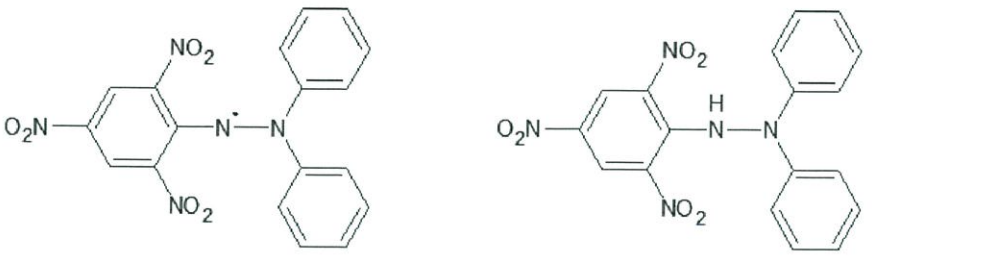
การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC) มีหลายวิธี ได้แก่

- การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogent atom transfer, HAT)
  - วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC)
  - วิธี Total radical – trapping antioxidant parameter (TRAP)
- การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron atom transfer, ET หรือ SET)
  - วิธี Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl assay (DPPH)
  - วิธี The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)
  - วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

### 2.7.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals Scavenging, DPPH)

DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่น จะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังรูป 2.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.13** โครงสร้างของสาร DPPH ที่เป็นอนุมูลอิสระและไม่เป็นอนุมูลอิสระ

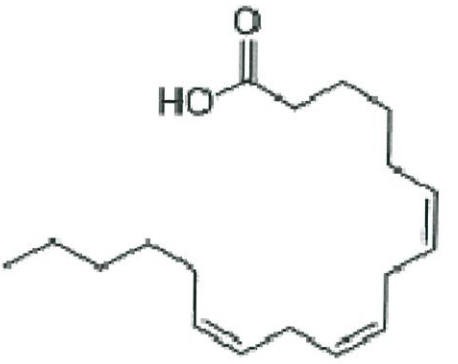
ที่มา : http://pirun.ku.ac.th/~b4755242/7.htm

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เนื่องจากใช้งานง่าย) โดยในการทดสอบนี้จะใช้ DPPH (มีสีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

**2.7.2 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดลิโนลีอิค (Antioxidant activity)**

กรดลิโนลีอิคเป็นกรดไขมันชนิดหนึ่งที่มีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ ดังรูป 2.14 ทำให้กรดนี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในระบบ ทำให้กลายเป็นอนุมูลอิสระ จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็น คอนจูเกตไดอีนที่เสถียร (Erikson, 1987) สารต้านอนุมูลอิสระมีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ ทำให้สารนี้สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ จึงสามารถลดการเกิดเป็นอนุมูลอิสระของกรดลีโนอิกได้ ด้วยเหตุนี้ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระของกรดลิโนลีอิคจึงวัดโดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงในสารละลายที่มีกรดลิโนเลอิคผสมอยู่ ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ค่าที่ได้นี้แปรผันตรงกับความเข้มข้นของไฮโดรเปอร์-ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ดังนั้นการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.14** กรดไขมันลิโนลีอิก

ที่มา : http://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/506-26-3.gif

**2.7.3 การวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)**

สารที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ สามารถจ่ายอิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลในตระกูลของโลหะที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ (เช่น เหล็ก ทองแดง) เหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์ริคไอออน ($Fe^{3+}$) มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ ได้ดี

$$Fe^{3+} + e^{-} \longrightarrow Fe^{2+}$$

ในด้านชีวเคมีอนุมูลอิสระที่พบมากที่สุดเป็นสารที่มีออกซิเจนและไวต่อปฏิกิริยา (ROS) ไอออนอิสระของเหล็กสามารถเป็นตัวเร่งการเกิดอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล เป็นต้น

การทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์เป็นการศึกษาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์หรือเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยสารทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัวจากการวัดปฏิกิริยารีดักชันของ $Fe^{3+}(CN^{-})_6$ ไปเป็น $Fe^{2+}(CN^{-})_6$ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงิน ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์ริกไอออนกับสารสกัดแต่ละชนิดมีค่าคงที่ สามารถตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.7.4 การวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันโดยการฟอกจางสีเบตาแคโรทีน (Beta Carotene Bleaching, BCB)

เป็นวิธีการเพื่อวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัด ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบตาแคโรทีนและกรดลิโนเลอิกในอิมัลชันเฟส โดยหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระของกรดลิโนเลอิกเปอร์ออกไซด์ที่ทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์เบต้าแคโรทีน หากสารสกัดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีจะเข้าไปจับกับอนุมูลของกรดลิโนเลอิกทำให้ลดการสูญเสียสีส้มของเบต้าแคโรทีนลงได้

การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันวิธีการฟอกจางสีเบต้าแคโรทีนทำได้โดยการผสมสารเบต้าแคโรทีนกับกรดลิโนเลอิก โดยมีทวีนเป็นตัวกลางช่วยให้เบต้าแคโรทีนและกรดลิโนเลอิกเข้ากันได้ดี จากนั้นกระตุ้นโดยการใช้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยการแตกตัวของอะตอมไฮโดรเจนออกจากสารกลุ่มไดออลิอิก เมทิลลีน ของกรดลิโนเลอิก ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลซึ่งจะออกซิไดซ์เบต้าแคโรทีนทำให้กลุ่มธาตุที่มีสีส้มของเบต้าแคโรทีนสลายตัว การเปลี่ยนแปลงสีสามารถวัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ถ้าในสารสกัดทดสอบมีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระของกรดลิโนเลอิก ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการสลายตัวหรือการเจือจางสีของเบต้าแคโรทีนได้

### 2.7.5 การวิเคราะห์การจับกับเฟอรัสไอออน (Ferrous ion Chelating Assay, FIC)

เป็นการทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเชลาติง เอเจนต์ หรือ ซีควิสแทรนซ์ ได้แก่ กรดซิตริกกรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

วิธีการทดสอบความสามารถในการรวมตัวหรือแย่งจับโลหะไอออน เช่น เหล็กไอออนของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ซึ่งตัวโลหะไอออนนี้จะเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาเคมีของสารที่จะทำให้เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระต่าง ๆ ได้ จากปฏิกิริยาเคมี เมื่อเติมสารเฟอร์โรไซด์ลงไปจะไปจับกับเฟอรัสไอออน ($Fe^{2+}$) แล้วจะอยู่ในรูป เฟอร์โรไซด์-$Fe^{2+}$ คอมเพล็กซ์ ซึ่งจะให้สีแดงและถ้าสารสกัดทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับ $Fe^{2+}$ จะทำให้สีแดงของ เฟอร์โรไซด์-$Fe^{2+}$ คอมเพล็กซ์ จางลงได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 การคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อาศัยวิธี Aseptic technique หมายถึง วิธีการป้องกันไม่ให้เชื้อจากภายนอกเข้าไปปะปน (contaminate) ในระหว่างการปฏิบัติการต่างๆ เช่น การเขี่ยเชื้อ การเพาะเชื้อ การบรรจุอาหารลงในจานเพาะเชื้อ (pour plate) การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มีวิธีการดังต่อไปนี้ คือ

### 2.8.1 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate)

วิธีนี้ใช้กับแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นมากๆค่อยๆกระจายออกไป หรือมีความเจือจางพอที่จะทำให้แต่ละเซลล์แยกออกจากกัน การที่จะให้เชื้อแยกออกจากกันได้ดีนั้นต้องขีดให้ได้ระยะทางยาวที่สุด ถ้าหากเชื้อยังซ้อนทับกันให้ทำการขีดเชื้ออีกครั้ง (restreak) การขีดเชื้อแบ่งเป็น

1. การขีดเชื้อแบบง่าย (simple streak)

ใช้ลูปลนไฟจนร้อนแดง ขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อจากจุดเริ่มต้น ขีดไปเรื่อยๆจำนวนแบคทีเรียจะเหลือน้อยลงจนแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว

2.การขีดเชื้อแบบตัดกัน (cross streak)

เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในห้องปฏิบัติการ โดยทำการเผาลูปจนร้อนแดงแล้วขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อขีดตามแนวแรกจำนวน 3-4 เส้น แนวที่ 2 ให้ลากต่อจากแนวแรกจำนวน 3-4 เส้น แนวที่ 3 ให้ลากต่อจากแนวที่ 2 จำนวน 3-4 เส้น และแนวที่ 4 ให้ลากต่อจากแนวที่ 3 โดยที่รอยขีดเชื้อของแนวที่ 1 และ 4 จะต้องไม่ชนกัน โดยที่เชื้อในแนวที่ 1 จะมีจำนวนและความหนาแน่นมากที่สุด และเชื้อในแนวที่ 4 จะมีจำนวนและความหนาแน่นน้อยที่สุด

**รูปที่ 2.15** การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate)

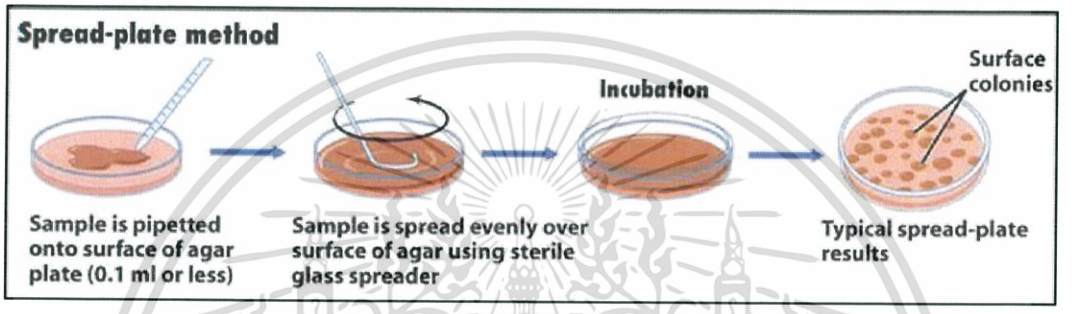
ที่มา : http://media1.shmoop.com/images/biology/biobook_prokar_graphik_20.png

### 2.8.2 การทำให้เชื้อกระจาย (spread plate)

การเจือจางเชื้ออย่างเป็นลำดับ (serial dilution) การทำเจือจางโดยใช้ตัวทำเจือจาง (diluent) โดยมีการใช้น้ำเกลือ (normal saline solution, NSS) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

buffer) และน้ำกลั่น เป็นต้น ใช้ปริมาตร 9 มิลลิลิตรผสมกับเชื้อ 1 มิลลิลิตรจะได้เป็นระดับความเจือจางที่ 10-1 จากนั้นดูดเชื้อจากหลอดขั้นต้น 1 มิลลิลิตรใส่หลอดถัดไปซึ่งมีตัวเจือจางอยู่ 9 มิลลิลิตร จะได้เป็นระดับความเจือจางที่ 10-2 ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนกว่าจะได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ เรียกว่า การทำเจือจางสิบเท่า (tenfold dilution) นำระดับความเจือจางที่ต้องการมาทำให้เชื้อกระจาย (spread plate) โดยดูดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายไปทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล วิธีนี้มีข้อดีคือใช้ตัวอย่างเพียงแค่เล็กน้อย



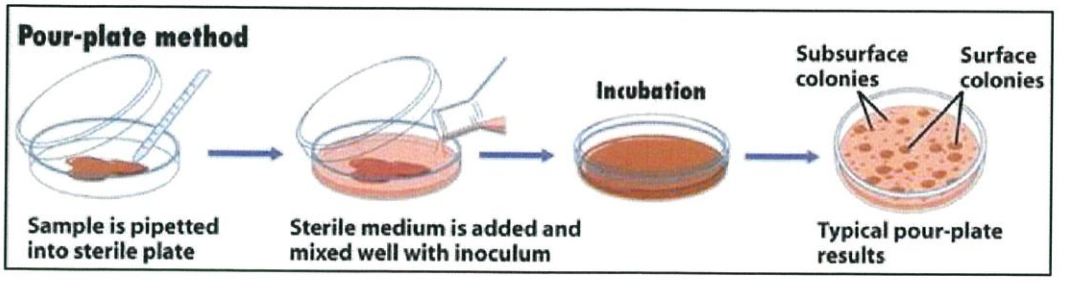

**รูปที่** 2.16 การทำให้เชื้อกระจาย (spread plate)

ที่มา :
http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/pharm/prov_pharm/ptn/Microbiologyimage006.jpg

### 2.8.3 การเทเพลท (pour plate)

ทำการเจือจางเชื้อแบบ ten-fold dilution นำระดับการเจือจางที่ต้องการมาทำการเทเพลท (pour plate) โดยดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่กำลังหลอมเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานที่มีเชื้อ หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เชื้อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจนทั่วจาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.17** การเทเพลท (pour plate)

ที่มา :

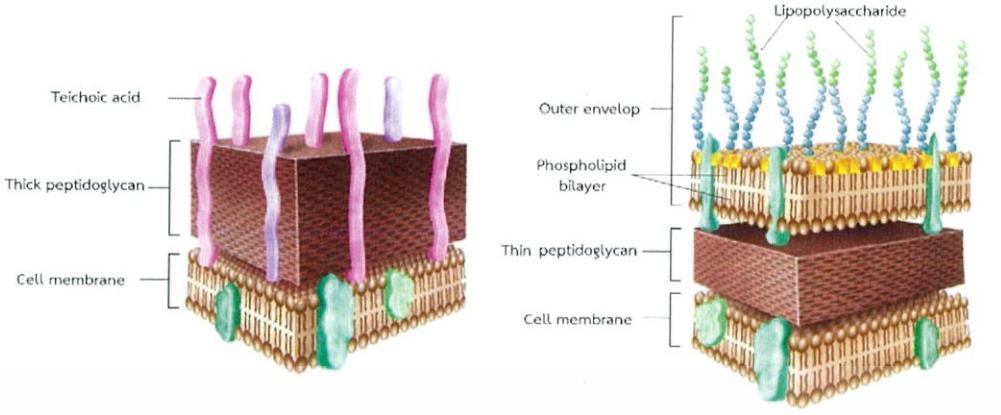
http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/pharm/prov_pharm/ptn/Microbiologyimage006.jpg

## 2.9 การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) (กัญจนา ธีระกุลและคณะ, 2544)

การย้อมสีแบบแกรม เป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิด สีย้อมแรกเรียกว่า primary stain คือ คริสตัล ไวโอเลต (crystal violet) มีสีม่วงหรือน้ำเงินส่วนสีที่สองเรียกว่า counter stain หรือ secondary stain สีที่ใช้คือ ซาฟานิน โอ(safranin O) มีสีแดงโดยการย้อมสีในขั้นแรกย้อมเชื้อที่สเมียร์และผ่านการตรึงแล้วด้วยคริสตัล ไวโอเลตเซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์บนรอยสเมียร์จะติดสีน้ำเงินหรือม่วง เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนาจึงติดคริสตัล ไวโอเลตได้ดีและเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสี คริสตัล ไวโอเลตกลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยแอลกอฮอล์ 95% แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อย ผลึกของคริสตัล ไวโอเลตยังคงติดแน่นอยู่ ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยซาฟานินโอ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบเดิมไม่ติดสีจะติดสีแดงในขั้นตอนนี้ จึงเห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มอย่างชัดเจน

การจำแนกแบคทีเรียอย่างคร่าว ๆ ออกเป็นสองกลุ่มนี้นอกจากจะมีประโยชน์อย่างมากในการค้นคว้าวิจัยทางจุลชีววิทยาแล้ว ยังใช้ในการวิเคราะห์โรคติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดและยังช่วยในการพิจารณาตัวยาที่จะใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ เหล่านั้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.18** ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (a) และแบคทีเรียแกรมลบ (b)

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/uploaded/_199.JPG

## 2.10 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส(Cytochrome oxidase enzyme) (นันทนา, 2537)

การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดสCytochrome oxidase ของแบคทีเรียบางชนิดซึ่งใช้แยกแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae*กับ *Vibrioaceae* อาศัยหลักการที่แบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์มีขบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation) สำหรับขบวนการหายใจและสร้างพลังงาน ในระหว่างที่ขบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นจะมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ออกซิเจนโดยผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน โดยอาศัยการทำงานของไซโตโครมต่างๆ (cytochrome)ซึ่งก็คือ ลูกโซ่ของเอนไซม์ ผลที่ได้ทำให้เกิดน้ำ ไซโตโครมสุดท้ายที่จับออกซิเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือยีสต์เป็นไซโตโครม ซี

ตรวจสอบโดยใช้รีเอเจนต์ที่ปกติไม่มีสี ซึ่งจะมีสีเมื่อถูกออกซิไดซ์ รีเอเจนต์ที่ใช้มีสองชนิด คือ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride หรือ dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride รีเอเจนต์ทั้งสองชนิดปกติจะไม่มีสี แต่จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเมื่อถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดสจะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

<u>การอ่านผล</u>

ผลบวก : เชื้อเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม

ผลลบ : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.11 การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme) (นันทนา, 2537)

การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส(Catalase enzyme) เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แตกออกให้ก๊าซออกซิเจนและน้ำ ดังสมการ

การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสนี้มีประโยชน์ในการจำแนกแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ออกจากสกุล *Streptococcus* spp. โดยที่ *Staphylococcus* ให้เอนไซม์คะตะเลส แต่ *Streptococcus* spp. ไม่ให้และแบคทีเรีย*Mycobacterium spp.* ทุกชนิด ยกเว้น *M. gastri* และ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาไอโซไดอาซิด (isodiazid) สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้

การอ่านผล

ผลบวก : มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ : ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

## 2.12 การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย Analytical Profile Idex (API)

ชุดทดสอบ API เป็นชุดทดสอบสำหรับจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน โดยอาศัยหลักการทดสอบทางชีวเคมี 21ชนิด โดย Strip ของชุดทดสอบ API เป็นแถบพลาสติกประกอบด้วยหลุมหรือช่องที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) จำนวน 21 ช่อง ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเติมสารละลายของเชื้อลงไปในช่องที่บรรจุสารเคมีเชื้อจะสามารถเจริญและใช้สารเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น เช่น การเปลี่ยนสีความขุ่นหลังจากบ่มเพาะเชื้อนำมาเติมสารทดสอบลงไป จากนั้นให้ทำการอ่านผล และบันทึกผลที่ได้จากการทดสอบนำไปแปรผลโดยใช้โปรแกรม API web เพื่อระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.12.1 ชุดทดสอบ API 20 E

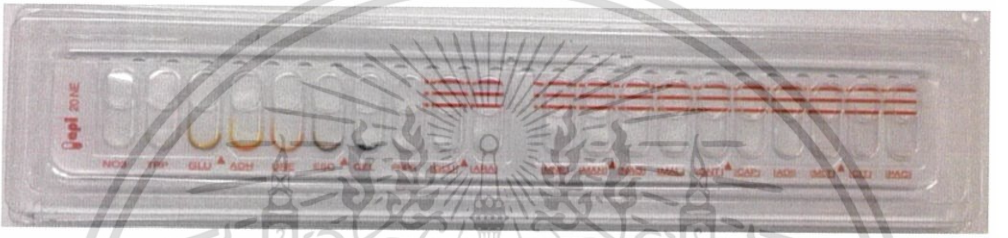
ชุดทดสอบ API 20 E เป็นชุดทดสอบที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และไม่มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยต้องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนทำการอ่านผล

**รูปที่ 2.19** ชุดทดสอบ API 20 E

### 2.12.2ชุดทดสอบ API 20 NE

ชุดทดสอบAPI 20 NE เป็นชุดทดสอบที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และมีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยต้องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก่อนทำการอ่านผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.20** ชุดทดสอบ API 20 NE

## 2.13 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย

แบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตดังต่อไปนี้

### 2.13.1 พลังงาน (Energy)

- แหล่งพลังงานจากแสง แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสงเรียกว่า Phototroph
- แหล่งพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชั่น (Oxidation) ของสารเคมีแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันเรียกว่า Chemotroph

### 2.13.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources)

แหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ แบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของสารอนินทรีย์สามารถเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์โบไฮเดรต เรียกว่า Autotroph ถ้าได้พลังงานจากแสงอาทิตย์ด้วยเรียกว่า Photoautotroph ถ้าได้พลังงานจากการออกซิเดชันของสารเคมีด้วยเรียกว่า Chemoautotroph ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของสารอินทรีย์เรียกว่า Heterotroph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.13.3 แหล่งของอิเล็กตรอน (Electron Sources)**

แบคทีเรียต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม พวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเรียกว่า Lithotroph ส่วนพวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเรียกว่า Organotroph

**2.13.4 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)**

แหล่งของไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น เกลือไนไตรท์ ไนเตรต หรือแอมโมเนียม

**2.13.5 แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส**

ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น น้ำและสารอาหารแหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดแหล่งของฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิด กรดไทโคอิกและสารอื่น ๆ

**2.13.6 ไอออนของโลหะหนัก**

ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรียเช่น $K^{+}$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Fe^{2+}$ เป็นต้น ซึ่งบางชนิดจัดเป็น Co factor ที่สำคัญของเอนไซม์ต่าง ๆ

**2.13.7 วิตามิน**

แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อยแต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตมากโดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 2.14 เทคนิคการคงสภาพและการเก็บรักษาเชื้อ

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ เป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการเก็บรักษายืนให้คงไว้ตลอดไป และสามารถนำมาใช้ได้เมื่อต้องการ เพราะในธรรมชาติจุลินทรีย์อาจสูญพันธุ์และกลายพันธุ์ได้ทุกเวลา ซึ่งหมายถึงการสูญเสียแหล่งพันธุกรรมที่มีคุณค่าไปซึ่งไม่อาจนำกลับมาได้อีก เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยหรือปฏิบัติทางพันธุวิศวกรรมได้แก่ หน่วยงานระหว่างประเทศที่ให้การสนับสนุนการเก็บรักษาจุลินทรีย์แก่ประเทศต่างๆ คือ MIRCEN (Microbiological Resource Center ) และ World Federation for Culture Collections (WFCC) และสถาบันเก็บรักษาเชื้อในแต่ละประเทศ เช่น American Type Culture Collections (ATCC), Northern Research Center (NRRL) ของสหรัฐอเมริกา และ National Collection of Type Culture (NCTC) ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อังกฤษ สำหรับในประเทศไทยมีศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์อยู่ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เรียกว่า Bangkok-MIRCEN

หลังจากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเชื้อผสม (mixed culture) ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ขั้นตอนต่อไปคือ การเพาะเชื้อบนอาหารแข็งหรืออาหารวุ้นในจานเพาะเชื้อ (plate หรือ petridish) หรือบนอาหารวุ้นเอียง (agar slant) และถ่ายโอนสู่อาหารใหม่ทุกสัปดาห์หรือทุกเดือน เพื่อให้เชื้อดำรงชีวิตอยู่ได้ ช่วงระยะเวลาในการถ่ายโอนขึ้นอยู่กับภาวการณ์สะสมของเสียและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ช่วงระยะเวลาการถ่ายโอนเชื้อสู่อาหารใหม่จะสั้นเข้า บางครั้งมีการถ่ายโอนจุลินทรีย์ลงบนอาหารเพาะเชื้อคงสภาพ (maintenance media) ซึ่งเป็นอาหารเพาะเชื้อที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตอยู่ได้ แต่มีการเจริญน้อยมาก เพื่อลดปริมาณการใช้อาหารและการสะสมของเสีย ทำให้เชื้ออยู่ได้นานขึ้น หรือช่วงระยะเวลาการถ่ายโอนสู่อาหารใหม่ยืดเวลายาวนานขึ้น การเก็บรักษาเชื้อควรทำการเพาะเชื้อบนอาหารวุ้นเอียง 2 หลอดๆหนึ่งเป็นเชื้อใช้งาน (working culture) เก็บรักษาเชื้อไว้สำหรับงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำอยู่เป็นประจำ ส่วนอีกหลอดเป็นเชื้อเก็บสะสม (stock culture) เก็บรักษาเชื้อไว้ใช้ระยะยาวหรือเป็นคลังของเชื้อ ถ้าต้องการเก็บรักษาเชื้อไว้เป็นระยะเวลายาวนาน อาจใช้กรรมวิธีการทำให้เชื้อแห้งโดยเร็วในสภาพเยือกแข็ง (freeze-drying)

### 2.14.1 การเก็บรักษาในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด และมักใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เป็นการเก็บในระยะเวลาอันสั้น โดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในหลอดอาหาร เมื่อเชื้อเจริญสูงสุดและจะเข้าสู่ระยะที่จะตายลงต้องทำการถ่ายเชื้อสู่อาหารหลอดใหม่ ซึ่งระยะที่จะต้องถ่ายเชื้อแต่ละครั้งจะแตกต่างกันไป แล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของอาหารที่ใช้ ซึ่งอาจจะแตกต่างกันมีตั้งแต่หนึ่งสัปดาห์ถึงหกเดือน การเก็บหลอดเลี้ยงเชื้อไว้ในที่เย็น เช่น ตู้เย็นและการใช้ฝาเกลียวปิดแน่นแทนจุกสำลีจะทำให้เชื้อเจริญช้าลง อากาศไม่ผ่านเข้าออก ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งช้าลง หรือปิดทับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟินเหลว (liquid paraffin) เป็นการยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อออกไปได้อีก แต่ในการถ่ายเชื้อบ่อยๆมักจะทำให้เกิดผลเสียหาย เช่น เกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น (contamination) เกิดความผิดพลาดหรือสับสนในการถ่ายเชื้อแต่ละชนิดตลอดจนต้องเสียเวลา แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จำเป็นสำหรับเชื้อบางชนิดที่ใช้วิธีอื่นๆ เก็บรักษาไม่ได้ เช่น เชื้อที่ไม่ทนทานต่ออุณหภูมิที่เย็นจัดหรือความแห้ง

### 2.14.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพแห้ง (drying)

จุลินทรีย์ในสภาพแห้งจะทำให้มีอัตราเมตาบอลิซึมต่ำลงทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น นิยมเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยให้จุลินทรีย์อยู่ร่วมกับตัวรองรับ (medium) เช่น ดิน ทราย หรือ ซิลิกาเจล ซึ่งจะทำให้สะดวกในการนำจุลินทรีย์มาใช้ ในทำนองเดียวกันก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่จะตายได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาพแห้งหรือขาดน้ำ เช่น เชื้อ*Vibrio* spp. และ *Pseudomonas* spp. ดังนั้นจะเก็บรักษาโดยวิธีนี้ไม่ได้ผล การเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีทำให้แห้งนี้นิยมปฏิบัติน้อยกว่าวิธีอื่นๆ จะใช้กับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนทานต่อสภาพเย็นจัด (freezing) ได้ และจะใช้กับจุลินทรีย์ที่มีสปอร์ มีการใช้สารบางชนิด เช่น หางนมผง (skimmed milk) หรือโซเดียมกลูตาเมท 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมลงไปกับน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนทำให้แห้ง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น

### 2.14.3 การเก็บจุลินทรีย์ในสภาพแช่แข็ง (freezing)

วิธีการเก็บรักษาทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้น เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงผสมเชื้อกับสารป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายในขณะแช่แข็ง (cryoprotective agent) เช่น กลีเซอรอลหรือ ไดเมทิลซัลออกไซด์ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายใส่หลอดขนาดเล็ก (cryoyube) ปิดฝาหลอดให้สนิท นำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง -20 องศาเซลเซียส จึงนำไปเก็บในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) วิธีการนี้ใช้เก็บจุลินทรีย์ได้แทบทุกชนิด มีอายุการเก็บรักษาได้ยาวนาน

### 2.14.4 การเก็บจุลินทรีย์โดยวิธีไลโอฟีไลเซชัน (lyophilization)

วิธีการเก็บรักษาทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้น เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงผสมของเหลวตัวกลาง (freeze-drying suspending fluids) เช่น horse serum หรือ skimmed milk จากนั้นถ่ายซัสเพนชันเชื้อเล็กน้อยใส่ในหลอดแอมพูล (ampule) ที่มรสลากชื่อเชื้ออยู่ภายใน จากนั้นนำเข้าเครื่อง lyophilizerซึ่งจะทำให้เชื้ออยู่ในสภาพเย็นจัด (-30 องศาเซลเซียส) และแข็งตัวในสภาพสุญญากาศ การปฏิบัติจะต้องกระทำภายใต้สภาพที่ปลอดเชื้อทุกขั้นตอน ซึ่งการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้จะทำให้จุลินทรีย์คงสภาพมีชีวิตอยู่ได้นานนับเป็นสิบปี

### 2.14.5 การเก็บรักษาเชื้อภายใต้น้ำมัน

การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดอาหารเอียง (Agar Slope Culture) หรือภายในอาหารวุ้น (Stab Culture) ก่อน เมื่อเชื้อเจริญแล้วเทพาราฟินเหลว หรือมิเนอรอลออยที่ปลอดเชื้อปิดทับเชื้อโดยใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Hot Air Oven) หรือใช้หม้อนึ่งภายใต้ความดัน 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

## 2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rashid (2015) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิที่ได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Bacillus megaterium* ที่คัดแยกจากรากของต้นข้าวสาลีในประเทศอิรักโดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย โดยทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารทุติยภูมิจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*B. megaterium* ทุกระดับความเข้มข้นจาก 1.95 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ที่ดีมาก (20-80%)

Krishnan และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมะละกอทั้งหมด 4 สายพันธุ์ สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 3 ตัวได้แก่ *Bacillus* (PE-LR-1และPE-LR-3) และ *Kocuria* (PE-LR-2) ซึ่งได้ทำการเก็บผลมาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระทุกๆ 20, 23, 27 และ 31 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Bacillus* (PE-LR-3) นั้นให้ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมีค่าประมาณ 61.2 %

Lanna-Filho และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาโปรตีนที่สกัดได้จากเอนโดไฟต์ *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) and *Bacillus pumilus* (BP) จาก ลำต้นของมะเขือเทศ พบว่า สารสกัดโปรตีนนี้สามารถช่วยป้องกันโรคพืชจาก *Xanthomonas vesicatoria* ได้ และยังช่วยเพิ่มการสร้างเอนไซม์ peroxidase (POD) และเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO)

Huang และ คณะ (2007) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านทานอนุมูลอิสระจากเชื้อราที่ทำการคัดแยกจากพืชสมุนไพร พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด หมายความว่าสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระของเอนโดไฟต์ และนอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

### 3.1.1 วัสดุ

1. แป้งถั่วเขียวยี่ห้อ ต้นสน
2. แป้งมันฝรั่งยี่ห้อ มือที่ 1

### 3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เอทานอลความเข้มข้น 95% (RCI-Labscan, Thailand)
2. กรดแอสคอร์บิก (Fisher Chemical, UK)
3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
4. Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma-Aldrich, USA)
5. กรดแกลลิก (SRL, India)
6. โซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) (APSAjax Finechem, USA)
7. สีย้อมคริสตัลไวโอเลต
8. สารละลายไอโอดีน
9. สีย้อมซาฟานิน
10. N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD)(Acros Organics, USA)
11. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น3%
12. พาราฟินเหลว
13. สูตรอาหาร NA (ภาคผนวก ก)
14. สูตรอาหาร NB (ภาคผนวก ก)
15. สูตรอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง (ภาคผนวก ก)

### 3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องอัลตราโซนิก (CREST, New York)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)
3. เครื่องเขย่า (Oskon, U.S.A)
4. ตู้อบลมร้อน (ConthermThermotec2000, Germany)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (TOMY รุ่น ES-315, Japan)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (Holten Lamina, Denmark)
7. เครื่องเหวี่ยงแยก (Falcon 6/300, U.K.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) (Heidolph, Germany)
9. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Unicoรุ่น UV-2800A, USA)
10. ฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร (SCHOTT,Germany)
11. บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร (SCHOTT,Germany)
12. ปาสเตอร์ปิเปต (Hirschmann Laborgerate)
13. กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร
14. ขวดรีเอเจนต์ขนาด 500 มิลลิลิตร
15. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร
16. 96-well plate
17. จานเพาะเชื้อ
18. แท่งแก้วคนสาร
19.ลวดเขี่ยเชื้อ
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
22. สไลด์ (Pearl, Chaina)
23. เครื่องชั่ง (Sartonius)
24. ช้อนตักสาร
25. ถ้วยกระดาษสำหรับชั่งสาร

**3.1.4 เชื้อแบคทีเรีย**

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากผลมะเขือเทศโดยนักศึกษาสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 18 ไอโซเลต

## 3.2 วิธีการทดลอง

**3.2.1 การถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากหัวเชื้อบริสุทธิ์**

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ทั้ง 18 ไอโซเลต มาถ่ายเชื้อลงบนเพลทที่มีอาหาร NA เพื่อศึกษาต่อไป มีวิธีการดังนี้

3.2.1.1 นำลูปเผาไฟจนร้อนแดงและทิ้งให้ลูปเย็น

3.2.1.2 ทำการเขี่ยเชื้อจากหลอดที่มีเชื้อบริสุทธิ์ถ่ายเชื้อลากแนวขวางลงบนอาหาร NA

3.2.1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไว้รอทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย**

3.2.2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร NA

ศึกษาจากลักษณะต่าง ๆ ของโคโลนีได้แก่สังเกตขนาดสีการยกตัวลักษณะพื้นผิว รูปร่างขอบและความสามารถในการส่องผ่านของแสงของโคโลนี

3.2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการย้อมสีแกรม (Gram's stain) ที่ดัดแปลงมาจาก กัญจนา ธีระกุล และคณะ (2544) มีวิธีการดังนี้

1. ทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากคราบไขมัน ทดสอบว่าสไลด์นั้นไม่มีไขมันติดอยู่โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ น้ำจะแผ่กระจาย

2. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำแตะลงบนสไลด์ 1-2 ลูป แล้วใช้ลูปที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นแล้วเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งให้ติดลวดเขี่ยเชื้อเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำแล้วสเมียร์ให้กระจายเป็นวงเล็ก ๆ ทิ้งไว้ให้รอยสเมียร์แห้งเองและทำการตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

3. หยดสีคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

4. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้งชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์และทิ้งไว้นาน 1 นาที

5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้งชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาทีล้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบา ๆ

6. ซับด้วยกระดาษซับแล้วย้อมทับด้วยการหยดสีซาฟานินโอให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้นาน 1 นาที

7. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

8. นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

**3.2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase enzyme)**

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส โดยวิธี Oxidase test ที่ดัดแปลงมาจาก นันทนาและคณะ (2537) มีวิธีการดังนี้

3.2.3.1 เตรียมสารละลาย DMPD เข้มข้น 1%ในน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.2.3.2 นำลูปเขี่ยเชื้อที่ผ่านการเผาไฟให้ร้อนแดง รอให้เย็น

3.2.3.3 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียเอนโดไฟต์แตะลงบนกระดาษกรอง

3.2.3.4 หยดสารละลายDMPDลงบนเชื้อ 1 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.5 สังเกตการเปลี่ยนแปลงหากเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 20 วินาที บันทึกผลเป็นบวก เปลี่ยนเป็นสีม่วงหลัง 20 วินาที บันทึกผลเป็นลบ

**3.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme)**

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยวิธี Catalase test ที่ดัดแปลงมาจาก นันทนาและคณะ (2537) มีวิธีการดังนี้

3.2.4.1 นำลูปเขี่ยเชื้อที่ผ่านการเผาไฟให้ร้อนแดง รอให้เย็น

3.2.4.2 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียเอนโดไฟต์แตะลงบนสไลด์

3.2.4.3 หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) เข้มข้น 3 % ลงบนเชื้อ

3.2.4.4 สังเกตการเปลี่ยนแปลงหากเกิดฟองก๊าซ บันทึกผลเป็นบวก ไม่เกิดฟองก๊าซบันทึกผลเป็นลบ

**3.2.5 การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย Analytical Profile Idex(API)**

3.2.5.1 ชุดทดสอบ API20E

1. เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์แล้วลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 ml ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

2. เติมน้ำกลั่นในกล่องพลาสติกสำหรับบ่มเชื้อ (incubation box)

3. นำ strip วางลงในกล่องพลาสติกสำหรับบ่มเชื้อ (incubation box) ที่เติมน้ำกลั่นแล้ว

4. ใช้ปาสเตอร์ปิเปตดูดสารละลายแบคทีเรียลงในกระเปาะของ stripทุกช่อง แต่สำหรับช่อง CIT VP และ GEL ให้เติมสารละลายเชื้อจนเต็มกระเปาะ (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ)

5. หยด mineral oil ปิดทับจนเต็มกระเปาะ สำหรับช่องที่มีสัญลักษณ์ขีดเส้นใต้ซึ่งได้แก่ช่อง ADH,LDC, ODC, $H_2S$, และ URE

6. ปิดฝากล่องนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชั่วโมง

7.อ่านผล strip โดยอ่านผลของกระเปาะที่ไม่ได้หยด reagent แล้วบันทึกผลลงในกระดาษบันทึกผล

8. หยด reagent ลงในกระเปาะของ strip ดังนี้

8.1) หยด TDA reagent 1 หยดลงในช่อง TDA แล้วอ่านผลทันที

8.2) หยด JAMES หรือ Covacs reagent 1 หยด ลงในช่องIND แล้วอ่านผลทันที

8.3) หยด VP1 reagent และVP2 reagent อย่างละ 1 หยด ลงในช่อง VP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. บันทึกสีที่เกิดขึ้นแล้วนำไปแปรผลโดยใช้โปรแกรม API WEP

3.2.5.2 ชุดทดสอบ API20NE

1. เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์แล้วลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 ml ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

2. เติมน้ำกลั่นในกล่องพลาสติกสำหรับบ่มเชื้อ (incubation box)

3. นำ strip วางลงในกล่องพลาสติกสำหรับบ่มเชื้อ (incubation box) ที่เติมน้ำกลั่นแล้ว

4. ใช้ปาสเตอร์ปิเปตดูดสารละลายแบคทีเรียลงในกระเปาะของ strip ทุกช่อง แต่สำหรับช่อง GLU ถึงช่อง PAC ให้เติมสารละลายเชื้อจนเต็มกระเปาะ (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ)

5. หยด mineral oil ปิดทับจนเต็มกระเปาะ สำหรับช่องที่มีสัญลักษณ์ขีดเส้นใต้ซึ่งได้แก่ช่อง GLU, ADHและ URE

6. ปิดฝากล่องนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 48ชั่วโมง

7. บันทึกผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในช่อง GLU, ADH , URE , ESC , GEL และ PPG

8. หยด reagent ลงในกระเปาะของ strip ดังนี้

8.1) หยด NIT1 และ NIT2 จำนวน 1 หยดลงในช่อง $NO_3$ สังเกตผลหลังจากผ่านไป 5 นาที

8.2) หยด JAMES reagent 1 หยด ลงในช่อง TRPแล้วสังเกตผลทันที

9. บันทึกผลที่เกิดขึ้นแล้วนำไปแปรผลโดยใช้โปรแกรม API WEP

**3.2.6 การเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์**

3.2.6.1 การเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย

1. เตรียมอาหารเหลว NB ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. นำลูปไปผ่านเปลวไฟจนร้อนแดง รอให้ลูปเย็น แล้วเขี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนี ใส่ลงไปในอาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวที่มีการเติมแป้ง

1. เตรียมอาหารเหลว NB ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 200 มิลลิลิตร โดยมีการเติมแป้งถั่วเขียว และแป้งมันฝรั่งความเข้มข้น 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ลงไปในแต่ละฟลาสก์ จากนั้นนำอาหารที่เตรียมได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ (จากข้อ 3.2.6.1) ลงไป 4 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

3.2.6.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรียและสารเมตาบอไลต์ภายนอกเซลล์

1. นำสารละลายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงครบ 5 วัน ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเหลว

2. เก็บอาหารเหลวไว้ในขวดเก็บตัวอย่าง เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3. ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

4. นำตะกอนเซลล์ไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอนที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และนำมาชั่งน้ำหนักจนมีน้ำหนักคงที่

3.2.6.4 การสกัดสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์

1. นำเซลล์แห้งของแบคทีเรียมาสกัดด้วยเอทานอล โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. ทำการแยกสารสกัดออกจากตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน

4. เก็บสารสกัดใส่ขวดสีชา เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

**3.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(Total phenolic content)**

นำสารสกัดเมตาบอไลต์ภายนอกและภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ที่ดัดแปลงมาจาก Kalkan และคณะ (2015) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้น 10% โดยปริมาตร โดยปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่หุ้มด้วยฟอยล์กันแสง

2. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 7.5 %โดยมวลต่อปริมาตร โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 3.75 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3.2.7.1 สารสกัดภายนอกเซลล์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1000ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.001 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 20 – 200ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตาราง3.1

**ตารางที่ 3.1** แสดงการเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นในช่วง 20 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารละลายกรดแกลลิก (มิลลิลิตร) | เอทานอลเข้มข้น 95 % (มิลลิลิตร) |
|---|---|---|
| 1000 | - | - |
| 200 | 0.20 | 0.80 |
| 180 | 0.18 | 0.82 |
| 160 | 0.16 | 0.84 |
| 140 | 0.14 | 0.86 |
| 120 | 0.12 | 0.88 |
| 100 | 0.10 | 0.90 |
| 80 | 0.08 | 0.92 |
| 60 | 0.06 | 0.94 |
| 40 | 0.04 | 0.96 |
| 20 | 0.02 | 0.98 |
| 0 | - | 1 |

3. ปิเปตสารสกัดภายนอกเซลล์ ปริมาตร 0.016 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate

4. ปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 0.064 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม

5. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.040 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม

6. ปิเปตน้ำกลั่น ปริมาตร 0.080 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7.2 สารสกัดภายในเซลล์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.0005 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. เจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 20 – 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตาราง 3.2

**ตารางที่ 3.2** แสดงการเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นในช่วง 20 – 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | สารละลายกรดแกลลิก (มิลลิลิตร) | เอทานอลเข้มข้น 95 % (มิลลิลิตร) |
|---|---|---|
| 500 | - | - |
| 140 | 0.28 | 0.72 |
| 120 | 0.24 | 0.76 |
| 100 | 0.20 | 0.80 |
| 80 | 0.16 | 0.84 |
| 60 | 0.12 | 0.88 |
| 40 | 0.08 | 0.92 |
| 20 | 0.04 | 0.96 |
| 0 | - | 1 |

3. เตรียมสารละลายสารสกัดภายในเซลล์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล

4. ปิเปตสารสกัดภายนอกเซลล์ ปริมาตร 0.016 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate

5. ปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 0.064 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม

6. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.040 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม

7. ปิเปตน้ำกลั่น ปริมาตร 0.080 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.8 การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)**

นำสารสกัดภายนอกและภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมาทำการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยดูความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดัดแปลงมาจาก Pieniz และคณะ (2015) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH มา 0.0059 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่หุ้มฟอยล์กันแสง

3.2.8.1 สารสกัดภายนอกเซลล์

1. ปิเปตสารสกัดภายนอกเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate

2. ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 1มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 517นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)

3.2.7.2 สารสกัดภายในเซลล์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.0005 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ใช้เป็นสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

2. เตรียมสารละลายสารสกัดภายในเซลล์ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล

3. ปิเปตสารสกัดภายในเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate

4. ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition) เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\right] \times 100$$

กำหนดให้ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH

$A_{sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH กับสารสกัด

### 3.2.9 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต มาเก็บรักษาในพาราฟินเหลวโดยมีวิธีการดังนี้

3.2.9.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียง (slant agar)

3.2.9.2 นำพาราฟินเหลวไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.9.3 เทพาราฟินเหลวลงในหลอดอาหารให้มีความสูง 0.5 นิ้ว

3.2.9.4 นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ปัญหาพิเศษนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete randomized design) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 17.0

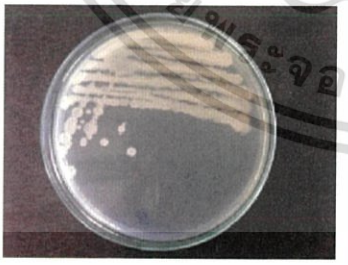
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

## 4.1 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร NA

จากการศึกษาลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง การยกตัว ขอบ และผิวหน้าของโคโลนีบนอาหาร NA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต โดยแสดงผลการศึกษาลักษณะโคโลนีดังตาราง 4.1

**ตารางที่ 4.1** แสดงผลการศึกษาลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร NA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต

| ไอโซเลต | รูปร่างของโคโลนี | ลักษณะของโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | สี | รูปร่าง | การยกตัวของโคโลนี | ขอบ | ผิวหน้า |
| TM4 | | ขาวขุ่น | ไม่แน่นอน | โค้งนูนจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย | หยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ | ผิวเรียบมันวาวโปร่งแสง |
| TM5 |  | ขาวขุ่น | กลม | แบนราบ | เรียบ | ผิวเรียบมันวาวโปร่งแสง |

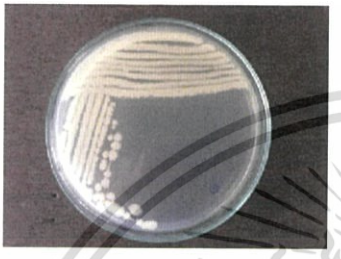
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TM6 | | ขาว ขุ่น | กลม | โค้งนูนจาก ผิวหน้า อาหาร เล็กน้อย | คลื่น โค้งเว้า เล็ก น้อย | ผิวเรียบ มันวาว โปร่ง แสง |
| TM7 | | ขาว ขุ่น | กลม | แบนราบ | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว โปร่ง แสง |
| TM8 | | ขาว ขุ่น | ไม่ แน่นอน | หนาสูง ขึ้นมาจาก ผิวหน้าของ อาหาร เล็กน้อย | คลื่น โค้งเว้า เล็ก น้อย | ผิว ขรุขระ มันวาว ทึบแสง |
| TM9 | | ขาว ขุ่น | กลม | แบนราบ | เรียบ | ผิวย่น มันวาว ทึบแสง |
| TM10 | | ขาว ขุ่น | ไม่ แน่นอน | แบนราบ | เรียบ | ผิวย่น ด้าน ทึบแสง |

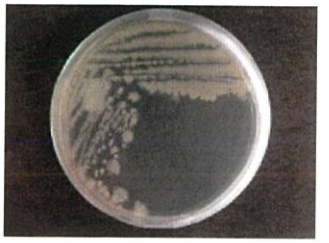
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TM11 | | ขาว ขุ่น | กลม | แบนราบ | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |
| TM12 | | ขาว ขุ่น | กลม | แบนราบ | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |
| TM13 | | ขาว ขุ่น | มีขนาดเล็กมาก เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1mm | แบนราบ | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |
| TM14 | | ขาว ขุ่น | กลม | ความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเล็กน้อย | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |
| TM15 | | ขาว ขุ่น | กลม | ความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเล็กน้อย | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TM16 | | ขาว ขุ่น | ไม่ แน่นอน | ความหนา สูงขึ้นมาจาก ผิวหน้าของ อาหาร เล็กน้อย | โค้งเว้า เล็กน้อย | ผิวเรียบ ด้าน ทึบแสง |
| TM17 |  | ขาว ขุ่น | มีขนาด เล็กมาก เส้นผ่า ศูนย์กลาง น้อย กว่า 1mm | ความหนา สูงขึ้นมาจาก ผิวหน้าของ อาหาร เล็กน้อย | เรียบ | ผิวย่น ด้าน ทึบแสง |
| TM18 | | ขาว ขุ่น | มีขนาด เล็กมาก เส้นผ่า ศูนย์กลาง น้อยกว่า 1mm | ความหนา สูงขึ้นมาจาก ผิวหน้าของ อาหาร เล็กน้อย | เรียบ | ผิวย่น มันวาว ทึบแสง |
| TM19 | | ขาว ขุ่น | มีขนาด เล็กมาก เส้นผ่า ศูนย์กลาง น้อยกว่า 1mm | ความหนา สูงขึ้นมาจาก ผิวหน้าของ อาหาร เล็กน้อย | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |
| TM20 | | ขาว ขุ่น | มีขนาด เล็กมาก เส้นผ่า ศูนย์กลาง น้อยกว่า | แบนราบ | เรียบ | ผิวเรียบ มันวาว ทึบแสง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1mm | | | |
| TM21 |  | ขาวขุ่น | ไม่แน่นอน | ความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเล็กน้อย | คลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย | ผิวเรียบมันวาวโปร่งแสง |

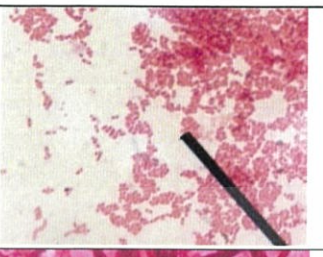
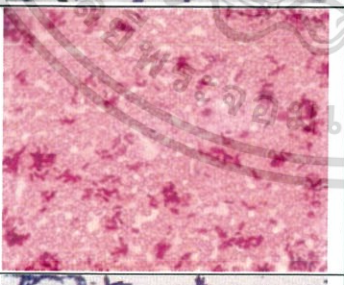
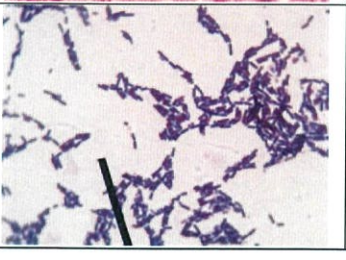
## 4.2 ผลการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การย้อมสีแบบแกรมเป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิด สีย้อมแรกเรียกว่า primary stain คือ คริสตัล ไวโอเลต (crystal violet) มีสีม่วงหรือน้ำเงินส่วนสีที่สองเรียกว่า counter stain หรือ secondary stain สีที่ใช้คือ ซาฟานิน โอ (safranin O) มีสีแดงโดยการย้อมสีในขั้นแรกย้อมเชื้อที่สเมียร์และผ่านการตรึงแล้วด้วยคริสตัล ไวโอเลตเซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์บนรอยสเมียร์จะติดสีน้ำเงินหรือม่วง เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนาจึงติดคริสตัล ไวโอเลตได้ดีและเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสี คริสตัล ไวโอเลตกลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (crystal violetiodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยแอลกอฮอล์ 95% แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อย ผลึกของคริสตัล ไวโอเลตยังคงติดแน่นอยู่ ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยซาฟานินโอ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบเดิมไม่ติดสีจะติดสีแดงในขั้นตอนนี้จึงเห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มอย่างชัดเจน

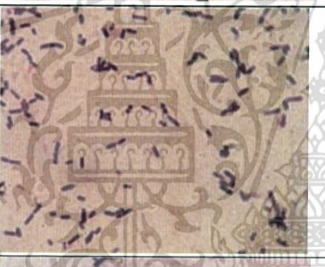
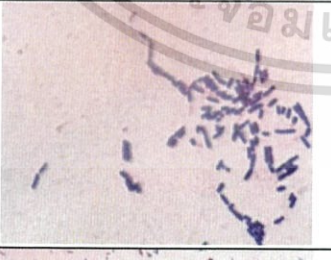
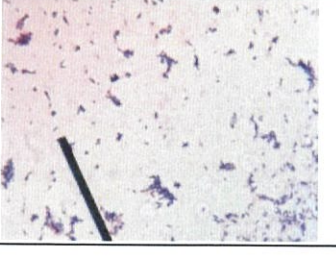
จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต โดยวิธีการย้อมสีแบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ได้ผลการศึกษาดังตาราง 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

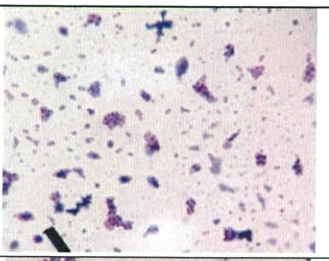
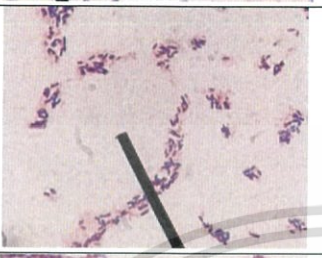
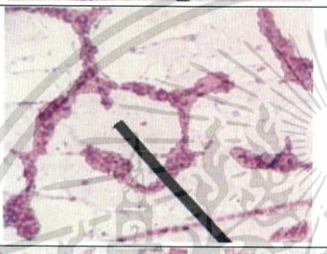
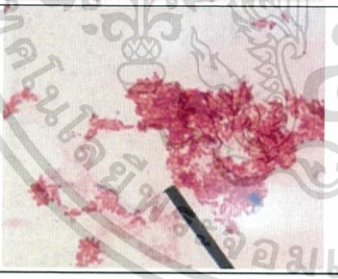
**ตารางที่ 4.2** แสดงผลการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลตโดยการย้อมสีแบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

| ไอโซเลต | ลักษณะแบคทีเรีย | แกรม | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา |
|---|---|---|---|
| TM4 |  | – | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างกลม |
| TM5 | | – | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM6 | | – | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างกลม |
| TM7 | | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM8 |  | – | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างกลม |
| TM9 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| TM10 | | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM11 | | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM12 | | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM13 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM14 | | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่น มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM15 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างกลม |
| TM16 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| TM17 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM18 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM19 |  | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM20 | | + | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย มีรูปร่างท่อนสั้น |
| TM21 |  | – | ตัวเซลล์มีขนาดเล็กมาก และอยู่รวมกันเป็นเส้นสาย มีรูปร่างกลม |

## 4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase enzyme)

การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสอาศัยหลักการที่แบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์มีขบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation)สำหรับขบวนการหายใจและสร้างพลังงาน ในระหว่างที่ขบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นจะมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ออกซิเจนโดยผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน โดยอาศัยการทำงานของไซโตโครมต่าง ๆ (cytochrome) ซึ่งก็คือ ลูกโซ่ของเอนไซม์ ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ได้ทำให้เกิดน้ำ ไซโตโครมสุดท้ายที่จับออกซิเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือยีสต์เป็นไซโตโครม ซี ตรวจสอบโดยใช้รีเอเจนต์สองชนิดคือ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochlorideหรือ dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride รีเอเจนต์ทั้งสองชนิดปกติจะไม่มีสี แต่จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเมื่อถูกออกซิไดซ์ ดังนั้น แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดสจะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

จากการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต โดยใช้รีเอเจนต์สารละลาย 97% *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylenediamine เข้มข้น 1 % ได้ผลการทดสอบดังตาราง 4.3

**ตารางที่ 4.3** แสดงผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต

| ไอโซเลต | ผลการทดสอบ |
|---|---|
| TM4 | + |
| TM5 | + |
| TM6 | + |
| TM7 | - |
| TM8 | + |
| TM9 | + |
| TM10 | + |
| TM11 | + |
| TM12 | + |
| TM13 | + |
| TM14 | + |
| TM15 | + |
| TM16 | + |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| TM17 | + |
| TM18 | - |
| TM19 | - |
| TM20 | + |
| TM21 | - |

หมายเหตุ: + หมายถึง รีเอเจนต์เปลี่ยนเป็นสีม่วง แสดงว่า มีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส

- หมายถึง รีเอเจนต์ไม่เปลี่ยนสี แสดงว่า ไม่มีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส

## 4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme) เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แตกออกให้ก๊าซออกซิเจนและน้ำ ทำการทดสอบโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนสไลด์แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ความเข้มข้น 3% ลงบนเชื้อ 1 หยดสังเกตการเกิดฟองก๊าซ ถ้าเกิดฟองก๊าซแสดงว่าแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ผลการทดสอบ

จากการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต ได้ผลการทดสอบดังตาราง 4.4

**ตารางที่ 4.4** แสดงผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 18 ไอโซเลต

| ไอโซเลต | ผลการทดสอบ |
|---|---|
| TM4 | + |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| TM5 | - |
| TM6 | - |
| TM7 | + |
| TM8 | + |
| TM9 | + |
| TM10 | - |
| TM11 | + |
| TM12 | + |
| TM13 | + |
| TM14 | + |
| TM15 | + |
| TM16 | + |
| TM17 | + |
| TM18 | + |
| TM19 | + |
| TM20 | + |
| TM21 | + |

หมายเหตุ: + หมายถึงเกิดฟองก๊าซ แสดงว่า มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

- หมายถึง ไม่เกิดฟองก๊าซ แสดงว่า ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธีAnalytical Profile Idex (API)

จากการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ TM4 และ TM21 ด้วยสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้วิธี analytical profile idex (API) ซึ่งทำการคัดเลือกไอโซเลตที่นำมาทดสอบจากการย้อมสีแกรม และ คุณสมบัติทางชีวเคมี คือ ดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสให้มีคุณสมบัติตรงตามชุดทดสอบและเตรียมสารละลายเชื้อให้มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 0.5

### 4.5.1 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 E

จากการคัดเลือกไอโซเลตที่นำมาทดสอบ โดยการย้อมสีแกรมและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไอโซเลตที่ตรงกับชุดทดสอบ API 20 E คือ TM21 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบและไม่มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.5

**รูปที่ 4.1** ผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 E หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**ตารางที่ 4.5** แสดงผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียไอโซเลต TM21 ด้วยชุดทดสอบ API 20 E

| ช่องทดสอบ | ผลการทดลอง |
|---|---|
| ONPG | + |
| ADH | - |
| LDC | + |
| ODC | - |
| CIT | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| $H_2S$ | - |
| URE | - |
| TDA | - |
| IND | - |
| VP | + |
| GEL | + |
| GLU | - |
| MAN | + |
| INO | - |
| SOR | + |
| RHA | - |
| SAC | + |
| MEL | - |
| AMY | - |
| ARA | - |
| OX | - |

หมายเหตุ : + แสดงผล Positive

\- แสดงผล Negative

จากผลการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E ทำการอ่านผล แปรผล และบันทึกผลที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม API web พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต TM21 นั้นมีผลแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อ *Bibersteinia trehalosi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.5.2 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20 NE

จากการคัดเลือกไอโซเลตที่นำมาทดสอบ โดยการย้อมสีแกรมและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไอโซเลตที่ตรงกับชุดทดสอบ API 20 NE คือ TM4 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบและมีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.6

**รูปที่** 4.2 ผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 NE หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**ตารางที่ 4.6** แสดงผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียไอโซเลต TM4 ด้วยชุดทดสอบ API 20 NE

| ช่องทดสอบ | ผลการทดลอง | |
|---|---|---|
| | 24 ชั่วโมง | 48 ชั่วโมง |
| $NO_3$ | + | + |
| TRP | - | - |
| GLU | - | - |
| ADH | - | - |
| URE | - | - |
| ESC | + | + |
| GEL | + | + |
| PNPG | + | + |
| GLU | - | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| ARA | - | - |
| MNE | - | - |
| MAN | - | - |
| NAG | - | - |
| MAL | - | - |
| GNT | - | - |
| CAP | - | - |
| ADI | - | - |
| MLT | - | - |
| CIT | - | - |
| PAC | - | - |
| OX | + | + |

หมายเหตุ : + แสดงผล Positive

\- แสดงผล Negative

จากผลการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 NE ทำการอ่านผล แปรผล และบันทึกผลที่ 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม API web ซึ่งจากผลการทดลองที่บ่มที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงนั้นให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน คือ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต TM4 มีผลแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อ *Brevundimonas vesicularis* ซึ่งก่อนหน้านี้ Prayitno และ Rolfe (2010) ได้มีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากข้าวด้วยชุดทดสอบ API 20E และ API 20NE เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.6 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดคือแป้งถั่วเขียว และแป้งมันฝรั่ง ชนิดละ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 5 10 และ 15กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก และนำเซลล์ที่แยกได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรโดยแสดงผลการทดลองดังแสดงในตาราง 4.7

**ตารางที่ 4.7** แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ไอโซเลต | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 0.06 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.10 | 0.13 | 0.04 |
| TM17 | 0.07 | 0.08 | 0.09 | 0.10 | 0.12 | 0.16 | 0.04 |
| TM18 | 0.11 | 0.12 | 0.15 | 0.16 | 0.18 | 0.21 | 0.06 |
| TM19 | 0.09 | 0.10 | 0.11 | 0.14 | 0.16 | 0.18 | 0.05 |
| TM20 | 0.12 | 0.15 | 0.18 | 0.19 | 0.21 | 0.26 | 0.08 |
| TM21 | 0.14 | 0.17 | 0.21 | 0.22 | 0.24 | 0.29 | 0.09 |

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ พบว่าในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียไอโซเลต TM21 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.29 กรัม รองลงมาคือน้ำหนักเซลล์แห้งของไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TM20, TM18, TM19, TM17 และ TM16 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.26, 0.21, 0.18, 0.16 และ 0.13 กรัม ตามลำดับ โดยการเติมแป้งถั่วเขียวและแป้งมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในอาหาร NB พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ดีขึ้นโดยเฉพาะเมื่อมีการเติมแป้งมันฝรั่ง แสดงว่าแบคทีเรียสามารถนำแป้งถั่วเขียวและแป้งมันฝรั่งไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ง่าย เนื่องจากแป้งถูกทำให้เสียสภาพโดยความร้อนในระหว่างกระบวนการฆ่าเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2015) ที่ได้ศึกษาค่าเอนทัลปีในการเกิดเจลของแป้งมันฝรั่งและแป้งถั่วเขียว พบว่ามีค่าเอนทัลปีเท่ากับ 4.0±0.2 และ 2.1-3.0 จูลต่อกรัม ตามลำดับ และยังพบว่าค่าเอนทัลปีมีผลต่อค่าความร้อนที่ใช้ในการเกิดเจล ซึ่งการเกิดเจลเป็นหนึ่งในขั้นตอนของการย่อยแป้ง

## 4.7 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต ซึ่งจะนำเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่ได้มาสกัดโดยใช้เอทานอลเข้มข้น 95 % ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ในขวดสีชาที่หุ้มฟรอยด์และเจาะรูด้านบน จากนั้นนำไปใส่ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำขวดสีชาไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมีน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร โดยแสดงผลการทดลองดังแสดงในตาราง 4.8

**ตารางที่ 4.8** แสดงน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ไอโซเลต | น้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ (กรัม) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 0.0009 | 0.0014 | 0.0018 | 0.0018 | 0.0022 | 0.0026 | 0.0016 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TM17 | 0.0011 | 0.0017 | 0.0020 | 0.0021 | 0.0025 | 0.0029 | 0.0011 |
| TM18 | 0.0017 | 0.0021 | 0.0026 | 0.0034 | 0.0037 | 0.0041 | 0.0012 |
| TM19 | 0.0013 | 0.0019 | 0.0023 | 0.0028 | 0.0031 | 0.0035 | 0.0028 |
| TM20 | 0.0022 | 0.0025 | 0.0029 | 0.0039 | 0.0042 | 0.0047 | 0.0019 |
| TM21 | 0.0026 | 0.0030 | 0.0033 | 0.00041 | 0.0046 | 0.0052 | 0.0003 |

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต TM21 มีค่าน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.0052 กรัม รองลงมาคือน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของไอโซเลต TM20, TM18, TM19, TM17, และ TM16 ซึ่งมีน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์เท่ากับ 0.0047, 0.0041, 0.0035, 0.0029 และ 0.0026 กรัม ตามลำดับ

## 4.8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด(Total phenolic content)

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) สามารถหาโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu เป็นการศึกษาการเกิดสีโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายในสภาวะด่างหรือในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10)และสารFolin-Ciocalteu reagent ประกอบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก และกรดฟอสฟอทังสเตนติก จะถูกรีดิวซ์โดยฟีนอลิกไฮดรอกซิล กรุ๊ป ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ด่าง) เกิดเป็นทังสเตน และ โมลิบดินัมบลู ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยวิธีวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดนี้จะใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานและรายงานผลในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ไม่จำเพาะเจาะจงต่อสารจำพวกโพลีฟีนอลเท่านั้น แต่สารละลาย Folin-Ciocalteu ฟีนอลสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่สามารถออกซิไดซ์ตัวมันได้ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนหมู่ฟีนอลที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบนั้น ๆ

จากการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต โดยทำการศึกษาสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ ซึ่งสารสกัดภายนอกเซลล์ หาได้จากการนำน้ำหมักที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้ง 6 ไอโซเลตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร โดยแสดงผลการทดลองในตาราง 4.9 รูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4

ส่วนสารสกัดภายในเซลล์ หาได้จากการนำเซลล์แห้งของแบคทีเรียมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95% ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารNBที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร โดยแสดงผลการทดลองในตาราง 4.10 รูปที่ 4.5 และรูปที่ 4.6



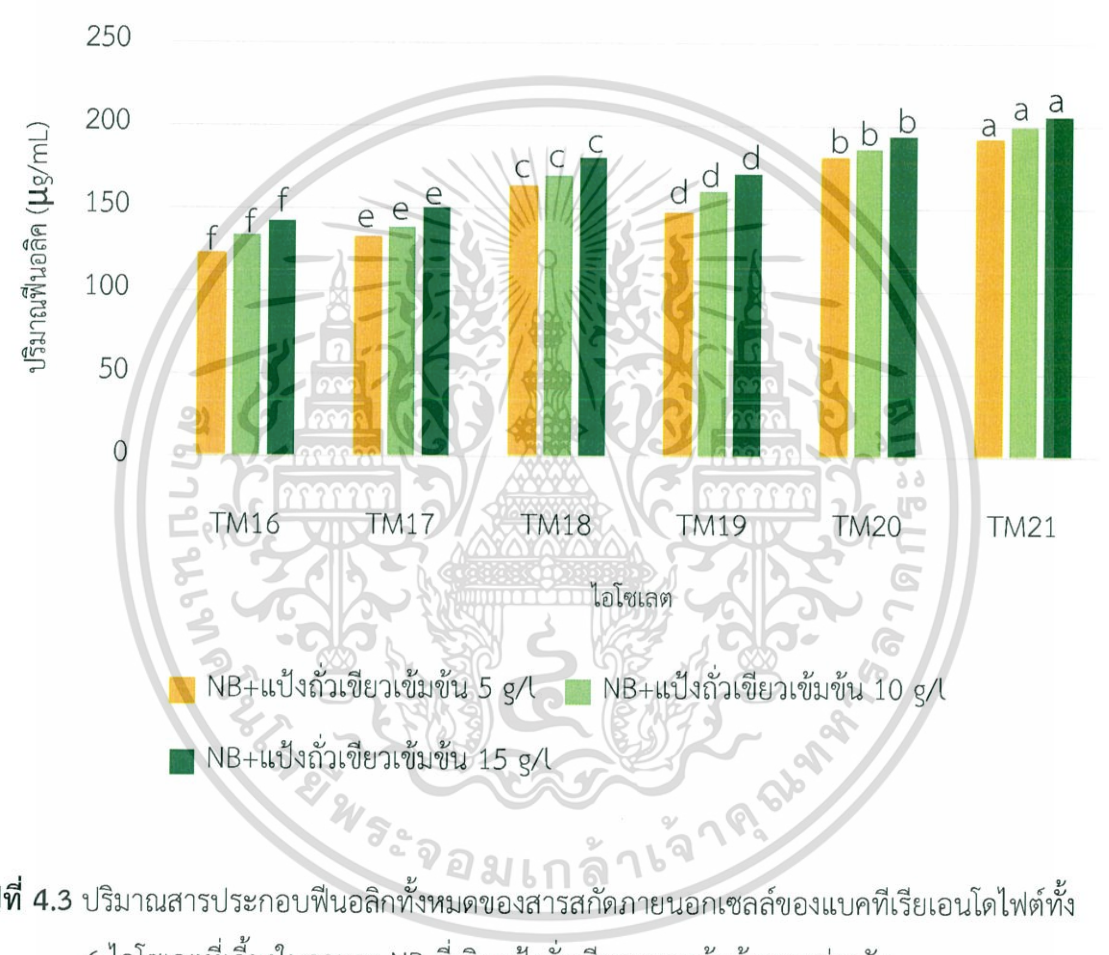
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.9** แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ไอโซเลต | TPC ± SE (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 122.92±0.30$^{f}$ | 134.00±0.14$^{f}$ | 142.75±0.14$^{f}$ | 126.00±0.14$^{f}$ | 137.50±0.25$^{f}$ | 147.42±0.30$^{f}$ | 108.33±0.08$^{f}$ |
| TM17 | 132.67±0.33$^{e}$ | 138.92±0.83$^{e}$ | 150.83±0.17$^{e}$ | 137.83±0.44$^{e}$ | 146.17±0.17$^{e}$ | 156.92±0.22$^{e}$ | 122.00±0.29$^{e}$ |
| TM18 | 163.75±0.14$^{c}$ | 170.25±0.14$^{c}$ | 181.17±0.22$^{c}$ | 165.17±0.36$^{c}$ | 175.75±0.14$^{c}$ | 183.17±0.17$^{c}$ | 157.67±0.22$^{c}$ |
| TM19 | 147.75±0.29$^{d}$ | 160.75±0.29$^{d}$ | 171.25±0.25$^{d}$ | 153.25±0.25$^{d}$ | 160.33±0.30$^{d}$ | 171.08±0.22$^{d}$ | 137.67±0.22$^{d}$ |
| TM20 | 180.92±0.22$^{b}$ | 186.58±0.17$^{b}$ | 194.25±0.29$^{b}$ | 179.83±0.36$^{b}$ | 190.00±0.14$^{b}$ | 200.42±0.60$^{b}$ | 170.08±0.22$^{b}$ |
| TM21 | 192.33±0.22$^{a}$ | 199.92±0.22$^{a}$ | 206.08±0.22$^{a}$ | 190.58±0.51$^{a}$ | 198.25±0.58$^{a}$ | 208.58±0.08$^{a}$ | 183.33±0.22$^{a}$ |

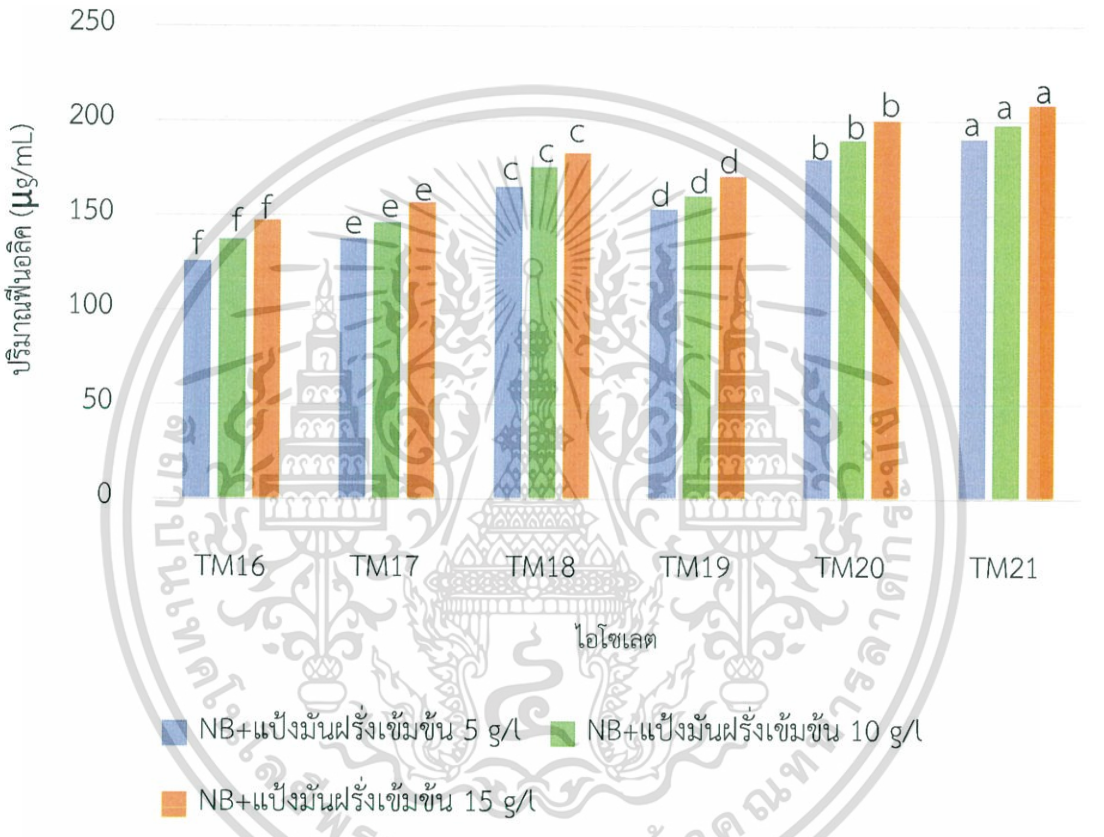
หมายเหตุ

a, b, c, d, e, f ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.01)




**รูปที่ 4.3** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.4** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน

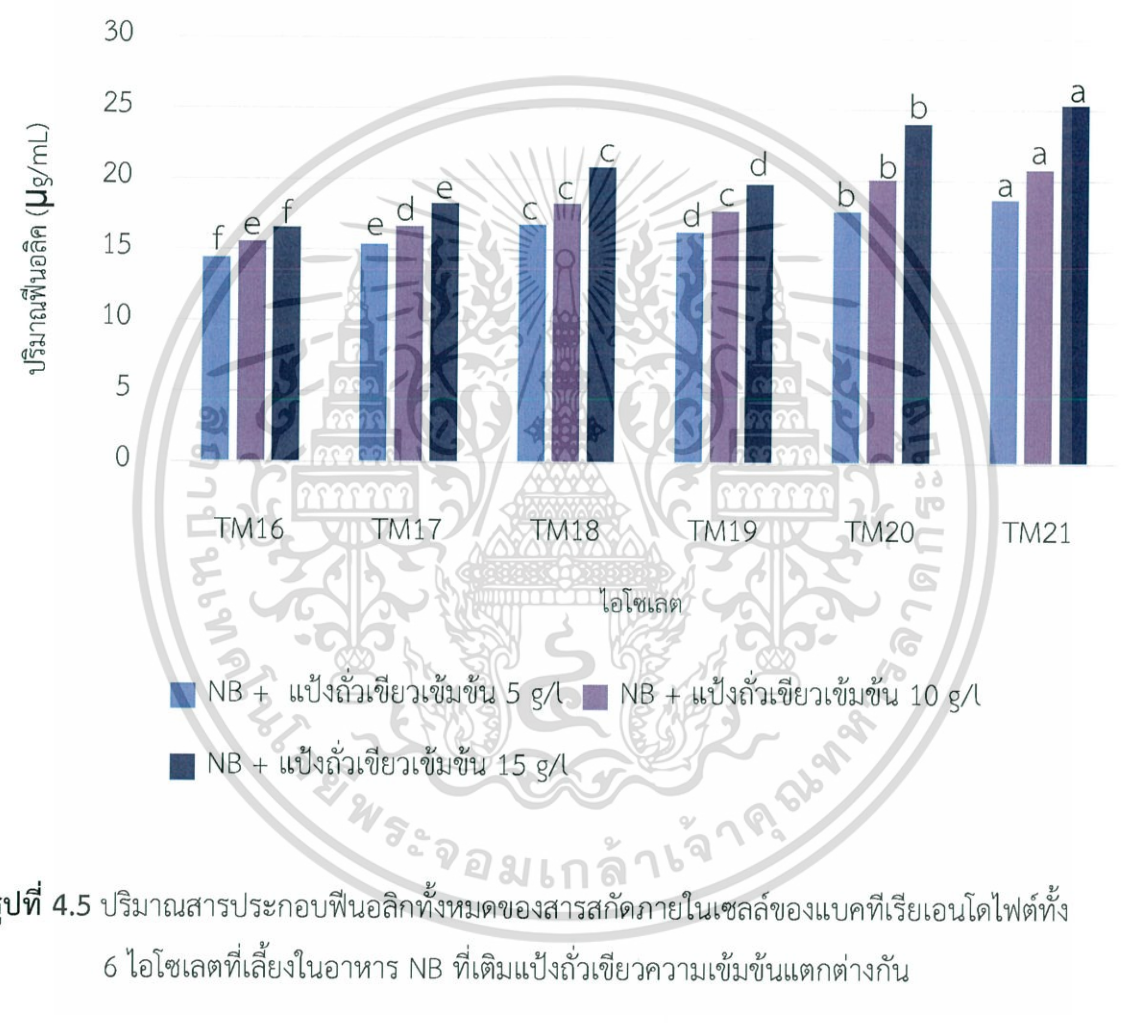
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.10** แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ไอโซเลต | TPC ± SE (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 14.42±0.07$^{f}$ | 15.60±0.23$^{e}$ | 16.60±0.12$^{f}$ | 14.33±0.13$^{e}$ | 16.47±0.18$^{f}$ | 19.13±0.07$^{f}$ | 13.20±0.12$^{e}$ |
| TM17 | 15.40±0.12$^{e}$ | 16.67±0.07$^{d}$ | 18.33±0.18$^{e}$ | 15.93±0.13$^{d}$ | 17.33±0.13$^{e}$ | 20.73±0.07$^{e}$ | 13.60±0.00$^{de}$ |
| TM18 | 16.80±0.12$^{c}$ | 18.33±0.07$^{c}$ | 20.87±0.07$^{c}$ | 18.40±0.12$^{c}$ | 21.27±0.07$^{c}$ | 24.27±0.18$^{c}$ | 14.40±0.12$^{c}$ |
| TM19 | 16.33±0.07$^{d}$ | 17.80±0.12$^{c}$ | 19.73±0.13$^{d}$ | 16.60±0.12$^{d}$ | 19.93±0.13$^{d}$ | 22.40±0.12$^{d}$ | 13.87±0.07$^{cd}$ |
| TM20 | 17.80±0.12$^{b}$ | 20.07±0.07$^{b}$ | 24.00±0.12$^{b}$ | 20.40±0.23$^{b}$ | 22.87±0.13$^{b}$ | 28.13±0.37$^{b}$ | 15.40±0.12$^{b}$ |
| TM21 | 18.67±0.07$^{a}$ | 20.80±0.12$^{a}$ | 25.40±0.23$^{a}$ | 24.67±0.30$^{a}$ | 25.93±0.35$^{a}$ | 36.93±0.18$^{a}$ | 16.73±0.27$^{a}$ |

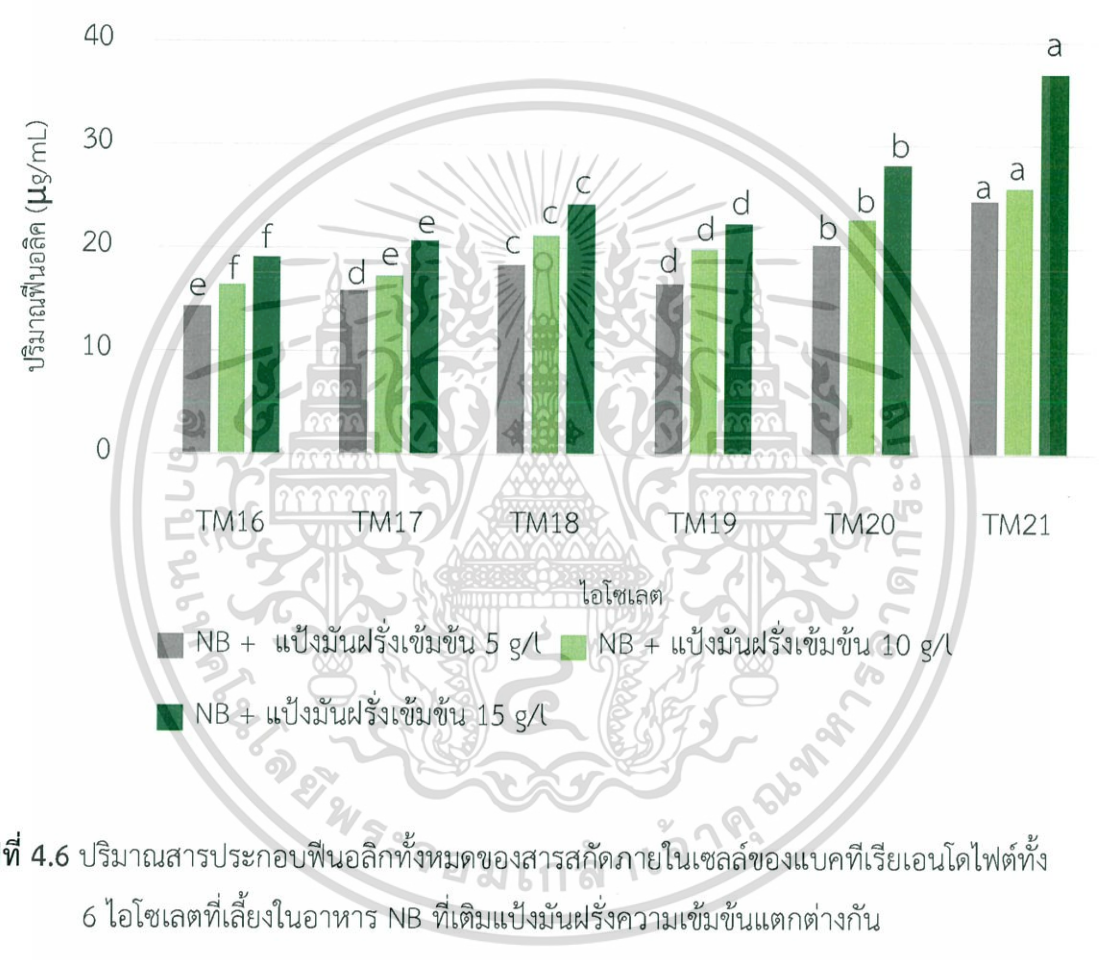
หมายเหตุ

a, b, c, d, e, f ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)




**รูปที่ 4.5** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.6** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ พบว่าสารสกัดจากไอโซเลต TM21 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 208.58±0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นสารสกัดจากไอโซเลต TM20, TM18, TM19, TM17 และ TM16 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 200.42±0.60, 183.17±0.17, 171.08±0.22, 156.92±0.22 และ 147.42±0.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากไอโซเลต TM16, TM17, TM18, TM19, TM20 และ TM21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

ส่วนการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดจากไอโซเลต TM21 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 36.93±0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นสารสกัดจากไอโซเลต TM20, TM18, TM19, TM17, และ TM16, ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 28.13±0.37, 24.27±0.18, 22.40±0.12, 20.73±0.07 และ 19.13±0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากไอโซเลต TM16, TM17, TM18, TM19, TM20 และ TM21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

## 4.9 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรซึ่งมีธาตุไนโตรเจนเป็นอะตอมกลาง ชอบละลายในไขมัน ซึ่งสารนี้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการประเมินค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันสีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถทราบถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Moktan และคณะ, 2008)

ในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต โดยผลการทดลองพบว่าสารละลายสีม่วงของอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย สีของสารละลายผสมเปลี่ยนจากสีม่วงเข้มไปเป็นสีส้มอมเหลือง แสดงว่าสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตนั้นมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต โดยทำการศึกษาสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ ซึ่งสารสกัดภายนอกเซลล์หาได้จากการนำน้ำหมักที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารNB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร โดยแสดงผลการทดลองในตาราง 4.11 รูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8

ส่วนสารสกัดภายในเซลล์หาได้จากการนำเซลล์แห้งของแบคทีเรียมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95% ทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 500ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารNBที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร โดยแสดงผลการทดลองในตาราง 4.12 รูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10

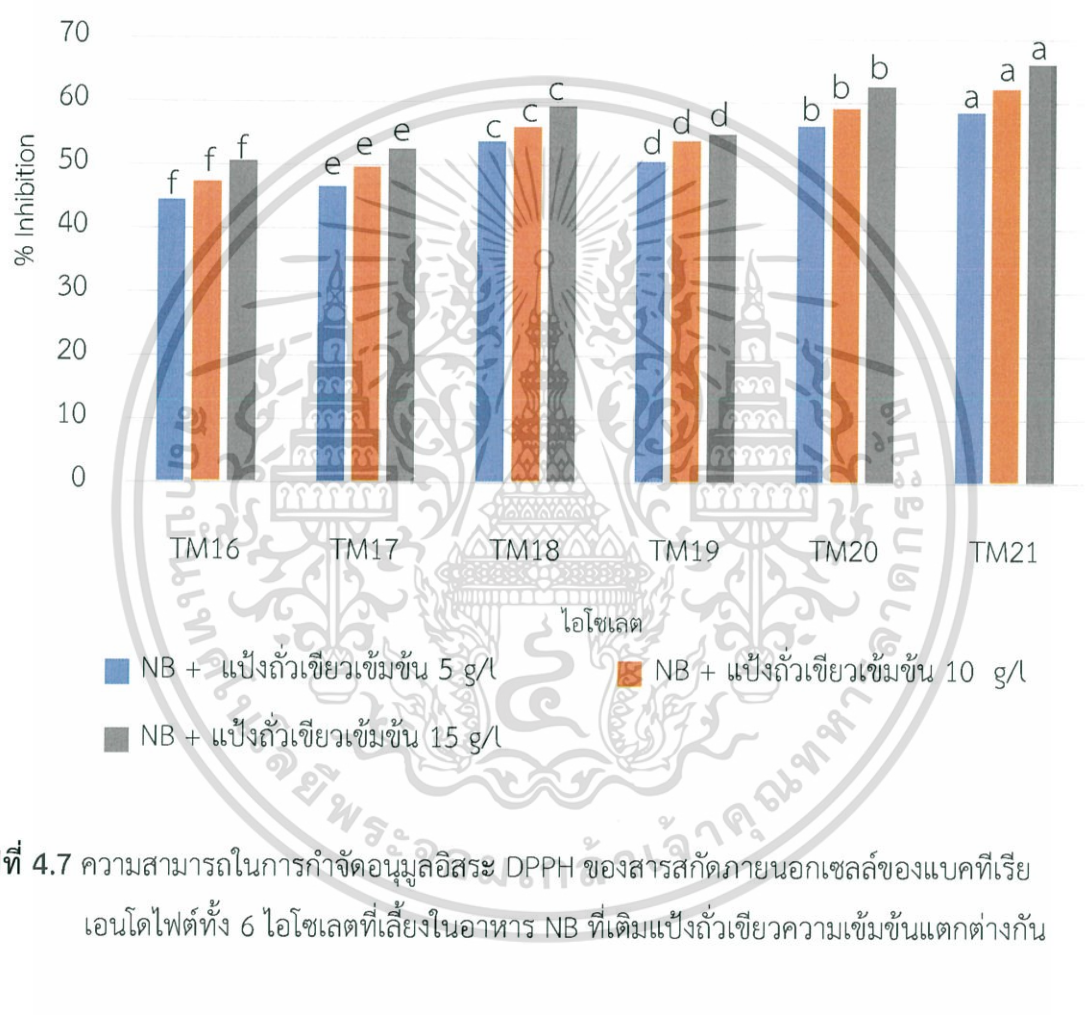
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.11** แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ไอโซเลต | % Inhibition ± SE | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 44.44±0.28$^{f}$ | 47.40±0.03$^{f}$ | 50.63±0.05$^{f}$ | 44.61±0.03$^{f}$ | 48.00±0.03$^{f}$ | 51.48±0.05$^{f}$ | 42.31±0.03$^{f}$ |
| TM17 | 46.58±0.05$^{e}$ | 49.68±0.10$^{e}$ | 52.52±0.07$^{e}$ | 47.34±0.05$^{e}$ | 50.77±0.03$^{e}$ | 54.04±0.06$^{e}$ | 45.82±0.05$^{e}$ |
| TM18 | 53.76±0.05$^{c}$ | 56.03±0.05$^{c}$ | 59.32±0.05$^{c}$ | 54.66±0.03$^{c}$ | 58.40±0.05$^{c}$ | 61.52±0.05$^{c}$ | 51.45±0.10$^{c}$ |
| TM19 | 50.58±0.03$^{d}$ | 53.90±0.03$^{d}$ | 55.00±0.03$^{d}$ | 51.81±0.05$^{d}$ | 55.02±0.30$^{d}$ | 56.65±0.07$^{d}$ | 47.96±0.07$^{d}$ |
| TM20 | 56.28±0.07$^{b}$ | 59.10±0.06$^{b}$ | 62.56±0.06$^{b}$ | 57.60±0.05$^{b}$ | 61.01±0.06$^{b}$ | 64.86±0.05$^{b}$ | 54.00±0.03$^{b}$ |
| TM21 | 58.50±0.03$^{a}$ | 62.20±0.06$^{a}$ | 66.05±0.05$^{a}$ | 59.54±0.05$^{a}$ | 63.10±0.05$^{a}$ | 69.28±0.07$^{a}$ | 55.72±0.07$^{a}$ |

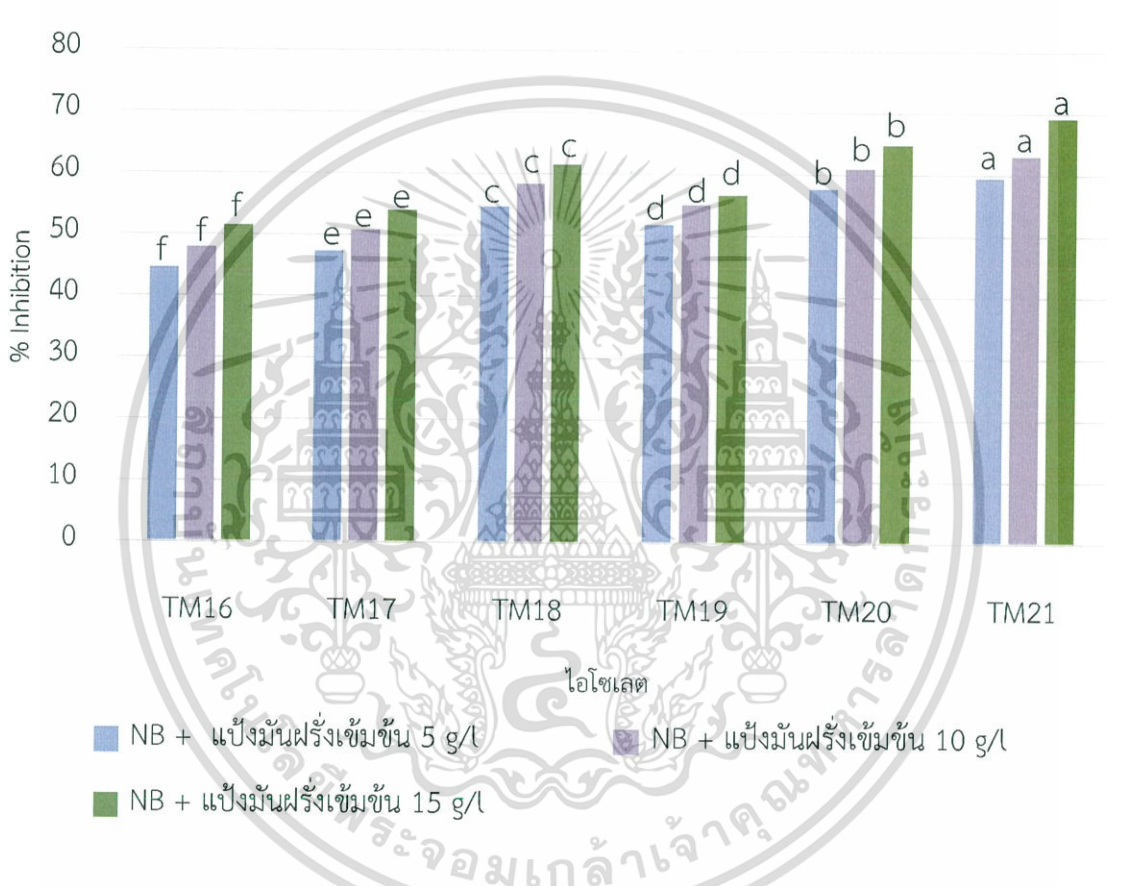
หมายเหตุ

a, b, c, d, e, f ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)




**รูปที่ 4.7** ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.8** ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน

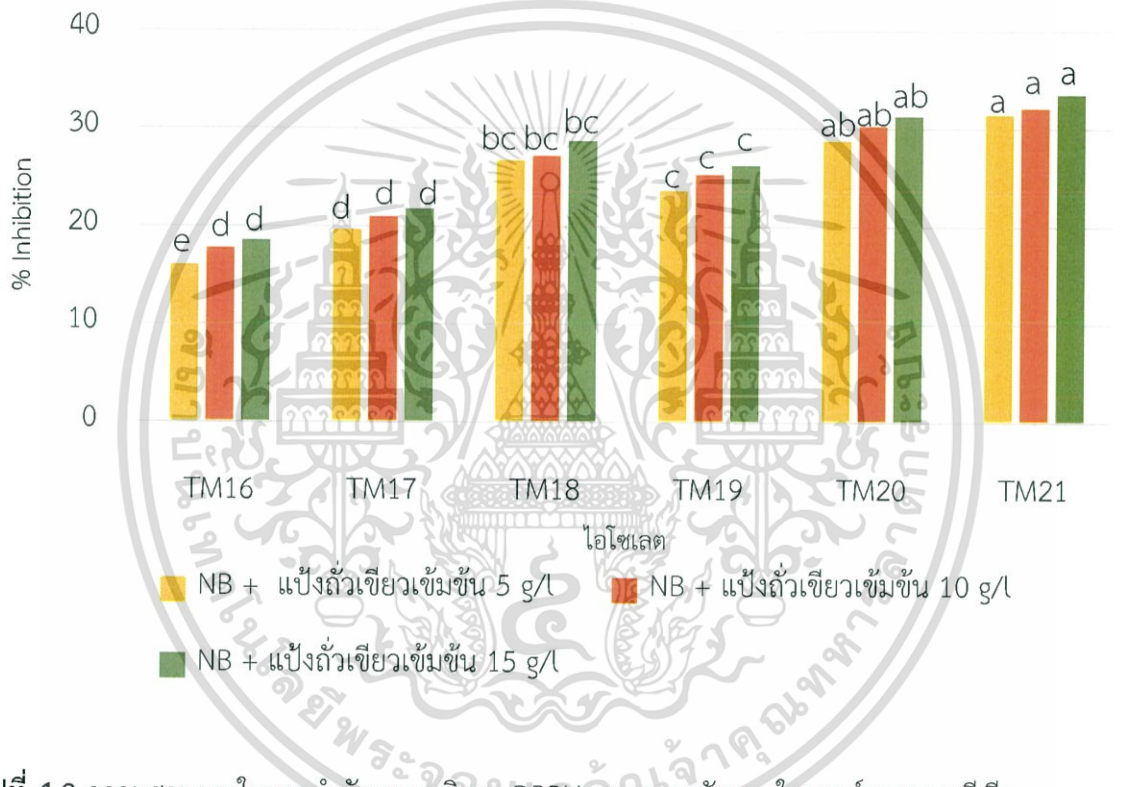
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.12** แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ไอโซเลต | % Inhibition ± SE | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 16.10±1.93$^{e}$ | 17.83±1.94$^{d}$ | 18.63±2.00$^{d}$ | 16.91±2.00$^{d}$ | 18.84±2.00$^{d}$ | 19.50±2.00$^{d}$ | 14.67±2.00$^{d}$ |
| TM17 | 19.72±0.05$^{d}$ | 21.05±0.05$^{d}$ | 21.82±0.03$^{d}$ | 20.04±0.08$^{d}$ | 21.50±0.05$^{d}$ | 23.51±0.06$^{c}$ | 18.32±0.03$^{c}$ |
| TM18 | 26.84±0.05$^{bc}$ | 27.31±0.03$^{bc}$ | 28.76±0.03$^{bc}$ | 27.39±0.08$^{bc}$ | 27.91±0.08$^{bc}$ | 30.11±0.56$^{b}$ | 26.07±0.07$^{ab}$ |
| TM19 | 23.74±0.12$^{c}$ | 25.37±0.03$^{c}$ | 26.30±0.03$^{c}$ | 24.56±0.05$^{c}$ | 25.57±0.05$^{c}$ | 27.60±0.05$^{b}$ | 23.52±0.03$^{b}$ |
| TM20 | 28.88±0.05$^{ab}$ | 30.34±0.07$^{ab}$ | 31.35±0.05$^{ab}$ | 29.46±0.13$^{ab}$ | 30.40±0.15$^{ab}$ | 33.75±0.10$^{a}$ | 27.72±0.13$^{a}$ |
| TM21 | 31.52±0.07$^{a}$ | 32.21±0.13$^{a}$ | 33.55±0.11$^{a}$ | 32.24±0.03$^{a}$ | 32.78±0.10$^{a}$ | 35.23±0.18$^{a}$ | 29.68±0.12$^{a}$ |

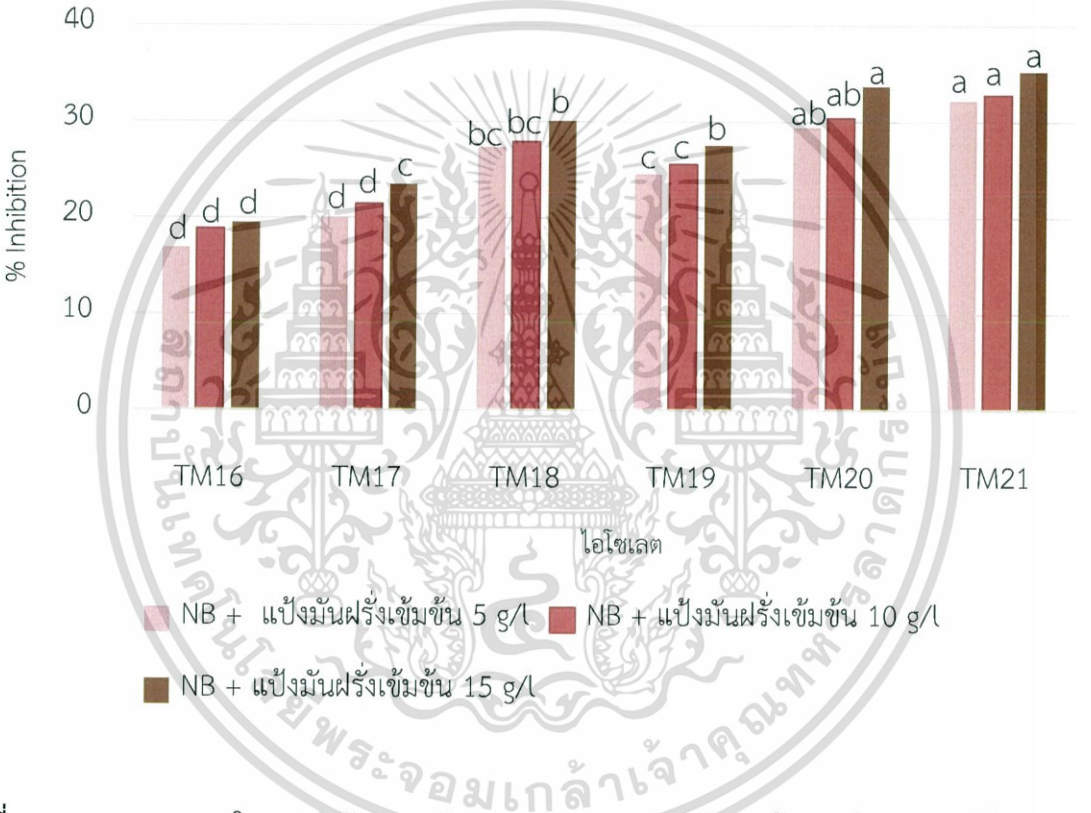
หมายเหตุ

a, b, c, d, e, f ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)




**รูปที่ 4.9** ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.10** ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ พบว่าสารสกัดจากไอโซเลต TM21 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดที่ 69.28±0.07% รองลงมาเป็นสารสกัดจากไอโซเลต TM20, TM18, TM19, TM17, และ TM16 ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 64.86±0.05%, 61.52±0.05%, 56.65±0.07%, 54.04±0.06% และ 51.48±0.05% ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากไอโซเลต TM16, TM17, TM18, TM19, TM20 และ TM21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

ส่วนการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ พบว่าสารสกัดจากไอโซเลตTM21 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดที่ 35.23±0.18% รองลงมาเป็นสารสกัดจากไอโซเลต TM20, TM18, TM19, TM17, และ TM16 ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 33.75±0.10%, 30.11±0.56%, 27.60±0.05%, 23.51±0.0% และ 19.50±2.00% ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากไอโซเลต TM16, TM17, TM18, TM19, TM20 และ TM21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

จากผลการทดลอง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวและแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตรมีปริมาณเซลล์แห้งและสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหาร NB ที่ไม่มีการเติมแป้ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taghavi และคณะ (2008) ที่ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยทำการเติมสารโพลีแซคาไรด์ลงไปในอาหาร พบว่ามีการเจริญเติบโตดีขึ้นโดยสังเกตได้จากความขุ่นของสารละลายเชื้อ

จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวและแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตรเมื่อนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธี Scavenging activity on DPPH radical พบว่ามีแนวโน้มของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงขึ้นตามความเข้มข้นของแป้งและสูงกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร NB ซึ่ง Goutam และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบของต้นเฟิร์น พบว่าเมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหาร PDB ที่มีการเติมแป้งที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันและมีปริมาณมากกว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมแป้ง

จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งถั่วเขียวและแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตรเมื่อนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และนำไปทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธี Scavenging activity on DPPH radical พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จะสอดคล้องกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ดังนั้น เมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาก แสดงว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระก็มากตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เมยกลางและคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้จากเครื่องดื่มน้ำผลไม้จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จะสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากหัวเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 18 ไอโซเลตลงบนอาหาร NA แล้วทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนีเดี่ยว รูปร่าง ขอบ สี การยกตัว และผิวหน้าของโคโลนี พบว่าบางไอโซเลตมีลักษณะของโคโลนีที่คล้ายคลึงกัน เมื่อทำการศึกษารูปร่างของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่า ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรูปท่อนสั้น อยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย ตัวเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็กมาก การย้อมสีแบคทีเรียจะใช้วิธีการย้อมแกรมเพื่อคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ จากผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด 13 ไอโซเลต ได้แก่ TM7, TM9, TM10, TM11, TM12, TM13, TM14, TM15, TM16, TM17, TM18, TM19 และ TM20 และมีแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ TM4, TM5, TM6, TM8 และ TM21

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ทั้ง 18 ไอโซเลต โดยใช้การทดสอบทั้งหมด 2 วิธี คือการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสนั้นจะสังเกตจากการเปลี่ยนสีของแบคทีเรียเมื่อหยดสารละลาย DMPD เข้มข้น 1% ถ้าแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 30 วินาทีแสดงว่าแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส พบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ มีทั้งหมด 14 ไอโซเลต ได้แก่ TM4, TM5, TM6, TM8, TM9, TM10, TM11, TM12, TM13, TM14, TM15, TM16, TM17 และ TM20 ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ มีทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ TM7, TM18, TM19 และ TM21 และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยสังเกตการเกิดฟองก๊าซของแบคทีเรียเมื่อหยอดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 % ถ้าเกิดฟองก๊าซแสดงว่าแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสพบว่ามีแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้มีทั้งหมด 15 ไอโซเลต ได้แก่ TM4, TM7, TM8, TM9, TM11, TM12, TM13, TM14, TM15, TM16, TM17, TM18, TM19, TM20 และ TM21 ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ TM5, TM6 และ TM10

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมด 2 ไอโซเลต คือ TM4 และ TM21 ด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย analytical profile idex (API) โดยคัดเลือกไอโซเลตที่นำมาทดสอบจากการย้อมสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แกรม และคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ ดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ให้มีคุณสมบัติตรงตามชุดทดสอบ โดยแบคทีเรียไอโซเลตTM4 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ซึ่งตรงกับชุดทดสอบ API 20 NE ผลการทดสอบพบว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Brevundimonas vesicularis* ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต TM21 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ซึ่งตรงกับชุดทดสอบ API 20 E ผลการทดสอบพบว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อ *Bibersteinia trehalosi*

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้ง 2 ชนิดคือแป้งถั่วเขียว และแป้งมันฝรั่ง ชนิดละ 3 ความเข้มข้น คือ 510และ 15กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ให้ผลน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดอยู่ในช่วง 0.13 – 0.29 กรัม จากผลน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ทำให้น้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีค่าน้ำหนักสารสกัดสูงที่สุดอยู่ในช่วง 0.0026 – 0.0052 กรัม

จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM16 TM17 TM18 TM19 TM20 และ TM21 มาทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดอยู่ในช่วง 147.42 – 208.58 และ 19.13 – 36.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM16, TM17, TM18, TM19, TM20 และ TM21 มาทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์และสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดอยู่ในช่วง 51.48 - 69.28% และ 19.50 - 35.23% ตามลำดับโดยที่ความเข้มข้นเดียวกันกับสารสกัดภายในเซลล์ คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกให้ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงถึง 95.55%

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้ง 6 ไอโซเลต แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อน้ำหนักเซลล์และการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ โดยแป้งมันฝรั่งความเข้มข้นกรัม มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจากแบคทีเรียซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อที่จะให้เชื้อแบคทีเรียมีการผลิตสารเมตาบอไลท์ในปริมาณมากขึ้น รวมถึงการทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้โดยวิธีการทดสอบอื่นๆ นอกเหนือจากวิธี DPPH radical scavenging activity และวิธี Folin-ciocalteauเช่น การทดสอบ Reducing power เพื่อศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ หรือการทดสอบ Lipid peroxidation เพื่อศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยา lipidperoxidationเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมากขึ้น รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเพื่อทดสอบความปลอดภัยในการใช้สารสกัดกับสิ่งมีชีวิต

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงในลำดับถัดไปจะต้องศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติมและศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไป เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงในระดับสายพันธุ์ และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ได้ผลผลิตของสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กัญจนา ธีระกุลและคณะ. (2544). จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่2. สำนักพิมพ์เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ.

เนตรนภา เมยกลาง และคณะ. (2557). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. KKU Res J (GS) 14 (4), 69-79.

ปรียนันท์ บัวสด, 2549, การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี,วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร,นครปฐม, 228

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. (2538). มะเขือเทศ. พิมพ์ครั้งที่1. สำนักพิมพ์โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์.

ยุวดี มั่นยืน, ยุวดี มาตขาว และอมรา เก่งการ. (2555). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหน *Lemnaaequinoctialis*. โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 3–4.

โอภา วัชระคุปต์. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ (พิมพ์ครั้ง ที่ 2). กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Chen, W., Zhou, H., and Cui, M. (2015). "Effects of charge-carrying amino acids on the gelatinization and retrogradation properties of potato starch." Food chemistry, 167, 180-184.

Chung H.A., Liu Q., Pauls K.P., Fan M.Z. and Yada R. (2008). "In vitro starch digestibility, expected glycemic invex and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada." Food Research International. 41(9): 869-875.

Hallmann J., Andrea Q. H., Walter F. M., and Joseph W. K. (1997). "Bacteriolendophytesinagricultural crops." Journal of Microbiology 43: 895-914.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Xing, J., Harold, C. & Sun, M. (2007) A Potential Antioxidant Resource: Endophytic Fungi from Medicinal Plants. *Economic Botany*, **61**, 14-30.

Joko P., Barry R. (2010). Characterization of Endophytic Diazotroph Bacteria Isolated from Rice. HAYATI Journal of Biosciences. 17:73-78.

Jyoti G., Vijay K. S., Satish K. V., Dheeraj K. S., Jitendra K., Ashish M., Anuj K. and R.N. Kharwar. (2014). Optimization of Culture Conditions for Enhanced

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Bioactive Metabolites Rich in Antimicrobial and Antioxidant Activities Isolated from *Emericella quadrilineata* an Endophyte of *Pteris pellucid*. JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY. Vol.8(3) : 2059-2073.

Kalkan F., Vanga S.K., Gariepy Y,, and Raghavan V. (2015) "Effect of MW-assisted roasting on nutritional and chemicalproperties of hazelnuts." food & nutrition.1-9.

Krishnan P., Bhat R., Kush A. and Ravikumar P. (2012). "Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from Carica papaya fruits". Journal of Applied Microbiology. 113: 308-317.

Lanna-Filho, R., Souza, R.M., Magalhães, M.M., Villela, L., Zanotto, E., Ribeiro-Júnior, P.M. & Resende, M.L.V. (2013) Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. *Tropical Plant Pathology*, **38**, 295-302.

Lee, V.S., Chen, C.R., Lio, Y.W., Tzen, J.T.and Chang, C.I. (2008). "Structural determinationand DPPH radical-scavenging activity of two acylated flavonoid tetraglycosides inoolong tea (Camellia sinensis)". Chem. Pharm. Bull. 56: 851-853.

Miller C., Miller R., Garton-Kenny D., Redgrave B., Sears J., Condron M., et al.(1998). Ecomycins, unique antimycotics from Pseudomonas viridiflava. J Appl Microbiol. 84:937–44.

Morton H.E. and Pulaski E.J. (1937). "The Presevation of Bacterial Cultures." Journal of bacteriology. 35(2): 163-183.

Pieniz S., Andreazza R., Okeke B. C., Camargo F. A. O. and Brandelli A.(2015). Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolate from meat and dairyproducts. Brazilian Journal of Biology. Brazil.

Prayitno J. and Rolfe B. (2010). "Characterization of Endophytic Diazotroph Bacteria Isolated from Rice." HAYATI Journal of Biosciences. 17:73-78.

Rashid, R. H., (2015). "Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant activity of secondary metabolites isolated from endophytic bacterium Bacillus megaterium isolated from wheat root in Iraq". Diyala Journal For Pure Sciences, 13: 78-88.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Safiyh T., Craig G., Se´bastien M., Lee N., Adam H., Nele W., Tanja B., Jaco V. and Daniel van der L. (2008). Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Vol.75(3) : 748-757.

Taghavi S., Garafola C., Monchy S., Newman L., Hoffman A., Weyens N., Barac T., Vangronsveld J.and Lelie D.(2008). "Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting aBeneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees."APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Vol.75(3) : 748-757.

Tsai T.H., Tsai P.J., Ho S.C.,(2005). "Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Several Commonly Used Spices." *Journal of Food Science*. 70(1) : 93-97.

Yang, J.H. et al. (2000). "Antioxidant and related compounds. BaosciBiotechnol". Journal of Biochemistry & Cell Biology. 61: 1646-1649.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร NA (Nutrient Agar)

| | | |
|---|---|---|
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| เปปโตน | 5 | กรัม |
| วุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

2. สูตรอาหาร NB (Nutrient Broth)

| | | |
|---|---|---|
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| เปปโตน | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

3. สูตรอาหาร NB (Nutrient Broth) ที่เติมแป้งถั่วเขียว

| | | |
|---|---|---|
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| เปปโตน | 5 | กรัม |
| แป้งถั่วเขียว | 5, 10, 15 | กรัม (ตามลำดับ) |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

4. สูตรอาหาร NB (Nutrient Broth) ที่เติมแป้งมันฝรั่ง

| | | |
|---|---|---|
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| เปปโตน | 5 | กรัม |
| แป้งมันฝรั่ง | 5, 10, 15 | กรัม (ตามลำดับ) |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. รูปร่างของโคโลนี (colony form)

- Punctiform โคโลนีมีขนาดเล็กมากเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
- Circular โคโลนีกลม
- Filamentous โคโลนีประกอบด้วยเส้นสายพันกันแน่น
- Irregular โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
- Rhizoid โคโลนีมีการแตกกิ่งก้านไม่แน่นอนและมีลักษณะคล้ายราก

2. ขอบหรือริมของโคโลนี (Colony margin or Colony edge)

- Entire ขอบโคโลนีเรียบ
- Undulate ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย
- Lobate ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก
- Erose ขอบโคโลนีเป็นหยกเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ
- Filamentous ขอบโคโลนีเป็นเส้นสายยาวไม่แนนอน
- Curled ขอบโคโลนีเป็นเส้นซ้อนกันเป็นคลื่นและหยักในลักษณะที่ขนานกัน

3. พื้นผิวของโคโลนี (Surface Texture)

- Smooth พื้นผิวของโคโลนีเรียบ
- Rough พื้นผิวของโคโลนีขรุขระ
- Mucoid พื้นผิวของโคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม
-Rugose พื้นผิวของโคโลนีย่น
- Concentrically ringed พื้นผิวของโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น

4. ความสูงหรือการยกตัวของโคโลนี (Elevation)

- Flat โคโลนีแบนราบ
- Raised โคโลนีมีความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย
- Convex โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย
- Pulvinate โคโลนีนูนโค้งขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

**1.สารเคมี**

1.1 การเตรียมสารละลายวิตามินซี (Ascorbic acid) ความเข้มข้น500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.1 ชั่งวิตามินซีมา 0.0005 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.1.2 เก็บสารละลายวิตามินซีที่ได้ใส่ในขวดสีชา

1.2 การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

1.2.1 ชั่งสาร DPPH มา 0.0059 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.2.2 เก็บสารละลาย DPPH ที่ได้ใส่ในขวดสีชา

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3.1 ชั่งกรดแกลลิกมา 0.001 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.3.2 เก็บสารละลายกรดแกลลิกที่ได้ใส่ในขวดสีชา

1.4 การเตรียมสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4.1 ชั่งกรดแกลลิกมา 0.0005 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.4.2 เก็บสารละลายกรดแกลลิกที่ได้ใส่ในขวดสีชา

1.5การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteuphenol reagent ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร

1.5.1 ปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่หุ้มด้วยฟอยล์กันแสง

1.5.2 เก็บสารละลาย Folin-Ciocalteuphenol reagent ที่ได้ใส่ในขวดสีชา

1.6 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 7.5% โดยมวลต่อปริมาตร

1.6.1 ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 3.75 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

1.6.2 เก็บสารละลายโซเดียมคาร์บอนเนตที่ได้ในขวดสีชา

1.7 การเตรียมสารละลาย N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) เข้มข้น 1 %

1.7.1 ชั่งสาร N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) 1 กรัม ละลายในน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.7.2 เก็บสารละลาย DMPD ที่ได้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.8 การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

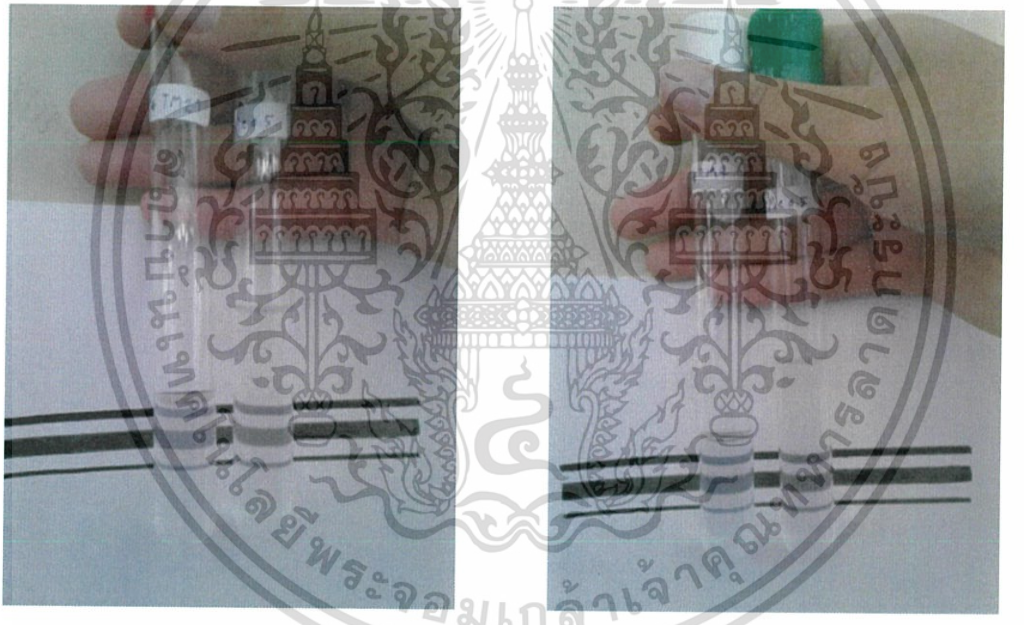
1.8.1 ปิเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้นมา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

1.8.2 ชั่งแบเรียมคลอไรด์มา 1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.8.3 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.8.1 ปริมาตร 995 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 1.8.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาผสมกัน

1.8.4 เก็บสารละลายMcFarland standard No. 0.5 ที่ได้ในหลอดฝาเกลียว ปิดฝาให้สนิทกันระเหย แล้วเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ก่อนใช้งานต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน และควรตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน สามารถใช้งานได้นาน 6 เดือน



**รูปที่ ผ-1** ความขุ่นของสารละลายเชื้อเทียบกับสารละลาย McFarland standard No. 0.5

**2. วิธีการวิเคราะห์**

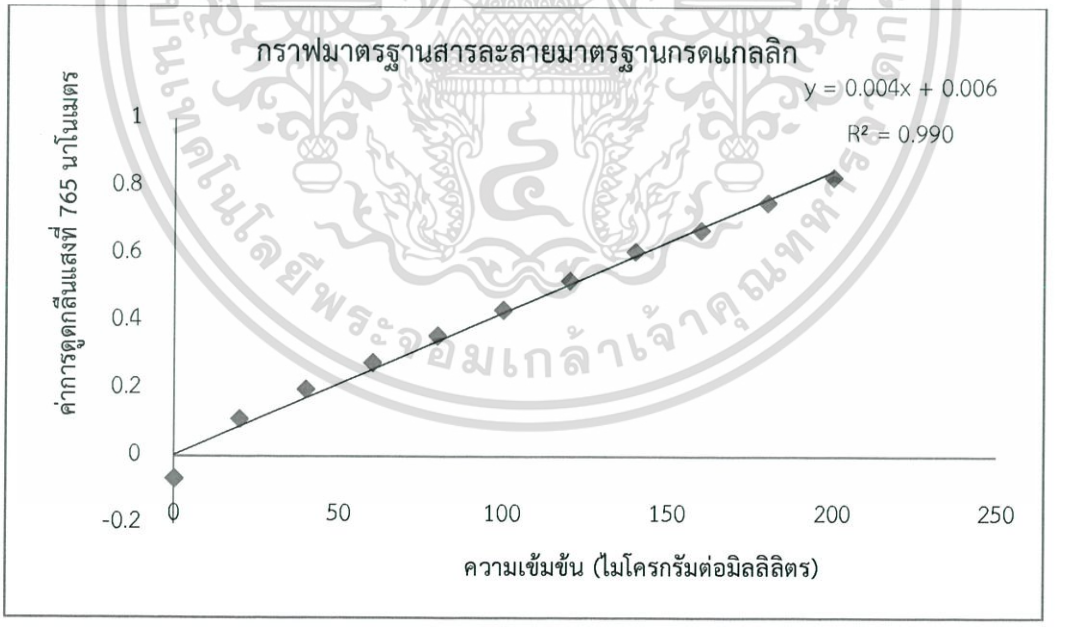
2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

2.1.1 สารสกัดภายนอกเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-1** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสง |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 20 | 0.113 |
| 40 | 0.201 |
| 60 | 0.28 |
| 80 | 0.36 |
| 100 | 0.436 |
| 120 | 0.524 |
| 140 | 0.611 |
| 160 | 0.673 |
| 180 | 0.756 |
| 200 | 0.832 |




**รูปที่ ผ-2** กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีคำนวณ

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15กรัมต่อลิตร

ซ้ำที่ 1

| | | | |
|---|---|---|---|
| ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ | | = | 0.898 |
| ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) | | = | 0.057 |
| ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) | | = | 0.898 – 0.057 |
| | | = | 0.841 |
| จากสมการเส้นตรง | y | = | 0.004x + 0.006 |
| แทนค่า y = 0.841 ลงในสมการ | | | |
| | 0.841 | = | 0.004x + 0.006 |
| จะได้ | x | = | 208.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

ซ้ำที่ 2

| | | | |
|---|---|---|---|
| ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ | | = | 0.897 |
| ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) | | = | 0.057 |
| ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) | | = | 0.897 – 0.057 |
| | | = | 0.84 |
| จากสมการเส้นตรง | y | = | 0.004x + 0.006 |
| แทนค่า y = 0.840 ลงในสมการ | | | |
| | 0.840 | = | 0.004x + 0.006 |
| จะได้ | x | = | 208.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

ซ้ำที่ 3

| | | | |
|---|---|---|---|
| ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ | | = | 0.897 |
| ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) | | = | 0.057 |
| ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) | | = | 0.897 – 0.057 |
| | | = | 0.84 |
| จากสมการเส้นตรง | y | = | 0.004x + 0.006 |
| แทนค่า y = 0.840 ลงในสมการ | | | |
| | 0.840 | = | 0.004x + 0.006 |
| จะได้ | x | = | 208.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงว่า มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย

$$\frac{208.75+208.5+208.5}{3} = 208.58 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

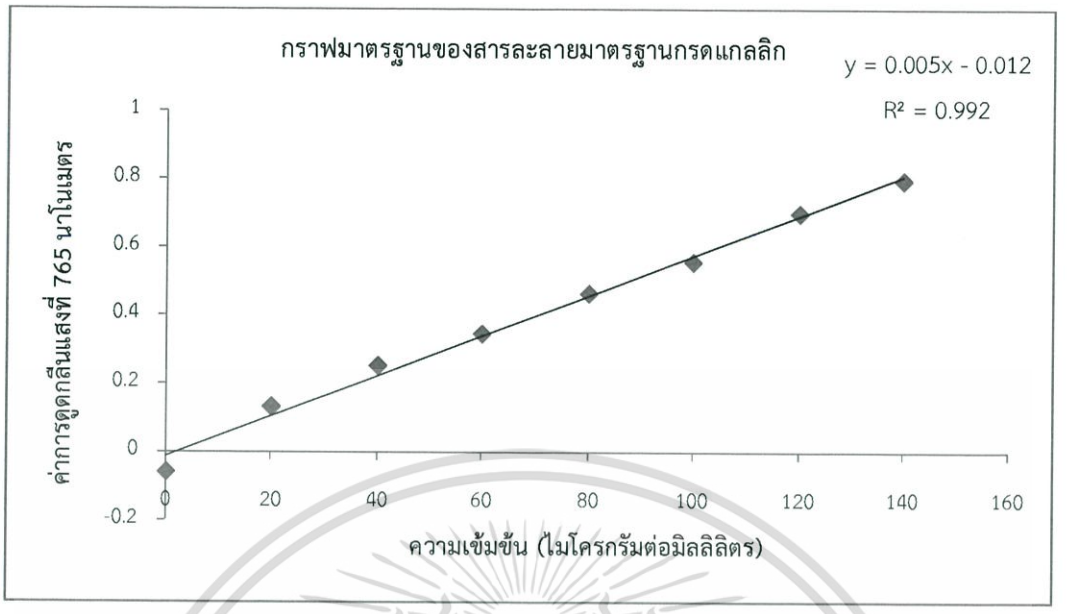
ดังนั้น สารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 208.58ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 สารสกัดภายในเซลล์

**ตารางที่ ผ-2** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสง |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 20 | 0.132 |
| 40 | 0.252 |
| 60 | 0.345 |
| 80 | 0.464 |
| 100 | 0.556 |
| 120 | 0.698 |
| 140 | 0.796 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ผ-3** กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีคำนวณ</u>

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

<u>ซ้ำที่ 1</u>

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.23

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.056

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.23 – 0.056

= 0.174

จากสมการเส้นตรง y = 0.005x - 0.012

แทนค่า y = 0.174 ลงในสมการ

0.174 = 0.005x - 0.012

จะได้ x = 37.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>ซ้ำที่ 2</u>

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.227

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.056

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.227 – 0.056

= 0.171

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการเส้นตรง $y = 0.005x - 0.012$

แทนค่า y = 0.171 ลงในสมการ

$0.171 = 0.005x - 0.012$

จะได้ $x = 36.6$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.229

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.056

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.229 – 0.056

= 0.173

จากสมการเส้นตรง $y = 0.005x - 0.012$

แทนค่า y = 0.173 ลงในสมการ

$0.173 = 0.005x - 0.012$

จะได้ $x = 37$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แสดงว่า มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย

$\frac{37.2+36.6+37}{3} = 36.93$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น สารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 36.93ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\right] \times 100$$

กำหนดให้ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH

$A_{sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH กับสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 สารสกัดภายนอกเซลล์

วิธีคำนวณ

หาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

ซ้ำที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับอาหาร NB) = 1.184

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.524

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.064

ค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร NB = 0.096

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.524 – (0.064 + 0.096)

= 0.364

แทนค่า $A_{control}$= 1.184 และ $A_{sample}$= 0.364 ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.184 - 0.364}{1.184}\right] \times 100$$

= 69.26 %

ซ้ำที่ 2

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับอาหาร NB) = 1.184

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.525

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.064

ค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร NB = 0.096

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.525 – (0.064 + 0.096)

= 0.365

แทนค่า $A_{control}$= 1.184 และ $A_{sample}$= 0.365 ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.184 - 0.365}{1.184}\right] \times 100$$

= 69.17 %

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับอาหาร NB) = 1.184

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.522

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.064

ค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร NB = 0.096

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.522 – (0.064 + 0.096)

= 0.362

แทนค่า $A_{control}$= 1.184 และ $A_{sample}$= 0.362 ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.184 - 0.362}{1.184}\right] \times 100$$

= 69.43 %

แสดงว่า มีค่า % Inhibition เฉลี่ย

$$\frac{69.26+69.17+69.43}{3} = 69.28\ \%$$

ดังนั้น สารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH69.28 %

2.2.2 สารสกัดภายในเซลล์

<u>วิธีคำนวณ</u>

หาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

<u>ซ้ำที่ 1</u>

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับเอทานอล) = 1.214

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.849

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.066

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.849 –0.066

= 0.789

แทนค่า $A_{control}$= 1.214 และ $A_{sample}$= 0.789ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.214 - 0.789}{1.214}\right] \times 100$$

= 35 %

<u>ซ้ำที่ 2</u>

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับเอทานอล) = 1.214

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.848

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.066

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.848 – 0.066

= 0.788

แทนค่า $A_{control}$= 1.214 และ $A_{sample}$= 0.788ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.214 - 0.788}{1.214}\right] \times 100$$

$$= 35.09\ \%$$

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับเอทานอล) = 1.214

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.848

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.066

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.848 – 0.066

= 0.782

แทนค่า $A_{control}$= 1.214 และ $A_{sample}$= 0.782ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.214 - 0.782}{1.214}\right] \times 100$$

$$= 35.58\ \%$$

แสดงว่า มีค่า % Inhibition เฉลี่ย

$$\frac{35+35.09+35.58}{3} = 35.23\ \%$$

ดังนั้น สารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลตTM21ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH35.23 %

2.2.3 สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีคำนวณ

หาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซ้ำที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับเอทานอล) = 1.221

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.113

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.06

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.113 – 0.06

= 0.073

แทนค่า $A_{control}$= 1.221 และ $A_{sample}$= 0.053 ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.221 - 0.053}{1.221}\right] \times 100$$

= 95.66 %

ซ้ำที่ 2

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับเอทานอล) = 1.221

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.114

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.06

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.114 – 0.06

= 0.054

แทนค่า $A_{control}$= 1.221 และ $A_{sample}$= 0.054 ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.221 - 0.054}{1.221}\right] \times 100$$

= 95.58 %

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{control}$ (สารละลาย DPPH กับเอทานอล) = 1.221

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่วัดได้ = 0.116

ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอล) = 0.06

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ $A_{sample}$ = 0.116 – 0.06

= 0.056

แทนค่า $A_{control}$= 1.221 และ $A_{sample}$= 0.056 ลงในสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.221 - 0.056}{1.221}\right] \times 100$$

= 95.41 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงว่า มีค่า % Inhibition เฉลี่ย

$$\frac{95.66+95.58+95.41}{3} = 95.55\ \%$$

ดังนั้น สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH9 5.55 %

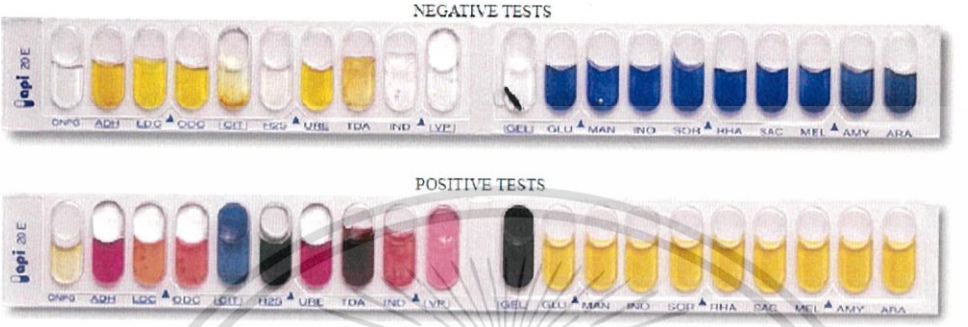


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ง

การแปรผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย Analytical Profile Idex (API)

**1. ชุดทดสอบ API 20 E**




**รูปที่ ผ-4** สีมาตรฐาน (color check) ตามแบบชุดทดสอบ API 20 E

**ตารางที่ ผ-3** แสดงการแปรผลของชุดทดสอบ API 20 E

| ช่องทดสอบ | สารออกฤทธิ์ | ปริมาณ (มิลลิกรัม/ช่อง) | ปฏิกิริยา/เอนไซม์ | ผลการทดลอง | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ผลลบ | ผลบวก |
| ONPG | 2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside | 0.223 | β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyanosidase) | ไม่มีสี | สีเหลือง |
| ADH | L-arginine | 1.9 | Arginine DiHydrolase | สีเหลือง | สีแดง/สีส้ม |
| LDC | L-lysine | 1.9 | Lysine DeCarboxylase | สีเหลือง | สีแดง/สีส้ม |
| ODC | L-ornithine | 1.9 | Ornithine DeCarboxylase | สีเหลือง | สีแดง/สีส้ม |
| CIT | trisodium citrate | 0.756 | CITrate utilization | สีเขียวอ่อน/สีเหลือง | สีน้ำเงินปนเขียว/สีน้ำเงิน |
| $H_2S$ | Sodium thiosulfate | 0.075 | $H_2S$ production | ไม่มีสี/สีเทา | สีดำเข้ม/สีดำอ่อน |
| URE | urea | 0.76 | UREase | สีเหลือง | สีแดง/สี |

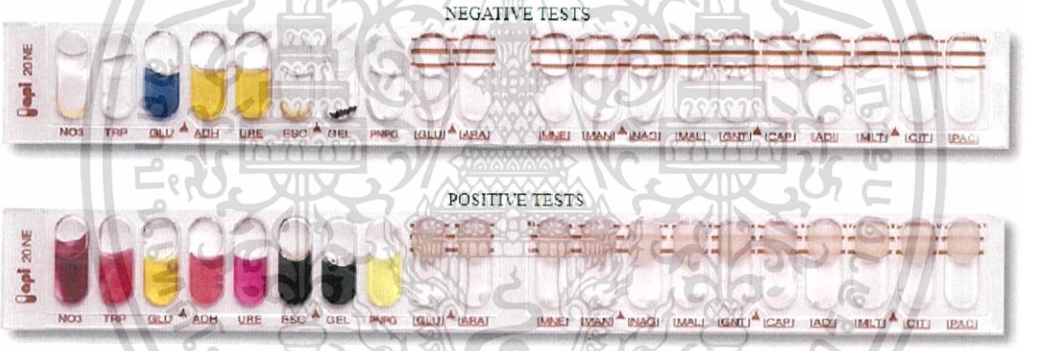
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | ส้ม |
|---|---|---|---|---|---|
| TDA | L-tryptophane | 0.38 | TryptophaneDeAminase | หยด TDA อ่านผลทันที<br>สีเหลือง | สีน้ำตาลแดง |
| IND | L-tryptophane | 0.19 | INDole product | หยด JAMES อ่านผลทันที<br>ไม่มีสี/สีเขียวอ่อน/สีเหลือง | สีชมพู |
| VP | Sodium pyruvate | 1.9 | Acetoin production(VogesProskauer) | หยด VP1+VP2 รอ 10 นาที<br>ไม่มีสี | สีชมพู/สีแดง |
| GEL | Gelatin (bovine origin) | 0.6 | GELatinase | ไม่มีการกระจายตัวของสี | มีสีดำกระจายตัว |
| GLU | D-glucose | 1.9 | Fermentation/oxidation (GLUcose) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง/สีเทาปนเหลือง |
| MAN | D-mannitol | 1.9 | Fermentation/oxidation (MANnitol) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| INO | inosital | 1.9 | Fermentation/oxidation (INOsitol) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| SOR | D-sorbitol | 1.9 | Fermentation/oxidation (SORbitol) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| RHA | L-rhamnose | 1.9 | Fermentation/oxidation (RHAmnose) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| SAC | D-sucrose | 1.9 | Fermentation/oxidation (SACcharose) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| MEL | D-melibiose | 1.9 | Fermentation/oxidation (MELibiose) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| AMY | amygdalin | 0.57 | Fermentation/oxidation (AMYgdalin) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| ARA | L-arabinose | 1.9 | Fermentation/oxidation (ARAbinose) | สีน้ำเงิน/สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| OX | ดูผลจากการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | | cytochrome-Oxidase | ดูผลจากการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | |

2. ชุดทดสอบ API 20 NE




**รูปที่ ผ-5** สีมาตรฐาน (color check) ตามแบบชุดทดสอบ API 20 NE

**ตารางที่ ผ-4** แสดงการแปรผลของชุดทดสอบ API 20 NE

| ช่องทดสอบ | สารออกฤทธิ์ | ปริมาณ (มิลลิกรัม/ช่อง) | ปฏิกิริยา/เอนไซม์ | ผลการทดลอง | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ผลลบ | ผลบวก |
| $NO_3$ | Potassium nitrate | 0.136 | Reduction of nitrates to nitrites | <u>หยด NIT1+NIT2 รอ 5 นาที</u> | |
| | | | | ไม่มีสี | สีชมพูปนแดง |
| TRP | L-tryptophane | 0.2 | Indole production | <u>หยด JAMES อ่านผลทันที</u> | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | (TRptoPhane) | ไม่มีสี/สีเขียวอ่อน/สีเหลือง | สีชมพู |
| GLU | D-glucose | 1.92 | Fermentation (GLUcose) | สีน้ำเงินปนเขียว | สีเหลือง |
| ADH | L-arginine | 1.92 | Arginine DiHydrolase | สีเหลือง | สีส้ม/สีชมพู/สีแดง |
| URE | urea | 0.76 | UREase | สีเหลือง | สีส้ม/สีชมพู/สีแดง |
| ESC | esculin<br>ferric citrate | 0.56<br>0.072 | hydrolysis (ß-glucosidase) (ESCulin) | สีเหลือง | สีเทา/สีน้ำตาล/สีดำ |
| GEL | Gelatin (bovine origin) | 0.6 | hydrolysis (protease) (GELatin) | ไม่มีการกระจายตัวของสี | มีสีดำกระจายตัว |
| PNPG | 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside | 0.22 | ß-galactosidase(Para-NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase) | ไม่มีสี | สีเหลือง |
| GLU | D-glucose | 1.56 | Assimilation(GLUcose) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| ARA | L-arabinose | 1.4 | Assimilation(ARAbinose) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| MNE | D-mannose | 1.4 | Assimilation (ManNose) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| MAN | D-mannitol | 1.36 | assimilation (MANnitol) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| NAG | N-acetyl-glucosamine | 1.28 | Assimilation (N-Acetyl-Glucosamine) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| MAL | D-maltose | 1.4 | assimilation (MALtose) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| GNT | Potassium gluconate | 1.84 | assimilation (potassium GlucoNate) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| CAP | capric acid | 0.78 | assimilation (CAPric acid) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| ADI | adipic acid | 1.12 | assimilation (ADIpic acid) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| MLT | malic acid | 1.56 | assimilation (MaLaTe) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| CIT | trisodium citrate | 2.28 | assimilation (trisodiumCITrate) | โปร่งใส | ทึบแสง |
| PAC | phenylacetic acid | 0.8 | assimilation (Phenyl | โปร่งใส | ทึบแสง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Acetic acid) | | |
| OX | ดูผลจากการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | - | cytochrome oxidase | ดูผลจากการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส | |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก จ

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

**ตารางที่ ผ-5** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรของสารสกัดภายนอกเซลล์

| ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 1 | 0.559 | 0.601 | 0.636 | 0.568 | 0.617 | 0.653 | 0.498 |
| | 2 | 0.556 | 0.602 | 0.637 | 0.569 | 0.614 | 0.654 | 0.499 |
| | 3 | 0.555 | 0.6 | 0.635 | 0.57 | 0.614 | 0.657 | 0.498 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.059 | 0.059 | 0.059 | 0.059 | 0.059 | 0.059 | 0.059 |
| TM17 | 1 | 0.596 | 0.619 | 0.666 | 0.612 | 0.65 | 0.693 | 0.554 |
| | 2 | 0.596 | 0.62 | 0.668 | 0.616 | 0.648 | 0.69 | 0.552 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 0.592 | 0.62 | 0.668 | 0.618 | 0.648 | 0.692 | 0.55 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 |
| TM18 | 1 | 0.719 | 0.746 | 0.789 | 0.722 | 0.768 | 0.796 | 0.695 |
| | 2 | 0.718 | 0.744 | 0.79 | 0.727 | 0.766 | 0.798 | 0.696 |
| | 3 | 0.72 | 0.745 | 0.787 | 0.725 | 0.767 | 0.796 | 0.693 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 |
| TM19 | 1 | 0.656 | 0.704 | 0.746 | 0.677 | 0.705 | 0.747 | 0.614 |
| | 2 | 0.652 | 0.708 | 0.749 | 0.674 | 0.702 | 0.746 | 0.612 |
| | 3 | 0.654 | 0.706 | 0.749 | 0.677 | 0.706 | 0.749 | 0.615 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 |
| TM20 | 1 | 0.788 | 0.811 | 0.843 | 0.781 | 0.823 | 0.861 | 0.743 |
| | 2 | 0.789 | 0.811 | 0.841 | 0.786 | 0.825 | 0.869 | 0.746 |
| | 3 | 0.786 | 0.809 | 0.839 | 0.783 | 0.824 | 0.867 | 0.744 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Blank (เอทานอล) | | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 | 0.058 |
| TM21 | 1 | 0.834 | 0.861 | 0.887 | 0.822 | 0.86 | 0.898 | 0.795 |
| | 2 | 0.831 | 0.864 | 0.886 | 0.825 | 0.852 | 0.897 | 0.798 |
| | 3 | 0.832 | 0.863 | 0.889 | 0.829 | 0.856 | 0.897 | 0.796 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 | 0.057 |

**ตารางที่ ผ-6** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรของสารสกัดภายในเซลล์

| ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 1 | 0.117 | 0.121 | 0.127 | 0.118 | 0.129 | 0.141 | 0.11 |
| | 2 | 0.117 | 0.125 | 0.129 | 0.116 | 0.127 | 0.141 | 0.112 |
| | 3 | 0.118 | 0.123 | 0.128 | 0.116 | 0.126 | 0.14 | 0.111 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Blank (เอทานอล) | | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 |
| TM17 | 1 | 0.123 | 0.128 | 0.138 | 0.124 | 0.133 | 0.149 | 0.113 |
| | 2 | 0.122 | 0.129 | 0.137 | 0.124 | 0.131 | 0.149 | 0.113 |
| | 3 | 0.121 | 0.128 | 0.135 | 0.126 | 0.131 | 0.148 | 0.113 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 |
| TM18 | 1 | 0.13 | 0.136 | 0.149 | 0.138 | 0.152 | 0.168 | 0.117 |
| | 2 | 0.128 | 0.137 | 0.15 | 0.136 | 0.151 | 0.166 | 0.116 |
| | 3 | 0.129 | 0.137 | 0.149 | 0.137 | 0.151 | 0.165 | 0.118 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 |
| TM19 | 1 | 0.126 | 0.133 | 0.143 | 0.128 | 0.146 | 0.157 | 0.115 |
| | 2 | 0.127 | 0.135 | 0.145 | 0.127 | 0.144 | 0.156 | 0.114 |
| | 3 | 0.127 | 0.134 | 0.143 | 0.129 | 0.144 | 0.158 | 0.114 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TM20 | 1 | 0.134 | 0.144 | 0.164 | 0.144 | 0.157 | 0.187 | 0.122 |
| | 2 | 0.132 | 0.144 | 0.163 | 0.148 | 0.159 | 0.181 | 0.12 |
| | 3 | 0.133 | 0.145 | 0.165 | 0.146 | 0.159 | 0.186 | 0.121 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 |
| TM21 | 1 | 0.138 | 0.148 | 0.173 | 0.165 | 0.171 | 0.23 | 0.129 |
| | 2 | 0.137 | 0.147 | 0.171 | 0.17 | 0.177 | 0.227 | 0.129 |
| | 3 | 0.137 | 0.149 | 0.169 | 0.167 | 0.173 | 0.229 | 0.125 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |

**ตารางที่ ผ-7** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารสกัดภายนอกเซลล์

| ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517นาโนเมตร | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 1 | 0.82 | 0.785 | 0.745 | 0.818 | 0.778 | 0.737 | 0.844 |
| | 2 | 0.819 | 0.784 | 0.746 | 0.817 | 0.779 | 0.736 | 0.845 |
| | 3 | 0.819 | 0.784 | 0.747 | 0.817 | 0.778 | 0.735 | 0.845 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 |
| NB | | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 |
| DPPH + NB | | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 |
| TM17 | 1 | 0.793 | 0.757 | 0.723 | 0.784 | 0.743 | 0.704 | 0.801 |
| | 2 | 0.792 | 0.758 | 0.724 | 0.783 | 0.744 | 0.706 | 0.803 |
| | 3 | 0.794 | 0.754 | 0.721 | 0.785 | 0.7432 | 0.704 | 0.802 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Blank (เอทานอล) | | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 |
| NB | | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 |
| DPPH + NB | | 1.183 | 1.183 | 1.183 | 1.183 | 1.183 | 1.183 | 1.183 |
| TM18 | 1 | 0.71 | 0.682 | 0.642 | 0.699 | 0.654 | 0.617 | 0.738 |
| | 2 | 0.709 | 0.683 | 0.643 | 0.698 | 0.653 | 0.618 | 0.737 |
| | 3 | 0.708 | 0.681 | 0.644 | 0.698 | 0.655 | 0.616 | 0.734 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 |
| NB | | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 |
| DPPH + NB | | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 |
| TM19 | 1 | 0.747 | 0.708 | 0.695 | 0.732 | 0.698 | 0.675 | 0.776 |
| | 2 | 0.747 | 0.707 | 0.694 | 0.731 | 0.697 | 0.673 | 0.779 |
| | 3 | 0.746 | 0.707 | 0.695 | 0.733 | 0.687 | 0.676 | 0.778 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 | 0.065 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NB | | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 |
| DPPH + NB | | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 |
| TM20 | 1 | 0.679 | 0.645 | 0.604 | 0.661 | 0.621 | 0.576 | 0.705 |
| | 2 | 0.676 | 0.643 | 0.602 | 0.663 | 0.623 | 0.575 | 0.704 |
| | 3 | 0.678 | 0.645 | 0.604 | 0.662 | 0.621 | 0.577 | 0.705 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 |
| NB | | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 |
| DPPH + NB | | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 |
| TM21 | 1 | 0.651 | 0.609 | 0.561 | 0.639 | 0.598 | 0.524 | 0.683 |
| | 2 | 0.652 | 0.607 | 0.563 | 0.64 | 0.597 | 0.525 | 0.686 |
| | 3 | 0.651 | 0.607 | 0.562 | 0.638 | 0.596 | 0.522 | 0.684 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 |
| NB | | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 | 0.096 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DPPH + NB | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 | 1.184 |

**ตารางที่ ผ-8** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารสกัดภายในเซลล์

| ไอโซเลต | ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517นาโนเมตร | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NB + แป้งถั่วเขียว | | | NB + แป้งมันฝรั่ง | | | NB |
| | | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L | |
| TM16 | 1 | 1.047 | 1.028 | 1.02 | 1.039 | 1.017 | 1.01 | 1.064 |
| | 2 | 0.985 | 0.962 | 0.951 | 0.974 | 0.952 | 0.943 | 0.997 |
| | 3 | 0.98 | 0.964 | 0.956 | 0.972 | 0.951 | 0.945 | 0.999 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 |
| DPPH + เอทานอล | | 1.118 | 1.118 | 1.118 | 1.118 | 1.118 | 1.118 | 1.118 |
| TM17 | 1 | 0.966 | 0.952 | 0.943 | 0.963 | 0.948 | 0.923 | 0.983 |
| | 2 | 0.967 | 0.951 | 0.943 | 0.965 | 0.946 | 0.925 | 0.983 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 0.968 | 0.953 | 0.944 | 0.962 | 0.947 | 0.925 | 0.982 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 | 0.063 |
| DPPH + เอทานอล | | 1.126 | 1.126 | 1.126 | 1.126 | 1.126 | 1.126 | 1.126 |
| TM18 | 1 | 0.947 | 0.941 | 0.924 | 0.94 | 0.933 | 0.908 | 0.955 |
| | 2 | 0.948 | 0.942 | 0.923 | 0.942 | 0.933 | 0.908 | 0.956 |
| | 3 | 0.946 | 0.941 | 0.924 | 0.939 | 0.936 | 0.906 | 0.958 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 | 0.061 |
| DPPH + เอทานอล | | 1.211 | 1.211 | 1.211 | 1.211 | 1.211 | 1.211 | 1.211 |
| TM19 | 1 | 0.964 | 0.944 | 0.934 | 0.953 | 0.942 | 0.918 | 0.966 |
| | 2 | 0.966 | 0.944 | 0.933 | 0.955 | 0.943 | 0.919 | 0.966 |
| | 3 | 0.961 | 0.945 | 0.933 | 0.954 | 0.941 | 0.917 | 0.967 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| DPPH + เอทานอล | | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 | 1.185 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TM20 | 1 | 0.923 | 0.906 | 0.893 | 0.914 | 0.907 | 0.865 | 0.94 |
| | 2 | 0.924 | 0.905 | 0.895 | 0.918 | 0.908 | 0.863 | 0.935 |
| | 3 | 0.925 | 0.908 | 0.894 | 0.919 | 0.902 | 0.867 | 0.939 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 | 0.062 |
| DPPH + เอทานอล | | 1.212 | 1.212 | 1.212 | 1.212 | 1.212 | 1.212 | 1.212 |
| TM21 | 1 | 0.891 | 0.88 | 0.868 | 0.883 | 0.878 | 0.849 | 0.911 |
| | 2 | 0.893 | 0.885 | 0.868 | 0.883 | 0.874 | 0.848 | 0.914 |
| | 3 | 0.89 | 0.884 | 0.864 | 0.882 | 0.876 | 0.842 | 0.916 |
| Blank (เอทานอล) | | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| DPPH + เอทานอล | | 1.214 | 1.214 | 1.214 | 1.214 | 1.214 | 1.214 | 1.214 |

**ตารางที่ ผ-9** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร |
|---|---|
| 1 | 0.113 |
| 2 | 0.114 |
| 3 | 0.116 |
| Blank (เอทานอล) | 0.06 |
| DPPH + เอทานอล | 1.221 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ฉ

ผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

**ตารางที่ ผ-10** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB

**Descriptives**

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 108.3333 | .14434 | .08333 | 107.9748 | 108.6919 | 108.25 | 108.50 |
| TM17 | 3 | 122.0000 | .50000 | .28868 | 120.7579 | 123.2421 | 121.50 | 122.50 |
| TM18 | 3 | 157.6667 | .38188 | .22048 | 156.7180 | 158.6153 | 157.25 | 158.00 |
| TM19 | 3 | 137.6667 | .38188 | .22048 | 136.7180 | 138.6153 | 137.25 | 138.00 |
| TM20 | 3 | 170.0833 | .38188 | .22048 | 169.1347 | 171.0320 | 169.75 | 170.50 |
| TM21 | 3 | 183.3333 | .38188 | .22048 | 182.3847 | 184.2820 | 183.00 | 183.75 |
| Total | 18 | 146.5139 | 27.13724 | 6.39631 | 133.0189 | 160.0089 | 108.25 | 183.75 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 12517.601 | 5 | 2503.520 | 17585.702 | .000 |
| Within Groups | 1.708 | 12 | .142 | | |
| Total | 12519.309 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1(f) | 2(e) | 3(d) | 4(c) | 5(b) | 6(a) |
| TM16 | 3 | 108.3333 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 122.0000 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 137.6667 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 157.6667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 170.0833 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 183.3333 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-11** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 122.9167 | .52042 | .30046 | 121.6239 | 124.2095 | 122.50 | 123.50 |
| TM17 | 3 | 132.6667 | .57735 | .33333 | 131.2324 | 134.1009 | 132.00 | 133.00 |
| TM18 | 3 | 163.7500 | .25000 | .14434 | 163.1290 | 164.3710 | 163.50 | 164.00 |
| TM19 | 3 | 147.7500 | .50000 | .28868 | 146.5079 | 148.9921 | 147.25 | 148.25 |
| TM20 | 3 | 180.9167 | .38188 | .22048 | 179.9680 | 181.8653 | 180.50 | 181.25 |
| TM21 | 3 | 192.3333 | .38188 | .22048 | 191.3847 | 193.2820 | 192.00 | 192.75 |
| Total | 18 | 156.7222 | 25.57240 | 6.02747 | 144.0054 | 169.4391 | 122.50 | 192.75 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 11114.694 | 5 | 2222.939 | 11038.041 | .000 |
| Within Groups | 2.417 | 12 | .201 | | |
| Total | 11117.111 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 122.9167 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 132.6667 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 147.7500 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 163.7500 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 180.9167 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 192.3333 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-12** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 134.0000 | .25000 | .14434 | 133.3790 | 134.6210 | 133.75 | 134.25 |
| TM17 | 3 | 138.9167 | .14434 | .08333 | 138.5581 | 139.2752 | 138.75 | 139.00 |
| TM18 | 3 | 170.2500 | .25000 | .14434 | 169.6290 | 170.8710 | 170.00 | 170.50 |
| TM19 | 3 | 160.7500 | .50000 | .28868 | 159.5079 | 161.9921 | 160.25 | 161.25 |
| TM20 | 3 | 186.5833 | .28868 | .16667 | 185.8662 | 187.3004 | 186.25 | 186.75 |
| TM21 | 3 | 199.9167 | .38188 | .22048 | 198.9680 | 200.8653 | 199.50 | 200.25 |
| Total | 18 | 165.0694 | 24.39515 | 5.74999 | 152.9380 | 177.2009 | 133.75 | 200.25 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 10115.851 | 5 | 2023.170 | 19422.433 | .000 |
| Within Groups | 1.250 | 12 | .104 | | |
| Total | 10117.101 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 134.0000 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 138.9167 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 160.7500 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 170.2500 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 186.5833 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 199.9167 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-13** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 142.7500 | .25000 | .14434 | 142.1290 | 143.3710 | 142.50 | 143.00 |
| TM17 | 3 | 150.8333 | .28868 | .16667 | 150.1162 | 151.5504 | 150.50 | 151.00 |
| TM18 | 3 | 181.1667 | .38188 | .22048 | 180.2180 | 182.1153 | 180.75 | 181.50 |
| TM19 | 3 | 171.2500 | .43301 | .25000 | 170.1743 | 172.3257 | 170.75 | 171.50 |
| TM20 | 3 | 194.2500 | .50000 | .28868 | 193.0079 | 195.4921 | 193.75 | 194.75 |
| TM21 | 3 | 206.0833 | .38188 | .22048 | 205.1347 | 207.0320 | 205.75 | 206.50 |
| Total | 18 | 174.3889 | 23.05209 | 5.43343 | 162.9254 | 185.8524 | 142.50 | 206.50 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 9032.028 | 5 | 1806.406 | 12386.781 | .000 |
| Within Groups | 1.750 | 12 | .146 | | |
| Total | 9033.778 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 142.7500 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 150.8333 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 171.2500 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 181.1667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 194.2500 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 206.0833 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-14** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 126.0000 | .25000 | .14434 | 125.3790 | 126.6210 | 125.75 | 126.25 |
| TM17 | 3 | 137.8333 | .76376 | .44096 | 135.9360 | 139.7306 | 137.00 | 138.50 |
| TM18 | 3 | 165.1667 | .62915 | .36324 | 163.6038 | 166.7296 | 164.50 | 165.75 |
| TM19 | 3 | 153.2500 | .43301 | .25000 | 152.1743 | 154.3257 | 152.75 | 153.50 |
| TM20 | 3 | 179.8333 | .62915 | .36324 | 178.2704 | 181.3962 | 179.25 | 180.50 |
| TM21 | 3 | 190.5833 | .87797 | .50690 | 188.4023 | 192.7643 | 189.75 | 191.50 |
| Total | 18 | 158.7778 | 23.16547 | 5.46015 | 147.2579 | 170.2977 | 125.75 | 191.50 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 9118.069 | 5 | 1823.614 | 4566.963 | .000 |
| Within Groups | 4.792 | 12 | .399 | | |
| Total | 9122.861 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 126.0000 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 137.8333 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 153.2500 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 165.1667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 179.8333 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 190.5833 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-15** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 137.5000 | .43301 | .25000 | 136.4243 | 138.5757 | 137.25 | 138.00 |
| TM17 | 3 | 146.1667 | .28868 | .16667 | 145.4496 | 146.8838 | 146.00 | 146.50 |
| TM18 | 3 | 175.7500 | .25000 | .14434 | 175.1290 | 176.3710 | 175.50 | 176.00 |
| TM19 | 3 | 160.3333 | .52042 | .30046 | 159.0405 | 161.6261 | 159.75 | 160.75 |
| TM20 | 3 | 190.0000 | .25000 | .14434 | 189.3790 | 190.6210 | 189.75 | 190.25 |
| TM21 | 3 | 198.2500 | 1.00000 | .57735 | 195.7659 | 200.7341 | 197.25 | 199.25 |
| Total | 18 | 168.0000 | 22.72324 | 5.35592 | 156.7000 | 179.3000 | 137.25 | 199.25 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 8774.542 | 5 | 1754.908 | 6317.670 | .000 |
| Within Groups | 3.333 | 12 | .278 | | |
| Total | 8777.875 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 137.5000 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 146.1667 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 160.3333 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 175.7500 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 190.0000 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 198.2500 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-16** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 147.4167 | .52042 | .30046 | 146.1239 | 148.7095 | 147.00 | 148.00 |
| TM17 | 3 | 156.9167 | .38188 | .22048 | 155.9680 | 157.8653 | 156.50 | 157.25 |
| TM18 | 3 | 183.1667 | .28868 | .16667 | 182.4496 | 183.8838 | 183.00 | 183.50 |
| TM19 | 3 | 171.0833 | .38188 | .22048 | 170.1347 | 172.0320 | 170.75 | 171.50 |
| TM20 | 3 | 200.4167 | 1.04083 | .60093 | 197.8311 | 203.0022 | 199.25 | 201.25 |
| TM21 | 3 | 208.5833 | .14434 | .08333 | 208.2248 | 208.9419 | 208.50 | 208.75 |
| Total | 18 | 177.9306 | 22.59633 | 5.32601 | 166.6937 | 189.1674 | 147.00 | 208.75 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 8676.601 | 5 | 1735.320 | 5949.669 | .000 |
| Within Groups | 3.500 | 12 | .292 | | |
| Total | 8680.101 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 147.4167 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 156.9167 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 171.0833 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 183.1667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 200.4167 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 208.5833 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-17** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 13.2000 | .20000 | .11547 | 12.7032 | 13.6968 | 13.00 | 13.40 |
| TM17 | 3 | 13.6000 | .00000 | .00000 | 13.6000 | 13.6000 | 13.60 | 13.60 |
| TM18 | 3 | 14.4000 | .20000 | .11547 | 13.9032 | 14.8968 | 14.20 | 14.60 |
| TM19 | 3 | 13.8667 | .11547 | .06667 | 13.5798 | 14.1535 | 13.80 | 14.00 |
| TM20 | 3 | 15.4000 | .20000 | .11547 | 14.9032 | 15.8968 | 15.20 | 15.60 |
| TM21 | 3 | 16.7333 | .46188 | .26667 | 15.5860 | 17.8807 | 16.20 | 17.00 |
| Total | 18 | 14.5333 | 1.25558 | .29594 | 13.9090 | 15.1577 | 13.00 | 17.00 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 26.107 | 5 | 5.221 | 90.369 | .000 |
| Within Groups | .693 | 12 | .058 | | |
| Total | 26.800 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (e) | 2 (d) | 3 (c) | 4 (b) | 5 (a) |
| TM16 | 3 | 13.2000 | | | | |
| TM17 | 3 | 13.6000 | 13.6000 | | | |
| TM19 | 3 | | 13.8667 | 13.8667 | | |
| TM18 | 3 | | | 14.4000 | | |
| TM20 | 3 | | | | 15.4000 | |
| TM21 | 3 | | | | | 16.7333 |
| Sig. | | .064 | .199 | .019 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-18** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 14.4667 | .11547 | .06667 | 14.1798 | 14.7535 | 14.40 | 14.60 |
| TM17 | 3 | 15.4000 | .20000 | .11547 | 14.9032 | 15.8968 | 15.20 | 15.60 |
| TM18 | 3 | 16.8000 | .20000 | .11547 | 16.3032 | 17.2968 | 16.60 | 17.00 |
| TM19 | 3 | 16.3333 | .11547 | .06667 | 16.0465 | 16.6202 | 16.20 | 16.40 |
| TM20 | 3 | 17.8000 | .20000 | .11547 | 17.3032 | 18.2968 | 17.60 | 18.00 |
| TM21 | 3 | 18.6667 | .11547 | .06667 | 18.3798 | 18.9535 | 18.60 | 18.80 |
| Total | 18 | 16.5778 | 1.45017 | .34181 | 15.8566 | 17.2989 | 14.40 | 18.80 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 35.431 | 5 | 7.086 | 265.733 | .000 |
| Within Groups | .320 | 12 | .027 | | |
| Total | 35.751 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 14.4667 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 15.4000 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 16.3333 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 16.8000 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 17.8000 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 18.6667 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-19** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 15.6000 | .40000 | .23094 | 14.6063 | 16.5937 | 15.20 | 16.00 |
| TM17 | 3 | 16.6667 | .11547 | .06667 | 16.3798 | 16.9535 | 16.60 | 16.80 |
| TM18 | 3 | 18.3333 | .11547 | .06667 | 18.0465 | 18.6202 | 18.20 | 18.40 |
| TM19 | 3 | 17.8000 | .20000 | .11547 | 17.3032 | 18.2968 | 17.60 | 18.00 |
| TM20 | 3 | 20.0667 | .11547 | .06667 | 19.7798 | 20.3535 | 20.00 | 20.20 |
| TM21 | 3 | 20.8000 | .20000 | .11547 | 20.3032 | 21.2968 | 20.60 | 21.00 |
| Total | 18 | 18.2111 | 1.86544 | .43969 | 17.2834 | 19.1388 | 15.20 | 21.00 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 58.598 | 5 | 11.720 | 251.133 | .000 |
| Within Groups | .560 | 12 | .047 | | |
| Total | 59.158 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (e) | 2 (d) | 3 (c) | 4 (b) | 5 (a) |
| TM16 | 3 | 15.6000 | | | | |
| TM17 | 3 | | 16.6667 | | | |
| TM19 | 3 | | | 17.8000 | | |
| TM18 | 3 | | | 18.3333 | | |
| TM20 | 3 | | | | 20.0667 | |
| TM21 | 3 | | | | | 20.8000 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .011 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-20** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 16.6000 | .20000 | .11547 | 16.1032 | 17.0968 | 16.40 | 16.80 |
| TM17 | 3 | 18.3333 | .30551 | .17638 | 17.5744 | 19.0922 | 18.00 | 18.60 |
| TM18 | 3 | 20.8667 | .11547 | .06667 | 20.5798 | 21.1535 | 20.80 | 21.00 |
| TM19 | 3 | 19.7333 | .23094 | .13333 | 19.1596 | 20.3070 | 19.60 | 20.00 |
| TM20 | 3 | 24.0000 | .20000 | .11547 | 23.5032 | 24.4968 | 23.80 | 24.20 |
| TM21 | 3 | 25.4000 | .40000 | .23094 | 24.4063 | 26.3937 | 25.00 | 25.80 |
| Total | 18 | 20.8222 | 3.15847 | .74446 | 19.2516 | 22.3929 | 16.40 | 25.80 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 168.791 | 5 | 33.758 | 506.373 | .000 |
| Within Groups | .800 | 12 | .067 | | |
| Total | 169.591 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 16.6000 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 18.3333 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 19.7333 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 20.8667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 24.0000 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 25.4000 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-21** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 14.3333 | .23094 | .13333 | 13.7596 | 14.9070 | 14.20 | 14.60 |
| TM17 | 3 | 15.9333 | .23094 | .13333 | 15.3596 | 16.5070 | 15.80 | 16.20 |
| TM18 | 3 | 18.4000 | .20000 | .11547 | 17.9032 | 18.8968 | 18.20 | 18.60 |
| TM19 | 3 | 16.6000 | .20000 | .11547 | 16.1032 | 17.0968 | 16.40 | 16.80 |
| TM20 | 3 | 20.4000 | .40000 | .23094 | 19.4063 | 21.3937 | 20.00 | 20.80 |
| TM21 | 3 | 24.6667 | .50332 | .29059 | 23.4163 | 25.9170 | 24.20 | 25.20 |
| Total | 18 | 18.3889 | 3.50292 | .82565 | 16.6469 | 20.1309 | 14.20 | 25.20 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 207.398 | 5 | 41.480 | 414.796 | .000 |
| Within Groups | 1.200 | 12 | .100 | | |
| Total | 208.598 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (e) | 2 (d) | 3 (c) | 4 (b) | 5 (a) |
| TM16 | 3 | 14.3333 | | | | |
| TM17 | 3 | | 15.9333 | | | |
| TM19 | 3 | | 16.6000 | | | |
| TM18 | 3 | | | 18.4000 | | |
| TM20 | 3 | | | | 20.4000 | |
| TM21 | 3 | | | | | 24.6667 |
| Sig. | | 1.000 | .024 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-22** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 16.4667 | .30551 | .17638 | 15.7078 | 17.2256 | 16.20 | 16.80 |
| TM17 | 3 | 17.3333 | .23094 | .13333 | 16.7596 | 17.9070 | 17.20 | 17.60 |
| TM18 | 3 | 21.2667 | .11547 | .06667 | 20.9798 | 21.5535 | 21.20 | 21.40 |
| TM19 | 3 | 19.9333 | .23094 | .13333 | 19.3596 | 20.5070 | 19.80 | 20.20 |
| TM20 | 3 | 22.8667 | .23094 | .13333 | 22.2930 | 23.4404 | 22.60 | 23.00 |
| TM21 | 3 | 25.9333 | .61101 | .35277 | 24.4155 | 27.4512 | 25.40 | 26.60 |
| Total | 18 | 20.6333 | 3.32495 | .78370 | 18.9799 | 22.2868 | 16.20 | 26.60 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 186.660 | 5 | 37.332 | 349.987 | .000 |
| Within Groups | 1.280 | 12 | .107 | | |
| Total | 187.940 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 16.4667 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 17.3333 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 19.9333 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 21.2667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 22.8667 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 25.9333 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-23** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

TPC

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 19.1333 | .11547 | .06667 | 18.8465 | 19.4202 | 19.00 | 19.20 |
| TM17 | 3 | 20.7333 | .11547 | .06667 | 20.4465 | 21.0202 | 20.60 | 20.80 |
| TM18 | 3 | 24.2667 | .30551 | .17638 | 23.5078 | 25.0256 | 24.00 | 24.60 |
| TM19 | 3 | 22.4000 | .20000 | .11547 | 21.9032 | 22.8968 | 22.20 | 22.60 |
| TM20 | 3 | 28.1333 | .64291 | .37118 | 26.5363 | 29.7304 | 27.40 | 28.60 |
| TM21 | 3 | 36.9333 | .30551 | .17638 | 36.1744 | 37.6922 | 36.60 | 37.20 |
| Total | 18 | 25.2667 | 6.11882 | 1.44222 | 22.2238 | 28.3095 | 19.00 | 37.20 |

ANOVA

TPC

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 635.147 | 5 | 127.029 | 1143.264 | .000 |
| Within Groups | 1.333 | 12 | .111 | | |
| Total | 636.480 | 17 | | | |

TPC

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 19.1333 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 20.7333 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 22.4000 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 24.2667 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 28.1333 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 36.9333 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-24** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 42.3066 | .04872 | .02813 | 42.1856 | 42.4276 | 42.28 | 42.36 |
| TM17 | 3 | 45.8157 | .08453 | .04880 | 45.6057 | 46.0257 | 45.73 | 45.90 |
| TM18 | 3 | 51.4487 | .17567 | .10142 | 51.0123 | 51.8850 | 51.31 | 51.65 |
| TM19 | 3 | 47.9606 | .12891 | .07442 | 47.6404 | 48.2808 | 47.85 | 48.10 |
| TM20 | 3 | 53.9977 | .04876 | .02815 | 53.8766 | 54.1189 | 53.97 | 54.05 |
| TM21 | 3 | 55.7151 | .12901 | .07449 | 55.3946 | 56.0356 | 55.57 | 55.83 |
| Total | 18 | 49.5407 | 4.79676 | 1.13061 | 47.1554 | 51.9261 | 42.28 | 55.83 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 390.999 | 5 | 78.200 | 6172.246 | .000 |
| Within Groups | .152 | 12 | .013 | | |
| Total | 391.151 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1(f) | 2(e) | 3(d) | 4(c) | 5(b) | 6(a) |
| TM16 | 3 | 42.3066 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 45.8157 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 47.9606 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 51.4487 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 53.9977 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 55.7151 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-25** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 44.4444 | .04872 | .02813 | 44.3234 | 44.5655 | 44.39 | 44.47 |
| TM17 | 3 | 46.5765 | .08453 | .04880 | 46.3665 | 46.7865 | 46.49 | 46.66 |
| TM18 | 3 | 53.7553 | .08439 | .04872 | 53.5456 | 53.9649 | 53.67 | 53.84 |
| TM19 | 3 | 50.5767 | .04872 | .02813 | 50.4556 | 50.6977 | 50.55 | 50.63 |
| TM20 | 3 | 56.2782 | .12901 | .07449 | 55.9577 | 56.5986 | 56.17 | 56.42 |
| TM21 | 3 | 58.5023 | .04876 | .02815 | 58.3811 | 58.6234 | 58.45 | 58.53 |
| Total | 18 | 51.6889 | 5.17291 | 1.21927 | 49.1165 | 54.2613 | 44.39 | 58.53 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 454.826 | 5 | 90.965 | 14349.037 | .000 |
| Within Groups | .076 | 12 | .006 | | |
| Total | 454.902 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 44.4444 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 46.5765 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 50.5767 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 53.7553 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 56.2782 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 58.5023 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-26** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 47.3980 | .04872 | .02813 | 47.2770 | 47.5191 | 47.34 | 47.43 |
| TM17 | 3 | 49.6760 | .17597 | .10159 | 49.2388 | 50.1131 | 49.54 | 49.87 |
| TM18 | 3 | 56.0338 | .08439 | .04872 | 55.8241 | 56.2434 | 55.95 | 56.12 |
| TM19 | 3 | 53.8959 | .04872 | .02813 | 53.7749 | 54.0170 | 53.84 | 53.92 |
| TM20 | 3 | 59.0935 | .09753 | .05631 | 58.8512 | 59.3357 | 59.04 | 59.21 |
| TM21 | 3 | 62.1903 | .09753 | .05631 | 61.9480 | 62.4326 | 62.08 | 62.25 |
| Total | 18 | 54.7146 | 5.25412 | 1.23841 | 52.1018 | 57.3274 | 47.34 | 62.25 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 469.174 | 5 | 93.835 | 9102.065 | .000 |
| Within Groups | .124 | 12 | .010 | | |
| Total | 469.297 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 47.3980 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 49.6760 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 53.8959 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 56.0338 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 59.0935 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 62.1903 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-27** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 50.6329 | .08439 | .04872 | 50.4233 | 50.8425 | 50.55 | 50.72 |
| TM17 | 3 | 52.5218 | .12912 | .07455 | 52.2011 | 52.8426 | 52.41 | 52.66 |
| TM18 | 3 | 59.3249 | .08439 | .04872 | 59.1153 | 59.5345 | 59.24 | 59.41 |
| TM19 | 3 | 54.9648 | .04872 | .02813 | 54.8438 | 55.0859 | 54.94 | 55.02 |
| TM20 | 3 | 62.5563 | .09753 | .05631 | 62.3140 | 62.7986 | 62.50 | 62.67 |
| TM21 | 3 | 66.0473 | .08446 | .04876 | 65.8375 | 66.2571 | 65.96 | 66.13 |
| Total | 18 | 57.6747 | 5.63866 | 1.32905 | 54.8706 | 60.4787 | 50.55 | 66.13 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 540.407 | 5 | 108.081 | 12986.949 | .000 |
| Within Groups | .100 | 12 | .008 | | |
| Total | 540.507 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 50.6329 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 52.5218 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 54.9648 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 59.3249 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 62.5563 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 66.0473 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-28** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 44.6132 | .04872 | .02813 | 44.4922 | 44.7343 | 44.56 | 44.64 |
| TM17 | 3 | 47.3373 | .08453 | .04880 | 47.1273 | 47.5473 | 47.25 | 47.42 |
| TM18 | 3 | 54.6554 | .04872 | .02813 | 54.5344 | 54.7764 | 54.60 | 54.68 |
| TM19 | 3 | 51.8143 | .08439 | .04872 | 51.6047 | 52.0240 | 51.73 | 51.90 |
| TM20 | 3 | 57.6014 | .08446 | .04876 | 57.3915 | 57.8112 | 57.52 | 57.69 |
| TM21 | 3 | 59.5439 | .08446 | .04876 | 59.3341 | 59.7537 | 59.46 | 59.63 |
| Total | 18 | 52.5943 | 5.47046 | 1.28940 | 49.8739 | 55.3147 | 44.56 | 59.63 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 508.675 | 5 | 101.735 | 18340.965 | .000 |
| Within Groups | .067 | 12 | .006 | | |
| Total | 508.741 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 44.6132 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 47.3373 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 51.8143 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 54.6554 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 57.6014 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 59.5439 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-29** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 47.9044 | .04872 | .02813 | 47.7833 | 48.0254 | 47.85 | 47.93 |
| TM17 | 3 | 50.7692 | .04473 | .02582 | 50.6581 | 50.8803 | 50.72 | 50.80 |
| TM18 | 3 | 58.3966 | .08439 | .04872 | 58.1870 | 58.6063 | 58.31 | 58.48 |
| TM19 | 3 | 55.0211 | .51331 | .29636 | 53.7460 | 56.2962 | 54.68 | 55.61 |
| TM20 | 3 | 61.0079 | .09753 | .05631 | 60.7656 | 61.2501 | 60.90 | 61.06 |
| TM21 | 3 | 63.0912 | .08446 | .04876 | 62.8814 | 63.3010 | 63.01 | 63.18 |
| Total | 18 | 56.0317 | 5.55965 | 1.31042 | 53.2670 | 58.7965 | 47.85 | 63.18 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 524.882 | 5 | 104.976 | 2159.777 | .000 |
| Within Groups | .583 | 12 | .049 | | |
| Total | 525.465 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 47.9044 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 50.7692 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 55.0211 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 58.3966 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 61.0079 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 63.0912 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-30** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 51.4768 | .08439 | .04872 | 51.2672 | 51.6864 | 51.39 | 51.56 |
| TM17 | 3 | 54.0434 | .09761 | .05635 | 53.8009 | 54.2859 | 53.93 | 54.10 |
| TM18 | 3 | 61.5190 | .08439 | .04872 | 61.3094 | 61.7286 | 61.43 | 61.60 |
| TM19 | 3 | 56.6526 | .12891 | .07442 | 56.3324 | 56.9728 | 56.54 | 56.79 |
| TM20 | 3 | 64.8649 | .08446 | .04876 | 64.6551 | 65.0747 | 64.78 | 64.95 |
| TM21 | 3 | 69.2849 | .12901 | .07449 | 68.9644 | 69.6054 | 69.17 | 69.43 |
| Total | 18 | 59.6403 | 6.38170 | 1.50418 | 56.4667 | 62.8138 | 51.39 | 69.43 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 692.216 | 5 | 138.443 | 12945.763 | .000 |
| Within Groups | .128 | 12 | .011 | | |
| Total | 692.344 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (f) | 2 (e) | 3 (d) | 4 (c) | 5 (b) | 6 (a) |
| TM16 | 3 | 51.4768 | | | | | |
| TM17 | 3 | | 54.0434 | | | | |
| TM19 | 3 | | | 56.6526 | | | |
| TM18 | 3 | | | | 61.5190 | | |
| TM20 | 3 | | | | | 64.8649 | |
| TM21 | 3 | | | | | | 69.2849 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-31** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 14.6691 | 3.40950 | 1.96848 | 6.1994 | 23.1387 | 10.73 | 16.73 |
| TM17 | 3 | 18.3245 | .05127 | .02960 | 18.1971 | 18.4518 | 18.29 | 18.38 |
| TM18 | 3 | 26.0666 | .12614 | .07283 | 25.7533 | 26.3800 | 25.93 | 26.18 |
| TM19 | 3 | 23.5162 | .04872 | .02813 | 23.3951 | 23.6372 | 23.46 | 23.54 |
| TM20 | 3 | 27.7228 | .21830 | .12603 | 27.1805 | 28.2651 | 27.56 | 27.97 |
| TM21 | 3 | 29.6815 | .20730 | .11968 | 29.1665 | 30.1965 | 29.49 | 29.90 |
| Total | 18 | 23.3301 | 5.55804 | 1.31004 | 20.5661 | 26.0940 | 10.73 | 29.90 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 501.687 | 5 | 100.337 | 51.296 | .000 |
| Within Groups | 23.472 | 12 | 1.956 | | |
| Total | 525.160 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (d) | 2 (c) | 3 (b) | 4 (a) |
| TM16 | 3 | 14.6691 | | | |
| TM17 | 3 | | 18.3245 | | |
| TM19 | 3 | | | 23.5162 | |
| TM18 | 3 | | | 26.0666 | 26.0666 |
| TM20 | 3 | | | | 27.7228 |
| TM21 | 3 | | | | 29.6815 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .045 | .010 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-32** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 16.1002 | 3.33836 | 1.92741 | 7.8072 | 24.3931 | 12.25 | 18.25 |
| TM17 | 3 | 19.7158 | .08881 | .05127 | 19.4952 | 19.9364 | 19.63 | 19.80 |
| TM18 | 3 | 26.8373 | .08258 | .04768 | 26.6322 | 27.0425 | 26.75 | 26.92 |
| TM19 | 3 | 23.7412 | .21237 | .12261 | 23.2136 | 24.2688 | 23.54 | 23.97 |
| TM20 | 3 | 28.8779 | .08251 | .04764 | 28.6729 | 29.0828 | 28.80 | 28.96 |
| TM21 | 3 | 31.5211 | .12583 | .07265 | 31.2086 | 31.8337 | 31.38 | 31.63 |
| Total | 18 | 24.4656 | 5.56392 | 1.31143 | 21.6987 | 27.2325 | 12.25 | 31.63 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 503.819 | 5 | 100.764 | 53.850 | .000 |
| Within Groups | 22.454 | 12 | 1.871 | | |
| Total | 526.273 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (e) | 2 (d) | 3 (c) | 4 (b) | 5 (a) |
| TM16 | 3 | 16.1002 | | | | |
| TM17 | 3 | | 19.7158 | | | |
| TM19 | 3 | | | 23.7412 | | |
| TM18 | 3 | | | 26.8373 | 26.8373 | |
| TM20 | 3 | | | | 28.8779 | 28.8779 |
| TM21 | 3 | | | | | 31.5211 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .017 | .093 | .036 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-33** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 17.8295 | 3.35788 | 1.93867 | 9.4880 | 26.1709 | 13.95 | 19.86 |
| TM17 | 3 | 21.0480 | .08881 | .05127 | 20.8273 | 21.2686 | 20.96 | 21.14 |
| TM18 | 3 | 27.3053 | .04768 | .02753 | 27.1868 | 27.4237 | 27.25 | 27.33 |
| TM19 | 3 | 25.3727 | .04872 | .02813 | 25.2517 | 25.4937 | 25.32 | 25.40 |
| TM20 | 3 | 30.3355 | .12603 | .07277 | 30.0224 | 30.6486 | 30.20 | 30.45 |
| TM21 | 3 | 32.2076 | .21794 | .12583 | 31.6662 | 32.7490 | 32.04 | 32.45 |
| Total | 18 | 25.6831 | 5.27491 | 1.24331 | 23.0599 | 28.3062 | 13.95 | 32.45 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 450.318 | 5 | 90.064 | 47.605 | .000 |
| Within Groups | 22.703 | 12 | 1.892 | | |
| Total | 473.020 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (d) | 2 (c) | 3 (b) | 4 (a) |
| TM16 | 3 | 17.8295 | | | |
| TM17 | 3 | 21.0480 | | | |
| TM19 | 3 | | 25.3727 | | |
| TM18 | 3 | | 27.3053 | 27.3053 | |
| TM20 | 3 | | | 30.3355 | 30.3355 |
| TM21 | 3 | | | | 32.2076 |
| Sig. | | .014 | .111 | .019 | .121 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-34** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 18.6345 | 3.44142 | 1.98691 | 10.0855 | 27.1834 | 14.67 | 20.84 |
| TM17 | 3 | 21.8176 | .05127 | .02960 | 21.6903 | 21.9450 | 21.76 | 21.85 |
| TM18 | 3 | 28.7641 | .04768 | .02753 | 28.6457 | 28.8825 | 28.74 | 28.82 |
| TM19 | 3 | 26.3010 | .04872 | .02813 | 26.1800 | 26.4220 | 26.24 | 26.33 |
| TM20 | 3 | 31.3531 | .08251 | .04764 | 31.1482 | 31.5581 | 31.27 | 31.44 |
| TM21 | 3 | 33.5530 | .19023 | .10983 | 33.0804 | 34.0256 | 33.44 | 33.77 |
| Total | 18 | 26.7372 | 5.47474 | 1.29041 | 24.0147 | 29.4597 | 14.67 | 33.77 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 485.751 | 5 | 97.150 | 49.009 | .000 |
| Within Groups | 23.787 | 12 | 1.982 | | |
| Total | 509.538 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (d) | 2 (c) | 3 (b) | 4 (a) |
| TM16 | 3 | 18.6345 | | | |
| TM17 | 3 | 21.8176 | | | |
| TM19 | 3 | | 26.3010 | | |
| TM18 | 3 | | 28.7641 | 28.7641 | |
| TM20 | 3 | | | 31.3531 | 31.3531 |
| TM21 | 3 | | | | 33.5530 |
| Sig. | | .017 | .053 | .044 | .080 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-35** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 16.9052 | 3.40950 | 1.96848 | 8.4355 | 25.3749 | 12.97 | 18.96 |
| TM17 | 3 | 20.0414 | .13566 | .07832 | 19.7044 | 20.3784 | 19.89 | 20.16 |
| TM18 | 3 | 27.3878 | .12614 | .07283 | 27.0745 | 27.7012 | 27.25 | 27.50 |
| TM19 | 3 | 24.5570 | .08439 | .04872 | 24.3473 | 24.7666 | 24.47 | 24.64 |
| TM20 | 3 | 29.4554 | .21830 | .12603 | 28.9132 | 29.9977 | 29.29 | 29.70 |
| TM21 | 3 | 32.2350 | .04756 | .02746 | 32.1169 | 32.3532 | 32.21 | 32.29 |
| Total | 18 | 25.0970 | 5.57245 | 1.31344 | 22.3259 | 27.8681 | 12.97 | 32.29 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 504.455 | 5 | 100.891 | 51.668 | .000 |
| Within Groups | 23.432 | 12 | 1.953 | | |
| Total | 527.887 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (d) | 2 (c) | 3 (b) | 4 (a) |
| TM16 | 3 | 16.9052 | | | |
| TM17 | 3 | 20.0414 | | | |
| TM19 | 3 | | 24.5570 | | |
| TM18 | 3 | | 27.3878 | 27.3878 | |
| TM20 | 3 | | | 29.4554 | 29.4554 |
| TM21 | 3 | | | | 32.2350 |
| Sig. | | .018 | .029 | .095 | .031 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-36** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 18.8432 | 3.38280 | 1.95306 | 10.4398 | 27.2465 | 14.94 | 20.84 |
| TM17 | 3 | 21.4920 | .08881 | .05127 | 21.2714 | 21.7126 | 21.40 | 21.58 |
| TM18 | 3 | 27.9108 | .14303 | .08258 | 27.5555 | 28.2661 | 27.75 | 27.99 |
| TM19 | 3 | 25.5696 | .08439 | .04872 | 25.3600 | 25.7793 | 25.49 | 25.65 |
| TM20 | 3 | 30.3905 | .26523 | .15313 | 29.7317 | 31.0494 | 30.20 | 30.69 |
| TM21 | 3 | 32.7842 | .16474 | .09512 | 32.3749 | 33.1934 | 32.62 | 32.95 |
| Total | 18 | 26.1651 | 5.11459 | 1.20552 | 23.6216 | 28.7085 | 14.94 | 32.95 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 421.551 | 5 | 84.310 | 43.698 | .000 |
| Within Groups | 23.153 | 12 | 1.929 | | |
| Total | 444.704 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (d) | 2 (c) | 3 (b) | 4 (a) |
| TM16 | 3 | 18.8432 | | | |
| TM17 | 3 | 21.4920 | | | |
| TM19 | 3 | | 25.5696 | | |
| TM18 | 3 | | 27.9108 | 27.9108 | |
| TM20 | 3 | | | 30.3905 | 30.3905 |
| TM21 | 3 | | | | 32.7842 |
| Sig. | | .038 | .061 | .049 | .056 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ผ-37** แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการเติมแป้งมันฝรั่งเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

Descriptives

DPPH

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| TM16 | 3 | 19.4991 | 3.40950 | 1.96848 | 11.0294 | 27.9688 | 15.56 | 21.56 |
| TM17 | 3 | 23.5050 | .10255 | .05921 | 23.2503 | 23.7598 | 23.45 | 23.62 |
| TM18 | 3 | 30.1129 | .09535 | .05505 | 29.8760 | 30.3497 | 30.06 | 30.22 |
| TM19 | 3 | 27.5949 | .08439 | .04872 | 27.3853 | 27.8046 | 27.51 | 27.68 |
| TM20 | 3 | 33.7459 | .16502 | .09527 | 33.3360 | 34.1558 | 33.58 | 33.91 |
| TM21 | 3 | 35.2279 | .31186 | .18005 | 34.4532 | 36.0026 | 35.01 | 35.58 |
| Total | 18 | 28.2810 | 5.78638 | 1.36386 | 25.4034 | 31.1585 | 15.56 | 35.58 |

ANOVA

DPPH

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 545.646 | 5 | 109.129 | 55.603 | .000 |
| Within Groups | 23.552 | 12 | 1.963 | | |
| Total | 569.198 | 17 | | | |

DPPH

Duncan[a]

| Isolate | N | Subset for alpha = 0.01 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (d) | 2 (c) | 3 (b) | 4 (a) |
| TM16 | 3 | 19.4991 | | | |
| TM17 | 3 | | 23.5050 | | |
| TM19 | 3 | | | 27.5949 | |
| TM18 | 3 | | | 30.1129 | |
| TM20 | 3 | | | | 33.7459 |
| TM21 | 3 | | | | 35.2279 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .048 | .219 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ช

การจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยสมบัติทางชีวเคมีด้วย analytical profile idex (API)

API 20 E

Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods

SUMMARY AND EXPLANATION

API 20 E is a standardized identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious, Gramnegative rods which uses 21 miniaturized biochemical tests and a database. The complete list of those organisms that it is possible to identify with this system is given in the Identification Table at the end of this package insert.

PRINCIPLE

The API 20 E strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates. These tests are inoculated with a bacterial suspension that reconstitutes the media. During incubation, metabolism produces color changes that are either spontaneous or revealed by the addition of reagents. The reactions are read according to the Reading Table and the identification is obtained by referring to the Analytical Profile Index or using the identification software.

CONTENT OF THE KIT

**Kit for 25 tests (ref. 20 100)**

- 25 API 20 E strips
- 25 incubation boxes
- 25 result sheets
- 1 clip seal
- 1 package insert

**Kit for 100 tests (ref. 20 160)**

- 100 API 20 E strips (4x25 strips)
- 100 incubation boxes
- 100 result sheets

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1 clip seal
- 1 package insert

## COMPOSITION OF THE STRIP

The composition of the API 20 E strip is given in the Reading Table of this package insert.

## REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOTPROVIDED

**Reagents :**

- API NaCl 0.85 % Medium, 5 ml (Ref. 20 230) or API Suspension Medium, 5 ml (Ref. 20 150)
- API 20 E reagent kit (Ref. 20 120) or

individual reagents : TDA (Ref. 70 402)
JAMES (Ref. 70 542)
VP 1 + VP 2 (Ref. 70 422)
NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70 442)

- Zn reagent (Ref. 70 380) - Oxidase (Ref. 55 635*)

* reference not sold in certain countries : use an equivalent reagent.

- Mineral oil (Ref. 70 100)
- API 20 E Analytical Profile Index (Ref. 20 190) or identification software (consult bioMérieux)

**Material :**

- Pipettes or PSIpettes
- Ampule protector
- Ampule rack
- General microbiology laboratory equipment

## POSSIBLE ADDITIONAL REAGENTS :

- API OF Medium (Ref. 50 110) :

Test for the determination of fermentative or oxidative metabolism.

- API M Medium (Ref. 50 120) :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Test for motility of facultative anaerobic bacteria.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

• For in vitro diagnostic use and microbiological control.

• For professional use only.

• This kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not totally guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious, and handled observing the usual safety precautions (do not ingest or inhale).

• All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", or to the regulations currently in use in each country.

• Do not use reagents past the expiration date.

• Before use, check that the packaging of the various components is intact.

• Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, desiccant sachet open,..

• The performance data presented were obtained using the procedure indicated in this package insert. Any change or modification in the procedure may affect the results.

• Interpretation of the test results should be made taking into consideration the patient history, the source of the specimen, colonial and microscopic morphology of the strain and, if necessary, the results of any other tests performed, particularly the antimicrobial susceptibility patterns.

STORAGE CONDITIONS

The strips are supplied in an aluminum pouch with desiccant sachets.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Once opened (*), the pouch should be re-sealed using the clip seal (included in the kit) to preserve the remaining strips with the desiccant sachets : place the open end of the pouch along the seal and carefully clamp between the two parts. The strips may then be kept for up to **10 months after the pouch has been opened**, at 2-8°C (or until the expiration date indicated on the packaging, if this comes before).

(*) Recommended method for opening the pouches : cut open the pouch just below the seal while holding the pouch upright, in order to avoid damaging the desiccant sachets.

SPECIMENS (COLLECTION AND PREPARATION)

API 20 E is not for use directly with clinical or other specimens.

The microorganisms to be identified must first be isolated on a culture medium adapted to the culture of *Enterobacteriaceae* and/or non-fastidious Gram-negative rods, according to standard microbiological techniques.

INSTRUCTIONS FOR USE

Oxidase test

The oxidase test must be performed according to the manufacturer's instructions for use. The result should be recorded on the result sheet as it is an integral part of the final profile (21st identification test).

Preparation of the strip

• Prepare an incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g., $Cl_2$, $CO_2$, etc.)] into the honeycombed wells of the tray to create a humid atmosphere.

• Record the strain reference on the elongated flap of the tray. (Do not record the reference on the lid as it may be misplaced during the procedure.)

• Remove the strip from its packaging.

• Place the strip in the incubation box.

**NOTE :** API 20 E should only be used with *Enterobacteriaceae* and/or non-fastidious Gram-negative rods. Fastidious organisms having demanding nutritional requirements and requiring appropriate handling precautions (i.e., *Brucella*and *Francisella*) are not

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

included in the API 20 E database. Alternative procedures must be used to exclude or confirm their presence.

**Preparation of the inoculums**

• Open an ampule of API NaCl 0.85 % Medium (5 ml) or an ampule of API Suspension Medium (5 ml) as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for these products, or use any tube containing 5 ml of sterile saline or sterile distilled water, without additives.

• Using a pipette or PSIpette, remove a single wellisolated colony from an isolation plate. It is recommended to use young cultures (18-24 hours old).

• Carefully emulsify to achieve a homogeneous bacterial suspension. This suspension must be used immediately after preparation.

**NOTE :** most *Vibrio* species are halophilous. If a *Vibrio* is suspected, suspend the bacteria in API NaCl 0.85 % Medium.

**Inoculation of the strip**

• Using the same pipette, fill both tube and cupule of the tests CIT , VP and GEL with the bacterial suspension.

• Fill only the tube (and not the cupule) of the other tests.

• Create anaerobiosis in the tests ADH, LDC, ODC, $H_2S$ and UREby overlaying with mineral oil.

• Close the incubation box.

• Incubate at 36°C ± 2°C for 18-24 hours.

READING AND INTERPRETATION

**Reading the strip**

• After the incubation period, read the strip by referring to the Reading Table.

• If 3 or more tests (GLU test + or –) are positive, record all the spontaneous reactions on the result sheet and then reveal the tests which require the addition of reagents :

- TDA Test : add 1 drop of TDA reagent. A **reddish brown** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.

- IND Test : add 1 drop of JAMES reagent. A **pink** color developed in the whole cupuleindicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- VP Test : add 1 drop each of VP 1 and VP 2 reagents. Wait at least 10 minutes. A **pink** or **red** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet. If a **slightly pink** color appears after 10 minutes, the reaction should be considered **negative**.

**NOTE :** The indole production test must be performed last since this reaction releases gaseous products which interfere with the interpretation of other tests on the strip. The plastic incubation lid should not be replaced after the addition of the reagent.

• If the number of positive tests (including the GLU test) before adding the reagents is less than 3 :

- Reincubate the strip for a further 24 hours (± 2 hours) without adding any reagents.
- Reveal the tests requiring the addition of reagents (see previous paragraph).
- To complete the identification, it may be necessary to perform supplementary tests (refer to Identification paragraph).

**Interpretation**

**Identification is obtained with the numerical profile.**

• Determination of the numerical profile : On the result sheet, the tests are separated into groups of 3 and a value 1, 2 or 4 is indicated for each. By adding together the values corresponding to positive reactions within each group, a 7-digit profile number is obtained for the 20 tests of the API 20 E strip. The oxidase reaction constitutes the 21st test and has a value of 4 if it is positive.

• Identification :

This is performed using the database (V4.0)

* with the Analytical Profile Index :
  - Look up the numerical profile in the list of profiles.

* with the identification software :
  - Enter the 7-digit numerical profile manually via the keyboard.

In some cases, the 7-digit profile is not discriminatory enough and the following supplementary tests need to be carried out :

- Reduction of nitrates to nitrites ($NO_2$) and $N_2$ gas ($N_2$) : add 1 drop each of NIT 1 and NIT 2 reagents to the GLU tube. Wait 2 to 5 minutes. A **red** color indicates a **positive** reaction (NO2). A negative reaction (yellow) may be due to the reduction to nitrogen

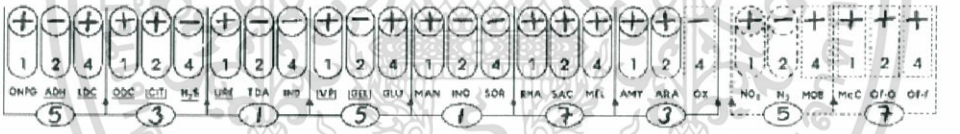
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(as sometimes evidenced by gas bubbles) : add 2 to 3 mg of Zn reagent to the GLU tube. After 5 minutes, if the tube remains **yellow** this indicates a **positive** reaction ($N_2$) to be recorded on the result sheet. If the test turns **orangered**, this is a **negative**reaction : the nitrates still present in the tube have been reduced by the Zinc. This reaction is useful when testing Gram-negative, oxidase positive rods.

**NOTE :** For the same reason as the indole test (see the note in the paragraph "Reading the strip"), the nitrate reduction test must be performed last.

- Motility (MOB) : Inoculate an ampule of API M Medium (see package insert).
- Growth on MacConkey agar medium (McC) : Streak a MacConkey agar plate (see package insert).
- Oxidation of glucose (OF-O) : Inoculate an ampule of API OF Medium (see package insert).
- Fermentation of glucose (OF-F) : Inoculate an ampule of API OF Medium (see package insert).

These supplementary tests, indicated in the introduction section (Profile coding) of the Analytical Profile Index, may be used to form a 9-digit profile. Identification is then obtained using the identification software.




5

315 173 (57) *Enterobactergergoviae*

Further tests may be proposed in case of low discrimination. Refer to the identification software or Analytical Profile Index.

## QUALITY CONTROL

The media, strips, and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. For those users who wish to perform their own quality control tests with the strip, it is preferable to use the strain

1. *Escherichia coli* ATCC 25922 or else one of the following strains :
2. *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 51331
3. *Enterobacter cloacae* ATCC 13047
4. *Proteus mirabilis* ATCC 35659
5. *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* ATCC 35657

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

| | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | $H_2S$ | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | $NO_2$ | $N_2$* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | + | – | + | + | – | – | – | – | + | – | – | + | + | – | + | + | – | + | – | + | + | – |
| 2. | + | – | V | – | V | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 3. | + | + | – | + | + | – | – | – | – | + | – | + | + | – | + | + | + | + | + | + | + | – |
| 4. | – | – | – | + | V | + | + | + | – | – | V | + | – | – | – | – | V | – | – | – | + | – |
| 5. | + | – | + | – | + | – | V | – | – | V | – | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – |

* The N2 (+) state may be observed for the strain ATCC 13047 and the strain ATCC 25922.

• Profile obtained after 24-48 hours of incubation for the strain ATCC 51331, using colonies grown on Trypticase Soy agar + blood.

• Profiles obtained after 18-24 hours of incubation for the other strains, using colonies grown on Trypticase Soy agar + blood.

• Bacterial suspensions prepared in API NaCl 0.85 % Medium.

It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any local applicable regulations.

## LIMITATIONS OF THE METHOD

• The API 20 E system is intended uniquely for the identification of *Enterobacteriaceae* and those nonfastidious, Gram-negative rods included in the database (see Identification Table at the end of this package insert). It cannot be used to identify any other microorganisms or to exclude their presence.

• Discrepancies with respect to conventional methods may be observed. They are due to the different principles of the reactions used in the API technique. In addition, substrate variations exist that also account for percentage differences.

• On rare occasions, the glucose reactions for organisms such as *Klebsiella* or *Proteus* may revert from positive to negative, in which instance a bluish-green color is seen. This reaction will be recorded as a negative reaction. Such occurrences are reflected in the percentages indicated in the Identification Table.

• If *Salmonella* or *Shigella* are identified, serological identification must be performed to confirm the bacterial identification.

• Only pure cultures of a single organism should be used.

## RANGE OF EXPECTED RESULTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Consult the Identification Table at the end of this package insert for the range of expected results for the various biochemical reactions.

PERFORMANCE

• *Enterobacteriaceae* :

5514 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested:

- 92.80 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).
- 4.61 % of the strains were not identified.
- 2.59 % of the strains were misidentified.

• Other non-fastidious Gram-negative rods :

2386 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested :

- 90.32 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).
- 6.16 % of the strains were not identified.
- 3.52 % of the strains were misidentified.

WASTE DISPOSAL

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABLITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

READING TABLE

| TESTS | ACTIVE INGREDIENTS | QTY (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | RESULTS | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | NEGATIVE | POSITIVE |
| ONPG | 2-nitrophenyl-ßD-galactopyranoside | 0.223 | ß-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-ßD-Galactopyranosidase) | colorless | yellow (1) |
| ADH | L-arginine | 1.9 | Arginine DiHydrolase | yellow | red / orange (2) |
| LDC | L-lysine | 1.9 | Lysine DeCarboxylase | yellow | red / orange (2) |
| ODC | L-ornithine | 1.9 | Ornithine DeCarboxylase | yellow | red / orange (2) |
| CIT | trisodium citrate | 0.756 | CITrate utilization | pale green / yellow | blue-green / blue (3) |
| $H_2S$ | sodium thiosulfate | 0.075 | $H_2S$ production | colorless / greyish | black deposit / thin line |
| URE | urea | 0.76 | UREase | yellow | red / orange (2) |
| TDA | L-tryptophane | 0.38 | Tryptophane DeAminase | TDA / immediate | |
| | | | | yellow | reddish brown |
| IND | L-tryptophane | 0.19 | INDole production | JAMES / immediate | |
| | | | | colorless pale green / yellow | pink |
| VP | sodium pyruvate | 1.9 | acetoin production (Voges Proskauer) | VP 1 + VP 2 / 10 min | |
| | | | | colorless | pink / red (5) |
| GEL | Gelatin (bovine origin) | 0.6 | GELatinase | no diffusion | diffusion of black pigment |
| GLU | D-glucose | 1.9 | fermentation / oxidation (GLUcose) (4) | blue / blue-green | yellow / greyish yellow |
| MAN | D-mannitol | 1.9 | fermentation / oxidation (MANnitol) (4) | blue / blue-green | yellow |
| INO | inositol | 1.9 | fermentation / oxidation (INOsitol) (4) | blue / blue-green | yellow |
| SOR | D-sorbitol | 1.9 | fermentation / oxidation (SORbitol) (4) | blue / blue-green | yellow |
| RHA | L-rhamnose | 1.9 | fermentation / oxidation (RHAmnose) (4) | blue / blue-green | yellow |
| SAC | D-sucrose | 1.9 | fermentation / oxidation (SACcharose) (4) | blue / blue-green | yellow |
| MEL | D-melibiose | 1.9 | fermentation / oxidation (MELibiose) (4) | blue / blue-green | yellow |
| AMY | amygdalin | 0.57 | fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4) | blue / blue-green | yellow |
| ARA | L-arabinose | 1.9 | fermentation / oxidation (ARAbinose) (4) | blue / blue-green | yellow |
| OX | (see oxidase test package insert) | | cytochrome-OXidase | (see oxidase test package insert) | |

(1) A very pale yellow should also be considered positive.

(2) An orange color after 36-48 hours incubation must be considered negative.

(3) Reading made in the cupule (aerobic).

(4) Fermentation begins in the lower portion of the tubes, oxidation begins in the cupule.

(5) A slightly pink color after 10 minutes should be considered negative.

• The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.

• Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## SUPPLEMENTARY TESTS

| TESTS | ACTIVE INGREDIENTS | QTY (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | RESULTS | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | NEGATIVE | POSITIVE |
| Nitrate reduction GLU tube | potassium nitrate | 0.076 | $NO_2$ production | NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min: yellow | red |
| | | | reduction to $N_2$ gas | Zn / 5 min: orange-red | yellow |
| MOB | API M Medium or microscope | | motility | non-motile | motile |
| McC | MacConkey medium | | growth | absence | presence |
| OF-F | glucose (API OF Medium) | | fermentation : under mineral oil | green | yellow |
| OF-O | | | oxidation : exposed to the air | green | yellow |


PROCEDURE p. I

IDENTIFICATION TABLE p. II

LITERATURE REFERENCES p. IV

INDEX OF SYMBOLS p. V


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## API 20 NE

Identification system for non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods

## SUMMARY AND EXPLANATION

API 20 NE is a standardized system for the identification of non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods (e.g. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), combining 8 conventional tests, 12 assimilation tests and a database. The complete list of those organisms that it is possible to identify with this system is given in the Identification Table at the end of this package insert.

## PRINCIPLE

The API 20 NE strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates.
The conventional tests are inoculated with a saline bacterial suspension which reconstitutes the media. During incubation, metabolism produces color changes that are either spontaneous or revealed by the addition of reagents.
The assimilation tests are inoculated with a minimal medium and the bacteria grow if they are capable of utilizing the corresponding substrate.
The reactions are read according to the Reading Table and the identification is obtained by referring to the Analytical Profile Index or using the identification software.

## CONTENT OF THE KIT (Kit for 25 tests)

- 25 API 20 NE strips
- 25 incubation boxes
- 25 ampules of API AUX Medium
- 25 result sheets
- 1 package insert

## COMPOSITION

### Strip

The composition of the API 20 NE strip is given in the Reading Table of this package insert.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Medium

| | | |
|---|---|---|
| **API AUX Medium** 7 ml | Ammonium sulphate | 2 g |
| | Agar | 1.5 g |
| | Vitamin solution | 10.5 ml |
| | Trace elements | 10 ml |
| | Monosodium phosphate | 6.24 g |
| | Potassium chloride | 1.5 g |
| | Demineralized water to make | 1000 ml |
| | Final pH : 7.0-7.2 | |

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Reagents :

- API NaCl 0.85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- Reagents : JAMES (Ref. 70 542)
  NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70 442)
  Zn (Ref. 70 380)
- Oxidase (Ref. 55 635*)

  * reference not sold in certain countries : use an equivalent reagent.
- Mineral oil (Ref. 70 100)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) No. 0.5
- API 20 NE Analytical Profile Index (Ref. 20 090) or identification software (consult bioMérieux)

Material :

- Pipettes or PSIpettes
- Ampule protector
- Ampule rack
- General microbiology laboratory equipment

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **For in *vitro* diagnostic use and microbiological control.**
- **For professional use only.**
- This kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not totally guarantee the absence of transmissible

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious, and handled observing the usual safety precautions (do not ingest or inhale).

• All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline* - December 1997". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", or to the regulations currently in use in each country.

• Do not use reagents past the expiration date.

• Before use, check that the packaging and components are intact.

• Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, etc.

• Open ampules carefully as follows :

- Place the ampule in the ampule protector.
- Hold the protected ampule in one hand in a vertical position (white plastic cap uppermost).
- Press the cap down as far as possible.
- Cover the flattened part of the cap with the upper part of the thumb.
- Apply thumb pressure in an outward motion to the base of the flattened part of the cap to snap off the top of the ampule inside the cap.
- Take the ampule out of the ampule protector and put the protector aside for subsequent use.
- Carefully remove the cap.

• The performance data presented were obtained using the procedure indicated in this package insert. Any change or modification in the procedure may affect the results.

• Interpretation of the test results should be made taking into consideration the patient history, the source of the specimen, colonial and microscopic morphology of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the strain and, if necessary, the results of any other tests performed, particularly the antimicrobial susceptibility patterns.

## STORAGE CONDITIONS

The strips and media should be stored at 2-8°C until the expiration date indicated on the packaging.

## SPECIMENS (COLLECTION AND PREPARATION)

API 20 NE is not for use directly with clinical or other specimens.

The microorganisms to be identified must first be isolated on a suitable culture medium (e.g., Trypticase Soy agar) according to standard microbiological techniques.

## INSTRUCTIONS FOR USE

### Oxidase test

The oxidase test must be performed according to the manufacturer's instructions for use. The result should be recorded on the result sheet as it is an integral part of the final profile (21st identification test).

### Selection of colonies

API 20 NE should only be used with non-fastidious Gramnegative rods which do not belong to the Enterobacteriaceae.

**NOTE 1 :** Some non-enteric Gram-negative rods are oxidase negative (*S. maltophilia, Acinetobacter*...). These microorganisms may also be identified with API 20 NE but their selection must be based on other bacteriological or clinical criteria.

**NOTE 2 :** Fastidious organisms having demanding nutritional requirements and requiring appropriate handling precautions (i.e. *Brucella* and *Francisella*) are not included in the API 20 NE database. Alternative procedures must be used to exclude or confirm their presence.

### Preparation of the strip

• Prepare an incubation box, tray and lid, and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

release gases (e.g. $Cl_2$, $CO_2$, etc.)] into the bottom of the tray to create a humid atmosphere.

• Record the specimen number on the elongated flap of the tray. (Do not record the number on the lid as it may be misplaced during the procedure.)

• Remove the strip from its individual packaging.

• Place the strip in the incubation box.

**Preparation of the inoculum**

• Open an ampule of API NaCl 0.85 % Medium (2 ml) as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for this product, or use any tube containing 2 ml of 0.85 % physiological saline without additives.

• Using a pipette or PSIpette, pick up 1-4 colonies of identical morphology from the agar plate, either by suction or by successive touches. It is recommended to use young cultures (18-24 hours old).

• Prepare a suspension with a turbidity equivalent to 0.5 McFarland. This suspension must be used immediately after preparation.

**NOTE :** It is very important that the density of the inoculum be adjusted to 0.5 McFarland ; the API 20 NE strip tests may otherwise not function correctly. In particular, a weaker inoculum may lead to false negative results. Do not touch the cupules while working with the strip and do not leave the strip exposed to air for a long period of time after inoculation.

**Inoculation of the strip**

• Inoculate tests $NO_3$ to PNPG by distributing the saline suspension into the tubes (and not the cupules) using the same pipette. To avoid the formation of bubbles at the base of the tubes, tilt the strip slightly forwards and place the tip of the pipette or PSIpette against the side of the cupule.

• Open an ampule of API AUX Medium as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" and add approximately 200 µl of the remaining saline suspension to the ampule. Homogenize well with the pipette, avoiding the formation of bubbles.

• Fill the tubes and cupules of tests GLU to PAC with the suspension. Take care to leave a flat or slightly convex, but not concave, meniscus. Cupules under or overfilled may give incorrect results.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

• Add mineral oil to the cupules of the 3 underlined tests (GLU, ADH and URE) until a convex meniscus is formed.

• Close the incubation box and incubate at 29°C ± 2°C for 24 hours (± 2 hours).

READING AND INTERPRETATION

**Reading the strip**

• After the incubation period, read the strip by referring to the Reading Table.

• Record all spontaneous reactions (GLU, ADH, URE, ESC, GEL and PNPG) on the result sheet.

• The reading of the two tests $NO_3$ and TRP should be performed whilst protecting the assimilation tests from airborne contamination. To do this, cover the assimilation tests with the incubation box lid during the reading of the $NO_3$ and TRP tests.

• **$NO_3$ test :**

- Add 1 drop of NIT 1 and 1 drop of NIT 2 reagents to the $NO_3$ cupule.
- After 5 minutes, a **red** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.
- A negative reaction may be due to the production of nitrogen (indicated by the presence of tiny bubbles) : add 2-3 mg of Zn reagent to the $NO_3$ cupule.
- After 5 minutes, a cupule remaining **colorless** indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet. If the cupule turns **pink-red**, the reaction is **negative** as nitrates were present in the tube and were reduced to nitrite by the zinc.

The reaction used for the identification of the bacterium is the reduction of nitrates. It is positive when either of the above reactions (production of $NO_2$ or $N_2$) is positive. The production of $N_2$ may, however, be useful alone as a supplementary test (refer to the Analytical Profile Index).

• **TRP test** :

Add 1 drop of JAMES reagent. The reaction takes place immediately : a **pink** color which develops in the whole cupule indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.

• **Assimilation tests :**

Observe the bacterial growth. An **opaque** cupule indicates a **positive** reaction.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Occasionally, a cupule may show weak growth. In this case, the results should be recorded as – + or +– by comparing the intensity to that of the other tests on the strip.

Once these readings have been made, identification should be possible as indicated in the paragraph "Interpretation". However, in the following cases, the strip must be reincubated :

- if the profile cannot be found in the API 20 NE Analytical Profile Index
- if the following note is indicated for the profile obtained :

IDENTIFICATION NOT VALID

BEFORE 48-HR INCUBATION

Using a pipette or PSIpette, remove the NIT 1, NIT 2 and JAMES reagents by suction and immediately cover tests $NO_3$ and TRP with mineral oil so that a convex meniscus is formed. Reincubate the strip at 29°C ± 2°C for a further 24 hours and read the all the tests again, except the first 3 ($NO_3$, TRP and GLU) which should only be read once at 24 hours.

**Interpretation**

Identification is obtained with the **numerical profile**.

• Determination of the numerical profile :

On the result sheet, the tests are separated into groups of 3 and a number 1, 2 or 4 is indicated for each. By adding the values corresponding to positive reactions within each group, a 7-digit number is obtained ; the oxidase reaction constitutes the 21st test and has a value of 4 if it is positive.

• Identification :

This is performed using the database (V6.0)

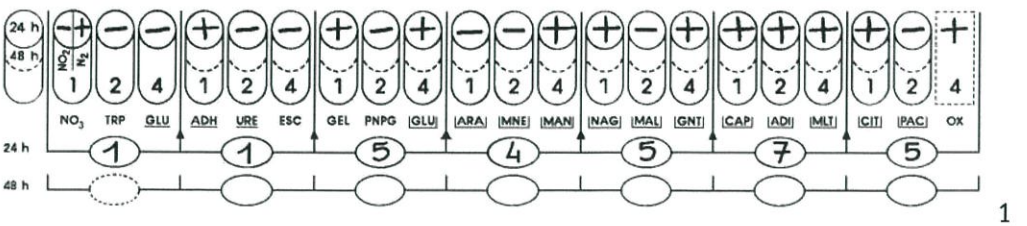
* with the Analytical Profile Index :

- Look up the numerical profile in the list of profiles.

* with the identification software :

- Enter the 7-digit numerical profile manually via the keyboard.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




1

154 575 Pseudomonas aeruginosa

## QUALITY CONTROL

The media, strips, and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. For those who wish to perform their own quality control tests with the strip, it is preferable to use the strain

**1. Sphingobacterium multivorum ATCC 35656** or else one of the following strains :

2. Aeromonas hydrophila ATCC 35654

3. Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

4. Alcaligenes faecalis ATCC 35655

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

| | $NO_3$ | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC | OX |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | – | – | – | – | + | + | – | + | + | + | + | – | + | + | – | – | – | – | – | – | + |
| 2. | + | + | + | + | – | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | + | –* | – | + |
| 3. | + | – | – | V | V | – | + | – | + | – | – | + | + | – | + | + | + | + | + | – | + |
| 4. | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | + | – | + | + | + | + |

* Weak reactions may occur.

Profiles for tests ADH to PAC obtained after 48 hours of incubation after culture of the colonies on Trypticase Soyagar. It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any local applicable regulations.

## LIMITATIONS OF THE METHOD

• The API 20 NE system is intended uniquely for the identification of those non-fastidious, non-enteric Gramnegative rods included in the database (see Identification Table at the end of this package insert). It cannot be used to identify any other microorganisms or to exclude their presence.

• Only pure cultures of a single organism should be used.

## RANGE OF EXPECTED RESULTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Consult the Identification Table at the end of this package insert for the range of expected results for the various biochemical reactions.

PERFORMANCE

5728 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested :

- 92.53 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).
- 3.13 % of the strains were not identified.
- 4.34 % of the strains were misidentified.

WASTE DISPOSAL

Unused ampules of API AUX Medium may be considered as non hazardous waste and disposed of accordingly.

Dispose of all used or unused reagents (other than the ampules of API AUX Medium) as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products.

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABLITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## READING TABLE

| TESTS | ACTIVE INGREDIENTS | QTY (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | RESULTS | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | NEGATIVE | POSITIVE |
| NO3 | potassium nitrate | 0.136 | reduction of nitrates to nitrites | NIT 1 + NIT 2 / 5 min colorless | pink-red |
| | | | reduction of nitrates to nitrogen | Zn / 5 min pink | colorless |
| TRP | L-tryptophane | 0.2 | indole production (TRyptoPhane) | JAMES / immediate colorless pale green / yellow | pink |
| GLU | D-glucose | 1.92 | fermentation (GLUcose) | blue to green | yellow |
| ADH | L-arginine | 1.92 | Arginine DiHydrolase | yellow | orange / pink / red |
| URE | urea | 0.76 | UREase | yellow | orange / pink / red |
| ESC | esculin<br>ferric citrate | 0.56<br>0.072 | hydrolysis (β-glucosidase) (ESCulin) | yellow | grey / brown / black |
| GEL | gelatin (bovine origin) | 0.6 | hydrolysis (protease) (GELatin) | no pigment diffusion | diffusion of black pigment |
| PNPG | 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside | 0.22 | β-galactosidase (Para-NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase) | colorless | yellow |
| GLU | D-glucose | 1.56 | assimilation (GLUcose) | transparent | opaque |
| ARA | L-arabinose | 1.4 | assimilation (ARAbinose) | transparent | opaque |
| MNE | D-mannose | 1.4 | assimilation (MaNnosE) | transparent | opaque |
| MAN | D-mannitol | 1.36 | assimilation (MANnitol) | transparent | opaque |
| NAG | N-acetyl-glucosamine | 1.28 | assimilation (N-Acetyl-Glucosamine) | transparent | opaque |
| MAL | D-maltose | 1.4 | assimilation (MALtose) | transparent | opaque |
| GNT | potassium gluconate | 1.84 | assimilation (potassium GluconAte) | transparent | opaque |
| CAP | capric acid | 0.78 | assimilation (CAPric acid) | transparent | opaque |
| ADI | adipic acid | 1.12 | assimilation (ADIpic acid) | transparent | opaque |
| MLT | malic acid | 1.56 | assimilation (MaLaTe) | transparent | opaque |
| CIT | trisodium citrate | 2.28 | assimilation (trisodium CITrate) | transparent | opaque |
| PAC | phenylacetic acid | 0.8 | assimilation (PhenylACetic acid) | transparent | opaque |
| OX | (see oxidase test package insert) | - | cytochrome oxidase | (see oxidase test package insert) | |

- The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.
- Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

PROCEDURE p. I
IDENTIFICATION TABLE p. II
LITERATURE REFERENCES p. III
INDEX OF SYMBOLS p. IV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้