

2018

การคัดแยก จำแนก และหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้าง
รงควัตถุสำหรับใช้เขียนสารให้สีทางเลือกในอาหาร

วิจิตรา ศรีเจริญ
คณะวิทยาศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>



Part of the [Food Science Commons](#)

Recommended Citation

ศรีเจริญ, วิจิตรา, "การคัดแยก จำแนก และหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุสำหรับใช้เขียนสารให้สีทางเลือกในอาหาร" (2018). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 2732.
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/2732>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การคัดแยก จำแนก และหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุสำหรับใช้เป็น
สารให้สีทางเลือกในอาหาร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND CONDITION OPTIMIZATION OF PIGMENT-
PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FOR USE AS ALTERNATIVE FOOD COLORING
AGENTS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยก จำแนก และหาสภาวะที่เหมาะสมของ แบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุสำหรับใช้เป็นสารให้สี ทางเลือกในอาหาร
โดย	น.ส.วิจิตรา ศรีเจริญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติพงศ์ อัครกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้)

วิจิตร ศรีเจริญ : การคัดแยก จำแนก และหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุ
 สำหรับใช้เป็นสารให้สีทางเลือกในอาหาร. (ISOLATION, CHARACTERIZATION AND CONDITION
 OPTIMIZATION OF PIGMENT-PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FOR USE AS ALTERNATIVE
 FOOD COLORING AGENTS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.
 ณัฐธิดา โชติช่วง

รงควัตถุจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นสารให้สีในอาหารจากธรรมชาติ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตรงควัตถุได้หลากหลายชนิดและเจดสี ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยงานวิจัยนี้เป็นการคัดแยกและศึกษาลักษณะของรงควัตถุที่สร้างจากแบคทีเรียชอบเกลือที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย (ปลาร้า) และซีอิ๊ว เมื่อศึกษาเสถียรภาพในการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไฮโซเลทอย่างน้อย 60 generations พบว่า มีแบคทีเรียไฮโซเลทที่สร้างรงควัตถุทั้งหมด 22 ไฮโซเลท และนำไประบุสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s DNA/RNA เมื่อพิจารณาสายพันธุ์และเจดสีที่แบคทีเรียสร้างขึ้น สามารถคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียไฮโซเลทมา 5 ไฮโซเลท ดังนี้ *Halobacillus yeomjeoni* (81-1), *Salinicoccus* sp. (82-1), *Bacillus infantis* (63-11), *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) จากนั้นวิเคราะห์ชนิดและลักษณะของรงควัตถุที่ได้ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometric พบว่า สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption peaks) ของรงควัตถุสีเหลือง-ส้มจาก *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) ที่ความยาวคลื่น 482 นาโนเมตร รงควัตถุสีเหลืองจาก *Staphylococcus carnosus* (48-10) ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร และรงควัตถุสีส้ม-แดงจาก *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร ในขณะที่รงควัตถุจาก *Salinicoccus* sp. (82-1) และ *Bacillus infantis* (63-11) ที่มีสีชมพู มีความยาวคลื่นที่ 509 และ 492 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) เพื่ออนุมานกลุ่มสารของรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียไฮโซเลท พบว่าสเปกตรัม IR (IR spectrum) ของรงควัตถุที่ผลิตจากแบคทีเรียไฮโซเลทมีลักษณะคล้ายคลึงกับสารแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ และวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อหาปริมาณสารหลักที่มีอยู่ในรงควัตถุเทียบกับสารมาตรฐานไลโคปีน (lycopene) เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) และลูทีน (lutein) พบไลโคปีนมากที่สุด รองลงมาคือลูทีน โดยรงควัตถุแต่ละเจดสีมีส่วนระหว่างสารสองชนิดนี้แตกต่างกันไป มีเพียงไฮโซเลท 63-11 ที่พบเบต้าแคโรทีนเพิ่มเติม ซึ่งสามารถอนุมานได้ว่ารงควัตถุจากแบคทีเรียไฮโซเลททั้ง 5 สายพันธุ์เป็นอนุพันธ์ของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เมื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำในการเพาะเลี้ยง 82-1 พบว่าสูตรอาหารเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับ ซีอิ๊ว 1% (v/v) แล้วปรับความเข้มข้นเกลือสุดท้ายเป็น 3% (w/v) ช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างรงควัตถุ และพบว่าปริมาณไลโคปีน และลูทีน เพิ่มขึ้น 6 เท่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
 ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อ นิสิต
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5972053323 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: Fermented food, Halophilic bacteria, Bacterial pigment, Carotenoid

Wichitra Sritharoen : ISOLATION, CHARACTERIZATION AND CONDITION OPTIMIZATION OF PIGMENT-PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FOR USE AS ALTERNATIVE FOOD COLORING AGENTS. Advisor: Assoc. Prof. CHEUNJIT PRAKITCHIWATTANA, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. NATTIDA CHOTECHUANG, Ph.D.

Microbial pigments are promising alternative sources for natural food coloring agents. Microorganisms can produce various pigments having different color and shade depending on species. This study was aimed to isolate and characterize pigments produced by halophilic bacteria isolates from Thai traditional salty fermented food samples (pla-ra and soy sauce). After testing pigmentation stability for 60 generations and salt tolerance property, a total of 22 pigment producing strains were obtained and further identified by 16s rDNA/RNA gene sequence analysis. Based on strains identity and color shade, the isolates could be divided into 5 groups including groups of *Halobacillus yeomjeoni* (81-1), *Salinicoccus* sp. (82-1), *Bacillus infantis* (63-11), *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) and *Staphylococcus carnosus* (48-10). Pigments were characterized by UV-Visible spectrophotometric found the maximum absorption peaks for pigment with orange-red from *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) at 482 nm, *Staphylococcus carnosus* (48-10); yellow at 460 nm, *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5); orange-red at 488 nm, *Salinicoccus* sp. (82-1) and *Bacillus infantis* (63-11) with pink color appeared at 509 and 492 nm, respectively. When representative of each group such as *Halobacillus yeomjeoni* (81-1), *Salinicoccus* sp. (82-1), *Bacillus infantis* (63-11), *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) and *Staphylococcus carnosus* (48-10) were further analyzed by FTIR, IR spectrum of pigment from each isolate was all similar to IR spectrum of xanthophyll previously reported. The results indicated that pigments generated from these different halophilic strains with different color shade were all derivatives of carotenoid. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was further analyzed amount of dominant bacteria pigment compared to standard reagent includes of lycopene, β -carotene and lutein. Resulted in each pigment from each isolate contained lycopene and lutein found the most lycopene followed by lutein, while only 63-11 found β -carotene. Pigments from 5 isolates were composed of carotenoids derivatives. Low-cost culture media for cultivation of 82-1 found that peptone (1%, v/v) were developed and found that 82-1 cultivated in 1% peptone water contained soy sauce (1%, v/v) and 3% (w/v) salt could generate pigment with 6 time higher amount of lycopene and lutein relative to standard culture media.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2018

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมถึงให้ข้อคิดในการทำงานเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติพงศ์ อัครสกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี ดีแท้ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำตรวจสอบ กลั่นกรอง และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ รวมถึงอำนวยความสะดวกตลอดการทำงาน วิจัยขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ช่วยกำลังใจและคอยช่วยเหลือเสมอมา ท้ายสุดนี้ กราบขอบพระคุณบิดามารดา และทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ ส่งเสริม และสนับสนุนด้วยความรักเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยการสนับสนุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ร่วมกับบริษัท นิวทรีชั่น เอส ซี จำกัด และทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิจิตรา ศรีเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	1
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 สารให้สี.....	3
2.2 รงควัตถุจากจุลินทรีย์.....	3
2.2.1 แหล่งที่มาของรงควัตถุจากจุลินทรีย์	4
2.2.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุของจุลินทรีย์	4
2.3 อาหารหมัก	6
2.3.1 ปลาแร่.....	6
2.3.2 ซีอิ๊ว	7
2.4 แบคทีเรียชอบเกลือ	7
2.5 การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์สำหรับใช้เป็นสารให้สีในอาหาร	7
2.5.1 การผลิตรงควัตถุชนิด Zeaxanthin จาก <i>Flavobacterium</i> sp.	7

2.5.2 การผลิตรงควัตถุชนิด Canthaxanthin จาก <i>Bradyrhizabium</i> sp. หรือ <i>Haloferax alexandrinus</i>	8
2.5.3 การผลิตรงควัตถุชนิด Astaxanthin จาก <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	9
2.5.4 การผลิตรงควัตถุชนิด β -carotene จาก <i>Blackeslea trisopa</i>	10
2.5.5 การผลิตรงควัตถุชนิด Lycopene จาก <i>Fusarium sporotrichioides</i>	10
2.5.6 การผลิตรงควัตถุจาก <i>Monascus</i>	10
2.5.7 การผลิตรงควัตถุจาก <i>Pennicilium oxalicum</i>	11
2.6 การประยุกต์ใช้รงควัตถุจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม	12
2.6.1 อุตสาหกรรมยา	12
2.6.2 อุตสาหกรรมอาหาร.....	14
2.6.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอ.....	16
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	17
3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	17
3.1.1 วัตถุดิบ	17
3.1.2 อุปกรณ์	17
3.1.3 สารเคมี.....	17
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	18
3.2.1 การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากอาหารหมักที่มีเกลือ..	18
3.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียโอโซเลท.....	19
3.2.3 การประเมินสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียโอโซเลท	23
3.2.4 การพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอโซเลทเพื่อสร้างรงควัตถุ	24
3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	24

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
4.1 การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากตัวอย่างปลาข้าวและซีอิ๊ว	25
4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียไฮโซเลท.....	34
4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์.....	34
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	35
4.2.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของรงควัตถุที่สกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท	36
4.2.4 การประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นของแบคทีเรียไฮโซเลท	46
4.3 การประเมินสถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไฮโซเลท	49
4.4 การพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลทเพื่อสร้างรงควัตถุ.....	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	63
5.1 สรุปผลการทดลอง	63
5.2 ข้อเสนอแนะ	64
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไฮโซเลทด้วยวิธีอณูจุลชีววิทยา.....	73
ภาคผนวก ข การสกัดรงควัตถุจากแบคทีเรียไฮโซเลท	75
ภาคผนวก ค การทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	76
ค.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)	76
ค.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity).....	77
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานการเจริญของแบคทีเรียไฮโซเลท.....	79
ภาคผนวก จ สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและสเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท	80
จ.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท	80
จ.2 สเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท	84
ภาคผนวก ฉ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย.....	95

ประวัติผู้เขียน.....	98
----------------------	----



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1	โครงสร้างของสารซีแซนทีน	8
ภาพที่ 2.2	Organization of the canthaxanthin biosynthesis gene cluster of <i>Bradyrhizobium</i> sp. strain ORS278 และ locations of various subcloned fragments. (Hannibal et al., 2000).....	8
ภาพที่ 2.3	โครงสร้างของสารแคนทาแซนทีน	9
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างของสารแอนตาแซนทีน	9
ภาพที่ 2.5	โครงสร้างของสารเบต้าแคโรทีน	10
ภาพที่ 2.6	โครงสร้างของสารไลโคปีน	10
ภาพที่ 2.7	ตัวอย่างโครงสร้างของสารที่ได้จาก <i>Monascus</i> sp.	11
ภาพที่ 2.8	โครงสร้างของสาร Arpink Red	11
ภาพที่ 2.9	ตัวอย่างโครงสร้างของรงควัตถุจากจุลินทรีย์ (Malik et al., 2012).....	14
ภาพที่ 4.1	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่สร้างรงควัตถุ.....	33
ภาพที่ 4.2	สีของสารสกัด (crude pigment extract) ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท	37
ภาพที่ 4.3	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทในแต่ละกลุ่มที่ความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร	40
ภาพที่ 4.4	สเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทในแต่ละกลุ่ม (ก) กลุ่ม 1 - 2 ไอโซเลท (ข) กลุ่ม 2 - 12 ไอโซเลท (ค) กลุ่ม 3 - 3 ไอโซเลท (ง) กลุ่ม 4 - 7 ไอโซเลท และ (จ) กลุ่ม 5 - 23 ไอโซเลท ตามลำดับ	44
ภาพที่ 4.5	HPLC Chromatograms ของสารมาตรฐานไลโคปีน (lycopene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ลูทีน (lutein) และสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทในแต่ละกลุ่ม ตามลำดับ โดย A คือ ไลโคปีน (Rt = 2.070) B คือ ลูทีน (Rt = 2.225) และ C คือ เบต้าแคโรทีน (Rt = 3.580).....	Error!

Bookmark not defined.

ภาพที่ 4.6 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในแบคทีเรียโอโซเลทด้วยเทคนิค multiplex PCR	48
ภาพที่ 4.7 การสลายซัลเฟอร์เม็ดเลือดแดงบนอาหารวุ้นแข็ง SBA ของตัวแทนแบคทีเรียโอโซเลท; <i>Halobacillus yeomjeoni</i> (81-1), <i>Salinicoccus</i> sp. (82-1), <i>Bacillus infantis</i> (63-11), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (60-5) และ <i>Staphylococcus carnosus</i> (48-10) ตามลำดับ	49
ภาพที่ 4.8 กราฟการเจริญของแบคทีเรียโอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (1%, 3% และ 5%, w/v) ของ (ก) <i>Halobacillus yeomjeoni</i> (81-1); (ข) <i>Salinicoccus</i> sp. (82-1); (ค) <i>Bacillus infantis</i> (63-11); (ง) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (60-5) และ (จ) <i>Staphylococcus carnosus</i> (48-10)	53
ภาพที่ 4.9 การสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียโอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (1%, 3% และ 5%, w/v) ของ (ก) <i>Halobacillus yeomjeoni</i> (81-1); (ข) <i>Salinicoccus</i> sp. (82-1); (ค) <i>Bacillus infantis</i> (63-11); (ง) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (60-5) และ (จ) <i>Staphylococcus carnosus</i> (48-10).....	55
ภาพที่ 4.10 การเจริญของแบคทีเรียโอโซเลท <i>Salinicoccus</i> sp. (82-1) ในอาหารต้นทุนต่ำสูตรต่างๆ เมื่อ P1 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 1% (v/v); P2 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 2% (v/v); P3 คือ น้ำปลาที่เจือจางด้วยน้ำเปปโตน 1% (w/v) ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v); S1 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v); S2 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 2% (v/v) และ S3 คือ ซีอิ๊วที่เจือจางด้วยน้ำเปปโตน 1% (w/v) ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v)	59
ภาพที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรียโอโซเลทแต่ละกลุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v).....	59
ภาพที่ 4.12 Pathogenic genes matching results.....	62

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	รงควัตถุจากจุลินทรีย์.....	4
ตารางที่ 2.2	รงควัตถุจากจุลินทรีย์และคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	13
ตารางที่ 2.3	รงควัตถุจากจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารให้สีในอาหาร.....	15
ตารางที่ 3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน biogenic amine-encoding.....	21
ตารางที่ 4.1	การระบุชนิดและการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท.....	27
ตารางที่ 4.2	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย.....	35
ตารางที่ 4.3	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแบคทีเรีย.....	36
ตารางที่ 4.4	คุณสมบัติของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry.....	38
ตารางที่ 4.5	คุณสมบัติของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR analysis.....	41
ตารางที่ 4.6	ปริมาณไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ที่พบในสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท.....	45
ตารางที่ 4.7	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ.....	56
ตารางที่ 4.8	ปริมาณไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ที่พบในสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ.....	58
ตารางที่ 4.9	การมียืนก่อโรค (Virulence gene) ของไอโซเลท <i>Salinicoccus</i> sp. (82-1).....	60
ตารางที่ 4.10	Acquired antimicrobial resistance gene results.....	61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจในด้านสุขภาพ และความปลอดภัยในอาหาร รวมถึงการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความต้องการใช้สีธรรมชาติในการผลิตอาหารและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากสีธรรมชาติไม่เป็นพิษ ไม่มีสารก่อมะเร็ง สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activities) ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้านการเกิดมะเร็งและการงอกของเซลล์ เป็นต้น (Kumar et al., 2015; Pankaj & Kumar, 2016; Venil et al., 2013) การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางสายพันธุ์จึงสร้างรงควัตถุและเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด เพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย ใช้เวลาไม่นาน และสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงได้ง่ายจึงมีต้นทุนต่ำ (Pankaj & Kumar, 2016) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตสารสีต่างๆ เช่น *Flavobacterium* sp., *Paracoccus xanthinifaciens* ผลิตสารสีเหลือง *Agrobacterium aurantilacum* ผลิตสารสีชมพู - แดง *Haloferax alexandrines* ผลิตสารสีแดงเข้ม *Streptoverticillium rubrireticuli* ผลิตสารสีแดง เป็นต้น (Venil et al., 2013) โดยธรรมชาติการที่จุลินทรีย์สร้างสารให้สีนั้นเป็นกลไกหนึ่งเพื่อปกป้องเซลล์จากอันตรายและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น แสงและรังสีจากธรรมชาติ ความร้อน สภาวะแห้งแล้ง และโดยเฉพาะสภาวะที่มีเกลือสูง ดังนั้นจึงมักมีรายงานการสร้างสารให้สีของแบคทีเรียในกลุ่ม Halobacteria ที่แยกได้จากแหล่งที่มีเกลือสูง เช่น ดิน น้ำทะเล ทะเลสาบน้ำเค็ม และอาหารหมักที่มีเกลือ และยังมีรายงานการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือความเข้มข้นระดับต่างๆ เพื่อแปรสภาวะความเข้มข้นเกลือในการปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง (Nigam & Luke, 2016)

ตัวอย่างการใช้รงควัตถุจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) เป็นรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ได้จาก *Bradyrhizobium* Spp. มีตั้งแต่สีส้มไปจนถึงสีชมพูเข้ม สามารถใช้ในอาหารได้หลากหลาย รวมถึงใช้ในอาหารเลี้ยงปลาแซลมอนและสัตว์ปีก แอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นรงควัตถุสีแดงส้มที่พบใน basidiomycetous yeast สาหร่าย (microalgae) แซลมอนและสัตว์ในกลุ่ม crustaceans ซึ่งมีการนำไปใช้เป็นสารให้สีในอาหารปลา และสัตว์ โพรดิจีโอซิน (prodigiosin) เป็นรงควัตถุสีแดงที่ได้จาก *Serratia marcescens* ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antibacterial) ต้านมาลาเรีย (antimalarial) ต้านปฏิชีวนะ (antibiotic) และต้านมะเร็ง (antineoplastic) ซึ่งมีการใช้เป็นสารให้สีในโยเกิร์ต นม และเครื่องดื่มอัดก๊าซ (carbonated drink) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) เป็นรงควัตถุสีน้ำเงินที่ผลิตจาก *Aphanizomenon flos-*

aquae และ *Spirulina* ซึ่งถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม และยังพบในขนมหวานและไอศกรีม ไวโอเลซีน (violacein) เป็นรงควัตถุสีม่วงจาก *Chromobacterium violaceum* ที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antibacterial) ต้านเชื้อรา (antifungal) ต้านปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และสิ่งทอ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) เป็นรงควัตถุสีเหลืองที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด นิยมใช้ในอาหารเข้าซีเรียล ซอส น้ำผลไม้ แล้วเครื่องดื่มชูกำลัง เบต้า-แคโรทีน (beta-carotene) เป็นรงควัตถุสีแดง-ส้ม สกัดได้จาก *Dunaliella salina* ได้รับการยอมรับในการเป็นสารให้สีในอาหาร สามารถใช้ในอาหารได้หลากหลาย เมลานิน (melanin) เป็นรงควัตถุพบในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด สามารถใช้ได้ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในการทำครีมกันแดดอีกด้วย และไลโคปีน (lycopene) เป็นรงควัตถุสีแดงที่ได้จาก *Fusarium*, *Sporotrichioides*, และ *Blakeslea trispora* มักถูกใช้ในการผสมสีเนื้อสัตว์ในประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ (Sen et al., 2019)

1.2 วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากอาหารหมักที่มีเกลือสูง และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียดังกล่าว รวมถึงพัฒนาอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเป็นแหล่งผลิตสีผสมอาหารจากธรรมชาติสำหรับใช้เป็นสารให้สีทางเลือกในอาหาร ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการคัดแยก จุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุจากอาหารหมักที่มีเกลือ ได้แก่ ปลาาร้า และซีอิ๊ว ทดสอบเสถียรภาพในการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไฮโซเลท วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของรงควัตถุที่ได้ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric FTIR และ HPLC analysis ตลอดจนประเมินสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไฮโซเลท รวมถึงพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ เพื่อลดต้นทุนในการผลิตรงควัตถุจากแบคทีเรีย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 สารให้สี

สารให้สีในอาหาร คือ วัตถุเจือปนอาหารที่ช่วยเพิ่มเน้นหรือรักษาวามเป็นเอกลักษณ์ของอาหาร ทำให้สีของอาหารมีความสดใสดึงดูดความสนใจให้กับผู้บริโภค นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์นอกเหนือจากอาหารได้หลายอย่าง รวมถึงเสื้อผ้า เครื่องสำอาง และยา เป็นต้น โดยสามารถแบ่งได้ตามแหล่งที่มา (origin) และการออกกฎหมาย (legislation) ได้เป็น สารให้สีตามธรรมชาติ (natural colorants) สารให้สีเลียนแบบธรรมชาติ (nature-identical) และสารให้สีสังเคราะห์ (synthetic colorants) ดังนี้

- สารให้สีตามธรรมชาติ เป็นสารให้สีที่สามารถสกัดได้จากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ พืชและสัตว์ เช่น ผลไม้ บีทรูท ใบชา แมลง *Coccus cacti* สหรัย และจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ยีสต์ และรา) เช่น *Monascus*, *Rhodotorula*, *Bacillus*, *Achromobacter* เป็นต้น รวมถึงสารให้สีที่สกัดจากหญ้าฝรั่น (saffron) คลอโรฟิลล์ธรรมชาติ (native chlorophyll) และไลโคปีนจาก *Blakeslea*
- สารให้สีเลียนแบบธรรมชาติ เป็นสารให้สีที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์สารเคมี เพื่อให้มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนสารให้สีตามธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) แคนทาแซนทีน (canthaxanthin) และไรโบฟลาวิน (riboflavin)
- สารให้สีสังเคราะห์ เป็นสารให้สีที่ได้จากการสังเคราะห์สารเคมี และไม่พบในธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น คาร์โมอิซีน (carmoisine) ทาร์ทราซีน (tartrazine) และซันเซต เยลโล (sunset yellow) เป็นต้น

โดยส่วนใหญ่สารให้สีที่ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร มักนิยมใช้สีสังเคราะห์มากกว่าสีธรรมชาติ เนื่องจากสีสังเคราะห์มีราคาไม่แพง มีประสิทธิภาพ และมีความเสถียรสูงแตกต่างจากสีธรรมชาติที่มีราคาสูง แต่ประสิทธิภาพ และมีความเสถียรต่ำ (Dufossé, 2017a; Joshi et al., 2003; Tuli et al., 2015)

2.2 รงควัตถุจากจุลินทรีย์

การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์ เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางสายพันธุ์จึงสร้างรงควัตถุและเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด เพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย ในเวลาไม่นาน และสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงได้ง่ายจึงมีต้นทุนต่ำ (Pankaj & Kumar, 2016)

2.2.1 แหล่งที่มาของรงควัตถุจากจุลินทรีย์

รงควัตถุจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้ตามแหล่งที่มา/หรือชนิดของจุลินทรีย์ ได้แก่ รงควัตถุจากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium* sp. รงควัตถุจากยีสต์ เช่น *Rhodotorula rubra*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* และรงควัตถุจากรา เช่น *Monascus* sp., *Penicillium* sp. เป็นต้น (Pankaj & Kumar, 2016) โดยรงควัตถุที่สร้างจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) เช่น แอสต้าแซนทิน (astaxanthin) (Malik et al., 2012)

ตารางที่ 2.1 รงควัตถุจากจุลินทรีย์

	ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ชนิดของรงควัตถุ	สีที่ปรากฏ
แบคทีเรีย	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	ม่วง
	<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosin	แดง
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Zeaxanthin	เหลือง
ยีสต์	<i>Rhodotorula</i> sp.	Torularhodin	ส้ม-แดง
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxanthin	ชมพู-แดง
รา	<i>Monascus</i> sp.	Ankaflavin	เหลือง
	<i>Blakeslea trispora</i>	Lycopene	แดง

ที่มา: Yangilar and Yildiz (2016)

2.2.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุของจุลินทรีย์

1) อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อการสร้างรงควัตถุของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของ *Monascus* sp. คือ 25-28 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *Pseudomonas* ต้องการอุณหภูมิ 35-36 องศาเซลเซียส ในการเจริญและสร้างรงควัตถุ (Kumar et al., 2015)

2) ความเป็นกรดต่าง

ความเป็นกรดต่างของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ รวมถึงชนิดและเฉดสีของรงควัตถุ โดยค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของ *Monascus* sp. และ *Rhodotorula* sp. คือ 5.5-6.5 และ 4.0-4.5 ตามลำดับ ซึ่ง pH ที่มีค่าเป็นด่างจะสร้างสารไลโคปีน ส่วน pH ที่เป็นกรดจะสร้างเบต้า-แคโรทีน (Joshi et al., 2003)

3) แหล่งคาร์บอน

การสร้างรงควัตถุของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน อาทิเช่น กลูโคส, ฟรักโทส, แล็กโทส, กาแล็กโทส และอื่นๆ ตัวอย่างเช่น *Monascus* sp. ที่สามารถสร้างรงควัตถุได้ดีเมื่อมีมีสตาร์ชและเด็กซ์ทริน สร้างรงควัตถุได้ปานกลางเมื่อมีกลูโคสและมอลโทส และสร้างรงควัตถุได้น้อยเมื่อมีฟรักโทส (Kumar et al., 2015)

4) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสร้างรงควัตถุจากจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนสำคัญในการสร้างรงควัตถุของ *Monascus* sp. (Joshi et al., 2003)

5) รูปแบบของการหมัก

การหมักแบบแห้ง (solid state fermentation) และแบบเปียก (submerged fermentation) มีผลต่อการสร้างรงควัตถุจากจุลินทรีย์ โดยการหมักแบบแห้งให้ผลผลิตของรงควัตถุมากกว่าการหมักแบบเปียก ตัวอย่างเช่น การหมักแบบแห้งของ *M. purpureus* ให้ผลผลิตรงควัตถุสีแดงและสีเหลืองมากขึ้น (Joshi et al., 2003)

6) แร่ธาตุ

แร่ธาตุเป็นส่วนสำคัญในการสร้างรงควัตถุของจุลินทรีย์ และทำให้ได้รงควัตถุที่มีเฉดสีแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่นความสามารถในการสร้างรงควัตถุของ *A. oryzae* ที่มีแร่ธาตุแตกต่างกัน โดยแมกนีเซียมซัลเฟต ให้เฉดสีชมพู และโซเดียมซิเตรท ให้เฉดสีชมพูสว่าง (Joshi et al., 2003)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้จุลินทรีย์จะสร้างรงควัตถุขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์จากแสงและรังสีต่างๆ ความร้อนและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะแห้งแล้ง โดยเฉพาะสภาวะที่มีเกลือสูง ดังนั้นจึงมีรายงานการพบจุลินทรีย์ที่สร้างสารให้สีจากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน น้ำทะเล และทะเลสาบน้ำเค็ม เป็นต้น (Nigam & Luke, 2016; Pankaj & Kumar, 2016)

กระบวนการหมักจุลินทรีย์มีผลต่ออุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับสีเป็นอย่างมาก โดยรงควัตถุที่สกัดได้ถ้านำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร รงควัตถุนั้นจะต้องผ่านการพิสูจน์ว่าปลอดภัยที่จะใช้กับอาหารได้และต้องได้รับการอนุญาตให้ใช้ตามกฎหมายของแต่ละประเทศ (Dufossé et al., 2005; Joshi et al., 2003)

2.3 อาหารหมัก

อาหารหมัก (fermented foods) หมายถึง อาหารที่ได้จากกิจกรรมการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบอันเนื่องมาจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ได้สารเมตาบอไลต์ที่มีกลิ่นรสพึงประสงค์ ซึ่งกระบวนการหมักอาหารสามารถปฏิบัติได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ราคาแพงเหมือนการบรรจุกระป๋องหรือการแช่แข็ง ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บนานขึ้นโดยไม่ต้องใช้ความเย็น มีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตอาหารได้หลากหลายจากวัตถุดิบที่มีอยู่ในท้องถิ่น (สุพรรณิ, 2550)

อาหารหมักพื้นบ้านของไทย (Thai traditional fermented foods) จัดเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละท้องถิ่น ชุมชน และกลุ่มชาติพันธุ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ อาหารหมักที่เติมเกลือ (Thai salted fermented foods) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีวัตถุดิบหลักเป็นเนื้อสัตว์ ปลา และสัตว์น้ำ ธัญพืช ผัก และผลไม้ ที่มีความเข้มข้นของเกลือในช่วง 0.5 - 20% ตัวอย่างเช่น แหนม (2.5-2.8%) ปลาร้า (11.5-23.9%) กะปิ (14.0-40.1%) ซีอิ๊ว (19.2-21.7%) ผักกาดดอง (1.6-7.3%) และมะม่วงดอง (1.7-11.3%) และอาหารหมักที่ไม่เติมเกลือ (Thai non-salted fermented foods) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีวัตถุดิบหลักเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง เช่น ข้าว ผลไม้ และมันสำปะหลัง หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีปริมาณโปรตีนสูง เช่น ถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมเกลือ ซึ่งอาหารหมักที่ไม่เติมเกลือสามารถแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์ได้เป็น 2 ประเภท คือ อาหารหมักที่มีแอลกอฮอล์ (alcoholics) ตัวอย่างเช่น ลูกแป้ง ข้าวหมาก น้ำตาลเมา และตาแป เป็นต้น และอาหารหมักที่ไม่มีแอลกอฮอล์ (non-alcoholics) ตัวอย่างเช่น ขนมหิน ข้าวแดง หรืออังกัก ถั่วเน่า วุ้นมะพร้าว

2.3.1 ปลาร้า

ปลาร้าเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านซึ่งนิยมบริโภคกันทางภาคอีสานและภาคกลางตอนบน ทำได้โดยหมักปลากับเกลือ (อัตราส่วน 3 ต่อ 1) แล้วนำมาคลุกกับข้าวคั่วหรือข้าวรำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-12 เดือน โดยปลาร้าส่วนใหญ่จะทำมาจากปลาน้ำจืด ซึ่งใช้ได้ทั้งปลาน้ำจืดขนาดเล็กและปลาน้ำจืดใหญ่ เช่น ปลาช่อน (*Channa striata*) ปลากระดี่ (*Trichogaster trichopterus*) ปลาสร้อย (*Cyclocheilichthys repasson*) เป็นวัตถุดิบในการหมัก โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอุดมไปด้วยสารอาหารต่างๆ โดยเฉพาะกรดอะมิโนและเปปไทด์ และมีความเข้มข้นของเกลือสูง (ประมาณ 1.2-3.1 M NaCl) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic bacteria) ตัวอย่างแบคทีเรียชอบเกลือที่คัดแยกได้จากปลาร้า ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* sp., *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus* sp. เป็นต้น (Sangjindavong et al., 2008; Yachai et al., 2008)

2.3.2 ซีอิ๊ว

ซีอิ๊วเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีวัตถุดิบหลักเป็นถั่วเหลือง ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งรสชาติอาหารคล้ายกับน้ำปลา มีรสชาติหลักคือเค็ม มีกลิ่นและรสที่เฉพาะตัว รวมทั้งเป็นเครื่องปรุงรสที่ให้สารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งได้รับความนิยมเป็นอันดับหนึ่งในกลุ่มของผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติ เพราะเป็นเครื่องปรุงรสที่สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำปลาได้ และประยุกต์ใช้ได้กับอาหารประเภทต่างๆ ได้หลายชนิด (Suwunna, 2008)

2.4 แบคทีเรียชอบเกลือ

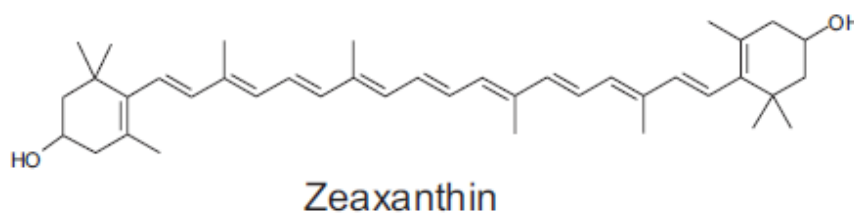
แบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ค่า water activity (a_w) ต่ำสุดที่แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้คือ 0.75 สามารถแบ่งตามความเข้มข้นของเกลือที่ต้องการในการเจริญ ได้เป็น 4 พวก ดังนี้ (1) พวกชอบเกลือเล็กน้อย (slightly halophilic bacteria) ที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 0.5-3% สามารถคัดแยกได้จากปลาและอาหารทะเล (2) พวกชอบเกลือปานกลาง (moderate halophilic bacteria) เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 3-15% สามารถคัดแยกได้จากปลาเค็ม เนื้อเค็ม ผักดอง (3) พวกชอบเค็ม (extreme halophilic bacteria) เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 15-30% และ (4) พวกทนเค็ม (halotolerant) เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาพที่มีเกลือและไม่มีเกลือ โดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 5% หรือมากกว่า ตัวอย่างเช่น *Flavobacterium* sp. (3-24%), *Vibrio parahaemolyticus* (7%) และ *Halobacterium* sp. (10-20%) เป็นต้น (Chaikulsareewath et al., 2015)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์สำหรับใช้เป็นสารให้สีในอาหาร

2.5.1 การผลิตรงควัตถุชนิด Zeaxanthin จาก *Flavobacterium* sp.

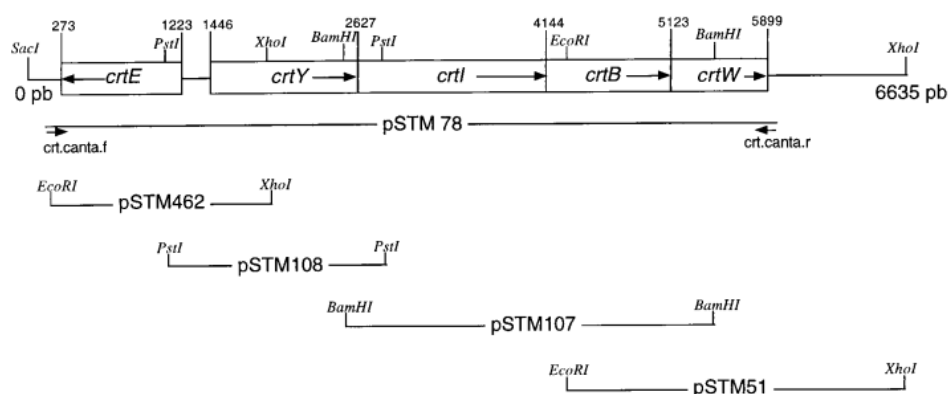
ซีแซนทิน (zeaxanthin) หรือ 3,3'-dihydroxy- β -carotene เป็นรงควัตถุสีเหลืองที่นำไปใช้อาหารสัตว์ปีก เพื่อให้ผิวหนังจากสัตว์และทำให้สีของไข่ไก่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของจอประสาทตาได้ โดยการเพาะเลี้ยง *Flavobacterium* sp. ในอาหารที่มีกลูโคสหรือซูโครส กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น methionine, cystine หรือ cysteine, pyridoxine และโลหะไอออน เช่น Fe^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} หรือ Mn^{2+} สามารถผลิตซีแซนทินได้สูงถึง 190 mg zeaxanthin/L (Dufossé, 2017a; Dufossé et al., 2005)



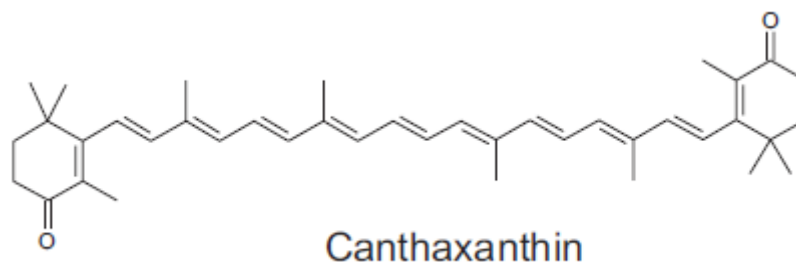
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสารซีแซนทิน

2.5.2 การผลิตรงควัตถุชนิด Canthaxanthin จาก *Bradyrhizabium* sp. หรือ *Haloferax alexandrinus*

แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) หรือ (4,4'-keto- β -carotene) เป็นรงควัตถุสีแดงที่นิยมใช้ แคนทาแซนทินผสมในอาหารสัตว์น้ำ เพื่อเพิ่มสีของเนื้อปลาแซลมอน โดย *Bradyrhizabium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มี carotenoid gene cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารดังกล่าว ดังภาพที่ 2.2 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผลิตแคนทาแซนทินจาก *Haloferax alexandrinus* ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 1 ลิตรในขวดรูปชมพู่ เป็นเวลา 6 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวม 6 mg และ 2 mg ของ แคนทาแซนทิน (Calegari-Santos et al., 2016; Dufossé, 2006; Hannibal et al., 2000)



ภาพที่ 2.2 Organization of the canthaxanthin biosynthesis gene cluster of *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 และ locations of various subcloned fragments. (Hannibal et al., 2000)

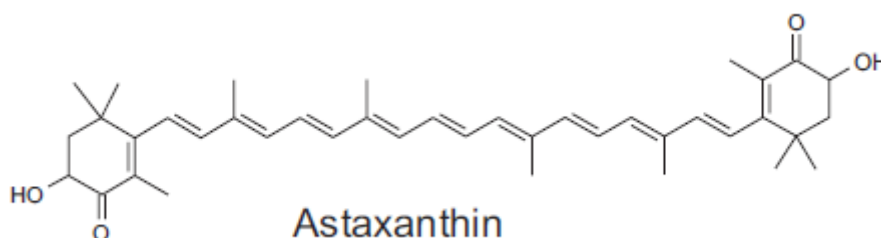


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของสารแคนทาแซนทิน

2.5.3 การผลิตรงควัตถุชนิด Astaxanthin จาก *Xanthophyllomyces dendrorhous*

แอสตาแซนทิน (astaxanthin) หรือ 3,3'-dihydroxy- β - β -carotene-4,4'-dione เป็นรงควัตถุสีแดงที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และพบในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustaceans (กุ้ง และปู) และปลาแซลมอน นิยมใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ช่วยให้เกิดสีแดงในปลาแซลมอน และไข่ โดยสถานะที่ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ผลิต astaxanthin ได้สูงสุด คือ อุณหภูมิ 19.7 °C ในอาหารที่มีค่า pH 6.0 มีปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจน เท่ากับ 11.25 g/L และ 0.5 g/L ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 19.7 °C ซึ่งได้ปริมาณ astaxanthin เท่ากับ 8.1 mg/L

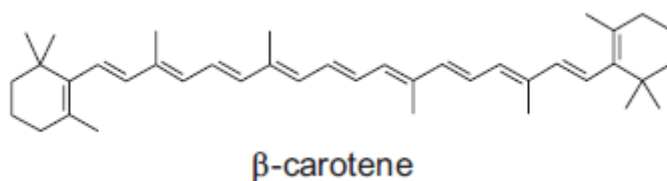
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาหาแหล่งผลิต astaxanthin จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น *Paracoccus carotinifaciens* และ *Halobacterium salinarum* ที่มีความน่าสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจาก (i) ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (ประมาณ 20%) ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ โดยที่ไม่ต้องฆ่าเชื้ออาหาร (ii) ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 15% สามารถทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้ โดยที่ไม่ต้องใช้เทคนิคพิเศษ และ (iii) สามารถสกัดรงควัตถุจากตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน (acetone) และเฮกเซน (hexane) ด้วยน้ำมันดอกทานตะวัน เพื่อลดความเป็นพิษที่เกิดจากตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองชนิด (Dufossé, 2017b)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารแอนตาแซนทิน

2.5.4 การผลิตรงควัตถุชนิด β -carotene จาก *Blackeslea trisopa*

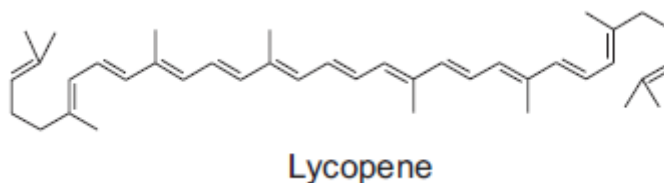
Blackeslea trisopa เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุ crystalline β -carotene โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้วยวิธี co-fermentation เริ่มจากขั้นตอน initial fermentation เพื่อผลิต biomass จากนั้นเปลี่ยน biomass เป็น isolate β -carotene ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวได้รับการยืนยันจาก EU (2000) แล้วว่าสามารถใช้ได้ในอาหาร นอกจากนี้จุลินทรีย์ดังกล่าวยังสามารถสังเคราะห์ไลโคปีนได้อีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตเบต้าแคโรทีนจากจุลินทรีย์ดังกล่าวในรัสเซียและยูเครน (Dufossé, 2017a)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของสารเบต้าแคโรทีน

2.5.5 การผลิตรงควัตถุชนิด Lycopene จาก *Fusarium sporotrichioides*

เชื้อรา *Fusarium sporotrichioides* ที่มีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม สามารถผลิต lycopene ได้โดยใช้เส้นใยข้าวโพดเป็นสารตั้งต้น (substrate) ให้ปริมาณไลโคปีนเท่ากับ 0.5 mg/g of dry mass (Kumar et al., 2015)

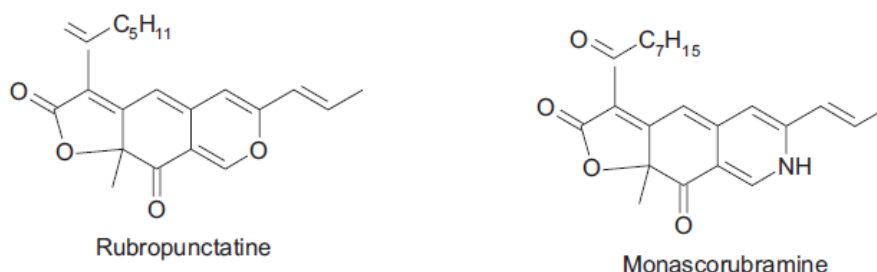


ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของสารไลโคปีน

2.5.6 การผลิตรงควัตถุจาก *Monascus*

Monascus sp. เป็นเชื้อราที่ผลิตสารสีและใช้เป็นสีผสมอาหารอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย โดยใส่ในอาหารหมักท้องถิ่น เช่น ข้าวแดง (Chinese red rice) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวกับ *Monascus* sp. ที่อัตราการให้อากาศและความชื้นที่เหมาะสมด้วยวิธีการหมักแบบ solid state fermentation โดยสามารถผลิตรงควัตถุสูงสุดในสภาวะที่ให้อากาศ (aeration rate) ระหว่าง 0.05-0.2 L/min และความชื้นเริ่มต้น 70% เท่ากับ ≥ 98 AU/g dry matter และ 1,415 AU/g dry matter ตามลำดับ สามารถนำมาใช้เป็นสีผสมอาหาร โดยใช้เป็นตัวเพิ่มกลิ่นรสและสีให้กับอาหาร

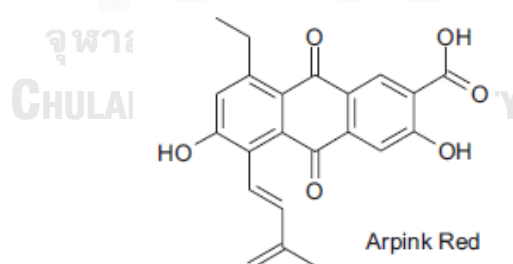
หมักต่างๆ หรือใช้ในการหมักเต้าหู้ (Joshi et al., 2003) โดยสามารถแบ่งชนิดของรงควัตถุได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ Rubropunctamine และ Monascorubramine ที่มีสีแดง Rubropunctatin และ Monascorubrin ที่มีสีส้ม และ Monascin และ Ankaflavin ที่มีสีเหลือง (Kumar et al., 2015)



ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างโครงสร้างของสารที่ได้จาก *Monascus* sp.

2.5.7 การผลิตรงควัตถุจาก *Pennicillium oxalicum*

Arpink Red เป็นรงควัตถุสีแดงจาก *Pennicillium oxalicum* ที่แยกได้จากดิน ผลิตสารกลุ่ม anthraquinone เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีคาร์โบไฮเดรต (ซูโครส, มอลโตส), ไนโตรเจน (corn extract, yeast autolysis), ซิงค์ซัลเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารดังกล่าวคือ pH (5.6-6.2) และอุณหภูมิ (27-29 °C) ซึ่งจะสร้างสารสีแดงเพิ่มขึ้น 1.5-2.0 g/L ภายใน 3-4 วัน สามารถใช้เป็นสารให้สีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สูงสุดที่ 100 mg/kg เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 200 mg/kg และ 150 mg/kg สำหรับผลิตภัณฑ์นม เช่น ไอศกรีม (Kumar et al., 2015)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของสาร Arpink Red

นอกจากรงควัตถุที่กล่าวไปข้างต้น ยังมีการศึกษาของ Venil et al. (2015) ที่พัฒนาผงสีม่วงจาก *Chromobacterium violaceum* UTM5 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย พร้อมศึกษาประสิทธิภาพการใชัรงควัตถุดังกล่าวเป็นสารให้สีในโยเกิร์ตและเยลลี่ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *C. violaceum* UTM5 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นและห่อหุ้ม (encapsulate) รงควัตถุที่ได้ด้วยกัมอะราบิก (ในอัตราส่วนรงควัตถุเข้มข้นต่อสารละลาย

กัมมะราบิก (v/v) = 1:3) แล้วนำไปทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย นำผงสารสีม่วงที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.25-1.0% (w/w) ไปผสมกับโยเกิร์ตและเยลลี่ พบว่า สีของผลิตภัณฑ์อาหารทั้งสองไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา

2.6 การประยุกต์ใช้รงควัตถุจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม

2.6.1 อุตสาหกรรมยา

รงควัตถุจากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จุลินทรีย์ (antimicrobial) และต้านมะเร็ง (anticancer) เป็นต้น (ตารางที่ 2.2) (Heer & Sharma, 2017; Tuli et al., 2015)

แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) เป็นรงควัตถุที่ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน จัดอยู่ในสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) มีสมบัติเป็นโภชนเภสัช (nutraceutical) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ และยังช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงและอาหารเป็นพิษด้วย (Kumar et al., 2015)

โพรดิจีโอซิน (Prodigiosin) เป็นรงควัตถุสีแดงที่ผลิตได้จาก *Serratia marcescens* มีสมบัติในการเป็น immune-suppressor และ anticancer agents นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารฆ่าแมลง (insecticidal) มีฤทธิ์การต้านเชื้อรา (antifungal) ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย (antibacterial) และฤทธิ์การต้านมาลาเรีย (antimalarial) (Narsing Rao et al., 2017)

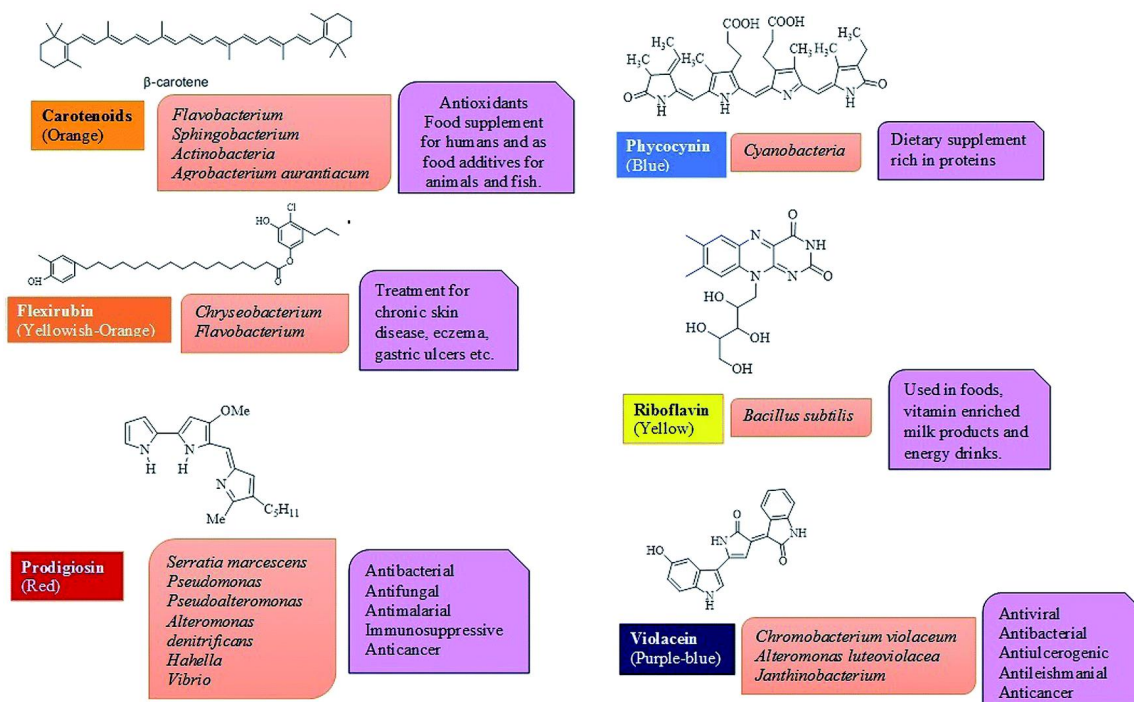
ไวโอเลซีน (Violacein) เป็นรงควัตถุสีม่วงที่ผลิตได้จาก *Chromobacterium violaceum* ที่คัดแยกได้จากแม่น้ำอะเมซอนในประเทศบราซิล ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านไวรัส (antiviral) ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย (antibacterial) เป็นต้น (Narsing Rao et al., 2017)

ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) หรือวิตามินบี 2 เป็นรงควัตถุสีเหลือง-ส้ม ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเผาผลาญสารอาหารที่ให้พลังงาน ได้แก่ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน รวมถึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของร่างกายและการผลิตเม็ดเลือดแดง (Narsing Rao et al., 2017)

ตารางที่ 2.2 รงควัตถุจากจุลินทรีย์และคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

รงควัตถุ	สี	ชนิดของจุลินทรีย์	คุณสมบัติ
Ankaflavin	เหลือง	<i>Monascus</i> sp.	Anti-inflammatory
Anthraquinone	แดง	<i>Penicilium oxalicum</i>	Anti-fungal, virucidal
Monascorubramine	แดง	<i>Monascus</i> sp.	Antimicrobial, anticancer
Riboflavin	เหลือง	<i>Ashbya gossypii</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Anticancer, antioxidant
Rubropanctain	ส้ม	<i>Monascus</i> sp.	Anticancer
β -carotene	เหลือง-ส้ม	<i>Blakeslea trispora</i>	Anticancer, antioxidant
Astaxanthin	ชมพู-แดง	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Paracoccus carotinifaciens</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	Antioxidant, anticancer, anti-inflammatory
Canthaxanthin	แดงเข้ม	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Antioxidant, anticancer
Zeaxanthin	เหลือง	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> <i>Flavobacterium</i> sp.	-

ที่มา: Nigam and Luke (2016)



ภาพที่ 2.9 ตัวอย่างโครงสร้างของรงควัตถุจากจุลินทรีย์ (Malik et al., 2012)

2.6.2 อุตสาหกรรมอาหาร

ตัวอย่างชนิดของจุลินทรีย์และรงควัตถุที่ใช้เป็นสารให้สีในอาหารทางการค้าที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Ribiflavin, สีเหลือง) *Monascus* sp. (Ankaflavin, สีเหลือง และ Monascorubramin, สีแดง) *Penicillium oxalicum* (Anthraquinone, สีแดง) ใช้เป็นสารให้สีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เครื่องดื่ม และอาหารประเภทอื่นๆ เป็นต้น (ตารางที่ 2.3) (Dufossé, 2017a)

ตารางที่ 2.3 รงควัตถุจากจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารให้สีในอาหาร

รงควัตถุ	สี	ชนิดของจุลินทรีย์	สถานะ
Ankaflavin	เหลือง	<i>Monascus</i> sp.	IP
Anthraquinone	แดง	<i>Penicilium oxalicum</i>	IP
Astaxanthin	ชมพู-แดง	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	DS
		<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	RP
		<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	RP
Canthaxanthin	แดงเข้ม	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	RP
		<i>Haloferax alexandrines</i>	RP
		<i>Gordonia jacobea</i>	DS
Decaprenoxanthin	เหลือง	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	DS
Lycopene	แดง	<i>Blakeslea trispora</i>	DS
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	RP
Melanin	ดำ	<i>Saccharomyces neoformans</i> var <i>nigricans</i>	RP
Monascorubramine	แดง	<i>Monascus</i> sp.	IP
Naphtoquinone	แดงเลือดหมู	<i>Cordyceps unilateralis</i>	RP
Riboflavin	เหลือง	<i>Ashbya gossypii</i>	IP
		<i>Bacillus subtilis</i>	
Rubropanctain	ส้ม	<i>Monascus</i> sp.	IP
Torularhodin	ส้ม-แดง	<i>Rhodotorula</i> sp.	DS
Zeaxanthin	เหลือง	<i>Flavobacterium</i> sp.	DS
		<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	RP
β -carotene	เหลือง-ส้ม	<i>Blakeslea trispora</i>	IP
		<i>Mucor circinelloides</i>	DS

หมายเหตุ IP = Industrial production, RP = Research project และ DS = Development stage (ที่มา: Dufossé (2017a))

2.6.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

ในอุตสาหกรรมสิ่งทอนิยมใช้สีสังเคราะห์มากกว่าสีจากธรรมชาติ เนื่องจากสังเคราะห์ได้ง่าย มีราคาถูก ความเสถียรต่อแสงและอุณหภูมิ รวมถึงมีสีหลากหลาย แต่เนื่องจากสีสังเคราะห์มีความเป็นพิษ และอาจนำไปสู่ปัญหาสุขภาพต่างๆ เช่น โรคมะเร็งผิวหนัง ดังนั้นผู้บริโภคจึงต้องการสีย้อมจากธรรมชาติเพิ่มขึ้น (Heer & Sharma, 2017)

Ahmad et al. (2012) ได้ศึกษาลักษณะของรงควัตถุสีแดงชนิด prodigiosin จาก *Serratia marcescens* และสีม่วง ชนิด violacein จาก *Chromobacterium violaceum* และทดสอบประสิทธิภาพการย้อมสีในเนื้อผ้าที่แตกต่างกัน ได้แก่ ผ้าฝ้ายบริสุทธิ์ (pure cotton) ผ้าไหมแท้ (pure silk) ผ้าเรยอน (pure rayon) เส้นใยอะคริลิก (acrylic) ผ้าซาติน (silk satin) และผ้าโพลีเอสเตอร์ (polyester) พบว่า สามารถใช้ prodigiosin ในการย้อมสีผ้าเส้นใยอะคริลิก และ violacein มีประสิทธิภาพในการย้อมสีผ้าเรยอนและผ้าซาติน



บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 วัตถุดิบ

- อาหารหมักที่มีเกลือของไทย ได้แก่ ปลาแร่ และซีอิ๊ว

3.1.2 อุปกรณ์

- เครื่องเขย่า (Shaker, Witeg, Germany)
- เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Sonicator, Bandelin, Sonorex digitec, Germany)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอ (Autoclave, Tommy SX-700, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge, KUBOTA 5310, Japan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Vortex-2 Genie, USA)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler Toledo ML1602/01, Switzerland)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler Toledo ML204/01, Switzerland)
- เครื่องไมโครเวฟ (Microwave, LG MS2127CW, Thailand)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (BioSpectrometer, eppendorf, Germany)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler, BIO-RAD T100™, Singapore)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet Class II, Telstar Bioultra, USA)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Memmert, India)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Mitsubishi, Thailand)
- ตู้เย็นแช่แข็ง (Deep freezer, Sanyo, Biomedical freezer, Japan-Thailand)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, WTB Binder FD 115, Germany)

3.1.3 สารเคมี

1) สารเคมี

- Agarose basis (AppliChem, Spain)
- L-Ascorbic acid (Ajax Finechem, New Zealand)

- Bris/Acryl™ (Life Science, USA)
- Chloroform (RCI Labscan, Thailand)
- Dimethoxy sulfoxide (Riedel-de Haen, USA)
- Methanol (RCI Labscan, Thailand)
- Sodium chloride (Carlo Erbra, France)
- Sodium hydroxide (Ajax Finechem, New Zealand)
- Tris (Vivantis, Malaysia)
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)

2) PCR reagent

- Buffer (Vivantis, Malaysia)
- DNA Tag polymerase (Vivantis, Malaysia)
- dNTPs (Vivantis, Malaysia)
- Ethidium Bromide (AppliChem, Spain)
- Laddar (Vivantis, Malaysia)
- Magnesium Chloride ($MgCl_2$) (Vivantis, Malaysia)
- Total RNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Agar powder (HiMedia, India)
- Mueller-Hintton broth, MHB (HiMedia, India)
- Nutrient agar, NA (HiMedia, India)
- Nutrient broth, NB (HiMedia, India)
- Peptone (HiMedia, India)
- TSA Sheep blood agar (Scharlau, Spain)

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากอาหารหมักที่มีเกลือ

คัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากอาหารหมักที่มีเกลือของไทย ได้แก่ ซีอิ๊ว และ ปลาร้า โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง (Nutrient agar, NA) ที่เติมเกลือ 3% (w/v) และบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน (ดัดแปลงจากวิธีของ S. Tanasupawat et al. (2009)) สังเกตลักษณะโคโลนี จัดกลุ่มตามเฉดสีของรงควัตถุ และนำมาชิตบนอาหารวุ้นแข็งจน

แยกได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียไอโซเลทที่มีความเสถียรในการสร้างรงควัตถุ โดยทดสอบความเสถียรในการสร้างสีอย่างน้อย 5 generations และเจริญได้ตัวอย่างน้อยร้อยละ 10 ของกลุ่มไประบุสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing analysis) ที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ก.) ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของแบคทีเรียไอโซเลทในแต่ละกลุ่ม

3.2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท

3.2.2.1 การสกัดรงควัตถุจากแบคทีเรียไอโซเลท

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broth, NB) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) ร้อยละ 3 (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Khaneja et al. (2010)) จากนั้นนำอาหารไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ $10,000 \times g$ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์เปื่อยที่ผ่านการแช่เยือกแข็งไปสกัดรงควัตถุโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารที่ใช้สกัด (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข.) และเก็บสารสกัด (crude pigment extract) ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)

ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดรงควัตถุโดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Disc diffusion ตามวิธีของ (D. Mohana et al., 2013) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ค.1)

3.2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรงควัตถุด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ (Brand-Williams et al., 1995) (วิธีแสดงในภาคผนวก ค.2)

3.2.2.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของรงควัตถุที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท

ศึกษาชนิดและปริมาณของสารสกัด (crude pigment extract) ที่ได้จากข้อ

3.2.2.1 ด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry, Fourier transfer inferred spectroscopy (FTIR) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังนี้

- UV-visible spectrophotometric analysis ดัดแปลงจากวิธีของ Richa Jain et al. (2015)

เตรียมสารละลายสารสกัดตรงควัตถุ โดยละลายสารสกัดตรงควัตถุในสารละลาย DMSO แล้วนำไปวิเคราะห์กราฟการดูดกลืนแสง (Absorption spectrum) ที่ช่วงความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร

- FTIR analysis ดัดแปลงจากวิธีของ Usman et al. (2018)

ตรวจวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของสารสกัดโดยใช้ความยาวคลื่นรังสีช่วงอินฟราเรด $4000-400\text{ cm}^{-1}$ โดยนำตัวอย่างสารสกัดมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr pallet ตามวิธีของ F. Li et al. (2017) ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Scientific and Technological Research Equipment Centre, STREC)

- HPLC analysis ตามวิธีของ Siriamornpun et al. (2012)

ตัวอย่างสารสกัดตรงควัตถุ ผสมกับ hexane/acetone/ethanol (50:25:25 v/v/v) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

แยกสารประกอบด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) โดยการใช้คอลัมน์ C18 ขนาด $4.6 \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ dichloromethane:acetonitrile (6:4, v/v) และ เมทานอล โดยระบบ gradient ดังนี้ นาที่ที่ 0-5 เฟสเคลื่อนที่ A 70% เฟสเคลื่อนที่ B 30% นาที่ที่ 5 -10 เฟสเคลื่อนที่ A 80% เฟสเคลื่อนที่ B 20% นาที่ที่ 10-20 เฟสเคลื่อนที่ A 70% เฟสเคลื่อนที่ B 30% อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ปริมาตรในการฉีด 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยดีเทคเตอร์ชนิด photo diode array detector ความยาวคลื่น 472 นาโนเมตร จำแนกชนิดขององค์ประกอบของสารมาตรฐานไลโคปีน (lycopene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และลูทีน (lutein) โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.2.2.5 การประเมินความปลอดภัยของแบคทีเรียไอโซเลท

ประเมินความเสี่ยงในการก่อโรค (Pathogenicity) ของแบคทีเรียไอโซเลท ได้แก่ การตรวจสอบการมียีนไบโอจีนิก Biogenic amine gene การทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity) และการทดสอบด้านพิษวิทยา (Cytotoxicity test) ดังนี้

- การตรวจสอบการมียีนไบโอจีนิก (Biogenic amine gene) ดัดแปลงจากวิธีของ (L. Li et al., 2018)

ประเมินการสร้างสารกลุ่มไบโอจีนิก ได้แก่ ฮิสตามีน (Histamine) ไทรามิน (Tyramine) และพิวเทรสซีน (Putrescine) ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลทในอาหารที่มีเกลือ 3% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำคัลเจอร์ (culture) ปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้ง และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ขั้นถัดไป จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยนำดีเอ็นเอ 20 ng ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3.1 เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในเครื่อง thermal cycler ด้วยสภาวะมาตรฐาน ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) จากไพรเมอร์ทั้งเจ็ดคู่ด้วย agarose gel 2% (w/v) electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยขนาดของ DNA amplicon ของไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาชิ้น biogenic amine-encoding

No.	Size (BPs)	Primers	Sequence (5'- to -3')	Target BAs	Ref.
1	367	JV16HC	AGA TGG TAT TGT TTC TTA TG	Histamine	(Landete et al., 2007)
		JV17HC	AGA CCA TAC ACC ATA ACC TT	Histamine	
2	435	HDC3	GAT GGT ATT GTT TCK TAT GA	Histamine	(Coton et al., 2010)
		HDC4	CCA AAC ACC AGC ATC TTC	Histamine	
3	1100	TD2	ACA TAG TCA ACC ATR TTG AA	Tyramine	
		TD5	CAA ATG GAA GAA GAA GTA GG	Tyramine	

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Size (BPs)	Primers	Sequence (5' - to -3')	Target BAs	Ref.
4	720	TDC1	AAC TAT CGT ATG GAT ATC AAC G	Tyramine	(Landete et al., 2007)
		TDC2	TAG TCA ACC ATA TTG AAA TCT GG	Tyramine	
5	825	TDC-F	TGG YTN GTN CCN CAR ACN AAR CAY TA	Tyramine	
		TDC-R	ACR TAR TCN ACC ATR TTR AAR TCN GG	Tyramine	
6	1440	PUT1-F	TWY MAY GCN GAY AAR CAN TAY YYT GT	Putrescine	
		PUT1-R	ACR CAN AGN ACN CCN GNG GRT ANG G	Putrescine	
7	624	PUT2-F	ATH WGN TWY GGN AAY ACN ATH AAR AA	Putrescine	
		PUT2-R	GCN ARN CCN CCR AAY TTN CCD ART C	Putrescine	

- การทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

ประเมินสมบัติการทำลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียโอโซเลทด้วยการใช้อาหารวุ้นแข็ง Sheep Blood Agar (SBA) (Pisano et al., 2014) โดย spot โคโลนีของแบคทีเรียโอโซเลทบนอาหารวุ้นแข็ง SBA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างโซนใสรอบโคโลนี โดยทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test)

ประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay โดยเซลล์ชนิด Baby hamster kidney cell line, (BHK-21), Mouse connective tissue fibroblast (L-929) และ Human hepatocyte cell line (Hep-G2) ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้ (1) การปลูกเซลล์ (seeding cell): ปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน

1.0×10^4 cell ใน 96 well plate นาน 24 ชั่วโมง (ปริมาตร 100 μ L/well) (2) Cell treatment: เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เทคนิค two-folds dilution ใน complete media ปริมาตร 100 μ L/well จากนั้นกำจัดส่วนใส และเติม complete media ที่มีสารสกัดลงไป บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ DMSO เป็นตัวควบคุม (3) Measurement the cell cytotoxicity: เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) 10 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในตู้บ่มชนิด CO₂ incubator จากนั้นละลายผลึกฟอรัมาซานด้วยสารละลาย Isopropanol with HCl (100 μ L/well) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำมาหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% inhibition concentration, IC₅₀) โดยส่งวิเคราะห์ตัวอย่างที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการงานบริการวิชาการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 การประเมินสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไอโซเลท

ประเมินความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl concentration) ต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไอโซเลท โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1%, 3% และ 5% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สังเกตการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไอโซเลทที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยนำ cell culture (25 mL) ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85% (w/v) หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ นำไป sonicate นาน 5 นาที แล้วกำจัดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออก นำเซลล์เปียกที่ได้ผสมกับสารละลายเมทานอล (Methanol) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนสารละลาย (supernatant) (Kirishna et al., 2014) นำไปวิเคราะห์การสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไอโซเลทตามข้อ 3.2.2.4

สำหรับการเตรียมสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ทำได้โดยนำสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท (0.1 g) ละลายในสารละลายเมทานอล 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 300-600 นาโนเมตร ใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial experiment) และทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สร้างรงควัตถุสูงสุดจะใช้เป็นความเข้มข้นของเกลือในการพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทเพื่อสร้างรงควัตถุต่อไป

3.2.4 การพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลทเพื่อสร้างรงควัตถุ

ปรับเตรียมอาหารต้นทุนต่ำจากน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม 2 ชนิด คือ น้ำทิ้งน้ำปลา และ น้ำทิ้งซีอิ๊ว สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลท โดยใช้ น้ำเปปโตน (Peptone) เข้มข้น 1% (w/v) และน้ำกลั่นเป็นอาหารพื้นฐาน (based medium) ดังต่อไปนี้

- 1) น้ำเปปโตนเข้มข้น 1% (w/v) ที่มีการเติมน้ำปลา (fish sauce) เข้มข้น 1% และ 2% (v/v) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเกลือที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.3 ด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์
- 2) น้ำเปปโตนเข้มข้น 1% (w/v) ที่มีการเติมซีอิ๊ว (soy sauce) เข้มข้น 1% และ 2% (v/v) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเกลือที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.3 ด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์
- 3) น้ำปลาหรือซีอิ๊วที่เจือจางด้วยน้ำเปปโตน เข้มข้น 1% (w/v) เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นเกลือที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.3
- 4) น้ำกลั่นที่มีการเติมน้ำปลา (fish sauce) เข้มข้น 1% และ 2% (v/v) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเกลือที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.3
- 5) น้ำกลั่นที่มีการเติมซีอิ๊ว (soy sauce) เข้มข้น 1% และ 2% (v/v) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเกลือที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.3
- 6) น้ำปลาหรือซีอิ๊วที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นเกลือที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.3

เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์และปริมาณและองค์ประกอบของรงควัตถุที่เวลา 0, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 3.2.3 และใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial experiment) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่ได้ด้วยวิธี HPLC ตามข้อ 3.2.2.4

3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 22

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

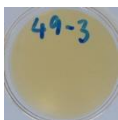
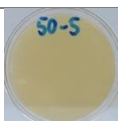
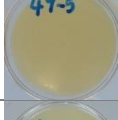
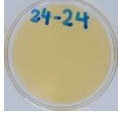
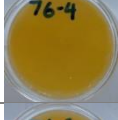
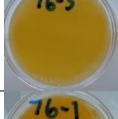
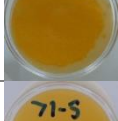
4.1 การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากตัวอย่างปลาร้าและซีอิ๊ว

คัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากตัวอย่างปลาร้าและซีอิ๊ว โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งที่เติมเกลือ 5% (w/v) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สังเกตเฉดสีของโคโลนีที่แบคทีเรียไอโซเลทสร้างขึ้น เมื่อประเมินเสถียรภาพในการสร้างสี และสมบัติการทนเกลือ สามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือที่มีเสถียรภาพในการสร้างรงควัตถุทั้งหมด 60 ไอโซเลท และพบการสร้างสีของโคโลนีในเฉดสีต่างๆ ได้แก่ สีขาว-เหลืองนวล (13 ไอโซเลท) สีเหลือง (16 ไอโซเลท) สีเหลือง-ส้ม (6 ไอโซเลท) สีส้ม (23 ไอโซเลท) และสีชมพู (2 ไอโซเลท) เมื่อจำแนกแบคทีเรียไอโซเลทด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) ของแบคทีเรียทั้ง 60 ไอโซเลทเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่ขึ้นชื่อในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ตารางที่ 4.1) และทำการวิเคราะห์ผลในรูปแบบของแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของแบคทีเรียไอโซเลทด้วยโปรแกรม Genious version 11.0 ดังภาพ 4.1 สามารถแบ่งแบคทีเรียไอโซเลทได้เป็น 13 กลุ่ม โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลทตามแต่ละ cluster ที่ปรากฏร่วมกับการศึกษาการสร้างสีบนอาหารวุ้นแข็ง (nutrient agar) ที่เติมเกลือ 5% (w/v)

เมื่อศึกษาลำดับเบสที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดแยกได้ พบแบคทีเรีย (1) กลุ่ม *Tetragenococcus* ที่สร้างโคโลนีสีขาว และมีความคล้ายกับ *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งเป็น Halophilic lactic acid สามารถพบได้ในกระบวนการหมักน้ำปลา (fish sauce fermentation) และอาหารหมักชนิดอื่นๆ เช่น ซีอิ๊ว (soy sauce) กะปิ (shrimp paste) และถั่วดำหมักหรือที่เรียกว่าเต้าซี่ (fermented black bean or Dou Chi) และมีรายงานว่ามีการใช้แบคทีเรียดังกล่าวเป็นหัวเชื้อเพื่อปรับปรุงลักษณะกลิ่นในกระบวนการหมักน้ำปลา (Udomsil et al., 2011) (2) กลุ่ม *Staphylococcus* ที่พบการสร้างโคโลนีตั้งแต่สีเหลืองไปจนถึงสีส้ม ตัวอย่างเช่น ไอโซเลท 76-1 ที่สร้างโคโลนีสีส้ม และมีความคล้ายกับ *Staphylococcus epidermidis* (76-1) ซึ่งมีรายงานการสร้างรงควัตถุในกลุ่มแซนโทฟิลล์จากแบคทีเรียชนิดนี้ที่คัดแยกได้จาก bovine udder (Sandvik & Brown, 1964) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus carnosus* (48-10) ที่สร้างเฉดสีเหลือง โดยการศึกษาของ Somboon Tanasupawat et al. (1991) ที่คัดแยกแบคทีเรียชนิดดังกล่าวได้จากอาหารหมักที่มีเกลือ ได้แก่ ปลาร้าและซีอิ๊ว และมีรายงานว่ามีการใช้แบคทีเรียดังกล่าวเป็น starter culture ในการผลิตไส้กรอกอีกด้วย (Müller et al., 2016) (3) กลุ่ม *Bacillus* ที่มีสปิซิส

แตกต่างกันแต่สร้างสีในเฉดเดียวกัน คือ สีเหลืองส้มและสีส้มแดง เช่น ตัวอย่างเช่น *Bacillus infantis* (63-11) ที่ Daharmaraj and Rajendren (2014) คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลาสีสกเทศ (*Labeo rohita*) พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทนกรดและน้ำดีได้ ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียโปรไบโอติก (probiotic) และ *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถทนกรดและน้ำดีได้ รวมถึงยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus cereus* ATCC 33019 และ *Listeria monocytogenes* BCRC 15338 (Lee et al., 2017) (4) *Salinicoccus* sp. (82-1) ที่มีรายงานว่าสร้างรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ชนิดแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) (Bhat & Marar, 2015) นอกจากพบแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวแล้ว ยังพบแบคทีเรียไฮโซเลทในกลุ่ม (5) *Halobacillus* ที่สร้างโคโลนีสีส้มแดง และมีรายงานว่า *Halobacillus trueperi* MXM-16 ที่คัดแยกจาก Mangrove Ecosystem of Goa สามารถสร้างรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) (Kharangate-Lad & Bhosle, 2016) (6) *Kocuria* ที่สร้างโคโลนีสีเหลือง และมีรายงานการคัดแยกได้จากตัวอย่างดิน คือ *Kocuria* KM243757 และ JO1 KM216829 สร้างรงควัตถุสีเหลืองและส้มในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Vora et al., 2015) และ (7) *Halomonas* สร้างโคโลนีสีส้ม ที่มีรายงานการสร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อนของ *Halomonas garicola* ที่คัดแยกได้จาก saeu-jeot ซึ่งเป็นอาหารหมักที่มีเกลือของเกาหลี (Jung et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน ยังไม่พบรายงานการสร้างและการระบุชนิดของรงควัตถุที่สังเคราะห์ได้จากไฮโซเลทที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้

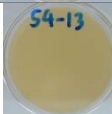
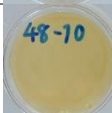
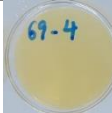
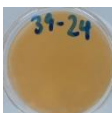
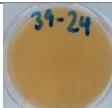
ตารางที่ 4.1 การระบุชนิดและการสร้างรหัสวัตถุของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

Group	Isolate	Strain	Identity (%)	Accession Number ¹	Color ²
1. <i>Tetragenococcus</i> sp.	49-3	Uncultured			
		<i>Tetragenococcus</i> sp.	289/98	JF427878.1	
		<i>T. halophilus</i>	278/98	LC269262.1	
	50-5	<i>T. halophilus</i>	287/98	LC269262.1	
	50-2	<i>T. halophilus</i>	278/99	KF758564.1	
	49-5	<i>T. halophilus</i>	281/98	LC269262.1	
2. <i>Staphylococcus</i> sp.	64-7	<i>T. halophilus</i>	278/99	KF758564.1	
	24-24	Uncultured			
		<i>Staphylococcus</i> sp.	289/99	HM074595.1	
		<i>S. epidermidis</i>	283/99	KY021442.1	
	24-19	<i>Staphylococcus</i> sp.	278/98	HM103367.1	
	76-4	<i>Staphylococcus</i> sp.	291/99	HM103367.1	
	76-3	<i>S. epidermidis</i>	285/99	KX648542.1	
	76-1	<i>S. epidermidis</i>	294/99	KX648542.1	
	71-5	<i>S. epidermidis</i>	294/99	KX648542.1	

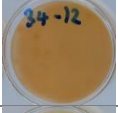
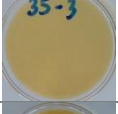
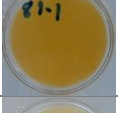
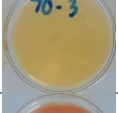
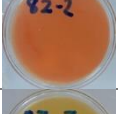
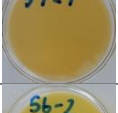
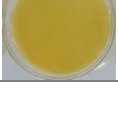
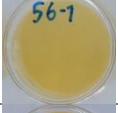
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Group	Isolate	Strain	Identity (%)	Accession Number ¹	Color ²
2. <i>Staphylococcus</i> sp. (ต่อ)	71-4	<i>Staphylococcus</i> sp.	289/99	HM103367.1	71-4
		<i>S. cohnii</i>	285/99	KX417232.1	
	71-3	<i>Staphylococcus</i> sp.	291/99	AM268423.1	71-3
	52-2	<i>Staphylococcus</i> sp.	289/98	AM268423.1	52-2
	54-4	<i>Staphylococcus</i> sp.	291/99	HM103367.1	54-4
	79-2	<i>S. epidermidis</i>	285/100	KX648542.1	79-2
3. <i>Staphylococcus</i> sp.	24-22	<i>S. epidermidis</i>	283/99	MF171038.1	24-22
	57-3	<i>S. saprophyticus</i>	285/98	HM216566.1	57-3
	24-18	<i>S. saprophyticus</i>	291/99	HM216566.1	24-18
	52-5	<i>S. arlettae</i>	287/99	KF233798.1	52-5
		<i>S. saprophyticus</i>	287/100	EU169536.1	
	52-3	<i>S. arlettae</i>	292/98	KY312806.1	52-3
	48-13	<i>S. arlettae</i>	291/98	KF233798.1	48-13
	52-1	<i>S. arlettae</i>	291/98	KF233798.1	52-1
	48-20	<i>S. arlettae</i>	292/98	KF233798.1	48-20

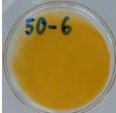
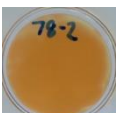
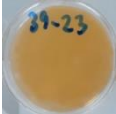
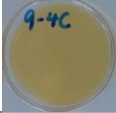
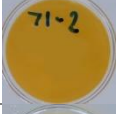
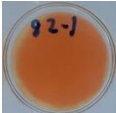
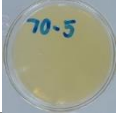
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Group	Isolate	Strain	Identity (%)	Accession Number ¹	Color ²
3. <i>Staphylococcus</i> sp. (ต่อ)	13-1c	<i>S. saprophyticus</i>	285/99	HM216566.1	
	30-3	<i>S. arlettae</i>	287/99	KF233798.1	
		<i>S. saprophyticus</i>	287/100	EU169536.1	
4. <i>Staphylococcus</i> sp.	54-13	<i>S. carnosus</i>	287/98	LC145699.1	
		<i>S. condiment</i>	287/98	CP018776.1	
	48-10	<i>S. carnosus</i>	289/98	LC145699.1	
		<i>S. condiment</i>	289/98	CP018776.1	
5. <i>Bacillus</i> sp.	70-2	<i>Oceanobacillus</i> sp.	279/97	LC274890.1	
		<i>Virgibacillus</i> sp.	279/97	KX954613.1	
		<i>Oceanobacillus</i>	279/97	KY400284.1	
		<i>picturae</i>	279/97	KY400284.1	
	69-4	<i>B. pumilus</i>	285/99	HM216575.1	
	63-11	<i>B. infantis</i>	278/98	MF326582.1	
		<i>B. infantis</i>	278/98	KX068628.1	
	6. <i>Bacillus</i> sp.	69-11	<i>Lentibacillus</i> sp.	268/95	NR_147386.1
<i>Virgibacillus</i> sp.			268/98	AB562922.1	
<i>B. subtilis</i>			267/96	GU434356.1	
77-3		<i>Bacillus</i> sp.	289/99	GO169106.1	
		<i>Virgibacillus</i>	279/99	KY604885.1	
		<i>halodenitrificans</i>			
39-24		<i>Bacillus</i> sp.	278/99	KT428838.1	
		<i>Virgibacillus</i>	276/99	KY604885.1	
		<i>halodenitrificans</i>			
35-1	<i>B. subtilis</i>	294/99	AY659863.1		

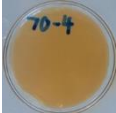
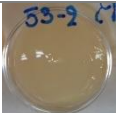
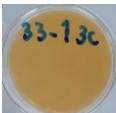
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Group	Isolate	Strain	Identity (%)	Accession Number ¹	Color ²
6. <i>Bacillus</i> sp. (ต่อ)	60-5	<i>B. amyloliquefaciens</i>	294/98	KF611911.1	
	34-12	<i>B. amyloliquefaciens</i>	294/98	KF611911.1	
	35-3	<i>B. amyloliquefaciens</i>	311/100	KF611911.1	
7. <i>Halobacillus</i> sp.	81-1	<i>Halobacillus yeomjeoni</i>	298/99	KF321911.1	
	70-3	<i>Halobacillus</i> sp.	298/99	KF321911.1	
8. <i>Bacillus</i> sp.	81-2	<i>Bacillus</i> sp.	231/94	JX047443.1	
	57-7	<i>B. amyloliquefaciens</i>	235/92	KF611911.1	
9. <i>Kocuria</i> sp.	56-2	<i>Micrococcus</i> sp.	257/94	FJ984893.1	
		<i>Micrococcus luteus</i>	257/94	MG818946.1	
		<i>Brevibacterium</i> sp.	250/100	MG988276.1	
	39-28c	Uncultured bacterium	250/100	MF092303.1	
	55-10	<i>Kocuria</i> sp.	263/100	JF893459.1	
		<i>Kocuria flava</i>	257/99	KY401485.1	
10. <i>Bacillus</i> sp.	56-1	<i>Kocuria</i> sp.	220/95	JF893459.1	
	13-3	<i>Bacillus</i> sp.	163/86	GU084147.1	
		<i>B. licheniformis</i>	161/5	KU922189.1	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

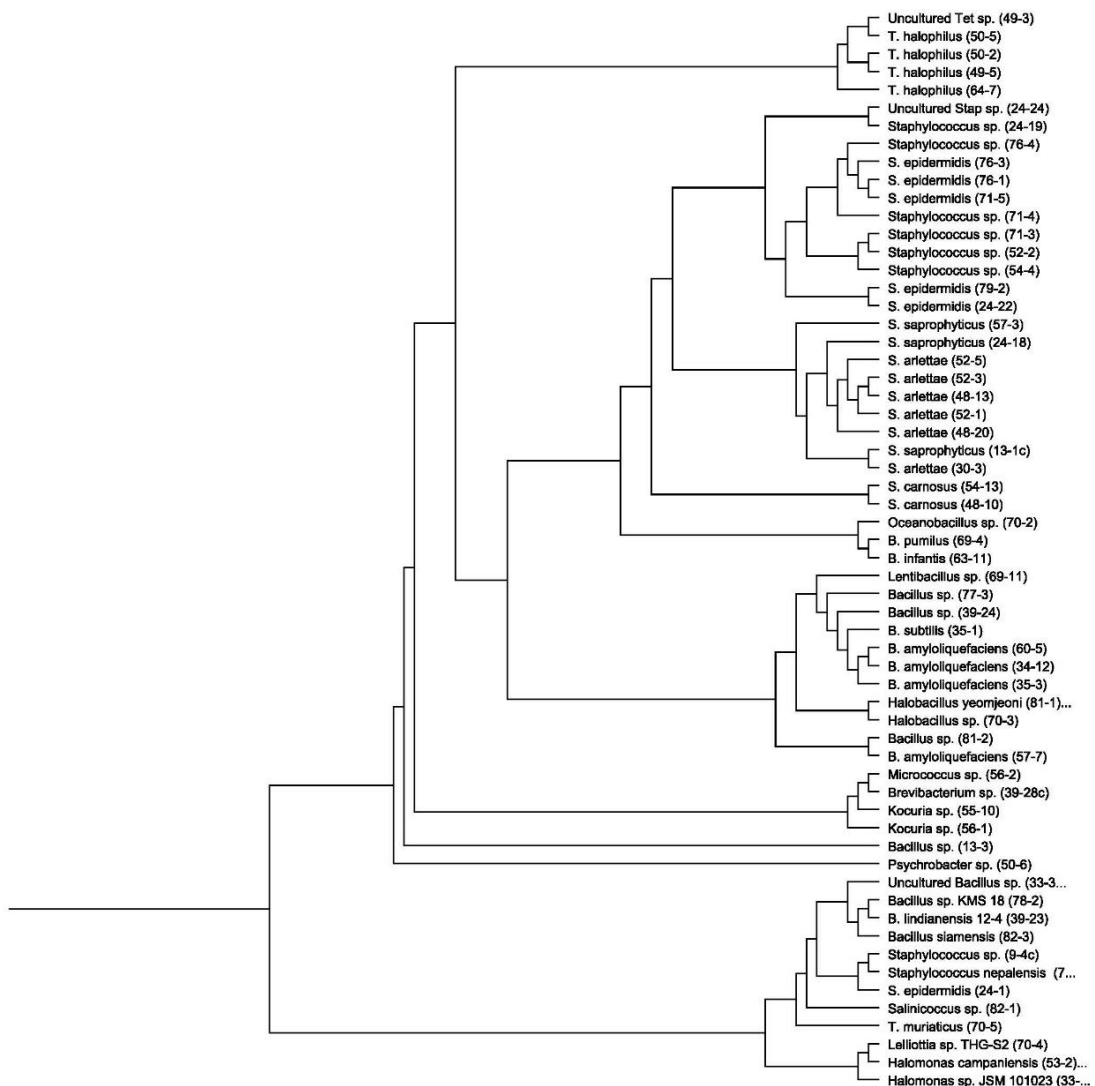
Group	Isolate	Strain	Identity (%)	Accession Number ¹	Color ²
11.					
<i>Psychrobacter</i> sp.	50-6	<i>Psychrobacter</i> sp.	289/99	KP639170.1	
12. <i>Bacillus</i> sp.		Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	278/99	LN875315.1	
	33-3	<i>Bacillus anthracis</i>	272/98	CP009341.1	
		<i>Bacillus</i> sp.	281/99	KY063598.1	
	78-2	<i>B. vieynamensis</i>	281/99	KU661974.1	
		<i>B. marisflavi</i>	281/99	KU983866.1	
		<i>B. lindianensis</i>	281/99	KP954691.1	
		<i>B. subtilis</i>	281/99	CP011534.1	
	39-23	<i>B. vietnamensis</i>	281/99	AB999975.1	
		<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	281/99	HG931337.1	
	9-4c	<i>Staphylococcus</i> sp.	898/99	KX250303.1	
			898/99	NR_037046.1	
	71-2	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	915/99	JO970476.1	
	24-1	<i>S. epidermidis</i>	291/100	JF920005.1	
		<i>Salinicoccus</i> sp.			
		<i>Salinicoccus</i>	281/99	KX099312.1	
	82-1	<i>hispanicus</i>	281/99	KU132379.1	
		<i>Salinococcus alkaliphilus</i>	281/99	GU397409.2	
	70-5	<i>T. muriaticus</i>	813/97	AB243004.1	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Group	Isolate	Strain	Identity (%)	Accession Number ¹	Color ²
13. <i>Halomonas</i> sp.	70-4	<i>Lelliottia</i> sp.	279/99	KJ810589.1	
		<i>Enterobacter cancerogenus</i>	279/99	KF438225.1	
	53-2	<i>Halomonas campaniensis</i>	453/94	CP007757.1	
	33-13c	<i>Halomonas</i> sp.	564/99	KR109183.1	
		<i>Halomonas alimentatia</i>	564/99	KT758546.1	

¹Accession number of the sequence and identification percentage of the closest relative found by BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

²Visible color on Nutrient agar with NaCl 5% (w/v)



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA ของแบคทีเรียไอโซเลทที่สร้างรงควัตถุ

จากการพิจารณาสายพันธุ์แบคทีเรียร่วมกับการสร้างสีบนอาหารเลี้ยงยูนแข็งของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดแยกได้ สามารถคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างสารสี จำนวน 22 ไอโซเลทที่มีเสถียรภาพในการสร้างสีอย่างน้อย 5 generations และเจริญได้ดีอย่างน้อยร้อยละ 10 ไปศึกษาชนิดและปริมาณของสารสกัด (crude pigment extract) จากแบคทีเรียไอโซเลทต่อไปด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry, Fourier transfer inferred spectroscopy (FTIR) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติแรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียไฮโซเลท

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากเซลล์แบคทีเรียแต่ละไฮโซเลท เข้มข้น 5 mg/mL มาศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* โดยมีสาร Tetracycline เข้มข้น 30 µg เป็นสารปฏิชีวนะมาตรฐาน (ตารางที่ 4.2.1) พบว่า สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) และ *Bacillus infantis* (63-11) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* ได้ทั้ง 3 ชนิด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ในช่วง 0.05-2.10 มิลลิเมตร สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. (82-1) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 0.85 ± 0.28 และ 1.75 ± 0.64 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *E. coli* ได้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 1.33 ± 0.67 และ 1.30 ± 0.49 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus carnosus* (48-10) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ เมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐาน tetracycline ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ในช่วง 23.65-24.35 มิลลิเมตร แล้ว อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดที่ได้จากแบคทีเรียไฮโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่ำ เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดในงานวิจัยนี้มีค่าน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ D. C. Mohana et al. (2013) ที่พบว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์ (ความเข้มข้น 1-10 mg/mL) จาก *M. roseus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ในช่วง 6.5-12.5 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า รงควัตถุที่สกัดได้จาก *Rhodotorula glutinis* สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone อยู่ในช่วง 8.8-13.3, 9.5-17.9 และ 7.9-13.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Rostami et al., 2016)

ตารางที่ 4.2ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย

Sample	Inhibition zone (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
81-1	2.10±0.07	0.77±0.04	0.30±0.07
82-1	0.85±0.28	NI	1.75±0.64
63-11	0.05±0.00	0.38±0.18	0.95±0.00
48-10	NI	NI	NI
60-5	NI	1.33±0.67	1.30±0.49
Tetracycline (30 µg)	23.65±0.70	23.98±0.95	24.35±0.71
หมายเหตุ	NI	หมายถึง no inhibition zone	

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีการทดสอบการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่อนุมูลอิสระที่คงตัวในตัวละลายเมทานอล มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH* ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะทำให้สีม่วงค่อยๆ จางลงจนมีสีเหลือง ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียได้ ซึ่งจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH* และรายงานผลในรูป % inhibition ของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ที่มีความเข้มข้น 5 mg/mL (ตารางที่ 4.2.2) พบว่า สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) มีค่า % inhibition สูงสุด เท่ากับ 14.93±1.82 ซึ่งสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (0.30 mg/mL) ที่มีค่า % inhibition เท่ากับ 95.50±2.74 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท สามารถต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารสกัดจาก *M. roseus* (1-10 mg/mL) และ *M. luteus* (1-10 mg/mL) ที่มีค่า % DPPH radical scavenging เท่ากับ 32.8-88.5 และ 29.1-82.1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของสารสกัดในในงานวิจัยที่มีความเข้มข้นต่ำ (D. C. Mohana et al., 2013) ซึ่งการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดังกล่าว อาจทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจาก DPPH* ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ในที่นี้สารสกัดจากแบคทีเรียอยู่ในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอน รวมถึงสารปนเปื้อนอื่นๆ ซึ่งสามารถเป็นตัว

รีดิวซ์แล้วทำให้สีของ DPPH* จางลงได้ จึงอาจต้องมีการทำให้สารสกัดจากแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นก่อน เพื่อลดการรบกวน (interfere) ที่อาจเกิดขึ้นได้

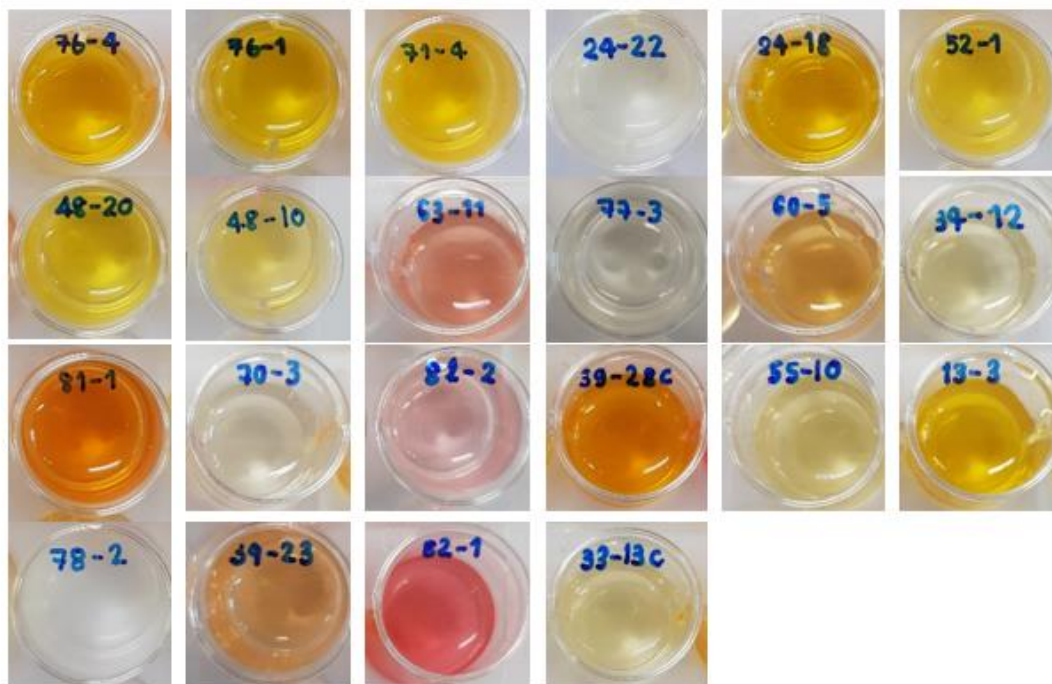
ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแบคทีเรีย

Strain	Inhibition (%)
<i>Halobacillus yeomjeoni</i> (81-1)	12.72±0.25
<i>Salinicoccus</i> sp. (82-1)	11.99±0.27
<i>Bacillus infantis</i> (63-11)	7.73±0.33
<i>Staphylococcus carnosus</i> (48-10)	6.01±1.35
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (60-5)	14.93±1.82
Ascorbic acid	95.50±2.74

4.2.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของรงควัตถุที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท

จากการสกัดรงควัตถุจากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจำนวน 22 ไอโซเลทด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ตามวิธีในข้อ 3.2.2.1 พบว่าสีของสารสกัด (crude pigment extract) ที่ได้จากไอโซเลทดังกล่าว มีความหลากหลายของสี ตั้งแต่สีเหลืองสดไปจนถึงสีชมพูเข้ม (ภาพที่ 4.2) ซึ่งใกล้เคียงกับสีของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สอดคล้องกับข้อมูลของ Namitha and Negi (2010) ที่รายงานว่าสีของสารในกลุ่มดังกล่าวนี้มีตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงสีแดงเข้ม

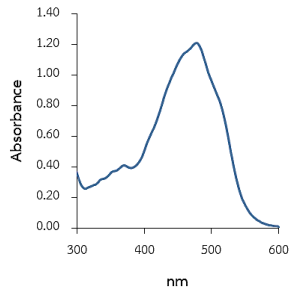
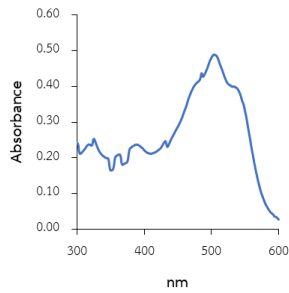
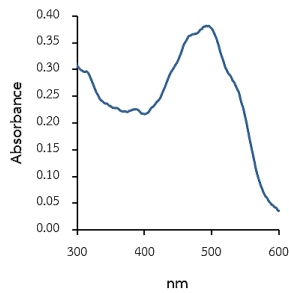
จากนั้นศึกษาคุณสมบัติและปริมาณของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry, Fourier transfer inferred spectroscopy (FTIR) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry เป็นวิธีเบื้องต้นที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและปริมาณของสารโดยอ้างอิงจากลักษณะการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 300-600 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Ramachandran et al., 2014) ร่วมกับการศึกษาโครงสร้างของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทด้วยเทคนิค Fourier transfer inferred spectroscopy (FTIR) เพื่อให้เข้าใจลักษณะของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทมากขึ้น



ภาพที่ 4.2 สีของสารสกัด (crude pigment extract) ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท

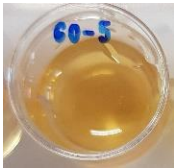
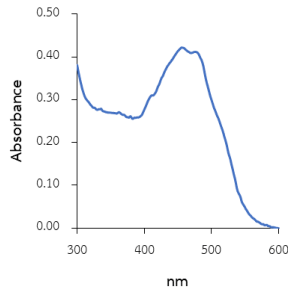
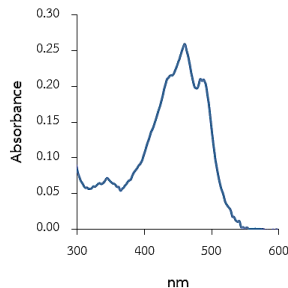
ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสีและค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 300-600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียไอโซเลท พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของแบคทีเรียไอโซเลทในกลุ่มเดียวกัน มีรูปแบบของพีคและจำนวนความยาวคลื่นสูงสุดใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.3 โดยสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ได้มีความคล้ายคลึงกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งใกล้เคียงกับแคโรทีนอยด์ที่ได้จาก *Bacillus* spp. (Khaneja et al., 2010)

ตารางที่ 4.4 คุณสมบัติของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry

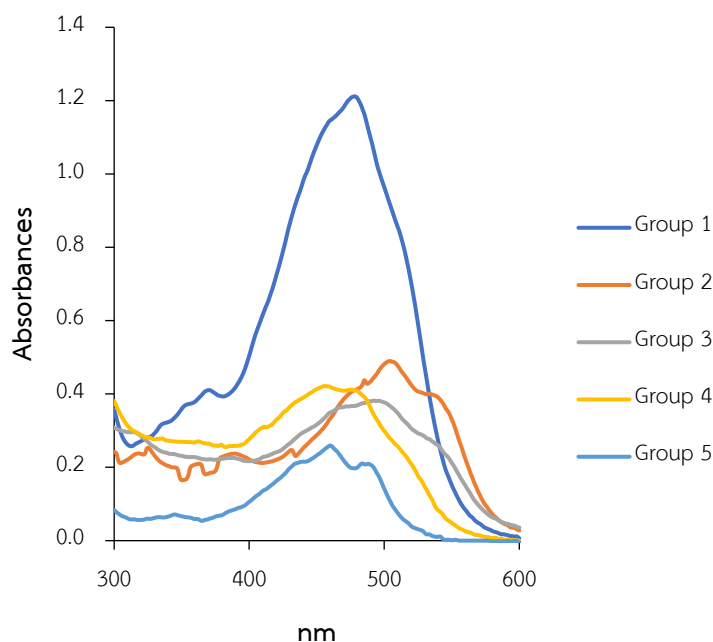
Group	Strain	Color ¹	Spectrometric analysis	
			Absorption Spectrum	Peak (λ_{max})
1 (2 ไอโซเลท)	- Halobacillus yeomjeoni (81-1) .. - Halobacillus sp. (70-3)			460 nm; 481 nm
2 (12 ไอโซเลท)	- Uncultured Bacillus sp. (33-3)... - Bacillus sp. KMS 18 (78-2) B. indianensis 12-4 (39-23) - Bacillus siamensis (82-3) - Staphylococcus sp. (9-4c) - Staphylococcus nepalensis (7... S. epidermidis (24-1) - Salinococcus sp. (82-1) T. muritacus (70-5) - Lelliottia sp. THG-S2 (70-4) - Halomonas campaniensis (53-2)... - Halomonas sp. JSM 101023 (33-...			489 nm; 509 nm; 541 nm
3 (3 ไอโซเลท)	- Oceanobacillus sp. (70-2) B. pumilus (69-4) B. infantis (63-11)			480 nm; 489 nm

¹Crude pigment extract dissolved in DMSO solution

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Group	Strain	Color ¹	Spectrometric analysis	
			Absorption Spectrum	Peak ($\lambda_{\max}$)
4 (7 ไอโซเลท)	- Lentibacillus sp. (69-11) - Bacillus sp. (77-3) - Bacillus sp. (39-24) B. subtilis (35-1) B. amyloliquefaciens (60-5) B. amyloliquefaciens (34-12) B. amyloliquefaciens (35-3)			469 nm; 488 nm
5 (23 ไอโซเลท)	- Uncultured Staph sp. (24-24) - Staphylococcus sp. (24-19) - Staphylococcus sp. (76-4) S. epidermidis (76-3) S. epidermidis (76-1) S. epidermidis (71-6) - Staphylococcus sp. (71-4) - Staphylococcus sp. (71-3) - Staphylococcus sp. (52-2) - Staphylococcus sp. (54-4) S. epidermidis (79-2) S. epidermidis (24-22) S. saprophyticus (57-3) S. saprophyticus (24-18) S. arlettae (52-5) S. arlettae (52-3) S. arlettae (48-13) S. arlettae (52-1) S. arlettae (48-20) S. saprophyticus (13-1c) S. arlettae (30-3) S. carnosus (54-13) S. carnosus (48-10)			443 nm; 460 nm; 483 nm

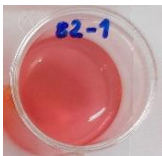
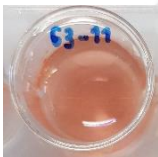
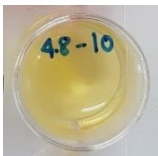
¹Crude pigment extract dissolved in DMSO solution



ภาพที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทในแต่ละกลุ่มที่ความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร

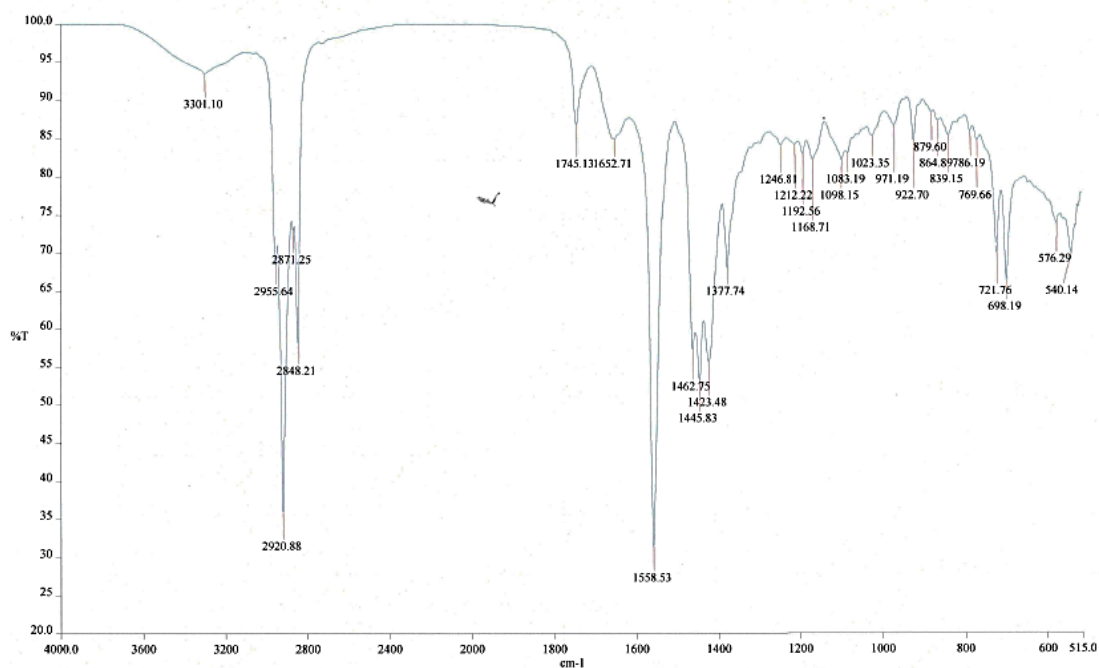
จากนั้นศึกษาสารสกัดที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่นำมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr pallet นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ในช่วงเลขคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$ พบว่า สเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทในกลุ่มเดียวกัน มีลักษณะใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.4ก-จ) โดยปรากฏหมู่ฟังก์ชันในกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl) ที่ $1745.13, 1745.78, 1743.67, 1744.00$ และ 1745.20 cm^{-1} ตามลำดับ และพบกลุ่มคาร์บอกซิลิก (carboxylic) ที่ $2955.64, 2954.79, 2955.65, 2956.32$ และ 2956.23 cm^{-1} ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่แบคทีเรียไอโซเลทสร้างขึ้นส่วนใหญ่อาจเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) (Namitha & Negi, 2010; Ramachandran et al., 2014)

ตารางที่ 4.5 คุณสมบัติของสารสกัดที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR analysis

Groups	Color	Identifying functional group	Tentative identification
Group 1 (2 isolates)		2955.64 and 2871.25 (C-CH ₃ /O-H stretch); 2920.88 and 2848.21 (-CH ₂ /O-H stretch); 1745.13 (C=O stretch); 1462.75 and 1445.83 (-CH ₂ - and -CH ₃ bend); 1423.48 (-CH ₂ bend); 1377.74 (-CH ₃ bend)	Xanthophylls
Group 2 (12 isolates)		2954.79 (C-CH ₃ /O-H stretch); 2920.59 and 2848.57 (CH ₂ /O-H stretch); 1745.78 (C=O stretch); 1637.31 (C=C stretch); 1445.81 (-CH ₂ - and -CH ₃ bend)	Xanthophylls
Group 3 (3 isolates)		2955.65 and 2872.26 (C-CH ₃ /O-H stretch); 2920.21 and 2848.21 (-CH ₂ /O-H stretch); 1743.67 and 1728.80 (C=O stretch); 1652.52 and 1635.64 (C=C stretch); 1462.79 and 1445.40 (-CH ₂ - and -CH ₃ bend); 1422.50 (-CH ₂ bend)	Xanthophylls
Group 4 (7 isolates)		2956.32 and 2873.69 (C-CH ₃ /O-H stretch); 2921.26 and 2848.57 (-CH ₂ /O-H stretch); 1744.00 (C=O stretch); 1636.56 (C=C stretch); 1462.66 and 1446.01 (-CH ₂ - and -CH ₃ bend); 1422.57 (-CH ₂ bend); 1378.84 (-CH ₃ - bend)	Xanthophylls
Group 5 (23 isolates)		2956.23 and 2873.49 (C-CH ₃ /O-H stretch); 2921.15 and 2848.51 (-CH ₂ /O-H stretch); 1745.20 (C=O stretch); 1641.03 (C=C stretch); 1462.91 and 1445.92 (-CH ₂ - and -CH ₃ bend); 1423.20 (-CH ₂ bend); 1378.11 (-CH ₃ bend)	Xanthophylls

Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)

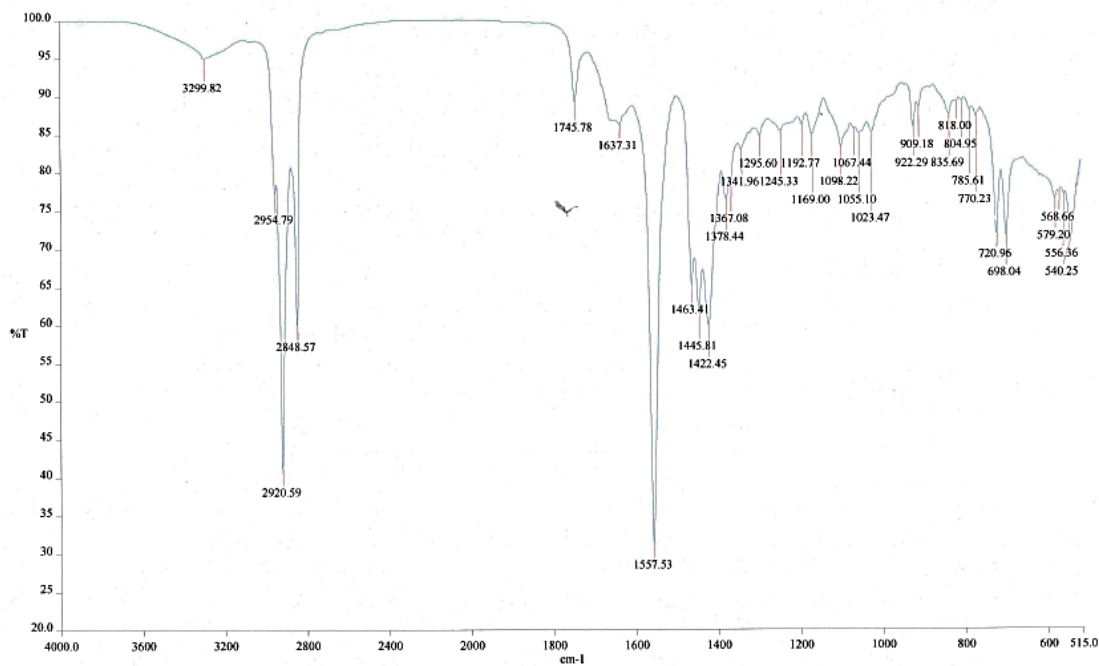


81-1.sp - 7/31/2018



Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

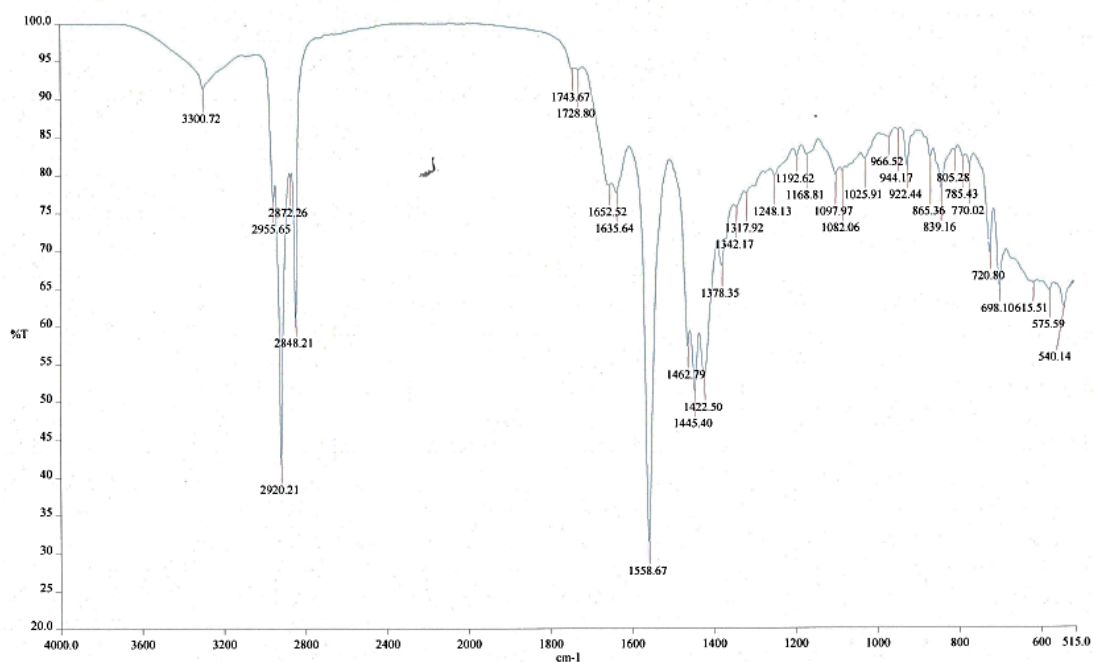
Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



82-1.sp - 7/31/2018

Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)

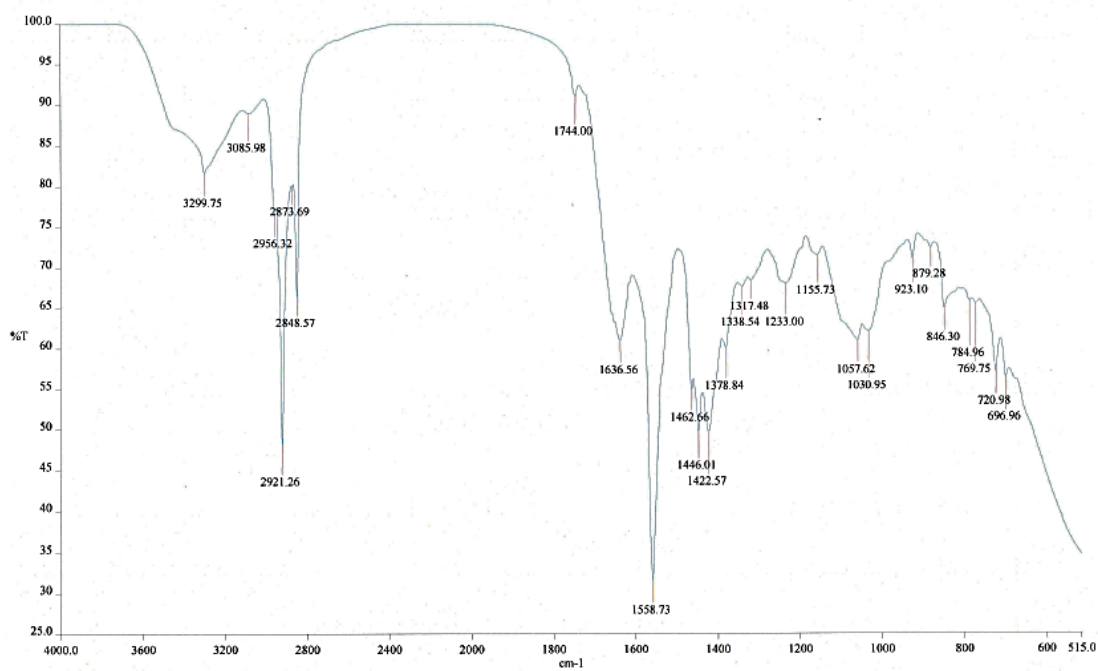


-63-11.sp - 7/31/2018

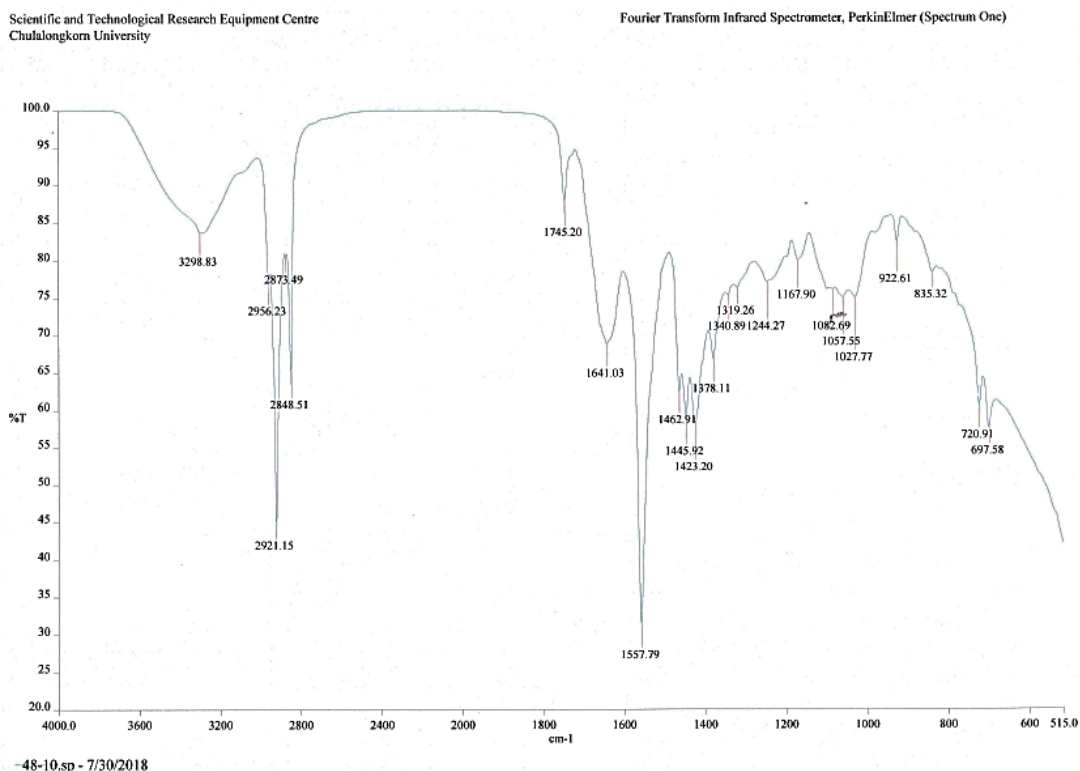


Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



-60-5.sp - 10/18/2018



ภาพที่ 4.4 สเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลทในแต่ละกลุ่ม (ก) กลุ่ม 1 - 2 ไฮโซเลท (ข) กลุ่ม 2 - 12 ไฮโซเลท (ค) กลุ่ม 3 - 3 ไฮโซเลท (ง) กลุ่ม 4 - 7 ไฮโซเลท และ (จ) กลุ่ม 5 - 23 ไฮโซเลท ตามลำดับ

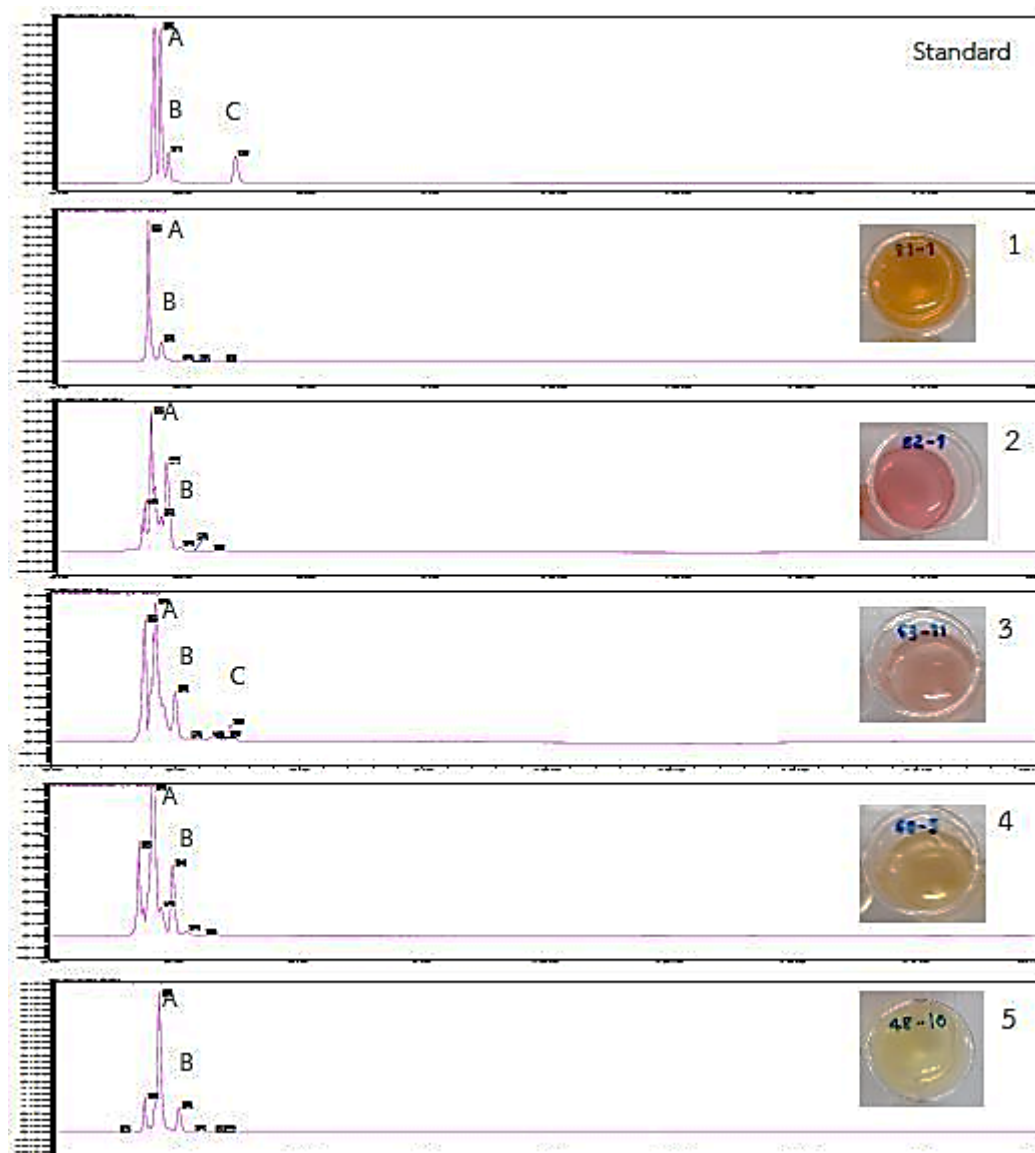
เมื่อศึกษาชนิดและโครงสร้างของสารสกัดที่ได้จากแบคทีเรียไฮโซเลทในแต่ละกลุ่ม ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric และ FTIR analysis พบว่า สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและสเปกตรัม IR ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองเทคนิคให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน นั่นคือแบคทีเรียไฮโซเลทในกลุ่มเดียวกันมีรูปแบบและโครงสร้างเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Bhat and Marar (2015) และ Patel et al. (2016) พบว่า รงควัตถุสีส้มจากแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. MKJ 997975 ที่คัดแยกจากดินในป่าของ Tungareshwar เป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Peridinin และ Pyrrohxanthin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($3-9\mu\text{g/ml}$) และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* และ *Proteus vulgaris*

จากนั้นคัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียไฮโซเลทในแต่ละกลุ่ม โดยพิจารณาจากเสถียรภาพในการสร้างรงควัตถุและการเจริญได้ดีของแบคทีเรีย ได้แก่ *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) *Salinicoccus* sp. (82-1) *Bacillus infantis* (63-11) *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ

Staphylococcus carnosus (48-10) โดยนำสารสกัดตรงควัตถุจากแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณที่แบคทีเรียไอโซเลทสร้างขึ้นด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อจำแนกชนิดและองค์ประกอบของสารที่พบ โดยมีสารไลโคปีน (lycopene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และลูทีน (lutein) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธีของ Siriamornpun et al. (2012) ซึ่งจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่พบในสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท พบว่า สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทมีปริมาณสารไลโคปีนมากที่สุด ตามด้วยลูทีน และพบเบต้าแคโรทีนในสารสกัดจากแบคทีเรียบางไอโซเลทดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 ปริมาณไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ที่พบในสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท

Group	Contents ($\mu\text{g/g}$)		
	Lycopene	Lutein	β -Carotene
1	4991.41 $\pm$ 40.40	17.54 $\pm$ 0.75	ND
2	852.13 $\pm$ 28.12	41.12 $\pm$ 1.03	ND
3	938.57 $\pm$ 5.39	6.50 $\pm$ 1.34	13.19 $\pm$ 0.56
4	2225.36 $\pm$ 63.84	124.83 $\pm$ 0.50	ND
5	496 $\pm$ 6.10	199.43 $\pm$ 4.78	ND



ภาพที่ 4.5 HPLC Chromatograms ของสารมาตรฐานไลโคปีน (lycopene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ลูทีน (lutein) และสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลทในแต่ละกลุ่ม ตามลำดับ โดย A คือ ไลโคปีน ($R_t = 2.070$) B คือ ลูทีน ($R_t = 2.225$) และ C คือ เบต้าแคโรทีน ($R_t = 3.580$)

4.2.4 การประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นของแบคทีเรียไฮโซเลท

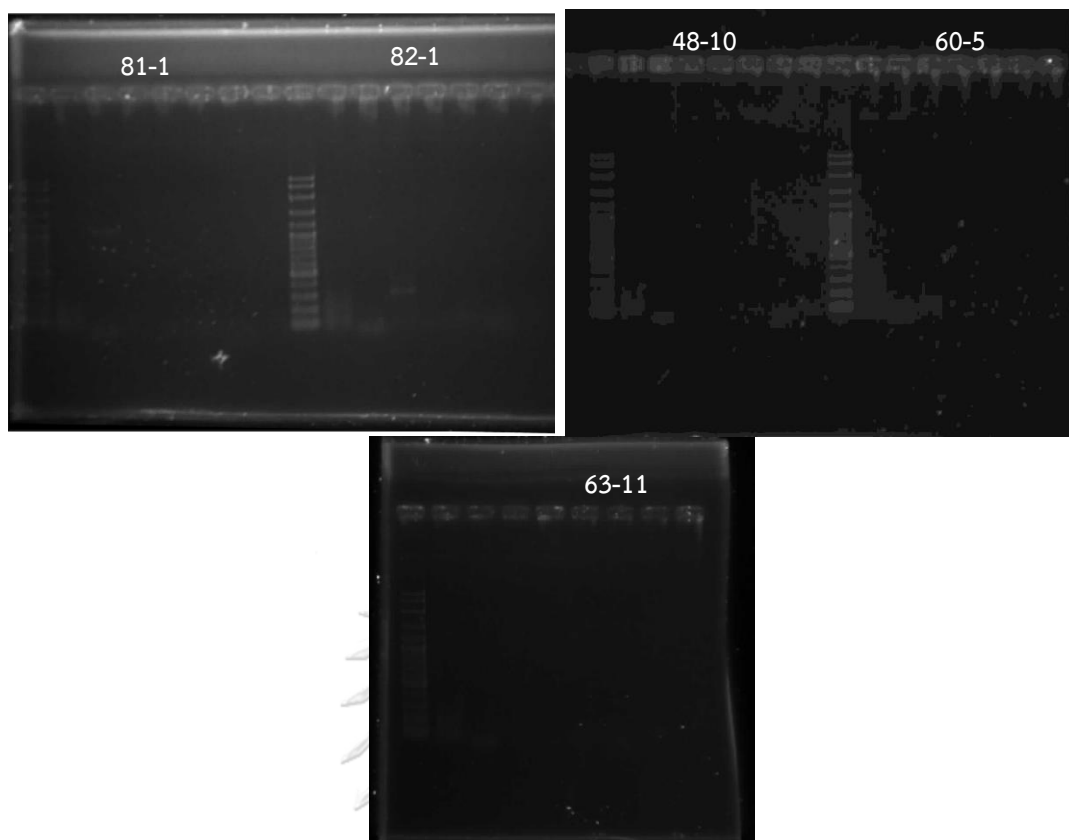
นอกจากการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไฮโซเลทตามข้อ 4.1.2 แล้ว การประเมินความปลอดภัยของแบคทีเรียไฮโซเลทก็เป็นหนึ่งขั้นตอนที่ช่วยให้ข้อมูลว่าแบคทีเรียไฮโซเลทที่นำมาศึกษานั้นมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ได้ โดยวิธีการประเมินความปลอดภัยของแบคทีเรียไฮโซเลทมักใช้การทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) และการทดสอบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) (Kesen & Aiyegoro, 2018)

ในขั้นตอนนี้จะประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลททั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) *Salinicoccus* sp. (82-1) *Bacillus infantis* (63-11) *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) ด้วยการทดสอบการมี ยีนไบโอจีนิก และทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง เพื่อให้มั่นใจว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่นำมาศึกษามี ความปลอดภัย และสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตตรงควัตถุสำหรับใช้เป็นสารให้สีทางเลือกในอาหาร

1) การทดสอบการมียีนไบโอจีนิก (Biogenic amine evaluation, BAs)

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic Amines, BAs) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจาก ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน (amino acids decarboxylation) ที่เร่งด้วย เอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น โดยอาหารที่มีแนวโน้มว่าจะพบสารไบโอจีนิกเอ มีนสูง ได้แก่ ปลา ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลา อาหารหมัก (ตัวอย่างเช่น เนื้อ นม และผัก) และ เครื่องดื่ม เช่น ไวน์ ไชเดอร์ และเบียร์ สารไบโอจีนิกเอมีนที่มักพบในอาหาร ได้แก่ ฮิสตา มิน (histamine) ไทรามิน (tyramine) พิวเทรสซีน (putrescine) คาร์ดาเวรีน (cadaverine) และฟีนิลเอทิลลามีน (β -phenylethylamine) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของ กรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine) ไทโรซีน (tyrosine) ออร์นิทีน (ornithine) ไลซีน (lysine) และฟีนิลอะลานีน (β -phenylalanine) ตามลำดับ หากได้รับสารดังกล่าวในปริมาณมากจะ ส่งผลต่อร่างกายของมนุษย์ เช่น เกิดอาการคลื่นไส้ (nausea) มีผลต่อการควบคุมความดัน เลือด (blood pressure changing) และการควบคุมการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร (intestinal problem) เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาสารไบ โอจีนิกเอมีนในอาหารผ่านการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารไบโอจีนิกเอมีน เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลลัพธ์อย่างรวดเร็วและเชื่อถือได้ (De Mey et al., 2012; Spano et al., 2010)

ขั้นตอนนี้เป็นการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารไบโอจีนิกเอมีนของตัวแทน แบคทีเรียไอโซเลททั้ง 5 สายพันธุ์ ด้วยการใช้การร่วมกันของ multiplex PCR ในการบ่ง บอกความปลอดภัยของแบคทีเรียไอโซเลทผ่านการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารไบ โอจีนิกเอมีน ได้แก่ ฮิสตามีน ไทรามิน และพิวเทรสซีนที่ไม่ปรากฏแถบ DNA ที่เฉพาะต่อยีน ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารไบโอจีนิกเอมีน ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และพบว่า ไม่มียีนที่ เกี่ยวข้องกับการผลิตสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวแทนแบคทีเรียไอโซเลททั้ง 5 สายพันธุ์

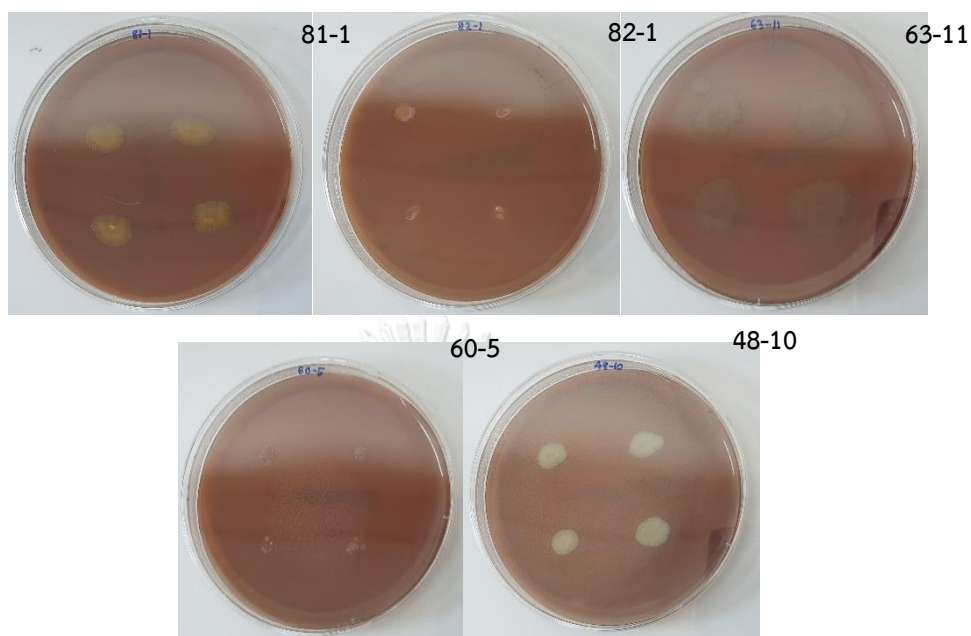


ภาพที่ 4.6 การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในแบคทีเรียโอโซเลทด้วยเทคนิค multiplex PCR

2) การทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

ฮีโมไลซิน (hemolysin) เป็นสารโมเลกุลหนึ่งที่มีความสามารถในการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell, RBCs) แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-ฮีโมไลซิน (α -hemolysin) และเบตา-ฮีโมไลซิน (β -hemolysin) โดยแอลฟา-ฮีโมไลซินจะเกิดการสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงบางส่วน (partial lysis of RBCs) ซึ่งส่งผลให้เกิดสีดาร์กโคโลนินบนอาหารวุ้นแข็ง Sheep Blood Agar (SBA) ในขณะที่เบตา-ฮีโมไลซินจะเป็นการสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (completely lysis of RBCs) ซึ่งทำให้เกิดโซนใสรอบโคโลนินบนอาหารวุ้นแข็ง SBA นอกจากนี้อาจพบแกมมา-ฮีโมไลซิน (γ -hemolysin) ที่แสดงถึงการไม่พบการเกิดการย่อยสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Mukry et al., 2010; Pisano et al., 2014; Vesper & Jo Vesper, 2004) จากการทดสอบการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของตัวแทนแบคทีเรียโอโซเลทด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง SBA พบว่า แบคทีเรียโอโซเลทไม่พบการสร้างสีดาร์กและโซนใสรอบโคโลนิน จึงจัดเป็นการทำลายเม็ดเลือดแดงชนิดแกมมา-ฮีโมไลซิน (γ -hemolysin) ดังแสดงในภาพที่ 4.7 ดังนั้นตัวแทนแบคทีเรียโอโซเลททั้ง 5 สายพันธุ์มีความ

ปลอดภัยเบื้องต้นและมีแนวโน้มที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารได้ โดยต้องนำไปประเมินความปลอดภัยตามข้อกำหนดทางกฎหมายอาหารและยาต่อไป



ภาพที่ 4.7 การสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงบนอาหารวุ้นแข็ง SBA ของตัวแทนแบคทีเรียโอโซเลท; *Halobacillus yeomjeoni* (81-1), *Salinicoccus* sp. (82-1), *Bacillus infantis* (63-11), *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) ตามลำดับ

4.3 การประเมินสถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียโอโซเลท

แบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง มีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง รวมไปถึงการสร้างสารคอมแพทิเบิลโซลูท (compatible solute) สารไบโอพอลิเมอร์ (biopolymers) และสารแคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Aljohny, 2015) ซึ่งความเข้มข้นของเกลือมีความสัมพันธ์ต่อการทำงานของเซลล์ ดังนั้นจึงศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียโอโซเลท

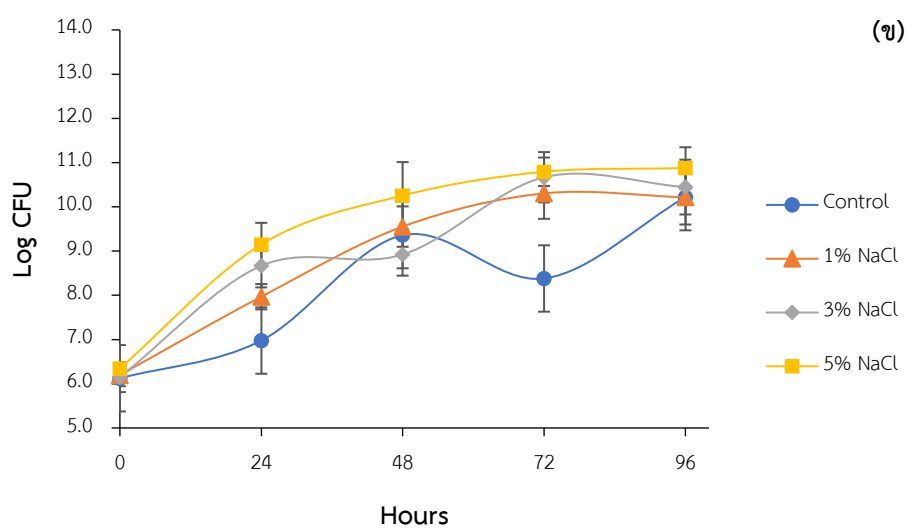
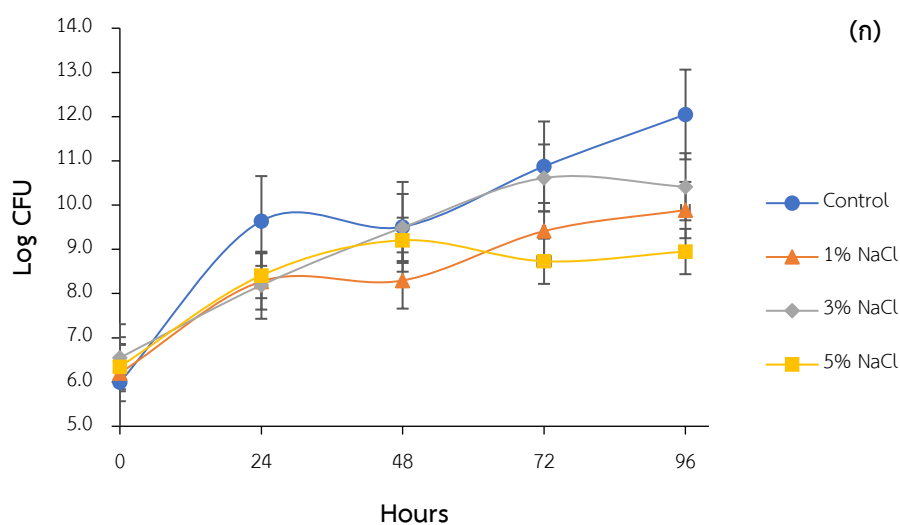
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอโซเลททั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) *Salinicoccus* sp. (82-1) *Bacillus infantis* (63-11) *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (nutrient broth, NB) โดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1%, 3% และ 5% (w/v) และมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวควบคุม ติดตามการเจริญของแบคทีเรียโอโซเลท พบว่า ทุกโอโซเลทมีการ

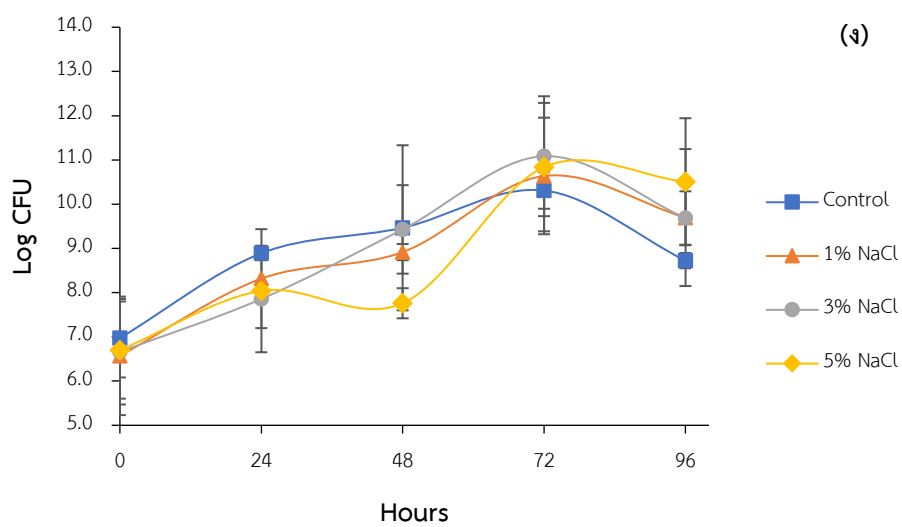
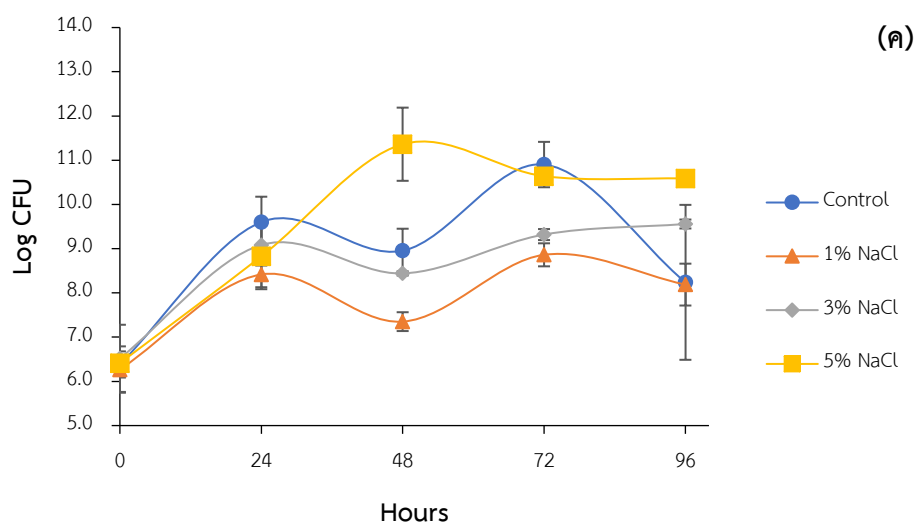
เจริญในระยะ log phase เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 10.88 ± 0.17 (log CFU) ในช่วงปลายของระยะ log phase ที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ *Salinicoccus* sp. (82-1) มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 10.79 ± 0.32 (log CFU) ที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% (w/v) เช่นเดียวกับ *Bacillus infantis* (63-11) ที่มีปริมาณเซลล์สูงสุด เท่ากับ 10.59 ± 0.16 (log CFU) ขณะที่ *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 11.08 ± 1.36 และ 12.16 ± 0.47 (log CFU) ตามลำดับ ที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) (ภาพที่ 4.8 ก-จ) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

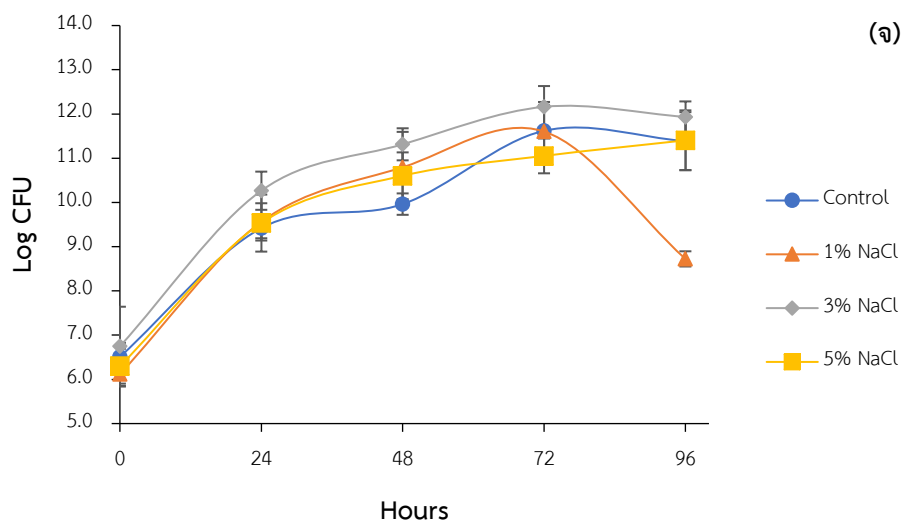
การสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียโอโซเลทเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยพบว่า *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) สร้างปริมาณรงควัตถุสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.864 ± 0.045 ที่ความยาวคลื่น 481 นาโนเมตร *Salinicoccus* sp. (82-1) สร้างปริมาณรงควัตถุสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.515 ± 0.015 ที่ความยาวคลื่น 509 นาโนเมตร *Bacillus infantis* (63-11) สร้างปริมาณรงควัตถุสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% (w/v) มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.035 ± 0.072 ที่ความยาวคลื่น 489 นาโนเมตร และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) สร้างปริมาณรงควัตถุสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% และ 3% (w/v) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.187 ± 0.010 และ 0.186 ± 0.010 ที่ความยาวคลื่น 483 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง ซึ่งมีเพียงโอโซเลท *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) เท่านั้นที่สร้างรงควัตถุสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.496 ± 0.055 ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.9 ก-จ)

จากการประเมินความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียโอโซเลท พบว่า *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) สามารถเจริญและสร้าง รงควัตถุได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ *Salinicoccus* sp. (82-1) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% และ 3% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ สำหรับการสร้างรงควัตถุ *Bacillus infantis* (63-11) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% และ 1% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ สำหรับการสร้างรงควัตถุ และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) สามารถเจริญและสร้างรงควัตถุได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) ขณะที่ *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) สามารถเจริญและสร้างรงควัตถุได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) และจากการประเมิน

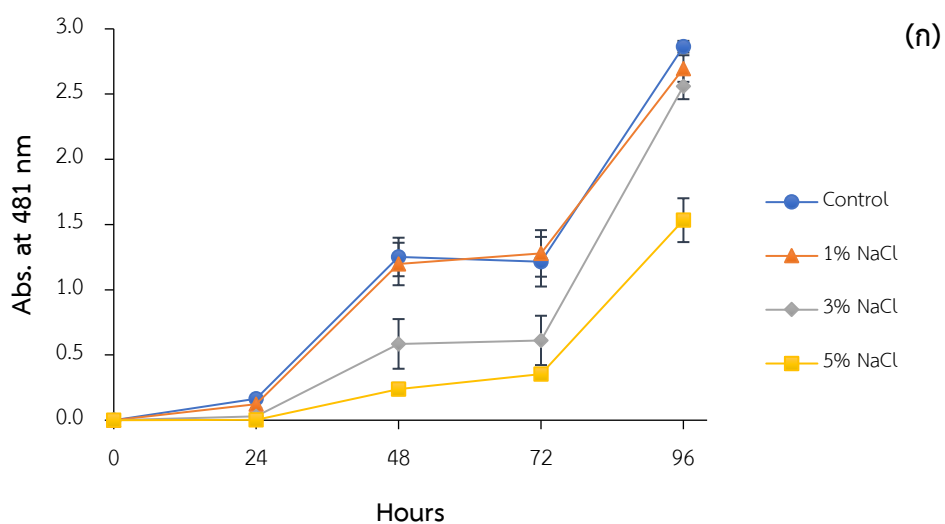
ประสิทธิภาพในการสร้างของรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) มีประสิทธิภาพในการสร้างรงควัตถุดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ และเลือกการเติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) มาใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำเพื่อผลิตรงควัตถุจากแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นสารให้สีในอาหาร เนื่องจากเป็นสภาวะที่แบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวมีการสร้างรงควัตถุสูงที่สุด ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% (w/v) จะให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุดก็ตาม

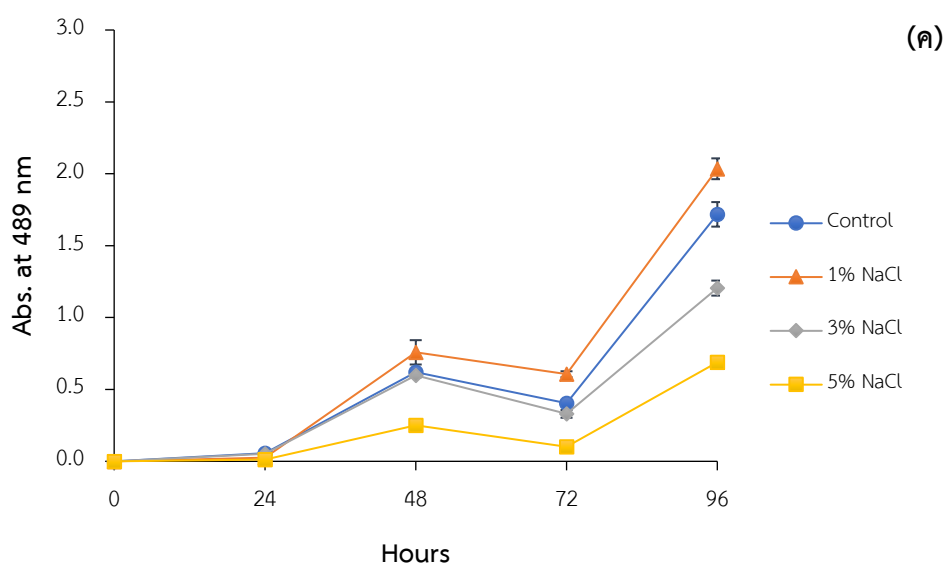
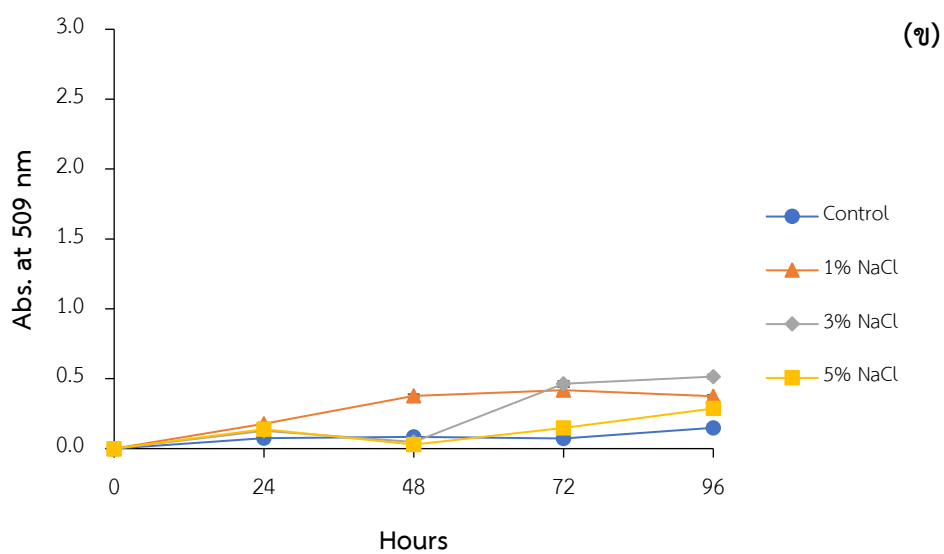


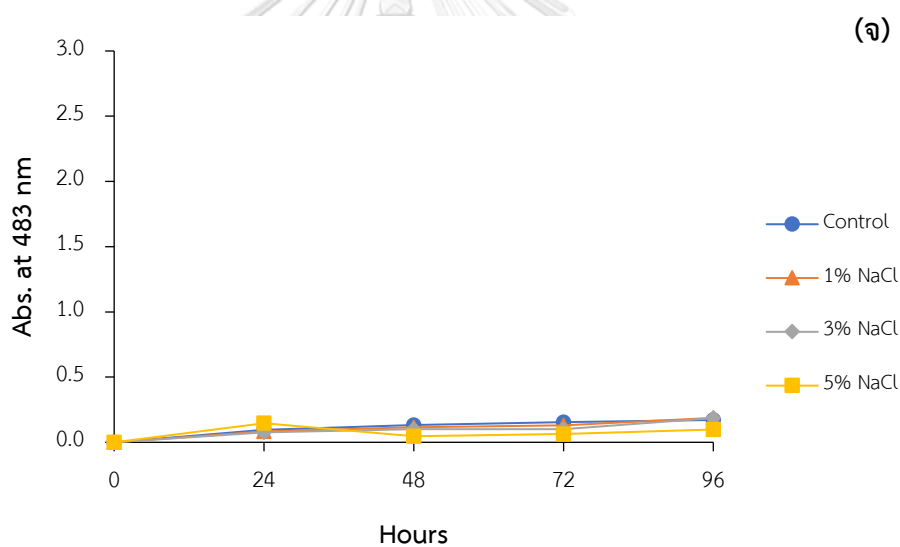
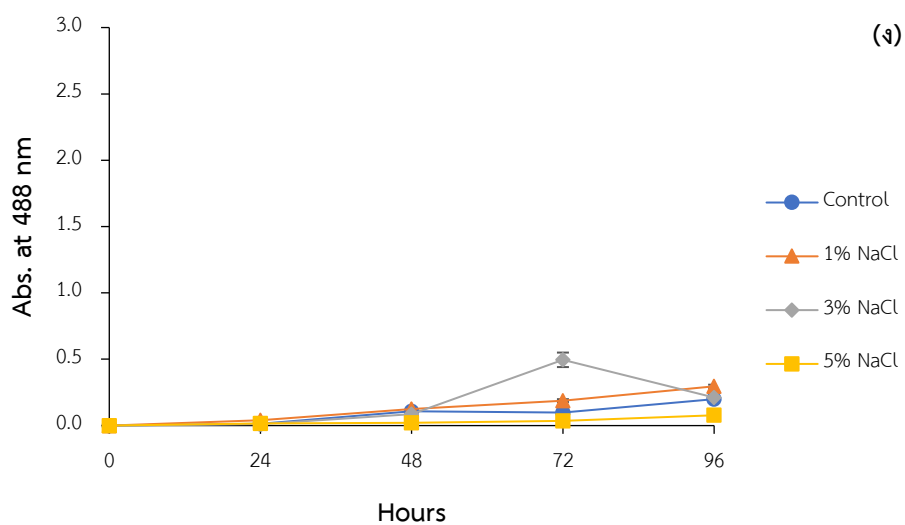




ภาพที่ 4.8 กราฟการเจริญของแบคทีเรียไฮโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (1%, 3% และ 5%, w/v) ของ (ก) *Halobacillus yeomjeoni* (81-1); (ข) *Salinicoccus* sp. (82-1); (ค) *Bacillus infantis* (63-11); (ง) *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ (จ) *Staphylococcus carnosus* (48-10)







ภาพที่ 4.9 การสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียไฮโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ (1%, 3% และ 5%, w/v) ของ (ก) *Halobacillus yeomjeoni* (81-1); (ข) *Salinicoccus* sp. (82-1); (ค) *Bacillus infantis* (63-11); (ง) *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ (จ) *Staphylococcus carnosus* (48-10)

4.4 การพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลทเพื่อสร้างรงควัตถุ

จากผลการประเมินความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียไฮโซเลทสามารถสร้างรงควัตถุได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v) ดังนั้นในการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียจึงต้องอาศัยคุณสมบัติ autochthonous ของแบคทีเรีย นั่นคือแบคทีเรียมีแหล่งกำเนิดหรือคัดแยกได้จากอาหารที่ต้องการพัฒนา เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความคุ้นเคยกับสารอาหาร สมบัติทางกายภาพและเคมี รวมถึงสภาวะของอาหารเหล่านั้น ทำให้เมื่อนำมาพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ แบคทีเรียจึงสามารถปรับตัวให้เจริญและผลิตรงควัตถุได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถลดความเสี่ยงในการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่ไม่ปลอดภัย (Chanprasartsuk & Prakitchaiwattana, 2015) จึงพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำโดยใช้น้ำเปปโตนเข้มข้น 1% (w/v) ในน้ำกลั่น ผสมกับน้ำปลาและซีอิ๊ว ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะของน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำปลาหรือซีอิ๊ว เนื่องจากในอุตสาหกรรมดังกล่าวจะเกิดของเสีย (waste) จากการทำความสะอาดเครื่องมือเป็นจำนวนมาก และยังเป็นแหล่งที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างรงควัตถุได้อีกด้วย จึงสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำทิ้งจากโรงงานและลดปริมาณของเสียจากโรงงานสู่สิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ

Medium base		Supplements	
		Fish sauce (%, v/v)	Soy sauce (%, v/v)
Peptone 1% (w/v)		1 (P1)	1 (S1)
		2 (P2)	2 (S2)
		Fish sauce based medium	Soy sauce based medium
		(P3)	(S3)
Distilled Water		1 (DF1)	1 (DS1)
		2 (DF2)	2 (DS2)
		Fish sauce based medium	Soy sauce based medium
		(DF3)	(DS3)
หมายเหตุ	P1	คือ	น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 1% (v/v)
	P2	คือ	น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 2% (v/v)
	P3	คือ	น้ำปลาเจือจางด้วยน้ำเปปโตน 1% (w/v) ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v)

S1	คือ	น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v)
S2	คือ	น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 2% (v/v)
S3	คือ	ซีอิ๊วเจือจางด้วยน้ำเปปโตน 1% (w/v) ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v)
DF1	คือ	น้ำกลั่นผสมกับน้ำปลา 1% (v/v)
DF2	คือ	น้ำกลั่นผสมกับน้ำปลา 2% (v/v)
DF3	คือ	น้ำปลาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v)
DS1	คือ	น้ำกลั่นผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v)
DS2	คือ	น้ำกลั่นผสมกับซีอิ๊ว 2% (v/v)
และ DS3	คือ	ซีอิ๊วที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v)

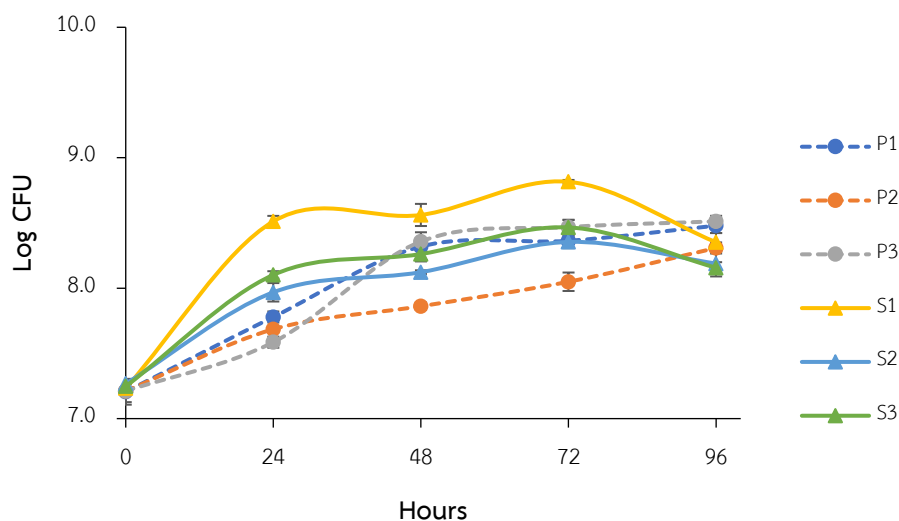
จากการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ โดยใช้แบคทีเรียไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้า เป็นตัวทดสอบชนิดของอาหารพบว่า ไอโซเลทดังกล่าวสามารถเจริญและสร้างรงควัตถุได้ในอาหารที่ใช้ น้ำเปปโตนเป็น medium base แต่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่ใช้ น้ำกลั่นเป็น medium based เนื่องจากเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย (Taylor et al., 1972) และพบการเจริญและสร้างรงควัตถุได้ดีในอาหารที่มาจากส่วนผสมน้ำเปปโตนที่เติมซีอิ๊ว 1% (v/v) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเกลือเป็น 3% (w/v) โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 8.82 ± 0.01 (log CFU) ซึ่งมีปริมาณเซลล์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) และพบว่าแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสั้นกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงต้นทุนต่ำมีปริมาณสารอาหารไม่มากเหมือนอาหารมาตรฐาน NB ทำให้การแบ่งตัวของแบคทีเรียลดลงและปริมาณรงควัตถุต่อกรัมเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่า หากจุลินทรีย์มีการแบ่งตัวลดลงหรือเข้าสู่ช่วง stationary phase ได้เร็วขึ้น จะทำให้เกิดการสร้างรงควัตถุเพิ่มขึ้นตามไปด้วย (ภาพที่ 4.10) และเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทอื่นๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าว พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทจากทุกกลุ่มสามารถเจริญได้ แต่มีปริมาณเซลล์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) และเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.11) จึงสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำที่ได้จากการผสมน้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v) สามารถใช้เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวได้

เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารดังกล่าวไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณรงควัตถุที่แบคทีเรียไอโซเลทสร้างขึ้นด้วยเทคนิค

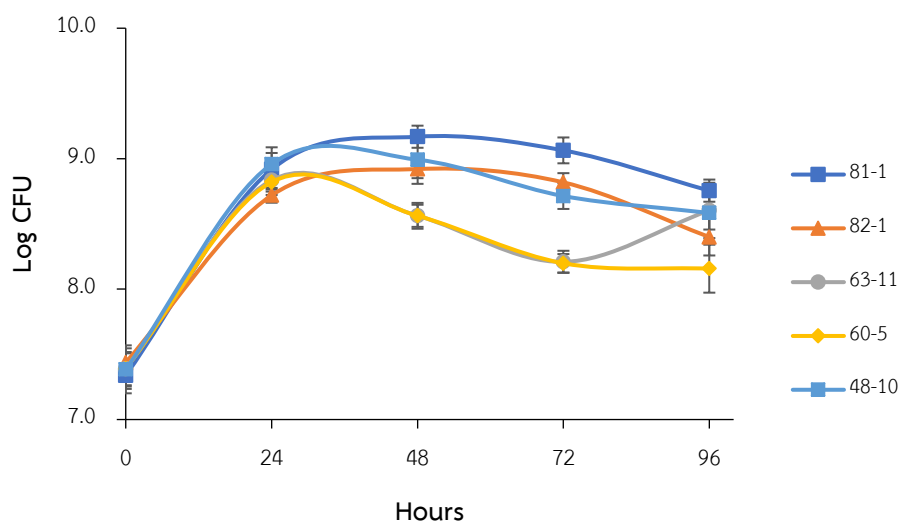
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อจำแนกชนิดและองค์ประกอบของสารที่พบโดยมีสารไลโคปีน (lycopene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และลูทีน (lutein) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธีของ Siriamornpun, Kaisoon, and Meeso (2012) ซึ่งจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่พบในสารสกัดจากแบคทีเรียโอโซเลท พบว่า ปริมาณสารไลโคปีน และลูทีน ที่พบในตัวอย่างเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวตรวจพบสารเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นในสารสกัดจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำสูตร P1 จากเดิมที่ไม่พบในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 4.8 เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำที่พัฒนาขึ้น มีปริมาณสารอาหารไม่มากเท่าอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทำให้แบคทีเรียเกิดการสร้างรงควัตถุเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4.8 ปริมาณไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) และเบต้าแคโรทีน (β -carotene) ที่พบในสารสกัดจากแบคทีเรียโอโซเลทที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ

Media	Contents ($\mu\text{g/g}$)		
	Lycopene	Lutein	β -Carotene
S1	5731.08 $\pm$ 133.52	1331.72 $\pm$ 30.74	ND
P1	6363.34 $\pm$ 117.09	1477.26 $\pm$ 26.96	42.19 $\pm$ 0.04
P2	6240.28 $\pm$ 114.12	1448.94 $\pm$ 26.28	ND
NB-3	852.13 $\pm$ 28.12	41.12 $\pm$ 1.03	ND
หมายเหตุ	S1	คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v)	
	P1	คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 1% (v/v)	
	P2	คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 2% (v/v)	
	NB-3	คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v)	



ภาพที่ 4.10 การเจริญของแบคทีเรียไฮโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) ในอาหารต้นทุนต่ำสูตรต่างๆ เมื่อ P1 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 1% (v/v); P2 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับน้ำปลา 2% (v/v); P3 คือ น้ำปลาที่เจือจางด้วยน้ำเปปโตน 1% (w/v) ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v); S1 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v); S2 คือ น้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 2% (v/v) และ S3 คือ ซีอิ๊วที่เจือจางด้วยน้ำเปปโตน 1% (w/v) ให้มีความเข้มข้นเกลือ 3% (w/v)



ภาพที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรียไฮโซเลทแต่ละกลุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v)

จากผลการวิจัยทั้งหมดพบว่าไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารต้นทุนต่ำภายใต้สภาวะที่ไม่ต้องควบคุมอย่างจำเพาะมากนัก บ่งชี้ว่าไอโซเลทดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาเป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตตรงควัตถุสำหรับผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ในอาหารด้วยกรรมวิธีง่ายๆ ได้ จึงได้นำไอโซเลทดังกล่าวไปประเมินความปลอดภัยตามข้อกำหนดทางกฎหมายอาหารและยา อ้างอิงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 376) พ.ศ. 2559 เรื่อง อาหารใหม่ (Novel food) โดยการประเมินความปลอดภัยด้านการสร้างสารพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ของแบคทีเรียไอโซเลทด้วยการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. (82-1) ต่อเซลล์ไลน์ Baby hamster kidney (BHK-21), Mouse connective tissue fibroblast (L-929) และ Human hepatocyte (HepG2) โดยการประเมินความอยู่รอดของเซลล์หลังจากทดสอบกับสารสกัดด้วยวิธี MTT ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อเปลี่ยนสาร MTT ให้เป็นผลึก formazan และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีชีวิตที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร พบว่า สารสกัดจากแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. (82-1) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Baby hamster kidney (BNK-21) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.53% (Doxorubicin, positive control = 3.116 $\mu\text{g/mL}$), Mouse connective tissue fibroblast (L-929) โดยมีค่า $IC_{50} > 1500 \mu\text{g/mL}$ (Doxorubicin = 2.1 $\mu\text{g/mL}$) และ Human hepatocyte (Hep-G2) โดยมีค่า $IC_{50} > 1500 \mu\text{g/mL}$ (Doxorubicin, positive control = 1.6 $\mu\text{g/mL}$) (แสดงผลเพิ่มเติมในภาคผนวก ฉ)

นอกจากนี้ยังตรวจหาการมียีนก่อโรค (virulence gene screening) และยีนต้านยาปฏิชีวนะ (antimicrobial resistance genes) ของไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) ด้วยเทคนิค Whole Genome Sequencing (WGS) โดยเทียบผล WGS กับโปรแกรม VirulenceFinder เพื่อหาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (ตารางที่ 4.8) พบว่า ไอโซเลทดังกล่าวไม่พบยีนก่อโรคในมนุษย์ และไม่พบการต้านยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 4.9) จากการทดสอบดังกล่าวบ่งชี้ว่า *Salinicoccus* sp. (82-1) มีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นแหล่งผลิตตรงควัตถุเพื่อพัฒนาเป็นสารให้สีทางเลือกในอุตสาหกรรมอาหารต่อไปได้

ตารางที่ 4.9 การมียีนก่อโรค (Virulence gene) ของไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1)

Probability of being a human pathogen	0.483
Matched Pathogenic Families	1
Matched Not Pathogenic Families	2

ตารางที่ 4.10 Acquired antimicrobial resistance gene results

Resistance gene	Hits
rifampicin	Not found
oxazolidinone	Not found
nitroimidazole	Not found
fosfomycin	Not found
macrolide	Not found
tetracycline	Not found
glycopeptide	Not found
phenicol	Not found
trimethoprim	Not found
quinolone	Not found
beta-lactam	Not found
colistin	Not found
fusidicacid	Not found
sulphonamide	Not found
aminoglycoside	Not found

Input Sequence	4_113 # 97658 # 97936 # -1 # ID=4_113;partial=00;start_type=ATG;rbs_motif=AGGAGG;rbs_spacer=5-10bp;gc_cont=0.419						
	PROJECT ID	ACCESSION ID	ORGANISMS	CLASS	PROTEIN FUNCTION	PROTEIN ID	IDENTITY
Matched Family	17153	CP000407	Streptococcus suis 05ZYH33, complete genome.	Lactobacillales	SSU ribosomal protein S19P	ABP89047	82.61

Input Sequence	3_170 # 187667 # 187909 # -1 # ID=3_170;partial=00;start_type=ATG;rbs_motif=AGGAG;rbs_spacer=5-10bp;gc_cont=0.481						
	PROJECT ID	ACCESSION ID	ORGANISMS	CLASS	PROTEIN FUNCTION	PROTEIN ID	IDENTITY
Matched Family	76	AL009126	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 complete genome.	Bacillales	putative iron- sulfur scaffold protein	CAB15212	87.5

Input Sequence	4_95 # 89074 # 89187 # -1 # ID=4_95;partial=00;start_type=ATG;rbs_motif=AGGAGG;rbs_spacer=5-10bp;gc_cont=0.377						
	PROJECT ID	ACCESSION ID	ORGANISMS	CLASS	PROTEIN FUNCTION	PROTEIN ID	IDENTITY
Matched Family	13466	CP000679	Caldicellulosiruptor saccharolyticus DSM 8903, complete genome.	Clostridia	ribosomal protein L36	ABP67841	89.19

ภาพที่ 4.12 Pathogenic genes matching results

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุจากอาหารหมักที่มีเกลือ ได้แก่ ปลาาร้า และ ซีอิ้ว พบแบคทีเรียที่สร้างรงควัตถุชนิดสีเหลือง ส้ม แดง ชมพู ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท พบความสอดคล้องของสมบัติการสร้างรงควัตถุที่สัมพันธ์กับกลุ่มไอโซเลทเมื่อทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค phylogenetic analysis กล่าวคือ ไอโซเลทในกลุ่มสปีชีส์เดียวกัน แสดงสมบัติการสร้างรงควัตถุชนิดเดียวกัน

เมื่อศึกษาลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรีย พบว่า สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของทุกไอโซเลทในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะคล้ายกัน และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR รงควัตถุจากแบคทีเรียไอโซเลทในกลุ่มเดียวกัน มี IR spectrum ใกล้เคียงกัน มีความใกล้เคียงกับสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) จึงคัดเลือกตัวแทนไอโซเลทจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ *Halobacillus yeomjeoni* (81-1) *Salinicoccus* sp. (82-1) *Bacillus infantis* (63-11) *Bacillus amyloliquefaciens* (60-5) และ *Staphylococcus carnosus* (48-10) ไปวิเคราะห์รงควัตถุด้วยเทคนิค HPLC พบว่า รงควัตถุจากทุกไอโซเลทมีปริมาณไลโคปีน (lycopene) มากที่สุด ตามด้วยลูทีน (lutein) และพบเบต้า-แคโรทีน (β -carotene) ในรงควัตถุของไอโซเลท *Bacillus infantis* (63-11)

การตรวจสอบความปลอดภัยของแบคทีเรียไอโซเลทสำหรับพัฒนาเป็นแหล่งผลิตรงควัตถุเพื่อใช้เป็นสารให้สีในอาหาร ในเรื่องของการก่อโรคมะเร็งและความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ก่อโรค โดยทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) และการสร้างสารก่อภูมิแพ้โดยการตรวจสอบการมี Biogenic amine gene ในการสร้างสารฮิสตามีน (histamine) ไทรามิน (Tyramine) และพิวเทรสซีน (Putrescine) ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (JV16HC/JV17HC, HDC3/HDC4, TD2/TD5, TDC1/TDC2, TDC-F/TDC-R, PUT1-F/PUT1-R และ PUT2-F/PUT2-R) พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทไม่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ก่อโรค และไม่มียีนสร้างสารก่อภูมิแพ้ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด Baby hamster kidney cell line, (BHK-21), Mouse connective tissue fibroblast (L-929) และ Human hepatocyte cell line (Hep-G2) ของสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท *Salinicoccus* sp. (82-1) พบว่าไม่เป็นพิษกับเซลล์ ดังแสดงในภาคผนวก ข

เมื่อนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย พบว่า ปริมาณเกลือเข้มข้น 3% (w/v) เป็นสภาวะที่แบคทีเรียไอโซเลทสร้างรงควัตถุสูงสุด ยกเว้น *Bacillus infantis* (1% NaCl, w/v) และเมื่อนำสภาวะดังกล่าวไปพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ พบว่าการใช้

สารละลายเปปโตน 1% (w/v) ร่วมกับซีอิ้ว 1% (v/v) แล้วปรับความเข้มข้นเกลือสุดท้ายเป็น 3% (w/v) เป็นสูตรอาหารต้นทุนต่ำที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยง *Salinococcus* sp. (82-1) เพื่อผลิตสารให้สีจากแบคทีเรียต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบสภาวะที่ใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ และการเพิ่มปริมาณของรงควัตถุที่ได้ ประกอบกับการประเมินความปลอดภัยตามข้อกำหนดทางกฎหมายอาหารและยา พบว่า ไอโซเลท *Salinococcus* sp. (82-1) มีศักยภาพในการเป็น commercial/industrial strain จึงสามารถนำไอโซเลทดังกล่าวไปให้เป็นแหล่งผลิตสารสีชมพู เพื่อใช้เป็นสารให้สีในอาหารต่อไปได้ ทั้งนี้การประเมินเพื่อขยายขนาดในการผลิต (scale-up) และการประยุกต์ใช้สารสีดังกล่าวในอาหารเป็นสิ่งที่ยังต้องมีการศึกษาต่อไป



บรรณานุกรม

- Ahmad, W. A., Ahmad, W. Y. W., Zakaria, Z. A., & Yusof, N. Z. (2012). *Application of Bacterial Pigments as Colorant- The Malaysian Perspective*.
- Aljohny, B. (2015). Halophilic Bacterium - A Review of New Studies. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 12(3), 2061-2069. doi:10.13005/bbra/1874
- Bhat, M. R., & Marar, T. (2015). Media Optimization, Extraction and Partial Characterization of an Orange Pigment from *Salinicoccus* sp. MKJ 997975. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 4, 85-89.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Calegari-Santos, R., Diogo, R. A., Fontana, J. D., & Bonfim, T. M. B. (2016). Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions. *Current Microbiology*, 72(5), 641-651. doi:10.1007/s00284-015-0974-8
- Chaikulsareewath, A., Chooprom, C., & Mana, A. (2015). Screening of Protease Producing Halophilic Bacteria from Fermented Fish (Pla-ra). *Journal of Food Technology, Siam University*, 10(1).
- Chanprasartsuk, O.-o., & Prakitchaiwattana, C. (2015). Impacts of Allochthonous and Autochthonous Yeast Strains: Case Studies in Fruit Wine Fermentations. In E. Perkins (Ed.), *FOOD MICROBIOLOGY FUNDAMENTALS, CHALLENGES AND HEALTH IMPLICATIONS* (pp. 117).
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., . . . Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8), 1078-1085. doi:10.1016/j.fm.2010.07.012
- Daharmaraj, R., & Rajendren, V. (2014). Probiotic assessment of *Bacillus infantis* isolated from gastrointestinal tract of *Labeo rohita*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(7), 1-6.

- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *KUWAIT MEDICAL JOURNAL*, 41(2), 117-122.
- De Mey, E., Drabik-Markiewicz, G., De Maere, H., Peeters, M. C., Derdelinckx, G., Paelinck, H., & Kowalska, T. (2012). Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 130(4), 1017-1023. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.124>
- Dufossé, L. (2006). Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 313-321.
- Dufossé, L. (2017a). Current Carotenoid Production using Microorganisms. 87-106.
- Dufossé, L. (2017b). Pigments, Microbial ☆. In *Reference Module in Life Sciences*.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406. doi:10.1016/j.tifs.2005.02.006
- Hannibal, L., Lorquin, J., Ortoli, N. A., Garcia, N., Chaintreuil, C., Masson-Boivin, C., . . . Giraud, E. (2000). Isolation and Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic Bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3850. doi:10.1128/JB.182.13.3850-3853.2000
- Heer, K., & Sharma, S. (2017). Microbial Pigments as a Natural Color- A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(5), 1913-1922. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.8
- Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A., & Bhushan, S. (2003). Microbial Pigments. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 362-369.
- Jung, W. Y., Lee, H. J., & Jeon, C. O. (2016). *Halomonas garicola* sp. nov., isolated from saeu-jeot, a Korean salted and fermented shrimp sauce. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 66(2), 731-737. doi:10.1099/ijsem.0.000784

- Kesen, M. A., & Aiyegoro, O. A. (2018). Beneficial Characteristics and Evaluation Criteria of Probiotics. *International Journal of Food and Bioscience*, 1(1), 23-33.
- Khaneja, R., Perez-Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., . . . Cutting, S. M. (2010). Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 1889-1902. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x
- Kharangate-Lad, A., & Bhosle, S. (2016). Studies on Siderophore and Pigment Produced by an Adhered Bacterial Strain *Halobacillus trueperi* MXM-16 from the Mangrove Ecosystem of Goa, India. *Indian Journal of Microbiology*, 56(4), 461-466. doi:10.1007/s12088-016-0591-7
- Kirishna, S., Kumar, B. S., Singaracharya, M. A., & Prakasham, R. S. (2014). Process Optimization of Red Pigment production from *Vibrio* sp Isolated from Marine Source. *Octa Journal of Biosciences*, 2(2), 79-85.
- Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dewivedi, S., & Kumar, M. (2015). Microbial Pigments: Production and Applications in Various Industries. *International Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences*, 5(1), 203-212.
- Landete, J. M., De Las Rivas, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 258-269. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001
- Lee, A., Cheng, K. C., & Liu, J. R. (2017). Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. *PLoS One*, 12(8), e0182220. doi:10.1371/journal.pone.0182220
- Li, F., Xue, F., & Yu, X. (2017). GC-MS, FTIR and Raman Analysis of Antioxidant Components of Red Pigments from *Stemphylium lycopersici*. *Current Microbiology*, 74(4), 532-539. doi:10.1007/s00284-017-1220-3
- Li, L., Wen, X., Wen, Z., Chen, S., Wang, L., & Wei, X. (2018). Evaluation of the Biogenic Amines Formation and Degradation Abilities of *Lactobacillus curvatus* From Chinese Bacon. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01015
- Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial Pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), 361-365.

- Mohana, D. C., Thippeswamy, S., & Abhishek, R. U. (2013). Antioxidant, antimicrobial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment*, 36(4), 168-174.
- Mukry, S. N., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2010). Screening and Partial Characterization of Hemolysins from *Bacillus* sp. strain S12 & S144 are Hemolysins B (HBL) Producers. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 463-472.
- Müller, A., Reichhardt, R., Fogarassy, G., Bosse, R., Gibis, M., Weiss, J., Weiss, A. (2016). Safety assessment of selected *Staphylococcus carnosus* strains with regard to their application as meat starter culture. *Food Control*, 66, 93-99.
doi:10.1016/j.foodcont.2016.01.042
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2010). Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 728-760.
doi:10.1080/10408398.2010.499811
- Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W. J. (2017). Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1113.
doi:10.3389/fmicb.2017.01113
- Nigam, P. S., & Luke, J. S. (2016). Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, 93-100.
doi:10.1016/j.cofs.2016.02.004
- Pankaj, V. P., & Kumar, R. (2016). 4. Microbial pigment as a potential natural colorant for contributing to mankind. *Research Trends in Molecular Biology*, 85-98.
- Patel, B., Marar, T., & Bhat, M. (2016). Study of Biological Activities and Characterization of the Cruude Orange Pigment isolated from A Distinct *Salinicoccus* sp. MKJ997975. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 2(5), 58-61.
- Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., . . . Cosentino, S. (2014). Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. *BioMed Research International*, 2014, 1-9. doi:10.1155/2014/286390
- Ramachandran, H., Iqbal, M. A., & Amirul, A. A. (2014). Identification and characterization of the yellow pigment synthesized by *Cupriavidus* sp. USMAHM13. *Applied*

Biochemistry and Biotechnology, 174(2), 461-470. doi:10.1007/s12010-014-1080-2

Richa Jain, Nitish Sharma, Heeralal Choudhary, Ankit Chokiwal, & Singh, A. (2015).

Screening for Potential Carotogenic Producing Bacteria from Soils of Arid Region of Rajasthan. *International Journal of Research Methodology*, 1(2), 1-7.

Sandvik, O., & Brown, R. W. (1964). Spectrophotometric Characterization of Pigments Produced by *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Bovine Udders. *Journal of Bacteriology*, 89(5), 1201-1208.

Sangjindavong, M., Chuapoehuk, P., Runglerdkriangkrai, J., Klaypradit, W., & Vareevanich, D. (2008). Fermented Fish Product (Pla-ra) from Marine Fish and Preservation. *Kasetsart Journal Natural Science*, 42, 129-136.

Sen, T., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2019). Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward. *Frontiers in Nutrition*, 6. doi:10.3389/fnut.2019.00007

Siriamornpun, S., Kaisoon, O., & Meeso, N. (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 757-766. doi:10.1016/j.jff.2012.05.002

Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., . . . Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(S3), S95-S100. doi:10.1038/ejcn.2010.218

Suwunna, P. (2008). *A Study on the Effect of Sodium Chloride on Fermentation Process of Soy Sauce from Pigeon Pea and Soybean*. (the Master of Education degree in Chemistry). Srinakharinwirot University,

Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M., & Komagata, K. (1991).

Identification of *Staphylococcus carnosus* strains from fermented fish and soy sauce mash. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(6), 479-494. doi:10.2323/jgam.37.479

- Tanasupawat, S., Namwong, S., Kudo, T., & Itoh, T. (2009). Identification of Halophilic Bacteria from Fish Sauce (Nam-Pla) in Thailand. *JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS*, 6, 69-75.
- Taylor, W. G., Dworkin, R. A., Pumper, R. W., & Evans, V. J. (1972). Biological efficacy of several commercially available peptones for mammalian cells in culture. *Experimental Cell Research*, 74(1), 275-279. doi:[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90505-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90505-8)
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., & Sharma, A. K. (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4669-4678. doi:10.1007/s13197-014-1601-6
- Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y. J., Hua, Y., & Yongsawatdigul, J. (2011). Use of *Tetragenococcus halophilus* as a Starter Culture for Flavor Improvement in Fish Sauce Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8401-8408. doi:10.1021/jf201953v
- Usman, H. M., Farouq, A. A., Baki, A. S., Abdulkadir, N., & Mustapha, G. (2018). Production and characterization of orange pigment produced by Halophilic bacterium *Salinococcus roseus* isolated from Abattoir soil. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 6(6), 238-243. doi:10.15406/jmen.2018.06.00222
- Venil, C. K., Aruldass, C. A., Abd Halim, M. H., Khasim, A. R., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2015). Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM 5 and its application in food model systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 324-329. doi:10.1016/j.ibiod.2015.02.006
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.006
- Vesper, S. J., & Jo Vesper, M. (2004). Possible Role of Fungal Hemolysins in Sick Building Syndrome. In (pp. 191-213): Elsevier.
- Vora, J. U., Jain, N. K., & Modi, H. A. (2014). Extraction, Characterization and Application studies of red pigment of halophilic *Serratia marcescens* KH1R KM035849 isolated from Kharaghoda soil. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(6), 160-168.

- Vora, J. U., Jain, N. K., & Modi, H. A. (2015). Identification and characterization of pigment producing strain *Kocuria* KM243757 & JO1 KM216829 from Kharaghoda soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(9), 850-859.
- Yachai, M., Tanasupawat, S., Itoh, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Valyasevi, R. (2008). *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 58(9), 2136-2140. doi:10.1099/ijs.0.65592-0
- Yangilar, F., & Yildiz, P. O. (2016). Microbial Pigments and the Important for Food Industry. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2). doi:10.18185/eufbed.55880





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลทด้วยวิธีอณูจุลชีววิทยา

การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลทด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16s DNA/RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ดัดแปลงจากวิธีของ Vora et al. (2014)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler, BIO-RAD T100™, Singapore)
- GF1 clean kit (Vivantis, Malaysia)

สารเคมี

- Buffer (Vivantis, Malaysia)
- DNA Tag polymerase (Vivantis, Malaysia)
- dNTPs (Vivantis, Malaysia)
- Ethidium Bromide (AppliChem, Spain)
- Laddar (Vivantis, Malaysia)
- Magnesium Chloride ($MgCl_2$)
- PCR water

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท ดัดแปลงจากวิธีของ Dashti et al. (2009)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทในอาหารที่มีเกลือ 3% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำคัลเจอร์ (culture) ปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้ง และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ขั้นถัดไป

การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA ด้วยวิธี PCR ตามสภาวะในตารางที่ ก.1 โดยนำ DNA มา 20 ng สำหรับทำ PCR reaction 50 μ L ตามตารางที่ ก.2 ซึ่งในการทำ PCR ใช้ไพร

เมอร์ 357F (5'-CTC CTA CGG GAG GCA GC AG-3') และ 517R (5'ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วย agarose gel (2%, w/v) Electrophoresis

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยรีเอเจนต์ดังนี้

1x taq buffer with KCl, 0.1 mM dNTPs, 0.1 μ M forward และ reverse primer, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 U taq DNA polymerase, DNA template 20 ng และ Water, nuclease-free

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่ง PCR amplicon ไปวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศสิงคโปร์ และวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BLAST ของ 16s ribosomal RNA sequences database ของ the NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.gov/>).

จัดทำ culture collection ของสายพันธุ์จุลินทรีย์

เก็บรักษาเชื้อใน glycerol stock โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือ 3% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำคัลเจอร์ปริมาตร 0.5 mL ผสมกับ 100% glycerol ปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่ -40 องศาเซลเซียส จัดทำบัญชีจุลินทรีย์พร้อมข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก (รายการ Accession number)

ตารางที่ ก.1 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

	STEP	TEMPERATURE	TIME	CYCLE
1	Initial denaturation	94°C	2 mins	-
2	Denaturation	94°C	30 sec	-
3	Annealing	55°C	30 sec	-
4	Extension	72°C	30 sec	-
5	Go to step 2 to 4			35
6	Final extension	72°C	7 min	-

ภาคผนวก ข

การสกัดรงควัตถุจากแบคทีเรียไฮโซเลท

ดัดแปลงจากวิธีของ Khaneja et al. (2010)

เครื่องมือและอุปกรณ์

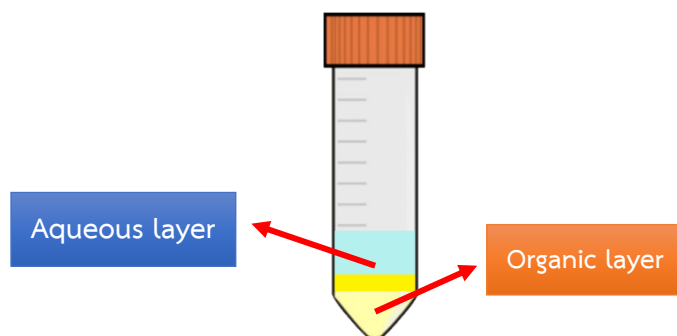
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge, KUBOTA 5310, Japan)
- เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Sonicator, Bandelin, Sonorex digitec, Germany)

สารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์
- เมทานอล (Methanol)
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform)

วิธีการ

- 1) นำเซลล์แบคทีเรียไฮโซเลทที่ผ่านการแช่แข็ง (200 mg) มาต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที
- 2) เติม 1M NaOH ลงไป 500 μL
- 3) นำไป sonicated ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 15 นาที เพื่อกำจัดโซเดียมไฮดรอกไซด์
- 5) เติมเมทานอล (250 μL) คลอโรฟอร์ม (500 μL) และน้ำกลั่น (250 μL) ผสมให้เข้ากัน
- 6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg นาน 15 นาที เพื่อทำให้เกิดการแยกชั้น (ภาพที่ ข.1)
- 7) เก็บส่วนล่าง (organic layer) ไปกำจัดสารละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ขณะที่สกัดส่วนบน (aqueous layer) อีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม จนกระทั่งไม่มีสี
- 8) เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์



ภาพที่ ข. การแยกชั้นหลังการปั่นเหวี่ยง (phase separation)

ภาคผนวก ค

การทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ค.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)

ด้วยเทคนิค Disc diffusion ตามวิธีของ D. Mohana et al. (2013)

อาหารเลี้ยงเชื้อ:

- Mueller-Hinton Agar (MHA)
- Mueller-Hinton broth (MHB)

จุลินทรีย์ก่อโรค:

- *Staphylococcus aureus* ATTC 210519
- *Bacillus cereus* ATCC 6637
- *Escherichia coli* ATCC 25922

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ:

- 1) เชื้อโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) นำเชื้อจากข้อ 1) มาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย 10^8 CFU/mL ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปวัดความขุ่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ
- 3) ใช้ด้ามสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื้อจากข้อ 2) ขึ้นมา swab ให้ทั่ว agar และตั้งทิ้งไว้ไม่ให้ขึ้น (ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง)
- 4) ใช้ forceps คีบกระดาษวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้วกดเบาๆ มาวางในตำแหน่งที่กำหนดไว้
- 5) หยดตัวอย่างที่จะทดสอบใส่ลงแผ่นกระดาษกรอง (ประมาณ 20 ไมโครลิตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร

ค.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Brand-Williams et al. (1995)

สารเคมี

- Methanol 99.9%
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Ascorbic acid

การเตรียมสาร

- DPPH solution เข้มข้น 0.025 mg/mL (0.0634 mM): ชั่ง DPPH 0.0025 g ละลายด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL
- สารมาตรฐาน Ascorbic acid เข้มข้น 1 mg/mL: ชั่ง Ascorbic acid 0.010 g ละลายด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL เจือจางสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (ปริมาตร 1 mL) ดังตาราง

CONC. (MG/ML)	STOCK SOLUTION (μL)	METHANOL (μL)
0.00	0	1000
0.05	50	950
0.10	100	900
0.15	150	850
0.20	200	800
0.25	250	750
0.30	300	700
0.35	350	650
0.40	400	600

- ตัวอย่างสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท (crude pigment extract) เข้มข้น 50 mg/mL

วิธีการ

- Blank: Methanol
- A_{Control} : DPPH solution (ไม่มีตัวอย่าง) = 5 mL DPPH Solution + 0.5 mL Methanol
- 1) A_{test} : นำสารสกัด 0.5 mL ผสมกับ 5 mL DPPH solution, ผสมด้วย Vortex 20 วินาที
- 2) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

การคำนวณ

$$\text{Inhibition (\% of DPPH)} = \frac{(A.\text{control} - A.\text{test})}{A.\text{control}} \times 100$$

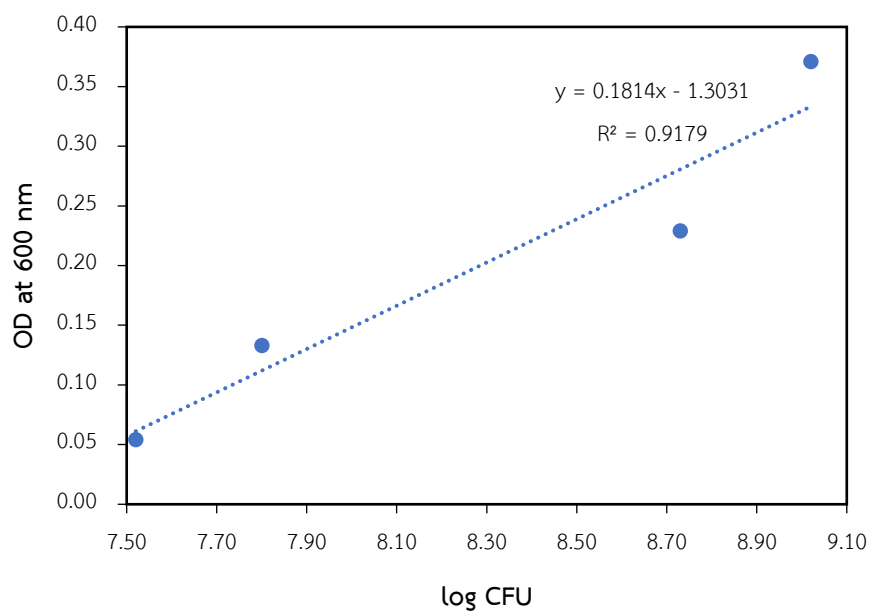
เมื่อ A_{Control} คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH solution (ไม่มีตัวอย่าง)

A_{test} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง



ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท



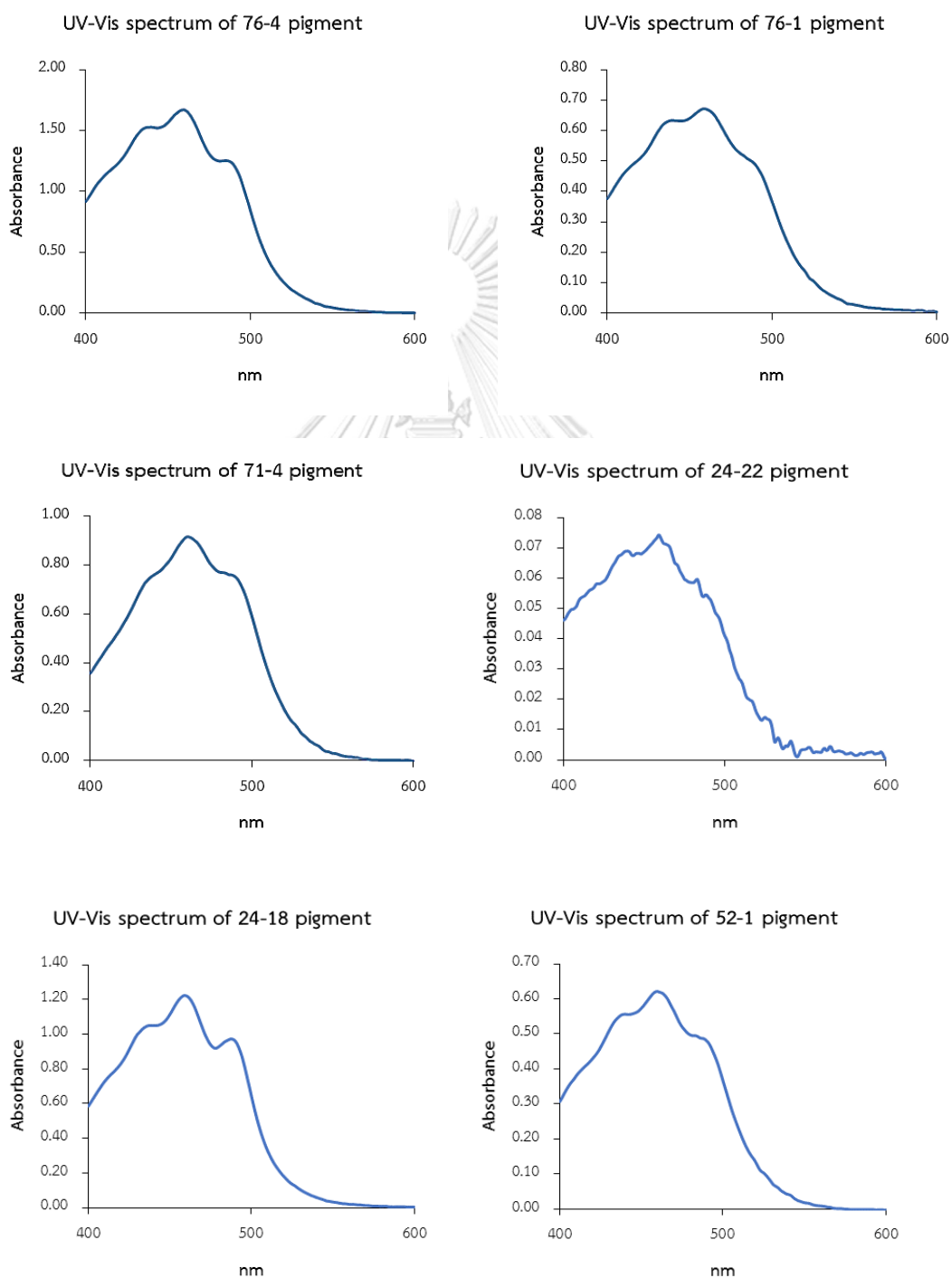
ภาพที่ ง.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย (log CFU) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm



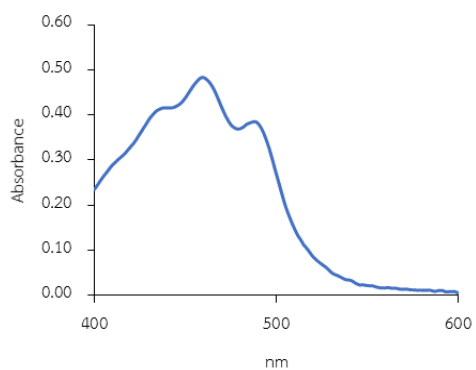
ภาคผนวก จ

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและสเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท

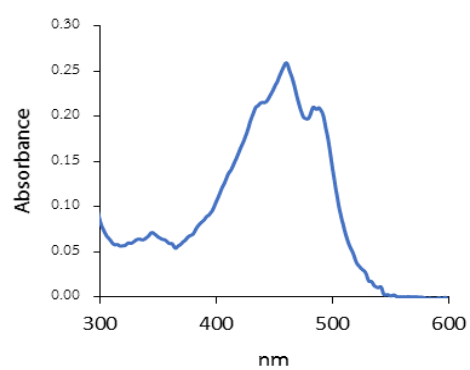
จ.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท



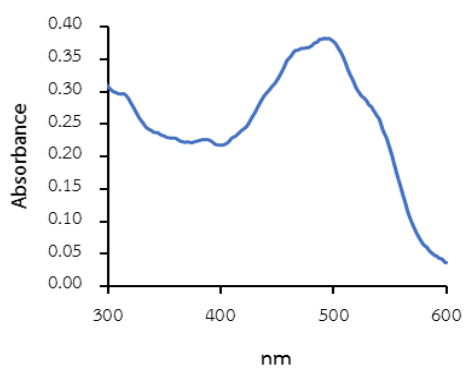
UV-Vis spectrum of 48-20 pigment



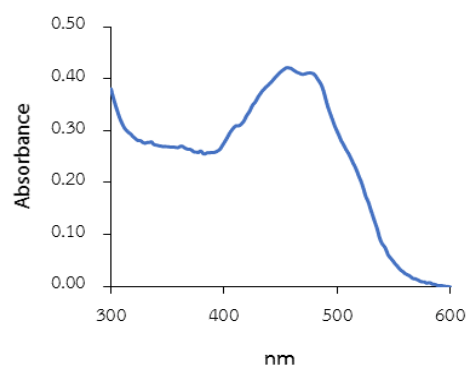
UV-Vis spectrum of 48-10 pigment



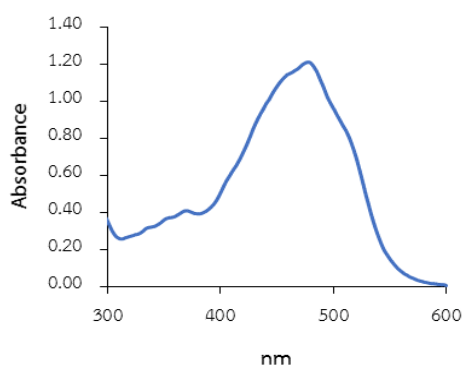
UV-Vis spectrum of 63-11 pigment



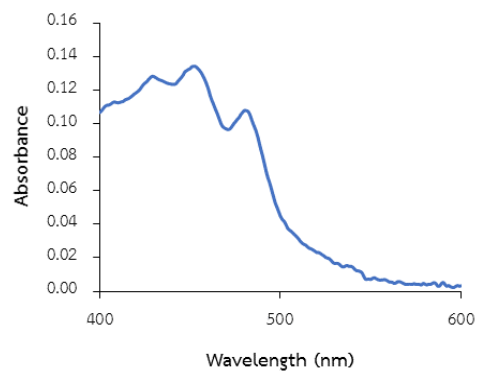
UV-Vis spectrum of 60-5 pigment



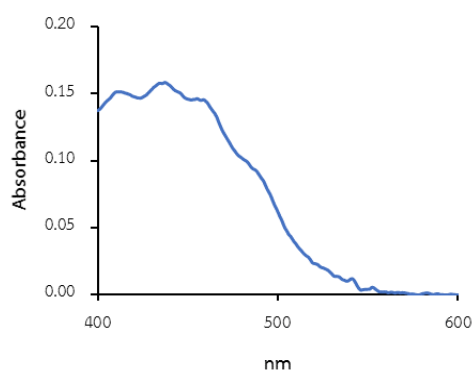
UV-Vis spectrum of 81-1 pigment



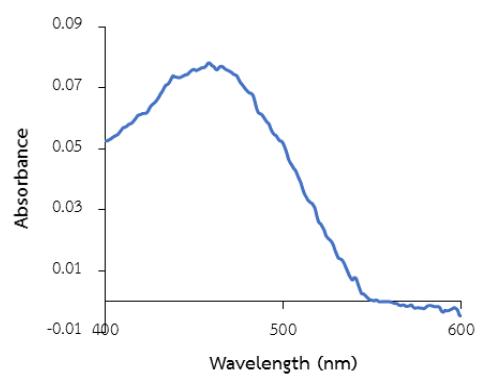
UV-Vis spectrum of 33-13c pigment



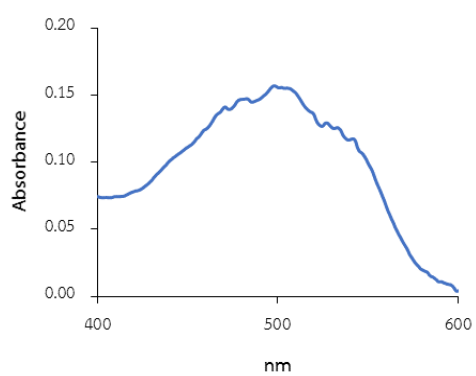
UV-Vis spectrum of 34-12 pigment



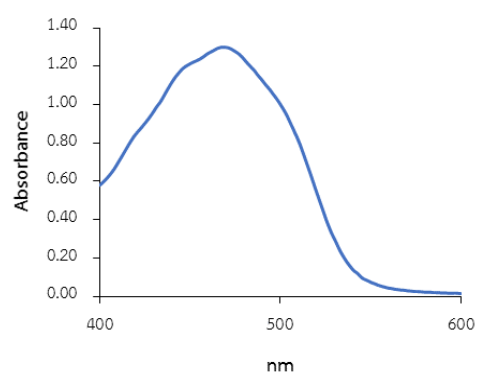
UV-Vis spectrum of 70-3 pigment



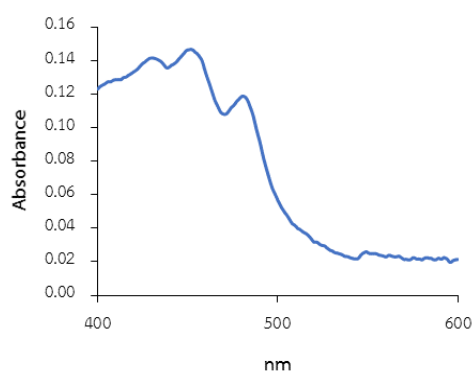
UV-Vis spectrum of 81-2 pigment



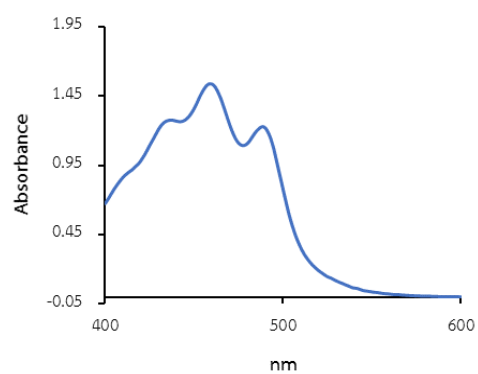
UV-Vis spectrum of 39-28c pigment



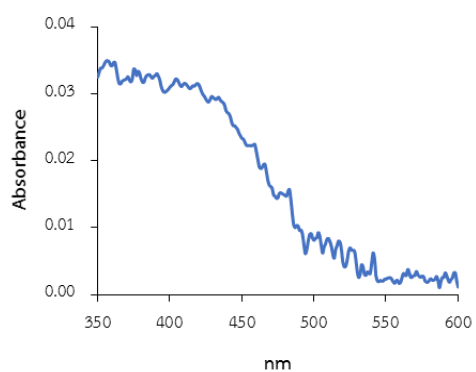
UV-Vis spectrum of 55-10 pigment



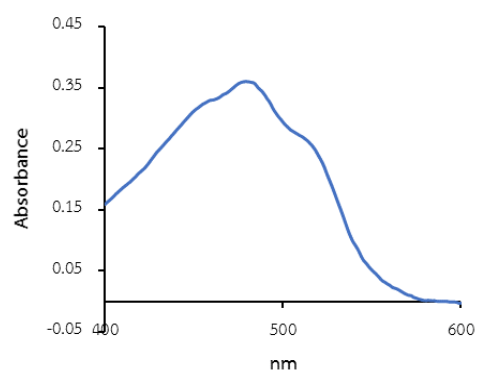
UV-Vis spectrum of 13-3 pigment



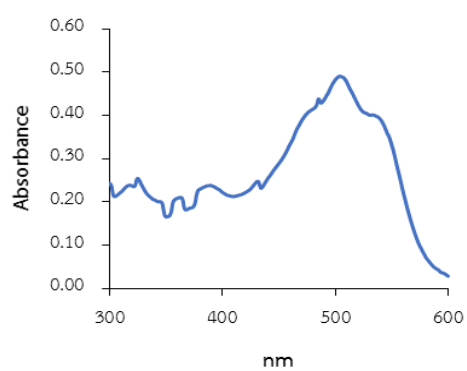
UV-Vis spectrum of 78-2 pigment



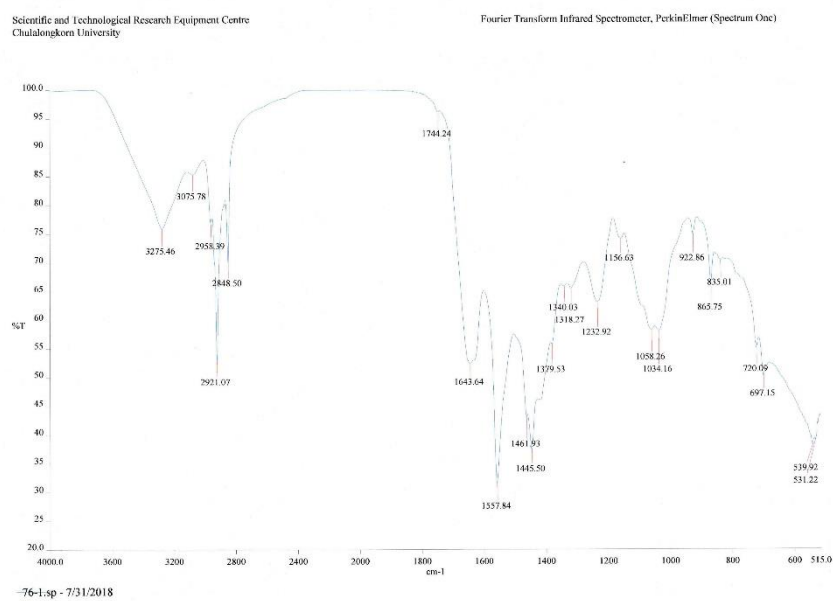
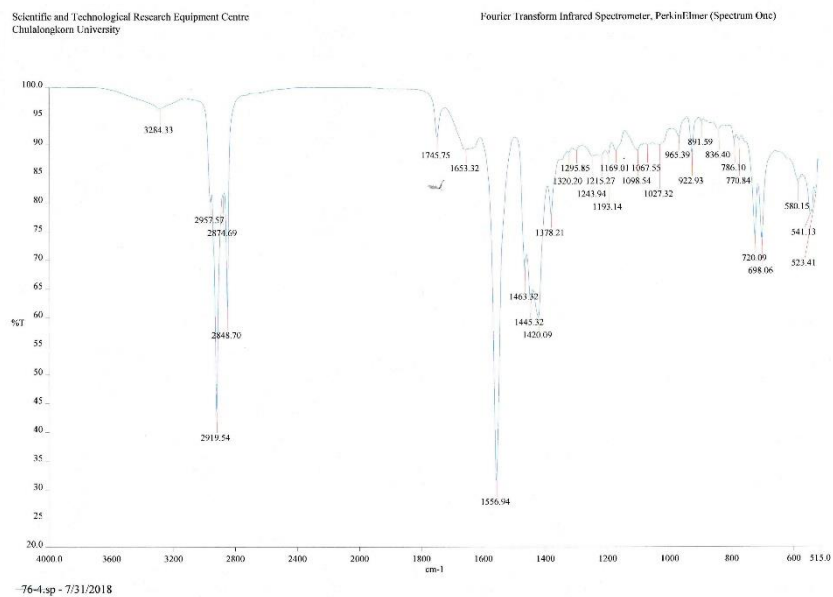
UV-Vis spectrum of 39-23 pigment



UV-Vis spectrum of 82-1 pigment

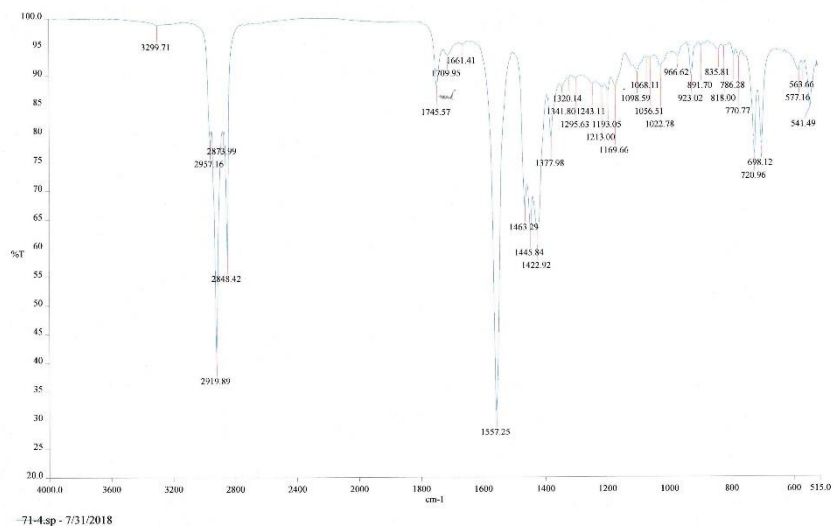


จ.2 สเปกตรัม IR ของสารสกัดจากแบคทีเรียไฮโซเลท



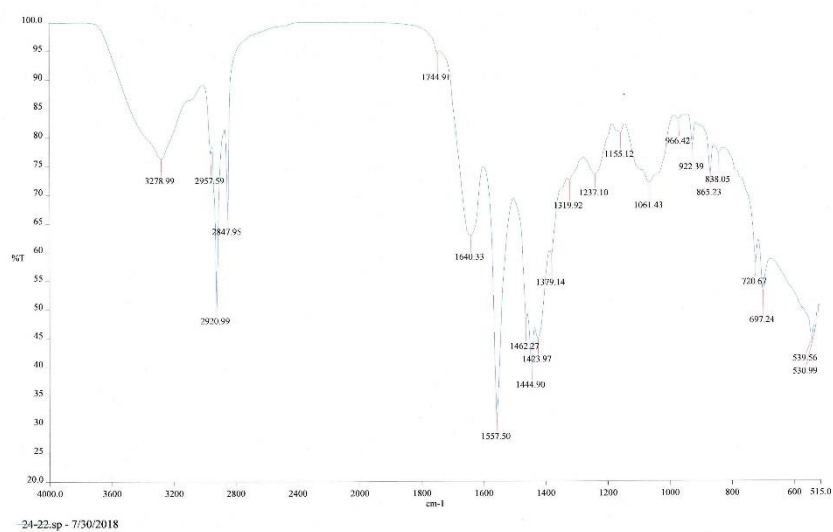
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



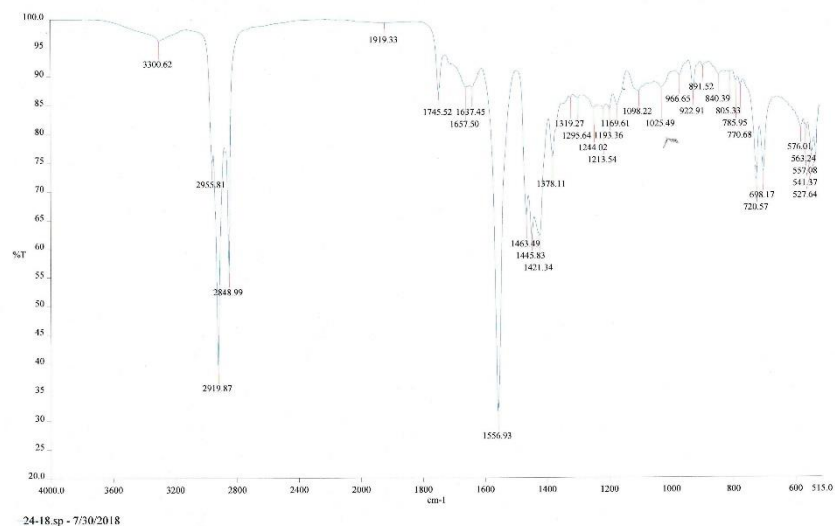
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



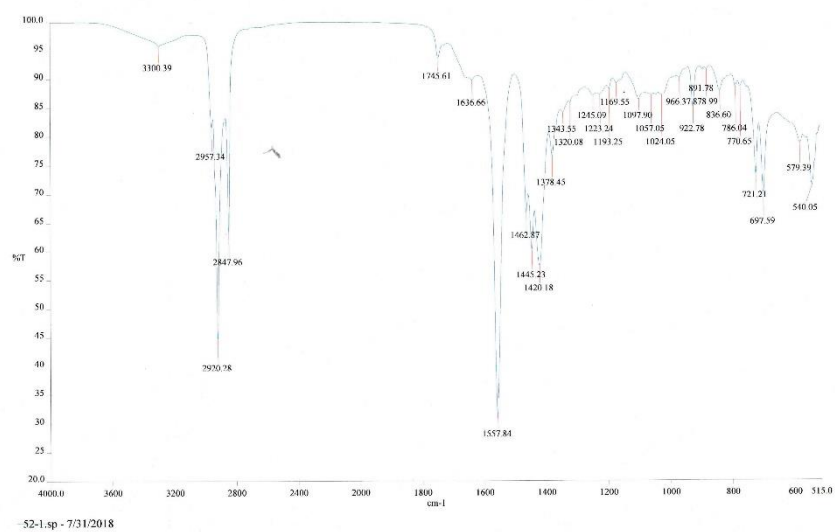
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



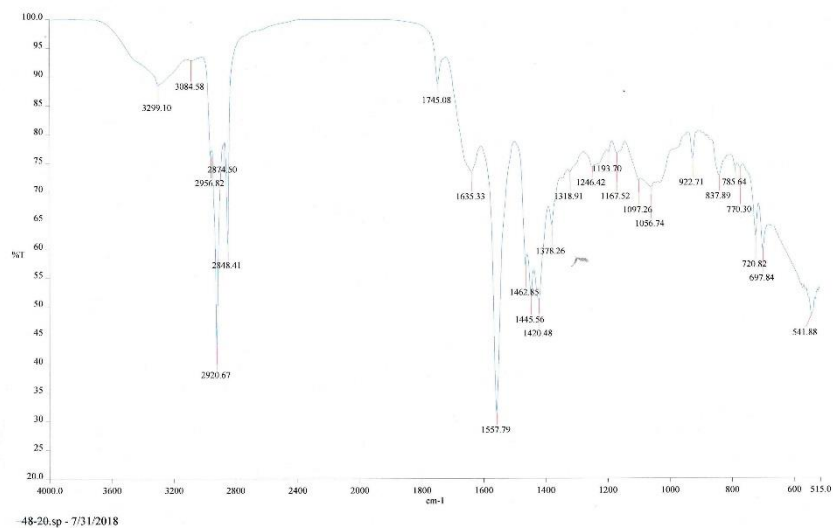
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



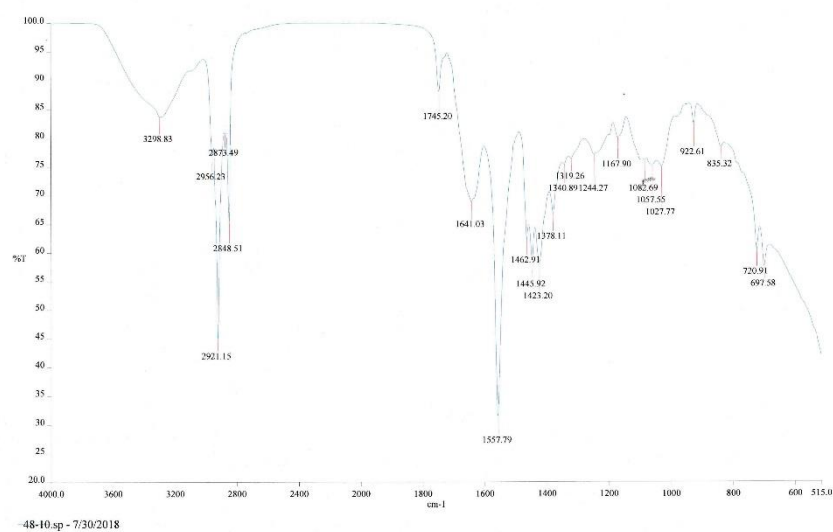
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



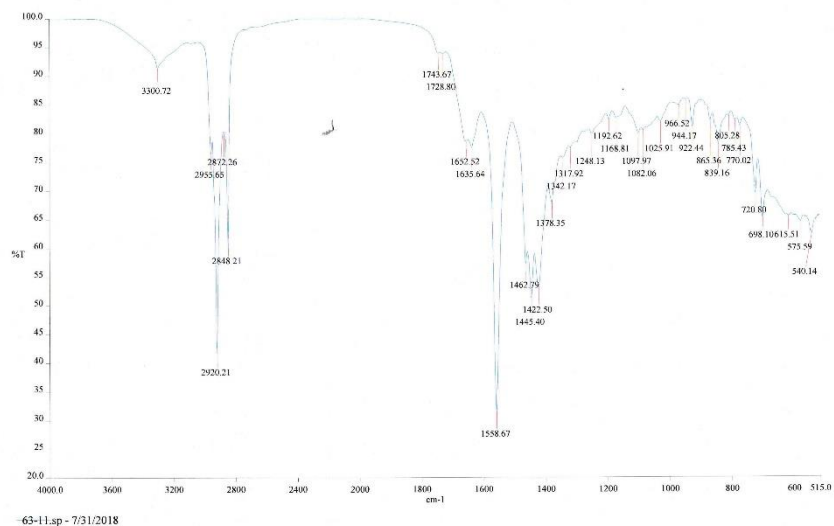
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



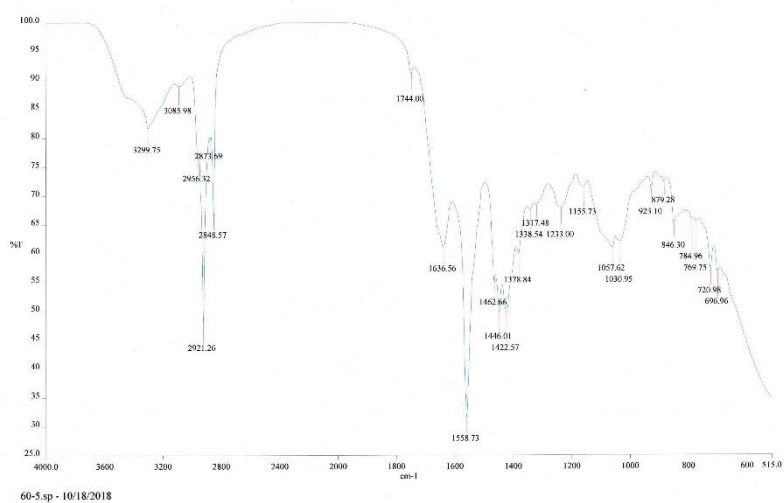
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



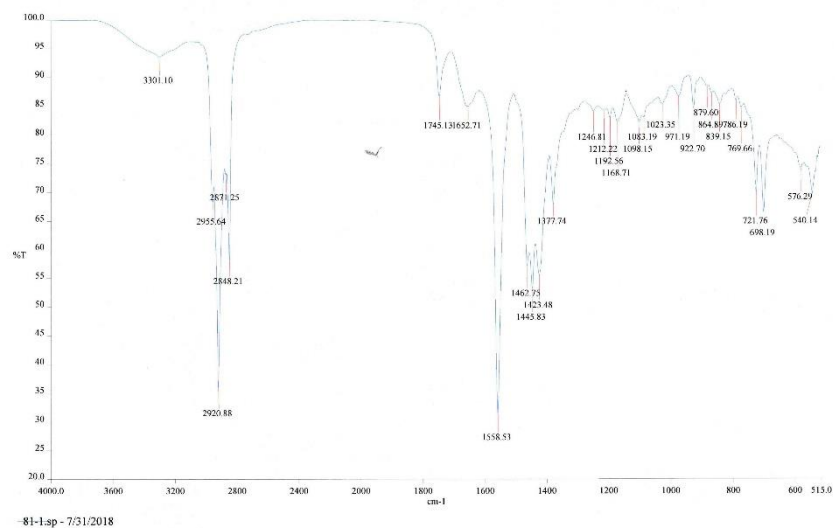
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



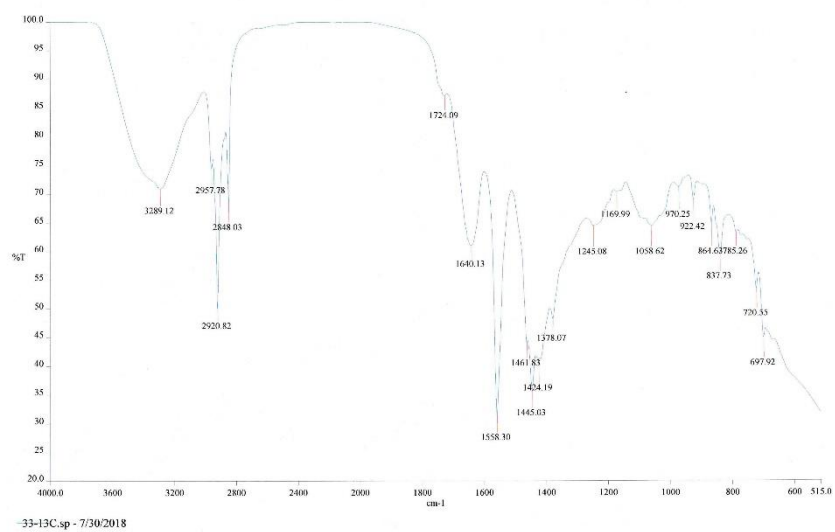
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

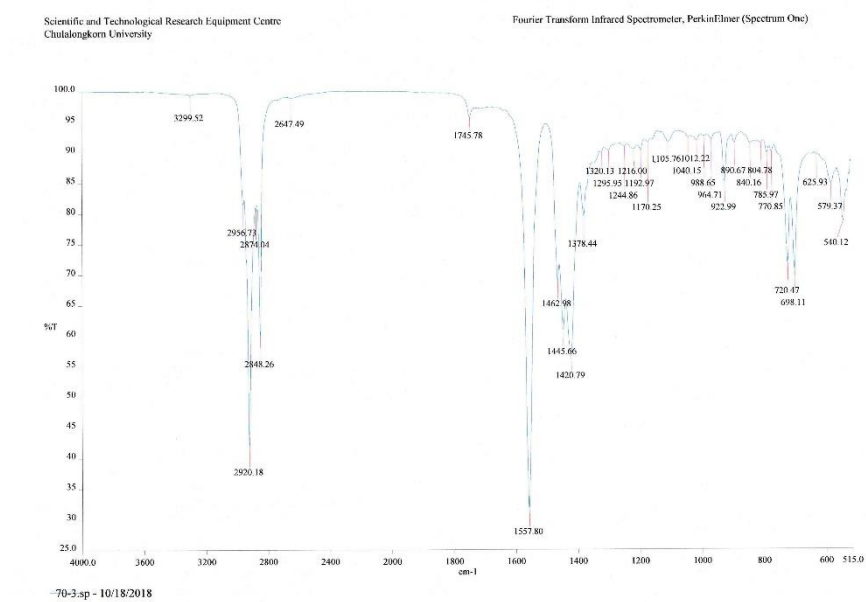
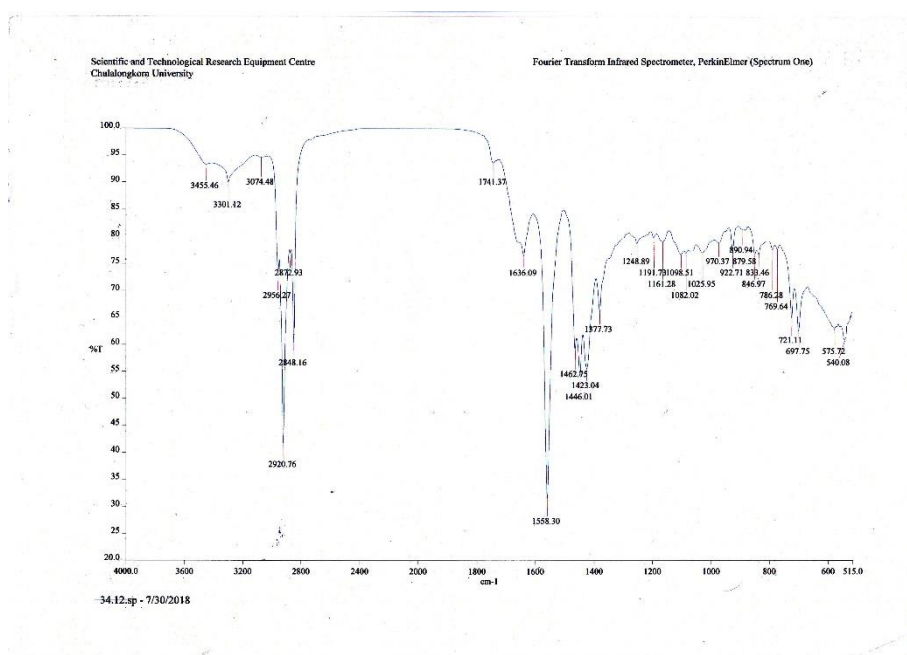
Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)

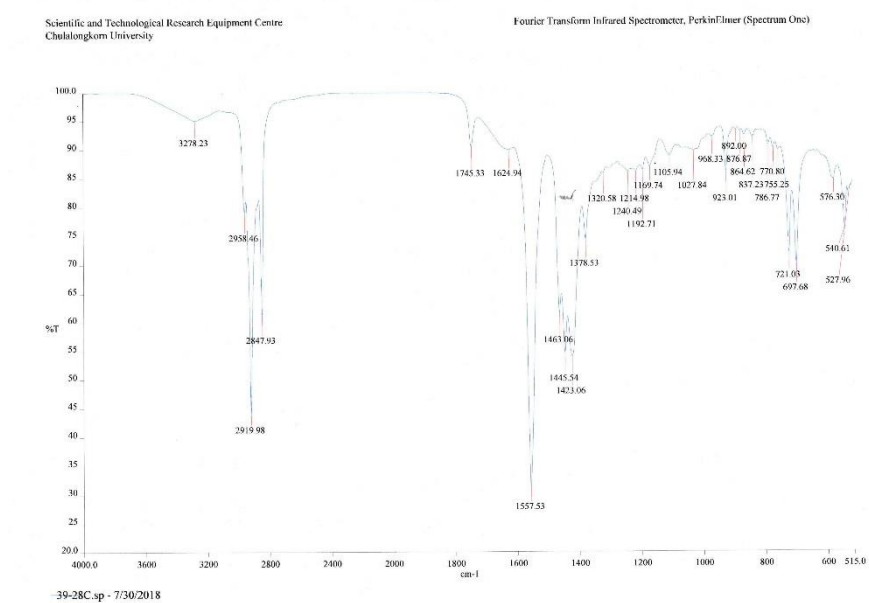
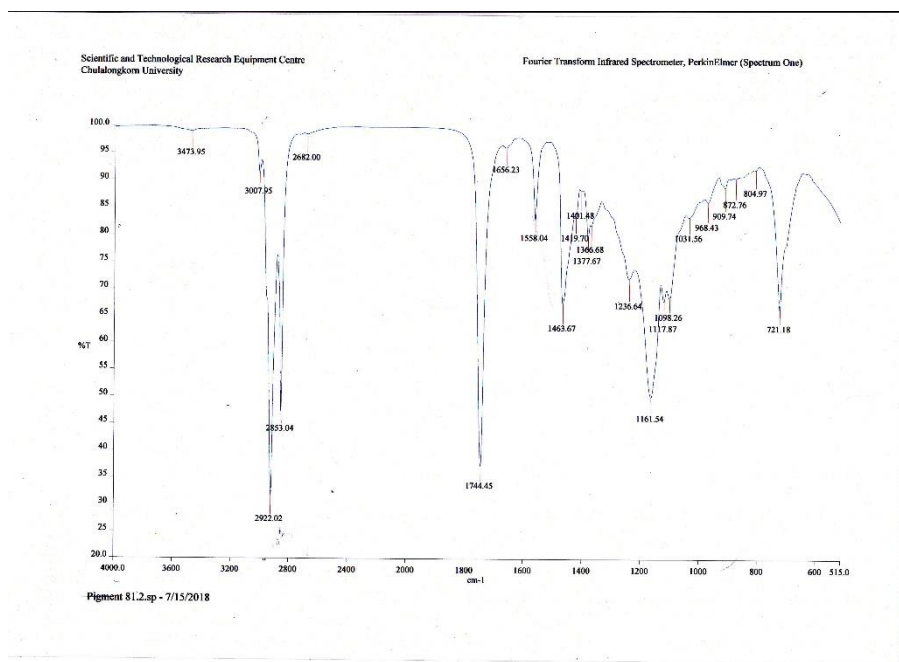


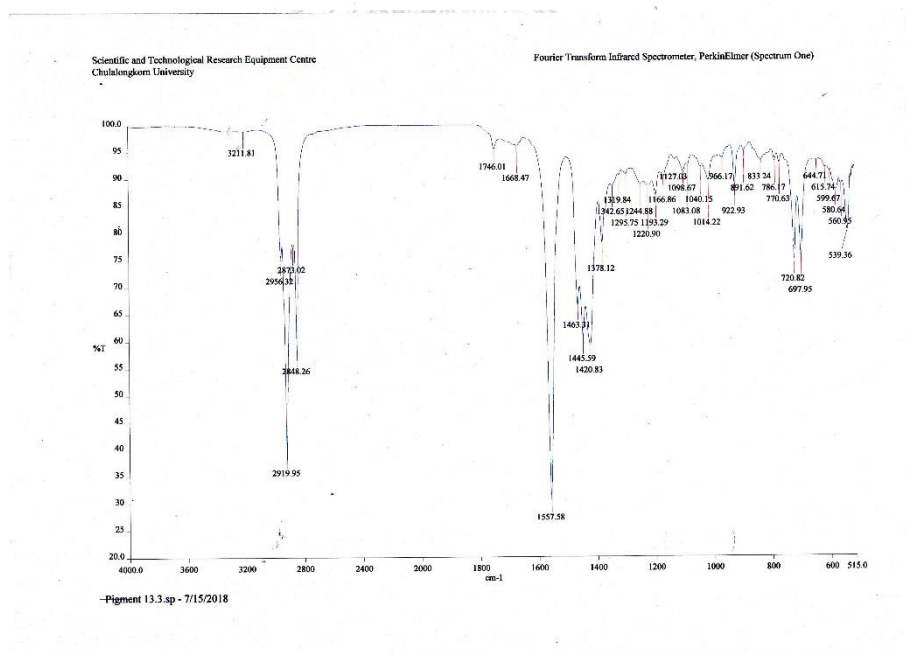
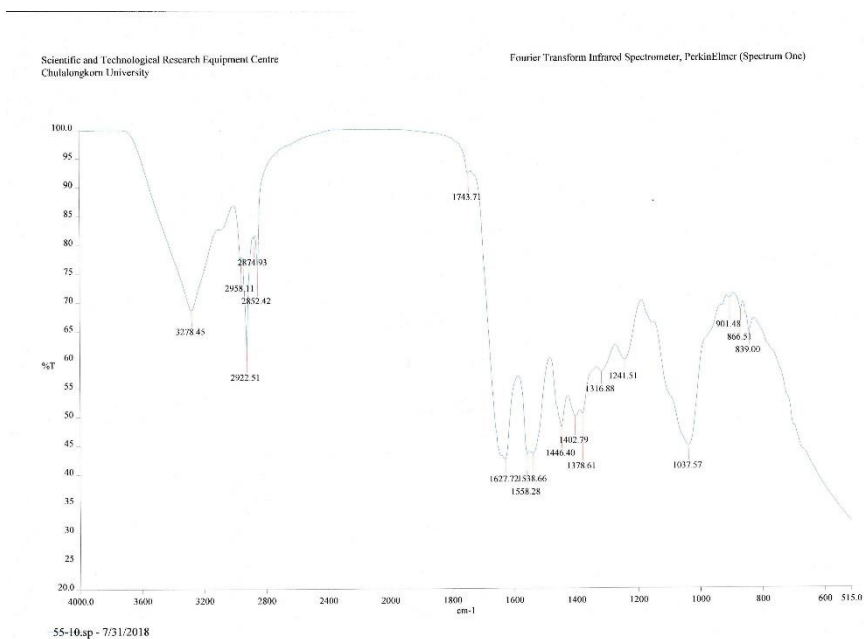
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



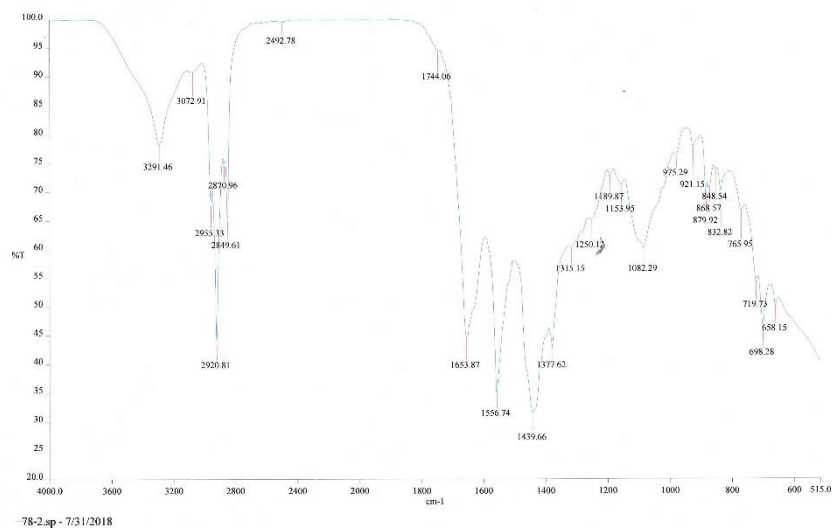






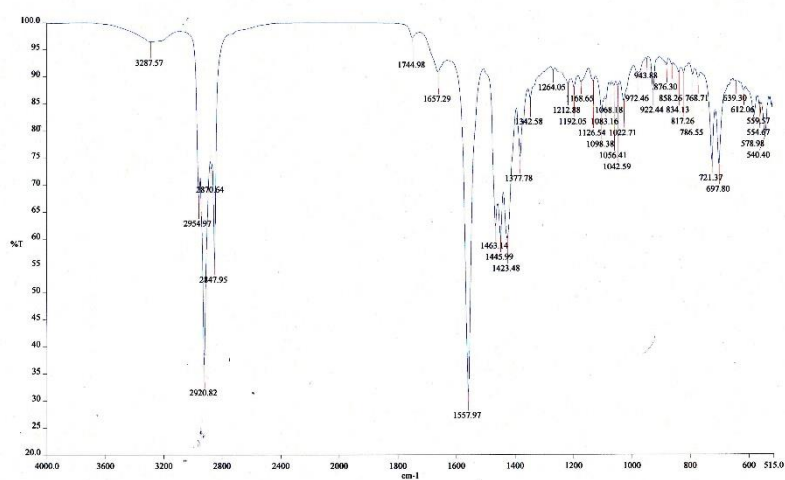
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



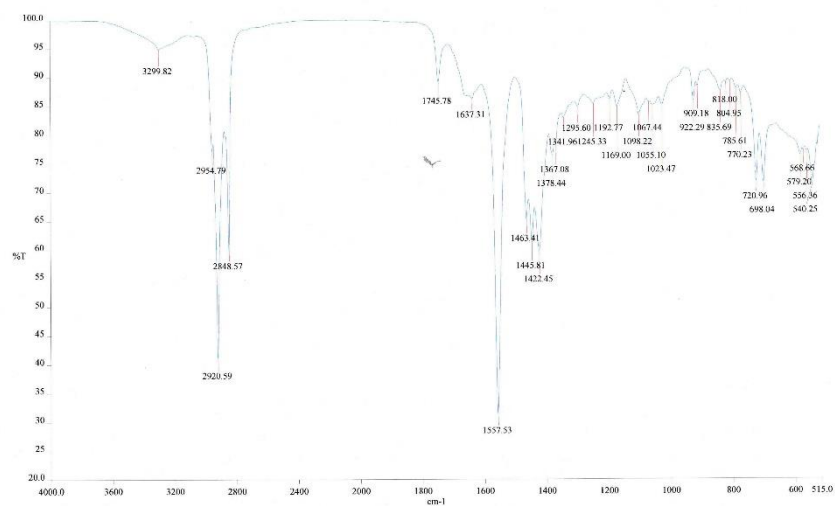
Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University

Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)



82-1.sp - 7/31/2018



ภาคผนวก ฉ

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากแบคทีเรีย

ตารางที่ ฉ.1 สารสกัดจากแบคทีเรียกับความเป็นพิษต่อเซลล์ BHK-21

ตัวอย่าง	ปริมาณสารทดสอบ (%)	จำนวนเซลล์ที่ตาย (%)	ความเป็นพิษต่อเซลล์	IC50
สารสกัดเซลล์ (82-1)	80.00	69.06±0.63	cytotoxic	15.96%
	25.30	66.16±4.72	Non-cytotoxic	
	8.00	-32.99±0.59	Non-cytotoxic	
	2.53	-39.65±6.03	Non-cytotoxic	
	0.80	-66.82±1.09	Non-cytotoxic	
	0.25	-94.68±0.31	Non-cytotoxic	
Doxorubicin (Positive control)	20.00	83.30±1.10	Cytotoxic	3.116 (µg/mL)
	10.00	60.48±0.30	Non-cytotoxic	
	5.00	59.00±1.45	Non-cytotoxic	
	2.50	35.82±2.11	Non-cytotoxic	
	1.25	17.13±3.23	Non-cytotoxic	
	0.62	7.16±3.62	Non-cytotoxic	
หมายเหตุ	จำนวนเซลล์ที่ตาย (%)		ความเป็นพิษต่อเซลล์	
	< 80%		Non-cytotoxic	
	≥ 80%		Cytotoxic (IC50 included)	

ตารางที่ ๑.2 สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่เรียกว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ L-929

ตัวอย่าง	ปริมาณสาร		Cytotoxicity (%)	Activity	IC50 (µg/mL)
	ทดสอบ (%)	A ₅₄₀			
สารสกัดจาก เซลล์ (82-1)	1500.00	0.878±0.02	41	Cytotoxic	>1500
	750.00	1.212±0.11	18	Non-Cytotoxic	
	375.00	1.299±0.08	13	Non-Cytotoxic	
	187.50	1.387±0.13	7	Non-Cytotoxic	
	93.75	1.352±0.16	9	Non-Cytotoxic	
	46.88	1.376±0.15	7	Non-Cytotoxic	
	23.44	1.375±0.12	7	Non-Cytotoxic	
	11.72	1.415±0.12	5	Non-Cytotoxic	
	5.86	1.436±0.11	3	Non-Cytotoxic	
	0	1.485±0.09	0	-	
Doxorubicin	1500.00	0.156±0.03	89	Cytotoxic	2.1
Control (+)	750.00	0.398±0.04	71	Cytotoxic	
	375.00	0.668±0.06	51	Cytotoxic	
	187.50	0.754±0.03	45	Cytotoxic	
	93.75	0.819±0.07	41	Cytotoxic	
	46.88	1.105±0.03	20	Non-Cytotoxic	
	23.44	1.167±0.13	15	Non-Cytotoxic	
	11.72	1.385±0.09	-1	Non-Cytotoxic	
	5.89	1.443±0.06	-5	Non-Cytotoxic	
	0	1.377±0.14	0	-	
หมายเหตุ	% Cytotoxicity		Activity		
	≤ 20%		Non-cytotoxic		
	> 20%		Cytotoxic		
	= 50%		IC50		

ตารางที่ ๓.3 สารสกัดจากแบคทีเรียที่เรียกกับความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2

ตัวอย่าง	ปริมาณสาร ทดสอบ (%)	A ₅₄₀	Cytotoxicity (%)	Activity	IC50 (µg/mL)
สารสกัดจาก เซลล์ (82-1)	1500.00	0.551±0.02	44	Cytotoxic	>1500
	750.00	0.931±0.02	6	Non-Cytotoxic	
	375.00	1.015±0.05	-3	Non-Cytotoxic	
	187.50	1.049±0.05	-6	Non-Cytotoxic	
	93.75	1.053±0.01	-6	Non-Cytotoxic	
	46.88	0.987±0.01	0	Non-Cytotoxic	
	23.44	1.035±0.01	-5	Non-Cytotoxic	
	11.72	1.037±0.05	-5	Non-Cytotoxic	
	5.86	1.028±0.10	4	Non-Cytotoxic	
	0	0.989±0.04	0	-	
Doxorubicin Control (+)	1500.00	0.203±0.02	81	Cytotoxic	1.6
	750.00	0.090±0.01	92	Cytotoxic	
	375.00	0.365±0.03	66	Cytotoxic	
	187.50	0.574±0.05	46	Cytotoxic	
	93.75	0.672±0.02	37	Cytotoxic	
	46.88	0.764±0.04	29	Cytotoxic	
	23.44	0.832±0.06	22	Cytotoxic	
	11.72	0.940±0.05	12	Non-Cytotoxic	
	5.89	1.026±0.09	4	Non-Cytotoxic	
	0	1.072±0.15	0	-	
หมายเหตุ	% Cytotoxicity		Activity		
	≤ 20%		Non-cytotoxic		
	> 20%		Cytotoxic		
	= 50%		IC50		

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วิจิตรา ศรีเจริญ
วัน เดือน ปี เกิด	23 ธันวาคม 2535
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2557 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2559
ที่อยู่ปัจจุบัน	11/134 หมู่ที่ 4 ซอยวัชรพล 1/9 แขวงท่าแร้ง เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220
ผลงานตีพิมพ์	นำเสนอผลงานทางวิชาการหัวข้อ Halophilic Bacteria Isolation from Salty Fermented Foods and Pigment Characterization ในงาน The 21st Food Innovation Asia Conference 2019 (FIAC 2019) : Future Food Innovation for Better Health and Wellness ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค ระหว่างวันที่ 13-15 มิถุนายน พ.ศ. 2562