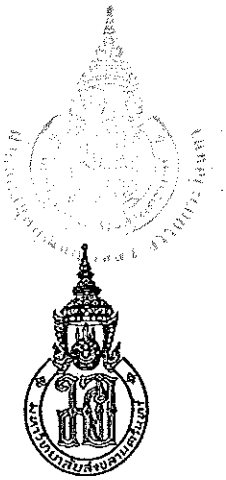


การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของสารสกัดจากพืชตระกูลถั่ว

Screening for Prebiotic Properties of Legume Extracts

โสภา บิลละโสย

Sopa Billasoi

QR121 ส92 2551 ค. 2

308689

27 มิ.ย. 2551

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของสารสกัดจากพืชตระกูลถั่ว

ผู้เขียน นางสาวโสภา บิลละโสย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของสารสกัดจากพืชตระกูลถั่ว
ผู้เขียน นางสาวโสภา บิลละโสย
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

จากการนำสารสกัดเอทานอล 50 เปอร์เซนต์และน้ำจากพืชตระกูลถั่วจำนวน 9 ชนิด คือ ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.), ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek), ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.), ถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*), ถั่วดำ (*Vigna mungo* L.), ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata var. sesquipedalis*), ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*), ถั่วลันเตา (*Pisum sativum* (L.) *var. macrocarpon* Ser.) และ ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.) มาทำการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง, ถั่วแขก, ถั่วดำ, ถั่วพูและถั่วเขียว มีศักยภาพเป็นสารพรีไบโอติกที่ดี กล่าวคือหลังจากผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยเหลืออยู่ 68.60, 61.81, 60.15, 58.94 และ 57.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำมาศึกษาผลการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 450 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875 พบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน สามารถส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด มีจำนวนเพิ่มขึ้น 2.94 และ 2.96 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วย 90 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 823 ดาลตัน ปริมาณ 89.37 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC มีองค์ประกอบย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส

เมื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคคือ *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* serovar Typhi ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียทั้งสามมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก แต่การเพิ่มจำนวนในอาหารที่ใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวนั้นน้อยกว่าชุดควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 24

ชั่วโมง โดยแบคทีเรียทั้งสามชนิดมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 7.11, 6.90 และ 6.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญในอาหารชุดควบคุม คืออาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้เท่ากับ 7.87, 7.40 และ 7.38 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน แสดงว่าแบคทีเรียก่อโรคทั้งสาม สามารถเจริญในอาหารที่มีสารสกัดถั่วเขียวได้น้อยกว่าชุดควบคุม 0.76, 0.5 และ 0.64 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

การเจริญของ *L. plantarum* ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิด ในอาหาร minimal medium ที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรค คือ *E. coli* O157:H7 DMST 12743, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มจำนวนเป็น 6.71, 5.60 และ 4.55 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว เพิ่มจำนวนเป็น 7.10, 6.92 และ 5.40 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน โดย *E. coli* O157:H7 มีจำนวนเชื้อลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.39 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว ส่วน *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 1.32 และ 0.85 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว

การเจริญของ *L. acidophilus* ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค พบว่าแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน เป็น 6.89, 5.93 และ 3.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว มีจำนวน 7.11, 6.90 และ 6.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แบคทีเรียก่อโรคคือ *E. coli* O157:H7 และ *S. aureus* มีจำนวนลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.21 และ 0.96 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 2.99 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว

Thesis Title	Screening for Prebiotic Properties of Legume Extracts
Author	Miss Sopa Billasoi
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2007

ABSTRACT

Ethanolic and water extracts from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), mung bean (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek), peanut (*Arachis hypogaea* L.), red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo* L.), yardlong bean (*Vigna unguiculata var. sesquipedalis*), green bean (*Phaseolus vulgaris*), snow pea (*Pisum sativum* (L.) *var. macrocarpon* Ser.) and winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.) were evaluated for their resistance to acidic (pH 1, 2 and 3) for 4 hours, and to human pancreatic α-amylase for 6 hours. Ethanolic extracts from peanut, green bean, black gram, winged bean, and mung bean exhibited potential prebiotic activity with indigestible carbohydrate content of 68.60, 61.81, 60.15, 58.94 and 57.12 %, respectively. The highest growth of probiotics including *Lactobacillus plantarum* TISTR 450 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875 (widely used as probiotic in humans) was observed in the presence of partial purified ethanolic extracts from mung bean, in which bacterial growth significantly increased 2.94 and 2.96 log CFU/ ml, respectively ($P<0.05$), compared to growth in the glucose containing medium at 24 h. Average molecular weight of partially purified, ethanolic extracts from mung bean was estimated to be 823 dalton (89.37 %), and sugar components of glucose and galactose were revealed by thin layer chromatography (TLC).

Growth of food-borne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhi) in minimal medium contained partially purified, ethanolic extracts from mung bean was evaluated. The pathogens were rapidly increased in 12 h and reached the highest growth at 24 h, at which growth of *E. coli* O157:H7 DMST 12743, *S. aureus* and *Sal. enterica* ser. Typhi increased to 7.11, 6.90 and 6.74 log CFU/ml, whereas growth in the glucose containing medium were 7.87, 7.40 and 7.38 log CFU/ ml, respectively. The presence of ethanolic extract from mung bean as a carbon source reduced growth of the pathogens 0.76, 0.5 and 0.64 log CFU/ml, respectively.

Co-cultivation between *L. plantarum* and the pathogens in minimal medium contained partially purified, ethanolic extracts from mung bean showed that *L. plantarum* TISTR 450 overgrew *E. coli* O157:H7 DMST 12743, *S. aureus* and *Sal. enterica* ser. Typhi. At 24 h, the number of the pathogens reached 6.71, 5.60 and 4.55 log CFU/ ml, whereas growth of the control treatment (pathogen alone) were 7.10, 6.92 and 5.40 log CFU/ ml, respectively. The growth of *E. coli* O157:H7 were non-significantly decreased ($P<0.05$) about 0.39 log CFU/ ml, compared to the control treatment. However, the numbers of *S. aureus* and *Sal. enterica* ser. Typhi significantly decreased ($P>0.05$) about 1.32 and 0.85 log CFU/ ml, respectively in the presence of *L. plantarum*.

Co-cultivation between *L. acidophilus* and the pathogens in minimal medium contained partially purified, ethanolic extracts from mung bean showed that *L. acidophilus* reduced growth of *E. coli* O157:H7 DMST 12743, *S. aureus* and *Sal. enterica* ser. Typhi to 6.89, 5.93 and 3.74 log CFU/ ml at 24 h, respectively, whereas growth of the control treatment (pathogen alone) were 7.11, 6.90 and 6.74 log CFU/ ml, respectively. The growth of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* were non-significantly decreased ($P<0.05$) about 0.21 and 0.96 log CFU/ ml, respectively compared to the control treatment. However, the numbers of *Sal. enterica* ser. Typhi significantly decreased ($P>0.05$) about 2.99 log CFU/ ml in the presence of *L. acidophilus*.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมไปถึงแนวทางในการดำเนินชีวิตและโอกาสดีๆ ที่อาจารย์มอบให้ ขอขอบคุณ ผศ. ดร. สุพิชญา จันทะชุม กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. สุภศิลป์ มณีรัตน์ ประธานกรรมการสอบ และ รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการวิจัย การศึกษาแหล่งของพรีไบโอติกจากพืชไทยบางชนิด คณะอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการคลังสมองไหลกลับ (RBD) ของสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช), และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์และโอกาสในการศึกษามาโดยตลอด ตลอดจนพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

โสภา บิลละโสย

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	5
กิตติกรรมประกาศ	7
สารบาญ	8
รายการตาราง	10
รายการภาพประกอบ	11
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์การวิจัย	37
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	38
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	52
4. สรุปผลการทดลอง	84
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	99
ภาคผนวก ข ผลการทดลอง	103
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์	116
ประวัติผู้เขียน	123

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การจัดจำแนกคาร์โบไฮเดรตโดยค่าดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์	5
2. ปริมาณของ FOS ที่พบในอาหารแต่ละชนิด	9
3. โครงสร้างและองค์ประกอบของพรีไบโอติกทางการค้า	18
4. โครงสร้างของสารโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดในพืชตระกูลถั่ว	19
5. ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตของถั่วแต่ละสายพันธุ์	20
6. ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารมนุษย์	22
7. กลไกการเสริมสุขภาพของโปรไบโอติก	29
8. แบคทีเรียแลกติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกทางการค้า	31
9. ค่า MIC ของน้ำหมักจากการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 450 และ *L. acidophilus* TISTR 875 ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	69
10. ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตจาก *L. plantarum* TISTR 450 และ *L. acidophilus* TISTR 450 ที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วเขียวและกลูโคส	71
11. ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์) ขนาดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขององค์ประกอบที่มีในสารสกัดถั่วเขียว	83
12. ผลได้ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วแขก และถั่วพู	103
13. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในสารสกัดถั่วที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำของถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วแขกและถั่วพู	104
14. เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่พีเอช 1, 2 และ 3	105-106
15. เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือของสารสกัด หลังผ่านการย่อยด้วยกรด HCl buffer ที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง	107

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

16. เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreas α-amylase ที่เวลา 6 ชั่วโมง ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเขียวและสารสกัดน้ำของถั่วแดง 107

17. เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือของสารสกัด หลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreas α-amylase ที่เวลา 0 และ 6 ชั่วโมง ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเขียวและถั่วแดงที่สกัดด้วยน้ำ 108

18. การเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน 109

19. การเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียในอาหาร minimal medium ที่ใช้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน 110

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์	7
2. โครงสร้างทางเคมีของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์	8
3. โครงสร้างทางเคมีของโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชตระกูลถั่ว	10
4. โครงสร้างทางเคมีของ A) ไคติน และ B) ไคโตแซน	11
5. โครงสร้างทางเคมีของเพคติน	12
6. โครงสร้างทางเคมีของแลคโตซูโครส	14
7. โครงสร้างทางเคมีของแลคทูโลส	15
8. ความแตกต่างระหว่างกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารแซคคาไรด์ที่ย่อยได้และไม่สามารถย่อยได้ในระบบการย่อย	23
9. ผลได้ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำที่สกัดได้	52
10. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำ	54
11. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เหลือ (คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์) ในสารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำ	55
12. เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำที่สกัดได้	57
13. เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย หลังผ่านการย่อยด้วยกรด HCl buffer ที่ pH 1 เวลา 4 ชั่วโมง ของสารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำ	58
14. เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายของสารสกัดที่ผ่านการย่อยสารละลายไฮโดรคลอริกที่พีเอช 1 และเอนไซม์ human pancreas α-amylase ของสารสกัด	60
15. เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยของสารสกัด หลังผ่านการย่อยกรดและเอนไซม์ human pancreas α-amylase ของสารสกัด	61
16. การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก A) *L. plantarum* TISTR 450 และ B) *L. acidophilus* TISTR 875 ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเขียว และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	63

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

17. การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 450 และ *L. acidophilus* TISTR 875 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเขียว และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 63

18. เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไปของสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วแขก และกลูโคส โดยโปรไบโอติก A) *L. plantarum* TISTR 450 และ B) *L. acidophilus* TISTR 875 64

19. การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารที่มีสารสกัดจากจากถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วแขก และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก A) *L. plantarum* TISTR 450 และ B) *L. acidophilus* TISTR 875 65

20. การเจริญของแบคทีเรีย (A) *E. coli* O157:H7, (B) *S. aureus* และ (C) *Sal. enterica* ser. Typhi ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว(◇) และกลูโคส (●) เป็นแหล่งคาร์บอน 66

21. การเจริญของ *L. plantarum* TISTR 450 และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7, B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi. เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว 76

22. การเจริญของ *L. acidophilus* TISTR 875 และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7, B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi. เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว 78

23. การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* และการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 79

24. การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* และการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 80

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
25. การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากตัวอย่างสารสกัดถั่วเขียว โดยใช้น้ำตาลฟรุคโตส (Fr) กาแลคโตส (Ga) และกลูโคส (Gl) เป็นน้ำตาลมาตรฐานเปรียบเทียบ	84
26. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ A) อะซิติก B) โพรพิโอนิก C) บิวเทอริก	111
27. โครมาโทแกรมของ GC แสดงตัวอย่างผสมของ (1) กรดอะซิติก, (2) กรดโพรพิโอนิก (3) กรดบิวไทริก	112
28. โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. plantarum* ใน minimal medium ที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 48 ชั่วโมง	112
29. โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. plantarum* ใน minimal medium ที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 24 ชั่วโมง	113
30. โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. acidophilus* ใน minimal medium ที่มีที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 48 ชั่วโมง	113
31. โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. acidophilus* ใน minimal medium ที่มีที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 24 ชั่วโมง	114
32. โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากถั่วเขียว	115
33. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น	117
34. กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	118
35 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD 660 นาโนเมตรและจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ คือ *L.plantarum* (A), *L. acidophilus* (B), *E. coli* O157:H7 (C), *S. aureus* (D) และ *Sal. enterica* ser. Typhi (E)	120-121
36. กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของ pullulans วิเคราะห์โดย GPC	122

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบันปัญหาด้านสุขภาพนับเป็นปัญหาสำคัญมาก ทั้งสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ อันเป็นผลเนื่องมาจากมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ผลทางด้านพันธุกรรม ปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และปัจจัยอีกหลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภคที่เปลี่ยนไปของมนุษย์ ทำให้มนุษย์อยู่ภายใต้ความเสี่ยงในการได้รับทั้งสารเคมี หรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายโดยเฉพาะที่ตกค้างไปกับผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งผลกระทบเหล่านี้ส่งผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ และสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคท้องร่วง โรคภูมิแพ้ ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และระบบภูมิคุ้มกันต่ำลง เป็นต้น

Schrezenmeir และ Vrese (2001) อ้างถึงรายงานของ Bohnhoff และคณะ (1954), Freter (1954) และ Colins และ Caster (1978) พบว่าความต้านทานต่อโรคต่างๆ ข้างต้น ของมนุษย์และสัตว์นั้นมีผลมาจากจุลินทรีย์ภายในลำไส้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์สามารถควบคุมจุลินทรีย์ภายในลำไส้ให้อยู่ในสภาวะสมดุล โดยเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า "กลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติก" ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* และ *Bifidobacterium spp.* เป็นต้น โดยเมื่อไม่นานมานี้แบคทีเรียโปรไบโอติกได้ถูกนำมาใช้และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแคปซูล หรือเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพหลากหลายชนิด ซึ่งเป็นที่นิยมอย่างมากในประเทศญี่ปุ่น ยุโรป และ อเมริกา (Stanton *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามการนำโปรไบโอติกไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากกระบวนการผลิต การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ในสภาวะที่มีออกซิเจน ตลอดจนการรอดชีวิตเมื่อต้องผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนต้น โดยเฉพาะ กระเพาะอาหารที่มีค่าความเป็นกรดสูง (พีเอช 1-3) อีกทั้งยังต้องสัมผัสกับน้ำดีและเอนไซม์จากตับอ่อน และต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นจำนวนมาก ส่งผลให้โปรไบโอติกไม่สามารถเกาะตัวอยู่ในลำไส้ใหญ่ได้มากพอที่จะให้ประโยชน์กับผู้บริโภคได้ ดังนั้นการใช้สารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ ควบคู่ไปกับการใช้โปรไบโอติกจะช่วยเพิ่มจำนวนโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ได้ เนื่องจากสารอาหารกลุ่มนี้ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ แต่เป็นสารอาหารที่เสริมการเจริญของโปรไบโอติกอย่างจำเพาะ เมื่อสาร

เหล่านี้เคลื่อนที่ไปยังลำไส้ใหญ่จะเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น แต่จะไม่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) ได้ สารอาหารประเภทเรียกนี้ว่า "สารพรีไบโอติก" (Gibson, 2004) ความหมายของสารพรีไบโอติก คือสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยหรือถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ไปถึงลำไส้ใหญ่และเป็นสารอาหารให้กับโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่

สารพรีไบโอติกมักเป็นสารกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ซึ่งพบได้ในพืชผักต่างๆ เช่น พืชตระกูลหัวหอม กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง หัวชิกอรี กล้วยและธัญพืชต่างๆ เป็นต้น หรือสารที่ไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (non-starch polysaccharide) เช่น ไคโตแซน และเส้นใยอาหาร ทั้งนี้รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น เพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไซแลน เป็นต้น ประโยชน์ทางสุขภาพของพรีไบโอติกนอกจากจะช่วยเพิ่มจำนวนโปรไบโอติก แล้วยังให้สารประกอบที่มีประโยชน์จากการหมักของโปรไบโอติก โดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids) เช่น อะซิเตท, บิวไทเรท และ โพรพิโอเนท ซึ่งช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานเชื้อก่อโรค เช่น โรคท้องร่วง อาหารเป็นพิษ เพิ่มการดูดซึมแคลเซียมภายในลำไส้ ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยเฉพาะบิวไทเรทสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยการกระตุ้นการตายของเซลล์ (apoptosis หรือ programmed cell death) ในเซลล์ลำไส้ใหญ่ทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง (Hughes and Rowland, 2001) จากการศึกษาของ Conway (2001) พบว่าสารพรีไบโอติกเมื่อเกิดการหมักโดยโปรไบโอติก สามารถช่วยควบคุมการผลิตสารหรือกระบวนการเมทาบอไลท์สารอาหารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม แมกนีเซียมในระบบย่อยอาหาร เนื่องจากกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น ส่งผลทำให้ค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ลดลง ทำให้แคลเซียมละลายได้ดีขึ้น จึงส่งผลให้การดูดซึมดีขึ้นด้วย และจากการศึกษาของ Rastall และ Maitin (2002) พบว่าการให้ soygerm powder ปริมาณ 4 กรัมต่อวัน ช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus reuteri* และยังสามารถทำให้เชื้อทนต่อเกลือน้ำดี (bile salts) เพิ่มขึ้นด้วย

ปัจจุบันการศึกษาแหล่งของสารอาหารที่จัดเป็นสารพรีไบโอติก เพื่อพัฒนาและค้นหาสารพรีไบโอติกจากแหล่งใหม่ที่สามารถทำงานร่วมกับโปรไบโอติกได้ดีที่สุด เพื่อนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหาร (food ingredient) ช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค ยังคงได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชอาหารที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย สำหรับงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการศึกษาแหล่งพรีไบโอติกจากพืชตระกูลถั่ว ทั้งที่เป็นถั่วธัญพืช และถั่วที่

บริโภคเป็นผักสด เพื่อทราบถึงข้อมูลแหล่งของสารพรีไบโอติกแหล่งใหม่และเป็นแนวทางเพื่อนำไปปรับปรุงเป็นผลิตภัณฑ์ ทั้งยังสามารถลดต้นทุนของผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพทำให้เพิ่มกลุ่มผู้บริโภคกว้างขึ้น และยังสามารถเพิ่มมูลค่าของพืชที่จัดเป็นสารพรีไบโอติกแก่เกษตรกรอีกด้วย

บทตรวจเอกสาร

พรีไบโอติก (Prebiotics)

พรีไบโอติก คือ เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน และสามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียบางกลุ่มโดยเฉพาะกลุ่มที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งส่งผลให้สุขภาพของผู้ที่รับประทานอาหารชนิดนั้นๆ ดีขึ้น (Gibson, 2004; Holzapfel and Schillinger, 2002) แบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์หรือเรียกว่าแบคทีเรียโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น โปรไบโอติกแบคทีเรียและพรีไบโอติกมีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิด พรีไบโอติกเป็นอาหารที่สามารถส่งเสริมให้จุลินทรีย์สุขภาพมีการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนและแข็งแรงมากยิ่งขึ้น หากร่างกายได้รับทั้งจุลินทรีย์สุขภาพและใยอาหารพรีไบโอติกที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมาก

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเส้นใยอาหารและคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารประกอบในอาหารกันแพร่หลายมากขึ้น พรีไบโอติกที่ได้รับความสนใจและการยอมรับในความสามารถเสริมการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ และมีผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค รวมถึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในตลาดของยุโรปและญี่ปุ่น ได้แก่ fructo-oligosaccharides, inulin, galacto-oligosaccharides, lactulose, lactosucrose, isomalto-oligosaccharides, soybean oligosaccharides, xylo-oligosaccharides, gentio-oligosaccharides (Rastall and Maitin, 2002) เมื่อสารพรีไบโอติกไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน จนสามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ จะเป็นสารอาหารให้แบคทีเรียบางกลุ่มโดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สามารถใช้เหล่านี้ในการเจริญ และเพิ่มจำนวน ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ ส่งผลให้สุขภาพของเจ้าบ้านดีขึ้น โดยช่วยในการดูดซึมแคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และยังสามารถป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร สามารถเคลื่อนที่ไปจนถึงลำไส้ใหญ่โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง และไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก รวมถึงไม่เป็นอาหารให้แก่ จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่ก่อโรคและอาศัยอยู่ภายในลำไส้ (Gibson, 2004)

1.1 ชนิดของสารพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่รู้จักกันแพร่หลายจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารอาหารที่ประกอบด้วย น้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อยประมาณ 2-15 หน่วย มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) หรือ พันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) โดยพันธะที่เชื่อมกันภายในโมเลกุลของน้ำตาล จะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยพันธะเหล่านี้ได้หรือไม่ เช่น ความสามารถของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria ที่สร้างเอนไซม์ β-fructofuranosidase มาย่อยพันธะภายใน fructo oligosaccharides ได้ เป็นต้น โดยสารพรีไบโอติกที่ดีนั้นควรจะมีความยาวของสายโพลิเมอร์ หรือดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ (Degree of polymerization: DP) สั้น เช่น สารกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถพบได้ในธรรมชาติ เช่น ในผักหรือผลไม้ (มะม่วง ส้ม กล้วย ธัญพืชและถั่ว) เป็นต้น หรืออาจได้โอลิโกแซคคาไรด์จากการสังเคราะห์ในทางการค้า เช่น สังเคราะห์ขึ้นมาโดยใช้เอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ซึ่งมีสารตั้งต้นคือแป้ง (Rastall and Gibson, 2002) และในการจำแนกสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ที่จัดเป็นพรีไบโอติกนิยมใช้ค่าดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ เช่น สารกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ (raffinose, stachyose และ fructo-oligosaccharide) มีปริมาณหน่วยย่อยของโมโนแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 3-10 หน่วย (ตารางที่ 1) โดยส่วนมากจะสังเคราะห์หรือสกัดได้จากส่วนของเนื้อเยื่อพืช ตัวอย่างเช่น อินนูลิน (inulin) ซึ่งมีความสามารถทนต่อเอนไซม์ และการย่อยที่เกิดขึ้นภายในลำไส้เล็กได้ (Aggett *et al.*, 2003)

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกคาร์โบไฮเดรตโดยค่าดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์

Table 1. Classification of dietary carbohydrates according to their Degree of polymerization (DP)

Carbohydrate	DP	Supgroups	Examples
monosaccharide	1	monosaccharide	glucose, galactose, fructose
disaccharide	2	disaccharide	sugar, lactose, lactulose
		sugar alcohol	sorbitol, lactilol
oligosaccharide	3-10	oligosaccharide	maltodextrins, raffinose, stachyose, fructo-oligosaccharide, galacto-oligosaccharides
polysaccharide	>10	starch	amylose, amylopectin, resistant starch
		non-strach polysaccharide	cellulose, hemicellulose, inulin, pectin

ที่มา: Aggett และคณะ (2003)

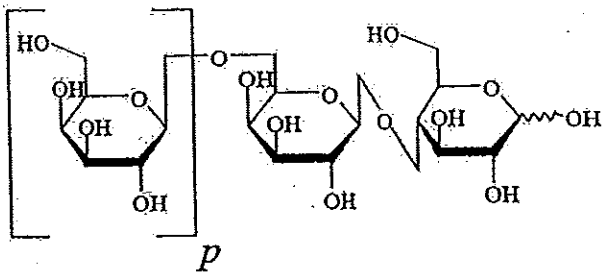
1.1.1 สารพรีไบโอติกจากธรรมชาติ

พรีไบโอติกที่ได้จากธรรมชาติจะพบได้ในผัก และผลไม้หลากหลายชนิด สารกลุ่ม oligosaccharides ที่จัดเป็นสารพรีไบโอติก เช่น lactose, lactulose, raffinose, stachyrose และ fructo-oligosaccharide (FOS) นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่ได้จากพืช เช่น เพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม ไซแลน และ chitosan-oligosaccharide ที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักโดยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Lee *et al.*, 2002) สามารถจัดกลุ่มของพรีไบติกที่ได้จากธรรมชาติได้ดังนี้

1.1.1.1 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 1) มีค่า DP อยู่ในช่วง 3-30 โดยมีโครงสร้างเป็น Gluα1-4 [ß Gal 1-6]$_n$ n= 2-5 พบได้ในธรรมชาติคือ น้ำนมของมนุษย์ นมวัว และโยเกิร์ต เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์ได้อีกด้วย ซึ่งสังเคราะห์ได้จากแลคโตส โดยใช้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ß-galactosidase) ซึ่งกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบในธรรมชาติ เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กโดยเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ สามารถเคลื่อนที่ไปถึงลำไส้ใหญ่ได้ (Tuohy *et al.*, 2005) และถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ได้ผลผลิตจากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวไทเรท และก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ และยังป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยไปลดระดับพีเอชในลำไส้ใหญ่ มีผลไปยับยั้งการสร้าง secondary bile acids ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ควบคุมเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการสร้างสารพิษและสารก่อมะเร็งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น ß -glucoronidase และ nitroreductase ลดจำนวนสารประกอบที่เป็นอันตรายต่างๆ เช่น แอมโมเนีย อินโดล ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มะเร็งลุกลามยิ่งขึ้น (Sako *et al.*, 1999)

จากการศึกษานมแม่หรือ Human milk oligosaccharides (HMOs) มีค่า DP อยู่ในช่วง 3-32 จัดเป็นสารพรีไบโอติกที่อยู่ในกลุ่มกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีรายงานว่าเมื่อทารกดื่มนมแม่ (HMOs) พบว่า HMOs ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของทารก และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่มีผลไปเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกพวก Bifidobacteria ได้ (Coppa *et al.*, 2001) และจากรายงานของ Ward และคณะ (2006) ทำการศึกษาโดยใช้ HMOs, inulin และ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 และ *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่ในลำไส้ใหญ่ของทารก พบว่า *B. infantis* ATCC 15697 สามารถใช้ HMOs เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในขณะที่ *L. gasseri* ATCC 33323 ไม่สามารถใช้ HMOs ในการเจริญได้ และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารที่มี inulin เป็นแหล่งคาร์บอน HMOs จึงจัดเป็นสารพรีไบติกที่

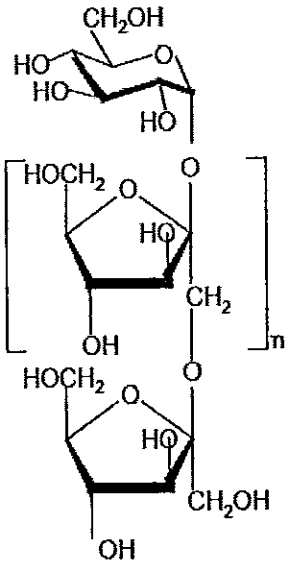
ส่งเสริมการเจริญในโปรไบโอติกบางชนิดเท่านั้น โดยเฉพาะเสริมการเจริญของโปรไบโอติกซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ในลำไส้ใหญ่ของทารก



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์

Figure 1. Chemical structures of galacto-oligosaccharides.

1.1.1.2 ฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์และอินนูลิน (Fructo-oligosaccharides (FOS) and Inulin) เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร อยู่ในกลุ่ม ฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ มีฟรุคโตส (fructose) เป็นองค์ประกอบ 3-60 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β, 2-1 glycosidic และมักพบหน่วยย่อยเป็นกลูโคสบริเวณปลายสาย ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก อยู่ในกลุ่มของโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ คือ D-glucose และ D-fructose โดยที่โมเลกุลโครงสร้างประกอบด้วย Gluα 1-2 [β Fru(2-1)]$_n$ โดย n= 10^{14} (ภาพที่ 2) โดยส่วนมากแล้วสกัดจากหัวชิคอรี (chicory) ส่วนอินนูลินพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรีย และราบางชนิด โดยพบอยู่ในผักและผลไม้กว่า 3,600 ชนิด โดยเฉพาะผักในตระกูล cichorium เช่น ชิคอรี พืชในตระกูลหอม เช่น หอมหัวใหญ่ กระเทียม กล้วยและธัญพืช เป็นต้น (ตารางที่ 2) อินนูลินไม่สามารถย่อยได้ในลำไส้เล็ก แต่ย่อยได้บางส่วนในลำไส้ใหญ่โดยอาศัยจุลินทรีย์ตามขนาดของโครงสร้าง อินนูลินมีค่า DP เท่ากับหรือมากกว่า 10 และตามโครงสร้างจะมีโอลิโกฟรุคโตสต่างชนิดกันประกอบอยู่ในโครงสร้างกลุ่มย่อยในพืช และมีปริมาณอินนูลินและโอลิโกฟรุคโตสที่แตกต่างกัน อินนูลินและโอลิโกฟรุคโตสละลายน้ำได้ดี โดยเฉพาะในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส แต่ละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็นและแอลกอฮอล์ และมีความคงตัวสูง ไม่มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทสัมผัส มีรสชาติหวานเล็กน้อย มีคุณสมบัติคล้ายน้ำตาลทรายและกลูโคสไซรัป จึงมีการพัฒนานำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่างๆ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมการปรับปรุงกลิ่นและความหวานในอาหารที่ให้พลังงานต่ำ เนื่องจากเป็นสารที่ให้ความหวานที่มีแคลอรี่ต่ำใช้ในการปรับเนื้อสัมผัส (texture) ของอาหาร (Rastall and Gibson, 2004)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

Figure 2. Chemical structures of fructo-oligosaccharides.

Wang และ Gibson (1993) ได้ทำการทดลองโดยให้อาสาสมัครรับประทานอินนูลิน 15 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน พบว่าระหว่างช่วงเวลานั้นปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* เพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมีปริมาณลดลง ซึ่งส่งผลให้สุขภาพผู้ที่รับประทานอาหารนั้นๆ ดีขึ้น พรีไบโอติกจึงมีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิดกับมนุษย์ หากร่างกายได้รับจุลินทรีย์สุขภาพและเส้นใยอาหารพรีไบโอติกที่เหมาะสม จะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายมาก เช่น ช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน ป้องกันความรุนแรงของการเกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. และ *Listeria* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยลดสารพิษ ช่วยให้การขับถ่ายดีขึ้น ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose) ในน้ำนม ซึ่งแก้ปัญหาแน่นท้องหรือท้องเสียได้ และช่วยให้ร่างกายดูดซึมสารอาหารโดยเฉพาะแคลเซียมและเหล็กได้ดี

จากรายงานการศึกษาการให้ฟรุคโตโอลิโอแซคคาไรด์ (FOS) แก่หนูที่มีการชักนำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) และภาวะกระดูกพรุน (osteopenia) ทดสอบกับหนูสามกลุ่มคือ หนูที่ไม่มีการให้ FOS ร่วมในอาหาร, หนูกลุ่มที่มีการให้ FOS ร่วมในอาหาร และหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ชักนำให้เกิดภาวะโลหิตจางและกระดูกพรุนและไม่ได้รับ FOS ร่วมในอาหาร จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดทุกสัปดาห์เพื่อวัดปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด และเมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำกระดูกส่วนโคนขา (femur) และกระดูกส่วนหน้าแข้ง (tibia) มาวัดความหนาแน่นของมวลกระดูก (bone

mineral density: BMD) พบว่าหนูกลุ่มที่มีการให้ FOS ปริมาณ 75 กรัม/ กิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 6 สัปดาห์มีปริมาณของฮีโมลโกลบินเพิ่มขึ้น และความหนาแน่นของมวลกระดูกมากกว่ากลุ่มการทดลองทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (Ohta *et al.*, 1998)

ตารางที่ 2 ปริมาณของ FOS ที่พบในอาหารแต่ละชนิด

Table 2. Concentration of FOS in various foods.

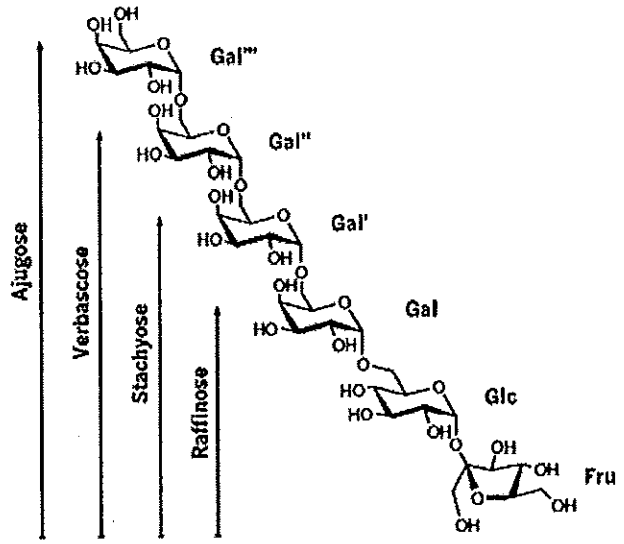
Source	Percentage of FOS
Barley	0.15
Tomato	0.15
Onion	0.23
Banana	0.30
Brown sugar	0.30
Rye	0.50
Garlic	0.60
Honey	0.75

ที่มา: Sangeetha และคณะ (2005)

1.1.1.3.ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharide; SOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบทั่วไปในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Raffinose family oligosaccharides ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น raffinose และ stachyose (Gibson, 2004) ซึ่งมีโมเลกุลโครงสร้างประกอบด้วย Galα1-6 Glu1-2βFru และ Galα1-6 Galα1-6 Gluα1-2βFru ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งน้ำตาลที่มักพบในถั่ว ได้แก่ น้ำตาลซูโครส ฟรุคโตส แรมโนส กลูโคส และอะราบิโนส ซึ่งสามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ α-galactosidase ซึ่งร่ายกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ และสามารถทนต่อการย่อยของโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ไปจนถึงลำไส้ใหญ่และกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria ได้ ซึ่งกระบวนการหมัก SOS โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันสายสั้น รวมถึงแก๊ส เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน และมีเทน เป็นต้น (Espinosa-Martos and Ruperez, 2006) จากการศึกษาการหมักซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ในอาสาสมัครเพศชาย 6 คน ให้ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่ม

จำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ โดยอาสาสมัครที่ได้รับ raffinose ในปริมาณ 15 กรัมต่อวัน มีปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า และสามารถลดจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* spp. ได้ 0.6 เท่า และ *Clostridium* spp. ได้ 1.6 เท่า และพบว่าการให้ soygerm powder ปริมาณ 4 กรัมต่อวัน จะช่วยให้เชื้อ *Lactobacillus reuteri* สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้เพิ่มขึ้น (Rastall and Maitin, 2002)



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชตระกูลถั่ว

Figure 3. Chemical structures of oligosaccharides in legumes.

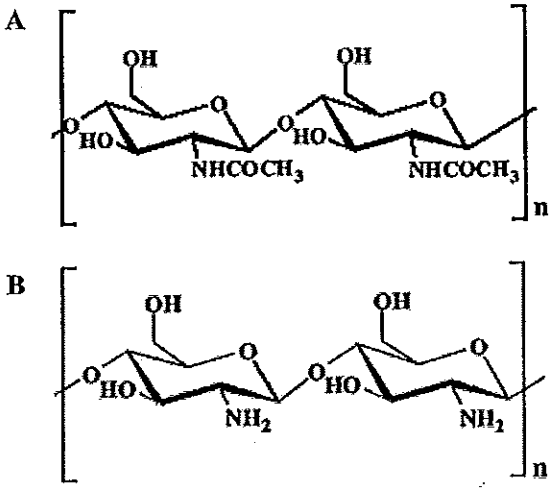
ที่มา: Kotiguda และคณะ (2006)

1.1.2 คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ และสารที่ไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (non-starch polysaccharide; NPS) ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

สารประเภทคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ และสารที่ไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เส้นใยอาหารซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม พรีไบโอติกส่วนมากได้จากพืชหรือจุลินทรีย์ เช่น สารกลุ่มเพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม ไซแลน ไคโตแซน และสารเมือกที่ได้จากแบคทีเรียโปรไบโอติก (exopolysaccharides) เป็นต้น ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักโดยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Lee *et al.*, 2002)

1.1.2.1 ไคโตแซน (chitosan; CS)

ไคโตแซนเป็นอนุพันธุ์ที่ไม่ละลายน้ำของไคติน (Chitin) พบได้ในธรรมชาติ โดยสกัดได้จากเปลือกของกุ้งขนาดกลางและเล็ก กุ้งกร้ามกราม หรือปู ซึ่งพบได้ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน สายโพลิเมอร์ประกอบด้วยหน่วยของ glucosamine เชื่อมต่อกันด้วย β-1,4 glucosidic bonds (ภาพที่ 4) ซึ่งไคโตแซนมีผลทางชีวภาพคือ เป็นสารต้านมะเร็ง (antitumor) ป้องกันภาวะเลือดไหลไม่หยุด (hemostatic) ป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูง (hypocholesterolemic) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค (antibacterial) เช่น *Salmonella* spp. โดยกลไกการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคของไคโตแซนยังไม่ทราบแน่ชัด (Helander *et al.*, 2001) คาดว่าไคโตแซนมีประจุบวกของ NH_3^+ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ glucosamine ซึ่งอาจมีผลต่อ cell membrances ของจุลินทรีย์ซึ่งมีประจุลบ มีการศึกษาถึงผลของไคโตแซนต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์ โดยศึกษาในแบคทีเรียก่อโรค 6 สายพันธุ์ที่มักพบในลำไส้ของมนุษย์ โดยใช้ปริมาณของไคโตแซนเท่ากับ 0.025, 0.05 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลของไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรค โดยไคโตแซนสามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacteroides* และ *Clostridium* ได้ถึง 91-97 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Roseburia* sp., *Eubacterium* sp. และ *Faecalibacterium* sp. สามารถยับยั้งการเจริญได้ 63-83 เปอร์เซ็นต์ (Simunex *et al.*, 2006)



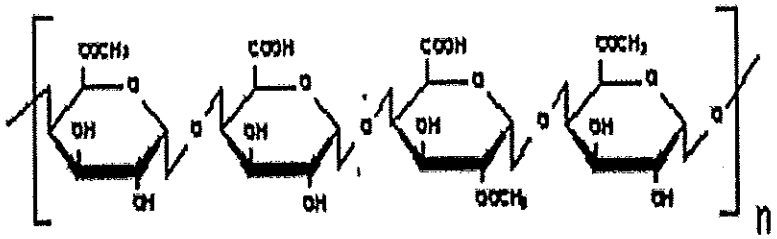
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ A) ไคติน และ B) ไคโตแซน

Figure 4. Chemical structures of A) chitin and B) chitosan

ที่มา: Barreteau และคณะ (2006)

1.1.2.2 เพคติน (Pectin)

เพคตินเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน สามารถละลายได้ในน้ำร้อน ประกอบด้วยหน่วยย่อยในสายหลักเป็นน้ำตาลแรมโนส (ภาพที่ 5) พบได้ในผลไม้ทุกชนิดในส่วนของผนังเซลล์ และ intracellular tissues และยังมีคุณสมบัติเป็นใยอาหาร (dietary fiber) พบประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไม่สามารถย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ ทำให้เพคตินสามารถช่วยให้เกิดการขับถ่ายได้ดี ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และยังช่วยทำหน้าที่ขัดขวางการดูดซึมของไขมันไม่ให้เข้ากระแสเลือด จึงป้องกันไม่ให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดในสมองตีบ ดังนั้นทางด้านเภสัชกรรมจึงได้มีการนำเพคตินมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มการทำงานของยา ช่วยลดคอเลสเตอรอลและระดับน้ำตาลในเลือด ใช้เป็นเส้นใยอาหารป้องกันโรคระบบทางเดินอาหาร และเนื่องจากเพคตินสามารถช่วยลดการระคายเคืองจึงมีการนำมาผลิตเป็นอาหารเด็ก เพคตินยังมีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อละลายน้ำจะพองตัวเป็นเจล ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มจึงนิยมใช้เพคตินเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยใช้เป็นตัวทำให้เกิดความยืดหยุ่น (gelling agent) ในผลิตภัณฑ์แยม เยลลี และขนมหวาน หรือช่วยทำให้เกิดความหนืด (viscosity) ในซอสเครื่องปรุง น้ำเชื่อมเข้มข้น น้ำสลัด เครื่องดื่ม และใช้เป็นตัวรักษาสภาพ (stabilizer) ในผลิตภัณฑ์นม และโยเกิร์ต เป็นต้น (Gray, 2006)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของเพคติน

Figure 5. Chemical structures of pectin

1.1.2.3 Exopolysaccharides (EPSs)

Exopolysaccharides เป็นโพลิเมอร์ที่สร้างโดยแบคทีเรียและ microalgae แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ขณะที่มีการเจริญ และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าสารเมือก (slime) ซึ่งแตกต่างจากสารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ที่เกาะอยู่กับผิวหน้าอย่างถาวรที่เรียกว่า capsular polysaccharides (Sutherland, 1985) โดยเฉพาะ EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่เป็นกลุ่มโพลิเมอร์ที่มีการศึกษากันมาก เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกจัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มที่มีความปลอดภัย

(Generally recognized as safe, GRAS) โดยได้นำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านอาหาร เพื่อเป็นการปรับปรุงผิวสัมผัสของอาหาร เป็นสารเพิ่มความหนืดในด้านอุตสาหกรรม ในด้านเภสัชกรรมใช้เป็นพลาสเตอร์ และเป็นสารห่อหุ้มตัวยาเพื่อควบคุมการออกฤทธิ์ของยาเฉพาะที่ เป็นต้น ซึ่ง EPSs ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสามารถจัดเป็น 2 กลุ่ม คือ homopolysaccharides และ heteropolysaccharides โดยอาศัยความแตกต่างขององค์ประกอบในโพลิเมอร์

-homopolysaccharides (HoPSs) เป็นโพลิเมอร์ที่มีน้ำตาลชนิดเดียวเป็นองค์ประกอบ หากโพลิเมอร์มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคส จะเรียก EPSs ชนิดนี้ว่ากลูแคน (glucan) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิต EPSs ชนิดนี้ได้ คือ *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* และ *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งพันธะ α-glucan และ β-glucan (Monson *et al.*, 2001 อ้างโดย Korakli and Vogel, 2006) และหากโพลิเมอร์มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลฟรุคโตส จะเรียกว่า ฟรุคแตน (fructan) ซึ่งแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิต EPSs ชนิดนี้ได้คือ *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Weissella* โดยสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจศึกษาสามารถผลิตฟรุคแตนชนิดอินนูลิน (inulin) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(1, 2) และลีแวน (levan) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(2, 6) (Monsan *et al.*, 2001) โดยที่ HoPSs ทั้ง glucan และ fructan มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ คือ glucosyltransferase และ fructosyltransferase ตามลำดับ และมีสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะในการผลิตคือน้ำตาลซูโครส

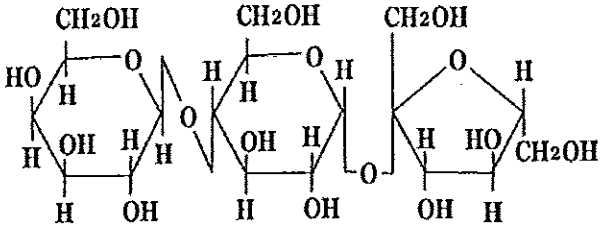
-heteropolysaccharides (HePSs) เป็นโพลิเมอร์ที่องค์ประกอบเป็นน้ำตาลต่างชนิดกัน ซึ่งแบคทีเรียแลกติกโดยส่วนใหญ่สามารถผลิต EPSs ชนิดนี้ได้ โดยที่น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบย่อยภายในสายโพลิเมอร์มักพบน้ำตาลกาแลคโตส และกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ และบางครั้งอาจพบน้ำตาลแรมโนส ฟรุคโตส แมนโนส และกาแลคโตส แต่พบในปริมาณน้อย (Van den Berg *et al.*, 1995; Degeest *et al.*, 2001)

1.1.3 พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

1.1.3.1 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครส เป็นผลผลิตมาจากการรวมตัวกันของแลคโตสและซูโครส (ภาพที่ 6) โดยเอนไซม์ ß-fructofuronosidase ซึ่งมีคุณสมบัติไปเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria มีรายงานว่า การให้แลคโตซูโครส ปริมาณ 3 กรัมต่อวัน แก่อาสาสมัคร 3 คน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ 0.7 เท่า และลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* spp.ได้ 0.6 เท่า (Ohkusa *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับการทดลองของ Hara และคณะ (1994) มีการให้แลคโตซูโครส (95 เปอร์เซ็นต์) แก่อาสาสมัคร 8 คน ปริมาณ 3 กรัม/ วัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และ ปริมาณ 6 กรัม/ วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งพบว่ามีจำนวนของ Bifidobacteria เพิ่มขึ้น และแบคทีเรียกลุ่ม Clostridia และ *Bacterioides* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และยังมีการรายงานถึง

การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันสายสั้นเช่น lactate และ acetate และพบการลดลงของ β-glucuronidase, azoreductase และ nitrate reductase อีกด้วย



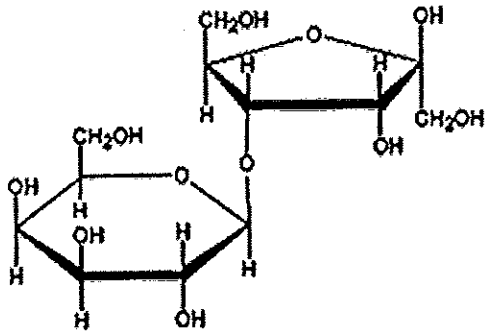
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของแลคโตซูโครส

Figure 6. Chemical structure of lactosucrose.

1.1.3.2 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลส ผลิตมาจากน้ำตาลแลคโตส โดยมีองค์ประกอบเป็นกาแลคโตสและฟรุคโตส โครงสร้างอยู่ในรูป Gal ß1-4 Fru (ภาพที่ 7) ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อยและไม่ละลายในอีเทอร์ ซึ่งแลคทูโลสจะไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก แต่จะเกิดการหมักที่ลำไส้ใหญ่มีผลทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่น ที่เป็นประโยชน์เจริญได้ดีขึ้น และยังมีรายงานการใช้แลคทูโลสเพื่อเป็นยาระบายในการรักษาอาการท้องผูก โดยพบว่าการให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องผูกเรื้อรัง (chronic constipation) รับประทานแลคทูโลสในปริมาณมากกว่า 20 กรัม/ วัน สามารถเพิ่มปริมาณการถ่ายอุจจาระในผู้ป่วยได้ ส่วนแลคทูโลสในปริมาณน้อยกว่า 20 กรัม/ วัน แสดงคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก คือ สามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ได้ (Saunders and Wiggins, 1981 อ้างโดย Tuohy *et al.*, 2005) จากการศึกษาโดยการให้แลคทูโลส 10 กรัมต่อวัน ในอาสาสมัคร 2 คน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีผลให้แบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Ballongue *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยมีผลลดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารก่อมะเร็ง (carcinogens) เช่น β-glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase เป็นต้น (Tuohy *et al.*, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ballongue และคณะ (1997) ศึกษาโดยให้แลคทูโลสแก่อาสาสมัคร 36 คน ปริมาณ 20 กรัม/ วัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของ Lactobacilli อีกทั้งยังลดปริมาณของ *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. และ Coliforms bacteria เป็นผลให้สามารถลดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับสารก่อมะเร็ง และสารเมทาบอไลท์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ได้ด้วย ซึ่งโดยปกติแล้วแลคทูโลสไม่มีหรือมีน้อยมากในอาหาร

ทั่วไปส่วนมากมีการนำแลคทูโลสไปใช้เป็น food additive ในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อเสริมสุขภาพ
ู่บริโภค



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของแลคทูโลส

Figure 7. Chemical structure of lactulose.

1.1.3.3 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharides, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ผลิตมาจากสารตั้งต้น คือ แป้ง ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,1-6 glucosidic ซึ่งในกระบวนการย่อยโดยใช้เอนไซม์เกิดขึ้น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ α-amylase และ pullulanase ร่วมกัน ในการเปลี่ยนแป้งเป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α, 1-4 glycosidic จากนั้นเป็นการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase เพื่อย่อย α, 1-6 glycoosidic linkage ซึ่งบางส่วนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ isomaltase ในลำไส้เล็กได้เป็นไอโซมอลโตส ซึ่งการสังเคราะห์IMO ในระดับอุตสาหกรรม สามารถใช้เอนไซม์ amylase, pullulanase และ α-glucosidase และมักใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารตั้งต้น โดยได้ผลผลิตเป็นสารผสมกันระหว่าง isomaltose, isomaltotriose และ panose (Kolida *et al.*, 2000) และจากการรายงานของ Olano-Martin และคณะ (2000) ศึกษาผลของไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกในลำไส้ ทำการศึกษาในอาสาสมัครผู้ชาย 6 คน ที่มีสุขภาพดีและแข็งแรง โดยให้ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ปริมาณ 20 กรัมต่อวัน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และสามารถเสริมการผลิตสารบิวไทเรทได้อีกด้วย

จากผลการศึกษาถึงศักยภาพความเป็นพรีไบโอติกของ IMO โดยเปรียบเทียบกันระหว่างความแตกต่างของสายพอลีแซคคาไรด์ของ Isomalto-900, IMO2 (isomaltose 63.8 เปอร์เซ็นต์ และ disaccharides 22.6 เปอร์เซ็นต์) และ IMO3 (panose 27.7 เปอร์เซ็นต์,

isomaltotriose 12.1 เปอร์เซ็นต์ และ tetra-, penta-หรือ hexasaccharides 50.1 เปอร์เซ็นต์) เปรียบเทียบกันในอาสาสมัครเพศชาย 2 กลุ่ม โดยให้รับประทาน IMO2 และ IMO3 ปริมาณ 5, 10 และ 20 กรัม/ วัน เป็นเวลา 12 วัน พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในอุจจาระของอาสาสมัครที่มีการรับประทาน IMO2 ปริมาณ 20 กรัม/ วัน ภายหลัง 12 วัน ส่วนในอาสาสมัครที่รับประทานในปริมาณ 5 และ 10 กรัม/วัน พบการเพิ่มขึ้นของโปรไบโอติกปริมาณน้อย และในอาสาสมัครที่รับประทาน IMO3 พบการเพิ่มขึ้นของโปรไบโอติกแบคทีเรียเช่นเดียวกัน แต่เพิ่มในปริมาณที่น้อยกว่า IMO2 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่แตกต่างกัน ซึ่งความยาวของสายโพลิเมอร์ของ IMO ทั้งสองชนิดที่แตกต่างกันนี้ ประกอบกับการที่เกิดการย่อยโดยเอนไซม์ isomaltase ในร่างกายมนุษย์ จึงทำให้เหลือ IMO ไปถึงลำไส้ใหญ่ในปริมาณน้อย ซึ่งทำให้พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียได้น้อย หรือไม่สามารถเห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์กับแบคทีเรียโปรไบโอติก สามารถผลิตบิวไทเรท ซึ่งบิวไทเรทจะมีผลในการควบคุมการเจริญของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ จึงสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ด้วย (Kaneko *et al.*, 1994 อ้างโดย Tuohy *et al.*, 2005) และในการศึกษาผลของไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเสริมการเจริญของของจุลินทรีย์โปรไบโอติกกลุ่ม Bifidobacteria โดยใช้ระบบ Human colonic-batch culture ซึ่งมีการเติม IMO ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ได้ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* และพบว่าปริมาณของ Clostridia ลดจำนวนลงด้วย (Rycroft *et al.*, 2001)

1.1.3.4 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharides, GOS)

กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ น้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β, 1-6 glucosidic สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase หรือ ß-glucosidase ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* หรืออาจเป็นการสกัดจาก ß-glucan จากข้าว หรือต้นโอ๊ต และจากการศึกษาผลของ GOS ต่อการเสริมการเจริญของ *Bifidobacteria breve* พบว่าสามารถเสริมการเจริญของโปรไบโอติกกลุ่มนี้ได้ และยังสามารถลดการปนเปื้อนของ *Salmonella typhimurium* ได้ (Asahara *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลการหมัก oligodextran โดยใช้ Human colonic-gut model ซึ่งมีการเติม oligodextran ลงไปปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการหมัก 21 วัน พบว่าจำนวนของ Bifidobacteria และ Lactobacilli เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถผลิตสารบิวไทเรทได้เพิ่มขึ้นเป็น 21.70 มิลลิโมลต่อลิตร (Olano-Martin *et al.*, 2000) สาร GOS ได้มีการยอมรับจาก FDA ในการนำมาใช้เป็น functional food แม้ว่า

ยังไม่แน่ชัดว่าเป็นสารพรีไบโอติก เนื่องจาก GOS ถูกย่อยได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides* (Valette *et al.*, 1993)

1.1.3.5.ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharide)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักๆ ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส ที่ต่อกันด้วยพันธะ β1-4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีค่า DP ประมาณ 2-5 จะถูกย่อยและถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งมีผลให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพิ่มขึ้น และสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* ได้ จากการให้ XOS ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/w) แก่หนูทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ดีกว่าการให้ fructo-oligosaccharides (Campbell *et al.*, 1997) และจากผลการศึกษาของ Rycroft และคณะ (2001) ที่ศึกษาจุลินทรีย์ผสมของอุจจาระมนุษย์ พบว่าหลังจากมีการให้ XOS เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว สามารถเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ภายหลัง 24 ชั่วโมง และยังสามารถลดจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides* ได้อีกด้วย

ในตลาดสากลมีการวางขายผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งมีชื่อทางการค้าเรียกแตกต่างกันไป (ตารางที่ 3) และมีการใช้และจำหน่ายมากในประเทศญี่ปุ่นและในตลาดยุโรป เช่น กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีชื่อทางการค้า คือ โอลิโกเมท (Oligomate) ที่ผลิตมาจากแลคโตส ซึ่งเป็นของเสียที่มีปัญหาในการกำจัดมากในอุตสาหกรรมนม โดยนำไปทำปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์ β-galactosidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็น กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น

ตารางที่ 3 โครงสร้างและองค์ประกอบของพรีไบโอติกทางการค้า

Table 3. Structure and composition of commercially available prebiotics.

Substrate	Oligosaccharide structure	Composition
Raftilose P95	Gluα1-2[βFru1-2]$_n$ where n=2-9 average 4-5	95% oligosaccharides
Raftiline LS	Gluα1-2[βFru1-2]$_n$ where n > 10 average 10-12	99% inulin
Lactulose	Galβ1-4Fru	99% lactulose
Xylo-oligosaccharides	Xylβ1-4[Xyl]$_n$ where n = 2-7	35% oligosaccharides
Oligomate 55	α-Glu1-4[βGal1-6]$_n$ where n = 1-4 average 2	50% oligosaccharides, 12% lactose, 38% monosaccharides
Soybean oligosaccharides	Stachyose (Galα1-6 Galα1-6 Gluα1-2 βFru) Raffinose (Galα1-6 Gluα1-2βFru)	25% stachyose, 10% raffinose, 50% sucrose, 15% monosaccharises
Isomalto-oligosaccharides	Gluα1-6 [GluV1-6]$_n$ where n = 1 average 1-2	91% oligosaccharides, 2% glucose, 7% high molecular weight (n = 11)

ที่มา: Rycroft และคณะ (2001)

1.2 พืชตระกูลถั่ว (The Grain Legumes)

พืชตระกูลถั่วเป็นที่รู้จักกันมานานทั่วโลก ที่รู้จักมีประมาณ 60 สายพันธุ์ และได้รับความนิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีสารอาหารสูง มีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในระดับสูงรวมทั้งแป้งและน้ำมัน ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมของประเทศที่กำลังพัฒนา เป็นพืชที่มีคุณสมบัติพิเศษในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศโดยอาศัยจุลินทรีย์ (*Rhizobium* spp.) ที่อยู่ร่วมกับพืชประเภทนี้

องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์สายสั้นๆ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3-10 โมเลกุล เช่น ราฟฟีโนสมีโครงสร้างเป็น α-gal-(1-6)- α-glu- (1-2)-β-fru (ตารางที่ 4) โดยมีคุณสมบัติเฉพาะตัว 2 อย่างคือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้

องค์ประกอบหลักที่เป็นแหล่งคาร์บอนในพืชตระกูลถั่วมากมายหลายชนิด เช่น โอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟีโนส (raffinose family of oligosaccharides; RFOs) (Wang *et al.*, 2003)

ตารางที่ 4 โครงสร้างของสารโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดในพืชตระกูลถั่ว

Table 4. Structures of oligosaccharides in legumes.

Oligosaccharides	Structure
raffinose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)- α-D-glucopyranosyl-(1-2) -β-D-fructofuranoside
stachyose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)- α-D-glucopyranosyl-(1-6) -α-D-glucopyranosyl-(1-2)- β-D-fructofuranoside
verbascose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)-[α-D-galactopyranosyl-(1-6)-]$_2$ -α-D-glucopyranosyl- (1-2)- β-D-fructofuranoside
ajugose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)-[α-D-glucopyranosyl-(1-6)-]$_3$ -α-D-glucopyranosyl- (1-2)- β-D-fructofuranoside

ที่มา: Hedley (2001)

โดยทั่วไปแล้วถั่วมีส่วนประกอบของสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีนประมาณ 20-30% และคาร์โบไฮเดรต ประมาณ 50-60 % ยกเว้นในถั่วเหลือง จะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าคาร์โบไฮเดรต และยังมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบอีก แตกต่างกันไปแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนมากแล้วองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตจะเป็นพวก soluble carbohydrates ดังแสดงในตารางที่ 5 คาร์โบไฮเดรตในถั่วแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วย raffinose, stachyose และ verbascose ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) โดยคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่วจัดอยู่ในกลุ่มราฟฟีโนส (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2005; Hedley, 2001)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงนลา อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตของถั่วแต่ละสายพันธุ์

Table 5. Concentration of carbohydrates composition in legume species.

Legume species	Starch	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Verbascose	Fibre[1]	total
Soybean	1.5	6.2	0.9	4.3	0.1	20	32.5
Lupin spp.	0.4	2.5	0.7	6.8	0.6	26	36.7
Chickpea	44.4	2.0	1.5	5.5	3.0	9	65.3
Mung bean	45.0	1.1	1.7	2.0	3.0	7	60.0
Pigeon pea	44.3	2.5	1.0	3.0	4.0	10	64.9
Jack bean	35.0	1.5	0.7	1.5	0.1	9	47.8
Common bean	41.5	5.0	0.3	4.1	0.1	10	61.3
Faba bean	41.0	3.3	0.2	0.7	2.5	12	59.8
Lentil	46.0	2.9	0.5	2.4	0.9	12	64.4
Pea	45.0	2.1	0.9	2.4	3.2	12	65.5

Fibre[1]: รวม insoluble และ soluble carbohydrates

ที่มา: Hedley (2001)

1.3 การย่อยอาหารของระบบทางเดินอาหาร

เมื่อมีการบริโภคอาหารเข้าสู่ร่างกาย ระบบทางเดินอาหารจะมีหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยนรูปของอาหารที่บริโภค ให้อยู่ในรูปของสารอาหารที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ พบว่าเกิดการย่อยอาหารลำดับแรกที่บริเวณปาก และสิ้นสุดการย่อยที่ลำไส้เล็ก

น้ำลายมีบทบาทในการย่อยอาหารในปาก พบว่าน้ำลายถูกหลั่งออกมาจากต่อมน้ำลายประมาณวันละ 1-1.5 ลิตร น้ำลายมีส่วนประกอบของเอนไซม์ที่สามารถย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตและไขมันได้ ในน้ำลายมีเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส (α-amylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไปย่อยหรือไปทำลายพันธะที่โมเลกุล แอลฟา 1, 4 ไกโคซิคิด (α-1, 4-glycosidic bonds) ถ้ามีการย่อยอาหารคาร์โบไฮเดรตเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ก็จะได้โมเลกุลต่างๆ คือ มอลโตส มอลโตไทรโอส และแอลฟาลิมิทเด็กทรินส์ (α-limit dextrins) นอกจากนี้ยังพบการย่อยไขมันได้บางส่วน โดยปกติการย่อยอาหารภายในช่องปากจะเกิดขึ้นน้อยมากเพราะเวลาที่อาหารอยู่ในปากเป็นช่วงเวลาสั้นๆ เมื่ออาหารผ่านหลอดอาหารส่งมาสู่กระเพาะอาหาร จะมีน้ำย่อยที่หลั่งออกมาจากกระเพาะอาหาร คือ

(ก) กรดเกลือ หรือกรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid: HCl) กรดไฮโดรคลอริคที่หลั่งเข้าไปในกระเพาะอาหารจะทำให้พีเอชในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรด มีพีเอชประมาณ 1-3 ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียที่ปะปนเข้าไปกับอาหาร แบคทีเรียที่เป็นจัดเป็นโปรไบโอติกและสารกลุ่มพรีไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดจากกระเพาะอาหารได้ เพื่อให้ผ่านไปที่ลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกอาศัยอยู่ได้

(ข) เปบซิน (pepsin) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนในอาหาร ที่หลั่งออกมาจากกระเพาะอาหาร แต่ถึงแม้จะไม่มีเอนไซม์เปบซินในกระเพาะอาหารพบว่าน้ำย่อยโปรตีนจากตับอ่อน และลำไส้เล็กก็สามารถที่จะทำการย่อยอาหารประเภทโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์

(ค) น้ำเมือก (mucus) เป็นไกลโคโปรตีนที่หลั่งเข้าไปในกระเพาะอาหารเพื่อเคลือบชั้นเยื่อบุของกระเพาะอาหาร ป้องกันอันตรายต่อเซลล์เยื่อบุที่เกิดจากอาหารในขณะที่มีการบีบตัวของกระเพาะอาหาร

(ง) สารอินทรินซิค (intrinsic factor) เป็นไกลโคโปรตีนที่หลั่งเข้าไปในกระเพาะอาหารและจับกับวิตามิน เพื่อไม่ให้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ต่างๆ จากกระเพาะอาหารและตับอ่อน และสามารถถูกดูดซึมได้ในบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย

เมื่ออาหารตกลงมาถึงลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นส่วนที่มีการย่อยเกิดขึ้นมากที่สุด แหล่งของเอนไซม์ย่อยอาหารมาจากตับอ่อนและลำไส้เล็ก โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากตับอ่อนจะหลั่งออกมาในรูปที่ยังไม่ทำงาน หรือเรียกว่า ไซโมเจน (zymogen) เช่น ทริปซิโนเจน (trypsinogen) และถูกเอนไซม์เอนเทอโรเปบทิเดส (enteropeptidase) ที่ผนังลำไส้เล็กกระตุ้นให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ทำงานได้ คือ ทริปซิน (trypsin) ส่วนน้ำย่อยที่หลั่งจากตับอ่อน (pancreatic juice) มีสภาพเป็นด่างเนื่องจากมีไบคาร์บอเนตหลั่งออกมาด้วย จึงมีผลทำให้เกิดสภาพที่เป็นกลางของอาหารในลำไส้เล็กซึ่งมาจากกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด เนื่องจากเอนไซม์จากตับอ่อนจะทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกลาง

ลำไส้ใหญ่ทำหน้าที่ดูดกลับน้ำออกจากส่วนที่จะกลายเป็นกากอาหาร แล้วสะสมอยู่ที่ส่วนท้ายสุดของลำไส้ คือ ไส้ตรง (rectum) เพื่อรอการขับถ่ายออกเป็นอุจจาระทางทวารหนัก สารคัดหลั่งจากลำไส้ใหญ่ คือสารเมือก ซึ่งอัตราการหลั่งสารเมือกขึ้นอยู่กับการกระตุ้นจากอาหารเหลวภายในลำไส้ใหญ่ สารเมือกที่หลั่งออกมาในบริเวณลำไส้ใหญ่จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายต่อชั้นเยื่อบุลำไส้ใหญ่เนื่องมาจากกากอาหาร นอกจากนี้สารเมือกยังช่วยทำให้เกิดการรวมตัวกันของอุจจาระเป็นก้อน และยังช่วยป้องกันอันตรายอันเนื่องมาจากแบคทีเรียที่จะไปทำอันตรายต่อเยื่อบุลำไส้ได้ ส่วนอาหารที่ไม่ถูกย่อยจากระบบทางเดินอาหารเมื่อเดินทางมาถึงลำไส้ใหญ่ จะมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (แบคทีเรียโปรไบโอติก) โดยในระบบทางเดินอาหารมนุษย์นั้นมีทั้งแบคทีเรียที่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* sp. และ

แบคทีเรียกลุ่มโปรไบโอติก เช่น Lactobacilli และ Bifidobacteria ซึ่งจำนวนแตกต่างกันออกไปในบริเวณที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อแบคทีเรียโปรไบโอติกได้รับสารอาหารกลุ่มพรีไบโอติก ช่วยให้โปรไบโอติกเพิ่มจำนวน อีกทั้งยังช่วยรักษาสมดุลและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารมนุษย์

Table 6. Composition of human gastro-intestinal flora.

Bacterial flora	Stomach	Jejunum	Ileum	Faeces
Total bacterial count/ ml	0-10	$0\text{-}10^5$	$10^3\text{-}10^7$	$10^{10}\text{-}10^{12}$
Aerobic or facultative bacteria				
Enterobacteria	$0\text{-}10^2$	$0\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^6$	$10^{10}\text{-}10^{12}$
Streptococci (including *Peptostreptococcus* sp.)	$0\text{-}10^3$	$0\text{-}10^4$	$10^2\text{-}10^6$	$10^3\text{-}10^{10}$
Staphylococci	$0\text{-}10^2$	$0\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^5$	$10^4\text{-}10^7$
Lactobacilli	$0\text{-}10^3$	$0\text{-}10^4$	$10^2\text{-}10^5$	$10^6\text{-}10^{10}$
Fungi	$0\text{-}10^2$	$0\text{-}10^2$	$10^2\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^6$
Anaerobic bacteria				
Bacteroides	rare	$0\text{-}10^2$	$10^3\text{-}10^7$	$10^{10}\text{-}10^{12}$
Bifidobacteria	rare	$0\text{-}10^3$	$10^3\text{-}10^5$	$10^8\text{-}10^{12}$
Gram-positive cocci	rare	$0\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^3$	$10^8\text{-}10^{11}$
Clostridium spp.	rare	rare	$10^2\text{-}10^4$	$10^6\text{-}10^{11}$
Eubacteria	rare	rare	rare	$10^9\text{-}10^{12}$

ที่มา: Simon and Gorbach (1984)

1.3.1 กระบวนการหมักพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่

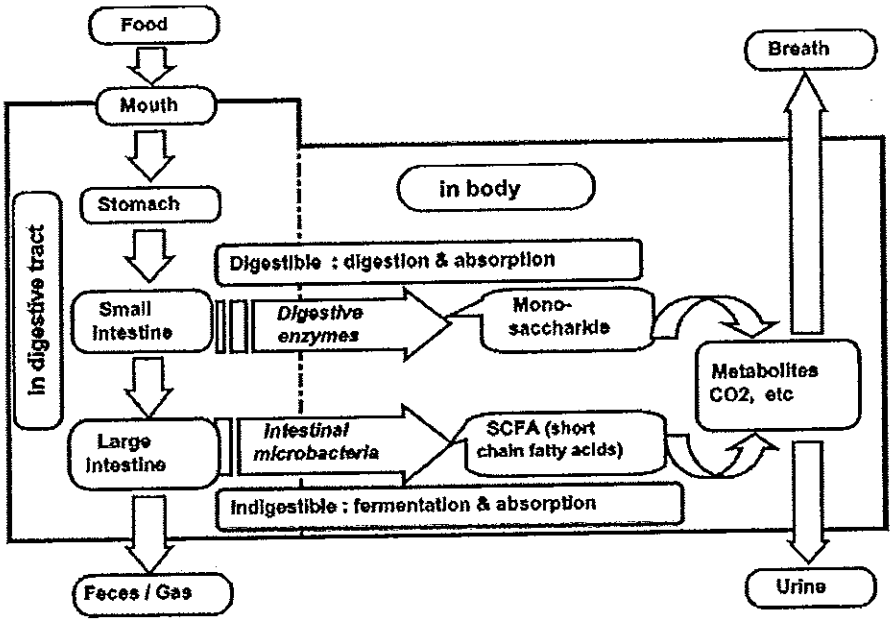
ภายในลำไส้ใหญ่จะเกิดกระบวนการหมักของสารที่เหลือจากการย่อยที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งกระบวนการหมักจะเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ

1.3.1.1 การหมักแบบแซคคาโรไลติก (Saccharolytic)

การหมักสารอาหารกลุ่มแซคคาไรด์ เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ จุลินทรีย์ที่เกิดการหมักสารกลุ่มนี้ ได้แก่ Bifidobacteria และ Lactobacilli ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นกรดไขมันสายสั้น เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวไทริก นอกจากนี้ยังมีก๊าซเกิดขึ้นด้วย (Cummings *et al.*, 2001) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นนี้จะถูกนำไปใช้ในรูปแบบต่างๆ ภายในร่างกาย (ภาพที่ 8) กรดอะซิติกถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ กรดโพรพิโอนิกถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์พลังงานในรูปของ ATP ส่วนกรดบิวไทริกจะใช้ในการแบ่งเซลล์ของลำไส้ใหญ่ และเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย การหมักแบบแซคคาโรไลติกในลำไส้ใหญ่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น เพิ่มความนิ่มแก่อุจจาระช่วยในการขับถ่าย และช่วยในการสังเคราะห์วิตามิน

1.3.1.2 การหมักแบบโปรติโอไลติก (Proteolytic)

การหมักสารอาหารกลุ่มโปรตีน โดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridia* และ *Bacteroides* ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะได้สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก เอมีน และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (Gibson, 2004)



ภาพที่ 8 ความแตกต่างระหว่างกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารแซคคาไรด์ที่ย่อยได้ และไม่สามารถย่อยได้ในระบบการย่อย

Figure 8. Differences in the metabolic pathways digestible and indigestible saccharides.

ที่มา: Hirayama (2002)

1.3.2 บทบาทและความสำคัญของสารพรีไบโอติก

สารกลุ่มพรีไบโอติกไม่มีผลโดยตรงต่อสุขภาพแต่จะใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักภายในลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีประโยชน์โดยตรงต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติก เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ที่อยู่ในลำไส้ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารพรีไบโอติกและผลิตสารเมทาบอไลท์ได้แตกต่างกัน สารประกอบที่แบคทีเรียโปรไบโอติกผลิตขึ้นจากการย่อยและการหมักสารพรีไบโอติก ได้แก่ สารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (แบคเทอริโอซิน) กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid: SCFA) โดยเฉพาะ SCFA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ สามารถผลิตได้ปริมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ (กรัม SCFA/ กรัมสับสเตรท) ซึ่งในแต่ละวันจะมีการผลิตออกมาประมาณ 300-500 มิลลิโมล โดย SCFA ที่เกิดขึ้นประกอบไปด้วย อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวไทเรท (Cumming and Englyst, 1995) สามารถพบปริมาณ SCFA สูงสุดที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (ascending colon) และมีปริมาณลดลงในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (descending colon) ซึ่งกรดไขมันที่ได้ทั้งสามชนิดมีบทบาทการทำงานที่แตกต่างกัน โดยที่อะซิเตทจะถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ ไต และหัวใจ โพรพิโอเนทจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP และมีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ส่วนบิวไทเรทจะใช้ในการแบ่งเซลล์ของลำไส้ใหญ่ ซึ่งสามารถควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cellular proliferation) และกระบวนการตายของเซลล์ (program cell death) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพในการหมักสารพรีไบโอติกของแบคทีเรียโปรไบติก และบทบาทต่อสุขภาพของผู้บริโภคอีก ดังนี้

1.3.2.1. ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (pathogens) ซึ่งภายในลำไส้ใหญ่มีจุลินทรีย์อยู่รวมกันหลายกลุ่ม ทั้งกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคและกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ โดยสารพรีไบโอติกไปกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก เช่น bifidobacteria และ lactobacilli ให้มีการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และผลิตกรดไขมันสายสั้น ซึ่งมีผลทำให้พีเอชในลำไส้ลดลง ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่จะเป็น กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก ซึ่งกรดเหล่านี้จะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ในลำไส้ เป็นต้น (Salminen, 2001) นอกจากนี้ยังสามารถทำให้แบคทีเรียโปรไบโอติกมีการผลิตสาร antibiotics และ antimicrobials สูงขึ้น โดยจากการศึกษาผลของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และอินนูลิน ที่ทำการทดลองในหนูทดลอง พบว่าหนูที่ได้รับสารพรีไบโอติกทั้งสองชนิดนี้สามารถป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ และสามารถป้องกันการเกิดเนื้องอกได้ (Gibson, 2004)

1.3.2.2 ลดอาการท้องผูกโดยกรดไขมันซึ่งผลิตโดย Bifidobacteria จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้อุจจาระนิ่มขึ้นขับถ่ายได้ง่าย (Tomomatsu, 1994) ซึ่งพบรายงานการใช้แลคทูโลสซึ่งเป็นสารพรีไบติกชนิดหนึ่ง เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยใช้เป็นยาระบายในการรักษาอาการท้องผูก พบว่าการให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องผูกเรื้อรัง (chronic constipation) รับประทานแลคทูโลสในปริมาณมากกว่า 20 กรัม/ วัน สามารถเพิ่มปริมาณการถ่ายอุจจาระในผู้ป่วยได้ ส่วนแลคทูโลสในปริมาณน้อยกว่า 20 กรัม/ วัน แสดงคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก คือ สามารถเพิ่มของ Bifidobacteria ได้ (Saunders and Wiggins, 1981 อ้างโดย Tuohy *et al.*, 2005)

1.3.2.3. ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด พบว่ากระบวนการหมักสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่มีผลลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดยไปกระตุ้นการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ซึ่งจะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ พบว่าสารในกลุ่ม เพคติน กัวกัม และ β-glucan ซึ่งจัดเป็นสารที่มีไฟเบอร์สูง สามารถลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้โดยการที่ไฟเบอร์มีลักษณะเหนียวหนืด จะไปช่วยเคลือบผนังลำไส้ ทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกายลดลง (Conway, 2001) และจากรายงานของ Pereira และคณะ (2003) ในการเลี้ยงแบคทีเรีย *L. fermentum* ร่วมกับสารพรีไบโอติกชนิด กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ *L. fermentum* อีกทั้งยังพบว่ามีปริมาณของกรดไขมันสายสั้น คือโพรพิโอเนท และบิวไทเรท เพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ และ 52 เป็น 157 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีผลไปลดซีรั่มคอเลสเตอรอลโดยเกิดการสังเคราะห์ bile acids ซึ่งส่งผลไปลดการละลายของคอเลสเตอรอล ทำให้การเกิดดูดซึมของคอเลสเตอรอลบริเวณลำไส้ใหญ่น้อยลง

1.3.2.4. ช่วยลดความดันโลหิต ได้มีการศึกษาถึงผลของ fructo-oligosaccharides ในผู้ป่วยที่มีระดับไขมันในเลือดสูง ที่บริโภค fructo-oligosaccharides เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ความดันโลหิตลดลงโดยเฉลี่ย 6 มิลลิเมตรปรอท และยังพบว่าความดันโลหิตแปรผกผันกับจำนวนของ Bifidobacteria ในลำไส้อีกด้วย (Tomomatsu, 1994)

1.3.2.5. ช่วยเพิ่มวิตามิน และแร่ธาตุบางชนิด โดยพบว่า Bifidobacteria สามารถผลิตวิตามิน B_1, B_2, B_6, B_{12}, nicotinic acid และ folic acid นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และเหล็ก (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001) ในระบบย่อยอาหารอีกด้วย ถึงแม้ว่าการดูดซึมแคลเซียมจะเกิดขึ้นหลักในลำไส้เล็ก แต่ก็ยังคงมีการดูดซึมในลำไส้ใหญ่อยู่ กลไกในการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ เกิดจากกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกทำให้เกิดกรด

ไขมันสายสั้น ส่งผลต่อค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ลดลงจึงทำให้แคลเซียมละลายได้ดีขึ้น ทำให้มีการดูดซึมได้ดีขึ้นด้วย เกิดกลไกการแลกเปลี่ยนแคลเซียมภายในลำไส้ โดยเกิดจากการแลกเปลี่ยนโปรตอนระหว่างแคลเซียมและกรดไขมันสายสั้น (SCFA) ที่เกิดจากกระบวนการหมักของสารพรีไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียโปรไบโอติกภายในลำไส้ (Conway, 2001) และจากการศึกษาผลของอินนูลินต่อการดูดซึมและการปรับสมดุลของแร่ธาตุต่างๆ ในร่างกาย โดยให้อินนูลินแก่อาสาสมัครวัยผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดี จำนวน 9 คน ให้รับประทานอินนูลินในปริมาณ 40 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่าสามารถดูดซึมแคลเซียมและปรับสมดุลแร่ธาตุได้ดีขึ้น และพบว่าการให้อินนูลินแก่อาสาสมัครวันละ 15 กรัม เป็นเวลา 21 วัน ให้ผลการดูดซึมธาตุเหล็กและแคลเซียมได้ดีขึ้น และจากการศึกษาโดยให้หนูรับประทานอาหารที่มีแคลเซียม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับโอลิโกฟรุคโตส ปริมาณ 0, 25, 50 และ 100 กรัม เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าหนูที่รับประทานแคลเซียมที่ผสมกับโอลิโกฟรุคโตส สามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมได้ดีขึ้น และมีการดูดซึมแคลเซียมได้ดีขึ้นเมื่อหนูได้รับโอลิโกฟรุคโตสในปริมาณที่เพิ่มขึ้น (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001)

1.3.2.6. ช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในร่างกายมนุษย์ สามารถจะสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมสารกลุ่มโปรตีนโดยการหมักแบบ proteolytic ได้ มีการศึกษาถึงผลของโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และทางห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่าถ้าใช้โอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารตั้งต้นแก่จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะช่วยลดปริมาณสารพิษ และเอนไซม์ที่เป็นโทษลงเฉลี่ยประมาณ 44.6 และ 40.9 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังช่วยป้องกันการทำงานของตับ โดยการลดปริมาณของสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึม เป็นผลให้ปริมาณสารพิษที่เข้าสู่ตับลดลงด้วย (Tomomatsu, 1994)

1.3.2.7. ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ จะเห็นว่าบริเวณลำไส้ใหญ่เป็นแหล่งที่สะสมของเสีย และเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด ดังนั้นจึงมีโอกาสเกิดโรคต่างๆ ได้โดยเฉพาะโรคมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นได้มากกว่าในลำไส้เล็กถึง 100 เท่า มีการพิสูจน์แล้วว่าสารพรีไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้ โดยช่วยควบคุมการผลิตสารหรือกระบวนการเมทาบอไลท์สารอาหารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (Rowland and Tanaka, 1993; Reddy *et al.*, 1997; Conway, 2001) ดังนั้นจึงมีแนวทางในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยเจาะจงไปที่พรีไบโอติกซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งกลไกการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ของสารพรีไบโอติกมีดังนี้

(ก) การเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ให้เป็นไปในแนวทางที่จะลดการเกิดสารที่ส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น การเกิดเมทาบอลิซึมของไขมัน และโปรตีนที่จะทำให้เกิดสารก่อมะเร็งขึ้น โดยอาจมีผลในการเปลี่ยนเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย *Clostridia* และ *Bacteroides* จากการเกิด proteolysis ไปเป็น saccharolysis นอกจากนี้พรีไบโอติกยังมีบทบาทในการส่งเสริมให้แบคทีเรียแลกติกผลิตสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่จะผลิตสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ และยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าสารพรีไบโอติกยังมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น azoreductase, nitroreductase, ß-glucuronidase เป็นต้น ลดปริมาณสารประกอบที่เป็นอันตรายต่างๆ เช่น แอมโมเนีย อินโดล และ พาราครีซอล (p-cresol) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มะเร็งยิ่งลุกลามขึ้น (Reddy, 1998) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียโปรไบโอติกมีกระบวนการหมักแบบไร้อากาศของคาร์โบไฮเดรตในลำไส้ใหญ่ มีส่วนในการสร้างสารต่างๆ ซึ่งมีบทบาทต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งได้โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้กลไกต่างๆ ในการป้องการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ของสารพรีไบโอติกนั้นยังมีกลไกที่เกิดร่วมกันกับแบคทีเรียโปรไบโอติก

(ข) การผลิตสารที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง เช่น กรดไขมันสายสั้น กลุ่มอะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวไทเรท โดยเฉพาะบิวไทเรท (Conway, 2001) ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการ apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ จึงได้มีความพยายามที่จะหาสารพรีไบโอติกที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวไทเรทให้ได้ปริมาณมาก ซึ่งส่งผลในการป้องกันมะเร็งของเซลล์ลำไส้ใหญ่โดยตรง จากการศึกษาผลของโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) และอินนูลิน ต่อการกระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ของหนู ทำการทดลองในหนู 3 กลุ่ม โดยหนูกลุ่มแรกให้รับประทานอาหารธรรมดา หนูกลุ่มที่ 2 รับประมานอาหารที่มีการเติมโอลิโกฟรุคโตส 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ ปริมาตร) กลุ่มที่ 3 รับประทานอาหารที่มีการเติมอินนูลิน 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ ปริมาตร) หลังจากเลี้ยงไป 3 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์การเกิด apoptosis ในลำไส้ใหญ่ พบว่าอินนูลินและโอลิโกฟรุคโตส สามารถกระตุ้นการเกิด apoptosis ได้สูงกว่าหนูที่รับประทานอาหารธรรมดา (Hughes and Rowland, 2001)

1.4. โปรไบโอติก (Probiotic)

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน และมีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของ

มนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น โปรไบโอติกนำมาใช้ครั้งแรกในงานวิจัยของ Lilly และ Stillwell ในปี ค.ศ. 1965 ซึ่งอ้างถึงสารที่โปรโตซัวชนิดหนึ่งขับออกมา แล้วช่วยในการกระตุ้นการเจริญของ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงกันข้ามกับยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด (Kaur *et al.*, 2002)

1.4.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ดี

1.4.1.1 สามารถสร้างกรดแลกติก ทำให้กระเพาะอาหารเป็นกรดมากขึ้นจึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น และปรับสภาพของทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (ตารางที่ 7) (Fuller, 1989; Isolauri *et al.*, 2004)

1.4.1.2 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula and Thelappurate, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway, 1996) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตมากที่พีเอช 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 และ *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงที่สุดที่พีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000)

1.4.1.3 ควรเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่ได้รับโปรไบโอติก เช่น เพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์ หรือต้านทานการเกิดโรคในสัตว์ และไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค

1.4.1.4 เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเพิ่มจำนวนได้มาก สามารถมีชีวิตอยู่รอดและทำงานได้ในลำไส้ใหญ่

1.4.1.5 มีความคงทนและสามารถรอดชีวิตได้ในสภาพการเก็บรักษาและในขณะทำการทดลอง

1.4.1.6 ทนต่อกรดโดยเฉพาะกรดจากน้ำย่อยหรือจากกระเพาะอาหาร

1.4.1.7 มีคุณสมบัติในการเจริญรวดเร็ว คือ ต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนน้อย และมีความสามารถในการมีชีวิตอยู่ได้ในลำไส้สัตว์ ช่วยย่อยสลายกากอาหารแล้วให้ผลผลิตเป็น กรดอะมิโน กรดไขมัน และวิตามิน

1.4.1.8 ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดพันธุกรรมการต้านยา

1.4.1.9 สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

ตารางที่ 7 กลไกการเสริมสุขภาพของโปรไบโอติก

Table 7. Health promoting effects and mechanisms of probiotic substances.

Beneficial effects	Mechanisms	References
Reduce risk of pathogen infection	Decreased pH and produced bacteriocins inhibited growth of undesirable bacteria	Tzortzis *et al.* (2004)
Improve mineral absorption	Decreased pH; increased mineral solubility	Bosscher *et al.* (2003)
Decrease lipids and chloresterol	-Increased short-chain fatty acid (SCFA) modulated lipogenesis -Lowering of pH & biles precipitation -Suppression of hepatic triglyceride and very low density lipoprotein (VLDL) synthesis -Reduced fatty acid synthesis in the liver	Delzenne *et al.* (2003)
Decrease risk of cancer	Increased butyrate; fule for colonocytes and cell differentiation Decreased bile acid formation Decreased genotoxic metabolites and enzymes and carcinogens	Brady *et al.* (2000)
Immune system	Direct contact of lactic acid bacteria or bacterial product with immune cells in the intestine Production of SCFA	Schley and Field (2002) Salminen, S. (2001)
Reduce constipation Reduce diarrhoea	Feacal bulkink and fibre like effect	Mizota.(1996)

1.4.2. กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

ความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดการเจริญภายในลำไส้ใหญ่ ส่งผลให้คนและสัตว์มีความสามารถในการต้านทานโรค โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหาร โดยปกติในสัตว์มักมีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารตามสภาพแวดล้อมและอาหารที่กินเข้าไป ดังนั้นปัจจัยสำคัญที่เข้ามาเกี่ยวข้องต่อการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ได้แก่ การสุขาภิบาล การใช้สารปฏิชีวนะ และความเครียด ซึ่งความเครียดในกรณีของสัตว์นั้นเกิดขึ้นได้เสมอ เช่น ความเครียดเกิดจากการเปลี่ยนอาหาร การขนย้าย อากาศและสภาพแวดล้อม จากการวิจัยพบว่าขณะที่สัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ จะมีผลทำให้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะกลุ่มโคลิฟอร์ม แต่การเจริญของ *Lactobacillus* spp. ลดลงซึ่งมีผลทำให้สัตว์เกิดอาการท้องร่วงได้ ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกจึงสามารถลดการสูญเสียเนื่องจากสามารถควบคุมปริมาณของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้

Parker (1974) และ Fuller (1989) ได้ทำการศึกษาการใช้โปรไบโอติกแทนสารปฏิชีวนะ มีรายงานว่าเมื่อให้สัตว์กินเข้าไปแล้วโปรไบโอติกจะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญหรือเกาะติดกับผนังลำไส้ใหญ่ทุกส่วน โดยเฉพาะการแทรกตัวอยู่ที่ร่องผนัง (villi) ของลำไส้มีการย่อยการสลายของกากอาหารแล้วสร้างกรดแลกติก ซึ่งกรดแลกติกจะทำลายหรือยับยั้งเชื้อก่อโรค Vesterlund และคณะ (2005) เห็นว่าการเกาะติดของแบคทีเรียแลกติกที่ผนังลำไส้ใหญ่ คือ ปัจจัยหลักในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถเป็นโปรไบโอติกได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่สามารถเกาะติดกับผนังลำไส้ใหญ่ได้นั้น สามารถต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ไม่มีการเกาะติด (non-adhesive) ที่ผนังลำไส้ใหญ่

ในปี ค.ศ. 2004 Arici และคณะ ได้ทำการทดลองแยก lactobacilli จากอุจจาระเด็กอายุต่ำกว่า 2 ปี และนำ lactobacilli ที่แยกได้จำนวน 20 สายพันธุ์ ไปทดสอบการผลิตกรด การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 28213, *S. aureus* ATCC 2392, *Yersinia enterocolitica* และ *Bacillus cereus* ได้

แบคทีเรียแลกติกที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกโดยทั่วไป เช่น Lactobacilli และ Bifidobacteria มีคุณสมบัติในการป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ (ตารางที่ 8) (Reid and Burton, 2002) โดยพบว่า Lactobacilli ในช่องคลอด จะมีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการลดความเสี่ยงของการเกิดการติดเชื้อในช่องคลอด และการติดเชื้อในระบบปัสสาวะ(Rousseau *et al.*, 2005) โดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการเกาะติด (anti-adhesion) ของแบคทีเรียก่อโรค คือ การผลิต by-products เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน ซึ่งการกำจัดแบคทีเรียก่อ

โรคจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันด้วย และการที่แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกมีการเกาะติดและแพร่กระจายทุกพื้นที่ทำให้ปิดกั้นการเกาะติดของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรียและไวรัส การที่มันแปลกปลอมจะดึงดูดให้ macrophage เดินทางมามาก จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้ดีขึ้น (Kaur *et al.*, 2002) และนอกจากนี้โปรไบโอติกยังมีความสามารถในการผลิตสารซึ่งจำเป็นต่อสัตว์ เช่น กรดอะมิโน กรดแลกติก และวิตามิน และยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะอ่อนๆ ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ดีอีกด้วย

ตารางที่ 8 แบคทีเรียแลกติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกทางการค้า

Table 8. Lactic acid bacteria used as commercial probiotics.

Lactobacilli	Bifidobacteria	Streptococci	Enterococci
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	*Bif. bifidum*	*St. thermophilus*	*Ent. faecalis*
L. acidophilus	*Bif. longum*		*Ent. faecium*
L. rhamnosus	*Bif. breve*		
L. reuteri	*Bif. infantis*		
L. casei			

ที่มา: Fooks และคณะ (1999)

1.4.3 แบคทีเรียแลกติก (Lactic Acid Bacteria)

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ รูปร่างลักษณะเป็นรูปกลมหรือท่อน มีทั้งท่อนที่เป็นท่อนสั้นและท่อนยาว การเจริญต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดไม่ต้องการอากาศ (strict anaerobe) ไม่สร้างเอนไซม์แคแทเลส(catalase) ไม่มีระบบไซโตโครม ไม่เคลื่อนที่ ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลกติก ซึ่งในกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิต extracellular products ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค ได้แก่ กรดแลกติก กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน (Kaur *et al.*, 2002)

สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียแลกติกตาม Metabolic pathways และผลผลิตที่ได้จากการหมักออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1.4.3.1 Homofermentative lactic acid bacteria

เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathways: EMP pathways ให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ (Wistereich, 1997) พบในจีนัส *Lactococcus*, *Lactobacillus* และ *Pediococcus* เป็นต้น

1.4.3.2 Heterofermantative lactic acid bacteria

เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Pentose phosphoketolase pathways ให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติก กรดอะซิติก เอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Wistereich, 1997) พบในจีนัส *Leuconostoc* และ *Lactobacillus*

สมาชิกที่สำคัญในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ Genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Vagococcus* และ *Tetragencococcus* เป็นต้น การจัดจำแนกของแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้ อาศัยทั้งลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ปัจจุบันได้มีการนำความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการจัดหมวดหมู่ ทำให้มีความชัดเจนถูกต้องมากขึ้น

ในสภาวะที่ลำไส้มีแบคทีเรียแลกติกลดลง และมีแบคทีเรียที่มีโทษมากขึ้น มักทำให้เกิดอาการท้องผูก ของเสียและสารพิษที่แบคทีเรียให้โทษผลิตออกมาจะหมักหมมอยู่ในลำไส้ใหญ่และถูกดูดซึมกลับเข้ากระแสเลือดไปตามอวัยวะต่างๆ ในร่างกายทำให้เกิดการเสียสมดุล เช่นทำให้ระบบควบคุมการสังเคราะห์และการสลายคอเลสเตอรอลในร่างการเสียไป และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคบกพร่องซึ่งรวมถึงภูมิต้านทานต่อการเกิดมะเร็งด้วย (Roberfroid, 2002)

แบคทีเรียแลกติกจะสร้างสารชนิดหนึ่งที่เรียกว่า สารแบคเทอริโอซิน ซึ่งได้แก่ อะซิโดลิน (acidolin), อะซิโดฟิลิน (acidophilins), บุลการิแคน (bulgarican), แลคโตซิลิน(lactocilins) และไนซิน (nisin) ที่สามารถทำลายแบคทีเรียที่ให้โทษต่อร่างกายได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการเจ็บคอ แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วง เช่น Pathogenic *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง เช่น *Helicobacter pylori* หรือแม้แต่แบคทีเรียตามผิวหนังที่ทำให้เป็นแผลผุพองเรื้อรังและดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เช่น Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Bogovic-Matijasic and Rogelj, 1998; Torodov *et al.*, 2004)

1.4.4 แบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก

Genus *Lactobacillus* ซึ่งลักษณะทั่วไปของ Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว มีขนาดสั้นยาวแตกต่างกัน กว้างตั้งแต่ 0.5 ถึง 1.2 ไมโครเมตร และยาว 1.0 ถึง 10.0 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ ถ้ามีการเคลื่อนที่จะใช้แฟลกเจลลารอบตัว ไม่สร้างเอนไซม์แคแทเลส แต่อาจมีบางสายพันธุ์สลายเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์ซูโดแคแทเลส (pseudocatalase) ส่วนใหญ่ไม่สร้างสารสี ถ้าสร้างจะมีสีเหลือง ส้ม จนถึงสีแดงอิฐ หรือสีสนิม ต้องการสารอาหารพิเศษในการเจริญ เช่น amino acids, peptides, nucleic acid และ vitamins อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญโดยทั่วไปคือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสม คือ 5.5-5.8 หรือต่ำกว่า ส่วนในพีเอชที่เป็นกลางหรือเริ่มเป็นด่างในระยะแรกของการเจริญ (lag phase) จะยาวขึ้นหรือการเจริญลดลง แบคทีเรียพวกนี้พบในน้ำนม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำ เบียร์ ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง และมีการสร้างกรดแลกติกและสารอื่นๆ ออกมาเป็นผลิตผลพลอยได้ (Suskovic *et al.*, 2001) Lactobacilli แบ่งตามลักษณะการใช้และการสร้างสารอาหารออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1.4.4.1. Obligately homofermentative lactobacilli เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จากกลูโคส แต่ไม่เกิดแก๊ส การใช้กลูโคสของน้ำตาลกลุ่มนี้จะใช้โดยผ่าน Embden-Meyerhof Parnes pathway (EMB) มีเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ fructose-1, 6-biphosphate-aldolase แต่จะไม่มีเอนไซม์ phosphoketolase และไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคเนตและเพนโตส ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, L. delbruekii, L. helveticus, L. jensenii, L. amylovorus* และ *L. ruminis* เป็นต้น

1.4.4.2 Facultatively heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักทั้งน้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโตส ได้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกและกรดอะซีติก มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ aldolase และ phosphoketolase ได้แก่ *L. plantarum, L. pentosus, L. casei, L. sake* และ *L. rhamnosus* เป็นต้น

1.4.4.3 Obligately heterofermentative lactobacilli สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้โดยใช้ phosphogluconate pathway ส่วนน้ำตาลเพนโตสจะเข้าสู่ pathway นี้เช่นเดียวกัน ผลผลิตที่ได้คือ กรดแลกติก กรดอะซีติก แอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ *L. brevis, L. buchneri, L. bifermentans, L. cinfusus* และ *L. hilgardii* เป็นต้น

ความสำคัญของ *Lactobacillus* มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์มาช้านานไม่เพียงแต่ในอาหารเท่านั้น แต่ยังพบว่ามีความสำคัญด้านอื่นๆ อีกด้วย สามารถสรุปความสำคัญได้ดังนี้

(ก) เพิ่มคุณภาพของอาหารหมัก เพราะความสามารถในการเปลี่ยน lactate ให้เป็นกรดแลกติก จึงเป็นเชื้อที่ช่วยในการหมักพืชผัก ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และเครื่องดื่มต่างๆ ทั้งยังสามารถผลิตสารที่ช่วยเพิ่ม กลิ่น รส ให้อาหารหมักได้ด้วย (Suskovic *et al.*, 2001)

(ข) สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ สารยับยั้ง ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีการนำไปใช้ในอาหารอย่างกว้างขวาง (Helander *et al.*, 1997)

(ค) ควบคุมสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการผลิตกรดทำให้พีเอชในทางเดินอาหารต่ำลง เชื้อก่อโรคที่ชอบพีเอชเป็นกลางไม่สามารถเจริญได้ และผลิตสารยับยั้งต่างๆ มาทำลายเชื้อในทางเดินอาหาร ทั้งยังแย่งจับผนังทางเดินอาหารกับแบคทีเรียก่อโรค (Suskovic *et al.*, 2001)

(ง) กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งการได้รับแบคทีเรียแลกติกผ่านระบบทางเดินอาหาร สามารถกระตุ้นให้ร่างกายผลิตแอนติบอดี (antibody) ทั้ง local และ circulatory antibody, gramma interferon, macrophage และ natural killer cells (Herich and Levkut, 2002)

(จ) ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด มีการศึกษาพบว่า คนที่ดื่มนมที่มี *Lactobacillus* ในปริมาณมากระยะหนึ่ง พบว่าระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง กลไกการลดอาจเกิดจากเชื้อมีการใช้คอเลสเตอรอล หรือคอเลสเตอรอลถูกดูดซับอยู่ที่ผนังเซลล์ของ *Lactobacillus* (Pereira and Gibson, 2002)

(ฉ) ลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งในลำไส้ ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่อาจเนื่องจากเชื้อไปมีผลในการเปลี่ยนแปลง metabolites ของแบคทีเรียอื่นๆ ในลำไส้เปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของลำไส้ พร้อมทั้งกระตุ้นให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อสารก่อมะเร็งเพิ่มมากขึ้น (Helander *et al.*, 1997)

1.4.5 การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก

1.4.5.1 กรดแลกติก (Lactic acid)

แบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์สามารถสร้างกรดแลกติกได้ โดยการเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลกติก ทำให้พีเอชของอาหารลดลง มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Helander *et al.*, 1997)

1.4.5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกไม่มีเอนไซม์แคแทเลส ที่จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น กลายเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Helander *et al.*, 1997)

1.4.5.3 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

ไดอะซิทิล เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ *Lactococcus* spp. เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดที่ความเข้มข้น 300-1000 ppm ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 µg/ml (Helander *et al.*, 1997)

1.4.5.4 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน แบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *Lactobacillus fermentum, L. heveticus, L. acidophilus, L. plantarum, Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus* สำหรับแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ nisin ซึ่งผลิตโดย *Lactococcus lactis* ซึ่งปัจจุบันได้มีการอนุญาตให้ใช้เป็น preservative ในอาหารมากกว่า 50 ประเทศ เนื่องจาก nisin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และเชื้อรา อาหารที่มีการนำ nisin ไปใช้ ได้แก่ เนยแข็ง นม โยเกิร์ต เครื่องดื่มหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา และผักบรรจุกระป๋อง (Helander *et al.*, 1997) แบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Vibrio anguillarum, V. salmonicida* และ *Proteus vulgaris* (Strom and Ringo, 1993; Ringo and Gastesoupe, 1998) นอกจากนี้ carnocin ที่ผลิตจาก *Carnobacterium piscicola* มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* (Lewus *et al.*, 1991)

1.4.5.5 รูทีรีน (Reuterin)

รูทีรีนเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็น β-hydroxy propionaldehyde ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีปานกลาง ได้จากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus reuterin* รูทีรีนสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทั้งแกรมบวก แกรมลบ รวมถึงยีสต์ รา โปรโตซัว เช่น *Salmonella, Staphylococcus, Listeria* และ *Clostridium* (Helander *et al.*, 1997)

1.5. ซินไบโอติก (Synbiotic)

ผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก คือ ผลิตภัณฑ์ที่มีการรวมกันของทั้งโปรไบโอติกและพรีไบโอติก จุดประสงค์คือเพื่อเพิ่มอัตราการอยู่รอดของโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารให้มีชีวิตรอดมากขึ้น โดยเกิดการเกาะติดกับผนังลำไส้ และสามารถเกิดการหมักในลำไส้ใหญ่ได้ดีขึ้น หากร่างกายได้รับทั้งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (โปรไบโอติก) ไปพร้อมกับสารพรีไบโอติกที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมาก (Holzapfel and Schillinger, 2002) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกวางจำหน่ายแล้วแถบทวีปยุโรป เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มีการรวมกันระหว่างฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ผสมกับโปรไบโอติกพวก *Lactobacillus* หรือ *Bifidobacterium* (Conway, 2001) จากรายงานของ Bouhnik และคณะ (1997) ทำการทดลอง โดยให้ *Bifidobacterium* ร่วมกับอินนูลิน แก่อาสาสมัครสุขภาพดี ปริมาณ 18 กรัมต่อวัน พบว่า จำนวนของ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้นจาก 7.7 log CFU/ml เป็น 9 log CFU/ml และเมื่อให้โปรไบโอติกโดยไม่ให้อินนูลินร่วมด้วย พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อในขนาดเดียวกันที่มีอินนูลินร่วมที่ให้แก่อาสาสมัครได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้หนูรับประทานผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกที่มีการผสมสารพรีไบโอติกชนิดโอลิโกฟรุตโตส 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ bifidobacteria ที่มีชีวิตปริมาณมากกว่า 10^9 เซลล์ เปรียบเทียบกับระหว่างหนูที่กินอาหารปกติ และหนูที่มีการกินแบคทีเรียโปรไบโอติก เป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูที่กินผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนของ bifidobacteria ประมาณ 1.4 log CFU ต่อกรัมอุจจาระ เมื่อเปรียบเทียบกับการให้หนูกินแต่ bifidobacteria เพียงอย่างเดียวมีการเพิ่มขึ้นขึ้นแค่ 0.6 log CFU ต่อกรัมอุจจาระ (Bielecka *et al.*, 2002) และในปี ค.ศ. 2000 Menne และคณะ ทำการทดลองโดยให้นมที่มี *Lactobacillus* ร่วมกับ Oligofructose สามารถที่จะเพิ่มจำนวนของ *Bifidobacterium* ได้ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์กลุ่ม Coliforms

มีรายงานว่าผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก มีผลต่อการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยสามารถลดการพัฒนาของเซลล์ที่สามารถเกิดโรคมะเร็งลำไส้ได้ เมื่อให้อินนูลินหรือโอลิโกฟรุคโตสประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารที่บริโภค พร้อมกับการให้แบคทีเรียสุขภาพโปรไบโอติก คือ *Bifidobacterium longum* สังเกตพบว่ามีการลดลงของเซลล์ก่อนที่จะเกิดเป็นเนื้องอก

(preneoplastic lesion) เมื่อให้โปรไบโอติก *B. longum* พร้อมกับอินนูลินทางปากสามารถลดปัจจัยดังกล่าวได้มากกว่าการให้โปรไบโอติก *B. longum* หรือให้อินนูลินเพียงอย่างเดียว (Reddy, 1999) และจากผลการศึกษาซินไบโอติกในระดับ *in vivo* โดยทำการศึกษาในหนูทดลองจำนวน 16 ตัว โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่มีการให้อาหารธรรมดาปริมาณ 20 กรัม/ วัน กลุ่มที่สองให้ผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกในปริมาณ low dose คือ 1.5 กรัม/ กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู/ วัน และกลุ่มที่สามให้ซินไบโอติกในปริมาณ high dose คือ 7.5 กรัม/ กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู/ วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยซินไบโอติกที่ใช้คือ FloraGuard® (Viva Life Science, Costa Mesa, CA, USA) มีส่วนผสมระหว่างโปรไบโอติก คือ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* และ *Streptococcus thermophilus* ส่วนพรีไบโอติกที่ใช้ คือ อินนูลินที่สกัดจากชิคอรี เมื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียพบว่า *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งกลุ่ม low dose และ high dose โดยที่กลุ่ม coliform bacteria ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่ากิจกรรมของ lipase, sucrase และ isomaltase ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วน lactase พบกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญในกลุ่ม low dose ในขณะที่พบกิจกรรมของ lipase และ disaccharidase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม high dose เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการที่ให้ซินไบโอติกในปริมาณที่เป็น low dose มีความเพียงพอต่อการส่งเสริมสุขภาพของร่างกาย host (Yang *et al.*, 2005) จากรายงานการศึกษาสารซินไบโอติก จุดประสงค์หลักเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการใช้สารพรีไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อให้คงคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกภายในระบบทางเดินอาหาร และให้ประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภคอย่างเต็มที่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสารสกัดจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดจากพืชตระกูลถั่วที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกร่วมกับสารสกัดที่คัดเลือกได้
4. เพื่อศึกษาผลการเจริญของเชื้อในการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคโดยมีสารสกัดที่คัดเลือกได้เป็นแหล่งคาร์บอน

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

ตัวอย่างพืชถั่วจากร้านค้าในตลาดพลาซ่า อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ทำการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแบ่งพืชถั่วเป็น 2 กลุ่มคือ

2.1.1 ถั่วธัญพืช

(1) ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.)

(2) ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek)

(3) ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

(4) ถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*)

(5) ถั่วดำ (*Vigna mungo* L.)

2.1.2 ถั่วที่บริโภคเป็นผัก

(1) ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata var. sesquipedalis*)

(2) ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*)

(3) ถั่วลันเตา (*Pisum sativum* (L.) *var. macrocarpon* ser.)

(4) ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.)

2.2 จุลินทรีย์

2.2.1 แบคทีเรียก่อโรค	ที่มา
Salmonella enterica serovar Typhi	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Staphylococcus aureus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Escherichia coli O157: H7 DMST 12743	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

2.2.2 แบคทีเรียโปรไบโอติก	ที่มา
Lactobacillus acidophilus TISTR 875	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)
Lactobacillus plantarum TISTR 450	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
H_2SO_4	Merck/ Analytical/ Germany
HCl	Lab scan/ Analytical/ Thailand
NaOH	Merck/ Analytical/ Germany
Nutrient Agar (NA)	Labscan/ Analytical/ Thailand
Nutrient Broth (NB)	Labscan/ Analytical/ Thailand
Mueller Hinton Agar (MHA)	Himedia/ Analytical/ India
Mueller Hinton Broth (MHB)	Himedia/ Analytical/ India
De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia/ Analytical/ India
Tween 80	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
Chloramphanical	Sigma/ Analytical/ Germany
Nitrogen gas	Commercial 98 percentage/ Thailand
NaCl	Merck/ Analytical/ Germany
KCl	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
Na_2HPO_4 $2H_2O$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
NaH_2PO_4	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
$CaCl_2 2H_2O$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
$MgCl_2$ $6H_2O$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
Na_2SO_3	Merck/ Analytical/ Germany
Sodium potassium tartrate	Merck/ Analytical/ Germany
3,5-Dinitrosalicylic acid	Fruka/ Germany
Phenol	Fisher Scientific/ Analytical/ England

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
Peptone water	Merck/ Germany
Yeast extract	Himedia/ Analytical/ India
K_2HPO_4	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
KH_2PO_4	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
$CaCl_2.6H_2O$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
$MgSO_4.7H_20$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
$NaHCO_3$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
Tween 80	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
Cysteine–HCl	Fluka/ Germany
Bile salt (Oxgall)	Himedia/ India
Catalase	Sigma/ Germany
$C_{12}H_6NNaO_4$ (resazurin)	Sigma/ Germany
α-amylase	Sigma/ Germany
D-Glucose	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
Bromocresol purple	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorius/ USA
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorius/ USA
เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation)	Büchi Rotavapor® R-200/205, Switzerland
เครื่อง GC-FID	Hewlette Packard รุ่น HP 6850/ USA
Haematocytometer	Diamond/ Taiwan
Vortex Mixer	Labnet/ USA
กล้องจุลทรรศน์	Nikon/ USA
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach/ Germany

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Scientific promotion/ Philadelphia/ USA
ตู้อบแรงดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy/ Japan
Microtiterplat 96 flat bottom WI	NUNC™/ Denmark
Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร	-
Microtiterplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek/ UK
พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo/ Thailand
ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	LabMate/ USA
ไมโครปิเปต (ขนาด 1000ไมโครลิตร)	Gilson/ France
Multichanels pipet (20-200 ไมโครลิตร)	Transferpette® -8/ Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert/ USA
Hunter lab รุ่น ColorFlex	Hunter Associates Laboratory/ USA

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การคัดเลือกสารสกัดพืชตระกูลถั่วที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

2.5.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำตัวอย่างพืชตระกูลถั่วทั้ง 2 กลุ่ม คือ ถั่วที่เป็นธัญพืช เช่น ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.), ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek), ถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*), ถั่วดำ (*Vigna mungo* L.), ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) และถั่วที่บริโภคเป็นผัก คือ ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata var. sesquipedalis*), ถั่วลันเตา (*Pisum sativum* (L.) *var. macrocarpon* Ser.), ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) และ ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.) โดยนำวัตถุดิบมาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นถั่วสดเป็นชิ้นยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำถั่วทั้งสองกลุ่มมาวัดความแก่อ่อนของตัวอย่างพืชโดยการสุ่มตัวอย่างพืชมาทำการวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab จากนั้นนำถั่วทั้งสองประเภทไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง การอบทำให้สะดวกแก่การเก็บรักษา สามารถเก็บตัวอย่างมาได้ครั้งละมากๆ ในครั้งเดียวเพื่อใช้ได้ตลอดการทดลอง เมื่อทำการอบแห้งแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้ของพืชแต่ละชนิด) โดยเครื่อง moisture analyzer ตามวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค จากนั้นนำตัวอย่างพืชอบแห้งเก็บใส่ถุงปิดผนึกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ทำการสกัดต่อไป

2.5.1.2 การสกัดตัวอย่างพืช

(ก) การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชตระกูลถั่วโดยใช้เอทานอล

นำพืชถั่วทั้งสองประเภท ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วแดง ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเหลือง ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วแขก และถั่วพู ที่ได้จากการเตรียมวัตถุดิบในข้อที่ 2.5.1.1 นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดโดยเติมสารละลายเอทานอลเป็นตัวกลาง ปั่นด้วยเครื่องปั่น(Blender) ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้ว 10 กรัม เติมเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ตัวอย่าง 10% ในสารละลาย) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/ นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ เพื่อแยกกากออก แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/ นาที เวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาของแข็งออกจากสารสกัด จากนั้นนำตัวอย่างมาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator จากนั้นนำตัวอย่างมาทำเป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ชั่งน้ำหนักที่ได้และเก็บสารสกัดในถุงซิป ที่ใสในกล่องที่มีสารดูดความชื้นและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป คำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดถั่วแต่ละชนิดดังนี้

$$\frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชก่อนการสกัด}} \times 100$$

นำตัวอย่างสารสกัดผงแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Miller (1959) (อ้างโดย Robertson *et al.*, 2001) และหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ด้วยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Fox and Robyt, 1991) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ค

(ข) การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชตระกูลถั่วโดยใช้น้ำ

การสกัดในขั้นตอนนี้ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.5.1.2 ข้อ (1) แต่ใช้น้ำกลั่นแทน 50 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล โดยนำตัวอย่างพืชที่ได้จากการเตรียมในข้อที่ 2.5.1.1 นำตัวอย่างมาบดในน้ำกลั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender) ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้ว 10 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ตัวอย่าง 10% ในสารละลาย) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/ นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองเครื่องกรองสุญญากาศเพื่อแยกกากออก แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/ นาที เวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาของแข็งออกจากสารสกัด จากนั้นมาทำเป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้และเก็บสารสกัดในถุงซิป ที่ใส่ในกล่องที่มีสารดูดความชื้นและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป คำนวณเปอร์เซ็นต์

ผลได้ของสารสกัดถั่วแต่ละชนิดตามสมการในข้อ 2.5.1.2 และนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Miller (1959) (อ้างโดย Robertson *et al.*, 2001) และหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ด้วยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Fox and Robyt, 1991) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ค

2.5.1.3 ความสามารถในการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรด

เตรียมสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.5.1.2 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น จากนั้นทำการเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ (Korakli *et al.*, 2002) โดยใช้สารสกัด 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ HCl buffer (0.1 โมลลาร์) ที่พีเอชต่างๆ คือ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทขนาด 24 หลุม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง มาเติมสารละลาย 1.0 M NaOH ปริมาตร 340, 210 และ 120 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในตัวอย่างที่พีเอช 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เพื่อปรับพีเอชของตัวอย่างให้เป็นพีเอช 7 และหยุดปฏิกิริยาการย่อยด้วยกรด จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Miller (1959) (อ้างโดย Robertson *et al.*, 2001) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ค แล้วนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโดย

$$\text{Acid hydrolysis (\%)} = \frac{\text{Reducing sugar release (Final – Initial reducing sugar)}}{\text{Total sugar content - Initial reducing sugar}} \times 100$$

คัดเลือกสารสกัดที่มีร้อยละการย่อยสลาย (hydrolysis) จากขั้นตอนการทนต่อการย่อยด้วยกรด โดยอาศัยการที่สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกจะต้องสามารถเหลือผ่านถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Cummings and Englyst, 1995) จึงคัดเลือกจากขั้นตอนการทนต่อการย่อยด้วยกรดที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายต่ำกว่าหรือเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และค่าปริมาณเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อย (Non-digestible carbohydrate) ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยคำนวณได้จาก

Non-digestible carbohydrate (%) เท่ากับ

$$\frac{\text{(Total sugar ที่เวลาเริ่มต้น – Total reducing sugar หลังจากการย่อย)}}{\text{Total sugar ที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$$

2.5.1.4 ความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic (α-amylase)

นำสารสกัดที่คัดเลือกจากขั้นตอนการทนต่อการย่อยด้วยกรด ที่ผ่านการย่อยกรดที่พีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาปรับพีเอชเป็น 6.9 โดยใช้ 1.0 M NaOH จากนั้นดูดสารสกัดหลังการปรับพีเอชแล้วมาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทขนาด 96 หลุม แล้วเติมเอนไซม์ human pancreatic (α-amylase) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ในสารสกัดเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ปริมาตรทั้งหมดในหลุมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร) และสารสกัดที่เป็นหลุมควบคุมให้เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเอนไซม์ แทนการเติมเอนไซม์ human pancreatic จากนั้นเขย่าไมโครไตเตอร์เพลทเบาๆ ให้สารผสมกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/ นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไมโครไตเตอร์เพลทมาปิดด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 0, 2, 4 และ 10 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเอนไซม์ นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นและหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ 6 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Miller (1959) (อ้างโดย Robertson *et al.*, 2001) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ค แล้วนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย (% hydrolysis) โดยเอนไซม์ α-amylase

คัดเลือกสารสกัดที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย (% hydrolysis) จากขั้นตอนการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Enzymatic hydrolysis (\%)} = \frac{\text{Reducing sugar release (Final -- Initial reducing sugar)} \times 100}{\text{Total sugar content - Initial reducing sugar}}$$

และคำนวณปริมาณเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อย (Non-digestible carbohydrate) โดยเลือกสารสกัดที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 2.5.2 ต่อไป โดยมีสูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อยดังนี้

$$= \frac{(\text{Total sugar ที่เวลาเริ่มต้น} - \text{Total reducing sugar หลังจากการย่อย})}{\text{Total sugar ที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$$

2.5.2. ผลของสารสกัดถั่วต่อการเจริญของโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค

2.5.2.1 การทำบริสุทธิ์บางส่วนและการแยกสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์

ก่อนนำสารสกัดที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.5.1.4 ไปทดสอบขั้นตอนในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จำเป็นต้องมีการทำบริสุทธิ์บางส่วน และแยกสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ออกจากสารสกัดหยาบ เพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารประกอบโมเลกุลเล็กอื่นๆ โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นที่ความเข้มข้นสุดท้าย 90 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างตะกอนโดยนำมาตะกอนมาละลายและตกตะกอนซ้ำในเอทานอลด้วยวิธีการเดิม จากนั้นทำการแยกตะกอนออกด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต้องการจะอยู่ในส่วนของตะกอน โดยที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารประกอบโมเลกุลเล็กอื่นๆ จะอยู่ในส่วนใส จากนั้นนำส่วนของตะกอนและส่วนใส มาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator และทำเป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) และเก็บไว้ในถุงซิปที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในกล่องที่มีสารดูดความชื้นเพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Miller (1959) (อ้างโดย Robertson *et al.*, 2001) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย GPC (ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร)

2.5.2.2 ความสามารถของสารสกัดถั่วในการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติก

นำสารสกัดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 2.5.2.1 มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย คือ *L. acidophilus* TISTR 875 และ *L. plantarum* TISTR 450 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่แยกมาจากกุ้ง (ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ และคณะ, 2549) ในอาหาร minimal medium (Fook *et al.*, 1999) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ คือ peptone 2.0 กรัม/ ลิตร, yeast extract 2.0 กรัม/ ลิตร, NaCl 0.1 กรัม/ ลิตร, K_2HPO_4 0.04 กรัม/ ลิตร, KH_2HPO_4 0.04 กรัม/ ลิตร, $CaCl_2.6H_2O$ 0.01 กรัม/ ลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม/ ลิตร, $NaHCO_3$ 2.0 กรัม/ ลิตร, Tween 80 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร, Cysteine-HCl 0.5 กรัม/ ลิตร, Bile salt 0.5 กรัม/ ลิตร และสารสกัดตัวอย่างที่คัดเลือกและเตรียมจากข้อ 2.5.2.1 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน (โดยคิดเทียบเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1000 มิลลิกรัม) (ดัดแปลงจาก Bielecka *et al.*, 2002) ซึ่งในการทดลองจะใช้น้ำตาลกลูโคสแทนสารสกัดตัวอย่างเป็นชุดควบคุมทำการทดลองดังนี้คือ ถ่ายเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก คือ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้ออีกเป็นเวลา 18

ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 1.0×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจางเชื้อเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร minimal medium เป็น 1.30×10^{5} และ 1.21×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่มีการเติมสารสกัดที่คัดเลือกได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการศึกษาผลของสารสกัดถั่วที่คัดเลือกได้ ต่อการเจริญของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ มีชุดควบคุม คือน้ำตาลกลูโคสแทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ (เพาะเลี้ยงโดยใช้ขวดฉีดยาที่มีการพ่นก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศที่อยู่ภายในขวด มีการเติม cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร และ rezasurin ปริมาณ 0.02 กรัม/ลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์บ่งชี้ว่ายังมีอากาศอยู่ภายในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่ จากนั้นปิดขวดฉีดยาให้สนิทด้วยฝาอลูมิเนียมที่บุยางด้านใน) เก็บตัวอย่างด้วยเข็มฉีดยา (syringe) ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต โดยการ spread plate บนอาหาร MRS วัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก และวัดปริมาณการใช้สารสกัดหลังจากการหมักโดยการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยนำตัวอย่างที่เวลาต่างๆ มาหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ด้วยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Fox and Robyt, 1991) เปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่เวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการเจริญของเชื้อ (Fook and Gibson, 2003; Olano-Martin *et al.*, 2000) รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ใช้ไป โดยคำนวณปริมาณเปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดที่ถูกใช้ (% Carbohydrate utilized) ไปดังนี้

$$= \frac{\text{(Total sugar ที่เวลาเริ่มต้น - Total sugar ที่เวลาสุดท้าย)}}{\text{Total sugar ที่เวลาเริ่มต้น}} \times 100$$

คัดเลือกสารสกัดถั่วที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ดีที่สุด 1 ชนิด เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 2.5.2.3 ต่อไป

2.5.2.3 ความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

นำสารสกัดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 2.5.2.1 และสามารถเสริมการเจริญของโปรไบโอติกได้ดีที่สุด 1 ชนิด จากข้อ 2.5.2.2 มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก คือ *L. acidophilus* TISTR 875 และ *L. plantarum* TISTR 450 ในอาหาร minimal medium (Fook *et al.*, 1999) ที่มีสารสกัดตัวอย่างที่คัดเลือกและเตรียมจากข้อ 2.5.2.1 เป็นแหล่งคาร์บอน (โดยคิดเทียบเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1000 มิลลิกรัม) (ดัดแปลงจาก

Bielecka *et al.*, 2002) ซึ่งในการทดลองจะใช้น้ำตาลกลูโคสแทนสารสกัดตัวอย่างเป็นชุดควบคุมทำการทดลองดังนี้คือ

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi โดยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากอาหารวุ้นเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) จำนวน10 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้ออีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Sal. enterica* ser. Typhi เท่ากับ 1.50×10^{9} และ 2.50×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ *S. aureus* มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.50×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อทั้งสามชนิดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร minimal medium เป็น 1.05×10^{5}, 8.75×10^{4}, 9.95×10^{4} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่มีการเติมสารสกัดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2.1 ที่มีปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะศึกษาผลของสารสกัดต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแต่ละสายพันธุ์ โดยมีชุดควบคุมคือใช้น้ำตาลกลูโคสแทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ (เพาะเลี้ยงโดยใช้ขวดฉีดยาที่มีการพ่นก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศที่อยู่ภายในขวด มีการเติม cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร โดยมี rezasurin เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและปิดสนิทด้วยฝาอลูมิเนียมที่บุยางด้านใน) เก็บตัวอย่างด้วยเข็มฉีดยา ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตด้วยการ spread plate บนอาหาร Mueller Hinton Agar (Fook and Gibson, 2003; Olano-Martin *et al.*, 2000)

2.5.2.4 ผลของสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้นของโปรไบโอติก

นำสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2.2 มาวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น โดยนำน้ำหมักที่ชั่วโมง 24 และ 48 มาวิเคราะห์ ซึ่งทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดย นำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ใน ข้อ 2.5.2.2 ที่ชั่วโมง 24 และ 48 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำตัวเซลล์ออก หลังจากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับอะซีโตน 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันสายสั้นด้วย GC-FID (Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector) analyzer (Hewlette Packard รุ่น HP 6850, USA) โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWax capillary ซึ่งทำจาก polyethylene glycol ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25

มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร กำหนดให้มีสภาวะการทำงาน คืออุณหภูมิของ injector เท่ากับ 230 องศาเซลเซียส และมีการนำตัวอย่างเข้าแบบ split less อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จะเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีการไหลของก๊าซฮีเลียม 30 มิลลิลิตรต่อนาที และก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวส่งตัวอย่างจากปลาย column เข้าสู่ detector เมื่อ GC-FID analyzer พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ ฉีดตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง autoinjector (Hewlette Packard, USA) ที่ injector port และสแกนด้วยเครื่องสแกนอัตโนมัติซึ่งจะคำนวณปริมาณของกรดไขมันสายสั้นแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีค (peak) เปรียบเทียบกับพีคทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม ChemStation ในการวิเคราะห์ใช้สารมาตรฐานกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวไทริก ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน (Laurentin and Edwards, 2004)

2.5.2.5 ศึกษาสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในน้ำหมักที่ได้จากการเจริญของโปรไบโอติก

ศึกษาโดยนำน้ำหมักที่คัดเลือกได้จากการเจริญของโปรไบโอติก (*L. plantarum* และ *L. acidophilus*) ร่วมกับสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน จากข้อ 2.5.2.2 และใช้น้ำหมักจากการเจริญของโปรไบโอติกที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นชุดควบคุม ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค คือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ทำการทดลองโดยนำน้ำหมักที่คัดเลือกได้ จากชั่วโมงที่ 72 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ 8,000 รอบ/ นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก มาแบ่งได้เป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ไม่มีการปรับส่วนใส

ส่วนที่ 2 มีการปรับพีเอชโดยใช้ 1.0 M HCl หรือ 1.0 M NaOH โดยปรับส่วนใสให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5-7.0

ส่วนที่ 3 มีการเติมเอนไซม์คะตะเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ส่วนที่ 4 มีการปรับพีเอชส่วนใสให้เท่ากับ 6.5-7.0 และมีการเติมเอนไซม์คะตะเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำส่วนใสทั้ง 4 ส่วนมานำมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามวิธี Microdilution assay (ภาคผนวก ค) ในไมโครไตเตอร์เพลท 96 หลุม โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากอาหารวุ้น

แข็งเอียงที่เก็บไว้ใน Stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว MHB จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ลงในอาหารใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว minimal medium จากนั้นทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี broth microdilution assay ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วยแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิด 5.20×10^5 , 4.75×10^5 และ 5.10×10^5 CFU/ml จำนวน 100 ไมโครลิตรในทุกหลุม นำส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวแรก แล้วทำการเจือจางลำดับสอง (two-fold dilution) ด้วยอาหาร minimal medium โดยดูดส่วนใสจากหลุมแรกปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลุมแถวที่สองแล้วผสมกันกับอาหารเหลว โดยดูดขึ้นลงจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลุมต่อไป ซึ่งแต่ละหลุมจะมีปริมาณเชื้อเท่ากันทุกหลุม และมีส่วนใสของน้ำหมักที่มีความเข้มข้นเจือจางเป็นสองเท่าถัดลงมาในไมโครเพลท โดยมี positive control คือ เชื้อแบคทีเรียผสมกับ minimal medium และ negative control คือ ส่วนใสของน้ำหมักผสมกับ minimal medium จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูกิจกรรมการยับยั้งโดยคัดเลือกหลุมที่ไม่เกิดความขุ่น แสดงว่ามีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ รายงานผลเป็นค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยคำนวณในหน่วยของ Arbitary unit ต่อมิลลิลิตร (AU ต่อมิลลิลิตร) ดังต่อไปนี้

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ ml)} = \frac{\text{1,000 ไมโครลิตร x Dilution factor}}{\text{100 ไมโครลิตร}}$$

โดยนำระดับความเจือจาง (dilution factor) ที่มองไม่เห็นความขุ่น (เทียบกับชุดควบคุม negative control) คูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หารด้วยปริมาตรส่วนใสที่เติมลงไปทดสอบ (Pilasombut *et al.*, 2006) เปรียบเทียบกันกับระหว่างส่วนใสทั้ง 4 ชนิด

2.5.3 ศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่ว (Co-cultivation)

ทดสอบการเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สารสกัดที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5.2.2 เป็นแหล่งคาร์บอน (โดยคิดเทียบเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1000 มิลลิกรัม) โดยทำการเตรียมแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค เช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.2 และ 2.5.2.3 โดยทำการเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรีย (*L. plantarum* และ *L.*

acidophilus) ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้ออีกเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 1.0×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจางเชื้อเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 3.50×10^{6} และ 2.75×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับจากนั้นนำแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* O157: H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.3 ที่ทำการเจือจางลงเหลือ 4.75×10^{6}, 5.20×10^{6}และ 5.50×10^{6}CFU ต่อมิลลิลิตร และโปรไบโอติกมาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร minimal medium เช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.2 โดยปรับจำนวนเชื้อโปรไบโอติกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9.20×10^{4} และ 9.10×10^{4} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในอาหาร minimal medium โดยมีชุดควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนสารสกัด ชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียวกับสารสกัด และชุดควบคุมการเจริญของโปรไบโอติกเพียงชนิดเดียวกับสารสกัด บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ทุก 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนำไปวัดจำนวนของโปรไบโอติกแบคทีเรียและแบคทีเรียก่อโรคโดยการ spread plate บนอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar ที่มีการเติมอินดิเคเตอร์ bromocresol purple 0.2 % เนื่องจากแบคทีเรียโปรไบโอติกจะสามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองได้ เลือกนับเฉพาะโคโลนีที่มีสีเหลืองล้อมรอบ ส่วนแบคทีเรียก่อโรคทำการ spread plate บนอาหาร Nutrient Agar (NA) โดยนับจำนวนแบคทีเรียก่อโรคภายใน 18-24 ชั่วโมง และรายงานผลการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก และแบคทีเรียก่อโรคที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยเปรียบเทียบระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคกับชุดการทดลองควบคุม (ดัดแปลงจาก Virginia และคณะ, 1999)

2.5.4 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดที่คัดเลือกได้จากพืชตระกูลถั่ว

2.5.4.1 ศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่คัดเลือกได้ โดยใช้ GPC (Gel Permeation Chromatography)

ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร ซึ่งทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ Gel Permeation Chromatography (GPC)

วิธีการเตรียมตัวอย่างทำได้โดยนำสารสกัดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน จากข้อ 2.5.2.1 มาละลายใน 0.1 M $NaNO_3$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองที่ทำด้วยไนลอน (nylon 66 membrane; port size 0.45 µm) ก่อนฉีดเข้าระบบ GPC (Polymer laboratories, England) ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ Ultrahydrogel 120, MW resolving range 100-5,000 (Waters 600E, MA, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของ

คอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เครื่อง Detector เป็น Refractive Index detector ใช้ pullulans เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิเคราะห์ผลโดยใช้ PL LogiCal GPC software (England) (Kachanechai *et al.*, 2007)

2.5.4.2 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

วิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยนำสารสกัดมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 1 เติม Trifluoroacetic acid (TFA) โดยให้ความเข้มข้นของสารละลาย TFA เมื่อเติมสารสกัด มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M ย่อยโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหยดบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีอะลูมิเนียม (Thin layer chromatography aluminium sheet ชนิด silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x20 cm หนา 0.2 mm; MERCK, Germany) ชนิด normal phase ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส และแรมโนส ในปริมาตรที่เท่ากัน นำแผ่น TLC แช่ใน TLC chamber ซึ่งมีระบบของตัวทำละลายเป็นอัตราส่วนของ เอทิลอะซิเตต: ไอโซโพรพานอล: น้ำ เป็น 3: 3: 1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นตัวเคลื่อนที่ รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนดไว้ นำมาเป่าให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปจุ่มด้วยสารผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริก: เมทานอล อัตราส่วน 1: 20 วางไว้จนแห้งและนำมาตรวจสอบการเกิดสีด้วยความร้อนโดยนำมาเป่าด้วยลมร้อน จนเห็นจุดสีของน้ำตาลบนแผ่น TLC วัดระยะที่น้ำตาลและตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้แล้วคำนวณหาค่า R_f เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ (ดัดแปลงจาก Yang และคณะ, 2004)

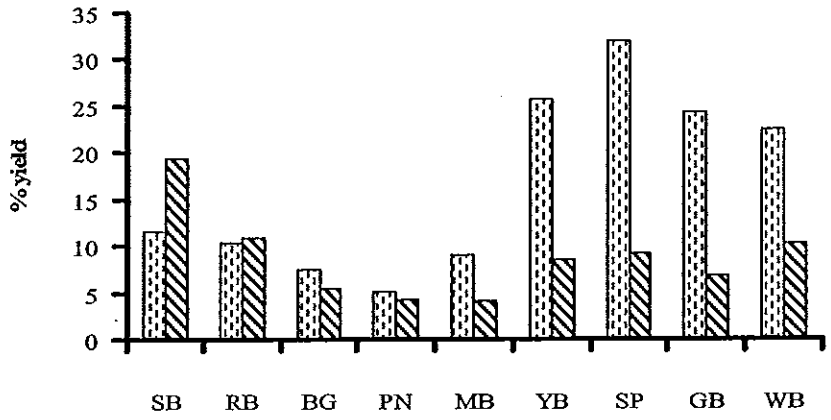
บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกสารสกัดจากพืชตระกูลถั่วที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

3.1.1 การเตรียมสารสกัดจากพืชตระกูลถั่ว

จากการนำตัวอย่างพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มาทำการสกัดด้วย 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และสกัดด้วยน้ำ พบว่าพืชแต่ละชนิดให้เปอร์เซ็นต์ผลได้เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบของสารสกัดแต่ละชนิดแตกต่างกัน พืชที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดสูงที่สุดคือ ถั่วลันเตา (snow pea) รองลงมาคือ ถั่วฝักยาว (yardlong bean) ที่สกัดโดยใช้เอทานอล คือมีค่าเท่ากับ 31.88 และ 25.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตามด้วยผลได้ของสารสกัดเอทานอลของถั่วแขก (green bean) ถั่วพู (winged bean) และสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง (soy bean) ซึ่งให้ผลได้ 24.30, 22.41 และ 19.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วเขียว (mung bean) มีผลได้ต่ำสุด คือ 4.01 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผลได้ของสารสกัดเอทานอล (▦) และสารสกัดน้ำ (▨) จากถั่วเหลือง (SB), ถั่วแดง (RB), ถั่วดำ (BG), ถั่วลิสง (PN), ถั่วเขียว (MB), ถั่วฝักยาว (YB) ถั่วลันเตา (SP), ถั่วแขก (GB), และถั่วพู (WB)

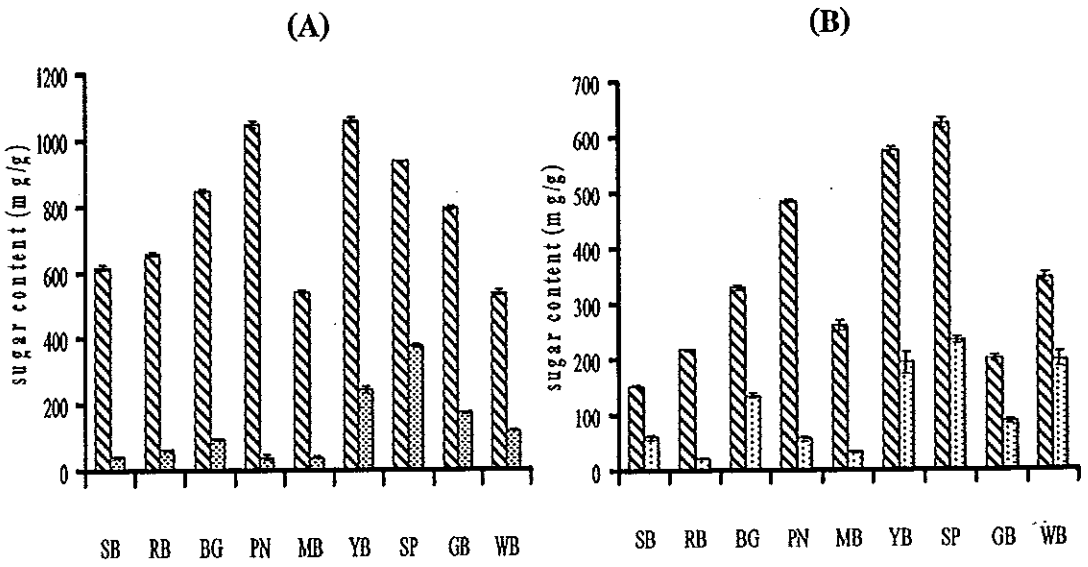
Figure 9. Yield percentage of ethanolic extracts (▦) and water extracts (▨) from soy bean (SB), red kidney bean (RB), black gram (BG), peanut (PN), mung bean (MB), yard long bean (YB), snow pea (SP), green bean (GB) and winged bean (WB).

จากผลการสกัดซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้เปอร์เซ็นต์ผลได้มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ โดยเฉพาะถั่วที่บริโภคเป็นผักสด เช่น ถั่วพู ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาวและถั่วแขก ที่ให้ผลได้สารสกัดเอทานอลสูงกว่าผลได้ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมาก โดยที่การสกัดด้วยน้ำให้ผลได้เพียง 10.21, 9.14, 8.48 และ 6.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ในตัวอย่างพืชสามารถละลายในเอทานอลได้ดีกว่าน้ำ การสกัดด้วยน้ำจึงให้เปอร์เซ็นต์ผลได้น้อยกว่าสกัดด้วยเอทานอล

3.1.2 การสกัดพืชตระกูลถั่วโดยใช้เอทานอลและน้ำในการสกัด

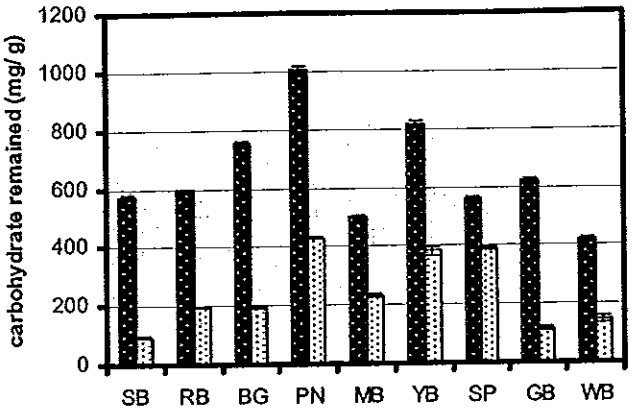
เมื่อนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 18 ชนิด มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่คิดเทียบเป็นน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วฝักยาว ถั่วลิสงและถั่วลันเตา คือมีค่าเท่ากับ 1058.99, 1044.83 และ 933.33 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลของถั่วดำ ถั่วแขก ถั่วแดง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วพู มีปริมาณเท่ากับ 848.03, 792.96, 655.94, 614.66, 538.30 และ 535.96 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วดำ ถั่วเขียว ถั่วแดง ถั่วแขก และถั่วเหลือง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 624.00, 574.29, 485.01, 344.32, 329.25, 261.11, 218.03, 200.85 และ 152.93 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดบอกถึงปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัด โดยแสดงเป็นค่าที่คิดเทียบกับน้ำตาลกลูโคส แสดงว่าสารสกัดที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลของถั่วฝักยาวและถั่วลิสง ที่มีค่าเท่ากับ 1058.99 และ 1044.83 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดนี้มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตอยู่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีองค์ประกอบอย่างอื่นอยู่น้อยมาก ส่วนสารสกัดที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดไม่ถึง 100 มิลลิกรัมต่อกรัม แสดงว่ายังมีสารอื่นที่นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เห็นได้ว่าสารสกัดเอทานอลที่มีปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดน้ำ คือถั่วฝักยาว ถั่วลิสง ถั่วลันเตา ถั่วดำ ถั่วแขก และถั่วแดง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วลันเตาและถั่วฝักยาวมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกับสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ถั่วเขียวและถั่วพู ในขณะที่สารสกัดน้ำของถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วดำ ถั่วเขียว ถั่วแดง ถั่วแขกและถั่วเหลือง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดต่ำกว่าในสารสกัดเอทานอล และเมื่อทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น สารสกัดที่ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นสูงสุด คือสารสกัดเอทานอลของถั่วลันเตาและถั่วฝักยาว รองลงมาคือ สารสกัดน้ำของถั่วลันเตา ซึ่งให้เท่ากับ 374.65, 242.35 และ 233.76 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และสารสกัดที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่ำสุด คือ สารสกัดน้ำของถั่วแดง และสารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง เท่ากับ 21.51 และ 38.72 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

เมื่อนำค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลบกับค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น จะบอกถึงส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีแนวโน้มที่น่าจะเป็นสารพรีไบโอติก คือจะไม่ถูกดูดซึมหากไม่ถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ก่อน เห็นได้ว่าสารสกัดเอทานอลมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าในสารสกัดน้ำ (ภาพที่ 10: A และ B) โดยที่สารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง ถั่วฝักยาว ถั่วดำ ถั่วแขก ถั่วแดง ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา ถั่วเขียว และถั่วพู ให้คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 1006.11, 816.64, 755.27, 620.79, 595.07, 573.9, 558.67, 499.58 และ 417.55 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำพบว่าถั่วลิสง ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วพู ถั่วแขกและถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 428.02, 390.23, 381.67, 229.02, 196.51, 194.73, 146.1, 114.17 และ 93.17 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▨) และน้ำตาลรีดิวซ์ (▩) ที่พบในสารสกัดเอทานอล (A) และสารสกัดน้ำ (B) ของถั่วเหลือง (SB), ถั่วแดง (RB), ถั่วดำ (BG), ถั่วลิสง (PN), ถั่วเขียว (MB), ถั่วฝักยาว (YB) ถั่วลันเตา (SP), ถั่วแขก (GB), และถั่วพู (WB)

Figure 10. Total sugar (▨) and reducing sugar (▩) contents in ethanolic extracts (A) and water extracts (B) from soy bean (SB), red kidney bean (RB), black gram (BG), peanut (PN), mung bean (MB), yard long bean (YB), snow pea (SP), green bean (GB) and winged bean (WB).



ภาพที่ 11 คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด - ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ในสารสกัดเอทานอล (■) และสารสกัดน้ำ (▦) ของถั่วเหลือง (SB), ถั่วแดง (RB), ถั่วดำ (BG), ถั่วลิสง (PN), ถั่วเขียว (MB), ถั่วฝักยาว (YB) ถั่วลันเตา (SP), ถั่วแขก (GB), และถั่วพู (WB)

Figure 11. Non-reducing carbohydrate content (Total sugar content - reducing sugar content) in ethanolic extracts (■) and water extracts (▦) from soy bean (SB), red kidney bean (RB), black gram (BG), peanut (PN), mung bean (MB), yard long bean (YB), snow pea (SP), green bean (GB) and winged bean (WB).

3.1.3 ผลของการย่อยสารสกัดในสภาวะที่เป็นกรดสูงและการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase

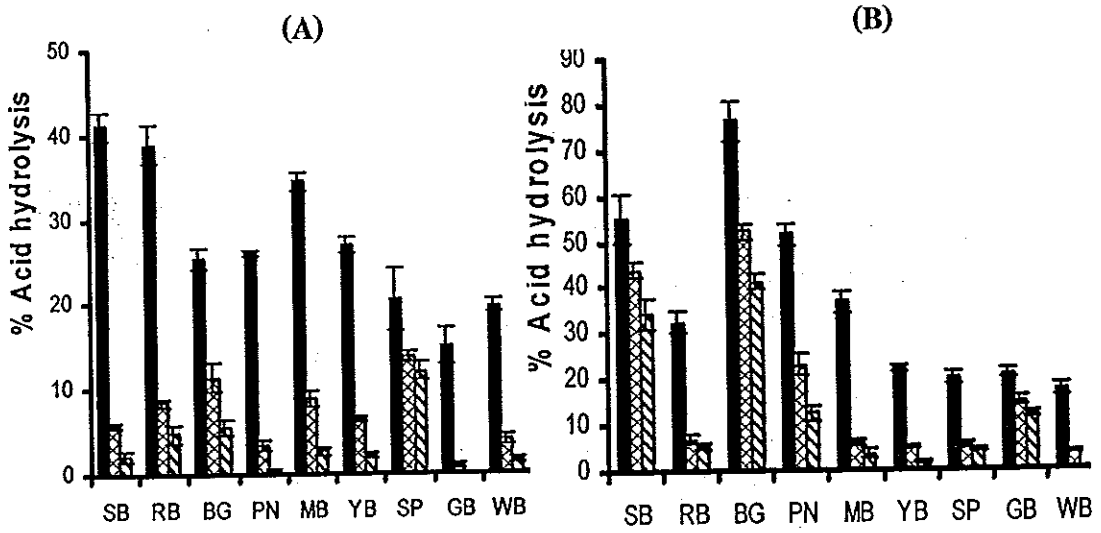
3.1.3.1 ความสามารถในการทนต่อการย่อยในสภาวะความเป็นกรดสูง

ในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกเบื้องต้นของสารสกัดนั้นทำได้ 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกทำการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรด เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพที่จะทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร ซึ่งโดยปกติแล้วกระเพาะอาหารของมนุษย์จะมีพีเอชอยู่ในช่วง 1-3 ส่วนขั้นตอนที่สองทำการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในลำไส้เล็ก โดยหลั่งมาจากตับอ่อน

การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรดของสารสกัดถั่วเหลือง ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วแขก ถั่วพูและถั่วแดงทั้งที่สกัดด้วยเอทานอลและสกัดด้วยน้ำ จำนวน 18 ชนิด ที่พีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 0-4 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทุกชนิดทนต่อการย่อยได้น้อยที่สุดที่พีเอช 1 และสามารถทนได้สูงขึ้นที่พีเอช 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง สารสกัดที่มีการทนต่อการย่อยสลายได้สูงที่สุด คือสารสกัดเอทานอลของถั่วแขก, ถั่วพู, ถั่วลันเตา, ถั่วดำ, ถั่ว

ลิสงและถั่วฝักยาว ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 14.92, 19.54, 20.35, 25.28, 25.84 และ 26.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วพู ถั่วลันเตา ถั่วแขก ถั่วฝักยาว ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วเหลืองและถั่วดำ มีค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 17.53, 20.34, 20.96, 22.19, 32.44, 36.73 51.39, 55.10 และ 76.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ถั่วแดงและถั่วเขียว ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 41.07, 38.79 และ 34.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดน้ำเกิดการย่อยสลายได้สูงกว่าสารสกัดเอทานอล โดยที่สารสกัดน้ำจากถั่วดำและถั่วเหลือง เกิดการย่อยสลายถึง 76.24 และ 55.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 12 (A) แสดงเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายของสารสกัดที่สกัดจากเอทานอลและภาพที่ 12 (B) แสดงเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายของสารที่สกัดจากน้ำ

สภาวะกรดที่มีความเข้มข้นสูงสามารถย่อยสารสกัดได้ดี เนื่องมาจากระดับของกรดที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลต่อพันธะที่เชื่อมต่อกันของโมเลกุลน้ำตาลที่เชื่อมต่อกันหลุดออกจากกันได้ง่ายกว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดต่ำ การย่อยสารสกัดโดยกรดที่พีเอชต่างๆ เกิดขึ้นแบบสุ่ม ซึ่งไม่จำเพาะกับชนิดของพันธะภายในสายพอลิเมอร์ ซึ่งถ้าสารสกัดนั้นมีสารประกอบโมเลกุลใหญ่จะมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยที่ต่ำกว่าสารสกัดที่มีสารประกอบโมเลกุลเล็ก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพืชที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำพบว่าพืชส่วนใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลจะให้ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าพืชที่สกัดด้วยน้ำ ส่วนค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของสารสกัดทั้งที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำให้ค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสารสกัดจากเอทานอลยังคงมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ ทำให้สารประกอบภายในโมเลกุลของสารที่สกัดด้วยเอทานอลมีขนาดใหญ่กว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ ทำให้ค่าการย่อยสลายในสภาวะเป็นกรดสูงของสารสกัดเอทานอลให้ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายต่ำกว่าในสารสกัดด้วยน้ำ จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Nilsson และ Bjorck (1988) ทำการทดสอบคุณสมบัติของซีเรียลฟรุคแตน (cereal fructans) และอินนูลิน ต่อสภาวะภายในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของหนู โดยในขั้นตอนของการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของซีเรียลฟรุคแตนและอินนูลิน ทำการทดลองแบบ *in vitro* โดยใช้กรดไฮโดรคลอริค จากการทดสอบที่พีเอช 1.05 เวลา 120 นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของสารซีเรียลฟรุคแตนเท่ากับ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่พีเอช 2 เกิดการย่อยสลายได้น้อยมาก คือ 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนอินนูลินมีการย่อยสลายเกิดขึ้น 10-15 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 1 ส่วนที่พีเอช 2 ให้ผลการย่อยสลายได้น้อยมากเช่นเดียวกับซีเรียลฟรุคแตน ซึ่งซีเรียลฟรุคแตนจัดอยู่ในกลุ่มของโอลิโกฟรุคโตส และเมื่อพิจารณาถึงค่า degree of polymerization ฟรุคแตนจัดอยู่ในหน่วยย่อยของอินนูลิน สอดคล้องกับการทดลองที่อินนูลินเกิดการย่อยสลายได้น้อยกว่าในซีเรียลฟรุคแตน เนื่องจากอินนูลินมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า

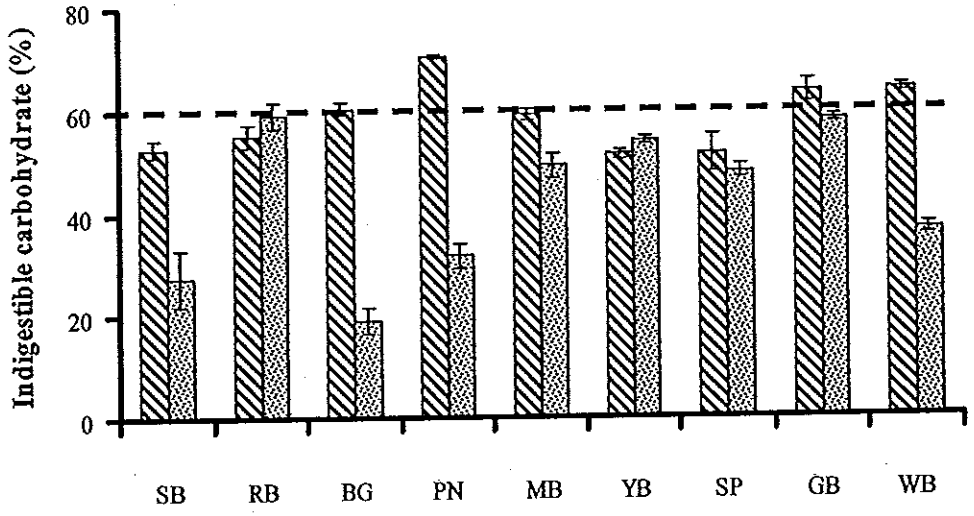


ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายของสารสกัดเอทานอล (A) และสารสกัดน้ำ (B) ของสารสกัดจากถั่วเหลือง (SB), ถั่วแดง (RB), ถั่วดำ (BG), ถั่วลิสง (PN), ถั่วเขียว (MB), ถั่วฝักยาว (YB) ถั่วลันเตา (SP), ถั่วแขก (GB), และถั่วพู (WB) ในสารละลายไฮโดรคลอริกที่พีเอช 1 (■), 2 (▩) และ 3 (▨)

Figure 12. Percentage of hydrolysis of ethanolic extracts (A) and water extracs (B) from soy bean (SB), red kidney bean (RB), black gram (BG), peanut (PN), mung bean (MB), yard long bean (YB), snow pea (SP), green bean (GB) and winged bean (WB) by HCl solution at pH 1 (■), 2 (▩) and 3 (▨)

โดยปกติแล้วสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกต้องสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1-3 ได้และสามารถเหลือผ่านไปในลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Cummings and Englyst, 1995) เมื่อคำนวณปริมาณของส่วนที่ไม่ถูกย่อยหรือคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อย พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง, ถั่วพู, ถั่วแขก, ถั่วดำ, ถั่วเขียวและสารสกัดน้ำของถั่วแดง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 70.39, 63.82, 63.56, 60.36, 59.13 และ 59.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลที่มีค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อยเหลือต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือสารสกัดเอทานอลของถั่วแดง, ถั่วเหลือง, ถั่วลันเตาและถั่วฝักยาว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 55.16, 52.73, 51.52 และ 51.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดน้ำที่มีค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือสารสกัดน้ำของถั่วแขก ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วเหลืองและถั่วดำ มีค่าเท่ากับ 58.08, 54.12, 49.24, 47.99, 36.41, 31.66, 27.56 และ 18.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 13 ดังนั้นจากขั้นตอนการทนต่อการย่อย

ด้วยกรด สามารถคัดเลือกสารสกัดที่มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อย มากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์หลังผ่านการย่อยที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วแขก ถั่วดำ ถั่วเขียวและสารสกัดน้ำของถั่วแดง เพื่อทำการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย หลังผ่านการย่อยด้วยกรด HCl buffer ที่ pH 1 เวลา 4 ชั่วโมง ของสารสกัดเอทานอล (▨) และสารสกัดน้ำ (▩) จากถั่วเหลือง (SB), ถั่วแดง (RB), ถั่วดำ (BG), ถั่วลิสง (PN), ถั่วเขียว (MB), ถั่วฝักยาว (YB), ถั่วลันเตา (SP), ถั่วแขก (GB), และถั่วพู (WB)

Figure 13. Percentage of indigestible carbohydrate after hydrolysis by HCl buffer pH 1 for 4 hours of ethanolic extracts (▨) and water extracts (▩) from soy bean (SB), red kidney bean (RB), black gram (BG), peanut (PN), mung bean (MG), yard long bean (YB), snow pea (SP), green bean (GB) and winged bean (WB).

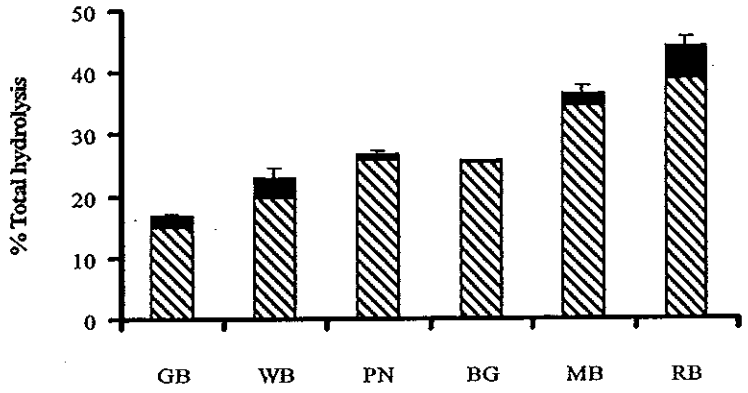
3.1.3.2 ความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.3.1 คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วแขก ถั่วดำ ถั่วเขียวและสารสกัดน้ำของถั่วแดง ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่มากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ จากการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง มาทดสอบการทนต่อการย่อย

ด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในลำไส้เล็ก ซึ่งเวลาโดยเฉลี่ยที่อาหารถูกย่อยอยู่ภายในลำไส้เล็กของคนปกติใช้เวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง โดยการทดสอบนี้ทำการทดสอบต่อเนื่องมาจากขั้นตอนการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และมีการนำมาปรับสภาพของสารสกัดให้มีพีเอชเท่ากับ 6.9 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ human pancreatic α-amylase และทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดที่ทดสอบได้ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายต่ำมาก พบว่าสารสกัดที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสูงที่สุดคือ สารสกัดด้วยน้ำจากถั่วแดง รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอลจากถั่วพู มีค่าเท่ากับ 5.24 และ 3.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว ถั่วแขก ถั่วลิสงและถั่วดำ มีค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 2.09, 1.82, 1.01 และ 0.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14 การที่เอนไซม์ pancreatic α-amylase เกิดการย่อยสลายสารสกัดได้น้อยนั้น อาจเนื่องมาจากพันธะที่จับกันระหว่างโมเลกุลในสายของน้ำตาลในสารสกัดไม่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ α-amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1, 4 ซึ่งในสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์และแป้งที่พบในพืชนั้นมีความหลากหลาย คือประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดเชื่อมกันด้วยพันธะที่แตกต่างกัน เช่น α-1, 4, α-1, 2, α-1, 6, β-1, 2 และ β-1, 4 เป็นต้น (Mandalari *et al.*, 2006) โดยทั่วไปพืชตระกูลถั่วส่วนใหญ่มีพันธะภายในเป็น α-1, 6 และ α-1, 2 และประกอบกับการที่ภายในลำไส้เล็กของมนุษย์นั้นไม่มีเอนไซม์ α–galactosidase เพื่อย่อย α-1, 6 galactosyl linkage (Wang *et al.*, 2007) สารสกัดจึงถูกย่อยในขั้นตอนการย่อยด้วยกรดได้ดีกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งในการย่อยด้วยกรดเป็นการย่อยแบบสุ่มที่ไม่จำเพาะต่อพันธะภายในโมเลกุลของสารสกัด ส่งผลให้การย่อยด้วยกรดเกิดขึ้นได้มากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับพันธะในการที่จะเข้าไปย่อยภายในโมเลกุลนั้นๆ จากผลการทดลองนี้มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการทดลองของ Gnoth และคณะ 2000 ที่ได้ทำการศึกษาการทนต่อการย่อยของ Human milk oligosaccharides (HMOs) โดยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายในช่องปาก (salivary amylase), เอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายในลำไส้เล็ก (pancreatic amylase) และการทนต่อการย่อยด้วยกรดภายในกระเพาะอาหาร ซึ่งพบว่าเมื่อ HMOs ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ภายในลำไส้เล็ก มีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายได้น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์

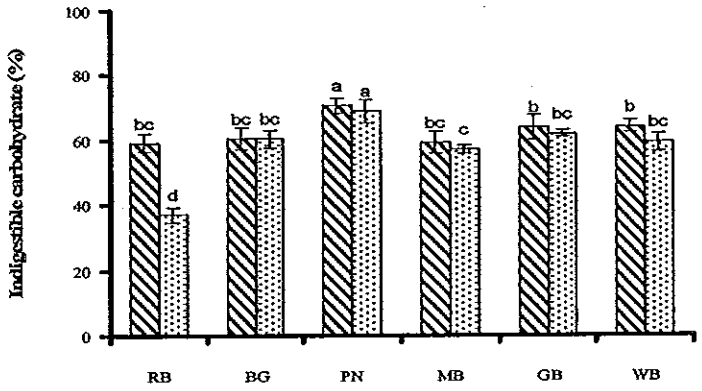
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือหรือคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย (indigestible carbohydrate) พบว่า เมื่อสารสกัดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยของสารสกัดเอทานอลจากถั่วลิสงมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขกมีปริมาณเท่ากับ 68.60 และ 61.81 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลของถั่วดำ ถั่วพู ถั่วเขียว และสารสกัดน้ำของถั่วแดง มีปริมาณเท่ากับ 60.15, 58.94, 57.12 และ 36.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย ที่ 0 ชั่วโมง (คือที่ 4 ชั่วโมง ในการ

ย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1) และหลังผ่านการย่อย 6 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์ ในสารสกัดจากถั่วแดงที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยลดลงอย่างมากและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดถั่วชนิดอื่นที่ทดสอบ ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลจากถั่วลิสง ถั่วแขก ถั่วดำ ถั่วพูและถั่วเขียว พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยสารสกัดที่ชั่วโมงเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยที่ชั่วโมงที่ 6 ดังแสดงในภาพที่ 15 ดังนั้นจึงคัดเลือกสารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วแขก ถั่วดำ ถั่วพูและถั่วเขียว ซึ่งสารทั้งหมดสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากยังมีคงมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยเหลือปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกของสารสกัดจากถั่วต่อไป



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสลายของสารสกัดที่ผ่านการย่อยสารละลายไฮโดรคลอริกที่พีเอช 1 (▨) และเอนไซม์ human pancreas α-amylase (■) ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก (GB), ถั่วพู (WB), ถั่วลิสง (PN), ถั่วดำ (BG), ถั่วเขียว (MB) และถั่วแดง (RB) ที่สกัดด้วยน้ำ

Figure 14. Percentage of hydrolysis of legume extracts by HCl buffer pH 1 (▨) and human pancreas α-amylase (■) of ethanolic extracts from green bean (GB), winged bean (WB), peanut (PN), black gram (BG), mung bean (MB) and water extracts from red kidney bean (RB).



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยของสารสกัด หลังผ่านการย่อยกรด (pH 1 เวลา 4 ชั่วโมง) และเอนไซม์ human pancreas α-amylase ที่เวลา 0 (▨) และ 6 ชั่วโมง (▩) ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก (GB), ถั่วพู (WB), ถั่วลิสง (PN), ถั่วดำ (BG), ถั่วเขียว (MB) และสารสกัดน้ำจากถั่วแดง (RB) ($^{a\text{-}d}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของค่าที่เปรียบเทียบกันในสารสกัดแต่ละชนิด)

Figure 15. Percentage of indigestible carbohydrate after acid (4 h, pH 1) and enzymatic hydrolysis from human pancreas α-amylase at 0 h (▨) and 6 h. (▩) of ethanolic extracts from green bean (GB), winged bean (WB), peanut (PN), black gram (BG), mung bean (MB) and water extract from red kidney bean (RB) ($^{a\text{-}d}$ different letters mean significant differences ($P<0.05$) compared in each extracted).

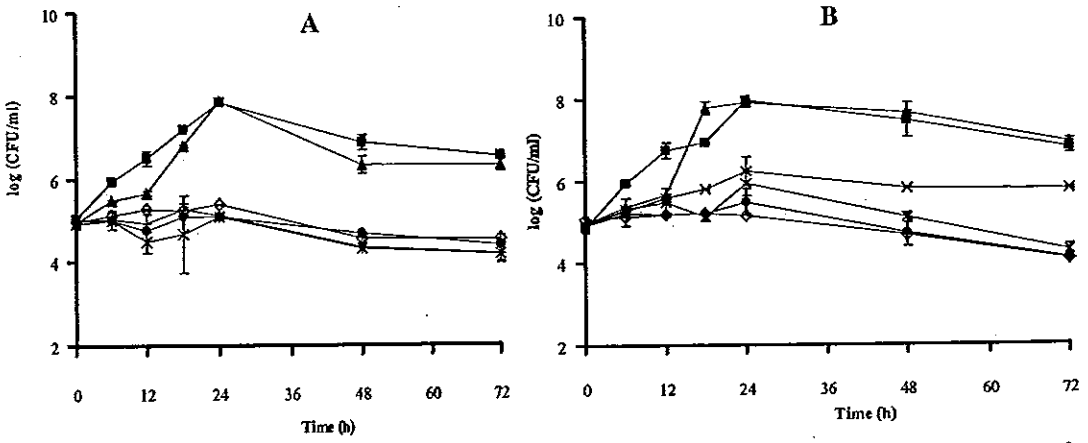
3.2. ผลของสารสกัดที่คัดเลือกได้ต่อการเจริญของโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค

3.2.1 ผลของสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน ในการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติก

เมื่อนำสารสกัดที่คัดเลือกจากข้อ 3.1.3.2 คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง ถั่วแขก ถั่วดำ ถั่วพูและถั่วเขียว มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส (โดยใช้ปริมาณคิดเทียบเท่ากับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 1000 มิลลิกรัม) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียโปรไบโอติก คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus acidophilus* โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.30×10^5 และ 1.21×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการบ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่าสารสกัดสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยพบว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 2.94 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อถึงการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 2.81 log CFU/มิลลิลิตร แสดงว่า *L. plantarum*

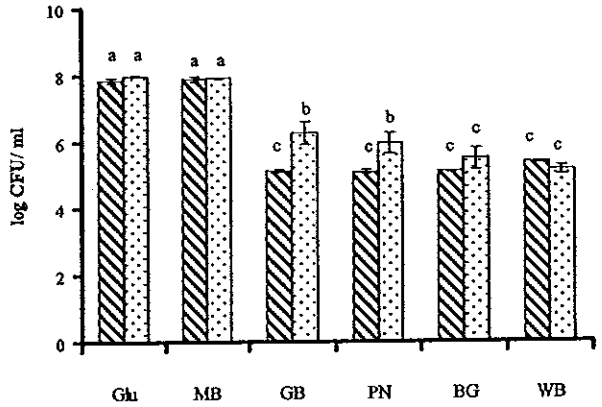
สามารถเจริญในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวได้ดีเช่นเดียวกับในอาหารกลุ่มควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 16 (A) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 17) และพบว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้น้อยมากในสารสกัดเอทานอลของถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง และถั่วดำ โดยสามารถเพิ่มจำนวนขึ้น 0.11, 0.41, 0.18 และ 0.10 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมง และสำหรับการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับ *L. plantarum* โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 2.96 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อถึงการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของ *L. acidophilus* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 3.13 log CFU/มิลลิลิตร แสดงว่า *L. acidophilus* สามารถเจริญในอาหารกลุ่มควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 16 (B) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 17) และพบว่า *L. acidophilus* สามารถเจริญได้น้อยมากในสารสกัดเอทานอลของถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง และถั่วดำ โดยสามารถเพิ่มจำนวนขึ้น 1.28, 0.07, 1.02 และ 0.57 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาผลของสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อการเจริญของโปรไบโอติก ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว ถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสงและถั่วดำ พบว่า โปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ คือ *L. plantarum*และ *L. acidophilus* สามารถใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวในการเจริญได้ดีที่สุด และมีการเจริญได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจากการรายงานของ Sako และคณะ (1999) ทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ในการใช้ lactulose และ rafinose เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเชื้อพบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถใช้ lactulose และ raffinose ได้ใกล้เคียงกับกลูโคสซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม และการที่แบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้ไม่เท่ากันนั้น เนื่องจากความหลากหลายในเรื่องของโครงสร้างและการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโมเลกุลเหล่านั้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกมีองค์ประกอบและการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะภายในโมเลกุลต่างกัน เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีพันธะที่เชื่อมต่อกันด้วย Fruβ2-1Fru$_n$, และ Gluα1-2[βFru1-2]$_n$, Raffinose จะต่อกันด้วย Galα1-6Glu1-2βFru และ lactosucrose จะต่อกันด้วย Galβ1-4 Gluα1-4 Gluα1-2βFru เป็นต้น (Rastall and Gibson, 2002) ดังนั้นแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นย่อยสารเหล่านี้เพื่อที่จะนำสารเหล่านี้ไปใช้ ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นจะมีความจำเพาะต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase β-glucosidase และ α-mannosadase ขึ้นมาได้ (Papamanoli *et al.*, 2003)



ภาพที่ 16 การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก A) *L. plantarum* และ B) *L. acidophilus* ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วแขก (✕), ถั่วพู (◇), ถั่วลิสง (✳), ถั่วดำ (●) ถั่วเขียว (▲), กลูโคส (■) เป็นแหล่งคาร์บอน

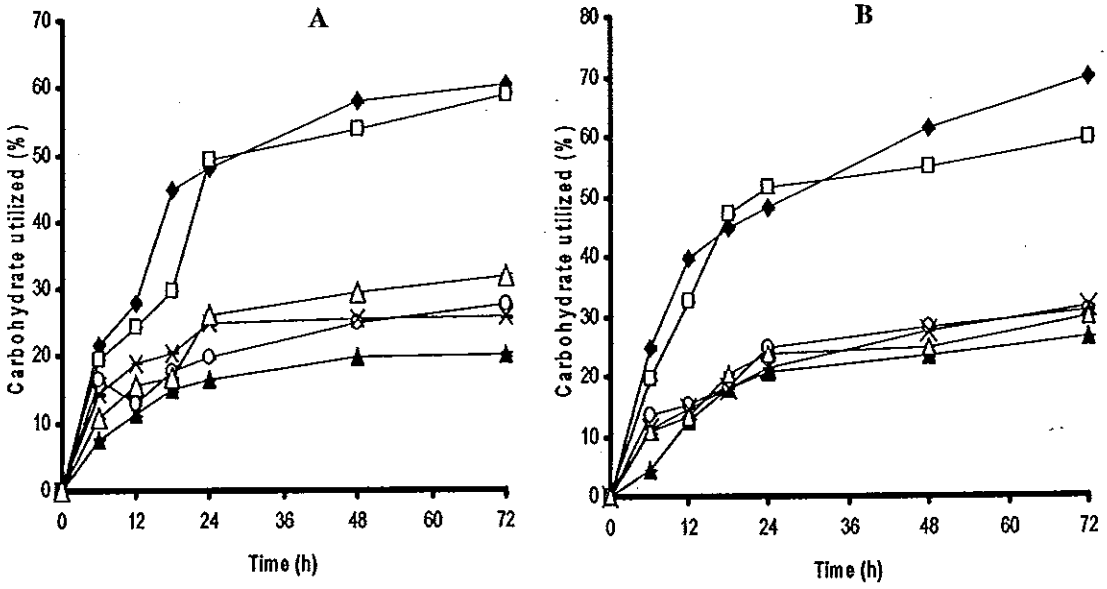
Figure 16. Growth of probiotics A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus* in minimal medium contained ethanolic extracts from green bean (✕), winged bean (◇), peanut (✳), black gram (●), mung bean (▲), glucose (■) as carbon sources.



ภาพที่ 17 การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* (▨) และ *L. acidophilus* (⊡) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วแขก (GB), ถั่วพู (WB), ถั่วลิสง (PN), ถั่วดำ (BG) ถั่วเขียว (MB) และกลูโคส (Glu) เป็นแหล่งคาร์บอน ($^{a-d}$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของค่าที่เปรียบเทียบกันของจำนวนแบคทีเรียทั้งสองชนิด)

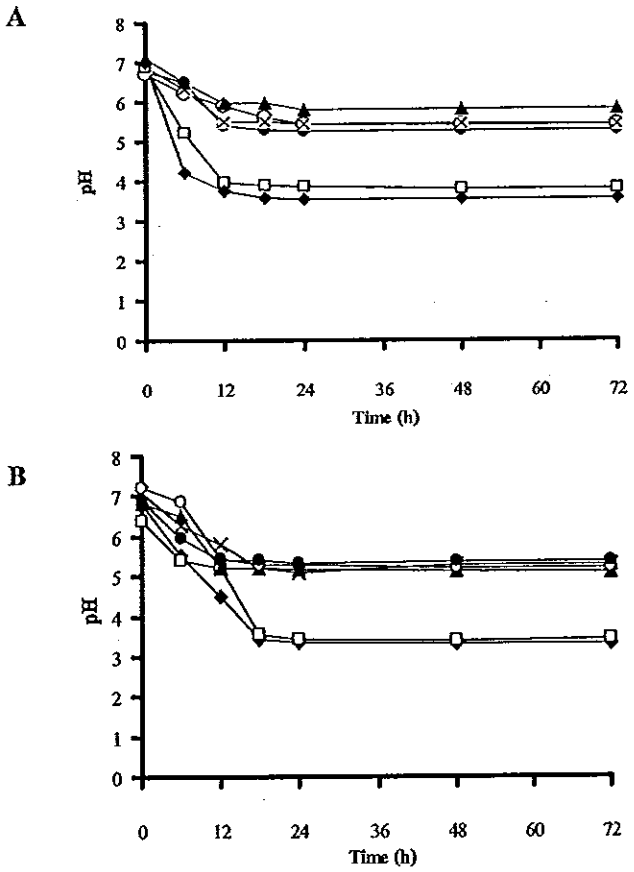
Figure 17. Growth of probiotics bacteria *L. plantarum* (▨) and *L. acidophilus* (⊡) at 24 hour in minimal medium contained ethanolic extracts from green bean (GB), winged bean (WB), peanut (PN), black gram (BG), mung bean (MB) and glucose (Glu) as carbon sources ($^{a-d}$ different letters mean significant differences ($P<0.05$) compared the growth of both probiotics).

และเมื่อพิจารณาการใช้สารสกัดของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* พบว่าโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ถึง 57 และ 59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสงและถั่วดำ แบคทีเรีย *L. plantarum* สามารถใช้ได้ในปริมาณ 31.8, 25.7, 27.6 และ 20.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *L. acidophilus* สามารถใช้ได้เท่ากับ 30, 31.5, 30.9 และ 26.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ *L. plantarum*และ *L. acidophilus* ซึ่งพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชน้อยมากในสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสงและถั่วดำ โดยมีพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.9 เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชจะค่อยๆ ลดลง จนเมื่อครบ 24 ชั่วโมงแรก ค่าพีเอชจะเริ่มคงที่ โดยมีพีเอชสุดท้ายอยู่ในช่วง 5.1-5.8 แต่ในการเจริญของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ในสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวพบว่ามีพีเอชลดลงถึง 3.77 และ 3.42 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีกลูโคส มีพีเอชลดลงถึง 3.53 และ 3.3 ตามลำดับ (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไปของสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว (□), ถั่วดำ (▲), ถั่วลิสง (○), ถั่วพู (✕), ถั่วแขก (△) และกลูโคส (◆) โดยโปรไบโอติก *L. plantarum* (A) และ *L. acidophilus* (B)

Figure 18. Percentage of carbon sources from ethanolic extracts of mung bean (□), black gram (▲), peanut (○), winged bean (✕), green bean (△) and glucose (◆) utilized by *L. plantarum* (A) and *L. acidophilus* (B).



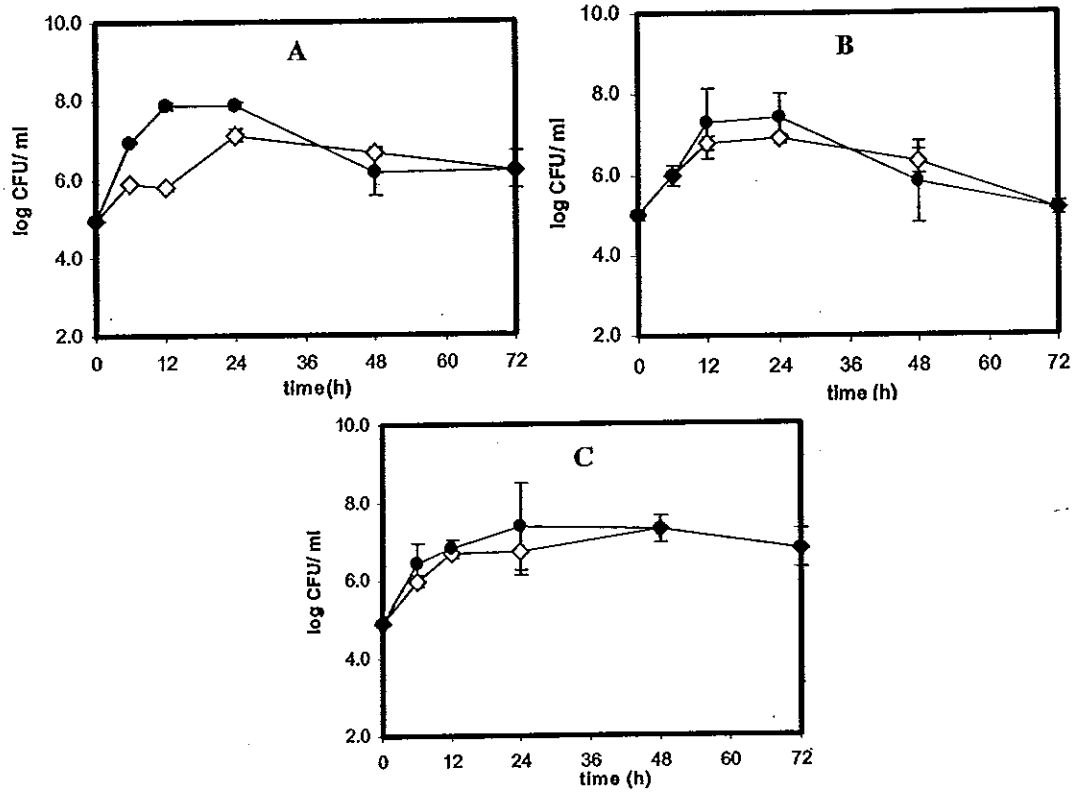
ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วเขียว (□), ถั่วดำ (▲), ถั่วลิสง (✕), ถั่วพู (○), ถั่วแขก (●) และกลูโคส (◆) เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* (A) และ *L. acidophilus* (B)

Fugure 19. pH change in culture broth of probiotics fermentation using ethanolic extracts from mung bean (□), black gram (▲), peanut (✕), winged bean (○), green bean (●) and glucose (◆) as carbon sources by *L. plantarum* (A) and *L. acidophilus* (B).

3.2.2 ผลของสารสกัดต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

จากการขั้นตอนการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งสามารถคัดเลือกสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว เพื่อนำมาทดสอบกิจกรรมการส่งเสริมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคคือ *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* ser. Typhi พบว่าแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดสามารถใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยมีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งใน 12 ชั่วโมงแรกแบคทีเรียทั้งสามมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แต่มีการเพิ่มจำนวนในอาหารที่ใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวได้น้อยกว่าชุดควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแบคทีเรีย *E. coli*

O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้เท่ากับ 7.87, 7.40 และ 7.38 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 4.93, 4.96 และ 4.87 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง ส่วนในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียทั้งสามชนิดมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 7.11, 6.90 และ 6.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้งสามชนิดลดจำนวนลงถึง 0.76, 0.5 และ 0.64 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 20 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียก่อโรคกลุ่มนี้ มีการใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ง่ายกว่าสารสกัดจากถั่วเขียว ซึ่งมักมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลราฟฟิโนส หรือสตาชิโอสซึ่งเป็นไตรแซคคาไรด์และเตเตระแซคคาไรด์ ตามลำดับ (Wang *et al.*, 2003) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างกลูโคสหรือฟรุคโตส



ภาพที่ 20 การเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 (A), *S. aureus* (B) และ *Sal. enterica* ser. Typhi (C) ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว (◇) และกลูโคส (●) เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 20. Growth of pathogens *E. coli* O157:H7 (A), *S. aureus* (B) and *Sal. enterica* ser. Typhi (C) in minimal medium contained ethanolic extracts of mung bean (◇) and glucose (●) as a carbon sources.

3.2.3 ผลของการใช้สารสกัดที่คัดเลือกได้ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโปรไบโอติก

การส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของสารพรีไบโอติก ซึ่งการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยนำส่วนใสที่ได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 72 มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ซึ่งจากการทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้งสาม (Minimum inhibitory concentrations: MIC) ซึ่งพบว่าน้ำหมักหรือส่วนใสจากแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองชนิดที่ไม่มีการปรับส่วนใสและมีการเติมเอนไซม์แคแทเลส พบค่า MIC อยู่ที่ 10 AU/ml และส่วนใสที่มีการปรับพีเอชเท่ากับ 6.5-7.0 กับส่วนใสที่มีการเติมทั้งเอนไซม์แคแทเลสและปรับพีเอชเป็น 6.5-7.0 มีค่า MIC เป็น 0 ซึ่งแสดงว่าไม่เกิดกิจกรรมการยับยั้งในส่วนใสดังกล่าว ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 9)

ในน้ำหมักหรือส่วนใสที่ได้หลังจากการเลี้ยงโปรไบโอติกทั้งสองในชั่วโมงที่ 72 โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าส่วนใสที่ไม่มีการปรับพีเอชและส่วนใสมีการเติมเอนไซม์แคแทเลส มีค่า MIC อยู่ที่ 10 AU/ml และส่วนใสที่มีการปรับพีเอชเท่ากับ 6.5-7.0 กับส่วนใสที่มีการเติมทั้งเอนไซม์แคแทเลสและปรับพีเอชเป็น 6.5-7.0 มีค่า MIC เป็น 0 (ตารางที่ 9) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับส่วนใสหรือน้ำหมักที่ได้หลังจากการเลี้ยงโปรไบโอติกทั้งสองในชั่วโมงที่ 72 โดยมีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งที่อยู่ในส่วนของน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 โดยมีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดที่ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า MIC เท่ากันในส่วนใสที่ไม่ได้มีการปรับส่วนใสและส่วนใสที่มีการเติมเอนไซม์แคแทเลส แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งไม่ได้มีผลมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่อาจมีผลมาจากกรดอินทรีย์โดยส่วนใหญ่และเมื่อทำการทดสอบว่ามีผลมาจากสารยับยั้งชนิดอื่นหรือไม่ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยทดสอบผลของแบคเทอริโอซินและผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าเมื่อปรับระดับพีเอชในน้ำหมักให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-7.0 และมีการเติมเอนไซม์แคแทเลสลงไป ส่งผลให้ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้น แต่ในส่วนที่มีการเติมเฉพาะเอนไซม์แคแทเลสพบกิจกรรมการยับยั้ง จากการทดลองนี้อาจจะบอกได้ว่าการยับยั้งนั้นเป็นผลที่เกิดจากกรด เนื่องมาจากกรดอินทรีย์ของกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก ให้ผลผลิตของกรดแลกติกมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Wistereich, 1997) และยังพบว่าช่วงการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้จะมีการผลิตสาร

ยับยั้งออกมาหลายชนิดเช่นกัน เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลคติก กรดอะซิติกและกรดบิวไทริก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

3.2.4 ผลของสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) ของโปรไบโอติก

เป็นที่ทราบกันดีว่าในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลกติก นอกจากจะใช้กรดแลกติกเป็นหลักแล้ว มักมีการผลิตกรดอินทรีย์สายสั้นอื่นๆ เกิดขึ้นด้วยเสมอ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์ สามารถใช้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวในกระบวนการหมักสารสกัดของแบคทีเรียแลกติก คือ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* เป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFA) ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิกและกรดบิวไทริก ได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดย *L. acidophilus* สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นทั้ง 3 ชนิดได้มากกว่า *L. plantarum* ซึ่งผลการทดสอบพบว่า *L. acidophilus* ผลิตกรดอะซิติกจากอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือได้กรดอะซิติก 3.98 และ 4.34 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนปริมาณกรดโพรบิโอนิกและบิวไทเรทที่ผลิตจาก *L. acidophilus* ที่ใช้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณเท่ากับ 0.40 และ 2.09 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณกรดโพรพิโอนิกและบิวไทเรทที่ผลิตโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 0.51 และ 1.17 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณกรดบิวไทริกที่ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* ในสารสกัดถั่วเขียวที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่ามากกว่าชุดควบคุม ส่วนการหมักโดยเชื้อ *L. plantarum* กับสารสกัดถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตกรดอะซิติก โพรพิโอนิกและบิวไทเรท ได้เท่ากับ 1.9, 0.51 และ 0.92 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าที่ผลิตได้จากชุดควบคุม คือ 3.04, 0.58 และ 1.12 เห็นได้ว่าปริมาณของกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวไทริกมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะซิติกที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ค่า MIC ของน้ำหมักจากการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 450 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875 ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

Table 9. Minimum inhibitory concentrations of supernatant from the growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 450 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875 in minimal medium contained ethanolic extract from mung bean and glucose as carbon source against pathogenic microorganism.

extracts	Strain	MIC (AU/ ml)											
		E. coli O157: H7				*S. aureus.*				*Sal. enterica* ser. Typhi.			
		CFF	CFB	CFH	CFBH	CFF	CFB	CFH	CFBH	CFF	CFB	CFH	CFBH
mung bean	*Lactobacillus plantarum*	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
	Lactobacillus acidophilus	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
glucose	*Lactobacillus plantarum*	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
	Lactobacillus acidophilus	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0

0; no inhibition, CFF: culture supernatant, CFB: neutralized culture supernatant, CFH: catalase-treated supernatant CFBH: neutralized and catalase-treated supernatant

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเฉพาะปริมาณกรดบิวไทริก โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้กลูโคสและสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. acidophilus* ที่ใช้สารสกัดจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตกรดบิวไทริกได้ 2.09 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีปริมาณแค่ 1.17 มิลลิโมลาร์ ส่วนใน *L. plantarum* เมื่อใช้สารสกัดจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกรดบิวไทริกเท่ากับ 0.95 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีปริมาณกรดบิวไทริกเท่ากับ 1.12 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยกรดบิวไทริกนี้เป็นกรดไขมันสายสั้นที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง และการกระตุ้นให้เกิดการ apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ จึงได้มีความพยายามที่จะหาสารพรีไบโอติกที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดบิวไทริกให้ได้ปริมาณมาก เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และจากผลการทดลองข้างต้นให้ผลการทดลองสอดคล้องกับของ Manderson และคณะ (2005) ซึ่งทดสอบโดยใช้สารพรีไบโอติก คือ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosaccharide: FOS) และสารเพคตินโอลิโกแซคคาไรด์ (pectin oligosaccharide: POS) ที่สกัดได้จากเปลือกส้มเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร Fecal batch culture ต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli, Bifidobacteria และ *Eubacterium rectale* เพื่อทดสอบหาปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่เวลา 0, 5, 10 และ 24 ชั่วโมง พบว่าในน้ำหมักจากแบคทีเรีย *Eubacterium rectale* ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารเพคตินโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้สูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณของกรดอะซิติกผลิตออกมามากที่สุด รองลงมาคือกรดบิวไทริกและโพรพิโอนิก ปริมาณเท่ากับ 32.76, 18.09 และ 9.23 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนในน้ำหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีปริมาณของกรดอะซิติก กรดบิวไทเรทและกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 32.31, 14.39 และ 12.19 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และจากการทดลองของ Michel และคณะ (1998) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้ Acacia gum เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต พบว่าจะมีการผลิตกรดอะซิติกมากที่สุด รองลงมาเป็นกรดโพรพิโอนิกและบิวไทเรท ซึ่งมีปริมาณของกรดบิวไทริกเกิดขึ้นประมาณ 6.2 มิลลิโมลาร์

จากการทดลองของ Laurentin และ Edwards (2004) โดยใช้สารสกัดเอทานอลจากมันฝรั่ง, ถั่วเลนทิล (Lentil) และ Cocoyam เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของแบคทีเรีย Anaerobic จากอุจจาระของคน พบว่าสารที่มีการผลิตกรดบิวไทริกในปริมาณที่สูง คือ สารสกัดเอทานอลจากมันฝรั่ง, ถั่วเลนทิล และ Cocoyam ปริมาณเท่ากับ 154, 148 และ 161 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองตามรายงานข้างต้นเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว สามารถส่งเสริมการผลิตกรดบิวไทริกได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่นๆ

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการทดลองนี้จะใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นเชื้อเดี่ยวในการหมักสารสกัดที่ทดสอบ ซึ่งแตกต่างจากรายงานในการทดลองอื่นๆ ซึ่งใช้เชื้อผสมในการหมัก โดยมีการใช้อุจจาระของคนที่มีสุขภาพดีมาเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักซึ่งมีจุลินทรีย์อยู่รวมกันหลากหลายชนิด โดยส่วนมากแล้วจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อโรค เช่น *Clostridium* มีความสามารถในการผลิตกรดบิวไทริกได้มากกว่ากลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติก (Laurentin and Edwards, 2004) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นที่แบคทีเรียผลิตออกมานี้เซลล์บริเวณลำไส้ใหญ่จะมีการนำส่งไปใช้เป็นพลังงานภายในเซลล์ (Conway, 2001)

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตจาก *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วเขียวและกลูโคส

Table 10. Short chain fatty acid (SCFA) formation in fermentation by *L. plantarum* and *L. acidophilus* in minimal medium containing mung bean extracted and glucose as carbon sources.

extracts	Probiotic strains	Time (h)	Acetic acid (mM)	Propionic acid (mM)	Butyric acid (mM)
Mung bean	*L .plantarum*	0	0.15±0.06^{a}	0.08±0.03^{a}	0.06±0.01^{a}
		24	1.16±0.05^{b}	0.48±0.01^{d}	0.46±0.01^{d}
		48	1.9±0.12^{c}	0.51±0.02^{d}	0.92±0.08^{e}
	L. acidophilus	0	0.10±0.02^{a}	0.10±0.04^{a}	0.08±0.02^{a}
		24	3.07±0.03^{d}	0.37±0.01^{c}	1.38±0.07^{g}
		48	3.98±0.03^{d}	0.40±0.10^{c}	2.09±0.04^{h}
Glucose	*L .plantarum*	0	0.25±0.10^{a}	0.13±0.09^{a}	0.20±0.02^{c}
		24	2.7±0.03^{d}	0.48±0.005^{d}	0.47±0.00^{d}
		48	3.04±0.14^{d}	0.58±0.002^{e}	1.12±0.14^{f}
	L. acidophilus	0	0.23±0.05^{a}	0.17±0.06^{b}	0.22±0.07^{c}
		24	2.59±0.04^{d}	0.48±0.001^{d}	0.47±0.005^{d}
		48	4.34±0.05^{e}	0.51±0.03^{d}	1.17±0.07^{f}

$^{a-h}$ different letters mean significant differences ($P<0.05$) compared in column.

3.3 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากถั่ว (Co-cultivation)

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกสองชนิด คือ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด คือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมาเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากการศึกษาข้างต้น ในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยในการศึกษาขั้นตอนนี้ใช้เชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียทั้งสองชนิดเท่ากับ 9.20×10^{4} และ 9.10×10^{4} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลอง พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามเพิ่มจำนวนเป็น 6.71, 5.60 และ 4.55 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย เพิ่มจำนวนเท่ากับ 7.10, 6.92 และ 5.40 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน โดย *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญร่วมกับ *L. plantarum* และมีจำนวนเชื้อลดลงโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.39 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วน *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ที่เจริญร่วมกับ *L. plantarum* เชื้อลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 1.32 และ 0.85 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* มีการเพิ่มจำนวนโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามเท่ากับ 7.96, 7.23 และ 7.91 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของ *L. plantarum* เพียงชนิดเดียว และเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียก่อโรคคือ *E. coli* O157:H7 และ *Sal. enterica* ser. Typhi ในชุดการทดลองที่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 4.20 และ 2.34 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 2.47 และ 2.93 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนเท่ากับ 6.67 และ 5.27 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่มีการเจริญร่วมกับ *L. plantarum* คือมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 4.88 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนลงลดโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.21 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 5.10 log CFU/มิลลิลิตร (ดังแสดงในภาพที่ 21)

แบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดคือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ที่เจริญร่วมกับ *L. plantarum* มีจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 โดยมีจำนวน 2.45, 2.50 และ

1.50 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือลดลง 3.75, 1.71 และ 2.92 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย ซึ่งมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6.20, 4.21 และ 4.43 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่จำนวนของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคมีจำนวนเท่ากับ 6.23, 6.15 และ 6.92 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวนลดลงโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของ *L. plantarum* เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 21)

ส่วนในการเลี้ยงร่วมกันของ *L. acidophilus* และแบคทีเรียก่อโรค คือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi พบว่าแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามสามารถเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ *L. acidophilus* ได้เท่ากับ 6.89, 5.93 และ 3.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* เชื้อก่อโรคสามารถเพิ่มจำนวนได้เท่ากับ 7.11, 6.90 และ 6.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน ซึ่ง *E. coli* O157:H7 และ *S. aureus* มีจำนวนเชื้อลดลงโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือลดลง 0.21 และ 0.96 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วน *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 2.99 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* มีการเพิ่มจำนวนในชุดทดลองที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามเท่ากับ 7.83, 6.89 และ 7.17 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดคือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ในชุดการทดลองที่มี *L. acidophilus* เจริญร่วมด้วย มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 4.38, 4.77 และ 2.77 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 2.28, 1.52 และ 5.0 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่มี *L. acidophilus* เจริญร่วมด้วย ซึ่งมีการเจริญเท่ากับ 6.67, 6.30 และ 7.28 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ดังแสดงในภาพที่ 22)

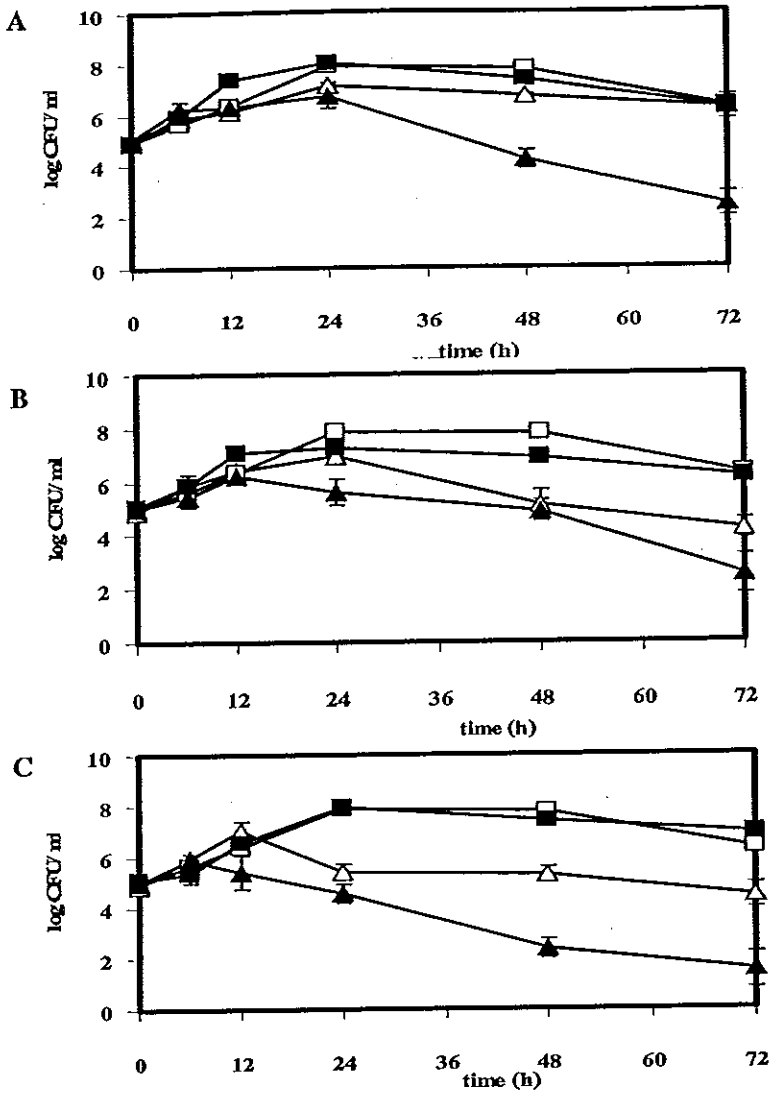
แบคทีเรียก่อโรคทั้งสามที่มีการเลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* มีจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 โดยมีจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *S. aureus* เท่ากับ 2.00 และ 3.41 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Sal. enterica* ser. Typhi ไม่มีปริมาณเชื้อเหลือรอดในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือลดลง 4.20, 1.71 และ 6.79 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มี *L. acidophilus* เจริญร่วมด้วย ซึ่งมีจำนวนเชื้อก่อโรคเท่ากับ 6.20, 5.12 และ 6.79 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่จำนวน *L.*

acidophilus ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดมีจำนวนเท่ากับ 6.61, 6.33 และ 4.93 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 22)

จากการศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถเจริญและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ได้ในช่วงเวลาต่างกัน โดยแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งช่วงที่มีการเจริญสูงสุด แต่จะลดจำนวนลงหลังจากชั่วโมงที่ 24 โดยพบว่าโปรไบโอติก *L. plantarum* สามารถเจริญและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคคือ *S. aureus* ได้ในชั่วโมงที่ 24 และโปรไบโอติกทั้งสองชนิดยังสามารถยับยั้ง *Sal. enterica* ser. Typhi ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงที่ 72 จะเห็นว่าโปรไบโอติกทั้งสองมีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งสามชนิด โดย *L. plantarum* สามารถเจริญและยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุด ส่วน *L. acidophilus* สามารถยับยั้ง *Sal. enterica* ser. Typhi ได้ดีที่สุดโดยไม่มีจำนวนเชื้อเหลือรอด ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Drago และคณะ (1997) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ enteropathogen คือ *E. coli, Salmonela entexitidis* และ *Vibrio cholerae* โดยการเลี้ยงร่วมกันกับ *Lactobacillus* ซึ่งแยกมาจากทางเดินอาหารมนุษย์ พบว่า *Lactobacillus* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่ *Lactobacillus* ผลิตขึ้นมา นอกจากสารพรีไบโอติกจะส่งเสริมการสร้างกรดอินทรีย์ขึ้นมาแล้วยังส่งเสริมการผลิตสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ขึ้นมายับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน (Hopkins and Macfarlane, 2003; Collins and Aramaki, 1980) และในการทดลองของนิรัญญา บุญติ้น (2550) ทำการศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียโปรไบโอติก คือ *L. plantarum* ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิดคือ *E. coli, S. aureus* และ *Salmonella* sp. โดยใช้สารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง พบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เมื่อเลี้ยงครบ 72 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามสายพันธุ์ สามารถเพิ่มจำนวนในชั่วโมงที่ 12 และหลังจากเลี้ยงไป 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียก่อโรคมีจำนวนลดลง และไม่เหลือรอดในชั่วโมงที่ 48 และ 72 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงไปครบ 72 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เหลืออยู่ 3.72 และ 4.01 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณของ *Salmonella* sp. ไม่มีเหลือรอดในการเลี้ยงร่วมกันโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อพิจารณาการลดลงของแบคทีเรียก่อโรคที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6.85, 6.40 และ 7.00 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6.72, 6.94 และ 6.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *S. aureus* ลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.54 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วน *E. coli* O157:H7 และ *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.17 และ 0.26 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว เมื่อพิจารณาที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดในชุดการทดลองที่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 7.14, 5.23 และ 5.61 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง *S. aureus* ลดจำนวนลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.48 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่ *Sal. enterica* ser. Typhi ลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 1.66 log CFU/มิลลิลิตร ส่วน *E. coli* O157:H7 มีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.46 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย ซึ่งมีการเจริญเท่ากับ 6.67, 5.70 และ 7.28 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 23)

จำนวนของแบคทีเรียก่อโรคที่เลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* และไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 แบคทีเรียก่อโรคที่เลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* มีจำนวนเชื้อก่อโรคเหลืออยู่ 4.27, 4.47 และ 5.10 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว มีจำนวนเชื้อเหลืออยู่ 4.70, 4.04 และ 6.79 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *E. coli* O157: H7 มีจำนวนเชื้อลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.43 log CFU/มิลลิลิตร และ *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 1.68 log CFU/มิลลิลิตร ที่เวลาเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว ในขณะที่ *S. aureus* มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.43 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียวในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 23)

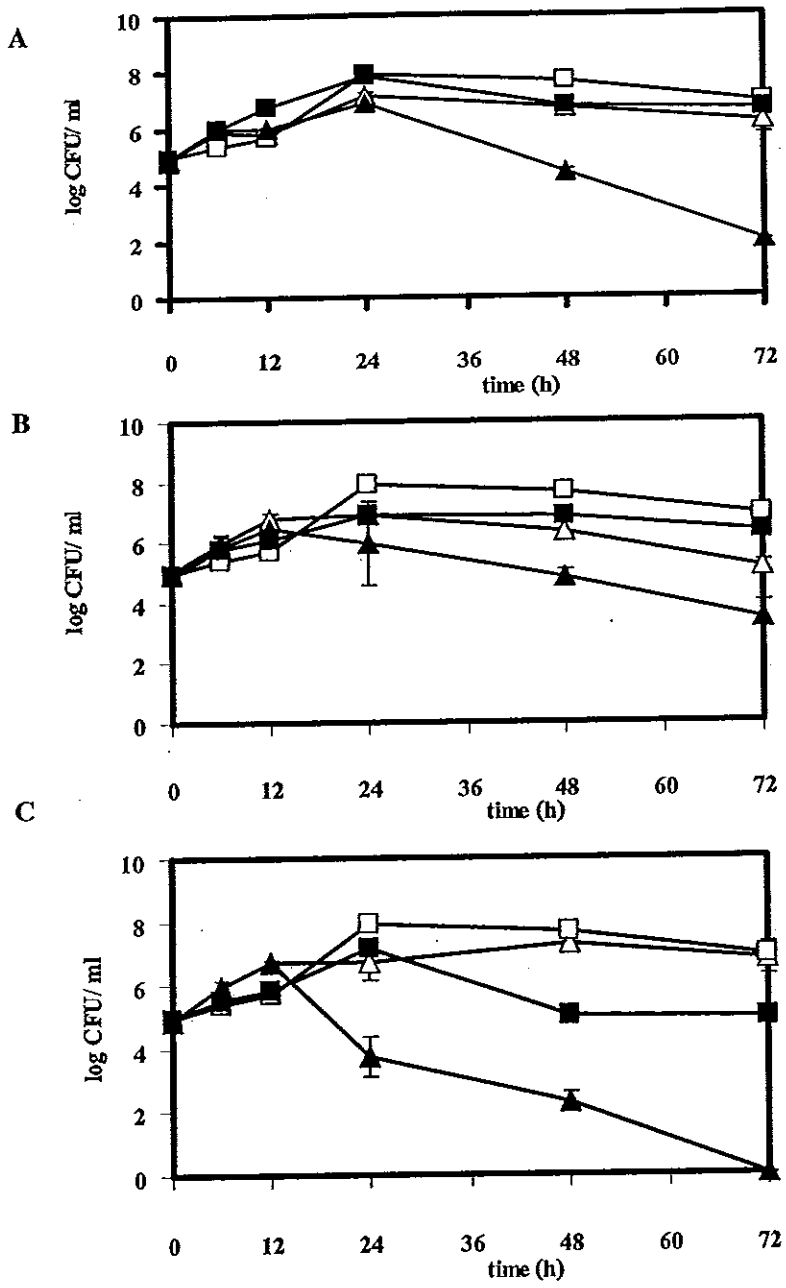


ภาพที่ 21 การเจริญของ *L. plantarum* และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi. เมื่อเลี้ยงร่วมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน (△ แบคทีเรียก่อโรคอย่างเดียว, □ *L. plantarum* อย่างเดียว, ▲ แบคทีเรียก่อโรคในco-culture และ ■ *L. plantarum* ใน co-culture)

Figure 21. Growth of *L. plantarum* and pathogens A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* and C) *Sal. enterica* ser. Typhi in the presence of ethanolic extract form mung bean as carbon source. (△ pathogen alone, □ *L. plantarum* alone, ▲ pathogen in co-culture and ■ *L. plantarum* in co-culture).

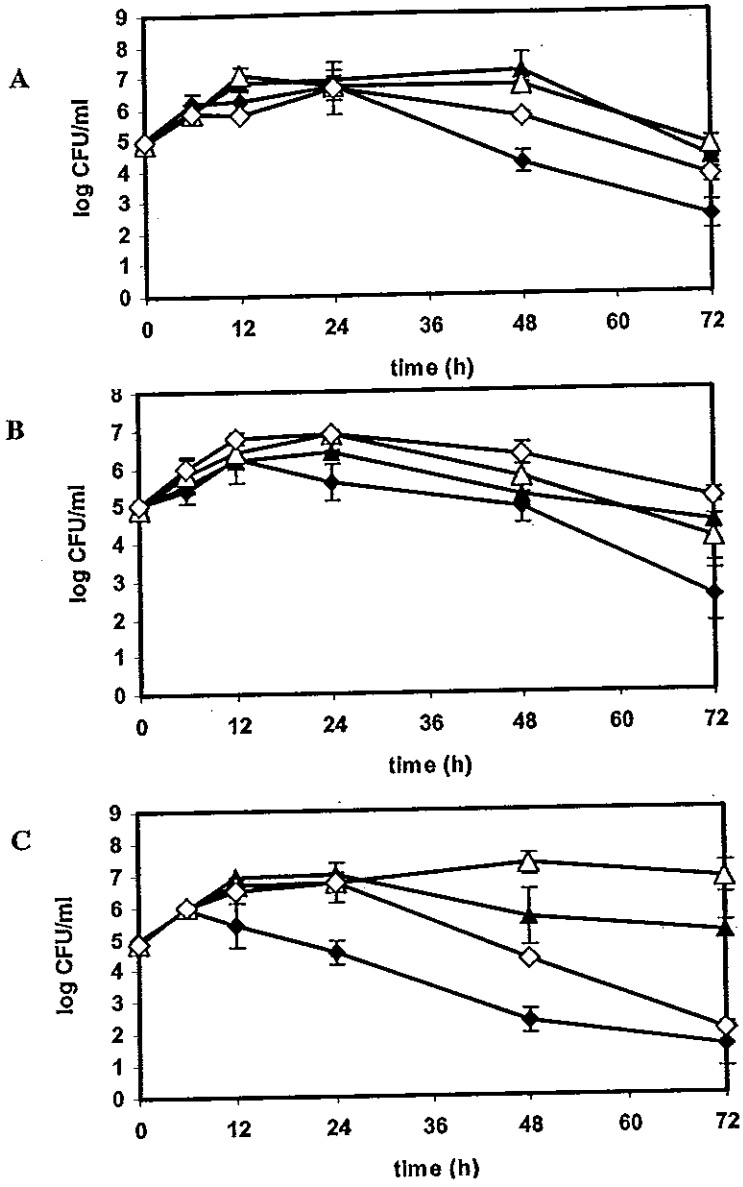
ส่วนการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคคือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ที่เลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดเท่ากับ 7.29, 6.82 และ 6.61 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6.72, 6.94 และ 7.25 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียก่อโรคคือ *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.12 และ 0.64 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนใน *E. coli* O157:H7 มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.57 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว และเมื่อพิจารณาที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดในชุดการทดลองที่มี *L. acidophilus* เจริญร่วมด้วย มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6.48, 6.67 และ 6.16 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง *E. coli* O157:H7 ลดจำนวนลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.18 log CFU/มิลลิลิตร และ *S. aureus* เพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 0.97 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่*Sal. enterica* ser. Typhi เพิ่มจำนวนแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.32 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่มี *L. acidophilus* เจริญร่วมด้วย ซึ่งมีการเจริญเท่ากับ 6.67, 5.70 และ 5.85 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน

แบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคร่วมกับ *L. acidophilus* โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีจำนวนแบคทีเรียก่อโรคเท่ากับ 3.55, 4.30 และ 4.78 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมที่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 4.70, 4.04 และ 2.85 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *E. coli* O157:H7 มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 1.15 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนใน *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้น 0.26 และ 1.93 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน โดยที่ *Sal. enterica* ser. Typhi มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 24) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียก่อโรคสามารถใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวได้น้อยกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองชนิดสามารถใช้จากสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีเช่นเดียวกัน (จากการทดลองที่ 3.2.1 และ 3.2.2) ซึ่งจากการศึกษาในขั้นตอนการนี้ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนส่งผลให้ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าการเจริญโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



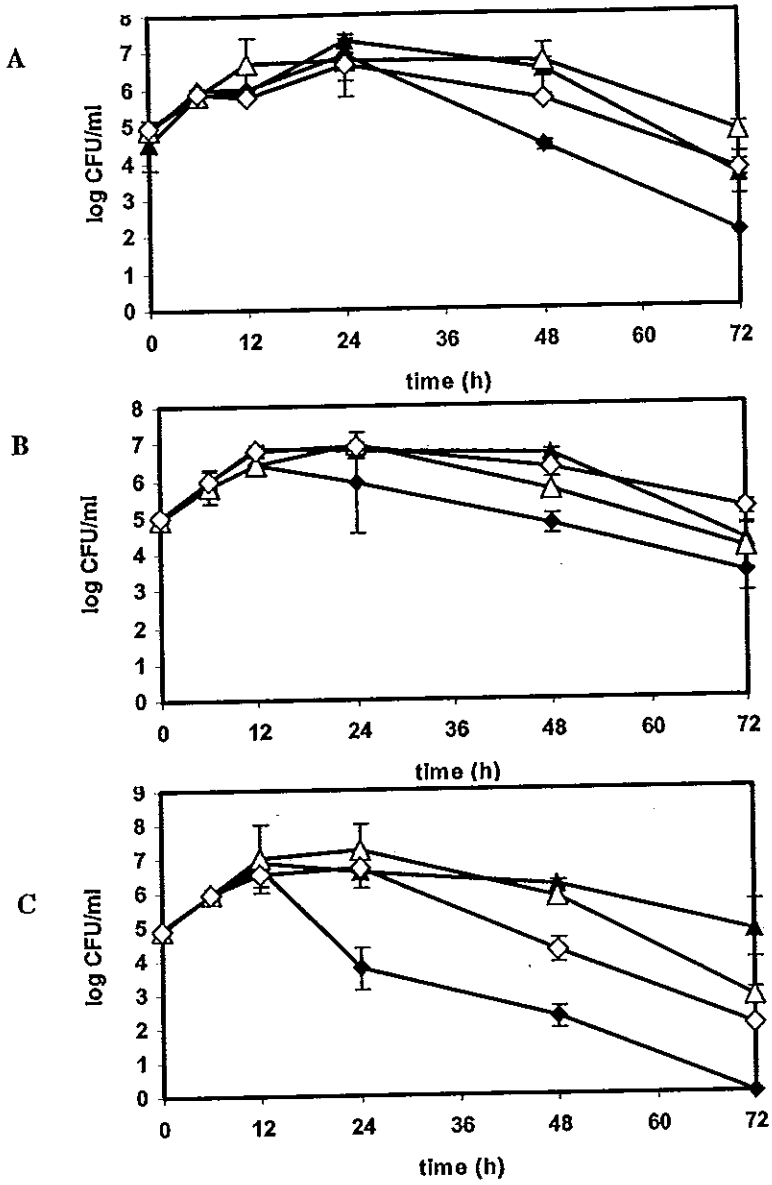
ภาพที่ 22 การเจริญของ *L. acidophilus* และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน (△ แบคทีเรียก่อโรคอย่างเดียว, □ *L. acidophilus* อย่างเดียว, ▲ แบคทีเรียก่อโรคใน co-culture และ ■ *L. acidophilus* ใน co-culture)

Figure 22. Growth of *L. acidophilus* and pathogens A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* and C) *Sal. enterica* ser. Typhi in the presence of ethanolic extract form mung bean as carbon source. (△ pathogen alone, □ *L. acidophilus* alone, ▲ pathogen in co-culture and ■ *L. acidophilus* in co-culture).



ภาพที่ 23 การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียว (◆) และกลูโคส (▲) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* และการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียวในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียว (◇) และกลูโคส (△) เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 23. Growth of pathogens A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* and C) *Sal. enterica* ser. Typhi in the presence of ethanolic extract form mung bean (◆) and glucose (▲) as a carbon sources in co-cultivation with *L. plantarum* and growth of pathogens alone in the presence of ethanolic extract from mung bean (◇) and glucose (△) as a carbon sources.



ภาพที่ 24 การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* และ C) *Sal. enterica* ser. Typhi ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียว (◆) และกลูโคส (▲) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* และการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพียงชนิดเดียวในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียว (◇) และกลูโคส (△) เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 24. Growth of pathogens A) *E. coli* O157:H7; B) *S. aureus* and C) *Sal. enterica* ser. Typhi in the presence of ethanolic extract form mung bean (◆) and glucose (▲) as a carbon sources in co-cultivation with *L. acidophilus* and growth of pathogens alone in the presence of ethanolic extract from mung bean (◇) and glucose (△) as a carbon sources.

นอกจากนี้สารพรีไบโอติกยังสามารถส่งเสริมการยับยั้งโดยใช้กลไกอื่นๆ อีก เช่น การแข่งขันการแย่งอาหารกับเชื้อก่อโรค การเพิ่มจำนวนและการป้องกันการเข้ายึดเกาะกับผนังลำไส้ใหญ่ (Fooks and Gibson, 2003; Suskovic *et al.*, 2001) จากการทดลองของ Brink และคณะ (2006) พบว่าสารพรีไบโอติกสามารถไปส่งเสริมการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้น้อยแต่สามารถไปเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะได้ดี ซึ่งพบว่าสารอาหารพรีไบโอติกจะมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกายทำให้การเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์เจริญได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สามารถไปแย่งอาหารของเชื้อก่อโรคได้ เมื่อแบคทีเรียโปรไบโอติกมีจำนวนมากขึ้นการเข้าแย่งพื้นที่ในการยึดเกาะบริเวณผนังลำไส้ก็เป็นไปได้มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งจะช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร และช่วยป้องกันการติดเชื้อในทางอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้

นอกจากการส่งเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แล้ว สารพรีไบโอติกยังมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้โดยตรง ซึ่งพบว่าสารพรีไบโอติกจะไปป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับผนังลำไส้ โดยจะไปจับกับ receptor บริเวณลำไส้ใหญ่ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถไปจับกับลำไส้ ดังนั้นจึงทำให้ถูกขับออกไปกับอุจจาระได้ (Korakli and Vogel, 2006) นอกจากนี้สารพรีไบโอติกจะไปจับกับเชื้อก่อโรค ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถจับกับ receptor บริเวณลำไส้ได้ เมื่อไม่มีที่ยึดเกาะจุลินทรีย์ก็ถูกชะออกไปนอกร่างกาย ซึ่ง Coppa และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของ Human milk oligosaccharides (HMOs) ในการยับยั้งการยึดเกาะ Caco-2 cell ของ *E. coli*, *Salmonella fyris* และ *Vibrio cholerae* พบว่า HMOs สามารถป้องกันการเข้ายึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับเซลล์ได้ และช่วยป้องกันการเกิดอาการท้องเสีย และยังมีการศึกษาอีกว่า HMOs ยังป้องกันการยึดเกาะของเชื้อ *Campylobacter jejuni* บริเวณผนังลำไส้ใหญ่ได้ ซึ่ง HMOs จะไปแย่งจับกับแบคทีเรียก่อโรคทำให้ไม่สามารถไปจับกับผนังลำไส้ได้ (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003) ในการทดลองการเลี้ยงร่วมกันครั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดเป็นผลจากกลไกใด แต่จากการทดสอบเบื้องต้นน่าจะเป็นผลของกรดอินทรีย์มากกว่าการยับยั้งโดยแบคเทอริโอซิน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ยังมีกลไกอื่นๆ อีกที่ยังไม่ได้ศึกษา ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งหรือการปรับสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่หรือร่างกายจริงๆ นั้นจะมีกลไกการยับยั้งหลายกลไกและซับซ้อนมากขึ้น เช่น การผลิตกรดขึ้นมาทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การผลิตสารยับยั้ง การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การแย่งอาหารและการแย่งพื้นที่ในการเกาะติดกับผนังลำไส้ เป็นต้น ซึ่งกลไกต่างๆ นั้นสารพรีไบโอติกมีส่วนในการกระตุ้นหรือส่งเสริมให้เกิดขึ้นได้ (Kolida *et al.*, 2002)

3.4 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดที่คัดเลือกได้จากพืชตระกูลถั่ว

3.4.1 ศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่คัดเลือกได้ โดยใช้ GPC (Gel Permeation Chromatography)

เมื่อนำสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวที่คัดเลือกได้ทั้งส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนใส หลังทำการตกตะกอนเพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ด้วยเอทานอลความเข้มข้นสุดท้าย 90 เปอร์เซ็นต์ นำมาหาน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด พบว่าส่วนตะกอนของสารสกัดถั่วเขียว มีองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 127, 288 และ 823 ดาลตัน โดยมีปริมาณ 0.35, 10.28 และ 89.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล (Mn) ที่มีค่ามากที่สุดคือ 785 ดาลตัน และองค์ประกอบของน้ำตาลในส่วนใส เท่ากับ 126, 283, 511, 742, และ 1081 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งมีอยู่ปริมาณ 18.67, 58.69, 9.62, 10.37 และ 2.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในส่วนตะกอนของสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าองค์ประกอบที่มีอยู่ในส่วนใสหลังตกตะกอน ซึ่งแสดงว่าองค์ประกอบในส่วนของตะกอนที่ได้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ และองค์ประกอบส่วนใหญ่ในส่วนที่ไม่ตกตะกอนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและ disaccharides

3.4.2 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ (TLC)

จากการวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดของถั่วเขียวจากส่วนของตะกอนหลังผ่านการตกตะกอนเพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย 90 เปอร์เซ็นต์เอทานอล โดยทำการย่อยและไม่ย่อยด้วย TFA โดยใช้ Thin layer chromatography เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส กาแลคโตสและฟรุคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลในกลุ่มราฟฟิโนสที่มักพบในพืชตระกูลถั่ว (Wang *et al.*, 2003) ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.54, 0.46 และ 0.56 ตามลำดับ และสารสกัดถั่วเขียวส่วนตะกอนหลังทำการย่อยด้วย TFA มีค่า Rf เท่ากับ 0.54 และ 0.44 เมื่อเทียบกับ Rf ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานกับค่า Rf ของสารสกัดถั่วเขียวพบว่ามีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ (ดังแสดงในภาพที่ 25) ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่าน้ำตาลกลุ่มราฟฟิโนสในถั่วเขียวพบประมาณ 1.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในถั่วเหลืองซึ่งจัดเป็นพรีไบโอติกมีปริมาณราฟฟิโนสน้อยกว่าในถั่วเขียว คือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (Hedley, 2001) ประกอบกับการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นพรีไบโอติกดังผลการศึกษาข้างต้น พบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวมีประสิทธิภาพในการเป็นพรีไบโอติกที่ดีกว่าสารสกัดถั่วเหลือง ถั่วดำ ถั่วแดง ถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วแขก ถั่วลันเตาและถั่วฝักยาวที่นำมาทดสอบ

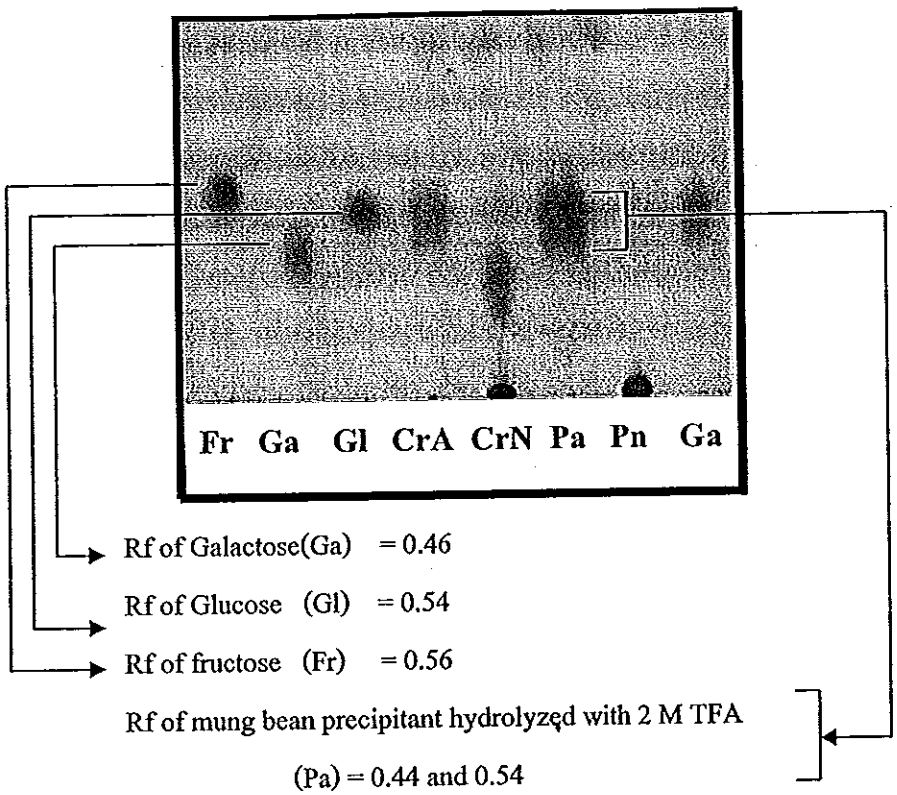
ตารางที่ 11 ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์) ขนาดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขององค์ประกอบที่มีในสารสกัดถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

Table 11. Concentration and molecular weight of component found in the partial purified of mung bean extracts.

Mung bean extract	Mn[a] (Dalton)	MW[b] average (Dalton)	Concentration (% relative)
Precipitant	126	127	0.35
	284	288	10.28
	785	823	89.37
Supernatant	123	126	18.67
	277	283	58.69
	504	511	9.62
	733	742	10.37
	1072	1081	2.65

[a] Mn is the molecular weight distribution.

[b] MW is the molecular weight.



ภาพที่ 25 รูปแบบ TLC ของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากตัวอย่างสารสกัดถั่วเขียว คือ ส่วนสารสกัดหยาบที่ย่อยด้วย 2 M TFA (CrA), ส่วนของสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย (CrN), ตะกอนที่ผ่านการย่อยด้วย 2 M TFA (Pa) และตะกอนที่ไม่ผ่านการย่อย (Pn) โดยใช้น้ำตาลฟรุคโตส (Fr) กาแลคโตส (Ga) และกลูโคส (Gl) เป็นน้ำตาลมาตรฐานเปรียบเทียบ

Figure 25. TLC profiles of sugar composition from crude of mung bean were hydrolyzed with 2 M TFA (CrA), crude of mung bean (CrN), precipitate of mung bean were hydrolyzed with 2 M TFA (Pa) and precipitate of mung bean (Pn) and used fructose (Fr), galactose (Ga) and glucose (Gl) as a reference sugar.

บทที่ 4

บทสรุป

จากการนำพืชตระกูลถั่วจำนวน 9 ชนิด มาอบแห้งที่ 55 องศาเซลเซียส และนำไปทำการสกัดด้วย 2 วิธี คือ สกัดด้วย 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอลและสกัดด้วยน้ำ จากนั้นนำสารสะลายที่ได้ไปทำแห้ง พบว่าถั่วลันเตาที่สกัดด้วยเอทานอลมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 31.88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือถั่วฝักยาว และถั่วแขกที่สกัดด้วยเอทานอลมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งเท่ากับ 25.64 และ 24.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วเขียวมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 4.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสารสกัดทั้ง 18 ตัวอย่าง มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกโดยการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรดและการทนต่อเอนไซม์ในลำไส้เล็ก พบว่าหลังจากผ่านการย่อยด้วยกรด สารสกัดส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาในครั้งนี้จึงคัดเลือกสารสกัดที่มีคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อย (indigestible carbohydrate) มากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ คือ สารสกัดจากถั่วลิสง ถั่วพู ถั่วแขก ถั่วดำ ถั่วเขียวที่สกัดด้วยเอทานอล และถั่วแดงที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งมีค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ถูกย่อยเท่ากับ 70.39, 63.82, 63.56, 60.36, 59.13 และ 59.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนการทนต่อการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase พบว่าสารสกัดที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนการย่อยด้วยกรดส่วนใหญ่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายต่ำมาก โดยสารสกัดน้ำของถั่วแดงมีค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอลของถั่วพู มีค่าเท่ากับ 5.24 และ 3.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียว ถั่วแขก ถั่วลิสงและถั่วดำ มีค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 2.09, 1.82, 1.01 และ 0.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย พบว่าเมื่อสารสกัดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยของสารสกัดเอทานอลจากถั่วลิสงมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขกมีปริมาณเท่ากับ 68.60 และ 61.81 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลของถั่วดำ ถั่วพู ถั่วเขียวที่สกัดและสารสกัดน้ำของถั่วแดง มีปริมาณเท่ากับ 60.15, 58.94, 57.12 และ 36.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำของถั่วแดงมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยน้อยที่สุด คือ 36.92 เปอร์เซ็นต์ จากขั้น

ตอนนี้จึงเลือกสารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง, ถั่วแขก, ถั่วดำ, ถั่วพูและถั่วเขียว ซึ่งยังคงมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้ปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำสารสกัดเอทานอลทั้ง 5 ชนิด มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก พบว่าเมื่อใช้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus acidophilus* ได้ดีที่สุด โดยพบว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 2.94 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อถึงการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 2.81 log CFU/มิลลิลิตร แสดงว่า *L. plantarum* สามารถเจริญในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวได้ดีเช่นเดียวกับในอาหารกลุ่มควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับ *L. plantarum* โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 2.96 และ 3.13 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อถึงการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง แสดงว่า *L. acidophilus* สามารถเจริญในอาหารกลุ่มควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อพิจารณาการใช้สารสกัดของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* พบว่าโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่าสารสกัดชนิดอื่นคือใช้ได้ถึง 57 และ 59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำสารสกัดจากถั่วเขียวด้วยเอทานอลมาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาผลการเจริญของ *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* Ser. Typhi พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งสามลดจำนวนลงถึง 0.76, 0.5 และ 0.64 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และในสารสกัดเอทานอลของถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสงและถั่วดำ พบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* สามารถเจริญได้น้อยมาก

เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเจริญของโปรไบโอติกในอาหารที่เติมสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันสายสั้น(SCFA) พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่ากรดไขมันสายสั้นชนิดอื่น ซึ่งเชื้อ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ที่มีการใช้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน จะผลิตกรดอะซิติกได้สูงที่สุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.90 และ 3.98 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากรดอะซิติกที่ผลิตได้ในชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่ง

คาร์บอน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.04 และ 4.34 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อพิจารณาเฉพาะปริมาณกรดบิวไทริก โดยเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้กลูโคสและสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. acidophilus* ที่มีสารสกัดจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณของกรดบิวไทริกเท่ากับ 2.09 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีปริมาณเพียง 1.17 มิลลิโมลาร์ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนใน *L. plantarum* เมื่อใช้สารสกัดจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกรดบิวไทริกเท่ากับ 0.95 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 1.12 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อนำส่วนใสที่ได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในชั่วโมงที่ 72 มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *Sal. enterica* Ser. Typhi ซึ่งจากการทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay พบว่าส่วนใสจากแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองชนิดที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการยับยั้งเช่นเดียวกัน คือเมื่อนำส่วนใสที่ไม่มีการปรับพีเอชและส่วนใสที่มีการเติมเอนไซม์คะตะเลส มีค่า MIC อยู่ที่ 10 AU/ ml และในส่วนใสที่มีการปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

และเมื่อศึกษาผลของการเจริญร่วมกันของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามเพิ่มจำนวนเป็น 6.71, 5.60 และ 4.55 log CFU/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย เพิ่มจำนวนเท่ากับ 7.10, 6.92 และ 5.40 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน โดย *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญร่วมกับ *L. plantarum* และมีจำนวนเชื้อลดลงโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 0.39 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มี *L. plantarum* เจริญร่วมด้วย ส่วน *S. aureus* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ที่เจริญร่วมกับ *L. plantarum* เชื้อลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 1.32 และ 0.85 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนในการเลี้ยงร่วมกันของ *L. acidophilus* และแบคทีเรียก่อโรค พบว่าแบคทีเรียก่อโรคทั้งสาม

สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับโปรไบโอติก ได้เท่ากับ 6.89, 5.93 และ 3.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* เชื้อก่อโรคสามารถเพิ่มจำนวนได้เท่ากับ 7.11, 6.90 และ 6.74 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง *E. coli* O157:H7 และ *S. aureus* มีจำนวนเชื้อลดลงโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือลดลง 0.21 และ 0.96 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* ส่วน *Sal. enterica* ser. Typhi มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) คือ 2.99 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus*

หลังจากคัดเลือกได้สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวแล้วจึงนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดถั่วเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่าส่วนของตะกอนมีอยู่ในช่วง 127-823 ดาลตัน โดยพบองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 823 ดาลตัน เป็นส่วนใหญ่ คือปริมาณ 89.37 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบพบว่าเป็นน้ำตาลในกลุ่มราฟฟีโนส โดยมีองค์ประกอบย่อยเป็นกลุ่มของน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส

เอกสารอ้างอิง

นิรัญญา บุญติ้น. 2550. การคัดเลือกโปรไบโอติกจากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิยาลัยสงขลานครินทร์.

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ, ศศิวิมล ปีติพรชัย และพรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล. 2549. การใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. รายงานการประชุมวิชาการประมงประจำปี 2549. หน้า 365-377.

Aggett, P. J., Agostoni, C., Axelsson, I., Edwards, C. A., Goulet, O., Hernell, O., Koletzko, B., Lafeber, H. N., Micheli, J. L., Michaelsen, K. F., Rigo, J., Szajewska, H. and Weaver, L. T. 2003. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. J. Pediatr. Gastr. Nutr. 36: 329-337.

Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O. and Ozdemir, C. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* sp. isolates from infant faeces. Food Microbiol. 21: 19-24.

Asahara, T., Nomota, K., Shimizu, K., Watanuki, M. and Tanka, R. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection by synbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 985-996.

Ballongue, J., Schumann, C. and Quignon, P. 1997. Effects of lactolose and lactitol on colonic microbiota and enzymatic activity. Scand. J. Gastroenterol. 32: 41-44.

Barreteau, H., Delattre, C. and Michaud, P. 2006. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. Food Technol. Biotechnol. 44: 323-333.

Bielecka, M., Biedrzycka, E. and Majkowska, A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. Food Res. Int. 35: 125-131.

Bogovic-Matijasic, B. and Rogelj, I. 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF 221-production studies in MRS-media at different pH-values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. Process Biochem. 33: 345-352.

Bosscher, D., Caillie-Bertrand, M. V., Cauwenbergh, R. V. and Deelstra, H. 2003. Availabilities of calcium iron and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. J. Nutr. 19: 641–645.

Bouhnik, Y., Flourie, B., Dagayabensour, L., Pochart, P., Garmet, G., Durand, M. and Rambaud, J. C. 1997. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. J. Nutr. 127: 444-448.

Brady, L. J., Gallaher, D. D. and Busta, F. F. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130: 410-414.

Brink, M., Todorov, S. D, Martin, J. H., Senekal, M. and Dicks, L. M. T. 2006. The effect of prebiotic on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. J. Appl. Microbiol. 100: 813-820.

Campbell, J. M., Fahey Jr, G. C. and Wolf, B. W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microfrora in rats. J. Nutr. 127: 130-136.

Collins, E.B. and Aramaki, K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 63: 681-686.

Conway, P. L. 1996. Development of Intestinal Microbiota. *In* Gastrointestinal microbes and Host Interaction. (Mackie, R. I., White, B. A. and Isaacson, R. E., eds.). p. 3-38. Chapman & Hall. New York.

Conway, P. L. 2001. Prebiotics and human health: The state of the art and future perspectives. Scand. J. Nutr. 45: 13-21.

Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Bruni, S., Carloni, I. and Gabrielli, O. 2001. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. Adv. Exp. Med. Biol. 501: 307-314.

Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., Facinelli, B., Ferrante, L., Capretti, R. and Orazio, G. 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli, Vibrio choletae* and *Salmonella fyris*. Int. Pediatr. Res. Found. 59: 377-382.

Cumming, J. H. and Englyst, H. N. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. Am. J. Clin. Nutr. 61: 938S-945S.

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. and Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. Am. J. Clin. Nutr. 43 (suppl): 415S-420S.

Drago, L. Gismondo, M.R. Lombardi, A. Haen, C.D. and Gozzini, L. 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestine origin. FEMS Microbiol. Lett. 153: 455-463.

Degeest, B., Janssens, B. and De Vuyst, L. 2001. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* O-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yield. J. Appl. Microbiol. 91: 470-477.

Delzenne, N., Cherbut, C. and Neyrinck, A. 2003. Prebiotics: actual and potential effects in inflammatory and malignant colonic diseases. Curr. Opin. Clin. Nutr. 6: 518-186.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 228: 350-356.

Erkkila, S and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter culture at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. J. Meat Sci. 55: 297-300.

Espinosa-Martos, I. and Ruperez, P. 2006. Soybean oligosachharides, Potential as new ingredients in function food. Nutr. Hosp. 21: 92-96.

Fox, J. D. and Robyt, J. F. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a micro-sample plate reader. Anal. Chem. 195: 93-96.

Fooks, L. J., Fuller, R. and Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53-61.

Fooks, L. J. and Gibson, G. R. 2003. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. Anaerobe. 9: 231-242.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

Gibson, G. R. 2004. Prebiotics. Best Practice & Research Clin. Gastroenterol. 18: 287-298.

Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. and Rudloff, S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. J. Nutr. 130: 3014-3020.

Gray, J. 2006. Dietary Fibre. *In* Definition, Analysis, Physiology and Health. (Champ, M., ed.). p. 13-17. ILSI Europe. Brussels. Belgium.

Hara, H., Li, S., Sasaki, M., Maruyama, T., Terada, A., Ogata, Y., Fujita, K., Ishigami, H., Hara, K., Fujimori, I. and Mitsuoka, T. 1994. Effective dose of lactosucrose of fecal flora and fecal metabolites of humans. Bifidobacteria Microflora. 13: 51-63.

Hedley, C. L. 2001. Carbohydrates in Grain Legume seeds: Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics. Ed. CABI publishing. Wallingford. UK.

Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. and Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Int. J. Food Microbiol. 71:235-244.

Helander, I. M., Wright, A. V. and Mattila-Sandholm, T. M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against Gram-negative bacteria. Trends Food Sci. Technol. 8: 146-150.

Herich, R. and Levkut, M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Vet. Med. 47: 169-180.

Hirayama, M. 2002. Novel physiological functions of oligosaccharides. Pure Appl. Chem. 74: 1271-1279.

Holzapfel, W. H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Res. Int. 35: 109-116.

Hopkins, M. J. and Macfarlane, G. T. 2003. Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1920-1927.

Hughes, H. and Rowland, I. R. 2001. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. Carcinogenesis. 22: 43-47.

Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Probiotics. Best Practice & Research Clin. Gastroenterol. 18: 299-313.

Jood, S., Mehta, U. and Singh, R. 1986. Effect of processing on available carbohydrates in legumes. J. Agr. Food Chem. 34: 417.

Kachanechai, T., Jantawat, P. and Pichyangkura, R. 2007. The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel. Food Hydrocolloid. 22: 74-83

Kaur, I. P., Chopra, K. and Saini, A. 2002 Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci. 15: 1-9.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. 2000. The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. Brit. Nutr. Found. 25: 223-231.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G.R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. Brit. J. Nutr. 87: S193-S197.

Kontula, K. L. and Thelappurate, R. 1998. Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solution. J. Food Prot. 57: 665-670.

Korakli, M., Ganzle, M. G. and Vogel, R. F. 2002. Metabolism by Bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. J. Appl. Microbiol. 92: 958-965.

Korakli, M. and Vogel, R. F. 2006. Structure/function of homopolysaccharide producing glycansucrase and therapeutic potential of their synthesized glycans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 790-803.

Kotiguda, G., Peterbauer, T. and Mulimani, V. H. 2006. Isolation and structural analysis of ajugose from *Vigna mungo* L. Carbohyd. Res. 341: 2156-2160.

Laurentin, A. and Edwards, C. 2004. Differential fermentation of glucose-based carbohydrates *in vitro* by human faecal bacteria a study of pyrodextrinised starches from different sources. Eur. J. Nutr. 43: 183-189.

Lee, H. W., Park, Y. S., Jung, J. S. and Shin, W. S. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. Anaerobe. 8: 319-324.

Lewus, C. B., Kaiser, A. and Montville, T. J. 1991. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1683-1688.

Martinez-Villaluenga, C., Frias, J. and Vidal-Valverde, C. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food Chem. 91: 645-649.

Mandalari, G., Palop, C.P., Tuohy, K., Gibson, G.R., Bennett, R.N., Waldron, K.W., Bisignano, G., Narbad, A. and Faulds, C.B. 2006. In vitro evaluation of the probiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 1173-1179.

Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., Yadhav, M. P., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2005. *In vitro* determination of probiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8383-8389.

Menne, E., Guggenbuhl, N. and Roberfroid, M. 2000. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. J. Nutr. 5: 1197-1199.

Michel, C., Kravtchenko, T. P., David, A., Gueneau, S., Kozlowski, F. and Cherbut, C. 1998. *In vitro* prebiotic effects of acacia gums onto the human intestine microbiota depends on both botanical origin and environmental pH. Anaerobe. 4: 257-266.

Mizota, T. 1996. Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. Bull. Int. Dairy Found. 313: 31-35.

Monson, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Simon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11: 675-686.

Nilsson, U. and Bjorck, I. 1988. Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract. J. Nutr. 118: 1482-1486.

Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K. and Ikeda, H. 1995. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. Microbiol. Rev. 56: 415-420.

Ohta, A., Ohtsuki, M., Uehara, M., Hosono, A., Hirayama, M., Adachi, T. and Hara, H. 1998. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. J. Nutr. 128: 485-490.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. Brit. J. Nutr. 83: 247-255.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. J. Meat Sci. 65: 859-867.

Parker, R. B. 1974. Probiotic, the other half of the antibiotics story. Anim. Nutr. Health. 29: 4-9.

Pereira, D. I. A. and Gibson, G. R. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4689-4693.

Pereira, D. I. A., McCartney, A. L. and Gibson, G. R. 2003. An *in vitro* study of probiotic potential of bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain and determination of its cholesterol-lowering properties. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4743-4752.

Pilasombut, K., Sakpuarum, T., Wajiwakul, W., Nitisinprasert, N., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by Lactobacillus salivarius K7 isolated from chicken intestine. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28: 121-131.

Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2002. Prebiotics Oligosaccharides: Evaluation of Biological Activities and Potential Future Developments. *In* Probiotics and Prebiotics: Where are We Going? (Tannock, G. W., ed.). p. 107-148. Caister Academic Press. United Kingdom. London.

Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2004. Functional foods: developments in colonic functional foods for improved digestive health. Bioscience. 2: 1-7.

Rastall, R. A. and Maitin, V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Food Biotechnol. 3: 490-496.

Reddy, B. S. 1998. Prevention of colon cancer by pre- and probiotic: evidence from laboratory studies. Brit. J. Nutr. 80: S219-S223.

Reddy, B. S. 1999. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence carcinogenesis and tumor growth. J. Nutr. 129: 1478S-1482S.

Reddy, B. S., Hamid, R. and Rao. 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. Carcinogenesis. 18: 1371-1374.

Reid, G. and Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect. 4: 319-324.

Ringo, E. and Gatesoupe, F. J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160: 177-203

Roberfroid, M. 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. Digest. Liver Dis. 34 (Suppl 2): S101-110.

Roberson, J. A., Ryden, P., Botham, R. L., Readind, L., Gibson, G. R. and Ring, S. G. 2001. Structural properties of diet-derived polysaccharides and their influence on butyrate production during fermentation. Brit. J. Nutr. 81: S219-S223.

Rousseau, V., Lepargneur, J. P., Roques, C. and Remaud-Simoeon, M. 2005. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. Anaerobe. 11: 145-153.

Rowland, I. R. and Tanaka, R. 1993. The effect of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. J. Appl. Bacteriol. 74: 667-674.

Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L. E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. and Newburg, D. S. 2003. *Campyrobacter jejuni* binds intestinal H (O) antigen (Fucα1, 2Galβ1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. J. Biol. Chem. 278: 14112-14120.

Rycroft, C. E., Jones, M. R. Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 878-887.

Sako, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R. 1999. Recent progressonresearch and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. Int. Dairy J. 9: 69-80.

Salminen, S. 2001. Human studies on probiotics: aspects of scientific documentation. Scand. J. Nutr. 45: 8-12.

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. and Prapulla, S. G. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructo-oligosaccharides. Trends Food Sci. Technol. 16: 442-457.

Schley, P. D. and Field, C. J. 2002. The immune enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. J. Nutr. 87: 221-230.

Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., Heuvel, G. H. M. and Schrezenmeir, E. 2001. Effect of prebiotics on mineral metabolism. Am. J. Clin. Nutr. 73: 459S-464S.

Schrezenmeir, J. and Vrese, M. D. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. Am. J. Clin. Nutr. 73 (Suppl.): 361S-364S.

Simon, G. L., and Gorbach, S. L. 1984. Intestinal flora in health and disease. J. Gastroenterol. 86: 174–193.

Simunex, J., Tishchenko, G., Hodrova, B. and Bartonova, H. 2006. Effect of chitosan on the growth of human colonic bacteria. Folia Microbiol. 51: 306-308.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B. and Ross, R. P. 2001. Market potential for probiotics. Am. J. Clin. Nutr. 73 (Suppl.): 476S-483S.

Strom, E. and Ringo, E. 1993. Changes in Bacterial Flora in Developing Cod, *Gadus morhua* (L.) Larvae After Inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the Water. *In* Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development. (Walther, B. and Fyhn, H. J., Eds.). p. 226-228. University of Bergen. Norway.

Suskovic, J., Kos, B., Goreta, J. and Matosic, S. 2001. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. Food Technol. Biotechnol. 39: 227-235.

Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacteria extracellular and cell wall polysaccharides Annu. Rev. Microbiol. 39: 243-270.

Todorov, S. D., Reenen, C. A. and Dicks, L. M. T. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. J. Gen. Appl. Microbiol. 50: 149-157.

Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. Food Technol. 48: 61-65.

Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. and Gibson, G. R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today 8: 692-700.

Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Bruck, W. M. and Gibson, G. R. 2005. Modulation of human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. Curr. Pharm. Design. 11: 75-90.

Tzortzis, G., Baillon, M. L. A., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2004. Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate. J. Appl. Microbiol. 96: 552-559.

Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P. and Szylit, O. 1993. Bioavailabitity of new synthesized gluco-olisaccharide in the intestinak tract of gnotobiotic rats. J. Sci. Food Agr. 62: 121-127.

Van der Berg, D. J. C., Robijin, G. W. and Janssen, A. C. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* O-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M. and Ouwehand, A. C. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacteria adhesion and viability. Res. Microbiol. 156: 238-244.

Virginia, S., Ocana, A. A., Holgado, P. R. and Nader-Macias, M. E. 1999. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. Immunol. Med. Microbiol. 23: 87-92.

Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B. and German, J. B. 2006. *In vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4497-4499.

Wang, Q., Ke, L., Yang, D., Bao, B., Jiang, J. and Ying, T. 2007. Change in oligosaccharides during processing of soybean sheet. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 16 (Suppl. 1): 89-94.

Wang, T. L., Domoney, C., Hedley, C. L., Casey, R. and Grusak, M. A. 2003. Nutritional quality of legume seeds. Plant Physiol.131: 886-891.

Wang, X and Gibson, G. R. 1993. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by inulin by bacteria growing in the human large intestine. J. Appl. Bacteriol. 75: 373-380.

Wisterich, G. A. 1997. Microbiology Laboratory fundamentals and application. Ed. Prentice-Hall. New Jersey. U.S.A.

Yang, S. C., Chen, J. Y., Shang, H. F., Cheng, T. Y., Tsou, S. C. and Chen, J. R. 2005. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. World J. Gastroenterol. 11: 7413-7417.

Yang, S. J., Lee, H. S., Park, C. S., Kim, Y. R., Moon, T. W. and Park, K. H. 2004. Enzymatic analysis of amylolytic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an α-amylase and a cyclodextrin hydrolyzing enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5988-5995.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Proteose peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Polysorbate 80	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.10	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 55.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Nutrient Broth (NB) และ Nutrient Agar (NA)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 8.0 กรัม (NB) และ 23.0 กรัม (NA) ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Minimal medium

องค์ประกอบ minimal medium

peptone water	2.0	กรัมต่อลิตร
yeast extract	2.0	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.1	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.04	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.04	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.6H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_20$	0.01	กรัมต่อลิตร
$NaHCO_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
Tween 80	2	มิลลิลิตรต่อลิตร
cysteine–HC1	0.5	กรัมต่อลิตร
Bile salt	0.5	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารแต่ละส่วนประกอบต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Mueller Hington Broth

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef infusion	300	กรัมต่อลิตร
Casein acid hydrolysate	17.50	กรัมต่อลิตร
Starch	1.50	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 21.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร Mueller Hington Agar

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Beef infusion	300	กรัมต่อลิตร
Casein acid hydrolysate	17.50	กรัมต่อลิตร
Starch	1.50	กรัมต่อลิตร
Agar	17.00	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 38.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Modified dinitrosalicylic acid

องค์ประกอบ

NaOH	10	กรัมต่อลิตร
Na_2SO_3	0.5	กรัมต่อลิตร
Sodium potassium tratrat	200	กรัมต่อลิตร
3,5-Dinitrosalicylic acid	10	กรัมต่อลิตร
Phenol	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง NaOH ตามปริมาณที่กำหนด ละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นนำส่วนประกอบที่เหลือละลายในสารละลาย NaOH ที่เตรียมไว้ คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้น นำมาปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Modified phenol sulfuric acid

Phenol	50	กรัมต่อลิตร
Con. Sulfuric		

วิธีการเตรียม

ชั่ง Phenol ตามปริมาณที่กำหนดละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.8 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม HCl buffer

องค์ประกอบ

NaCl	8.00	กรัมต่อลิตร
KCl	0.20	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4 $2H_2O$	8.25	กรัมต่อลิตร
NaH_2PO_4	14.35	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 2H_2O$	0.10	กรัมต่อลิตร
$MgCl_2$ $6H_2O$	0.18	กรัมต่อลิตร
HCl 5 M	ใช้ในการปรับพีเอช	

วิธีการเตรียม

ชั่งแต่ละส่วนประกอบละลายในน้ำกลั่น 0.8 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.9 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์

การเตรียมเอนไซม์

เอนไซม์ human pancreatic α-amylase (EC 3.2.1.1) (Sigma) ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใน (20 mM) ใน โซเดียมคลอไรด์ (6.7 mM) ซึ่งปรับพีเอชให้ได้ 6.9 โดยใช้ 1 N NaOH

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

ลักษณะของสารสกัดที่ได้หลังผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนและทำแห้ง (freeze dry)

1. สารสกัดเอทานอลของถั่วเขียว ลักษณะผลึกละเอียด สีน้ำตาลอ่อน
2. สารสกัดเอทานอลของถั่วดำ ลักษณะผลึกละเอียด สีแดงเข้ม
3. สารสกัดเอทานอลของถั่วลิสง ลักษณะผลึกละเอียด สีส้มปนแดง
4. สารสกัดเอทานอลของถั่วพลู ลักษณะผลึกหยาบ สีน้ำตาลปนแดง
5. สารสกัดเอทานอลของถั่วแขก ลักษณะผลึกหยาบ สีเขียวเข้มปนน้ำตาล

ตารางที่ 12 ผลได้ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วแขกและถั่วพู

Table 12. Yield percentage of ethanolic extracts and water extracts from soy bean, red kidney bean, black gram, peanut, mung bean, yard long bean, snow pea, green bean and winged bean.

Type of Samples	% yield	
	Ethanolic extracts	Water extracts
Peanut (*Arachis hypogaea* L.)	5.14	4.18
Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)	10.4	10.87
Mung bean (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek)	8.92	4.07
Black gram (*Vigna mungo* L.)	7.51	5.49
Soy bean (*Glycine max* (L.) Merr.)	11.63	19.38
Yardlong bean (*Vigna unguiculata var. sesquipedalis*)	25.64	8.48
Snow pea (*Pisum sativum* (L.) *var. macrocarpon* Ser.)	31.88	9.14
Green bean (*Phaseolus vulgaris*)	24.3	6.81
Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.)	22.41	10.21

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในสารสกัดถั่วที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำของถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วแขกและถั่วพู

Table 13. Total sugar and reducing sugar in ethanolic and water extracts from soy bean, red kidney bean, black gram, peanut, mung bean, yard long bean, snow pea, green bean and winged bean.

	total sugar (mg/g)		reducing sugar (mg/g)	
extracts	ethanol	water	ethanol	water
soy bean	614.66± 7.44	152.93± 2.54	40.76± 2.07	59.76± 4.50
red kidney bean	655.94± 3.19	218.03± 1.54	60.87± 4.78	21.52± 0.65
black gram	848.03± 5.61	329.25± 3.95	92.76± 0.90	134.52± 5.42
peanut	1044.83± 9.99	485.01± 4.17	38.72± 7.28	56.99± 4.25
mung bean	538.30± 8.12	261.11± 9.23	38.72± 1.93	32.09± 2.00
yard long bean	1058.99± 8.94	574.29± 7.90	242.35± 11.33	192.62± 18.56
snow pea	933.33± 3.24	624.00± 8.91	374.66± 7.14	233.77± 6.78
green bean	792.96± 6.82	200.85± 6.15	172.17± 4.76	86.68± 3.88
winged bean	535.96± 7.26	344.32± 9.39	118.41± 4.72	198.22± 14.53

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่พีเอช 1, 2 และ 3

Table 14. Hydrolysis of the extracts prepared from plant extracts in HCl solution for 4 hours at pH of 1, 2 and 3

Extracts	pH	% hydrolysis	
		Ethanol	Water
soybean	1	41.07±1.62	55.10±5.49
	2	5.78±0.38	43.95±1.96
	3	2.14±0.74	34.35±3.55
red kidney bean	1	38.79±2.30	32.44±2.54
	2	8.47±0.42	6.97±0.83
	3	4.81±1.03	5.44±0.47
black gram	1	25.28±1.35	76.24±4.36
	2	11.3±1.67	52.17±1.83
	3	5.63±0.91	41.12±1.79
peanut	1	25.84±0.32	51.39±2.27
	2	3.28±0.67	23.12±2.49
	3	0.55±0.14	12.50±1.53
mung bean	1	34.37±1.01	36.73±2.42
	2	8.89±0.97	5.78±0.64
	3	2.64±0.45	3.68±1.12
yard long bean	1	26.76±0.90	22.19±0.75
	2	6.39±0.35	5.12±0.37
	3	2.16±0.18	1.87±0.19

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่พีเอช 1, 2 และ 3 (ต่อ)

Table 14. Hydrolysis of the extracts prepared from plant extracts in HCl solution for 4 hours at pH of 1, 2 and 3

Extracts	pH/Time	% hydrolysis	
		Ethanol	Water
snow pea	1	20.35±3.64	20.34±1.36
	2	13.81±0.65	5.22±0.85
	3	12.03±0.99	4.30±0.25
Green bean	1	14.92±2.06	20.96±0.87
	2	0.82±0.27	15.02±0.77
		0.10±0.04	12.04±0.60
Winged bean	1	19.54±0.76	17.53±1.12
	2	3.95±0.73	3.89±0.29
	3	1.57±0.34	0.25±0.08

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือของสารสกัด หลังผ่านการย่อยด้วยกรด HCl buffer ที่ pH 1 เวลา 4 ชั่วโมง

Table 15 Percentage of total sugar remaining of extracts after hydrolysis by HCl buffer pH 1 for 4 hours

extracts	% total sugar remaining	
	ethanol	water
soy bean	52.73±1.62	27.56±5.49
red kidney bean	55.16±2.30	59.15±2.54
black gram	60.36±1.35	18.98±2.54
peanut	70.39±0.32	31.66±2.27
mung bean	59.13±1.01	49.24±2.42
yard long bean	51.43±0.90	54.12±0.75
snow pea	51.52±3.64	47.99±1.36
green bean	63.56±2.06	58.08±0.87
wing bean	63.82±0.76	36.41±1.12

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreas a-amylase ที่เวลา 6 ชั่วโมง ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วเขก ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเขียวและสารสกัดน้ำของถั่วแดง

Table 16. Enzymatic hydrolysis of extracts by human pancreas a-amylase for 6 hours from ethanolic extracts of green bean, winged bean, peanut, black gram, mung bean and water extracts from red kidney bean

extracts	% hydrolysis
green bean	1.82±0.34
winged bean	3.52±1.36
peanut	1.01±0.49
black gram	0.40±0.20
mung bean	2.09±1.26
red kidney bean	5.24±1.69

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือของสารสกัด หลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreas a-amylase ที่เวลา 0 และ6 ชั่วโมง ของสารสกัดเอทานอลจากถั่วแขก ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วเขียวและสารสกัดน้ำของถั่วแดง

Table 17 Percentage of total sugar remaining after hydrolysis by human pancreas a-amylase for 0 and 6 hours from ethanolic extracts of green bean, winged bean, peanut, black gram, mung bean and water extracts from red kidney bean

Extracts/ times	% total sugar remaining	
	0 h	6 h
green bean	63.56±2.06	61.81±1.03
winged bean	63.82±0.76	58.94±2.69
peanut	70.39±0.32	68.60±3.72
black gram	60.36±1.35	60.15±2.83
mung bean	59.13±1.01	57.12±1.29
red kidney bean	59.15±2.54	36.92±2.24

ตารางที่ 18 การเพิ่มจำนวนปริมาณจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Table 18 Growth of probiotics used ethanolic extracts as carbon sources in minimal medium.

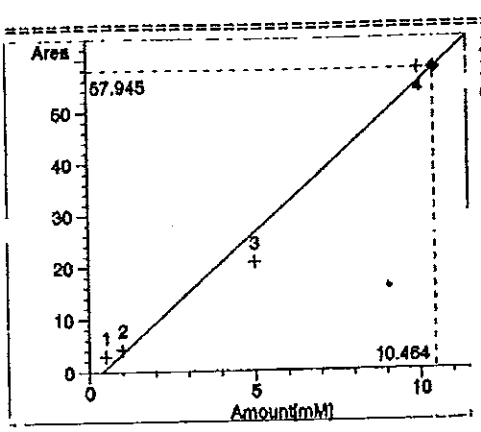
Bacteria	Time (h)	Ethanolic extracts (log CFU/ml)				
		green bean	winged bean	peanut	black gram	mung bean
L. platarum	0	5.00±0.12	4.96±0.13	4.9±0.06	4.98±0.10	4.93±0.05
	6	5.02±0.04	5.12±0.07	5.06±0.22	5.01±0.22	5.47±0.03
	12	4.93±0.21	5.26±0.02	4.48±0.26	4.75±0.49	5.65±0.08
	18	5.28±0.15	5.22±0.11	4.66±0.93	5.07±0.17	6.8±0.03
	24	5.11±0.05	5.37±0.01	5.09±0.07	5.09±0.07	7.88±0.09
	48	4.35±0.04	4.54±0.10	4.32±0.03	4.66±0.02	6.32±0.20
	72	4.16±0.23	4.51±0.09	4.16±0.18	4.37±0.28	6.28±0.14
L. acidophilus	0	4.95±0.04	5.06±0.10	4.90±0.06	4.90±0.04	4.95±0.13
	6	5.24±0.34	5.11±0.08	5.30±0.09	5.19±0.07	5.36±0.21
	12	5.59±0.01	5.18±0.03	5.48±0.34	5.18±0.01	5.67±0.16
	18	5.79±0.03	5.19±0.03	5.11±0.09	5.20±0.03	7.78±0.17
	24	6.44±0.06	5.13±0.14	5.93±0.30	5.48±0.31	7.90±0.02
	48	5.80±0.01	4.66±0.31	5.08±0.12	4.71±0.32	7.64±0.02
	72	5.76±0.02	4.07±0.01	4.28±0.13	4.09±0.01	6.91±0.08

ตารางที่ 19 การเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียในอาหาร minimal medium ที่ใช้สารสกัดของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน

Table 19. Growth of probiotics used ethanolic extracts of mung bean as carbon sources in minimal medium

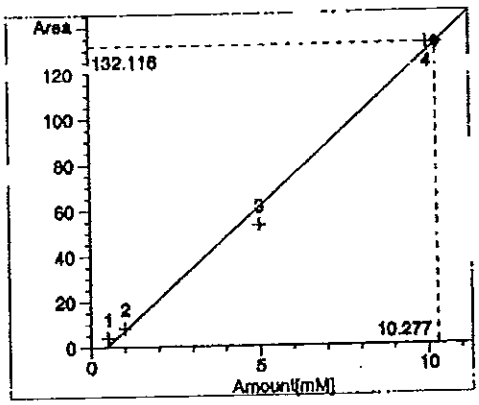
Probiotics	Time (h)	viable counts (log CFU/ml)		
		E.coli 0157: H7	*S. aureus*	*Sal. typhi*
L. platarum.	0	4.907±0.05	5.077±0.01	5.077±0.02
	12	7.362±0.13	7.063±0.07	6.522±0.38
	24	7.962±0.03	7.232±0.14	7.910±0.41
	48	7.328±0.14	6.901±0.17	7.391±0.02
	72	6.234±0.12	6.156±0.17	6.927±0.17
L. acidophilus	0	4.956±0.01	4.877±0.31	4.922±0.01
	12	6.777±0.04	6.104±0.24	5.834±0.03
	24	7.837±0.01	6.894±0.02	7.172±0.30
	48	6.766±0.61	6.841±0.21	6.976±0.08
	72	6.619±0.14	6.333±0.09	6.933±0.13

A



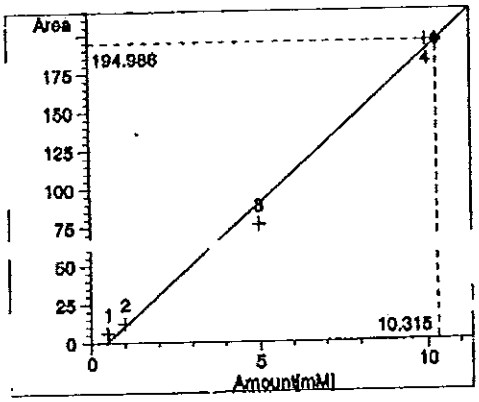
ACETIC ACID at exp. RT: 5.027
FID1 A,
Correlation: 0.98837
Residual Std. Dev.: 4.77531
Formula: y = mx + b
m: 5.75391
b: -2.26133
x: Amount[mM]
y: Area

B



PROPIONIC ACID at exp. RT: 5.679
FID1 A,
Correlation: 0.99579
Residual Std. Dev.: 6.66938
Formula: y = mx + b
m: 13.43820
b: -5.98976
x: Amount[mM]
y: Area

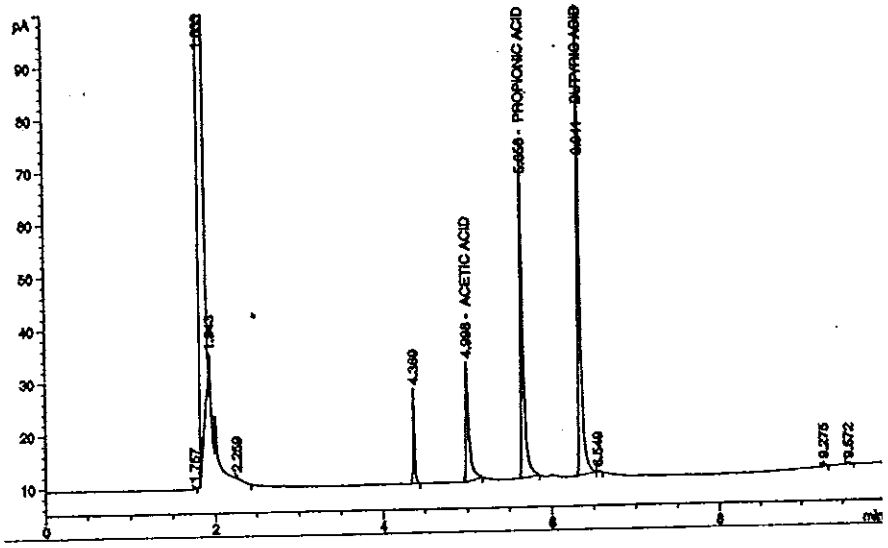
C



BUTYRIC ACID at exp. RT: 6.359
FID1 A,
Correlation: 0.99457
Residual Std. Dev.: 11.15224
Formula: y = mx + b
m: 19.75920
b: -8.83493
x: Amount[mM]
y: Area

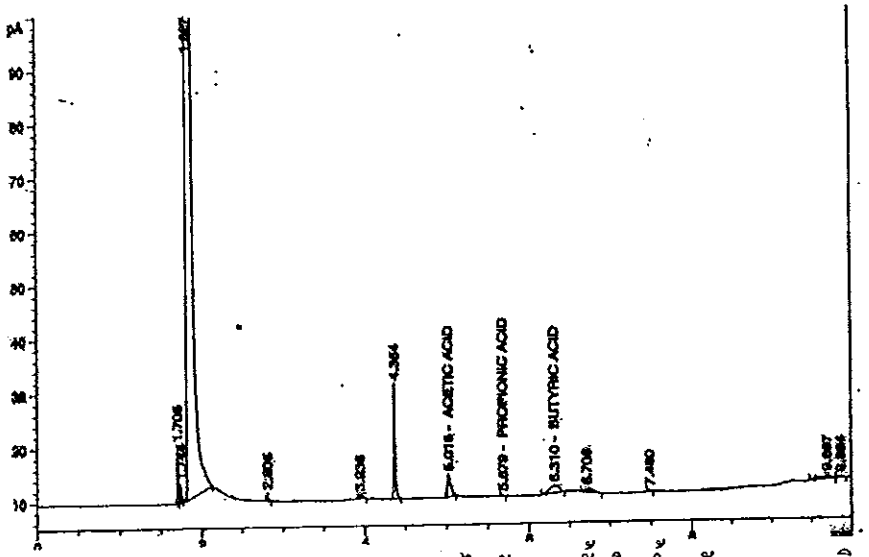
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ A) อะซิติก B) โพรพิโอนิก C) บิวเทอริก

Figure 26. Standard curve of A) acetic acid; B) propionic acid; C) butyric acid.



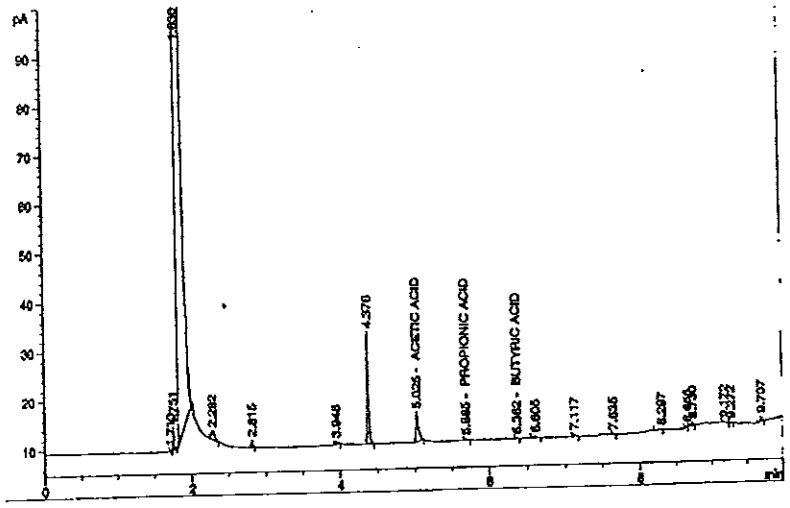
ภาพที่ 27 โครมาโทแกรมของ GC แสดงตัวอย่างผสมของ(1) กรดอะซิติก, (2) กรดโพรพิโอนิก

Figure 27. Gas chromatograms of standard mixture; (1) acetic acid; (2) propionic acid and (3) butyric acid.



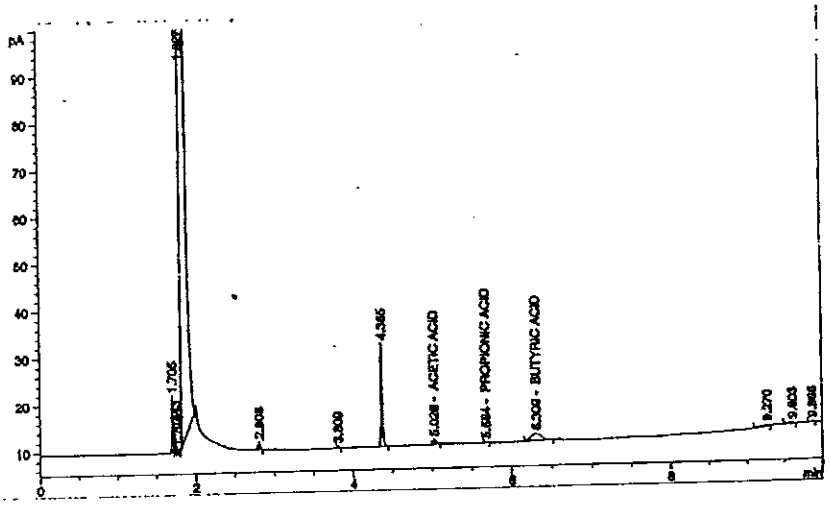
ภาพที่ 28 โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้นในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. plantarum* ใน minimal medium ที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 48 ชั่วโมง

Figure 28. Gas chromatograms of short chain fatty acid (SCFA) in fermentation by *L. plantarum* in minimal medium containing mung bean extracted as carbon sources at 48 h.



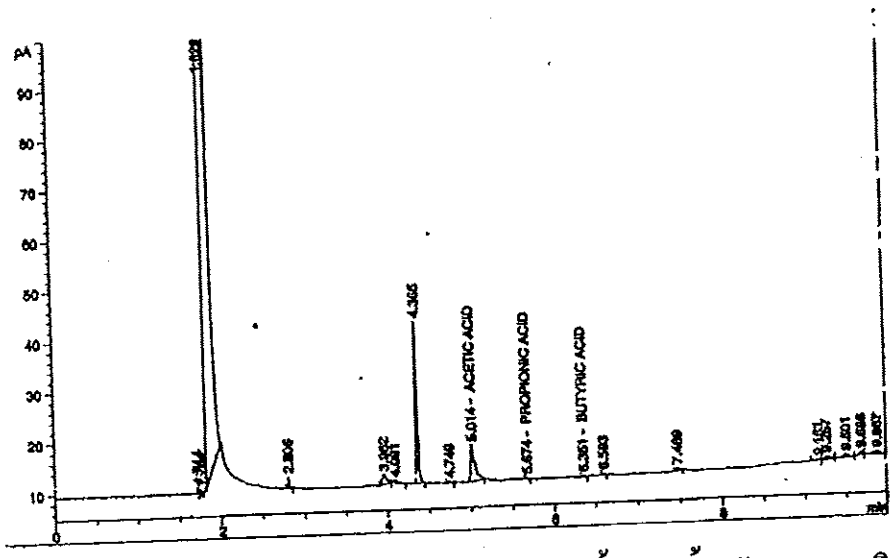
ภาพที่ 29 โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. plantarum* ใน minimal medium ที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 24 ชั่วโมง

Figure 29. Gas chromatograms of short chain fatty acid (SCFA) in fermentation by *L. plantarum* in minimal medium containing mung bean extracted as carbon sources at 24 h.



ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. acidophilus* ใน minimal medium ที่มีที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 48 ชั่วโมง

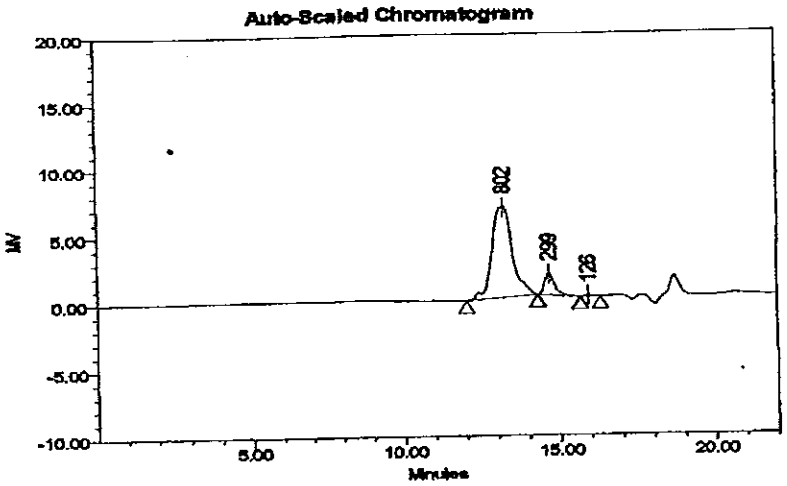
Figure 30. Gas chromatograms of short chain fatty acid (SCFA) in fermentation by *L. acidophilus* in minimal medium containing containing mung bean extracted as carbon sources at 48 h.



ภาพที่ 31 โครมาโทแกรมของ GC แสดงกรดไขมันสายสั้น ในน้ำหมักจากการเจริญของ *L. acidophilus* ใน minimal medium ที่มีที่มีสารสกัดเอทานอลของถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 24 ชั่วโมง

Figure 31. Gas chromatograms of short chain fatty acid (SCFA) in fermentation by *L. acidophilus* in minimal medium containing containing mung bean extracted as carbon sources at 24 h.

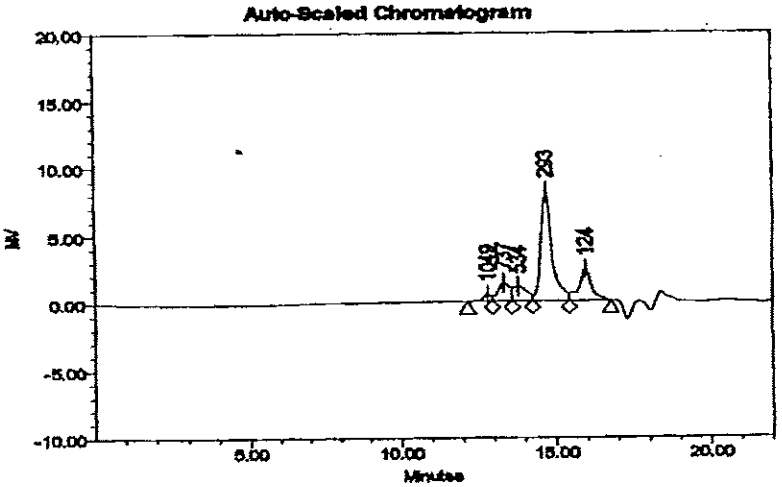
A



GPC Results

	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Polydispersity	% Area
1	795	823	802	861	900	1.048066	89.37
2	284	288	299	292	298	1.014611	10.26
3	126	127	126	127	128	1.003808	0.35

B



GPC Results

	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Polydispersity	% Area
1	1072	1081	1049	1092	1103	1.008740	2.65
2	733	742	737	751	761	1.012129	10.37
3	504	511	534	519	525	1.014578	9.62
4	277	283	293	289	294	1.021409	58.69
5	123	128	124	129	133	1.026046	18.67

ภาพที่ 32 โครมาโทแกรมของ GPC แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดจากถั่วเขียว

Figure 32. GPC chromatogram of mung bean extracts, (A) precipitate of extracts, (B) supernatant of extract.

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

ทำการอบภาชนะสำหรับเตรียมชั่งน้ำหนักตัวอย่างในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำภาชนะที่อบแล้วใส่ในโถดูดความชื้น ก่อนใส่ตัวอย่างนำภาชนะไปชั่งน้ำหนักก่อน แล้วนำตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนักและวัดค่าสีแล้วใส่ลงในภาชนะ และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จึงนำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก คำนวณเป็นร้อยละโดยใช้สูตร คือ

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

2. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Miller (1959) (อ้างโดย Robertson *et al.*, 2001)

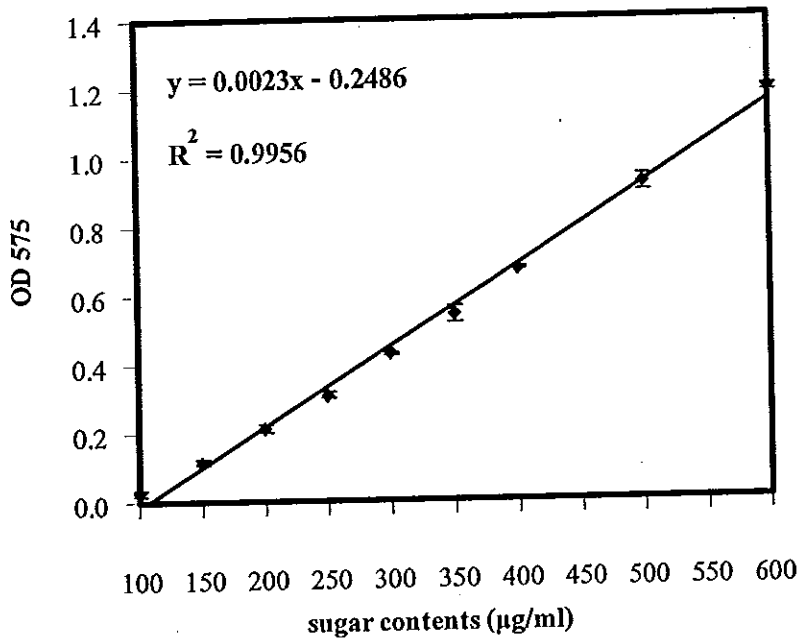
2.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

โดยทำการเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 450 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ทำการทดลองในไมโครไตเตอร์เพลท ขนาด 96 หลุมโดยเติมสารละลายกลูโคส 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 100 ไมโครลิตรเขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-500ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น

ดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม (ช่วง 100 หรือ 200 เท่า) 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท 3 หลุม (3 ซ้ำ) เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการโดยการแทนค่า

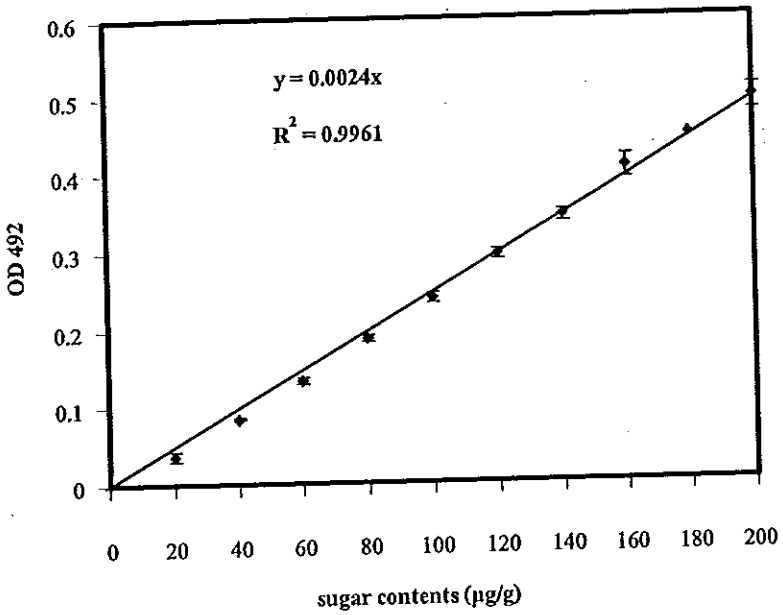


ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น

Figure 33. Standard curve of reducing sugar.

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Fox and Robyt, 1991)

ทำการทดลองโดยดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท ขนาด 96 หลุม เติม 5 % Phenol 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ 30 วินาที นำไมโครไตเตอร์เพลท ไปแช่บนน้ำแข็งเติม 95% concentration Sulfuric Acid 125 ไมโครลิตร ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป นำไปให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 นาที ทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร เทียบค่า OD ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคส



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

Figure 34. Standard curve of total sugar.

3. วิธีวิเคราะห์ Microdilution assay

ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของน้ำหมักที่ได้จากการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกร่วมกับสารสกัด โดยวิธี broth microdilution assay ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วยแบคทีเรียก่อโรค 10^5 CFU/ml จำนวน 100 ไมโครลิตรในทุกหลุม นำส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวแรก แล้วทำการเจือจางลำดับสอง (two-fold dilution) ด้วยอาหาร minimal medium โดยดูดส่วนใสจากหลุมแรกปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลุมแถวที่สองแล้วผสมกันกับอาหารเหลว โดยดูดขึ้นลงเป็นเวลา 5 ครั้ง จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลุมต่อไป ซึ่งแต่ละหลุมจะมีปริมาณเชื้อเท่ากันทุกหลุม และมีส่วนใสของน้ำหมักที่มีความเข้มข้นเจือจางเป็นสองเท่าถัดลงมาในไมโครเพลท โดยมี positive control คือ เชื้อแบคทีเรียผสมกับ minimal medium และ negative control คือ ส่วนใสของน้ำหมักผสมกับ minimal medium จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูกิจกรรมการยับยั้งโดยคัดเลือกหลุมที่ไม่เกิดความขุ่น แสดงว่ามีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ รายงานผลเป็นค่า Arbitary unit ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกันกับระหว่างส่วนใสทั้ง 4 ชนิด ซึ่งหลุมสุดท้ายที่ไม่เห็นความขุ่นคือค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

4.การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

4.1 จุลินทรีย์ก่อโรค

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (*Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* และ *Escherichia coli* O157: H7) จากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับแบคทีเรียก่อโรค แล้วบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้จำนวนเชื้อเท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร (กรณีเชื้อ *Sal. typhi* และ *E. coli* O157: H7) และ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (กรณีเชื้อ *S. aureus*) จากนั้นนำมาเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร

4.2 จุลินทรีย์โปรไบโอติก

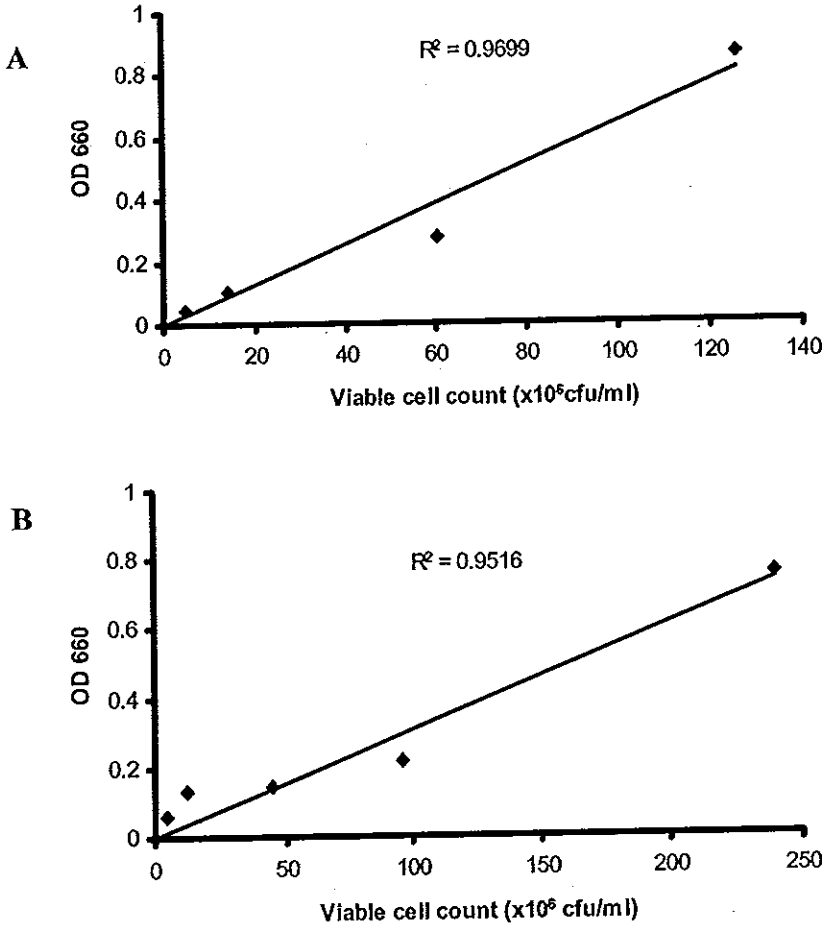
เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (*Lactobacillus plantarum* TISTR 450 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875) จาก stock culture มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ได้จำนวนเชื้อเท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร

5. การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

ทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็งที่เหมาะสมกับกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากนั้นใช้ spreader ปราศจากเชื้อกวาดไปมาบนอาหารแข็งที่มี solution ของเชื้ออยู่ โดยกวาดให้ทั่วผิววุ้น จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยเชื้อโปรไบโอติกใช้อาหาร MRS agar ในสภาวะไร้อากาศโดยเลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และแบคทีเรียก่อโรคทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MHA บ่มเพาะเชื้อ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง) จากนั้นตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยคำนวณค่าเป็น CFU/ml (colony forming units)

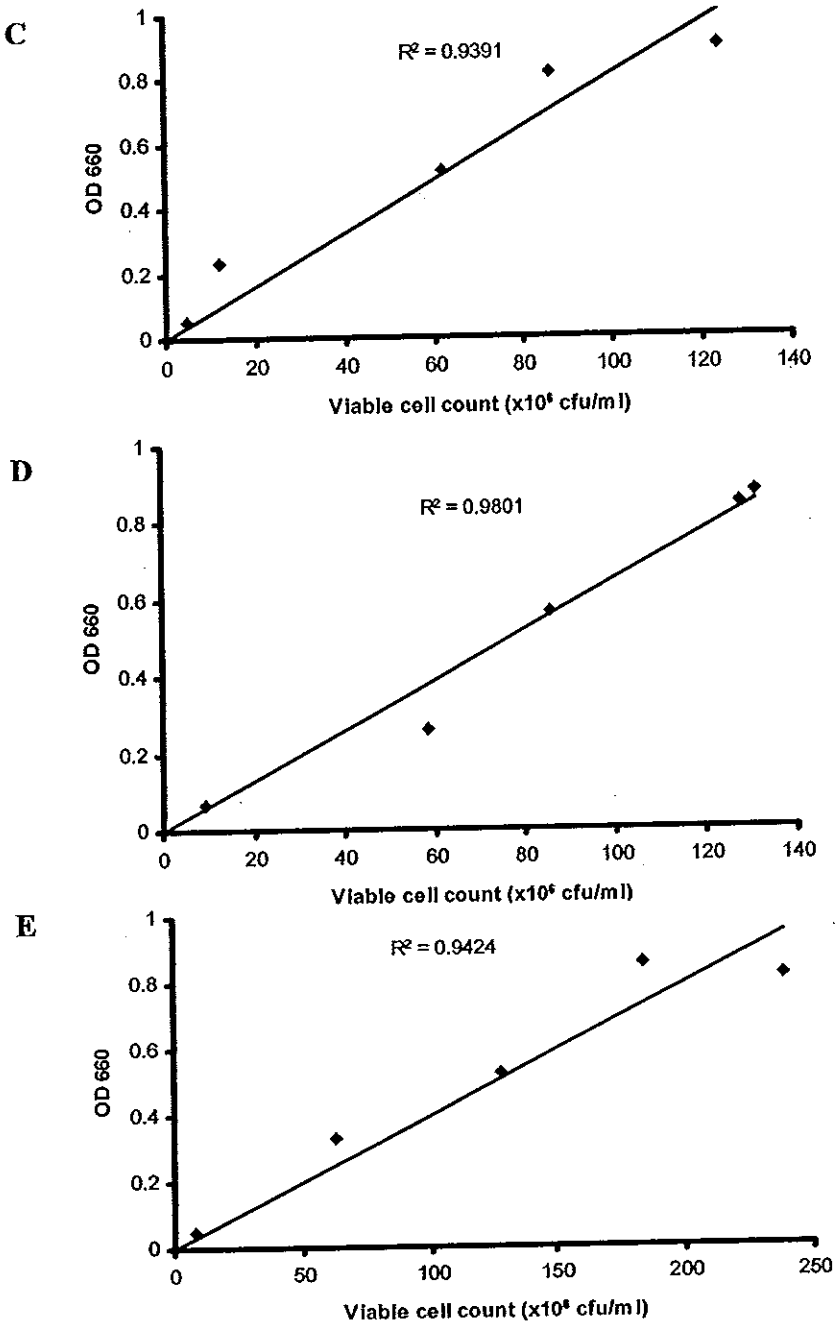
6. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจากการ spread plate

จากขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อทำการบ่มเพาะเชื้อในอาหารเหลวแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นจึงตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตโดยการ Spread plate และนำมาเขียนกราฟเพื่อเทียบค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบแต่ละชนิด ซึ่งอยู่ในช่วงเวลาการบ่มเพาะเชื้อที่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังแสดงต่อไปนี้



ภาพที่ 35 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD 660 นาโนเมตรและจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ คือ *L. plantarum* (A), *L. acidophilus* (B), *E. coli* O157:H7 (C), *S. aureus* (D) และ *Sal. enterica* ser. Typhi (E)

Figure 35. The relation between OD 600 nm and viable cell number (CFU/ml) of tested microorganism are *L. plantarum* (A), *L. acidophilus* (B), *E. coli* O157:H7 (C), *S. aureus* (D) and *Sal. enterica* ser. Typhi (E).

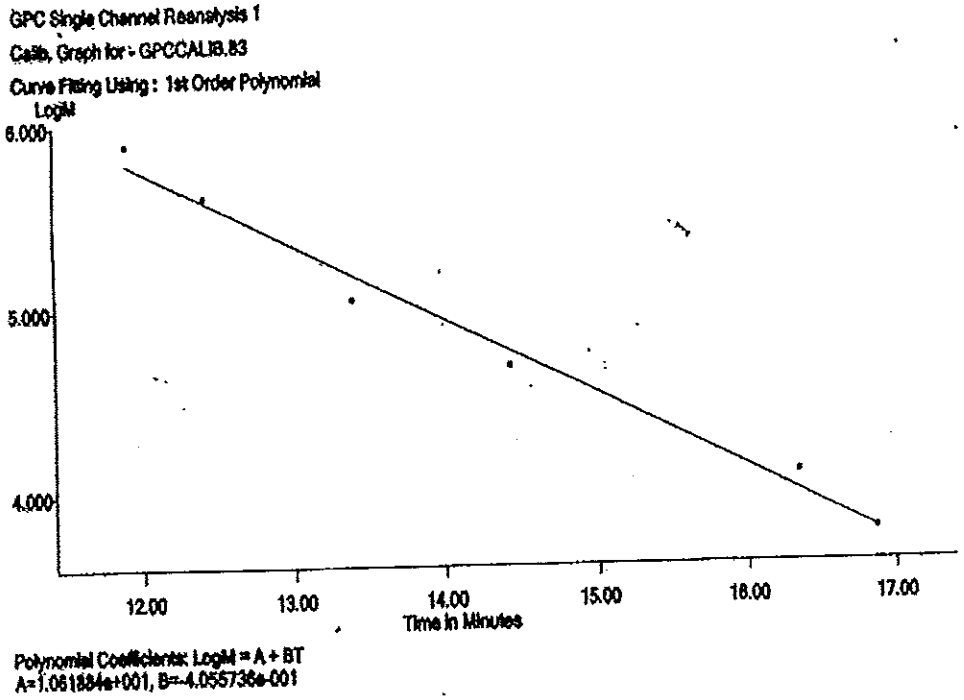


ภาพที่ 35 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD 660 นาโนเมตรและจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ คือ *L. plantarum* (A), *L. acidophilus* (B), *E. coli* O157:H7 (C), *S. aureus* (D) และ *Sal. enterica* ser. Typhi (E) (ต่อ)

Figure 35. The relation between OD 600 nm and viable cell number (CFU/ml) of tested microorganism are *L. plantarum* (A), *L. acidophilus* (B), *E. coli* O157:H7 (C), *S. aureus* (D) and *Sal. enterica* ser. Typhi (E).

7. การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel permeation chromatography (GPC)

นำสารสกัดทั้งส่วนตะกอนและส่วนใสหลังจากทำการตกตะกอนด้วย 90 เปอร์เซ็นต์เอทานอล มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลใหญ่โดยใช้ GPC (Gel Permeation Chromatography) เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยขนาดโมเลกุลการแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุเม็ดของแข็งที่มีรูพรุนหรือเจล (Gel)



ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของ pullulans วิเคราะห์โดย GPC

Figure 36. GPC chromatogram of pullulans (standard curve)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวโสภา บิลละโสย

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4882037

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ (ประเภท ข) คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2549
- ทุนจากโครงการวิจัย การศึกษาแหล่งของพรีไบโอติกจากพืชไทยบางชนิดซึ่งได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการสมองไหลกลับ (RBD) ของสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช)

ทุนอุดหนุนงานวิจัย

- ทุนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sopa Billasoi, Supitchaya Chantachum and Tipparat Hongpattarakere. 2007. Prebiotic Properties of Oligosaccharides Extracted from Legumes. The 7th National Graduate Research Conference. Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani, Thailand. 4-5 April 2007. pp. 98.