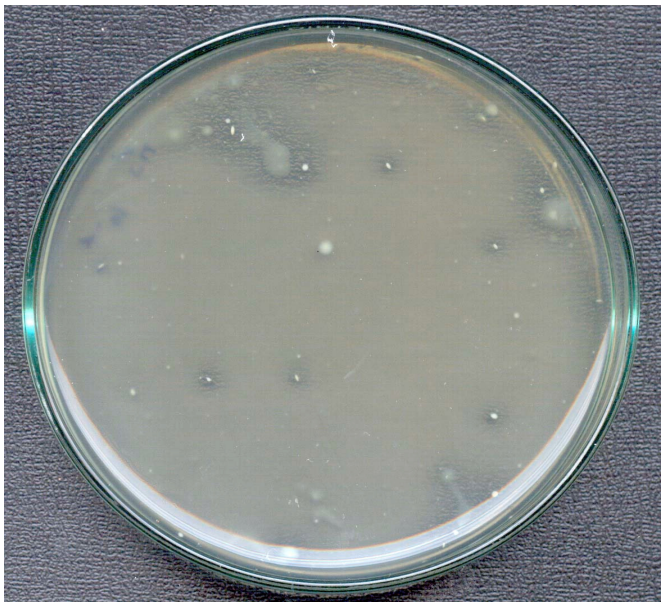
บทที่ 3
ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารสัตว์ทะเล

จากการนำตัวอย่างเครื่องในจากสัตว์ทะเลที่เป็นปลา กุ้ง และ ปู รวม 20 ชนิด ได้แก่ ปลาโคป (Moustached thryssa) ปลาทราย (Silver sillago) ปลาเก๋า (Areolated grouper) ปลาขี้ตัง (Damsel fish) ปลากระบอก (Red mullet) ปลาทู (Short mackerel) ปลาแป้น (Common ponyfish) ปลาจวด (Soldier croaker) ปลาคางคก ปลาสลิดหิน (Whitespotted spinefoot) ปลาท่องเที่ยว ปลาดุกทะเล (Catfish) ปูม้า (Blue swimming crab) กุ้งหางแดง (Greasy back shrimp) กุ้งกุลาดำ (Giant tiger prawn) และกั้ง (Mantis shrimp) รวมทั้งตัวอย่างหอยแครง (Cockle) หอยแมลงภู่ (Green mussel) หอยตลับ (Oriental hard clam) หอยลาย (Short-neck clam) และอาหารหมักซึ่งเป็นไตปลาจวด (Fermented intestine) มาแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ที่ใช้เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบโคโลนี (ภาพที่ 11) บนอาหาร MRS ที่เททับด้วยอาหารที่มี *E. coli* มาทำการแยกเชื้อ พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้ 160 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) โดยแยกจากเครื่องในปลาขี้ตังได้สูงสุด คือ 28 สายพันธุ์ รองลงมาคือจากหอยแมลงภู่ และเครื่องในปลาดุกทะเล ซึ่งแยกได้ตัวอย่างละ 19 สายพันธุ์ และแยกได้จากเครื่องในของปลากระบอก ปลาแป้น ปลาสลิดหิน ปลาทู กั้ง ปลาท่องเที่ยว และกุ้งกุลาดำ จำนวน 15, 14, 13, 10, 10, 8 และ 7 สายพันธุ์ ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างชนิดอื่น เช่น ปลาเก๋า ปลาคางคก ปลาจวด ไตปลา และกุ้งหางแดง แยกได้น้อยมาก คือ1-3 สายพันธุ์ นำเชื้อที่ได้มาทดสอบเบื้องต้นโดยย้อมสีแกรมและทดสอบเอนไซม์คะตะเลส พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นแท่งและมีรูปร่างกลม ให้ผลคะตะเลสเป็นลบ ยกเว้นเชื้อที่แยกได้จากไตปลาจวดจะให้ผลเป็นบวก จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแลกติกยกเว้นเชื้อที่แยกได้จากไตปลา เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือแท่ง ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axellsson, 1993)

จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่แยกและคัดเลือกได้จะมีปริมาณ 4-5x10^4 ถึง 10^5 cfu ต่อกรัมน้ำหนักเปียกของเครื่องในสัตว์ทะเลทุกชนิด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการแยกจากกระเพาะอาหารของปลา Samonid พบว่ามีปริมาณ 2x10^4 ถึง 10^5 cfu ต่อกรัม (Austin and Al-Zahrani, 1998; Ringo, 1993) แต่พบว่าแบคทีเรียแลกติกไม่ได้เป็นจุลินทรีย์หลักที่มีอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล จากการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารของปลา Arctic charr,

Salvelinus alpinus (L) พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียแลกติกแค่ 10 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด (Ringo, 1993) แต่จากการศึกษาพบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่สูง ซึ่งความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรีย อาจขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่ใช้ในการแยกและสภาวะแวดล้อมที่ปลาอาศัย จากรายงานข้างต้นเป็นการแยกจากปลาน้ำเย็น แต่จากการทดลองครั้งนี้แยกจากปลาเขตร้อน จึงทำให้เป็นไปได้ว่าปริมาณของแบคทีเรียแลกติกแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลต่อการแยกแบคทีเรียแลกติกจากปลาทะเลอีก 3 ปัจจัยที่สำคัญ อาหารที่ใช้ในการแยก อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม และเวลาที่ใช้ในการบ่ม ซึ่งอาหารที่ใช้แยกจะใช้ trypticase soy agar (TSA), Marine-medium และ brain-heart infusion agar (BHIA) (Ringo and Gatesoupe, 1998)



ภาพที่ 11 โคโลนีของแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS agar ที่เททับด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*E. coli*)

Figure 11. LAB colonies on MRS agar overlaid with pathogenic *E. coli* containing NA agar layer. The colonies expressed inhibitory activity with clear zone was selected.

ตารางที่ 6 จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างต่างๆ

Table 6. Number of isolates obtained from differences sample.

Type of Samples	Obtained isolates	
	Aerobe	Anaerobe
Lycothrissa crocodiles (Moustached thryssa)	-	3
Epinephelus areolatus (Areolated Grouper)	1	-
Penaeus monodon (Giant tiger prawn)	-	7
Dascyllus aruanus (Damsel fish)	14	14
Perna viridis (Green mussel)	19	-
Parupeneus cinnabarins (Red Mullet)	10	5
Rastrelliger brachysoma (Short mackerel)	4	6
Leiognathus eguulus (Common ponyfish)	10	4
Nibea soldado (Soldier croaker)	2	-
Pla cock	1	-
Metapenaeus ensis (Greasy back shrimp)	-	3
Siganus canaliculatus (Whitespotted spinefoot)	-	13
Pla Tong-Taew	8	-
Miyakea nepa (Mantis shrimp)	6	4
Plotosus canius (Catfish)	13	6
Arca granulosa (Cockle)	3	2
Portunus pelagicus (Blue swimming crab)	-	-
Paphia undulata (Short-neck clam)	-	-
Meretrix casta (Oriental hard clam)	-	-
Sillago sihama (Silver sillago)	-	-
fermented intestine	2	-
Total	93	67

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

3.2.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้

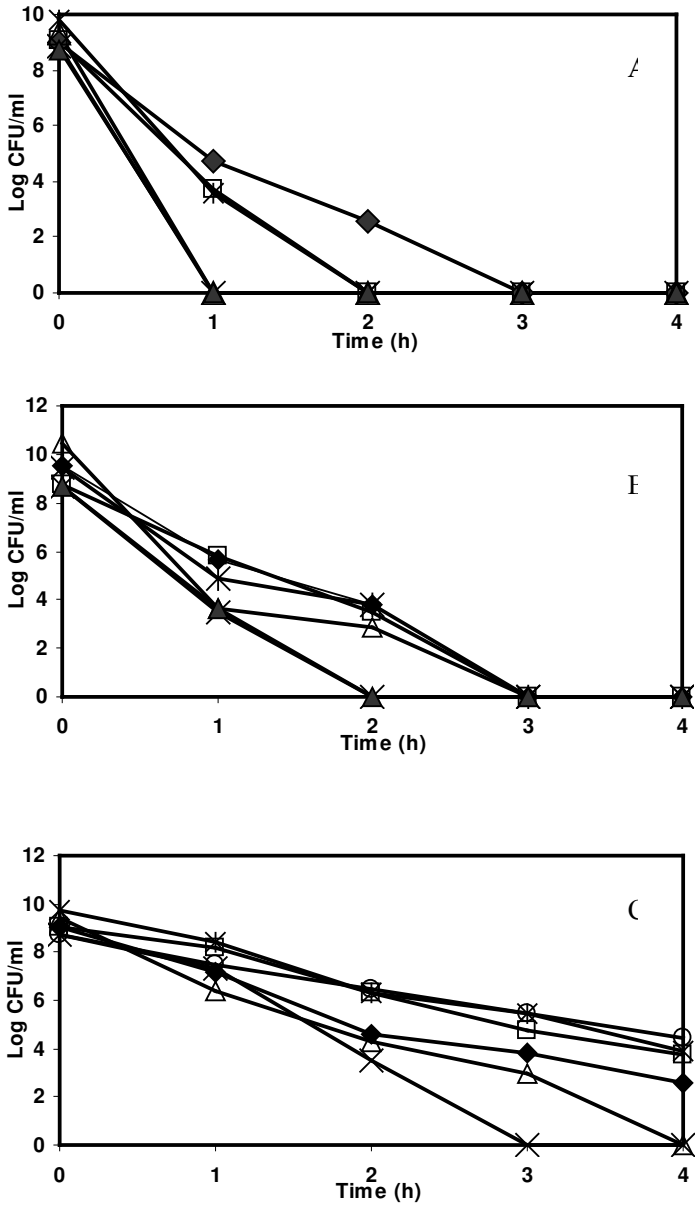
จากการนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ มาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 2000, 3000 และ 4000 พีพีเอ็ม พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ 2000 พีพีเอ็ม จำนวน 69 สายพันธุ์ สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ 3000 พีพีเอ็ม มีจำนวน 32 สายพันธุ์ และทนต่อเกลือน้ำดีที่ 4000 พีพีเอ็ม มีจำนวน 19 สายพันธุ์ คิดเป็น 43.12, 20.00 และ 11.85 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่แยกได้ ตามลำดับ ซึ่งโปรไบโอติกต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีในช่วง 1500-3000 พีพีเอ็มได้ จากการทดลองของ Erkkila และ Petaja (2000) ที่ทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติก พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถทนเกลือน้ำดีได้ที่ระดับความเข้มข้น 3000 พีพีเอ็ม ซึ่งการทนเกลือน้ำดีระดับนี้ของแบคทีเรียแลกติก สอดคล้องกับการศึกษาผลของเกลือน้ำดีต่อการเจริญของ *Lactobacillus* ของ Pennacchia และคณะ (2004) ที่พบว่าสามารถเจริญบนอาหาร MRS ที่มีเกลือน้ำดี 3000 พีพีเอ็มได้ และในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรีย 47 สายพันธุ์ โดยทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 3000 พีพีเอ็ม พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ถึง 97.87 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด (Jacobsen *et al*., 1999) นอกจากนี้ Papamanoli และคณะ (2003) ได้ศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จาก ไส้กรอกหมักแห้ง (dry-fermented sausage) ที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 1000, 2000, 8000, 10,000 และ 20,000 พีพีเอ็ม พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ เท่ากับ 82.50, 26.25, 15.00, 8.75 และ 8.75 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 3000 พีพีเอ็ม ได้ 20 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด จากการทดลองส่วนใหญ่แบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 1000-3000 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นความเข้มข้นปกติในทางเดินอาหารของมนุษย์ ดังนั้นคุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติกต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นนี้ได้ (Gilliland และคณะ, 1984 อ้างโดย Erkkila and Petaja, 2000) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของเกลือน้ำดีอาจจะมากกว่า 3000 พีพีเอ็ม ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะของร่างกาย พบว่า *L. rhamnosus* ที่แยกจาก Parmigiano และ Reggiano cheese สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 10,000, 15,000 และ 20,000 พีพีเอ็ม หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Succi *et al*., 2005) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสร้าง

เอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ขึ้นมาเพื่อย่อยเกลือน้ำดี ทำให้สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือน้ำดีได้ (Erkkila and Petaja, 2000; Maragkoudakis *et al*., 2006) ซึ่งโดยปกติเกลือน้ำดีมีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรียโดยไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้องค์ประกอบภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลทำให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย ดังนั้นแบคทีเรียจึงมีกลไกในการป้องกันอันตรายจากเกลือน้ำดีโดยการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาย่อย เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ซึ่งกระบวนการสำคัญที่เกิดขึ้นในการป้องกันอันตรายจากเกลือน้ำดี คือปฏิกิริยา 7α-dehydroxylation โดยมีเอนไซม์ 7α-dehydroxylase เปลี่ยน cholate ไปเป็น deoxycholate และ chenodeoxycholate ไปเป็น lithocholate ทำให้สารเหล่านี้ไม่สามารถไปละลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ส่งผลให้เซลล์ที่มีกลไกนี้สามารถเจริญและอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้ (De Boever *et al*., 2000; Begley *et al*., 2005; Taranto *et al*., 2006)

3.2.2 การทดสอบการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากการนำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถทนเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้น 4000 พีพีเอ็ม มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 1, 2, 2.5 และ 3 พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 สายพันธุ์ ที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 4000 พีพีเอ็ม ไม่สามารถทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 1 ได้ แต่สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 2 ได้ จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ APa4, AIa1 และ ARa1 และที่ระดับพีเอช 2.5 จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ APa4, AIa1, APa5, AEa3, ARa1 และAEa2 เมื่อศึกษาการเหลือรอดชีวิตของทั้ง 6 สายพันธุ์ เมื่อสัมผัสกับสภาวะความเป็นกรดที่ระดับพีเอช 1, 2, 2.5 และ 3 ในเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น และไม่เหลือรอดเลยในสภาวะที่เป็นกรดสูงที่พีเอช 1 ส่วนที่พีเอช 2 1 ชั่วโมง มี 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ APa4, AIa1 และ ARa1 มีจำนวนเหลือรอด 4.72, 3.71 และ 3.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 9.01, 9.03 และ 9.78 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่สามารถทนกรดที่พีเอช 2 ได้ 2 ชั่วโมง มีเพียง 1 สายพันธุ์ คือ APa4 ซึ่งมีจำนวนเหลือรอดเพียง 2.60 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบการทนกรดที่ระดับพีเอช 2.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ APa4, AIa1, APa5, AEa3, ARa1 และAEa2 มีจำนวนเหลือรอด 5.65, 5.83, 3.63, 3.48, 4.91 และ 3.65 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 9.56, 8.77, 10.48, 8.69, 9.48 และ 8.65 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมี 4 สายพันธุ์ที่สามารถทนต่อพีเอช 2.5 ได้ 2 ชั่วโมง คือ APa4, AIa1, APa5 และARa1 ซึ่งเหลือรอด 3.80, 3.49, 2.87 และ 3.86 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมี 3 สายพันธุ์ สามารถทนพีเอช 3 ได้ 4 ชั่วโมง คือ APa4, AIa1 และARa1 ที่เหลือรอด 2.54,

3.73 และ 3.87 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 12 และพบว่ามี 3 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถทนพีเอช 2ได้ คือ สายพันธุ์ APa5, AEa3 และ AEa2 แต่สามารถทนพีเอช 2.5 ได้ที่ 1 ชั่วโมง จากผลการทดลอง พบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถทนพีเอช 2 และ 2.5 ได้น้อยเป็นระยะเวลาสั้น และสามารถทนต่อพีเอช 3 ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Erkkila และ Petaja (2000) ทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารที่พีเอช 1-3 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ สามารถทนพีเอช 3 ได้ดี และจากการศึกษาการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus* ที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก 29 สายพันธุ์ พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อพีเอช 3 ได้ 6 ชั่วโมง สามารถทนพีเอช 2 ได้ 3 ชั่วโมง 16 สายพันธุ์ และสามารถทนพีเอช 1 ได้ 1 ชั่วโมง มี 1 สายพันธุ์ (Maragkoudakis *et al*., 2006) แบคทีเรียโดยปกติจะสามารถทนต่อระดับพีเอชต่ำได้น้อยกว่าที่ระดับพีเอชสูงแต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย อย่างเช่น *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 พบว่าสามารถทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit *et al*., 1998) นอกจากนี้การทนกรดยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกเชื้อ โดย มณฑกานต์ ทองสม (2547) ได้ทดสอบการทนกรดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 150 สายพันธุ์ ไม่สามารถทนพีเอช 1, 2 และ 3 ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่แยกจากสัตว์เลือดอุ่น พบว่าแบคทีเรียที่แยกจากมนุษย์สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Prasad และคณะ (1998) ได้ทดสอบการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติก จำนวน 200 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากอุจจาระของมนุษย์ ที่ระดับพีเอช 3 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามี 4 สายพันธุ์ ที่มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า *Enterococcus* ที่แยกจากอุจจาระของสุนัขสามารถทนต่อพีเอช 3 ที่ 3 ชั่วโมงได้ดี ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 76-87 เปอร์เซ็นต์ (Strompfova *et al*., 2004) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่แยกจากสัตว์ทะเล พบว่าสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้น้อย ซึ่งที่พีเอช 3 มีชีวิตเหลือรอดไม่ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบไป 4 ชั่วโมง อาจเป็นไปได้ว่าทางเดินอาหารสัตว์ทะเลมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.5-4.5 อาจทำให้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้นั้นสามารถทนต่อพีเอชต่ำๆ ได้น้อย (Ringo and Gatesoupe, 1998) ในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีนั้นแบคทีเรียต้องสามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในกระเพาะอาหารได้เพื่อที่จะมีชีวิตเหลือรอดไปยังลำไส้ใหญ่ได้ (Park *et al*.,2002) ซึ่งในสภาวะปกติในกระเพาะอาหารจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 1-3 ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ APa4, AIa1 และ ARa1 เพื่อนำไปศึกษาต่อไป



ภาพที่ 12 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ APa 4 (♦), AIa1 (□),APa5 (Δ), AEa3 (×), ARa1 (✳) และAEa2 (○) ในสภาวะความเป็นกรดที่ A) พีเอช 2; B) พีเอช 2.5 และ C) พีเอช 3

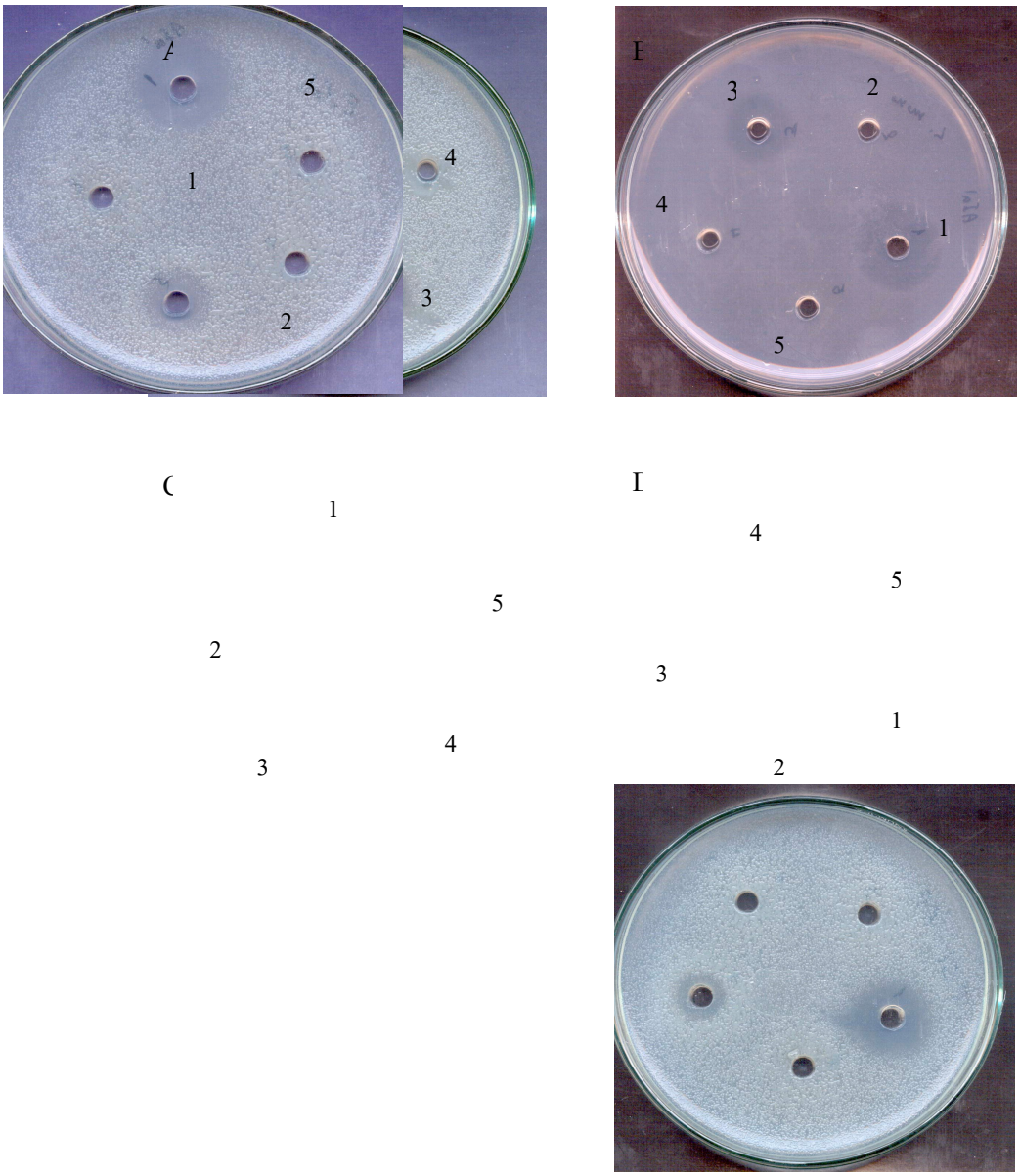
Figure 12. Survival of LAB strains APa 4 (♦), AIa1 (□), APa5 (Δ), AEa3 (×), ARa1 (✳) and AEa2 (○) under acidic condition at A) pH 2; B) pH 2.5 and C) pH 3.

3.2.3 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด คือ *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์

AIa1, ARa1 และ APa4 โดยวิธี agar well diffusion method พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย แลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้ โดยสามารถยับยั้ง *Lis. monocytogenes* ได้ดีที่สุดซึ่ง *Pediococcus pentosaceus* AIa1 และ *Pediococcus pentosaceus* APa4 มีวงใสของการยับยั้งเท่ากัน คือ 17.80 มิลลิเมตร ส่วน *Enterococcus faecium* ARa1 มีวงใสในการยับยั้งเท่ากับ 14.80 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* ได้ 15.80, 14.13 และ 12.47 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีกิจกรรมการยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้น้อยที่สุด คือมีวงใสของการยับยั้งประมาณ 10.00-10.80 มิลลิเมตร แต่เมื่อนำส่วนใสที่ผ่านการปรับพีเอชเป็น 6.5-7.0 จากพีเอชเริ่มต้นของส่วนใสประมาณ 3.3-3.8 หรือส่วนใสที่เติมเอนไซม์คะตะเลสมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง พบว่าส่วนใสดังกล่าวที่ได้จากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 13 ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น เนื่องจากเมื่อทำการปรับพีเอชเป็นกลาง หรือเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสูญเสียไป ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ากรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง แกรมบวกและแกรมลบ ((Helander *et al*., 1997) อย่างไรก็ตามกิจกรรมการยับยั้งที่พบในส่วนใสที่ยังไม่มีการปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลส อาจจะเป็นผลจากปัจจัยร่วมกันของสารยับยั้งหลายชนิดที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลกติก กรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Aslim *et al*., 2005; Drago *et al*.,1997) มีรายงานว่าแบคเทอริโอซิน ของ *Ent. faecium* และ *P. pentosaceus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Lis. monocytogenes* และ *S. aureus* เป็นต้น (Marcinakova *et al*., 2004; Aly *et al*., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gurira และ Buy (2005) ได้ศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Pediococcus* sp. โดยนำส่วนใสมาปรับพีเอชเป็น 6.5 แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *P. pentosaceus* สามารถยับยั้ง *Lis. monocytogenes* ATCC 7644 ได้ ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากสารแบคเทอริโอซิน pediocins ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา (Elotmani *et al*., 2002; Manca de Nadra *et al*., 1998) ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม *Enterococcus* ก็มีรายงานว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Lis. monocytogenes* และ *Helicobacter pylori* ได้เช่นกัน ซึ่งแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตเป็นชนิด Enterocin A, Enterocin B, Enterocin P และ Enterocin 50 (Franz *et al*., 1999; Cintas *et al*., 1998) แต่จากการทดลองครั้งนี้กลับไม่พบกิจกรรมการยับยั้ง *Lis. monocytogenes* เมื่อกำจัด

กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินขึ้นมาได้ แต่สภาวะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เหมาะสมกับการผลิตแบคเทอริโอซิน หรือการเติมกรดและเอนไซม์คะตะเลสที่มากเกินไปทำให้ส่วนใสถูกเจือจางจนมีปริมาณแบคเทอริโอซินไม่เพียงพอที่จะยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะ *Lis. monocytogenes* ได้



ภาพที่ 13 กิจกรรมการยับยั้ง A) *Salmonella* sp.; B) *L. monocytogenes* ; C) *E. coli* ;D) *S. aureus* ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Pediocuccus pentosaceus* AIa1, CFF (3); ส่วนใสที่ผ่านการปรับพีเอช, CFBH (4); ส่วนใสที่ผ่านการปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลส, CFB (5) โดยมี chloramphenical 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1) และอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (2) เป็นชุดควบคุม.

Figure 13. Antimicrobial activity against A) *Salmonella* sp.; B) *L. monocytogenes*; C) *E. coli* ; D) *S. aureus* of supernatant from cultivatic broth cultivation of *Pediocuccus pentosaceus* AIa1, CFF (3); neutralized culture supernatant, CFBH (4); catalase-treated supernatant, CFB (5) and control as 100 µg/ml chloramphenical (1); MRS broth (2) (negative control).

ตารางที่ 7 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

Table 7. Antimicrobial activity of LAB against indicator microorganism.

Isolates	*S. aureus*			*Salmonella* sp.			*L. monocytogenes*			*E. Coli*		
	CFF (mm)	CFBH	CFB	CFF (mm)	CFBH	CFB	CFF (mm)	CFBH	CFB	CFF (mm)	CFBH	CFB
Pediococcus pentosaceus APa4	12.23±0.40	-	-	10.80±0.20	-	-	17.80±0.35	-	-	14.13±1.10	-	-
Pediococcus pentosaceus AIa1	10.53±0.31	-	-	10.00±0.17	-	-	17.80±0.60	-	-	15.80±0.60	-	-
Enterococcus faecium ARa1	11.27±0.50	-	-	10.67±0.12	-	-	14.80±0.20	-	-	12.47±0.58	-	-

: ไม่มีกิจกรรมการยับยั้ง, CFF: ส่วนใสธรรมดา, CFBH: ส่วนใสที่นำมาปรับพีเอช 7.0, CFB: ส่วนใสที่นำมาปรับพีเอช 7.0 และเติมเอนไซม์คะตะเลส (วัดกิจกรรมการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากขอบวงใสถึงขอบวงใส โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ well เท่ากับ 5.8 มิลลิเมตร)

-:no inhibition, CFF: culture supernatant, CFBH: neutralized culture supernatant, CFB: catalase-treated supernatant

3.2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้

จากการทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้นั้น พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ APa4, AIa1 และ ARa1 ซึ่งแยกมาจาก Common ponyfish, Soldier croaker และ Mantis shrimp มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จึงได้จัดจำแนกชนิดสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ใน nr database โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของ16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ APa4, AIa1 และ ARa1 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Pediococcus pentosaceus* LM2 (GenBank accession number AY 675245), *Pediococcus pentosaceus* SL4 (GenBank accession number AY 675243) และ *Enterococcus faecium* (GenBank accession number AY 675247) ตามลำดับ ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 97 (654/668 bp), 97 (691/712 bp) และ 99 (1394/1396bp) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14, 15 และ 16 จึงจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ APa4, AIa1 และ ARa1 เป็น *Pediococcus pentosaceus* APa4, *Pediococcus pentosaceus* AIa1 และ *Enterococcus faecium* ARa1 ตามลำดับ

แบคทีเรียกลุ่ม *Pediococcus* และ *Enterococcus* พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบได้ในอาหารหลายชนิด เช่นในผลิตภัณฑ์เนื้อ และการผลิต cheese (Franz *et al*., 1999) และมักถูกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ (Hyronimus *et al*., 2000; Strompfova *et al*., 2004) ปัจจุบันมีการศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม *Enterococcus* เพื่อเป็นใช้โปรไบโอติกในมนุษย์ (Fook *et al*., 1999; Franz *et al*., 1999) โดยมีการแยกและคัดเลือก *Ent. faecium* TM39 ได้จากอุจจาระของเด็ก และทำการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรไบโอติก พบว่า *Ent. faecium* TM39 สามารถทนต่อกรดและเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้ สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดี อีกทั้งยังสามารถยับยั้ง *Helicobacter pylori* ได้ (Tsai *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังมีการพบแบคทีเรียชนิดนี้ในอุจจาระของผู้ใหญ่ ที่มีสุขภาพดีอีกด้วย และมีการใช้ *Ent. faecium* SF 68 เป็นโปรไบโอติกในมนุษย์ โดยพบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคท้องร่วงได้ (Lewenstein *et al.,* 1979 อ้างโดย Franz *et al*., 1999)

```
 Score = 1195 bits (603),  Expect = 0.0
 Identities = 654/668 (97%), Gaps = 4/668 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  4    ATTGATTATGACGT-CTTGT-CTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGT  61
            |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  73   ATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGT  132

Query  62   GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT  121
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133  GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT  192

Query  122  ACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCT  181
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  ACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCT  252

Query  182  GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATAC  241
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATAC  312

Query  242  GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC  372

Query  302  GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT  361
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT  432


Query  362  GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGT  421
            |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433  GAGTGAAGAAGGGTTTCGACTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGT  492

Query  422  AACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  481
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493  AACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  552

Query  482  CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG  541
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553  CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG  612

Query  542  CGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCANCNGAA-AAGTGCATTGGAAACTG  600
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| | ||| ||||||||||||||||||
Sbjct  613  CGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTG  672

Query  601  GGANACTTGAGTGCA-AAAANGACAGTGGAACTCCNTGTGTANCGGTGAAATGCNTAAAT  659
            ||| |||||||||| || | ||||||||||||||| |||||| |||||||||| || ||
Sbjct  673  GGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT  732

Query  660  ATATGGAA  667
            ||||||||
Sbjct  733  ATATGGAA  740
```

ภาพที่ 14 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ APa4 กับ *Pediococcus pentosaceus* LM2

Figure14. Comparison of 16S rDNA nucleotide sequences of strain APa4 with *Pediococcus pentosaceus* LM2.

```
 Score = 1243 bits (627),  Expect = 0.0
 Identities = 691/712 (97%), Gaps = 3/712 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GATTATGACGTACTTGT-CTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAG  59
            |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  76   GATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAG  135

Query  60   TAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACC  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  136  TAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACC  195

Query  120  GTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGA  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  196  GTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGA  255

Query  180  TGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGCAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTA  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  256  TGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGCAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTA  315

Query  240  GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  316  GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  375

Query  300  AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  359
            |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  376  AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCTCAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  435


Query  360  TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAAC  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  436  TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAAC  495

Query  420  TGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  479
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  496  TGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  555

Query  480  GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG  539
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  556  GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG  615

Query  540  TCTTTTANGTCT-ATGTGAAAGCCTTCGGCTCANCCGAAAAAGTGCATTGGAAACTGGGA  598
            ||||||| |||| |||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  616  TCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGA  675

Query  599  NACTNGAGTGCANAAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATNT-  657
             ||| ||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||| || | |
Sbjct  676  GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA  735

Query  658  TGGNAAAACCCCANTGGCNAAGGCGNCTGTCTGGTCTGCACCTGACNCTGAG  709
            ||| | ||| ||| |||| ||||||| ||||||||||||| |||||| ||||||
Sbjct  736  TGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAG  787
```

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ AIa1 กับ *Pediococcus pentosaceus* SL4

Figure15. Comparison of 16S rDNA nucleotide sequences of strain AIa1 with *Pediococcus pentosaceus* SL4.

```
 Score = 2753 bits (1389),  Expect = 0.0
 Identities = 1394/1396 (99%), Gaps = 0/1396 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  2     CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACC  61
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16    CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACC  75

Query  62    GGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGANGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT  121
             ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  76    GGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT  135

Query  122   GCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACC  181
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  136   GCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACC  195

Query  182   GCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAT  241
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  196   GCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAT  255

Query  242   TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT  301
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  256   TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT  315

Query  302   GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  361
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  316   GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  375

Query  362   TCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGG  421
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  376   TCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGG  435

Query  422   ATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACG  481
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  436   ATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACG  495

Query  482   GTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  541
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  496   GTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  555

Query  542   CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG  601
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  556   CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG  615

Query  602   TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG  661
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  616   TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG  675

Query  662   AGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG  721
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  676   AGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG  735
```

ภาพที่ 16 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ARa1 กับ *Enterococcus faecium*

Figure16. Comparison of 16S rDNA nucleotide sequences of strain ARa1 with *Enterococcus faecium*.

```
Query  722   GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA  781
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  736   GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA  795

Query  782   GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTC  841
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  796   GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTC  855

Query  842   CGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG  901
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  856   CGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG  915

Query  902   TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG  961
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  916   TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG  975

Query  962   AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT  1021
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  976   AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT  1035

Query  1022  TCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT  1081
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1036  TCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT  1095

Query  1082  GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGG  1141
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  1096  GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGG  1155

Query  1142  CACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA  1201
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1156  CACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA  1215


Query  1202  TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGT  1261
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1216  TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGT  1275

Query  1262  CGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGC  1321
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1276  CGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGC  1335

Query  1322  CTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC  1381
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1336  CTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC  1395

Query  1382  GGGCCTTGTACACACC  1397
              ||||||||||||||||
Sbjct  1396  GGGCCTTGTACACACC  1411
```

ภาพที่ 16 (ต่อ)

Figure 16. (cont.).

3.3 การคัดเลือกสารสกัดจากพืชหัวที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

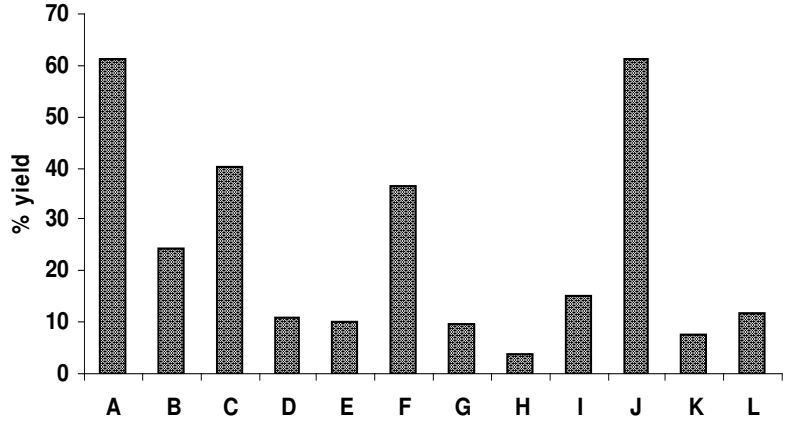
3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากพืชหัว

จากการนำตัวอย่างพืชหัวชนิดต่างๆ ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มาสกัดด้วย 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอล พบว่าพืชแต่ละชนิดจะให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดที่แตกต่างกัน พบว่าพืชที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดสูงที่สุดคือ บีทรูท (beetroot) และมันเทศสีส้ม (jewel sweet potato) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 61.05 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นหัวไชเท้า (labanos) และแครอท (carrot) ซึ่งให้ผลได้ 40.14 และ 36.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 17) ส่วนมันแกว (yam bean) มันเทศสีม่วงเปลือกแดง (red sweet potato) มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (purple sweet potato) มันขี้หนู (madagascar potato) มันเทศสีขาวเปลือกแดง (white sweet potato) แห้ว (cyperus) มันฝรั่ง (potato) และเผือก (taro) มีเปอร์เซ็นต์สารสกัดที่ได้เท่ากับ 24.24, 15.22, 11.67, 10.71, 9.93, 9.62, 7.72 และ 3.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 12 ชนิด มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าสารสกัดที่ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุด คือ สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง รองลงมาคือ สารสกัดจากหัวไชเท้า มันแกว และ บีทรูท โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 934.00, 750.07, 714.87 และ713.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 18 ส่วนสารสกัดเอทานอลจากมันขี้หนู มันเทศสีม่วงเปลือกแดง แครอท มันเทศสีขาวเปลือกแดง มันเทศสีส้ม เผือก แห้ว และมันฝรั่ง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 698.00, 649.12, 630.13, 616.45, 577.12, 284.15, 213.80 และ 168.60 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คิดเป็น 79.12, 63.62, 61.91, 61.43, 54.56, 41.84, 21.87, 15.51, 13.84, 10.88, 7.92 และ 5.77 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งพบในมันขี้หนู แห้ว หัวไชเท้า มันแกว แครอท เผือก มันฝรั่ง มันเทศสีส้ม มันเทศสีม่วงเปลือกแดง มันเทศสีขาวเปลือกแดง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง ตามลำดับ

3.3.2 ผลของการย่อยสารสกัดในสภาวะที่เป็นกรดสูงและการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase

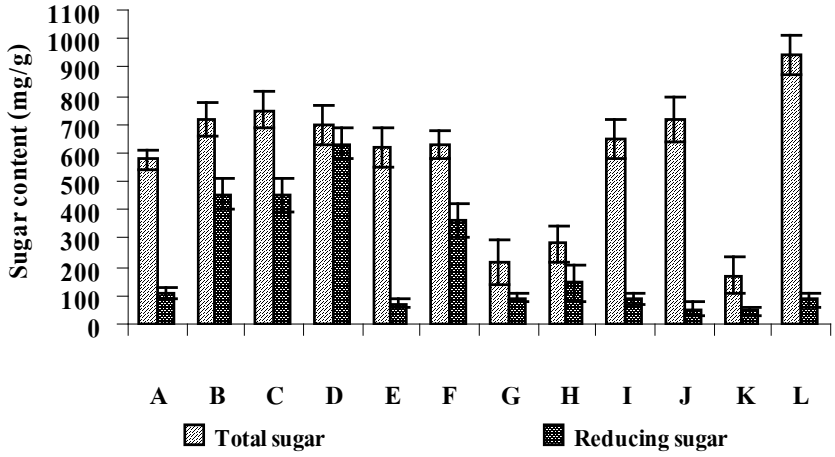
3.3.2.1 ผลของการย่อยสารสกัดในสภาวะที่เป็นกรดสูง

ในการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดของสารสกัดเอทานอลจากพืชหัว 12 ชนิด ก็เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพที่จะไม่ถูกย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหาร ซึ่งกระเพาะอาหารของคนปกติจะมีพีเอช 1-3 เมื่อย่อยสารสกัดทั้งหมดที่พีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเอทานอลจากพืชหัวทั้งหมดสามารถทนต่อการย่อยที่พีเอชต่างๆ ได้ดีโดยที่พีเอช 1 เวลา 4 ชั่วโมง สารสกัดทนต่อก [illegible] ตามลำดับ



ภาพที่ 17 ผลได้ของสารสกัดเอทานอลที่สกัดได้จากมันสีส้ม (A), มันแกว (B), หัวไชเท้า (C), มันขี้หนู (D), มันสีขาวเปลือกแดง (E), แครอท (F), แห้ว (G), เผือก (H), มันสีม่วงเปลือกแดง (I), บีทรูท (J), มันฝรั่ง (K), มันสีม่วงเปลือกเหลือง (L)

Figure 17. Percentage yield of ethanolic extracts from jewel sweet potato (A), yam bean (B), labanos (C), madagascar potato (D), white sweet potato (E), carrot (F), cyperus (G), taro (H), red sweet potato (I), beetroot (J), potato (K), purple sweet potato (L).

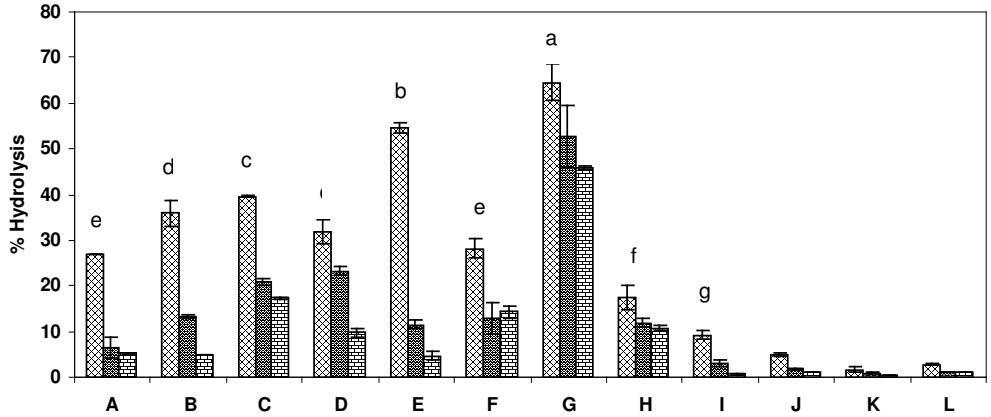


ภาพที่ 18 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ ที่พบในสารสกัดเอทานอลที่สกัดจากมันสีส้ม (A), มันแกว (B), หัวไชเท้า (C), มันขี้หนู (D), มันสีขาวเปลือกแดง (E), แครอท (F), แห้ว (G), เผือก (H), มันสีม่วงเปลือกแดง (I), บีทรูท (J), มันฝรั่ง (K) และมันสีม่วงเปลือกเหลือง (L)

Figure18. Total sugar and reducing sugar in ethanolic extracts from jewel sweet potato (A), yam bean (B), labanos (C), madagascar potato (D), white sweet potato (E), carrot (F), cyperus (G), taro (H), red sweet potato (I), beetroot (J), potato (K) and purple sweet potato (L).

ซึ่งที่พีเอชต่ำสุดและเวลาสูงสุดที่ทดสอบคือ พีเอช 1 ที่ 4 ชั่วโมง สารสกัดส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารสกัดจากเผือก มันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และ มันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองที่ถูกย่อยได้แค่ 17.47, 9.28, 5.04, 2.81 และ 1.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากแห้ว มันเทศสีขาวเปลือกแดง มันขี้หนู มันแกว หัวไชเท้า มันเทศสีส้ม และแครอท มีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยได้ถึง 64.49, 54.51, 39.56, 35.86, 31.78, 28.13 และ 26.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 19 ซึ่งโดยปกติที่ความเข้มข้นกรดสูงสามารถย่อยได้ดีกว่าที่กรดต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากที่ระดับความเป็นกรดสูงจะมีความรุนแรงมากกว่าจึงส่งผลต่อพันธะที่เชื่อมต่อกันของโมเลกุลน้ำตาลให้หลุดจากกันได้ง่ายกว่าสภาวะที่เป็นกรดต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gnoth และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสามารถการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากน้ำนมมนุษย์ (human milk oligosaccharides, HMOs) โดยทดสอบที่พีเอช 2.5 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การย่อยเกิดขึ้นได้น้อยมาก แต่เมื่อลดระดับพีเอชลง (<2) พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากน้ำนมมนุษย์ (human milk oligosaccharides, HMOs) จะถูกย่อยเพิ่มขึ้น การย่อยสารสกัดโดยกรดที่พีเอชต่างๆ อาจจะเกิดขึ้นแบบสุ่ม ซึ่งถ้าสารสกัดนั้นมีสารประกอบโมเลกุลใหญ่ จะมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยที่ต่ำกว่าสารสกัดที่มีสารประกอบโมเลกุลเล็ก ซึ่งเป็น

ไปได้จากการที่สารสกัดเอทานอลเหล่านี้มีค่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สนับสนุนว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในสารสกัดเอทานอลเหล่านี้ เช่นสารสกัดที่ได้จาก มันขี้หนู แห้ว มันแกว หัวไชเท้า และแครอท มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นถึง 79.12, 63.62, 61.90, 61.43 และ 54.56 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามลำดับ แต่ก็มีสารสกัดเอทานอลบางชนิดที่มีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเริ่มต้น และมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยกรดที่พีเอชต่างๆ ได้น้อยด้วย เช่น สารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็นต้น กรณีเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดเอทานอลเหล่านี้มีความสามารถในการทนต่อกรดได้สูง โดยปกติระดับพีเอชในกระเพาะอาหารในร่างกายมนุษย์โดยเฉลี่ยประมาณ 1-3 ดังนั้นสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดที่พีเอชต่างๆ เหล่านี้ได้ จากการทดลอง พบว่ามีสารสกัดเพียง 5 ชนิด คือสารสกัดจากเผือก มันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง ที่มีองค์ประกอบที่สามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดพีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกและนำสารสกัดเหล่านี้ไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกต่อไป



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกพีเอช 1 ( ), ( ) และ 3 ( ) ของสารสกัดจากมันสีส้ม (A), มันแกว (B), หัวไชเท้า (C), มันขี้หนู (D), มันสีขาวเปลือกแดง (E), แครอท (F), แห้ว (G), เผือก (H), มันสีม่วงเปลือกแดง (I), บีทรูท (J), มันฝรั่ง (K) และมันสีม่วงเปลือกเหลือง (L)

Figure19. Hydrolysis of the extracts prepared from jewel sweet potato(A), yam bean (B), labanos (C), madagascar potato (D), white sweet potato (E), carrot (F), cyperus (G), taro (H), red

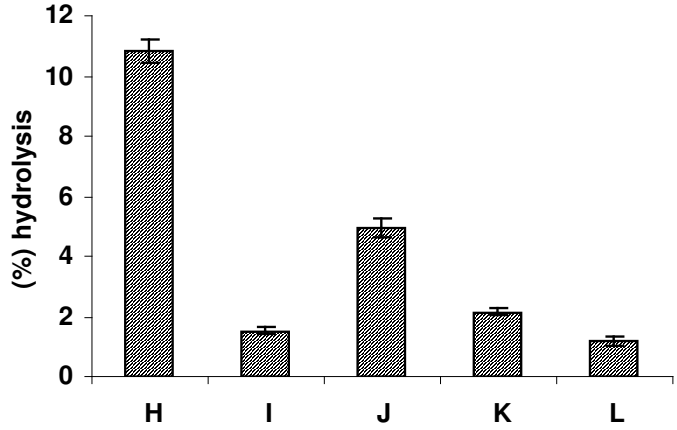
sweet potato (I), beetroot (J), potato (K) and purple sweet potato (L) in HCl solution with pH of 1 ( ), 2 ( ) and 3 ( ) .

3.3.2.2 ผลของการย่อยสารสกัดด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase

การทดสอบความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ซึ่งพบในลำไส้เล็กของสารสกัดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.1 ที่มีเปอร์เซ็นต์ที่ถูกย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1 ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่สารสกัดจากเผือก มันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง โดยใช้เวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาโดยเฉลี่ยที่อาหารถูกย่อยอยู่ในลำไส้เล็กของบุคคลปกติทั่วไป พบว่าสารสกัดทุกชนิดที่นำมาทดสอบสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยต่ำมาก ดังแสดงในภาพที่ 20 คือมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยต่ำกว่า 11 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดจากเผือกมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยสูงที่สุด คือ 10.81 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสารสกัดจากบีทรูท มันฝรั่ง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และ มันเทศ สีม่วงเปลือกเหลือง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยเป็น 4.94, 2.13, 1.50 และ 1.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากน้ำนมมนุษย์ (human milk oligosaccharides,HMOs) โดยใช้เอนไซม์ amylase และเอนไซม์ชนิดอื่นที่หลั่งออกมาในลำไส้เล็กจากมนุษย์และหมู ใช้เวลาทดสอบ 20 ชั่วโมง พบว่า HMOs สามารถทนต่อการย่อยได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยน้อยกว่า 1.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ maltodrextrin พบว่าถูกย่อยได้เกือบสมบูรณ์ (Engfer *et al*., 2000) นอกจากนี้ Gnoth และคณะ (2000) ได้ศึกษาการทนต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนของ HMOs โดยทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาในช่องปาก การทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาบริเวณลำไส้เล็ก พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดจากบีทรูท และมันฝรั่ง การที่สารสกัดจากพืชแต่ละชนิดสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดีนั้น อาจเนื่องมาจากพันธะที่จับกันระหว่างโมเลกุลในสายของน้ำตาลในสารสกัดไม่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ α-amylase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะมีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,4 ซึ่งสารประกอบ oligosaccharides และแป้งที่พบในพืชนั้นมีความหลากหลาย คือประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดเชื่อมกันด้วยพันธะที่แตกต่างกัน เช่น α-1,4, α-1,2, α-1,6, β-1,2 และ β-1,4 เป็นต้น (Oku and Nakamura, 2002) ดังนั้นการที่สารสกัดเหล่านี้ถูกย่อยด้วย α-amylase ได้น้อยนั้น อาจเนื่องมาจากในสายพอลิเมอร์นั้นมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 น้อย ทำให้สารสกัดเหล่านี้สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดี จากการศึกษาของ Mcpherson และ Jane (1999) พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีในกลุ่มมันต่างๆ พบว่า

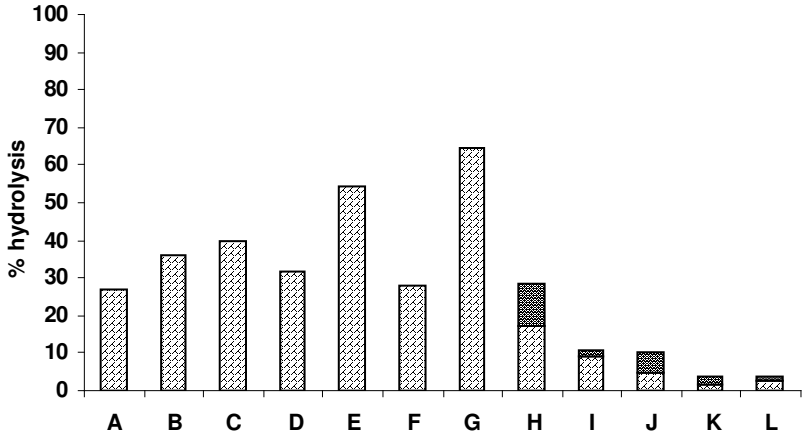
มีปริมาณ 25-35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะประกอบด้วย non starch polysaccharide, dietary fiber, amylose (15-20 เปอร์เซ็นต์) และ amylopectin เป็นต้น จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase ได้ดี คาดว่าในสารสกัดน่าจะมีองค์ประกอบของ amylose อยู่น้อยมาก และอาจมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีพันธะหลากหลายซึ่งสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดี การที่สารสกัดถูกย่อยด้วยกรดได้ดีกว่าถูกย่อยด้วยเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากการย่อยด้วยกรดเป็นการย่อยแบบสุ่มซึ่งไม่จำเพาะต่อพันธะภายในโมเลกุล ส่งผลให้การย่อยด้วยกรดเกิดขึ้นได้มากกว่าการย่อยด้วยเอ็นไซม์ซึ่งมีความจำเพาะต่อพันธะในการที่จะเข้าไปย่อยภายในโมเลกุลนั้นๆ

จากการพิจารณาการถูกย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ของสารสกัดจากเผือก มันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยเท่ากับ 28.28, 10.79, 9.98, 3.83 และ 3.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งสารสกัดจากมันฝรั่งสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเริ่มต้นที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ก่อนนำไปย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ พบว่าสารสกัดจากเผือกมีปริมาณถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มีแค่ 13.84, 5.77, 21.87 และ 7.92 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยด้วยกรดและเอนไซม์เหลืออยู่ทั้งหมดเท่ากับ



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase ของสารสกัดจากเผือก (H), มันเทศสีม่วงเปลือกแดง (I), บีทรูท (J), มันฝรั่ง (K) และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (L)

Figure 20. Enzymatic hydrolysis of extracts from taro (H), red sweet potato (I), beetroot (J), potato (K) and purple sweet potato (L) by α-amylase.



ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การถูกย่อย (น้ำตาลรีดิวซ์/(น้ำตาลทั้งหมด-น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น)x100) ด้วยกรดที่พีเอช 1 (▨) และเอนไซม์ α-amylase (▩) ของสารสกัดจาก มันสีส้ม (A), มันแกว (B), หัวไชเท้า (C), มันขี้หนู (D), มันสีขาวเปลือกแดง (E), แครอท (F), แห้ว (G), เผือก (H), มันสีม่วงเปลือกแดง (I), บีทรูท (J), มันฝรั่ง (K) และมันสีม่วงเปลือกเหลือง (L)

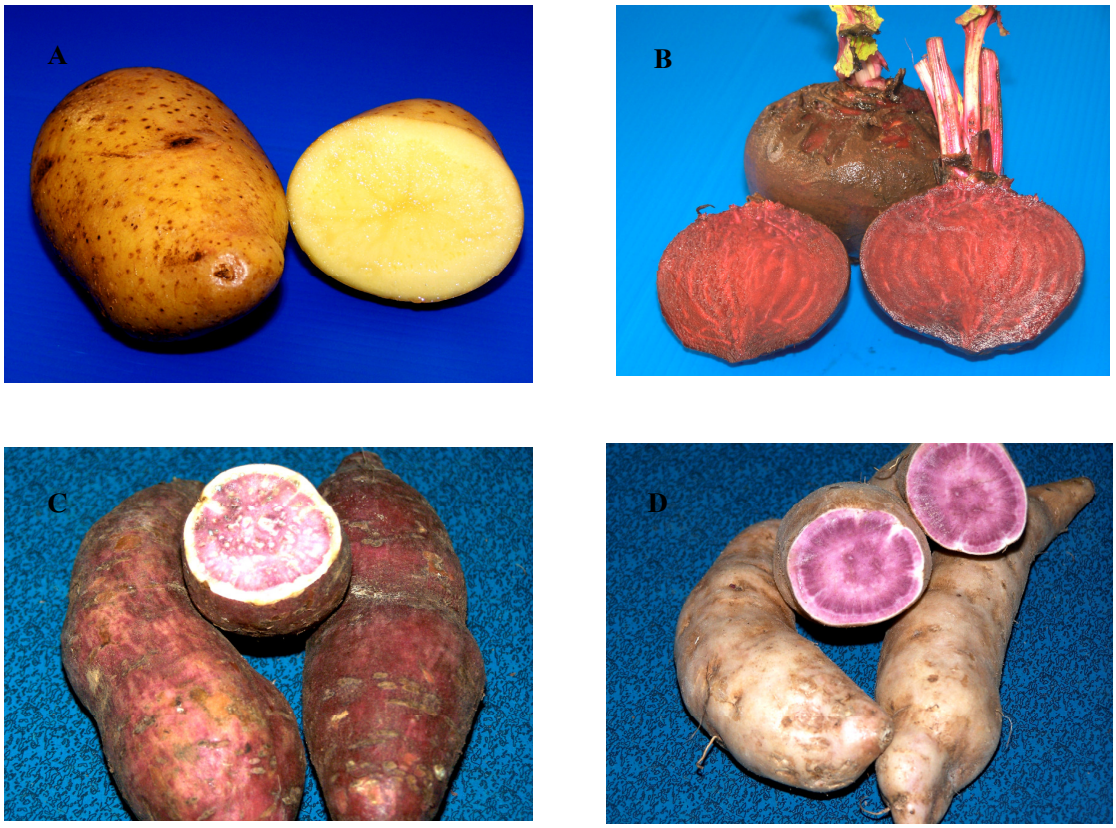
Figure 21. Percentage of hydrolysis (reducing sugar/ (Total sugar content - initial reducing sugar) x 100) of the extract by HCl pH 1 (▨) and human pancreatic α-amylase (▩) of ethanolic extracts from jewel sweet potato (A), yam bean (B), labanos (C), madagascar potato (D), white sweet potato (E), carrot (F), cyperus (G), taro (H), red sweet potato (I), beetroot (J), potato (K) and purple sweet potato (L).

29.88, 75.37, 84.25, 74.29 และ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองจะบ่งบอกได้ว่าในสารสกัดเหล่านี้มีองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมโดยทางเดินอาหารส่วนต้น และมีโอกาสเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารสกัดจากเผือก ซึ่งจากการศึกษาการเป็นพรีไบโอติกที่ดีนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ได้ และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโอลิโกฟรุคโตส (Oligofructose) และอินนูลิน (inulin) สามารถทนต่อการถูกย่อยด้วยทางเดินอาหารส่วนบน และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ถึง 85-89 เปอร์เซ็นต์ (Cumming *et al*., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Englyst และ Cumming (1987) พบว่าในข้าวโอ๊ต กล้วย และ มันฝรั่ง มี non starch polysaccharide เหลืออยู่มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทดสอบการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน ดังนั้นจึงคัดเลือกสารสกัดเอทานอลจากสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (ภาพที่ 22) ซึ่งมีองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ และเป็นองค์ประกอบที่ไม่ถูกดูดซึมบริเวณลำไส้เล็กเหลืออยู่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ไปทำการทดลองในข้อต่อไป

3.4 ผลของสารสกัดจากพืชหัวที่คัดเลือกได้ต่อการเจริญของโปรไบโอติก

3.4.1 ผลของสารสกัดจากพืชหัวต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก

เมื่อนำสารสกัดของพืชหัวทั้ง 4 ชนิด ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2.2 คือ สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง มันฝรั่ง บีทรูท และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum, L. acidophilus, B. bifidum* และ *Ent. faecium* พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6 และ 12 จนถึงสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามระดับการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารที่มีสารสกัดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดยพบว่าสารสกัดจากบีทรูทสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และ มันฝรั่ง คือมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น 4.01, 3.56, 2.88 และ 2.85 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อถึงการเจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. plantarum* เจริญในอาหารที่มีสารสกัดจากบีทรูทได้ดีกว่าในอาหารที่มีกลูโคส ประมาณ 0.5 log CFU ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่23) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$) เช่นเดียวกันกับการเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง ส่วนการเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันฝรั่ง มีค่าต่ำกว่าการเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นคาร์บอนประมาณ



ภาพที่ 22 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการสกัด A) มันฝรั่ง; B) บีทรูท; C) มันสีม่วงเปลือกแดง; D) มันสีม่วงเปลือกเหลือง

Figure. 22 Samples of plants uesd extracts. A) potato; B) beetroot; C) red sweet potato; D) purple sweet potato

0.8 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นสารสกัดจากบีทรูทสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดของมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันฝรั่งอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ที่ 24 ชั่วโมง

เมื่อศึกษาการเจริญของ *L. acidophilus* ในอาหารที่มีสารสกัดจากพืชหัวที่คัดเลือกมาทั้ง 4 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* ได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่ง *L. acidophilus* สามารถเจริญในอาหารที่มีสารสกัดจากมันฝรั่ง บีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองโดยเพิ่มจำนวนขึ้น 2.30, 1.40, 2.02 และ 1.65 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ใน

ขณะที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ถึง 3.70 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในภาพที่ 23 เมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าการเจริญของ *L. acidophilus* ในอาหารที่มีสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ต่ำกว่าการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จากการศึกษาการเจริญของ *Ent. faecium* ในอาหาร minimal medium ที่มีสารสกัดจากมันฝรั่ง บีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Ent. faecium* สามารถใช้สารสกัดทั้ง 4 ชนิด ในการเจริญได้ โดยแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้สูงสุดใน 24 ชั่วโมงแรก แต่จำนวนเซลล์เริ่มลดลงเมื่อครบ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 23) โดย *Ent. faecium* สามารถเพิ่มจำนวน ได้ถึง 2.42, 2.65, 2.40 และ 2.58 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารที่มีกลูโคส พบว่า *Ent. faecium* สามารถใช้กลูโคสในการส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าสารสกัดจากพืชหัวทั้ง 4 ชนิด โดยเพิ่มจำนวนได้ถึง 3.41 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเจริญของ *Ent. faecium* ในสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

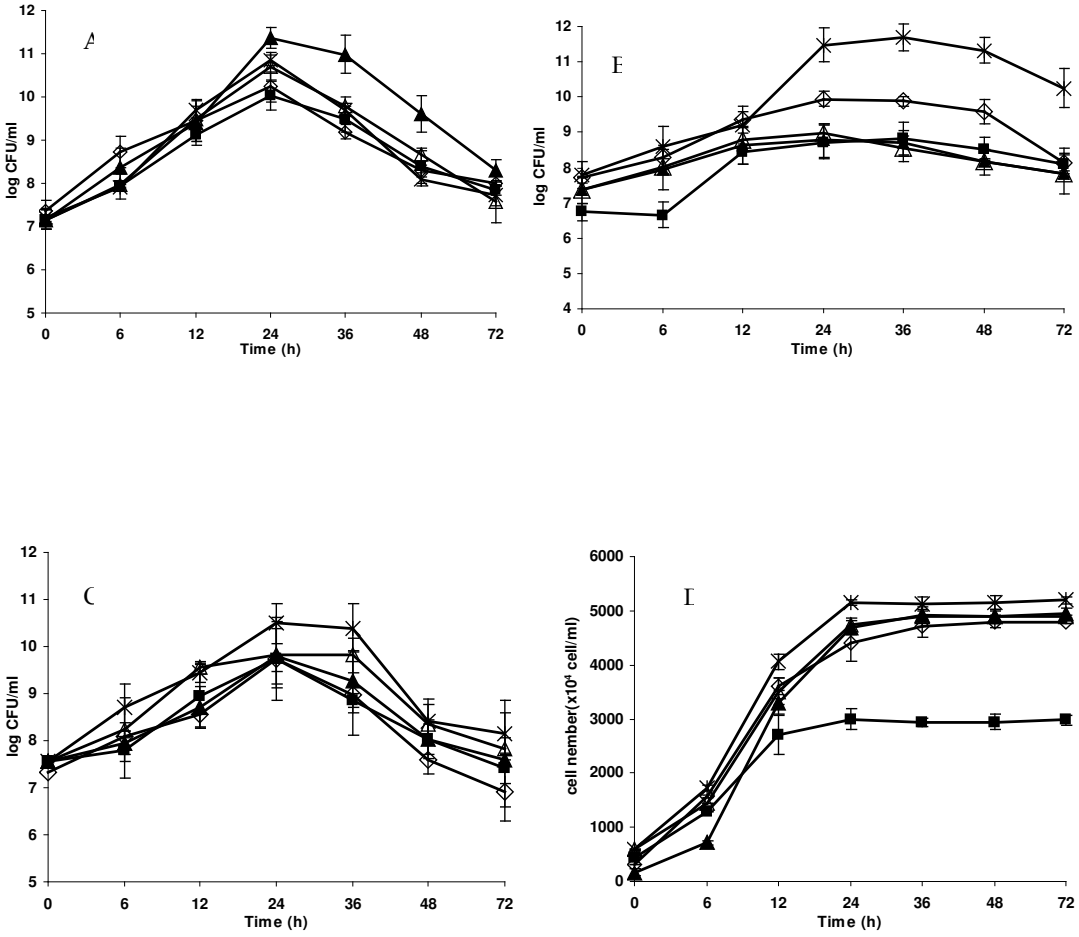
จากการทดสอบการเจริญของ *B. bifidum* โดยใช้สารสกัดทั้ง 4 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญของ *B. bifidum* มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นถึง $3.0x10^7$, $4.68x10^7$, $4.39x10^7$ และ $4.74x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และ มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสารสกัดเอทานอลจากพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 1 log เซลล์ต่อมิลลิลิตร **และเพิ่มจำนวนได้ถึง $5.15x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่** 23) ซึ่ง *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีที่สุด ในอาหารที่มีสารสกัดจากบีทรูท เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จากการศึกษาผลของสารสกัดเอทานอลต่อการส่งเสริมการเจริญโปรไบโอติก พบว่าสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* ได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *L. plantarum* สามารถผลิตเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสารสกัดเอทานอล เพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานของเซลล์และช่วยในการเจริญ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการส่งเสริมการเจริญของสารสกัดเอทานอลใน *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง พบว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีกว่า *L. acidophilus* เนื่องจาก *L. plantarum* สามารถใช้สารที่มีโมเลกุลใหญ่ได้ดีกว่า *L. acidophilus* (Kaplan and Hutkins, 2000) และ *Ent. faecium* สามารถใช้สารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิดได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส ซึ่งจากการรายงานของ Sako และคณะ (1999) เชื้อกลุ่ม *Enterococcus* สามารถใช้ Lactulose และ Raffinose ได้

เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส แต่พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถใช้ Lactulose และ Raffinose ได้ใกล้เคียงกับกลูโคส ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum, L. acidophilus, B. bifidum* และ *Ent. faecium* พบว่า *L. plantarum* สามารถใช้สารสกัดทุกชนิดได้สูงสุด โดยสามารถใช้สารสกัดจากบีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง มันฝรั่ง และ กลูโคส ได้ถึง 80.19, 79.12, 59.70, 63.65 และ 61.46 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเริ่มต้น ซึ่งการใช้คาร์โบไฮเดรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรก (ภาพที่ 24) สอดคล้องกับการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาเดียวกัน คือมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ถึง 4.01, 3.56, 2.88 และ 2.85 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ **เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่ามีพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 3.0-4.0 พบในสารสกัดเอทานอลจากพืชทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับกลูโคส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ** *L. plantarum* **เกิดจากแบคทีเรียสามารถผลิตกรดขึ้นมา กรดที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญ** *L. plantarum* **คือ กรดแลกติก นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่นอีก เช่น กรดอะซิติก กรดบิวเทอริก และกรดโพรพิโอนิก ซึ่งกรดเหล่านี้จะส่งผลให้ระดับพีเอชในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียลดลง และยังบ่งบอกถึงความสามารถในการใช้สารอาหารและการเจริญของแบคทีเรียอีกด้วย**

เมื่อพิจารณาการใช้สารสกัดของ *L. acidophilus* ในการเจริญ พบว่าสามารถใช้สารสกัดจากมันฝรั่ง บีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนได้แค่ 33.82, 25.75, 32.14 และ 22.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในใช้กลูโคสได้ถึง 63.05 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 24) ซึ่งสอดคล้องกับ**การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ** *L. acidophilus* **พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับพีเอชน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ** *L. plantarum* **ซึ่งจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 4.60-6.38 และเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคสการเปลี่ยนแปลงพีเอชลดลงถึง 3.23** เช่นเดียวกับ**การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ** *Ent. faecium* **ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด พบว่าระดับพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 4.0-4.5 แต่ในการเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีพีเอชลดลงถึง 3.25 (ภาพที่** 25) ซึ่งเมื่อวัดปริมาณการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตของ *Ent. faecium* พบว่าสามารถนำกลูโคสไปใช้ได้ดีที่สุด คือ 53.73 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง คิดเป็น 47.03, 43.72, 39.07 และ 45.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำนองเดียวกันกับการใช้สารสกัดเป็นแหล่งคาร์บอนของ *B. bifidum* **ที่สามารถใช้สารสกัดทุกชนิดได้ ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อโปรไบโอติกจะค่อยๆ มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนครบ 72 ชั่วโมง โดย** *B. bifidum* **สามารถใช้กลูโคสได้ดีที่สุด คือ 59.44 เปอร์เซ็นต์**

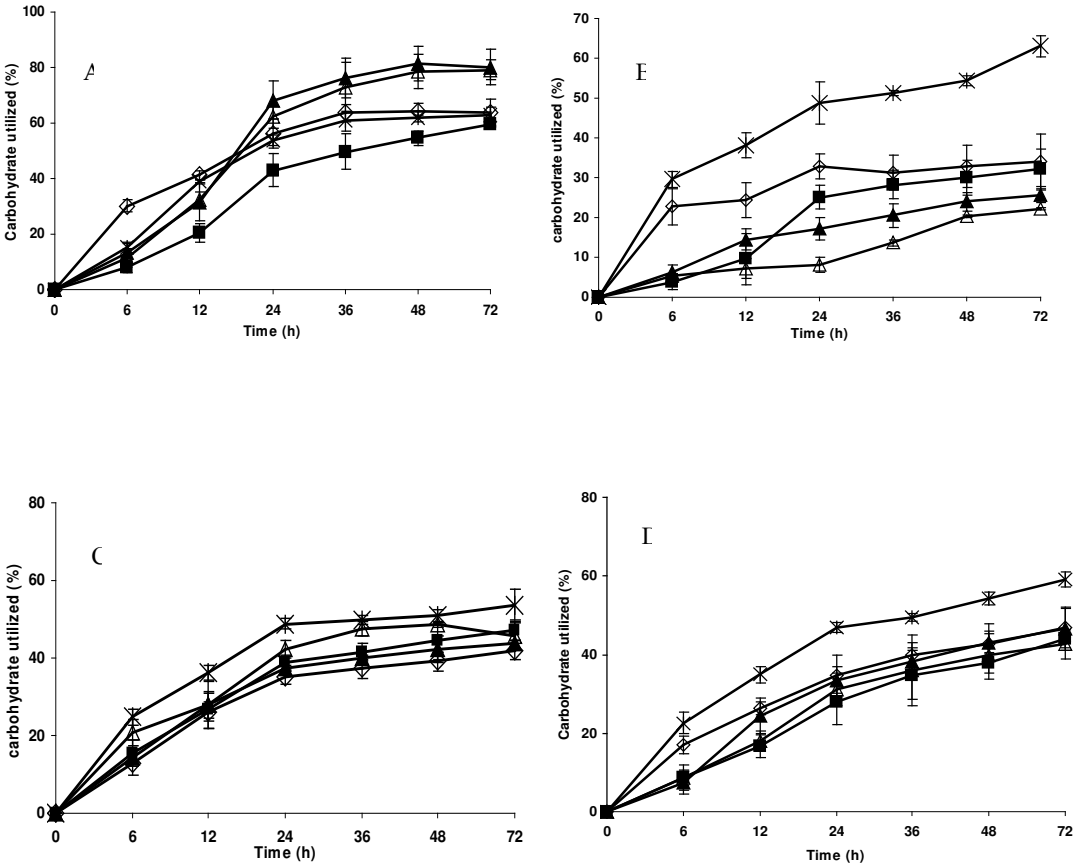


ภาพที่ 23 การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus*; C) *Ent. faecium*; D) *B. Bifidum* ในอาหารที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (Δ) มันเทศสีม่วงเปลือกแดง (■) บีทรูท (▲) มันฝรั่ง (◊) และกลูโคส (✳) เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 23. The growth of probiotic in minimal medium containing purple sweet potato (Δ), red sweet potato (■), beetroot (▲), potato (◊) and glucose (✳) extracts as carbon sources; A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus*; C) *Ent. faecium*; D) *B. Bifidum*

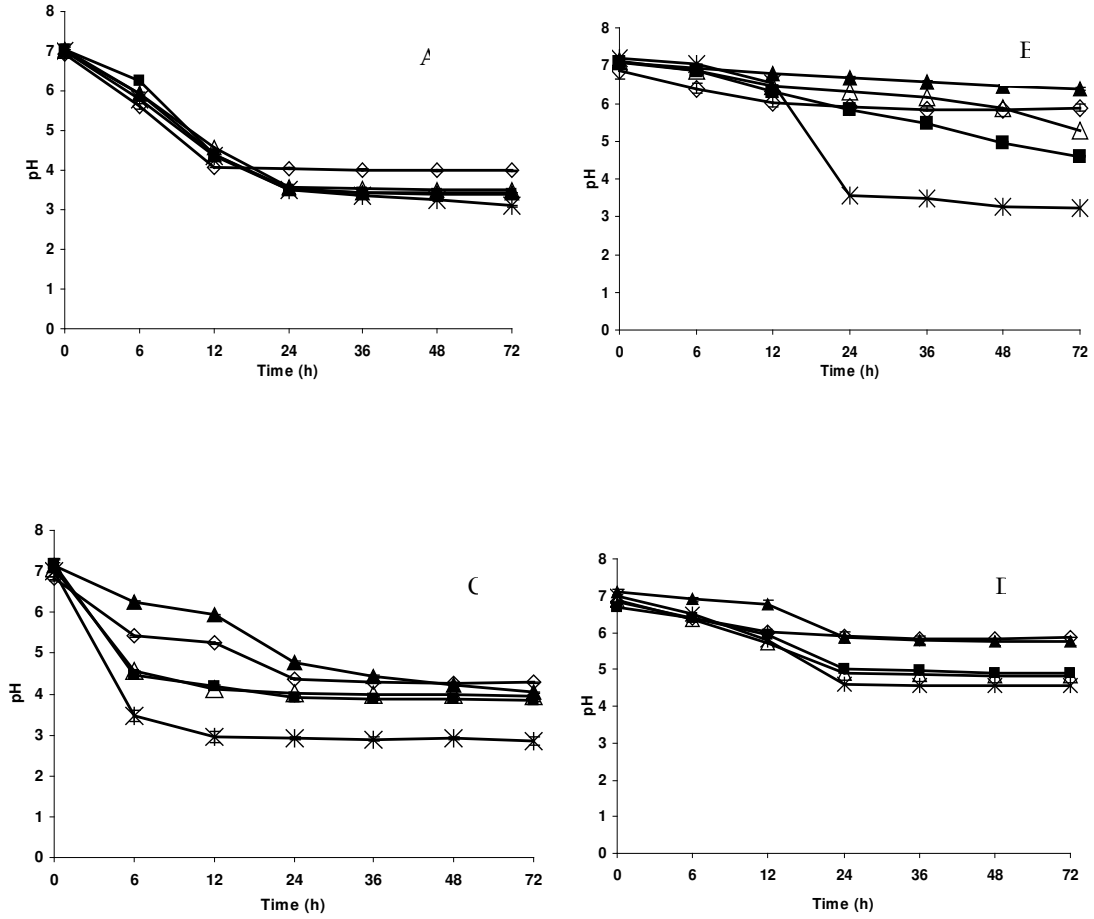
และใช้สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็น**แหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงกันคือ** 43.90, 46.50, 46.78 **และ** 42.58 **เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่** 24 **เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของ** *B. bifidum* **ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง พบว่าจากพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.9 เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชจะค่อยๆ ลดลงจนเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นจนเมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมง จะมีพีเอชสุดท้ายอยู่ในช่วง 4.8-5.8 ของสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 2**5**) **อาจจะเป็นเพราะ** *B. bifidum* **มีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5.0-5.5 จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียจะมีการควบคุมเมทาบอลิซึมให้มีการสร้างกรดที่น้อยลงเพื่อควบคุมระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นสภาวะเหมาะสมต่อการมีชีวิตรอด ดังนั้นระดับพีเอชที่ชั่วโมงสุดท้ายจึงลดลงไม่มากเมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงของแบคทีเรียในกลุ่ม** *Lactobacillus* ดังนั้น *L. plantarum* สามารถใช้สารสกัดเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงที่สุด ดีกว่า *L. acidophilus*, *Ent. faecium* และ *B. Bifidum*

คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกที่ดีต้องสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกายได้ ซึ่งพบว่าเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดเอทานอลจากพืชทั้ง 4 ชนิด คือ สารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่งและมันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองต่อการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกในร่างกาย พบว่าสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้ในการทดสอบได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pedreschi และ คณะ (2003) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ สารสกัดเอทานอลจาก yacon root โดยทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก 3 ชนิด คือ *L. acidophilus*, *L. plantarum* และ *B. bifidum* เปรียบเทียบกับการใช้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ทางการค้า พบว่า *L. plantarum* และ *B. bifidum* สามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้สารสกัดจาก yacon root เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า FOS ส่วน *L. acidophilus* สามารถใช้สารทั้ง 2 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้มีการศึกษาผลของ arabinan และ arabinanoligosaccharides ที่สกัดจาก sugar beet ต่อการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก พบว่าสารสกัดจาก sugar beet สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacteria* ได้ (Al-Tamimi *et al*., 2006)



ภาพที่ 24 เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไปของสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (Δ) มันเทศสีม่วงเปลือกแดง (■) บีทรูท (▲) มันฝรั่ง (◊) และกลูโคส (✳) โดย A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus*; C) *Ent. faecium*; D) *B. bifidum*

Figure 24. Percentage of carbon sources from purple sweet potato (Δ), red sweet potato (■), beetroot (▲), potato (◊) and glucose (✳) extracts utilized by; A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus*; C) *Ent. faecium*; D) *B. bifidum*



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงพีเอช ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus*; C) *Ent. faecium*; D) *B. bifidum* ในอาหารที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (Δ) มันเทศสีม่วงเปลือกแดง (■) บีทรูท (▲) มันฝรั่ง (◊) และกลูโคส (✳) เป็นแหล่งคาร์บอน

Figure 25. pH change in culture broth of probiotic fermentation using purple sweet potato (Δ), red sweet potato (■), beetroot (▲), potato (◊) and glucose (✳) extracts as carbon sources by; A) *L. plantarum*; B) *L. acidophilus*; C) *Ent. faecium*; D) *B. bifidum*

แบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยเฉพาะขนาดโมเลกุลของสารอาหารโดยพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสามารถใช้สารอาหารโมเลกุลเล็กได้ดีกว่าสารอาหารโมเลกุลใหญ่ (Olano-Martin *et al*., 2000) จากการทดลองพบว่า *L. plantarum* สามารถใช้สารสกัดจากบีทรูทได้ดีสารสกัดชนิดอื่น และสามารถใช้สารสกัดจากมันฝรั่งได้น้อยมัน ซึ่งเมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีขนาดน้ำหนักอยู่ในช่วง 500-5000 ดาลตัน โดยสารสกัดจากบีทรูทมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 464 และ 1603 ดาลตัน ถึง 73.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันฝรั่ง มีปริมาณ 62.38, 63.54 และ 34.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสนับสนุนว่าขนาดของโมเลกุลของสารอาหารมีผลต่อการนำไปใช้ของแบคทีเรีย สอดคล้องกับการใช้ pectin ในการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับการใช้ pectin oligosaccharides โดยพบว่า *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium infantis* และ *Bifidobacterium aldolescentis* ไม่สามารถเจริญได้บน pectin แต่สามารถเจริญได้บน pectic oligasaccharides

นอกจากนี้ความสามารถในการใช้สารอาหารหรือสารพรีไบโอติกของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะ (Olano-Martin *et al*., 2002) พบว่า *Bifidobacterium animalis* DN-173010 สามารถใช้ Raftilose P95 และ Raftilose Synergy 1 ได้ดีกว่ากลูโคส และฟรุคโตสซึ่งสามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Van der Meulen *et al*., 2004) และ *B. bifidum* สามารถใช้ Lactulose ได้ดีเท่ากับการใช้กลูโคส แต่ไม่สามารถใช้ Raffinose ได้ เช่นเดียวกับ *L. acidophilus* แต่พบว่า *Lactobacillus salivarius* สามารถใช้ได้ทั้ง Lactulose และ Raffiose เป็นแหล่งคาร์บอน (Sako *et al*., 1999) การที่แบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติกได้ไม่เท่ากันนั้นเนื่องจากความหลากหลายในเรื่องของโครงสร้าง และการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโมเลกุลเหล่านั้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก จะมีองค์ประกอบและการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะภายในโมเลกุลต่างกัน เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ จะต่อกันด้วย 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) ดังนั้นแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นย่อยสารเหล่านี้ เพื่อที่นำสารเหล่านี้ไปใช้ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นจะมีความจำเพาะต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ พบว่า *L. plantarum* สามารถผลิตเอนไซม์ α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase และ α-mannosadase ขึ้นมาได้ และไม่พบการสร้างเอนไซม์ α-Galactosidase และ α-glucosidase ใน *L. acidophilus* (Papamanoli *et al*., 2003) นอกจากนี้พบว่า *L. paracasei* subsp.

paracasei 8700:2, *L. paracasei* 1195 สามารถผลิต β-fructosidases ขึ้นมาย่อยอินนูลิน ในขณะที่ *L. acidophilus* IBB801 ไม่สามารถสร้างขึ้นมาย่อยได้ (Makras *et al*., 2005; Kaplan and Hutkin, 2000) ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตขึ้นมาจะมีความจำเพาะต่อพันธะที่เชื่อมต่อกันภายในพอลิเมอร์ ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืชหัวพบว่าเป็นกลุ่มของกลูโคส และฟรุคโตส ซึ่งเป็นน่าจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,1-2 และβ,2-1 ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบน่าจะเป็นกลุ่มของกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ *L. plantarum* สามารถใช้สารเหล่านี้ในการเจริญได้ดีกว่า *L. acidophilus*

3.4.2. ผลของสารสกัดในการส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติก

การส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของสารพรีไบโอติก ซึ่งการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *Ent. faecium* และ *B. bifidum* ที่เจริญในอาหารที่มีสารสกัดจาก มันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยนำส่วนใสที่ได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 72 มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 สายพันธุ์ คือ *Salmonella* sp., *Lis. monocytogenes, E. coli* และ *S. aureus* พบว่าส่วนใสที่ได้หลังจากการเลี้ยง *L. plantarum* ในอาหารที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมการยับยั้งพบว่าไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้น ซึ่งจากการทดลองทำให้แน่ใจได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งไม่ได้มาจากผลของสารสกัด และส่วนใสที่ได้หลังจากการเลี้ยง *L. acidophilus*, *Ent. faecium* และ *B. bifidum* ในอาหารที่มีสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบทั้งหมดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการเจริญ การใช้สารสกัดเป็นแหล่งคาร์บอนและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของ *L. plantarum* สูงกว่าโปรไบโอติกสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการศึกษาดังที่ได้ศึกษาในข้อ 3.4.1 พบว่าในการเจริญ *L. plantarum* โดยใช้สารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชมากที่สุดซึ่งจะมีพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 3-4 ซึ่งมีระดับ พีเอชที่ต่ำกว่าการเจริญในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทำให้ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนั้นน้ำหมักที่ได้จากการศึกษาการเจริญ *L. plantarum* โดยใช้สารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลกิจกรรมการยับยั้งเป็นบวก ในการเจริญแบคทีเรียแลกติกนั้นจะมีการผลิตสารยับยั้ง จุลินทรีย์ได้หลายชนิดออกมา เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดบิวเทอริก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น แต่ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในการทดลองอาจเนื่อง

มาจากผลของกรดอินทรีย์โดยส่วนใหญ่ เมื่อพิจารณาถึงระดับพีเอชที่เกิดขึ้นแล้ว การเจริญโดย *L. plantarum* จะให้ระดับพีเอชที่ต่ำกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และเมื่อทำการทดสอบว่ามีผลของสารยับยั้งชนิดอื่นหรือไม่ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยทดสอบผลของแบคเทอริโอซิน และผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าเมื่อปรับระดับพีเอชในน้ำหมักให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5 และมีการเติมเอนไซม์คะตะเลสลงไป ส่งผลให้ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้น จากการทดลองนี้อาจจะบอกได้ว่าการยับยั้งนั้นเป็นผลที่เกิดจากกรด

3.4.3 ปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) ที่ได้จากการหมักสารสกัดของ *L. plantarum*

ในกระบวนการหมักสารสกัดด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* จะมีการผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFA) หลายชนิดได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวเทอริก เมื่อ *L. plantarum* ใช้สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. plantarum* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด เมื่อเจริญในอาหารที่มีสารสกัดจากมันฝรั่ง ดังแสดงในตารางที่ 8 รองลงมาเป็นสารสกัดจากบีทรูท ส่วนการผลิตกรดอะซิติกในอาหารที่มีกลูโคส สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง และมันเทศสีม่วงเปลือกแดง จะมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจะมีปริมาณ 11.55, 4.98, 4.01, 4.03 และ 3.99 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณของกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวเทอริก จะมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะซิติกที่เกิดขึ้น พบว่าจะมีปริมาณของกรดบิวเทอริก 0.27, 0.19, 0.15, 0.14 และ 0.16 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเกิดขึ้นในการหมักโดยใช้สารสกัดจากมันฝรั่ง บีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง กลูโคส และมันเทศสีม่วงเปลือกแดงเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Michel และคณะ (1998) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้ Acacia gum เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต พบว่าจะมีการผลิตกรดอะซิติกมากที่สุด รองลงมาเป็นกรดโพรพิโอนิก และบิวเทอริก ซึ่งจะมีปริมาณของ กรดบิวเทอริกเกิดขึ้นประมาณ 6.2 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Laurentin และคณะ (2004) โดยใช้สารสกัดเอทานอลจากมันฝรั่ง Lentil และ Cocoyam เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ พบว่ามีการผลิตกรดบิวเทอริกในปริมาณที่สูงประมาณ 154, 148 และ 161 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด สามารถส่งเสริมการผลิตกรดบิวเทอริกได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการทดลองอื่นๆ ใช้เชื้อผสมในการหมักซึ่งจะใช้อุจจาระของคนที่มีสุขภาพดีมาเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก และมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* สามารถผลิตกรดบิเทอริกออกมาได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม *Clostridium* และ *bacteriodes* (Olano-Martin *et al*.,

2000) แต่แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในร่างกาย ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาสารที่ไปส่งเสริมการผลิตกรดบิวเทอริก และกรดไขมันสายสั้นชนิดอื่นๆ ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ถึงแม้ว่าแบคทีเรียแลกติกจะมีการผลิตกรดแลกติกเป็น กรดตัวหลักในการหมักสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค แต่พบว่ากรดอะซิติกมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เช่นกัน นอกจากนี้การหมักบริเวณลำไส้ใหญ่มีกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่หลากหลาย เช่นการสร้างยับยั้ง การแย่งอาหาร การป้องกันการเข้ายึดเกาะบริเวณผนังลำไส้ ซึ่งกลไกเหล่านี้มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในร่างกายได้ และกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักมีผลต่อสุขภาพได้ในหลายด้าน เช่น ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Buddington *et al*., 1996; Hylla *et al*., 1998) โดยเฉพาะกรดบิวเทอริก และโพรพิโอนิกช่วยป้องกันการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่โดยไปกระตุ้นการเกิด apoptosis ในร่างกาย (Hughes and Rowland, 2001) นอกจากนี้เซลล์บริเวณลำไส้ใหญ่จะนำกรดไขมันเหล่านี้ไปใช้เป็นพลังงานภายในเซลล์ และการผลิตกรดไขมันสายสั้นในปริมาณมากยังช่วยป้องการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารได้ (Flickinger *et al*., 2002)

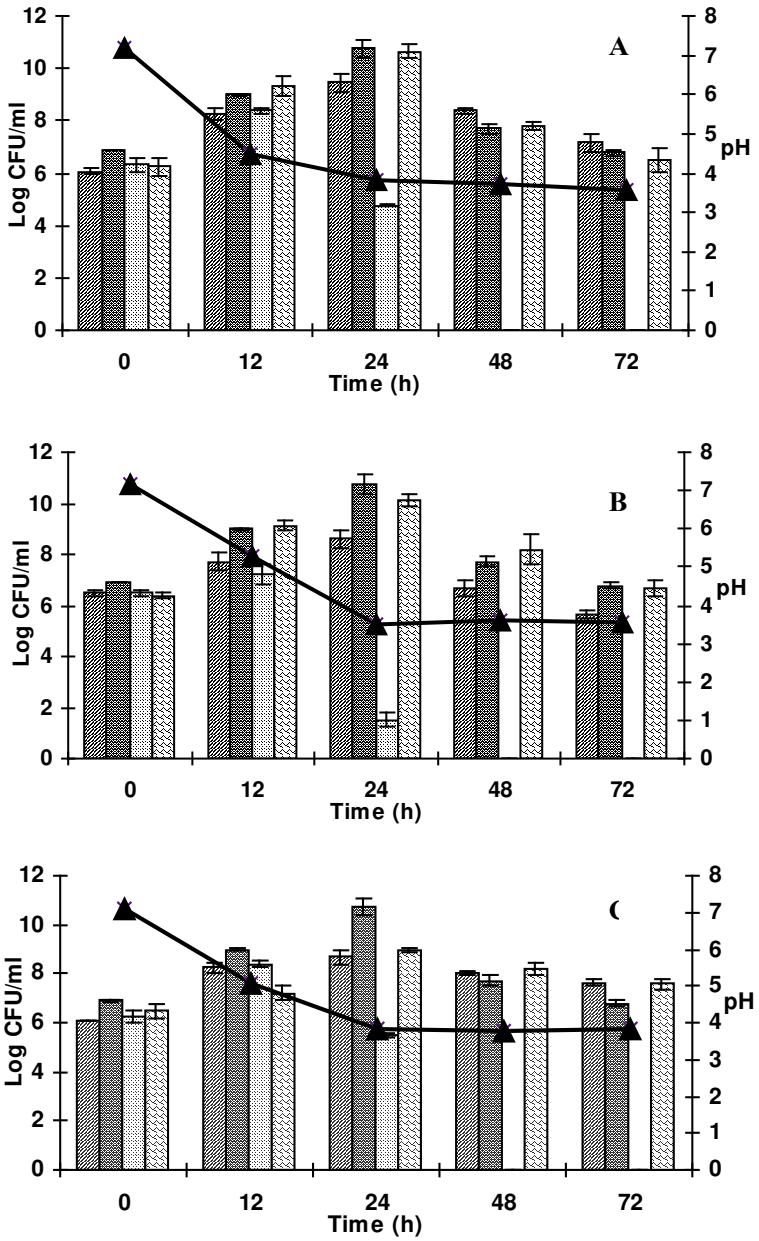
3.5 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากพืชหัว (Co-culture)

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ โดยในอาหารที่มีสารสกัดจากมันสีม่วงเปลือกแดง แบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด เพิ่มจำนวนเป็น 8.38, 7.19 และ 8.40 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 และลดจำนวน 4.76, 1.50 และ 5.46 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และยับยั้งได้สมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่ ในอาหารที่ไม่มี *L. plantarum* แบคทีเรียก่อโรคสามารถเจริญถึง 9.47, 8.60 และ 8.68 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อเลี้ยงไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 จะมีปริมาณแบคทีเรียเหลืออยู่ 7.16, 5.65 และ 7.36 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 26

ตารางที่ 8 ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตจาก *L. plantarum* ที่เจริญในอาหารที่มี สารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง และ กลูโคส

Table 8. Short chain fatty acid (SCFA) formation in fermentation by *L. plantarum* in minimal medium containing red sweet potato, beetroot, potato, purple sweet potato extracted and glucose as carbon sources.

Type of ethanolic extract	Time (h)	Acetic acid (mM)	Propionic acid (mM)	Butyric acid (mM)
Red-sweet potato	0	0.14±0.01	0.07±0.01	0.06±0.007
	24	3.65±0.10	0.25±0.01	0.15±0.04
	48	3.99±0.20	0.27±0.08	0.16±0.05
Beetroot	0	0.13±0.01	0.09±0.02	0.08±0.01
	24	5.66±0.11	0.32±0.06	0.21±0.05
	48	4.98±0.13	0.32±0.03	0.19±0.08
Potato	0	0.13±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01
	24	10.32±0.42	0.37±0.09	0.25±0.04
	48	11.55±0.40	0.42±0.03	0.27±0.01
Purple-sweet potato	0	0.13±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01
	24	3.09±0.35	0.29±0.03	0.15±0.04
	48	4.03±0.06	0.32±0.04	0.15±0.04
Glucose	0	0.26±0.02	0.17±0.03	0.06±0.007
	24	3.95±0.10	0.30±0.01	0.15±0.004
	48	4.01±0.12	0.29±0.07	0.14±0.02

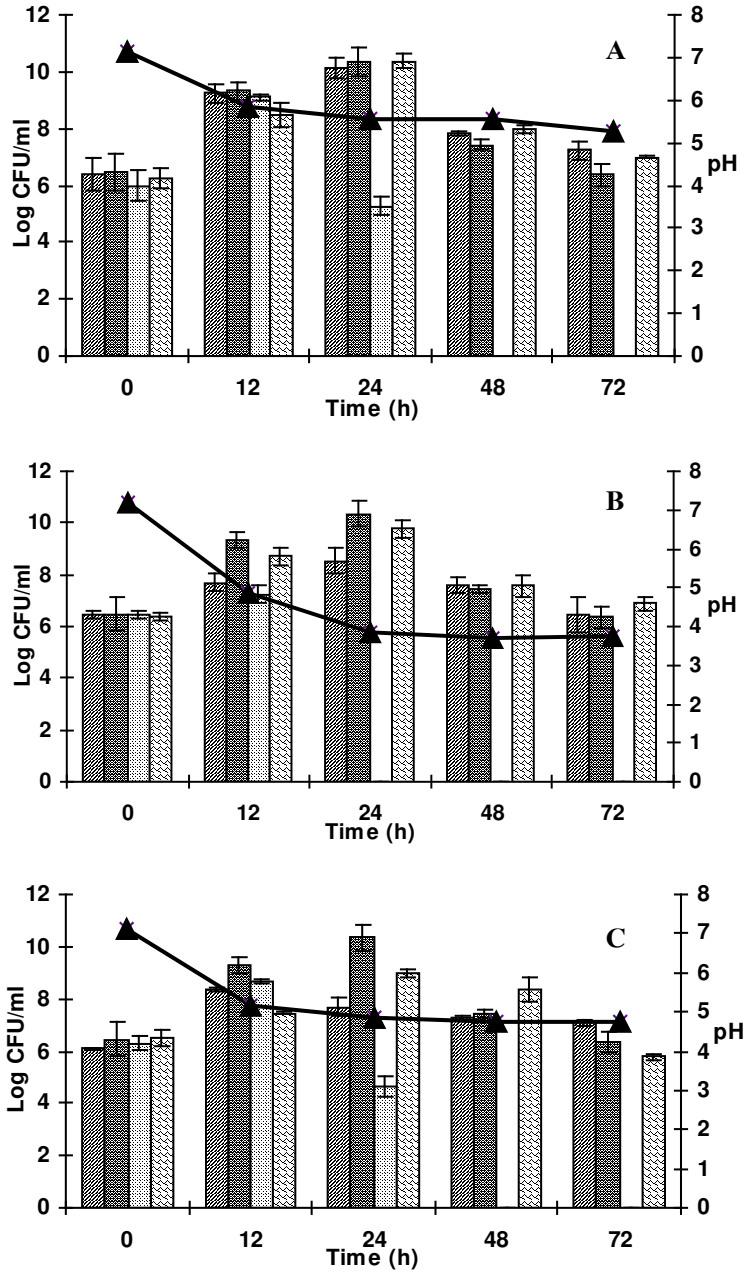


ภาพที่ 26 การเจริญของ *L. plantarum* และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli*; B) *S. aureus* และ C) *Salmonella* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง (แบคทีเรียก่อโรคอย่างเดียว *L. plantarum* อย่างเดียว แบคทีเรียก่อโรคใน co-culture *L. plantarum* ใน co-culture ▲ พีเอช)

Figure26. Growth of A) *E. coli*; B) *S. aureus*, C) *Salmonella* with *L. plantarum* in the presence of red-sweet potato extract. (pathogen alone *L. plantarum* pathogen in co-culture *L. plantarum* in co-culture ▲ pH)

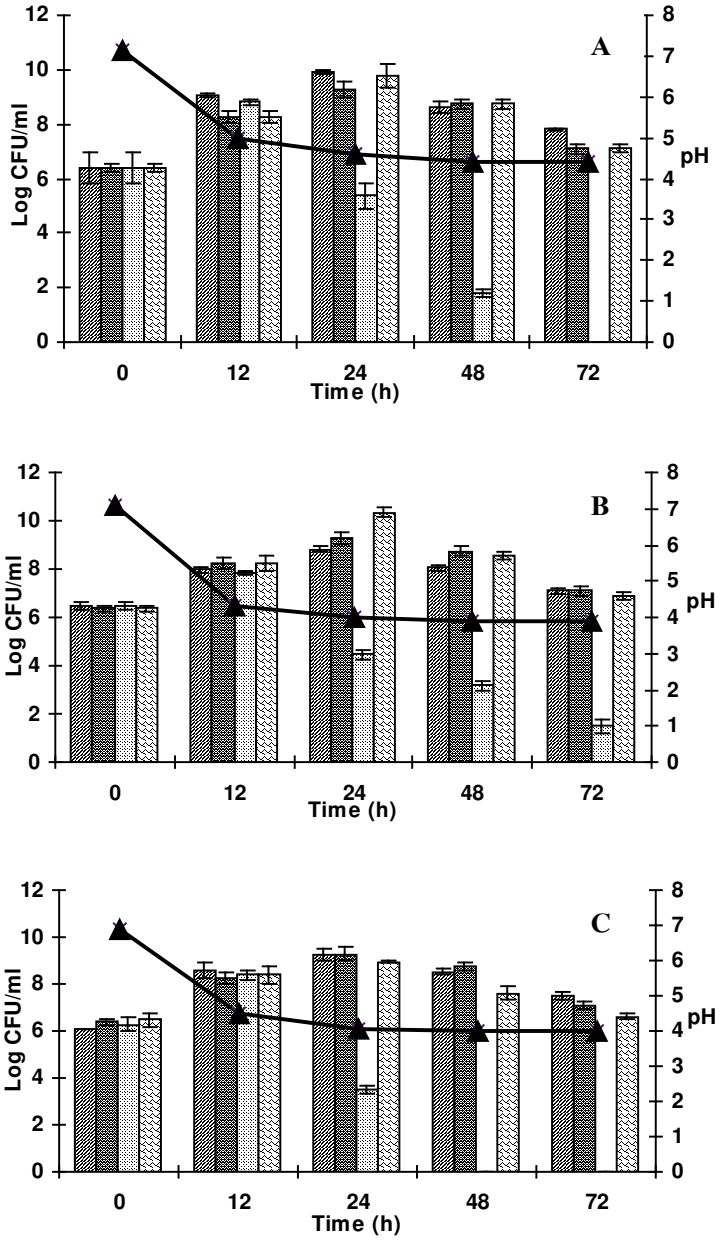
จากการศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียโปรไบโอติก (*L. plantarum*) ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สารสกัดเอทานอลจากบีทรูท (beetroot) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากบีทรูทสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* *S. aureus* และ *Salmonella* sp.ได้ ซึ่งมีการเจริญและกิจกรรมการยับยั้งเช่นเดียวกันกับการศึกษาที่ใช้สารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดงเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด มีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วง 12 ชั่วโมงแรก แต่จะลดจำนวนลงในชั่วโมงที่ 24 โดย *E. coli* เพิ่มจำนวนเป็น 9.12 log CFUต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 แต่ลดลงเป็น 5.28 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 26) ส่วน *Salmonella* sp. เพิ่มเป็น 8.70 ในชั่วโมงที่ 12 และลดลงเป็น 4.68 log CFU ต่อมิลลิลิตร แต่ในการเลี้ยงร่วมกันกับ *S. aureus* พบว่าไม่มีปริมาณเชื้อเหลือรอด ในชั่วโมงที่ 24 ส่วน *E. col* และ *Salmonella* sp. ถูกยับยั้งได้สมบูรณ์หลังจาก 48 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* โดยไม่มี *L. plantarum* จะมีจำนวน 7.09, 6.47 และ 7.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 27)

เมื่อศึกษาการเจริญร่วมกันของ *L. plantarum* กับแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากมันฝรั่ง (potato) เป็นแหล่งคาร์บอนโดย *Salmonella* sp. จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 8.45 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 แต่จะลดลงในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีปริมาณ 5.06 log CFU ต่อมิลลิลิตร และไม่มีปริมาณเชื้อเหลือรอดในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *Salmonella* sp. สามารถเจริญถึง 9.231 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อเลี้ยงไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 จะมีปริมาณแบคทีเรียเหลืออยู่ 8.539 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาการเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* พบว่าจะมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นถึง 8.803 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 แต่ลดลงในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ซึ่งมีปริมาณเหลืออยู่ 5.370 และ 1.801 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และถูกยับยั้งสมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 72 แต่การเลี้ยงร่วมกับ *S. aureus* พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้หมดในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณเหลืออยู่ 1.5 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ *L. plantarum* พบว่าจะมีปริมาณ *S. aureus* เหลืออยู่ถึง 7.08 log CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมง 72 (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 27 การเจริญของ *L. plantarum* และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli*; B) *S. aureus* และ C) *Salmonella* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากบีทรูท (▨แบคทีเรียก่อโรคอย่างเดียว ▩ *L. plantarum* อย่างเดียว ⁙ แบคทีเรียก่อโรคใน co-culture ▧ *L. plantarum* ใน co-culture ▲ พีเอช)

Figure27. Growth of A) *E. coli*; B) *S. aureus*, C) *Salmonella* with *L. plantarum* in the presence of red sweet potato extract. (▨ pathogen alone ▩ *L. plantarum* alone ⁙ pathogen in co-culture ▧ *L. plantarum* in co-culture ▲ pH).

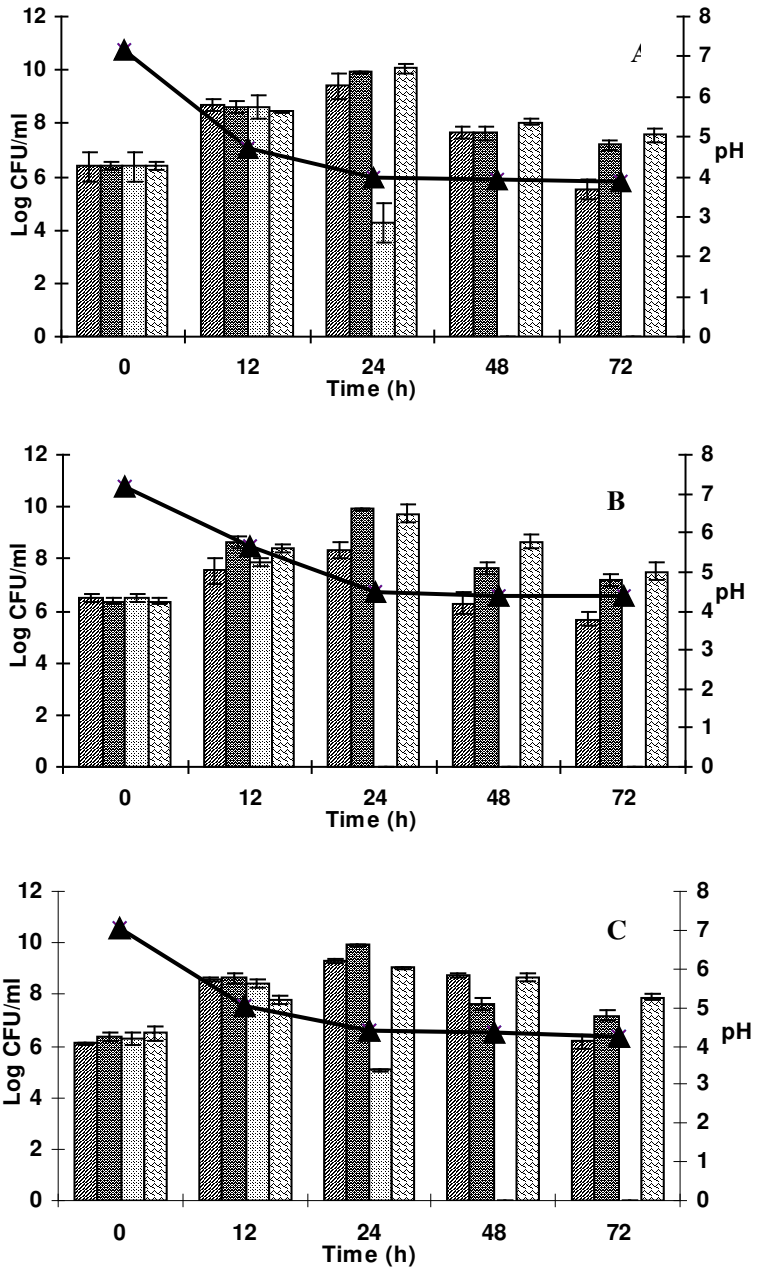


ภาพที่ 28 การเจริญของ *L. plantarum* และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli*; B) *S. aureus* และ C) *Salmonella* sp.เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากมันฝรั่ง (แบคทีเรียก่อโรคอย่างเดียว *L. plantarum* อย่างเดียว แบคทีเรียก่อโรคใน co-culture *L. plantarum* ใน co-culture ▲ พีเอช)

Figure28. Growth of A) *E. coli*; B) *S. aureus*, C) *Salmonella* with *L. plantarum* in the presence of red sweet potato extract (pathogen alone *L. plantarum* *Salmonella* sp. in co-culture *plantarum* in co-culture ▲ pH)

เมื่อศึกษาการเจริญร่วมกันของ *L. plantarum* กับแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียก่อโรค *E. coli*,*S. aureus* และ *Salmonella* sp.ไม่เหลือรอดเลยในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 8.618, 7.853 และ 8.447 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 12 แต่มีปริมาณลดลงเหลือ 4.275 และ 5.664 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งพบในการเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ส่วน *S. aureus* ไม่มีปริมาณเหลือรอด แต่ในชุดควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 72 ชั่วโมง เชื้อก่อโรคที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียโปรไบโอติกไม่เหลือรอดทั้ง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่ายังมีปริมาณเชื้อเหลืออยู่ประมาณ 5.673, 5.528 และ 5.808 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus* ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 29

จากการศึกษาการเจริญร่วมกันระหว่างแบคทีเรีย *L. plantarum* กับแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร คือ *E. coli, S. aureus* และ *Salmonella* sp. ในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากพืชทั้ง 4 ชนิด ที่คัดเลือกได้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งคุณสมบัติของสารพรีไบโอติก นอกจากจะสามารถส่งเสริมการเจริญจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แล้ว ยังต้องมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ให้โทษแก่ร่างกาย จากการทดลองพบว่า *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เมื่อเลี้ยงร่วมกันไปจนครบ 72 ชั่วโมง แบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มจำนวนในชั่วโมงที่ 12 และหลังจากเลี้ยงไป 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณลดลงและไม่มีเหลือรอดในชั่วโมงที่ 48 และ 72 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยงไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณ *E. coli* และ *S. aureus* เหลืออยู่ถึง 3.72 และ 4.01 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับแต่ปริมาณของ *Salmonella sp.* ไม่มีเหลือรอดในการเลี้ยงร่วมกันโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสังเกตได้ว่าสารสกัดเอทานอลที่คัดเลือกทั้ง 4 ชนิด มีประสิทธิภาพดีกว่ากลูโคส ถึงแม้ว่ากลูโคสจะส่งเสริมการยับยั้งได้ แต่ในสภาวะปกติเมื่อร่างกายได้รับกลูโคสหรือสารอาหารที่ถูกย่อยได้ด้วยกรดและเอนไซม์ในทางเดินอาหารส่วนบน สารอาหารเหล่านั้นจะถูกดูดซึมภายในลำไส้เล็กทำให้ไม่มีเหลือลงไปในลำไส้ใหญ่และไปส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย โปรไบโอติกได้ ซึ่งจากการทดลองของ Van de Wiele และ คณะ (2004) พบ Bifidobacteria ที่เลี้ยงในอาหารที่มี inulin เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Clostridium* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang และ Gibson (1993) โดยศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียโปรไบโอติกแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารที่มีโอลิโกฟรุคโตส และอินนูลินเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ Lactobacilli และ Bifidobacteria ได้ และปริมาณ *E. coli* และ *Clostridium* ลดลง



ภาพที่ 29 การเจริญของ *L. plantarum* และแบคทีเรียก่อโรค A) *E. coli*; B) *S. aureus* และ C) *Salmonella* sp.เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง (◪ แบคทีเรียก่อโรคอย่างเดียว ▩ *L. plantarum* อย่างเดียว ⊡ แบคทีเรียก่อโรคใน co-culture ⊠ *L. plantarum* ใน co-culture ▲ พีเอช)

Figure 29. Growth of A) *E. coli*; B) *S. aureus*, C) *Salmonella* with *L. plantarum* in the presence of red-sweet potato extract. (◪ pathogen alone ▩ *L. plantarum* alone ⊡ pathogen in co-culture ⊠ *L. plantarum* in co-culture ▲ pH)

นอกจากนี้ ในปี 1994 Gibson และ Wang ได้ศึกษาการเลี้ยงร่วมกันของ *B. infantis*, *E. coli* และ *Clostridium perfringens* ในอาหารที่มีโอลิโกฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน *B. infantis* และสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Clostridium perfringens* ได้ นอกจากนี้ Bailey และคณะ (1991) ได้ศึกษาผลของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ต่อการเจริญของ *Salmonella* ในทางเดินอาหารไก่ โดยให้ไก่กิน FOS ปริมาณ 0.75 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร พบว่าเมื่อให้ไป 4 วัน สามารถยับยั้ง *Salmonella* ดังนั้นในการคัดเลือกสารที่มีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติกต้องสามารถส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในร่างกายได้ ซึ่งสารพรีไบโอติกหลายชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากพืชสามารถส่งเสริมการยับยั้ง *E. coli* และ *C. perfringens* ได้ (Flickinger *et al*., 2002) น้ำตาลซอบิทอล (sorbital) ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติก (Suskovic *et al*., 2001) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ (Vaux *et al*., 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Fooks และ Gibson (2003) พบว่าเมื่อเลี้ยง *L. plantarum* 0407 ร่วมกับ *E. coli* และ *Campylobacter jejuni* โดยใช้โอลิโกฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงไปถึงชั่วโมง 24 พบว่าปริมาณ *E. coli* และ *Campylobacter jejuni* ลดลงถึง 5 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ Mandalari และคณะ (2007) พบว่า pectic-oligosaccharides ที่ได้จากเปลือกมะกรูด (bergamot peel) สามารถลดปริมาณของ *Clostridium* ลงได้ โดยทำการเลี้ยงแบบ mix culture สาร พรีไบโอติกที่มีขายทางการค้ามีผลต่อการส่งเสริมการเจริญแบคทีเรียโปรไบโอติกและยังส่งผลยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* และ *Campylobacter* เป็นต้น (Cummings and Macfarlane, 2002; Servin, 2004) ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นเป็นไปได้ในหลายกลไกด้วยกัน อาจเนื่องมาจากสภาวะในการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคไม่เหมาะสม ซึ่งในกระบวนการเจริญของแบคทีเรียแลกติกจะมีการผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นมาเป็นผลิตภัณฑ์หลักทำให้พีเอชในระหว่างการเจริญลดลง ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้มีพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 3.8-5.2 นอกจากนี้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกจะสามารถส่งเสริมการผลิตกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นพวกกรดไขมันสายสั้น เช่น อะซิติก โพรพิโอนิก และบิวเทอริก ซึ่งพบว่ากรดไขมันสายสั้นเหล่านี้ส่งผลให้ระดับพีเอชในระหว่างการเจริญลดลงเช่นกัน และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Salminen and Wright, 1993) ซึ่งจากการทดลองโดยใช้สารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Drago และคณะ (1997) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของ enteropathogen คือ *E. coli*, *Salmonella entexitidis* และ *Vibrio cholerae* โดยการเลี้ยงร่วมกันกับ *Lactobacillus* ซึ่งแยกมาจากทางเดินอาหารมนุษย์ พบว่า *Lactobacillus* สามารถยับยั้ง

การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่ *Lactobacillus* ผลิตขึ้นมา นอกจากสารพรีไบโอติกจะส่งเสริมการสร้างกรดอินทรีย์ขึ้นมาแล้ว ยังส่งเสริมการผลิตสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ขึ้นมายับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Hopkins and Macfarlane, 2003; Collins and Aramaki, 1980) ในการทดลองครั้งนี้กิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจจะไม่ได้เป็นผลมาจากแบคเทอริโอซิน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ เนื่องจากเมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 มาปรับพีเอชเป็น 5.5 และเติมเอนไซม์คะตะเลส พบว่าไม่เกิดกิจกรรมการยับยั้ง ซึ่งสารสกัดเอทานอลทั้ง 4 ชนิด อาจจะไม่ส่งเสริมการผลิตสารยับยั้งของ *L. plantarum* หรืออาจจะผลิตได้ในปริมาณน้อย และเกิดการเจือจางในอาหารเลี้ยงส่งผลให้กิจกรรมการยับยั้งไม่เกิดขึ้น (Drago *et al*., 1997)

นอกจากการส่งเสริมการสร้างกรดและสารยับยั้งในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแล้ว สารพรีไบโอติกยังสามารถส่งเสริมการยับยั้งโดยใช้กลไกอื่นๆ อีก เช่น การแข่งขันการแย่งอาหารกับเชื้อก่อโรค การเพิ่มจำนวน และการป้องกันการเข้ายึดเกาะกับผนังลำไส้ใหญ่ (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) ซึ่ง Coppa และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของ Human milk oligosaccharides (HMOs) ในการยับยั้งการยึดเกาะ Caco-2 cell ของ *E. coli*, *Salmonela fyris* และ *Vibrio cholerae* พบว่า HMOs สามารถป้องกันการเข้ายึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับเซลล์ได้ และช่วยป้องกันการเกิดอาการท้องเสีย และมีการศึกษาอีกว่า HMOs ยังป้องกันการยึดเกาะของของเชื้อ *Campylobacter jejuni* บริเวณผนังลำไส้ได้ ซึ่ง HMOs จะไปแย่งจับกับแบคทีเรียก่อโรคทำให้ไม่สามารถไปจับกับผนังลำไส้ได้ (Ruiz-Palacios *et al*., 2002) ในการทดลอง

การเลี้ยงร่วมกันครั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดเป็นผลจากกลไกใด แต่จากการทดสอบเบื้องต้นน่าจะเป็นผลของกรดอินทรีย์มากกว่าการยับยั้งโดยแบคเทอริโอซิน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ยังมีกลไกอื่นๆ อีกที่ยังไม่ได้ศึกษา ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งหรือการปรับสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่หรือร่างกายจริงๆ นั้นจะมีกลไกการยับยั้งหลายกลไกและซับซ้อนมากขึ้น เช่น การผลิตกรดขึ้นมาทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ จุลินทรีย์ก่อโรค การผลิตสารยับยั้ง การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การแย่งอาหาร และการแย่งพื้นที่ในการเกาะติดกับผนังลำไส้ เป็นต้น ซึ่งกลไกต่างๆ นั้น สารพรีไบโอติกมีส่วนในการกระตุ้นหรือส่งเสริมให้เกิดขึ้นได้ (Kolida *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง มันฝรั่ง และบีทรูท มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นสารพรีไบโอติก เนื่องจากสามารถทนการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดสูงและการย่อยด้วยเอนไซม์ สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก และส่งเสริมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้

3.6 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดคัดเลือกได้จากพืชหัว

3.6.1 ผลศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่คัดเลือกได้ โดยใช้ GPC

จากการนำสารสกัดเอทานอลจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง ที่คัดเลือกได้มาหาน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเอทานอล พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด มีองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยใกล้เคียงกันซึ่งจะอยู่ในช่วง 464-4735 ดาลตัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Mcpherson และ Jane (1999) พบว่ามีขนาดของ amylopectin ที่พบพืชหัวจะมีขนาด 4500-5000 ดาลตัน และ amylose มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 1000-2000 ดาลตัน ในซึ่งสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดงมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 3917 และ 1723 ดาลตัน มี อยู่ประมาณ 36.46 และ 63.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดจากบีทรูท 4735, 1603 และ 464 ดาลตัน มีปริมาณ 26.90, 60.70 และ12.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดจากมันฝรั่ง 3065 และ 1624 ดาลตัน มีปริมาณ 65.38และ 34.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 4324 และ 1511 ดาลตัน มีปริมาณ 37.62 และ 62.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

3.6.2 ผลการศึกษาชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดโดยใช้ TLC

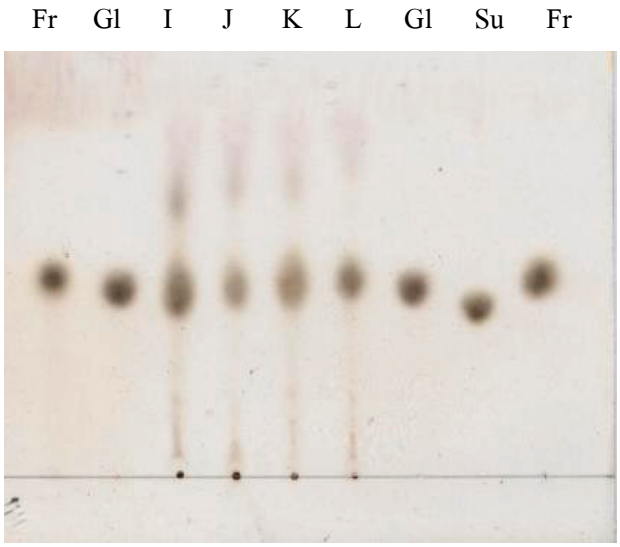
จากการทดลองหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก มันเทศสีม่วงเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และ มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง พบว่ามีค่า Rf ของสารสกัดเท่ากับ 0.44,

0.44, 0.45 และ 0.45 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และ ซูโครส มีค่า Rf เท่ากับ 0.46, 0.44 และ0.38 จึงคาดว่าสารสกัดจากจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง และบีทรูท น่าจะมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ส่วนมันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองมีค่า Rf ใกล้เคียงกับกลูโคสและฟรุคโตส คาดว่าน่าจะเป็นไปได้ที่จะมีน้ำตาลตัวใดตัวนึงหรือทั้งสองชนิดเป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 30 ซึ่งจากการรายงานพบว่าในพืชหัวมีน้ำกลูโคสเป็นองค์ประกอบถึง 88.4 เปอร์เซ็นต์ และพบฟรุคโตสเพียงเล็กน้อย (Salvador *et al*., 2000; Huang *et al*., 2000) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าในสารสกัดที่วิเคราะห์นั้นมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ แต่เพื่อความแน่ชัดจึงทำการทดลองด้วยเทคนิคอื่นเพื่อใช้ในการยืนยันผล

ตารางที่ 9 ความเข้มข้น (%ค่าความสัมพันธ์) ขนาดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขององค์ประกอบที่มีในสารสกัดมันเทศสีม่วงเปลือกแดง, บีทรูท, มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง

Table 9. Concentration and molecular weight of components found in the extracts of red-sweet potato, beetroot, potato and purple-sweet potato.

Extract	Mw average (Dalton)	Concentration (%relative)
Red-sweet potato	3917	36.46
	1723	63.54
Beetroot	4735	26.90
	1603	60.70
	464	12.41
Potato	3065	65.38
	1624	34.62
Purple-sweet potato	4324	37.62
	1511	62.38



ภาพที่ 30 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากมันเทศสีม่วงเปลือกแดง (I), บีทรูท (J), มันฝรั่ง (K) และ มันเทศสีม่วงเปลือกเหลืองที่ถูกย่อยด้วย 2 M TFA โดยใช้น้ำตาลกลูโคส (Gl) ฟรุคโตส (Fr) และซูโครส (Su)ในการเปรียบเทียบ

Figure 30. TLC Identification of sugar composition from red sweet potato (I), beetroot (J), potato (K) and purple sweet potato (L) were hydrolyzed with 2 M TFA used glucose (Gl), fructose (Fr) and sucrose (Su) as a reference sugar.