รหัสโครงการ SUT3-305-56-24-12

รายงานการวิจัย

ศักยภาพของประเภทของแป้งที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะ

(Potentiality of types of Resistant Starch for Stimulation of Probiotics Growth)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-56-24-12

รายงานการวิจัย

ศักยภาพของประเภทของแป้งที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะ

(Potentiality of types of Resistant Starch for Stimulation of Probiotics Growth)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้งบประมาณทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2556-2557 ทำให้ผลงานวิจัยโครงการนี้เกิดขึ้นได้ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยมันสำปะหลัง และศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับอาคาร สถานที่ และเครื่องมือในการวิจัย และงานวิจัยนี้คงไม่สำเร็จหากขาดผู้ช่วยวิจัยเหล่านี้ คือ นางสาวชาลินี ทนันชัย และนางสาววราภรณ์ ศรเดช จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ประเภทของแป้งต้านทาน (RS) อาจมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ และการเพิ่มปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นซึ่งสันนิษฐานว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค แป้ง RS แบ่งออกได้เป็น 5 ประเภท คือ สตาร์ชที่เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปได้ (RS1), เม็ดสตาร์ชต้านทานการย่อย (RS2), สตาร์ชที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (RS3), สตาร์ชดัดแปรทางเคมี (RS4) และการเกิดคอมเพล็กซ์ระหว่างอะมิโลส-ลิพิด (RS5) ซึ่งจัดเป็นพรีไบโอติกส์ที่สามารถใช้เสริมในอาหารสำหรับผู้บริโภค การศึกษาศักยภาพของแป้ง RS2, RS3 และ RS4 เปรียบเทียบกับพรีไบโอติกส์ทางการค้าคือ ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบเป็นปกติในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์จำนวน 4 สายพันธุ์ (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 450, *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 และ *Lactobacillus fermentum* TISTR 876) และแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์คัดได้แยกจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีในสกุล *Lactobacillus* และ *Streptococcus* จำนวน 2 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งต้านทานชนิดใดชนิดหนึ่งหรือ FOS ปริมาณร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์ทั้ง 4.สายพันธุ์ มีแนวโน้มความสามารถในการใช้แป้ง RS.ได้ค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคส.ส่วนแบคทีเรียจากอาสาสมัครซึ่งจำลองการย่อยสับสเตรททุกประเภทผ่านระบบทางเดินอาหารทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรทแต่ละประเภทมีการเจริญใกล้เคียงกันและมีค่าการเจริญสูงที่สุดถึง 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 20 ชั่วโมง และพบว่าแป้ง RS3 เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างกรดไขมันสายสั้น โดยพบกรดบิวทิริกปริมาณสูงที่สุด นอกจากนี้เมื่อทดลองโดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครพบว่าปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการบ่มคือร้อยละ 10 (ปริมาตร ปริมาณสับสเตรทที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือ 1% (w/v) และระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมที่สุดคือ 24 ชั่วโมง และพบว่าแป้ง RS3 เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างกรดไขมันสายสั้นโดยพบกรดอะซิติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 32.60 มิลลิโมลาร์ และพบว่า RS3 ให้ค่าพรีไบโอติกส์ อินเดกซ์สูงที่สุด คือ 4.82 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สับสเตรทชนิดอื่นๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแป้ง RS3 แสดงความเป็นพรีไบโอติกส์ที่ส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์

Abstract

The types of resistant starch (RS) may play an important role in the growth stimulation of probiotics bacteria and an increase in intestinal concentrations of lactic acid and short-chain fatty acids (SCFA) assumed to be a health benefit for the host. The RS is divided into five types: physically inaccessible starch (RS1), resistant granular starch (RS2), retrograded starch (RS3), chemically modified starch (RS4), and amylose-lipid complexes (RS5) considered as prebiotics that can be a supplement to the diet. The potential of RS2, RS3, and RS4 compared to fructo-oligosaccharides (FOS), a commercial prebiotic for growth stimulation of four species of lactic acid bacteria, normal flora on humans and animals obtained from microbial culture collection stock cultures, (*Lactobacillus acidophilus* TISTR 450, *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lactobacillus plantarum* TISTR 543, *Lactobacillus fermentum* TISTR 876) and the beneficial micro-flora isolated from fecal samples of healthy people in genera *Lactobacillus* and *Streptococcus* for 2 and 1 species, respectively, and were studied using a medium containing 1% of either RS or FOS, as carbon sources. The trend in RS consumption of the four bacterial species from stock cultures was lower when compared to glucose. For the three bacterial isolates collected from healthy people, all substrates were treated through the digestive model system. The growth of all isolates was similar and reached the maximum of 10^{10} CFU/mL at cultivation for 20 hours. RS3 was best served as the substrate for producing SCFA. The highest content of SCFA was butyric acid which was higher than propionic and acetic acids. Furthermore, the investigation of mixed culture from fecal samples suggested that the optimum inoculum was 10% (v/v), optimum carbon source was 1% (w/v) and optimum incubation time was 24 h. In addition, RS3 was the best served as the substrate for producing SCFA and the highest content of SCFA was acetic acid, 32.60 mM. RS3 also obtained the highest prebiotic index which was 4.82 compared to those of other substrates. RS3 reveals the promising beneficial effects of prebiotics on human health.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ช
สารบัญภาพ ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 3
บทที่ 2 วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แป้งต้านทาน 4
2.1.1 ประเภทของแป้ง RS 4
2.2 ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ 9
2.2.1 กระเพาะอาหาร 9
2.2.2 ลำไส้เล็ก 10
2.2.3 ลำไส้ใหญ่ 12
2.3 จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของคนปกติ 16
2.3.1 โพรไบโอติกส์ (Probiotics) 16
2.4 พรีไบโอติกส์ (Prebiotics) 20
2.4.1 ประเภทของพรีไบโอติกส์ 20
2.4.2 ประโยชน์ของพรีไบโอติกส์ 21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 26
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย 26
3.1.1 ครุภัณฑ์ 26
3.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์ 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ....27
3.2.1 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์จาก stock culture....27
3.2.2 การเตรียมเชื้อผสมจากอุจจาระของมนุษย์....28
3.3 การเตรียมตัวอย่างแป้งต้านทาน....28
3.4 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร....29
3.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรมาตรฐาน....29
3.4.2 การคัดเลือกหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ....29
3.5 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานทั้ง 3 ประเภท....30
3.5.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ และเชื้อผสม....30
3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง....31
3.6.1 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก....32
3.6.2 การเจริญของแบคทีเรีย (Bacterial growth)....35
3.6.3 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH)....35
3.6.4 ความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity)....35
3.6.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars)....36
3.6.6 วิเคราะห์ความสามารถในการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น....36
3.6.7 การวิเคราะห์ค่าพรีไบโอติกส์ อินเดกซ์ (Prebiotic index)....37
3.6.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ....37
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล....38
4.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์....39
4.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อที่คัดแยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร....40
4.2.1 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย....41
4.2.2 การทดลองเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์....46

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.3 การหาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ 50
4.2.4 การทดสอบศักยภาพของแป้ง RS ในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์แยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร แบบไม่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง 54
4.2.5 การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง 62
4.3 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร 68
4.3.1 การคัดเลือกปริมาณเชื้อที่เหมาะสม 68
4.3.2 การคัดเลือกความเข้มข้นของแป้งต้านทานที่เหมาะสม 69
4.3.3 การคัดเลือกหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม 72
4.3.4 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร 74
4.3.5 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ 77
4.3.6 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก 80

บทที่ 5 บทสรุป 86
บรรณานุกรม 88
ภาคผนวก 104
ประวัติผู้วิจัย 113

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 การย่อยเชิงกลในระบบทางเดินอาหาร 14

1.2 การศึกษาระบบการย่อยอาหารแบบจำลองในระดับ *in vitro* 15

1.3 จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักในตำแหน่งที่ต่างกันในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ 17

2.1 ปริมาณแป้งต้านทาน 29

3.1 การเจริญ ค่า pH และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน นาน 24 ชั่วโมง 39

3.2 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5)เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอ้างอิงในสกุล *Lactobacillus* และ *Streptococcus* 43

3.3 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5) ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux) 44

3.4 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 3 ไอโซเลท ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux) 46

3.5 ส่วนประกอบในอาหาร MRS ปรับสูตรให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ 46

3.6 ส่วนประกอบในอาหาร SF ปรับสูตรให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ 47

3.7 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 49

3.8 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 52

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

3.9 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 % เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 56

3.10 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 63

3.11 การเจริญ ค่า pH ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติมเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครปริมาณ 5-30% และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน 24 ชั่วโมง 69

3.12 การเจริญ, ค่า pH, ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติม FOS และ RS3 ปริมาณ 0.5-2.0% และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน 24 ชั่วโมง 71

3.13 การเจริญ ค่า pH ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติมแป้งต้านทานชนิดที่ 3 ปริมาณ1% และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20-48 ชั่วโมง 73

3.14 การเจริญ ค่า pH ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติมแป้งต้านทานปริมาณ 1% เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 75

3.15 ปริมาณกรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และกรดอินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆปริมาณ 1.0% หลังการเจริญของเชื้อผสมที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 77

3.16 ตัวติดตาม (Probe) ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย 4 สกุล เพื่อหาค่า Prebiotic index 77

3.17 ค่า Prebiotic index (PI) ที่คำนวณจากการเจริญของแบคทีเรียในภาพที่ 3.12 84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

3.18 ลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีของแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่คัดแยกและเลือกวิเคราะห์ชนิด 82

3.19 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 10 ไอโซเลท ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux) 83

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1.1 การบีบแบ่งเป็นส่วนของลำไส้เล็ก 11

3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัครบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSAgar (A), RCA Agar (B), SF Agar (C) และ ST Agar (D) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 41

3.2 ลักษณะโคโลนี (อายุ 48 ชั่วโมง) และสัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5) ที่คัดแยกและเลือกศึกษา 43

3.3 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% แทนน้ำตาลกลูโคส หลังการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 53

3.4 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส 58

3.5 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 59

3.6 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคสเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 60

3.7 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 65

3.8 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 66

3.9 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง 67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3.10 ปริมาณกรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และกรดอินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติม FOS หรือ RS3 ปริมาณ 0.5-2.0% แทนน้ำตาลกลูโคสหลังการเจริญของเชื้อผสมที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง....72

3.11 กรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติม RS3 ปริมาณ 1.0% แทนน้ำตาลกลูโคส หลังการเจริญของเชื้อผสมที่ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20-48 ชั่วโมง.... 74

3.12 การเจริญของแบคทีเรียที่นับจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเป็นตัวแทนของโพรไบโอติก (*Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp.) และแบคทีเรียก่อโรค (*Clostridium* sp. (histolyticum subgroup) และ *Bacteroids* sp.) ใน basal medium ที่เติมแหล่งคาร์บอนปริมาณ 1% เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 78

3.13 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่แยกและคัดเลือกในขั้นตอนทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร....80

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีการใช้อาหารเพื่อการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ที่จัดเป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) กันอย่างแพร่หลาย จุลินทรีย์ดังกล่าวได้แก่แบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Lactobacilli และ Bifidobacteria เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นของลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ มีการใช้อาหารที่มนุษย์เราบริโภคผ่านระบบทางเดินอาหาร ไปเป็นสารอาหาร (substrate) ในกระบวนการหมัก แล้วผลิตกรดแล็กติกเป็นผลผลิตหลัก และยังได้กรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids, SCFA) ซึ่งล้วนส่งผลให้มนุษย์เรามีสุขภาพร่างกายที่ดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995) จากผลลัพธ์ที่ตามมา จึงมีผู้สนใจศึกษาการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียและการทำงานของแบคทีเรียเหล่านี้ในลำไส้ใหญ่เป็นอย่างมาก โดยสารอาหารที่แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์จะสามารถใช้เป็นสับสเตรท ในการหมักได้นั้นต้องรอดผ่านจากการย่อยของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์ได้ ซึ่งส่วนประกอบของอาหารดังกล่าวเป็นที่รู้จักโดยทั่วไปว่า "พรีไบโอติก" (prebiotic) เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ทนต่อการย่อยและดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก มีการเลือกใช้เป็นสารอาหารสำหรับช่วยกระตุ้นการเจริญและการทำงานอย่างจำเพาะของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ โดยสารที่จัดว่าเป็นพรีไบโอติกได้แก่ non-starch polysaccharides (NSP), inulin, oligosaccharides และ resistant starch (Gibson and Roberfroid, 1995; Gibson, 2004)

แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS) เป็นแป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่ถูกดูดซึมและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติ และจะผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่และถูกใช้เป็นสับสเตรท ในการหมักโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ จึงจัดได้ว่าเป็นพรีไบโอติก(Asp, 1992; Englyst et al., 1992) ซึ่งแป้งต้านทานมีผลช่วยเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้นหลังจากการหมัก โดยหลัก ๆ ประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นเหล่านี้เป็นพลังงานสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์เยื่อบุในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตที่ลำไส้ใหญ่ และป้องกันการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติในลำไส้ใหญ่ (Topping and Clifton, 2001) จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง มีรายงานว่าการให้อาหารสัตว์ที่ผสมแป้ง RS พบว่า ปริมาณกรดไขมันสายสั้นในกระพุ้งลำไส้ใหญ่และในอุจจาระเพิ่มมากขึ้น (Ferguson et al., 2000; Henningson et al., 2003) และเช่นเดียวกันรายงานของ Beards, Tuohy และ Gibson, 2010 เมื่อทดลองแบบ *in vitro* fermentation โดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร จำนวน 3 ราย ได้รายงานว่าแป้ง RS, FOS และ inulin เป็นประเภท

ของสับสเตรทที่สามารถ กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ และสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดี สอดคล้องกับการทดลองใช้ FOS และแป้ง RS ผสมในอาหารสำหรับหนูทดลอง และวัดค่า pH ภายในลำไส้ของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสม FOS มีค่าความเป็นกรดในลำไส้มากกว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสมแป้ง RS และเมื่อวัดค่าอัตราการเจริญระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่า ในลำไส้ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกทั้งสองประเภทนี้ มีค่าอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria มากกว่าแบคทีเรียก่อโรค ทั้ง FOS และ RS ซึ่งมีค่าการเจริญแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไม่ต่างกันทางสถิติ (Rodriguez-Cabezas ME et al., 2010) จากการทดลองใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทให้กับสายพันธุ์ของเชื้อบริสุทธิ์ *Bifidobacterium* ที่มีการคัดเลือกแล้วว่าสามารถใช้แป้งเป็นซับสเตรทในการเจริญได้ พบว่าในตัวอย่างแป้ง RS มีค่าการเจริญของแบคทีเรียและค่าการผลิตกรดแล็กติกในปริมาณระหว่าง 12.7%-33.9% และกรดอะซิติกในปริมาณระหว่าง 66.0%-87.3% ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าในแป้งดิบ (native starch) ส่วนในเชื้อผสมจากลำไส้ของหนูทดลองที่ให้ได้รับอาหารตามปกติ และนำไส้หนูมาหมักกับแป้ง RS และ native starch พบว่าในตัวอย่างแป้งที่มี RS ให้ปริมาณกรดไขมันสายสั้นชนิดกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก โดยมีค่าเท่ากับ 45.9%, 6.9%, และ 4.8% ตามลำดับ (Wronkowska et al., 2006) และการทดลองในมนุษย์ส่วนใหญ่ก็พบว่าแป้ง RS สามารถเพิ่มการขับถ่ายอุจจาระ และเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นในอุจจาระได้ดี (Phillips et al.,1995; Silvester et al.,1995; Cumming et al.,1996; Birkerr et al., 2000; Muir et al., 2004) และยังมีรายงานถึงบทบาทในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดซึ่งส่งผลต่อการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด และโรคหัวใจได้ (De Deckere et al., 1993; Younes et al., 1995; Mathe′ et al., 1993; Kim et al., 2003) อีกทั้งยังมีรายงานผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งเหมาะสมต่อการบริโภคของผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ที่กำลังควบคุมน้ำหนัก (Nugent, 2005)

นอกจากนี้ยังพบว่าแป้ง RS ทำหน้าที่เป็นทั้ง prebiotic และ synbiotics โดยมีรายงานการใช้ร่วมกันกับ bifidobacteria ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (Crittenden et al., 2001) และจากการศึกษาของ Brown et al. (1998) และ Rodriguez-Cabezas ME et al. (2010) เมื่อใช้แป้ง RS ร่วมกับ FOS ในหนูทดลองพบว่าช่วยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอุจจาระได้ดีกว่าให้อย่างใดอย่างหนึ่งแยกกัน แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแป้ง RS แต่ละประเภทในการกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกสายพันธุ์บริสุทธิ์เมื่อใช้เดี่ยว ดังนั้นการศึกษาในหัวข้อของวิทยานิพนธ์นี้ต้องการทดสอบศักยภาพของแป้ง RS 3 ประเภท คือ แป้ง RS2 (resistant granular starch), RS3 (retrograded starch) และ RS4 (chemically modified starch) ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์สายพันธุ์บริสุทธิ์ในสกุล *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, และ*Enterococcus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ และมีรายงานว่า *Enterococcus*บางสายพันธุ์เช่น *Enterococcus faecium* No.78 สามารถใช้สตาร์ชได้ หลายประเภทได้แก่ สตาร์ชที่ละลายได้ สตาร์ชข้าวโพด สตาร์ชข้าวสาลี สตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ช

สาคูเป็นสับสเตรทในการเจริญแล้วมีการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ (Shibata et al., 2007) ดังนั้นสายพันธุ์เฉพาะของ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, และ *Enterococcus* ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์และมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก จึงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมายที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถใช้แป้ง RS ในการเจริญได้ ปัจจุบันมีการใช้แป้ง RS เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จภาพ โดยผู้บริโภคสามารถหาซื้อผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ทั่วไป นอกจากนี้แหล่งของแป้ง RS ที่สำคัญพบในพืชหลากหลายประเภทในธรรมชาติ อาทิเช่น ข้าวโพด มันฝรั่ง และโดยเฉพาะข้าวและมันสำปะหลังที่มีการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย ซึ่งสามารถสกัดเอาแป้งออกมาได้ง่าย มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถนำมาผ่านกระบวนการผลิตได้เป็นแป้ง RS3 และดัดแปรทางเคมีได้เป็นแป้ง RS4 โดยใช้ต้นทุนต่ำ ซึ่งนับว่าเป็นทางเลือกที่ดีหากสามารถบริโภคแป้ง RS เพื่อไปช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ให้ช่วยเพิ่มปริมาณของเชื้อเป้าหมายที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่แล้วในลำไส้ใหญ่ ทดแทนการบริโภคโพรไบโอติก โดยตรงได้ เนื่องจากโพรไบโอติกที่บริโภคเข้าไปมีเพียงส่วนน้อยที่จะเหลือรอดไปถึงลำไส้ใหญ่ และอาจถูกล้างหมดไปจากระบบทางเดินอาหารได้ (washed out) (Topping et al., 2003) การบริโภคอาหารเสริมโพรไบโอติกโดยตรงนั้นจึงจำเป็นต้องบริโภคทุกวันซึ่งเป็นการสิ้นเปลือง การบริโภคแป้ง RS จะสามารถเพิ่มผลผลิตสุดท้ายที่เราต้องการที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการหมักสับสเตรทของจุลินทรีย์ได้โดยทางอ้อมซึ่งส่งผลที่เป็นประโยชน์ช่วยส่งเสริมสุขภาพได้เป็นอย่างดี

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ของ probiotics ที่สามารถใช้ resistant starch ในการหมัก และสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดี

2.2 เพื่อศึกษาศักยภาพของแป้ง resistant starch 3 ประเภท คือ resistant starch type II, type III และ type IV ในการกระตุ้นการเจริญของ probiotics สายพันธุ์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่

บทที่ 2

วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Reviewed literature)

2.1 แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS)

แป้ง (starch) สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามอัตราและระยะเวลาในการย่อย ได้แก่ แป้งสตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (rapidly digestible starch, RDS) แป้งสตาร์ชที่สามารถ ถูกย่อยได้อย่างช้า ๆ (slowly digestible starch, SDS) และแป้งต้านทาน (Englyst, Kingman, and Hudson, 1992) ซึ่งโครงสร้างหลักของ RDS เป็นส่วนอสัณฐาน (amorphous) ดังนั้นจึงถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่าย การบริโภคอาหารประเภทแป้งที่มีสัดส่วนของ RDS ในปริมาณมากจึงส่งผลให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลินในกระแสเลือดสูง (Englyst, Englyst, Hudson, Cole, and Cummings, 1999) ขณะที่การบริโภคอาหารที่มีสัดส่วนของ SDS สูงจะส่งผลให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลินในกระแสเลือดปานกลาง (Zhang, Sofyan, and Harmaker, 2008) ซึ่งจะลดโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน หลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นต้น

แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS) คือ แป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่ถูกดูดซึมและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติและจะผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่และถูกเลือกใช้เป็นสารอาหาร ในการเจริญโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ (probiotic microorganisms) จึงจัดได้ว่าเป็น prebiotic (Englyst, Kingman, and Hudson, 1992) ซึ่ง resistant starch มีผลทำให้ได้ผลผลิตหลังจากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้นๆในปริมาณมาก โดยหลักๆประกอบด้วยกรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นเหล่านี้จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์เยื่อบุในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตที่ลำไส้ใหญ่ และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติในลำไส้ใหญ่ (Topping and Clifton, 2001; Leu, Hu, and Young, 2002; Topping, Fukushima, and Bird, 2003) นอกจากนี้กรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นยังช่วยให้เกิดสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่จัดเป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganism) ในลำไส้ใหญ่ โดยจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ลดอาการของโรคท้องร่วง (diarrhoea) กระตุ้นการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ส่งผลให้ host มีสุขภาพร่างกายที่ดีขึ้น (David and Peter, 2001)

2.1.1 ประเภทของแป้ง RS

แป้ง RS สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ประเภทได้แก่ (Eerlingen et al., 1995; Brouns et al., 2002; Haralampu, 2000; Raigond et al., 2014)

แป้ง RS1 (physically inaccessible starch) เป็นแป้ง RS ที่อยู่ภายในเมล็ดพืชโดยแป้งถูกตึงไว้ภายในเซลล์หุ้มเมล็ดพืช (fiber material) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาภายในเม็ดแป้งได้ ส่วนใหญ่พบในส่วนของเมล็ด (grains และ seeds) และถั่ว (legume)

แป้ง RS2 (resistant granular starch) เป็นแป้ง RS ที่อยู่ในภาพเม็ดแป้งดิบ (native granular starch) หรือ (high-amylose maize starch) พบใน แป้งมันฝรั่งดิบ (raw potato starch) และกล้วยดิบ (green bananas) เนื่องจากมีส่วนที่มีความเป็นผลึกสูง มีลักษณะทางโครงสร้างของเม็ดแป้งที่ไม่มีรูหรือช่องเปิด ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ ปัจจุบันแป้ง RS type II มีการส่งขายไปถั่วโลกโดยบริษัท National Starch and Chemical Co. และนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลาย ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ธัญพืช ขนมปัง และขนมอบกรอบ และผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น

แป้ง RS3 เป็นแป้งคืนตัว (retrograded starch) ที่ได้จากแป้งที่ผ่านการให้ความร้อนสูงในสภาวะน้ำมากจนเกิดการเจลาติไนซ์ แล้วทำให้เย็นตัวลง มีผลให้สายอะไมโลสที่หลุดออกเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ (recrystallization) ได้เป็นผลึกแป้งที่แข็งและทนทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์พบใน moisture-heat foods เช่น cornflakes

แป้ง RS4 (chemically modified starch) เป็นแป้ง RS ที่เกิดจากกระบวนการดัดแปรแป้งทางเคมี เช่น แป้งดัดแปรครอส-ลิงค์ (cross linking starch) และไฮดรอกซีโพรพิลสตาร์ช (hydroxypropyl starch) การทำเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) และอีเทอริพิเคชัน (etherification) ซึ่งจะทำให้เกิดหมู่แทนที่หรือพันธะเพิ่มขึ้นในโครงสร้างของแป้ง ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปย่อยได้

แป้ง RS5 เป็น resistant starch ที่เกิดจากสายอะไมโลส และลิพิดรวมตัวกัน (amylose-lipid complexes) การเกิดอะไมโลส-ลิพิด คอมเพล็กซ์นั้น จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการปรุงอาหาร และภายใต้สภาวะที่ควบคุมให้เกิดการรวมตัวกัน ซึ่งมักเกิดกับแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสสูง ซึ่งอะไมโลส-ลิพิด คอมเพล็กซ์ดังกล่าวจะทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์แอลฟ่า-อะไมเลส (α-amylase)

แป้ง RS สามารถใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารแทนการใช้เส้นใยอาหารจากแหล่งอื่น และใช้เพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร (fiber fortified) โดยปริมาณ RS ที่เติมลงในก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งที่ใช้ ชนิดของอาหาร และระดับความต้องการของเส้นใยอาหาร โดยใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำถึงปานกลาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ และผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จภาพ เนื่องจากมีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ (Yue and Waring, 1998) นอกจากนี้ยังอาจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ โดยใช้เป็นสารเพิ่มความข้นในอาหาร (thickener) ช่วยให้อุณหภูมิการเกิดเจลาติไนซ์สูงขึ้น และมีความต้านทานต่อแรงเฉือนมากขึ้น (Schmidl et al., 2000) จากคุณสมบัติดังกล่าวประกอบกับความนิยมของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพทำให้แนวโน้มการใช้แป้ง RS ในผลิตภัณฑ์อาหารเพิ่มขึ้น

จากคุณสมบัติของแป้ง RS ที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้ ดังนั้นจึงทำให้มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับเส้นใยอาหาร (dietary fiber) (Yue and Waring, 1998) การบริโภคแป้ง RS มีผลช่วยให้ระบบขับถ่ายทำงานดีขึ้น โดยไปเพิ่มมวลอุจจาระ และเพิ่มความถี่ในการขับถ่าย ลดอาการของโรคท้องผูก ทั้งยังมีบทบาทในการลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในเลือด ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมันจากการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าสามารถลดระดับความเข้มข้นของ

คอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือด (total cholesteral) และลดระดับความเข้มข้นของ triglyceride ในเลือดจึงสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด และโรคหัวใจได้ (De Deckere et al., 1993 ; Younes et al., 1995; Matheʹ et al., 1993; Han, Fukushima, Kato, Kojima, Ohba, and Shimada, 2003; Hashimoto, Ito, Han, Shimada, Sekikawa, and Topping, 2006; Mikulíková, Masár, and Kraic, 2008)

การเพิ่มปริมาณกรดไขมันสายสั้นจะถูกเหนี่ยวนำโดยการบริโภคแป้ง RS ซึ่งกรดไขมันสายสั้นจะมีผลช่วยลดความเป็นกรดด่างในลำไส้ ส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สัมพันธ์กันกับปริมาณการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ (Coming et al., 1996; Hetjnen et al., 1990; Jenkins et al., 1998; Muir et al., 2004; Birkett et al., 1996; Phillips et al., 1995) หลักการทำงานร่วมกันระหว่างแป้ง RS และโพรไบโอติกคือ แป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่ถูกดูดซึมและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก จะผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่ และถูกเลือกใช้เป็นสับสเตรทอย่างจำเพาะในการหมักโดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแล็กติก lactobacilli และ bifidobacteria แล้วได้ผลิตผลสุดท้ายออกมาเป็นกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid, SCFA) ประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดบิวทิริก (butyric acid) และมีการเกิดก๊าซ ไฮโดรเจน (H_2), คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และก๊าซมีเทน (CH_4) ร่วมด้วย จากนั้นก๊าซที่เกิดขึ้นจะถูกขับออกมาพร้อมกับลมหายใจหรือช่องว่างในทางเดินอาหาร (Nugent, 2005; Englyst et al.,1999; Brown, Wang, and Topping, (1999) แป้ง RS สามารถช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นในลำไส้ใหญ่ได้ดี ซึ่งจะสัมพันธ์กันกับการปรับตัวของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ภายในช่วงระยะเวลาที่มากพอ เพื่อที่จะใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมัก (Topping and Clifton, 2001) โดยกรดไขมันสายสั้นทั้งสามชนิดที่เกิดจะมีสัดส่วนต่างกันตามประเภทของแป้ง RS และสามารถถูกดูดซึมได้ภายในลำไส้ใหญ่ จากนั้นถูกส่งผ่านทางหลอดเลือดใหญ่ไปยังตับ และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นในร่างกายและเซลล์เยื่อบุสำหรับการเผาผลาญ (metabolism) โดยกรดไขมันสายสั้นจะเป็นแหล่งพลังงานเหนี่ยวนำให้เซลล์ลำไส้ใหญ่สมบูรณ์ และลดการเจริญของเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ การเสริมแป้ง RS เป็นส่วนประกอบในอาหารในปริมาณสูงจะช่วยลดระดับของ cholesterol และ triglyceride ในเลือดได้เนื่องจากช่วยเร่งให้มีอัตราการ ขับออกของ cholesterol และ bile acids สูง (Nugent, 2005; Wursch,1999) จากรายงานผลการทดลองดังได้กล่าวมา จะเห็นได้ว่าแป้ง RS มีคุณสมบัติที่เป็นผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์

Le Blay et al. (2003) ได้ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS2 และ FOS ในหนูทดลอง 18 ตัวโดยผสมในอาหารปริมาณ 9% เทียบกับการให้อาหารปกติเป็นระยะเวลานาน 14 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรีย และผลผลิตจากการหมักในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ลำไส้ใหญ่ส่วนปลายและอุจจาระ พบว่าทั้งแป้ง RS2 และ FOS ให้ผลทางพรีไบโอติกได้ดีกว่าตัวอย่างอาหารควบคุม โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีการเจริญในอาหารที่เติม FOS ในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนปลายและ

อุจจาระ ส่วนในอาหารที่เติมแป้ง RS2 แบคทีเรียกรดแล็กติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนต้นและกระพุ้งลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งแป้ง RS2 และ FOS ให้ผลที่ส่งเสริมกันซึ่งการใช้ร่วมกันจะช่วยส่งผลประโยชน์ต่อสุขภาพของลำไส้ใหญ่ได้เป็นอย่างดี Brown et al. (1997) ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS2 ในหมูเพศผู้ 12 ตัว โดยเปรียบเทียบระหว่างแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ (low-amylomaize starch) กับแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสสูง (high-amylomaize starch) ติดตามปริมาณอุจจาระและกรดไขมันสายสั้น โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริก และตรวจวัดปริมาณการเจริญของ bifidobacteria ต่อกรัมของอุจจาระ พบว่า high-amylomaize starch สามารถกระตุ้นการเจริญของ bifidobacteria ได้ดีทั้งยังมีการผลิตกรดไขในสายสั้นได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ low-amylomaize starch และให้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกันกับ FOS Silivi et al. (1999) ศึกษาผลของแป้ง RS3 ต่อการเจริญของเชื้อจากลำไส้หนูทดลอง พบว่าแป้ง RS3 15 กรัมต่อ 100 กรัมอาหาร มีผลช่วยให้ปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria เพิ่มขึ้นได้ $10\text{-}10^2$ CFUต่อมิลลิลิตร และยังมีมลต่อการลดจำนวนของ enterobacteria ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้แป้ง RS3 ยังมีผลส่งเสริมการผลิตกรดบิวทิริกในหนูทดลอง และช่วยลดปริมาณการผลิตแอมโมเนียและลดค่าพีเอชในกระพุ้งลำไส้ได้ การทดลองผลในคนของ Bouhnik et al. (2004) พบว่าการบริโภคแป้ง RS3 ปริมาณ 10 กรัมต่อวันจะช่วยส่งเสริมการสร้างผลผลิตผลจากแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้กลุ่ม bifidobacteria ได้ดี แต่ก็ไม่ยืนยันข้อสรุปด้านปริมาณที่ควรบริโภคในคน ต่อมา Roberfroid (2007) ได้ศึกษาปริมาณของ bifidobacteria ร่วมกันกับระยะเวลาในการสัมผัสกับพรีไบโอติกซึ่งสามารถช่วยอธิบายผลที่เกิดขึ้นได้ดีกว่าผลของปริมาณของพรีไบโอติกที่บริโภคเข้าไป

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองของ Kleessen et al. (1997) ซึ่งได้ใช้แป้ง RS2 และ RS3 ปริมาณ 10 % ผสมในอาหารให้หนูทดลองกินเป็นระยะเวลา 5 เดือน หลังจากนั้นฆ่าหนู แล้วเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์จากลำไส้ใหญ่ และอุจจาระมาวัดการเจริญ พบว่าหนูที่ได้รับอาหารที่เติมแป้ง RS ทั้ง 2 ประเภท มีการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม bifidobacteria เป็นส่วนใหญ่ และมีปริมาณมากกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างเห็นได้ชัด และหนูที่ได้รับแป้ง RS3 มีการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli, enterococci และ streptococci มากกว่าในหนูที่ได้รับแป้ง RS2 และตัวอย่างควบคุม เมื่อวัดปริมาณกรดไขมันสายสั้นโดยรวม พบว่ามีกรดไขมันสายสั้นโดยรวมในลำไส้ใหญ่มากกว่าในอุจจาระ โดยหลักๆจะพบกรดอะซิติก ซึ่งมีค่าอัตราส่วนอยู่ช่วงระหว่าง 64-69% และพบกรดโพรพิโอนิกในตัวอย่างที่เติมแป้ง RS3 มากกว่าแป้ง RS2 ส่วนกรดบิวทิริกพบในตัวอย่างที่เติมแป้ง RS2 มากกว่าแป้ง RS3 และเช่นเดียวกันในการศึกษาอื่น ๆ ก็พบว่าการให้อาหารที่มีส่วนผสมของแป้ง RS กับสัตว์ทดลองมีผลให้ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นในกระพุ้งลำไส้ใหญ่ และในอุจจาระเพิ่มมากขึ้น (Wang et al., 1999; Ferguson et al., 2000; Henningson et al., 2003) ผลการทดลองในคนของ Bouhnik et al. (2004) พบว่าการบริโภคแป้ง RS3 ปริมาณ 10 กรัมต่อวันจะช่วยส่งเสริมการสร้างผลผลิตผลจากแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้กลุ่ม bifidobacteria ได้ดี และจากผลการทดลองในคนส่วนใหญ่พบว่าการบริโภคอาหารที่มีส่วนผสมของแป้ง RS ในปริมาณสูง

สามารถเพิ่มการขับถ่าย และเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นในอุจจาระได้ดี (Phillips et al.,1995; Silvester et al.,1995; Cumming et al.,1996; Birkerr et al., 2000; Muir et al., 2004)

จากการทดลองของ Wronkowska et al. (2006) ได้ศึกษาผลของ wheat, potato และ pea starch ในภาพที่มีการดัดแปรเป็น resistant starch และภาพของ native starch ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ *Bifidobacterium* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *B. pseudolongum* K 19, *B. breve* KN14 และ *B. animalis* KS20a1 เมื่อวัดการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสับสเตรทปริมาณร้อยละ 1 พบว่า *Bifidobacterium* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในตัวอย่างที่มีแป้ง RS มากกว่าในตัวอย่าง native starch แต่ยังน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท เมื่อพิจารณากรดที่เกิดขึ้นพบว่ามีการผลิตเฉพาะกรดแล็กติกและกรดอะซิติก แต่เมื่อทดลองโดยใช้แป้ง RS ปริมาณ 0.2 g ในตัวอย่างเชื้อผสมที่ได้จากลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารมาตรฐานตามปกติ แล้ววัดปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้น พบว่ามีการผลิต acetate, propionate และ butyrate โดยมีปริมาณของ acetate มากกว่า propionate และ butyrate ตามลำดับ ทั้งนี้มีผลสัมพันธ์กันกับจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ประจำถิ่นที่เพิ่มขึ้นด้วย คล้ายกันกับผลการทดลองของ Dongowski et al. (2005) และ Jacobasch et al. (2006) ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS3 ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่เติมแป้ง RS3 มีการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม bifidobacteria และมีการผลิตกรดไขมันสายสั้นเพิ่มมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร และส่งผลต่อการลดลงของค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ และอุจจาระของหนูทดลอง Lesmes et al. (2008) ได้ศึกษาผลของแป้ง RS3 ด้วยการทดลองแบบ *in vitro* พบว่า โครงสร้างผลึกที่หนาแน่นของแป้ง RS3 มีอิทธิพลต่อความสามารถในการหมักของแบคทีเรียในลำไส้ และจำนวนของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลต่อปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นด้วย จากรายงานผลการทดลองของ Ferguson, Jones and Englyst, (2000) พบว่าแป้ง RS2 ที่ได้จากมันฝรั่งดิบ (raw potato starch) สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ butyrate ได้ดี สอดคล้องกับผลการทดลองทั้งในมนุษย์และในหนูทดลองพบว่าแป้ง RS สามารถเพิ่มปริมาณของกรดไขมันสายสั้นได้ดีโดยเฉพาะกรดบิวทิริกซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค ในหลายด้านรวมถึงการต้านมะเร็งลำไส้ (Asp, and Bjorck, 1992; Hague et al., 1995; Cummings et al., 1996; Champ, Langkilde and Brovns, 2003; Tharanathan, and Mahadevamma, 2003; Henningsson et al., 2003; Sajilata et al., 2006; Sengupta et al., 2006; Sharma, Yadav, and Ritika 2008)

Maathuis et al. (2008) ได้ศึกษาผลความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS (newly developed maize starch) แบบ *in vitro* พัฒนาผลิตภัณฑ์แป้งข้าวโพดแบบใหม่ ต่อกิจกรรมและการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ โดยใช้แป้ง RS ที่ได้จำลองการย่อยผ่านระบบลำไส้ (pre-digested) แล้วดึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและ น้ำตาลโมเลกุลคู่ (di-saccharides) ออกแล้วนำพอลิเมอร์ที่เหลือไปหมักกับจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ใหญ่ แบบจำลอง พบว่าแป้ง RS มีผลช่วยช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสกุล bifidobacteria และ lactobacilli ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันสายสั้นและพบว่ามีกรดแล็กติกในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักแป้ง RS ได้เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และช่วยลด

ผลผลิตที่เป็นพิษที่เกิดจากการหมักโปรตีนได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันผลประโยชน์ต่อสุขภาพของแป้ง RS

มีแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ไม่กี่สายพันธุ์ ที่สามารถใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในการเจริญได้ ดังแสดงในผลการทดลองของ (Crittenden et al., 2001) ซึ่งได้ทดลองใช้ *Bifidobacterium* 40 สายพันธ์ ร่วมกันกับแป้ง RS เป็น symbiotic ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต พบว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถใช้แป้ง RS ในการเจริญ ได้แก่ *Bifidobacterium lactis* Lafti B94 และสามารถมีชีวิตรอดผ่านสภาวะความเป็นกรดที่ระบบทางเดินอาหารได้ และยังอยู่รอดผ่านกระบวนการผลิตโยเกิร์ตและสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแป้ง RS ทำหน้าที่เป็นทั้ง prebiotic และ synbiotics โดยมีรายงานการใช้ร่วมกันกับ bifidobacteria ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เนื่องจากในการทดลองศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าแป้ง RS มีส่วนเกื้อหนุนทางกายภาพให้กับ bifidobacteria หลายสายพันธุ์ช่วยป้องกันการถูกทำลายระหว่างการเตรียมอาหาร การเก็บรักษา และระหว่างส่งผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนบน (Brown et al., 1999; Crittenden et al., 2001) สอดคล้องกับผลการศึกษาแบบ *in vitro* ของ Wang et al. (1999) พบว่าแป้ง RS ทำหน้าที่เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของ bifidobacteria อีกทั้งยังช่วยปกป้อง bifidobacteria ระหว่างระบบทางเดินอาหารส่วนบนไปยังลำไส้ใหญ่ และจากการศึกษาของ Brown et al. (1998) and Rodriguez-Cabezas ME et al. (2010) พบว่าแป้ง RS เมื่อใช้ร่วมกับ FOS ในสัตว์ทดลองช่วยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียในอุจจาระได้ดีกว่าให้อย่างใดอย่างหนึ่งแยกกัน

2.2 ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

2.2.1 กระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหารมีภาพร่างคล้ายอักษรตัวเจ (J-shaped) มีขนาดยาว 25 เซนติเมตร ขณะที่กระเพาะอาหารว่างจะมีปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร และสามารถขยายให้มีความจุได้ถึง 4 ลิตร ภายหลังอาหารมื้อใหญ่ (Pocock and Richards, 2009) ต่อมในกระเพาะอาหาร (Gastric glands) มี 3 ชนิด คือ ต่อม Cardiac glands มีหน้าที่ขับเมือก ต่อม Peptic glands ต่อมนี้ประกอบด้วย Chief cells (ทำหน้าที่หลั่ง pepsinogen), Parietal cells (ทำหน้าที่สร้างและหลั่งกรดกรดไฮโดรคลอลิก ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการเปลี่ยน pepsinogen ให้เป็น pepsin ที่ใช้ในการย่อยโปรตีนอีกด้วย รวมทั้งหลั่ง Intrinsic factors ซึ่งเป็นสารประเภท glycoprotein จะทำหน้าที่รวมกับ vitamin B12 แล้วทำให้ vitamin B12 ถูกดูดซึมได้ดีที่ Ileum บริเวณปลายลำไส้เล็ก), Mucous neck cells ทำหน้าที่หลั่งน้ำเมือกออกมาเคลือบกระเพาะอาหารเพื่อป้องกันการถูกย่อย และต่อม Pyloric glands มีหน้าที่ขับเมือก และ pepsinogen (Smith and Morton, 2010)

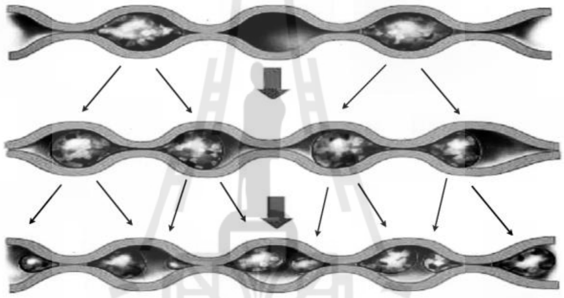
กระเพาะอาหารมีหน้าที่เป็นแหล่งเก็บอาหารชั่วคราวและช่วยย่อยอาหารเชิงกล ด้วยการกวนนวดอาหารให้ได้เป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ผสมกับน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร (gastric juice) หลั่งกรดไฮโดร

คลอริก เอนไซม์ และเมือก ในช่วงแรกที่มีอาหารเข้าสู่กระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารจะขยายใหญ่ขึ้น และความดันในกระเพาะอาหารจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อกระเพาะอาหารขยายขึ้นถึงระดับหนึ่ง จะเกิดกระบวนการรีเฟล็กซ์การคลายตัวเมื่อถูกยืด (stretch relaxation) หรือเรียกว่าเกิดเหตุการณ์ receptive relaxation หลังจากเกิดรีเฟล็กซ์นี้แล้ว เมื่อมีอาหารเข้ามาจะทำให้กระเพาะอาหารขยายตัวต่อไปอีก และความดันในกระเพาะอาหารจะไม่เพิ่มขึ้น หลังจากกินอาหารเสร็จแล้วประมาณ 15 นาทีกระเพาะอาหารจะเริ่มบีบแรงขึ้น โดยเริ่มบีบในบริเวณส่วนกลางถัดไปทางส่วนหลัง กระเพาะอาหารส่วนหลังจะมีแรงบีบเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ การบีบของกระเพาะอาหารส่วนหลังมีลักษณะคล้ายการบีบรูดเป็นคลื่นรูดไปทางปลายกระเพาะอาหารรวมทั้งบีบอาหารเหลวส่งไปลำไส้เล็กส่วนต้น แล้วกระเพาะอาหารช่วงท้ายจะบีบแรงขึ้นเป็นลำดับ เมื่อคลื่นบีบรูดเคลื่อนไปถึงตอนปลายสุดของกระเพาะอาหารจะทำให้หูรูด (pyloric sphincter) ที่ปลายกระเพาะอาหารเปิดออก ช่วงนี้จะมีอาหารบางส่วนผ่านหูรูดออกไปได้บ้าง แต่ อาหารที่เป็นชิ้นขนาดใหญ่ยังผ่านหูรูดปลายกระเพาะออกไปไม่ได้ และยังคงอยู่ในกระเพาะอาหาร เพื่อให้กระเพาะอาหารบดย่อยให้มีขนาดเล็กลงอีก การบีบของกระเพาะอาหารส่วนหลังจะเป็นไปอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจากเมื่ออาหารเข้ามา และอาหารจะถูกบดย่อยเล็กลงไปเป็นลำดับจนกระทั่งมีขนาดเล็กพอที่จะผ่านหูรูดปลายกระเพาะ ไปได้ จะเห็นว่าอาหารประเภทอาหารเป็นชิ้นจะเริ่มออกจากกระเพาะอาหารไปได้หลังกินอาหารผ่านไปแล้วเป็นเวลานานกว่าอาหารที่มีลักษณะเป็นอาหารเหลว ประมาณได้ว่าอาหารเป็นชิ้นเริ่มผ่านกระเพาะอาหารออกไปได้เมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 50 นาทีหลังกินอาหาร ในขณะที่อาหารเหลว เริ่มผ่านกระเพาะอาหารออกไปได้ ภายในเวลาประมาณ 10 นาทีหลังจากกินอาหาร สำหรับอาหารที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (fiber; เส้นใยในผัก, ผลไม้) ก็จะเคลื่อนผ่านหูรูดปลายกระเพาะออกไปได้ช้ากว่าอาหารเหลว ลักษณะทางกายภาพของอาหาร ได้แก่ ความแน่น (density) ความหนืด (viscosity) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้อาหารเคลื่อนออกจากกระเพาะอาหารไปได้ในเวลาต่างกัน (Pocock and Richards, 2009; Kent and Van de Graaff, 2000) อัตราเร็วที่กระเพาะอาหารบีบ เพื่อส่งอาหารไปเข้าลำไส้เล็กส่วนต้น นอกจากจะเป็นไปตามปัจจัยที่มีสิ่งกระตุ้นอยู่ในกระเพาะอาหารเอง ดังที่ได้อธิบายมาแล้ว ยังมีความสัมพันธ์กับการมีอาหารอยู่ในลำไส้เล็กส่วนต้นอีกด้วย เมื่อมีอาหารประเภทไขมันอยู่ในลำไส้เล็กส่วนต้น มีกรดของกระเพาะอาหารไหลลงมาที่ลำไส้เล็กส่วนต้น และมีกรดอะมิโน, มีเพปโทน (peptone) อยู่ในลำไส้เล็กส่วนต้น การบีบของกระเพาะอาหารและการบีบไล่อาหารของกระเพาะอาหารจะช้าลง ด้วยกระบวนการเรียกว่า "enterogastric reflex" (Pocock and Richards, 2009; Smith and Morton, 2010)

2.2.2 ลำไส้เล็ก

ลำไส้เล็กมีความยาว 4 เมตร และกว้าง 2.5 เซนติเมตร ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) อยู่ติดกับกระเพาะอาหาร มีความยาวเพียง 25 เซนติเมตร ถัดลงมาคือลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) มีความยาว 1.5 เมตร และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) มีความยาวมากที่สุดถึง 2.5 เมตร เมื่อมี

อาหารอยู่ในลำไส้เล็กจะเป็นสิ่งกระตุ้นตัวรับการยืดในลำไส้เล็ก แล้วจะเป็นการเริ่มต้นการบีบของลำไส้เล็ก 2 ลักษณะคือ การบีบแบ่งเป็นส่วน (segmentation) และการบีบรูด (peristalsis) (Pocock and Richards, 2009) การบีบแบ่งเป็นส่วนนี้ทำให้เห็นว่าลำไส้เล็กแบ่งออกเป็นปล้อง ลักษณะการบีบแบ่งเป็นส่วนคือ ลำไส้เล็กช่วงนี้มีบริเวณที่บีบรัดอยู่สลับกับบริเวณคลาย จึงเห็นลักษณะเป็นปล้อง (ภาพที่ 1.1) ลูกศรแสดงให้เห็นว่าอาหารในบริเวณนี้จะเคลื่อนไปอยู่บริเวณใดเมื่อบีบแบ่งเป็นส่วนในลำดับต่อไปความถี่ของการบีบแบ่งเป็นส่วนเกิดขึ้นในลำไส้เล็กส่วนต้นนาทีละประมาณ 11-12 ครั้ง สภาวะบ่มและเกิดขึ้นในลำไส้เล็กส่วนปลายนาทีละประมาณ 8-9 ครั้ง วิธีบีบของลำไส้เล็กลักษณะนี้เกิดจากกล้ามเนื้อวงแหวนของผนังลำไส้เล็กหดตัว-คลายตัวสลับที่กันไป การหดตัวครั้งหนึ่ง หดอยู่นาน 3-8 วินาที การบีบและคลายอย่างสลับที่ไปเช่นนี้ทำให้อาหารที่อยู่ในลำไส้เล็กส่วนนี้ถูกตัดแบ่งออกเป็นก้อนเล็กลงไป และทำให้ก้อนอาหารเคลื่อนไปมาเป็นช่วงสั้น ๆ ทำให้อาหารคลุกเคล้าเข้ากับน้ำย่อยได้ดี (Kent and Van de Graaff, 2000)



ภาพที่ 1.1 ภาพแสดงการบีบแบ่งเป็นส่วนของลำไส้เล็ก (Smith and Morton, 2010)

กระบวนการบีบรูด (peristalsis) มีระบบควบคุมที่ซับซ้อนกว่าการบีบแบ่งเป็นส่วน ลักษณะเป็นการเคลื่อนของอาหารลงไปตามลำไส้เล็ก ระบบการทำงานประกอบด้วย การกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบวงแหวนที่ลำไส้เล็กช่วงเหนือตำแหน่งที่มีอาหารอยู่หดตัว และให้กล้ามเนื้อเรียบตามยาวคลายตัว ในขณะเดียวกันจะควบคุมให้กล้ามเนื้อเรียบวงแหวนที่ลำไส้เล็กช่วงล่างอยู่ในสภาพคลายตัว และให้กล้ามเนื้อตามยาวช่วงนี้หดตัว เมื่อกล้ามเนื้อวงแหวนคลายตัวขณะที่กล้ามเนื้อตามยาวหดตัว ลำไส้เล็กจึงมีเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น และทำให้อาหารเคลื่อนลงมาอยู่ในลำไส้เล็กช่วงล่างได้ง่าย การบีบรูดจะเกิดเป็นคลื่นบีบรูดเคลื่อนไปตามลำไส้เล็กจากช่วงต้นไปช่วงปลายได้เป็นระยะทางสั้นๆ (Pocock and Richards, 2009; Smith and Morton, 2010) เมื่อภายในช่องลำไส้เล็กมีความดันเพิ่มขึ้น จะสามารถกระตุ้นให้ลำไส้เล็กบีบตัว ทั้งการบีบแบบแบ่งเป็นส่วน และแบบบีบรูด จึงสรุปว่าการบีบทั้งสองแบบนี้เป็นการทำงานตอบสนองของลำไส้เล็กเมื่อมีอาหารอยู่ในลำไส้เล็ก สอดคล้องกับการศึกษาการบีบของลำไส้เล็กของ Bayliss and Starling (1999) ได้เรียกการทำงานนี้ว่า " law of the intestine " รายงานว่าการบีบของลำไส้เล็ก อาศัยข่ายการประสานงานของระบบประสาทเอนเทอริกในลักษณะวงจรรีเฟล็กซ์ และการมีอาหารในลำไส้เล็กนั่นเองที่เป็นสิ่งกระตุ้นที่สำคัญ (Pocock and Richards, 2009)

2.2.3 ลำไส้ใหญ่

ลำไส้ใหญ่มีขนาดใหญ่กว่าลำไส้เล็ก มีความยาวเฉลี่ย 1.5 เมตร กว้าง 6.5 เซนติเมตร และมีสภาวะบ่มพื้นที่ผิวโดยประมาณเท่ากับ 1.3 ตารางเมตร ซึ่งจะอยู่ในตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ทางด้านขวา เหนือขึ้นไปด้านบนและโค้งไปทางด้านซ้ายในตำแหน่งที่ต่ำกว่าตับ ดิ่งลงมาที่ตำแหน่งเชิงกราน และสิ้นสุดที่ทวารหนัก ลำไส้ใหญ่มีน้ำหนักเปียกประมาณ 220 กรัม ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 90 กรัม จุอาหารได้ประมาณ 1-2 ลิตร ภายในประกอบด้วยกากอาหารเป็นส่วนของเหลวกึ่งแข็งที่ไม่ถูกย่อย (95 กรัมต่อวัน) ซึ่งตกมาถึงลำไส้ใหญ่ อุจจาระที่เป็นของแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการดูดของเหลวออกโดยปริมาตรสุดท้ายจะได้อุจจาระประมาณ 0.2 ลิตร ซึ่งจะถูกขับถ่ายออกสู่ภายนอกร่างกาย (Macfarlane and Cumming, 1991; Roberfroid, 2005b) และลำไส้ใหญ่ยังประกอบด้วยแบคทีเรียปริมาณมาก มีรายงานว่า เมื่อตรวจแบคทีเรียจากลำไส้ใหญ่ส่วนปลายและอุจจาระของมนุษย์วัยผู้ใหญ่ พบว่ามีเชื้อเด่นเพียง 4 divisions จาก 55 divisions ประกอบด้วย *Firmicutes* (64% ส่วนใหญ่เป็น clostridia class ในสกุล *Eubacterium, Faecalibacterium, Roseburia* และ *Lactobacillus*), *Bacteroidetes* (23% โดยหลัก ๆ เป็น *Bacteroides* sp. สายพันธุ์ *Bacteroides thetaiotaomicron*), proteobacteria (8% ประกอบด้วย *Enterbacteriaceae*) และ actinobacteria (3% ประกอบด้วย *Bifidobacterium* sp.) (Eckburg et al., 2005; Frank et al., 2007) ระยะเวลาของการส่งผ่านของเหลวจะช้าลงเฉลี่ยช่วง transit time ประมาณ 18-20 ชั่วโมง โดยที่การขนส่งสารอาหารในลำไส้จะช้าลงจากส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนต้นไปถึงไส้ตรง (Macfarlane and Cumming, 1991) อย่างไรก็ตามความคงตัวของการไหลของสารอาหารผ่านระบบของลำไส้จะส่งผลกดดันให้แบคทีเรียในลำไส้หนีจากการถูกล้างหมดจากลำไส้โดยการยึดเกาะบริเวณเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของเจ้าบ้าน หรือการเร่งการเจริญเพิ่มปริมาณเซลล์ที่สมดุลกับปริมาณที่จะถูกล้างหมดไปจากลำไส้ (Flint et al., 2007)

โดยคร่าว ๆ ลำไส้ใหญ่สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ซึ่งสัมพันธ์กับสารอาหารที่มี และกิจกรรมของแบคทีเรีย ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal or ascending colon) ถัดมาเป็นลำไส้ใหญ่ส่วนที่เกี่ยวกับการส่งผ่านสารอาหาร (transversal) และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal or descending colon) (Macfarlane and Cumming, 1991) ลำไส้ใหญ่ไม่ทำหน้าที่ในการย่อยอาหาร แต่ดูดซึมน้ำและอิเล็กโทรไลต์จากอาหารที่ผ่านเข้ามาจากลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่มีการบีบแบ่งเป็นส่วนและการบีบรูด เช่นเดียวกับลำไส้เล็ก ในเวลาที่ไม่ได้กินอาหารลำไส้ใหญ่มีการบีบรูดอยู่ในอัตราที่ช้ามาก การบีบรูดในช่วงเวลานี้จะทำให้อาหารเคลื่อนที่ไปได้ประมาณชั่วโมงละ 5 เซนติเมตร ช่วงหลังกินอาหารเสร็จใหม่ๆลำไส้ใหญ่จะบีบเร็วขึ้นและแรงขึ้น หลังกินอาหารแล้วประมาณ 15-30 นาที ลำไส้ใหญ่จะเริ่มบีบมากขึ้นและยังคงบีบติดต่อกันไปอีกนานกว่า 2 ชั่วโมง เหตุที่ลำไส้ใหญ่บีบได้แรงช่วงหลังกินอาหารเป็นเพราะการที่อาหารทำให้กระเพาะอาหารยืดออก ขณะเดียวกันใยประสาทที่เชื่อมโยงไปถึงระบบประสาทในลำไส้ใหญ่ จะกระตุ้นลำไส้ใหญ่บีบแรงขึ้นด้วย ต่อมาเมื่ออาหารมาอยู่ในลำไส้เล็กกระตุ้นให้ลำไส้เล็กบีบ จะกระตุ้นลำไส้

ใหญ่ด้วยเช่นกัน สองเหตุการณ์นี้ เป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่บีบแรงในช่วงเวลาหลังมื้ออาหาร (Pocock and Richards, 2009) การบีบแบ่งเป็นส่วนทำให้ลำไส้ใหญ่มีลักษณะเป็นปล้องคล้ายกระเปาะเล็กๆ เรียงกันไป เรียกว่า "haustra" จึงเรียกการบีบของลำไส้ใหญ่แบบนี้ว่า "haustration" การบีบลักษณะนี้ทำให้ก้อนอาหารแยกเป็นก้อนเล็ก ๆ ทำให้มีพื้นที่ผิวที่จะสัมผัสกับเยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่มากขึ้น มีผลทำให้เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ดูดซึมน้ำและอิเล็กโทรไลต์จากอาหารไปได้มากที่สุด (Kent and Van de Graaff, 2000)

กากอาหารที่ตกค้างและสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และอื่น ๆ ที่รอดพ้นการดูดซึมจากลำไส้เล็กจะมาถึงลำไส้ใหญ่ส่วนต้นและจะถูกใช้เป็นสารอาหารในการเจริญให้กับแบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้ใหญ่ ซึ่งปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูงจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญและการหมุนเวียนของแบคทีเรียและส่งผลในการลดลงของค่าพีเอชของลำไส้ประมาณ 5.4-5.9 หลังจากนั้นปริมาณคาร์โบไฮเดรตและความชื้นที่ค่อย ๆ หมดลงเรื่อย ๆ ไปจนถึงส่วนปลายของลำไส้ใหญ่จะส่งผลให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียลดลงสัมพันธ์กับค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นประมาณ 6.6-6.9 ในขณะที่การหมักของคาร์โบไฮเดรตหลัก ๆ จะเกิดขึ้นที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น และผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการหมักประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้นได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และแก๊ส ส่วนการย่อยสลายโปรตีนจะเกิดที่ส่วนปลายของลำไส้ใหญ่ และผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการหมักประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้นได้แก่ แอมโมเนีย เอมีน ฟีนอล และอินโดล (Macfarlane and Cumming, 1992; Roberfroid, 2005a) ทั้งนี้กลไกการย่อยอาหารเชิงกล และการเคลื่อนที่ของอาหารในแต่ละขั้นตอนภายในระบบทางเดินอาหารแต่ละส่วนจากปากกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ไปจนถึงส่วนของลำไส้ใหญ่ดังไว้ในตารางที่ 1.1

ในด้านของการจำลองระบบการย่อยอาหารแบบ *in vitro* มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ลักษณะสมบัติของตัวอย่าง กิจกรรมการทำงานของ enzyme ส่วนประกอบของไอออน ความกดดันของเชิงกล (mechanical stresses) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะการทดลองแบบ *in vitro* นั้นจะไม่ได้ถูกกระตุ้นอย่างสมบูรณ์ (Hur, Lim, Decker, and McClenents, 2011) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการทดลอง *in vitro* digestion models ในอาหารอย่างหลากหลาย (ตารางที่ 1.2) Boisen and Eggum (1991) อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทดลองการย่อยอาหารแบบจำลองในระดับ *in vitro* และการทำงานของเอนไซม์ ได้รายงานว่าเทคนิคการจำลองระบบการย่อยแบบ *in vitro* สามารถออกแบบให้ใช้เอนไซม์ที่จำเพาะของแต่ละสารอาหาร เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการย่อยสูงสุด (maximol digestibility) หรือเพื่อวัดอัตราเริ่มต้นของการสลายตัวของสารประกอบ (the initial rate of hydrolysis) โดยปัจจัยสำคัญที่สุดในการทดลองระบบการย่อยแบบ *in vitro* คือการทำงานของเอนไซม์ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ล้วนมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่า pH ความคงตัว (stability) ตัวกระตุ้น (activators) ตัวยับยั้ง (inhibitors) และเวลาที่ใช้ในการบ่ม

ตารางที่ 1.1 การย่อยเชิงกลในระบบทางเดินอาหาร (Kent and Van de Graaff, 2000)

Region	**Type of Motility**	**Frequency**	**Stimulus**	**Result**
Oral cavity	Mastication	Variable	Initiated voluntarily proceeds reflexively	Subdivision, mixing with saliva
Oral cavity and pharynx	Deglutition	Maximum of 20 per min	Initiated voluntarily, reflexively controlled by swallowing center	Clears oral cavity of food
Esophagus	Peristalsis	Depends on frequency of swallowing	Initiated by swallowing	Movemet through the esophagus
Stomach	Receptive relaxation Tonic contraction Peristalsis Hunger contractions	Matches frequency of swallowing 15-20 per min 1-2 per min 3 per min	Unknown Autonomic plexuses Autonomic plexuses Low blood sugar level	Permits filling of stomach Mixing and churning Evacuation of stomach Feeding
Small intestine	Peristalsis Rhythmic segmentation Pendular movements	15-18 per min 12-16 per min variable	Autonomic plexuses Autonomic plexuses Autonomic plexuses	Transfer through intestine Mixing Mixing
Large intestine	Peristalsis Mass movements Haustral churning Defecation	3-12 per min 2-3 per day 3-12 per min Variable: 1 per day to 3 per week	Autonomic plexuses Stretch Autonomic plexuses Reflex triggered by rectal distension	Transport Fills sigmoid colon Mixing Defecation

ตารางที่ 1.2 การศึกษาระบบการย่อยอาหารแบบจำลองในระดับ *in vitro* (Hur et al., 2011)

Samples	Measurement parameters	Enzymes or chemicals	Digestion times	Literature references
Determination of oxalates in Japanese Taro corns	Dry matter, gastric and intestinal soluble oxalate, total oxalate	α-amylase, mucin BSA, pepsin pancreatin, , bile	5 min 2h 2h	Savage and catherwood (2007)
Bioaccessibility of wheatgrass	Bioaccessible concentrations of wheatgrass	Pepsin Pancreatin, bile	3h 4h	Kulkarni, Acharya, Rajurkar, and Reddy (2007)
Phenolic Compounds in fruits	Antioxidant activity, total polyphenol, profile of polyphenols	Pepsin pancreatin	2h 4h	Tarko, Duda-Chodak, Sroka, Satora, (2009)
Starch hydrolysates with various degrees of branching	Influence of chemical structure of starch hydrolysates on growth of probiotic microflora	Pepsin pancreatin bile salt fecal flora	4h 2h 18h	Słominska et al. (2010)
Release of phenolic compounds from chokeberry juice	Change in their antioxidant activity	Pepsin pancreatin bile salt	2h 2h	Goderska et al. (2008)
In vitro digestion of beef with various fibres	Confocal microscopy, free fatty acid contents fatty acid composition cholesterol contents	a-amylase mucin BSA pepsin mucin pancreatin bile	5 min 2h 2h	Hur, Lim, Decker, and McClements (2009)
Bioaccessibility of heterocyclic amines	Release of heterocyclic amines	Amylase pepsin pancreatin	10 min 30 min 3.5 h	Kulp, Fortson, Knize, and Felton (2003)

สารอาหารอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เปปซิน (pepsin) การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) หรือการย่อยไขมันด้วยเอนไซม์ไลเปส (lipases) เป็นต้น และในทางเดียวกันได้มีรายงานว่าการใช้เอนไซม์เพียง 1 ชนิด (single puvifiled enzyme) ให้ผลดีกว่าการใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน เพราะจะทำให้ง่ายต่อการทำ standardization ของการจำลองการย่อยแบบ *in vitro* ด้วยความคงตัวเปรียบเทียบกันระหว่างห้องปฏิบัติการ (Coles, Moughan, and Darragh, 2005) แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสารอาหาร 1 ชนิด มักจะได้รับอิทธิพลโดยการย่อยของสารอาหารชนิดอื่น ดังนั้นในการจำลองระบบการย่อยส่วนใหญ่จึงเป็นไปได้ที่จะใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันมากกว่าการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว (Boisen and Eggum, 1991; Hur et al., 2011)

2.3 จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของคนปกติ

ในระบบทางเดินอาหารของคนมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora หรือ normal microbiota) แตกต่างกันหลากหลายสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 1.3 ทั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อก่อโรค ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ดังกล่าวคือจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นสารเสริมชีวนะ (Probiotics) ของคน

2.3.1 โพรไบโอติก (Probiotic)

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตสามารถอยู่รอดผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนบน โดยจะทนต่อสภาพกรดในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้ และอยู่ในน้ำดีได้ สามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ได้ดี เจริญเพิ่มปริมาณและมีกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolizing) ในลำไส้ใหญ่ ไม่ก่อให้เกิดโรค และยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพของ host (Fuller, 1992) เมื่อได้รับในปริมาณพอเพียง ช่วยให้มีสุขภาพที่ดีขึ้น ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์โดยเฉพาะลำไส้ใหญ่จะมีทั้งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และจุลินทรีย์ก่อโรคอยู่ร่วมกัน เมื่อบริโภค probiotics จะไปปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยจะช่วยเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อโรค จึงมีผลในการช่วยป้องกันหรือลดความรุนแรงของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ลดการเกิดโรคท้องร่วง และลดอาการของโรคลำไส้อักเสบ นอกจากนี้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่เป็นประโยชน์ของ probiotics ในหลายหลายด้าน ประกอบด้วย ประโยชน์ทางด้านโภชนาการ การช่วยสังเคราะห์วิตามิน และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย การช่วยผลิตเอนไซม์ที่สำคัญต่อการย่อย เช่น β-galactosidase เป็นผลดีสำหรับผู้ที่ขาดเอนไซม์ช่วยย่อยแลคโตส (lactose) ในนมและผลิตภัณฑ์นม ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สามารถทำงานได้ดี ช่วยลดอาการท้องผูกโดยเร่งการบีบตัวของลำไส้ ช่วยให้เซลล์เยื่อบุลำไส้สมบูรณ์ลดความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ อีกทั้งยังช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ด้วย (Gibson and Roberfroid, 1995) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกยังได้แก่แบคทีเรียอีกหลายชนิด ยีสต์ และรา (Fuller, 1992) กลุ่มแบคทีเรียทีเป็นโพรไบโอติก *Bacillus* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้

ได้แก่ *Baci. coagulan, Baci. subtilis, Baci. licheniformis, Baci. toysi* และ *Baci. stearothermophilus), Bacteroides* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Bact. amylophilus, Bact. capillosus, Bact. ruminocola* และ *Bact.* suis), *Bifidobacterium* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Bifi. thermophilum, Bifi. adolescentis, Bifi. animalis, Bifi. bifidum, Bifi. infantis* และ *Bifi. longum)*

ตารางที่ 1.3 จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักในตำแหน่งที่ต่างกันในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Salminen and Wright, 1993)

ระบบทางเดินอาหาร	**จุลินทรีย์**	**จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อกรัมอุจจาระ**
กระเพาะอาหาร	*Streptococcus* *Lactobacillus*	10^{1} - 10^{2}
ลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนกลาง	*Streptococcus* *Lactobacillus*	10^{2} – 10^{4}
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	*Bateroides* *Clostridium* *Enterococcus* *Streptococcus* *Lactobacillus*	10^{6} – 10^{8}
ลำไส้ใหญ่	*Bateroides* *Eubacterium* *Bifidobacterium* *Streptococcus* *Lactobacillus*	10^{11} – 10^{12}

Lactobacillus sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Lact. Acidophilus, Lact. bifidus, Lact. brevis, Lact. bulgaricus, Lact. casei, Lact. rerterii, Lact. cellobiosus, Lact. colinoides, Lact. corvatus, Lact. delbruekii, Lact. fermentum, Lact. lactis, Lact. plantarum, Lact. ruminis* และ *Lact. vitulinus)*, *Leuconostoc* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Leu. cremoris, Leu. dextranicum, Leu. lactis* และ *Leu. mesenteroides), Pediococcus* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Pedi. acidophilus, Pedi. halophilus, Pedi. pentosaecus, Pedi. cerevisiae* และ *Pedi. acidilactici), Propionibacterium* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Prop. fredenreichii และ *Prop. shermaii), Streptococcus* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Strep. cremoris, Strep. diacetylactis, Strep. faecium, Strep. intermedius, Strep. lactis* และ *Strep. thermophillus)*, *Clostridium* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Clostridium butyridium*) และ *Enterococcus* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus faecalis*) ส่วนกลุ่มยีสต์ที่เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pentoiepessi* และนอกจากนี้ยังมีกลุ่มราที่เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus niger*

โดยธรรมชาติโพรไบโอติกไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้อย่างถาวร โดยโพรไบโอติกจะมีสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพได้ดีก็ต่อเมื่อผ่านระบบย่อยอาหารเข้าไปอยู่ในลำไส้ได้ ซึ่งมีโพรไบโอติกบางชนิดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ (normal colonic microflora) งานวิจัยส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับโพรไบโอติกจะเกี่ยวข้องกับการสังเกตผลมากกว่าการอธิบายกระบวนการ ดังนั้นกระบวนการทำงานของโพรไบโอติกจึงไม่ค่อยได้มีคำอธิบายมากนัก (Fuller, 1992) โพรไบโอติกที่วางจำหน่ายในท้องตลาดนั้นโดยมากได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* รวมกันอยู่ แม้ว่าจะมีการใช้ยีสต์พวก *Saccharomyces* อยู่บ้างก็ตาม จุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสเป็นส่วนที่น่าสนใจมากที่สุด เพราะเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประเภทคาร์โบไฮเดรต และมีความสัมพันธ์กับระบบเมตาบอลิซึมของเจ้าบ้าน (host) โดยตรง แลคโตบาซิลลัสบางสายพันธุ์สามารถสร้างและปลดปล่อยวิตามินที่ละลายน้ำได้ออกมา แต่จะมีชนิดของวิตามินที่สร้างแตกต่างกันไปตามสปีชีส์หรือสายพันธ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะพบได้ในลำไส้ของเด็กทารก ที่กินนมแม่อย่างชัดเจน พบสูงสุดถึงประมาณ 95% ที่พบในลำไส้และช่วยป้องกันการติดเชื้อของเด็กทารกได้ และมีจำนวนลดลงเมื่อทารกเติบโตมากขึ้น (Fuller, 1992) อย่างไรก็ตามไม่ใช่ทั้งหมดของ*Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์ ที่จะมีประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ได้ มีการทดลองใช้อาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง 23 คน รับประทานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มี *Lactobacillus acidophilus* และ *Lact. bulgaricus* แล้วลองให้ได้รับเชื้อ *E. coli* ชนิดที่สร้างเอ็นเทอโรท็อกซิน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งในอัตราการเกิดโรค ระยะฟักตัวและระยะเวลาในการเกิดโรค เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก ยีสต์ *Saccharomyces boularddii* ที่นำมาใช้ในการทดลองเกี่ยวกับการป้องกันและรักษาโรคท้องร่วงที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ใช้ผู้ป่วยจำนวนทั้งหมด 180 คน ในการทดลองเป็นกลุ่มควบคุม 20 คน พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับโพรไบโอติกปริมาณร้อยละ 9.5 มีอาการท้องเสีย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอาการร้อยละ 22 ผู้เขียนสรุปว่าการใช้โพรไบโอติกช่วยลดการเกิดอาการท้องร่วงที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ถึงแม้ว่ายีสต์ *Saccharomyces boulardii* จะไม่สามารถป้องกันเชื้อก่อโรคได้ก็ตาม (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, and Bressollier, 2013; Axelsson, 2004)

โพรไบโอติกสามารถสร้างกรดแล็กติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ใน

สภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (Kontula et al., 1998) สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแล็กติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway et al., 1987) และพบว่า *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตได้ที่ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Saad et al., 2013) จากรายงานของ Shirota (1962) กล่าวว่า *Lactobacillus* ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูงได้แก่ *Lact. bulgaricus, Lact. fermenti, Lact. casei, Lact. acidophilus* และ *L. casei shirota* สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* ซึ่งอยู่ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี และมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *Lactobacillus acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ด้วย (Brennan et al., 1993) เมื่อโพรไบโอติกเจริญร่วมกับจุลิทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน สามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อก่อโรคจะเข้ายึดเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ และการเข้ายึดเกาะที่ผนังทางเดินอาหารของโพรไบโอติกนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1992)

นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) เบต้า-กาแล็กโตซิเดส (β-galactosidase) อะไมเลส (amylase) โพรติเอส (protease) เลคเตส (lactase) และเซลลูเลส (cellulase) มีผลทำให้การย่อยและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆดีขึ้น สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกบลูลิน (gamma globulin) แกมมาอินเตอเฟียรอน (gamma interferon) และส่งเสริมกิจกรรมของแมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kaila (1992) ได้นำ *Lactobacillus* sp. (GG) จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่าทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นถึงร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. (GG) ซึ่งพบการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46 อีกทั้งยังช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง วิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ กรดไขมัน และกรดอะมิโน (Fuller, 1989) ลดระดับของโคเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Buke and Gilland (1990) โดยได้ใช้เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ควบคุมระดับโคเลสเตอรอลได้ เนื่องจากจะช่วยดูดซึมโคเลสเตอรอลในลำไส้ได้โดยแยกเชื้อ *Lact. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัคร 9 ราย พบว่า *Lact. acidophilus* D16 จะดูดซึมโคเลสเตอรอลได้มากที่สุดคือ 50.9μgต่อมิลลิลิตร และ *Lact. acidophilus* D5 จะดูดซึมได้น้อยที่สุดคือ 28μgต่อมิลลิลิตร และโพรไบโอติกสามารถสร้างกรดได้จากการหมักสารอาหาร ช่วยปรับสภาพในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์พวกก่อโรคเช่นบางสายพันธุ์ในกลุ่ม *Coliforms* เจริญได้ยาก มีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค มีความคงทนต่อสภาพแห้งแล้งได้นาน สามารถนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์ได้ ทนต่อ

ยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งมักพบหรือใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในการดื้อยา (Fuller, 1989)

จำนวนแบคทีเรียที่พบในแต่ละบริเวณของระบบทางเดินอาหาร แสดงในตารางที่ 1.3 โดยปกติในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีจุลิทรีย์ไม่มากเช่น *Streptococcus, Lactobacillus* และ ยีสต์ มีจำนวน 10–10^4CFUต่อมิลลิลิตร แต่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) จะมีจุลินทรีย์จำนวน 10^6–10^8 CFUต่อมิลลิลิตร โดยเป็นแบคทีเรียกในสกุล *Enterococcus, Bateroides, Clostridium, Streptococcus, และ Lactobacillus* จำนวนแบคทีเรียในลำไส้จะเพิ่มมากขึ้นเป็น 10^{11}–10^{12}CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อใกล้กับลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (sigmoid colon) (Salminen and Wright, 1993) จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบลำไส้มีความสำคัญต่อสุขภาพ การเจริญและระบบเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่จะขึ้นอยู่กับสารอาหารที่ได้รับ ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากอาหารที่เรารับประทานเข้าไป จึงมีความพยายามที่จะปรับเปลี่ยนโครงสร้างและกิจกรรม เมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่โดยใช้โพรไบโอติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหาร เป็นที่ทราบกันดีว่ามีการนำจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก กลุ่มแลคโตบาซิลลัสและไบฟิโดแบคทีเรียมมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ในหารผลิตโยเกิร์ตและผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่นๆ จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ไม่เป็นพิษ มีชีวิตอยู่เป็นเวลานาน และสามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กไปสู่ลำไส้ใหญ่ได้ดี (Fuller, 1992)

2.4 พรีไบโอติก (Prebiotic)

พรีไบโอติกเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก มีการเลือกใช้เป็นสารอาหาร (substrate) สำหรับช่วยกระตุ้นการเจริญและการทำงานอย่างจำเพาะของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ และหลังจากมีการใช้พรีไบโอติกโดยจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแล้ว ได้กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นเป็นผลผลิตสุดท้ายที่ล้วนส่งผลให้เจ้าบ้าน (host) มีสุขภาพที่ดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995; Gibson, 2004)

2.4.1 ประเภทของพรีไบโอติก

สารที่จัดว่าเป็นพรีไบโอติกได้แก่ non-starch polysaccharides (NSP), Inulin, resistant starch และ oligosaccharides โดยเฉพาะ fructo-oligosaccharide (FOS) ที่ส่วนมากมักถูกเลือกใช้เป็น substrate เพื่อกระตุ้นการเจริญของ probiotics กลุ่ม bifidobacteria ได้ดี (Gibson and Roberfroid, 1995) จากการทดลองแบบ *in vitro* ของ Ghoddusi et al. (2007) ซึ่งได้ศึกษาผลของ prebiotic 4 ประเภท ได้แก่ inulin (IN), fructo-oligosaccharide (FOS), polydextrose (POL) และ isomalto-oligosaccharides (ISO) โดยวัดผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างอุจจาระของอาสาสมัคร จำนวน 3 ราย พบว่าในตัวอย่างที่ใช้ FOS, IN และ FOS + IN มีผลกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม bifidobacteria, lactobacilli และ enterococci ได้ดี Pompei et al. (2008) ได้ทดลองศึกษาผลของ oligofructose (OF) และ inulin ต่อการ

เจริญของ แบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัคร 7 ราย เมื่อตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ พบว่าพรีไบโอติกทั้ง 2 ประเภท สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ในสกุล bifidobacteira และ lactobacilli ได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และ OF มีปริมาณแอมโมเนียน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นพบว่ามีกรดอะซิติกและกรดแล็กติกเป็นผลผลิตหลักจากการหมัก OF ซึ่งสัมพันธ์กันกับค่าพีเอชที่ลดลง และมีปริมาณกรดไขมันสายสั้นมากกว่าเมื่อเทียบกับ inulin อีกทั้ง FOS และ IN เป็นพรีไบโอติกทางการค้าที่สามารถจัดหาได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้เป็นพรีไบโอติกสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพอย่างแพร่หลาย (Rodriguez-Cabezas ME et al., 2010; Beards, Tuohy and Gibson, 2010)

2.4.2 ประโยชน์ของพรีไบโอติก (Health benefits of prebiotic)

ผลประโยชน์หลัก ๆ ของพรีไบโอติกคือ การส่งเสริมหน้าที่การทำงาน และเมตาบอลิซึมของลำไส้ใหญ่ให้เกิดผลดีที่สุด ได้แก่ การเพิ่มการแสดงออก หรือเปลี่ยนองค์ประกอบของกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid, SCFA), และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในลำไส้ใหญ่, เพิ่มปริมาณอุจจาระ, ลดปริมาณผลิตผลสุดท้ายของไนโตรเจน และ reductive enzymes ช่วยเพิ่มการแสดงออกของการจับกับโปรตีน หรือเป็นดัชนีบ่งชี้ในด้านเมตาบอลิซึมของไขมันและแร่ธาตุ และช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน (immune system modulation) (Bournet, Brouns, Tashiro, and Duvillier, 2002; Forchielli and Walker, 2005; Qiang, Yanglie, and Qianbing, 2009) มีรายงานว่า

การให้อาหารสัตว์ที่ผสมแป้ง RS พบว่า ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นในกระพุ้งลำไส้ใหญ่และในอุจจาระเพิ่มมากขึ้น (Ferguson et al., 2000; Henningson et al., 2003) และเช่นเดียวกันรายงานของ Beards, Tuohy และ Gibson (2010) เมื่อทดลองแบบ *in vitro* fermentation โดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร จำนวน 3 ราย ได้รายงานว่า FOS และ inulin เป็นประเภทของสับสเตรทที่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ และสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดี จากการทดลองใช้ FOS และแป้ง RS ผสมในอาหารสำหรับหนูทดลอง และวัดค่าพีเอชภายในลำไส้ของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสม FOS มีค่าความเป็นกรดในลำไส้มากกว่า หนูทดลองที่ได้รับอาหารผสมแป้ง RS และเมื่อวัดค่าอัตราการเจริญระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่าในลำไส้ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกทั้งสองประเภทนี้ มีอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria มากกว่าแบคทีเรียก่อโรค ทั้ง FOS และ แป้ง RS ซึ่งมีค่าการเจริญแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Rodriguez-Cabezas ME et al., 2010) จากการทดลองใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทให้กับสายพันธุ์ของเชื้อบริสุทธิ์ *Bifidobacterium* ที่มีการคัดเลือกแล้วว่าสามารถใช้แป้งเป็นซับสเตรทในการเจริญได้ พบว่าในตัวอย่างแป้ง RS มีค่าการเจริญของแบคทีเรียและค่าการผลิตกรดแล็กติกในปริมาณระหว่าง 12.7%-33.9% และพบกรดอะซิติกในปริมาณระหว่าง 66.0%-

87.3% ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าในแป้งดิบ (native starch) ส่วนในเชื้อผสมจากลำไส้ของหนูทดลองที่ให้ได้รับอาหารตามปกติ และนำไส้หนูมาหมักกับซับสเตรทคือ แป้ง RS และ native starch พบว่าในตัวอย่างแป้ง RS ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่วิเคราะห์ได้มีกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก โดยมีค่าเท่ากับ 45.9%, 6.9% และ 4.8% ตามลำดับ (Wronkowska et al., 2006) ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนมีผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่มีผลต่อชีวเคมีและจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (histology) ในลำไส้ของ host เหล่านี้มีผลช่วยส่งเสริมเหตุผลของการใช้ พรีไบโอติกเพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ซึ่งอยู่ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของคนปกติ เพื่อส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพในด้านต่าง ๆ

ผลต่อการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ (intestinal flora) จากการศึกษาทดลองแบบ *in vitro* ในหนูทดลอง ของ Asahara, Nomoto, Shimizu, Watanuki, and Tanaka (2001) และการทดลองในลูกหมูของ Bomba et al. (2002) หรือ การทดลองในคนของ Langlands, Hopkins, Coleman, and Cummings (2004); Cumming and Macfarlane (2002) พบว่าพรีไบโอติกเช่น Fructo-oligosacchalides (FOS), Trans-galacto-oigosaccharides (TGOS), Inulin เมื่อใช้เป็น synbiotics ร่วมกันกับจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) สายพันธุ์ *Lact. plantarum, Lact. paracasei*, หรือ *Bifidobacterium bifidum* จะมีผลช่วยเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กลุ่ม bifidobacteria และ lactobacilli ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายสายพันธุ์ (*Clostridium* sp., *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* หรือ *Salmonella typhimurium*) ทั้งในลำไส้ของคนและสัตว์ทดลอง

ผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีรายงานว่าอาหาร functional foods มีผลช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับผู้บริโภคได้ จริงๆแล้วส่วนประกอบในโภชนาการและผลิตผลของกระบวนการหมักมักมีความเชื่อมโยงกันกับเนื้อเยื่อของระบบน้ำเหลืองในลำไส้ (GALT) ซึ่งเป็นส่วนที่มีมากที่สุดในระบบภูมิคุ้มกันของลำไส้เล็ก อาหารที่มีอยู่ในลำไส้ อาจมีความจำเป็นสำหรับการแสดงบทบาทที่เหมาะสม และการพัฒนาการของระบบบน้ำเหลืองในลำไส้ (Scheppach, Bartram, Richter, Richter, et al., 1992) อย่างไรก็ตาม กลไกอื่นๆในระบบภูมิคุ้มกัน สันนิษฐานว่าการตอบสนองต่อการต้านทานการรุกรานแต่ดั้งเดิมสามารถถูกกระตุ้นผ่านการทำปฏิกิริยา ของน้ำตาลกับตัวรับการกระตุ้นบน plasma membrane ของเซลล์ในส่วนของ macrophages จากผลการทดลองพบว่า inulin และ FOS ถูกจัดให้เป็นตัวส่งเสริมหลายปัจจัยของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาว (lymphocyte proliferation) การควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของลำไส้ IgA การเพิ่มจำนวนของ polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) ซึ่งมีการแสดงออกทั้งในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ และการพัฒนาการของระบบบน้ำเหลืองในลำไส้ (Hoentjen et al., 2005; Nakamura et at., 2004, and Pierre et al., 1997) ในการทดลองของ Buddington and Donahao (2002) โดยให้หนูทดลองกินอาหารที่ผสม FOS และ inulin ในปริมาณ 100gต่อkg เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีความผิดปกติของต่อมในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายลดลงหลังจากได้รับการสัมผัสกับสารกระตุ้นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมีความต้านทานต่อการติดเชื้อมากขึ้น ช่วยลดอัตราการตายเมื่อทดสอบกับเชื้อก่อ

โรค และในการรักษาภาวะลำไส้อักเสบ มีผลการทดลองที่ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของ inulin ในการปรับปรุงแผลของเซลล์เยื่อเมือกในลำไส้ตอนปลายของหนูทดลองให้ดีขึ้นได้ (Videla, Vilaseca, Antolin, Garcia-LafuenteGuarner, Crespo, et al., 2001) ตามจริงแล้วการบริโภคพรีไบโอติกนั้นจะช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ส่งผลในการปรับระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ หรือโดยทางผลของกรดไขมันสายสั้นที่สร้างจากการหมักพรีไบโอติกของแบคทีเรียกรดแล็กติกในลำไส้ใหญ่โดยตรง ผลที่สุดคือการส่งเสริมการสร้างเซลล์เยื่อเมือกในลำไส้ นอกจากนี้การศึกษาทำงานร่วมกันของพรีไบโอติกเช่น polydextros และ lactitol พบว่า มีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่าง การเจริญของจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารของหนูทดลอง และเพิ่มการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มการขับ immunoglobulin A (IgA) (Peuranen, Tiihonen, Apajalahti, Kettunen, Saarinen, and Rautonen, 2004)

ผลต่อการช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ กรดไขมันสายสั้นเป็นผลผลิตหลักที่ได้จากกระบวนการสันดาปของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ผ่านการหมักพรีไบโอติกโดยหลัก ๆ ประเภทของกรดไขมันสายสั้นประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) โดยปกติแล้วในมนุษย์จะมีปริมาณของกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารด้วย ซึ่งกรดไขมันสายสั้นถูกนำไปใช้เป็นพลังงานในกระบวนการหายใจของเซลล์เยื่อบุภายในลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีผลต่อเยื่อบุเมือกลำไส้ใหญ่หลายด้านทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะกรดบิวทิริก (butyric acid) ซึ่งมักจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานของเยื่อบุเมือกลำไส้ใหญ่ (Schwiertz, Lehmann, and Jacobasch, 2002) จากรายงานของ Mentschel and Claus (2003) พบว่า กรดบิวทิริก ที่สร้างขึ้น จะช่วยปรับสภาวะตอนปลายของลำไส้ใหญ่ให้สมบูรณ์ โดยช่วยบำรุงเยื่อบุของลำไส้ใหญ่ (colonic epithelium) กรดบิวทิริกจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน(gene expression) และจะช่วยเหนี่ยวนำการหยุดยั้งการเจริญเซลล์ที่ผิดปกติ หรือกระตุ้นการตายโดยธรรมชาติของเซลล์ (Apoptosis) กำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการหรือมีอายุมากแล้ว ส่งผลช่วยยับยั้งการเจริญของเนื้องอกและลดเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ (David and Peter, 2001; Scheppach and Weiler, 2004)

ผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน ได้มีการพิสูจน์ถึงผลของพรีไบโอติกต่อเมทาบอลิซึมของไขมันในตับพบว่า inulin และ FOS แสดงผลทางสรีรวิทยาต่อระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) และ triglyceride ในหนูทดลองโดยการลดภาวะที่โลหิตมีคอเลสเตอรอล และ triglyceride มากผิดปกติหลังอาหาร (triglyceridenia) ได้มากถึง 15% และ 50% ตามลำดับ (Delzenne, Daubioel, Neyrinck, Lasa, and Taper, 2002; Fiordaliso, Kok, Desager, Goethals, Deboyser, Roberfroid et al., 1995) การลดลงของระดับ cholesterol และ triglyceride นี้ มีสาเหตุจากการลดจำนวนของไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก (Very Low Density Lipoprotine , VLDL) และโดยการลดการทำงานของเอนไซม์ lipogenic การทดลองในคนนั้นมีผลการทดลองที่ขัดแย้งกันมาก 3 ใน 9 ของการศึกษาโดยการใช้ inulin และ FOS เป็นอาหารเสริมในอาหารของอาสาสมัครพบว่าไม่มีผลต่อระดับ cholesterol หรือ triacylglycerol ในเลือด และมี 3

ราย ที่แสดงการลด triacylglycerol อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ 4 ราย พบการลดลงของ triacylglycerol และ cholesterol โดยรวมอย่างมีนัยสำคัญ (Delzenne and Kok, 2001; Williams and Jackson, 2002) จากการศึกษาในหนูทดลอง พบว่ากรดอะซิติก (acetic acid) ที่เกิดจากการหมักพรีไบโอติกของจุลินทรีย์ สามารถช่วยยับยั้งการสังเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterolgenesis) และการสลายตัวของไขมัน ส่วนการทดลองในคนพบว่าจะสามารถลดกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ซึ่งปกติแล้วหากมีปริมาณกรดไขมันอิสระมาก ๆ จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพ และยังมีผลไปช่วยลดความไวของการตอบสนองของอินซูลินทำให้การดูดซึมกลูโคสลดลง (Beynen et al., 1982) เช่นเดียวกันในการศึกษาแบบ *in vitro* ของ Cheng and Lai (2000) พบว่าการลดปริมาณคอเลสเตอรอลโดยรวมในเลือดนั้นสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดโพรพิโอนิก โดยกรด โพรพิโอนิก (propionic acid) สามารถช่วยยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน และคอเลสเตอรอล จากการทดลองผสมพรีไบโอติกเป็นสารอาหารในคน พบว่าอินนูลิน (inulin) ปรากฏผลที่ดีกว่า FOS ในการลดปริมาณ triacylglyceride ขณะที่การทดลองในหนูทดลองพบว่าทั้ง inulin และ FOS ให้ผลเท่ากัน ในการทดลองก่อนหน้านี้ การทำงานร่วมกันของอาหารโปรตีนสูง (HP) กับอาหารเส้นใยสูง high fibre diet (HF) มีผลในการลดความอยากอาหาร (anorexigenic) และ insulinotropic hormone และ glucagon-like peptide-1 (GLP-1) ในอาหาร HF และในอาหารที่มีส่วนผสมของ inulin จะมีผลยืดเวลาที่มี triglyceride และระดับ cholesterol โดยรวมในเลือดน้อยที่สุด (Reimer and Russell, 2008)

ผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุ มีรายงานผลการทดลองในคนวัยหนุ่มสาวถึงการบริโภคร่วมกันของพรีไบโอติกประเภทอินนูลินสายสั้นและสายยาวในแต่ละวันมีผลจะช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุแคลเซียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังเพิ่มแร่ธาตุในกระดูกระหว่างวัยเจริญพันธุ์ ผลของปัจจัยด้านโภชนาการในการดูดซึมแคลเซียมอาจถูกสนับสนุนโดยปัจจัยด้านพันธุกรรม ได้แก่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวรับวิตามินบี (Abrams, Griffin, Hawthorne, Liang, Gunn, and Darlington, 2005) นอกจากนี้การทดลองศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่ามีการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมจากการใช้ inulin และ FOS ในอาหาร (Sholz-Ahrens and Schrezonmeir, 2007) Demigné, Jacobs, Moundras, Davicco, Horcajada, et. al. (2008) รายงานว่าการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าทั้ง native inulin และ reformulated inulin แสดงผลที่เหมือนกันในการหมักในลำไส้ โดยการผลิตกรดไขมันสายสั้นโดยเฉพาะกรดบิวทิริก และการกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียม และผลต่อความหนาแน่นของแร่ธาตุกระดูก

ผลต่อการควบคุมน้ำหนัก มีการรายงานเกี่ยวกับการวิจารณ์เกี่ยวกับ ความสนใจในคาร์โบไฮเดรตที่ต้านทานการย่อย (non-digestible carbohydrates) ในการควบคุมโรคอ้วน และสัมพันธ์กับผลิตผลที่ผิดปกติ (metabolic disorders) Roberfroid, Gibson, Hoyles, McCartney, Rastall, and Rowland (2010) รายงานว่าการทดลองส่วนมากมีข้อมูลสนับสนุนผลของพรีไบโอติกในอาหารที่บริโภคเข้าไป ต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวในสัตว์ทดลองบางชนิด ผลที่ได้แสดงถึงการลดลงของมวลไขมันตามการให้อาหารที่ผสม inulin-type fructan (ITF) การลดลงนี้มีผลสัมพันธ์กับการลดอาหารหรือพลังงานที่รับเข้าไป ผู้เขียน

รายงานว่าพรีไบโอติกที่ใช้เสริมในอาหารสามารถแสดงศักยภาพ ในการขับ peptides เช่น glucagon-like peptide (GLP), Peptide YY (PYY) โดย endocrine cell ในลำไส้โดยการควบคุมอาหารที่บริโภคเข้าไปและพลังงานที่ได้รับ (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, and Bressollier, 2013)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการ "ศักยภาพของประเภทของแป้งที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะ" นี้ ใช้สถานที่ปฏิบัติงานหลักคือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคารศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหาร (อาคารเครื่องมือ 3) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ครุภัณฑ์และวัสดุ-อุปกรณ์หลักที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัยของโครงการ มีดังนี้

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

3.1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังต่อไปนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autocla ve, SX-700, Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan) ตู้เขี่ยจุลินทรีย์ (Laminar flow hood, HRX-II, Haier, Chaina) ตู้อบความร้อน (Hot air oven, 1375FX Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator, Shel Lab, sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, U.S.A.) ตู้บ่มเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber, BACTRON I, Shel Lab, U.S.A.) ตู้แช่แข็ง(Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (HLLE-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) สำหรับเก็บเชื้อและสารชีวภาพ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC Shel Lab) เครื่องชั่งหยาบ (Analytical balance, SI-234, Denver Instrument, Germany) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) Spectrophotometer (Smartspec™3000, BioRad, U.S.A.) เครื่องตีป่น (Stomacher, Stomacher®400 circulator, Seward Medical, London, U.K.) เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer, Finevortex, FinePCR®, Korea) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus, Camedia, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

3.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้โดยภาพรวมมีดังนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา เครื่องพลาสติก เครื่องแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างอุจจาระจากอาสาสมัคร และเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อสำหรับทดสอบศักยภาพของแป้งที่ทนย่อยต่อเอนไซม์ เครื่องแก้วที่ทนต่อความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ, Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 และ 250 มิลลิลิตร, Microcentrifuge tubes, Micropipette tips, อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแป้งต้านทาน ได้แก่ MRS Broth (HiMedia Laboratories, India), Yeast Extract powder (HiMedia Laboratories, India), Skim milk powder (HiMedia Laboratories, India), Pancreatic digest of casein (HiMedia Laboratories, India), Soya Peptone (HiMedia Laboratories, India), Peptone, Bacteriological (HiMedia Laboratories, India) สารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ Sodium chloride, Potassium hydroxide, Potassium chloride, Sodium dihydrogenphosphate (Sigma) Magnesium chloride (Univar, Ulixes B.V., U. K.) Calcium chloride (Carlo Erba reagent, Carlo Erba Reagenti, Italy) *N,N,N' ,N'* -Tetramethylethylenediamine (TEMED; BDH-Merck Chemicals Ltd., U.K.) แป้งต้านทาน RS3 (retrograded starch) และ RS4 (chemically modified starch) ผลิตจากห้องปฏิบัติการทางเคมี อาคารเครื่องมือ 3 สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร และ RS2 (Hi-maize 260 CKI0390) จากบริษัท National starch ประเทศไทย Oligofructose ทางการค้า (FOS, BeneoTM P95, Orafti, Tienen, Belgium) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท DPO (Thailand) Ltd.

3.2 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ

3.2.1 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์จาก stock culture

เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Enterococcus species* จากศูนย์วิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จาก stock culture ที่เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาวางไว้ให้ละลายที่อุณภูมิห้อง ปิเปตเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow, Biosafety cabinet class II, HRX-II, Haier, Chaina) และบ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (SHEL LAB) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว Cross streak ลงบนอาหารวุ้นแข็งแล้วบ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน Anaerobic chamber (SHEL LAB) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ (Pure culture) มา streak ลงบนอาหารวุ้นแข็ง บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

แบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์ในสกุล *Lactobacillus* และ *Streptococcus* (สายพันธุ์ที่สร้างกรดและไม่ก่อโรค) ซึ่งคัดแยกได้จากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี มีอายุในช่วง 20 ถึง 40 ปี และไม่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงอย่างน้อย 3 เดือนก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระ

3.2.2 การเตรียมเชื้อผสมจากอุจจาระของมนุษย์

เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี มีอายุอยู่ในช่วง 20 ถึง 40 ปี และไม่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงอย่างน้อย 3 เดือนก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระ

คัดแยกเชื้อโดยเก็บตัวอย่างเชื้อจากอุจจาระของอาสาสมัคร ตามวิธีมาตรฐานใน Vanderzant and Splittstoesser (1992) แล้วเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจากสูตรอาหารมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ในสกุล *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus* และ *Streptococcus* (สายพันธุ์ที่สร้างกรดและไม่ก่อโรค) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar, TPY Agar, *Streptococcus faecalis* Agar (SF) และ Mitis Salivarius Agar (MSA) ตามลำดับ (ภาคผนวก ค) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถใช้แป้งได้ โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหารสูตรที่มีการแทนที่แป้ง soluble starch ความเข้มข้น 1% ลงในสูตรอาหารมาตรฐานแทนที่น้ำตาลกลูโคส และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่ใช้แป้งได้ มาทดสอบสมบัติทางสัณฐานและสรีรวิทยาตาม Brenner, Krieg, and Staley (2005) เพื่อทราบสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทาน จากนั้นเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ (Pure culture) มาเก็บไว้เป็น stock culture เข้า freezer ที่ -80 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 การเตรียมตัวอย่างแป้งต้านทาน

การเตรียมแป้งต้านทานเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยชั่งตัวอย่าง 100 ± 5 ใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม *(1), *(2) Sodium maleate buffer เข้มข้น 0.1 M, pH 6.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่อหลอด หรือ 4 มิลลิลิตรต่อ100mg Mix ให้เข้ากันนำไปบ่มใน water bath ที่ 37 องศาเซลเซียส, 16 ชม.(ตอนบ่มใน water bath ให้นอนหลอดลง และ เขย่าตลอดเวลา 16 ชม. พันพาราฟิมด้วย)Stop reaction โดยเติม absolute ethanol (99%) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่อ หลอด Centrifuge ที่ 2500 ×g, นาน 20 นาที*(Temp ต่ำ [4องศาเซลเซียส] จะช่วยในการตกตะกอนต่ออาจใช้ room temp ก็ได้) เทส่วนใสทิ้ง (ระวังตะกอนไหล, ถ้ายังมีตะกอนแขวนลอยอยู่ให้ centrifuge ใหม่) เติม 50% ethanol 8 มิลลิลิตรต่อหลอด, centrifuge ที่ 2500 ×g, นาน 20 นาที (รอบที่ 1) เทส่วนใสทิ้ง เติม 50% ethanol 8 มิลลิลิตรต่อหลอด, centrifuge ที่ 2500 ×g, นาน 20 นาที (รอบที่ 2) เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง (คว่ำหลอด)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณแป้งต้านทาน

ตัวอย่างแป้ง	ปริมาณ RS (%)
ตัวอย่างแป้งต้านทานก่อนทำเป็น 100% RS	
RS2	50.32±0.20
RS3	37.38±0.28
RS4	60.90±0.75
ตัวอย่างแป้งต้านทานหลังจากทำเป็น 100% RS	
RS2	94.69±0.43
RS3	90.18±0.80
RS4	97.68±0.51

3.4 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร

3.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรมาตรฐาน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) โดยนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (High pressure steam sterilizer, Autoclave SX-700, Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan) มีการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลาย โดยปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เชื้อจะสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานหลัก เพื่อให้เชื้อได้ใช้สับสเตรทของเราแทน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง RS2, RS3 และ RS4 แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ตามเป้าหมาย

3.4.2 การคัดเลือกหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) มีการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลาย โดยปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เชื้อจะสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานหลัก เพื่อให้เชื้อได้ใช้สับสเตรทของเราแทน โดยทดสอบการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกไว้สำหรับการทดลองเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง RS2, RS3 และ RS4 แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ตามเป้าหมาย

ทดลองหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 1 loopful ลงในอาหารเหลว MRS สูตรมาตรฐานปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง หรือประมาณ 1 คืน ให้มีกล้าเชื้อ

เริ่มต้นประมาณ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาณ 2% ลงในอาหารเหลวที่เติมแป้ง RS แต่ละสูตร จะได้เชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมงประมาณ 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดผลการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS Agar บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกการเจริญเป็น CFUต่อมิลลิลิตร บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการหมัก โดยใช้เครื่อง pH-meter และวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดทั้งหมด (total acidity) ด้วยวิธีการไทเทรต (AOAC International, 2000) แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugars) เพื่อหาปริมาณสับสเตรทที่เชื้อใช้ไประหว่างการเจริญในอาหารเหลว ด้วยวิธี colorimetric (phenol-sulphuric acid) method (Dubois et al., 1956)

3.5 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานทั้ง 3 ประเภท

3.5.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

ทดลองหาระดับความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ และผสมแป้งต้านทานความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5%, และ 2.0% ไปแทนที่น้ำตาลกลูโคส

เมื่อได้ปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมแล้วจึงทำการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลว MRS สูตรมาตรฐานปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หรือประมาณ 1 คืน ให้มีกล้าเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อ 2% ลงในอาหารเหลวที่ผสมแป้งต้านทานแต่ละประเภท จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วัดผลการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS Agar บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกการเจริญเป็น CFUต่อมิลลิลิตร บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการหมักโดยใช้เครื่อง pH-meter และวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดทั้งหมด (total acidity) ด้วย titration method ตาม AOAC Official Method 950.07 (AOAC International, 2000) แล้ววิเคราะห์ปริมาณ total sugars เพื่อหาปริมาณสับสเตรทที่เชื้อใช้ไประหว่างการเจริญในอาหารเหลว ด้วยวิธี colorimetric (phenol-sulphuric acid) method (Dubois et al., 1956)

จากนั้นวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น โดยการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมในตัวอย่าง ที่สามารถผลิตกรดทั้งในปริมาณที่ค่อนข้าง

สูงมา 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตเอาส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นโดยใช้เครื่อง high per formance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1200 Series LC System and Module, Agilent Technologies International sarl, Morges, Switzerland)

3.5.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของมนุษย์

ทดลองหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมโดยการเก็บตัวอย่างเชื้อจากอุจจาระของอาสาสมัคร ตามวิธีมาตรฐานใน Vanderzant and Splittstoesser (1992) แล้วเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมแป้งต้านทานความเข้มข้น 1% โดยเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเริ่มต้น 5, 10, 20 และ 30% ในขวดภาพชมพู่ฝาเกลียว ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนใน Anaerobic chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นทดลองหาปริมาณความเข้มเข้นของแป้งต้านทานที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยทดลองผสมแป้งต้านทานที่ความเข้มข้น 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 1%, 1.5% และ 2.0 % ใส่เชื้อความเข้มข้นเริ่มต้น 10% ในขวดภาพชมพู่ฝาเกลียว ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อได้ปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมแล้วจึงทำการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อผสม โดยเก็บตัวอย่างเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร ตามวิธีมาตรฐานใน Vanderzant and Splittstoesser (1992) แล้วแยกกากอาหารออกโดยปั่นเหวี่ยง 2,500 g 5 นาที จากนั้นปิเปตเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลวที่ผสมแป้งต้านทานแต่ละประเภท จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันได้คัดแยกและเลือกเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไอโซเลทเด่นที่พบในขั้นตอนทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครนี้ด้วย

3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.6.1 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก ด้วยสมบัติทางสัณฐานและสรีรวิทยา ตาม Holt et al. (1994) และ (Krieg et al., 2001) พร้อมทั้งทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยระบบ API (bioMérieus; bioMérieux, Inc., France) เปรียบเทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) ตามวิธีการดังนี้

3.6.1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรีย

ศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของแบคทีเรียดังต่อไปนี้

ก. สัณฐานวิทยาของโคโลนี (Colony morphology)

Cross streak เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar (ภาคผนวก ค1) สำหรับ Lactic acid bacteria ให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนี

ข. สัณฐานวิทยาของเซลล์ (Cell morphology)

1) การติดสีย้อมแบบแกรม (Gram stain) ของเซลล์แบคทีเรีย ศึกษาการติดสีย้อมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียมรอย smear ของแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar สำหรับ Lactic acid bacteria บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก1) เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบาๆ หยด Gram's iodine (ภาคผนวก 5.2.3) ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างรอย smear ด้วย Ethyl alcohol 95% ประมาณ 5 วินาที ล้างด้วยน้ำ ย้อมทับรอย smear ด้วยสี Safranin O (ภาคผนวก ก3) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจดูการติดสี รูปร่าง โครงสร้าง และการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope; Olympus Model BX51TRF, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

2) ขนาดของเซลล์ (Cell size) วัดขนาดเซลล์โดยใช้ Image-Pro Plus Version 6.0.0.Z60 (Media Cybernatics, Inc., Japan) ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus)

3) รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ (Cell shape and arrangement) ศึกษาลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus)

ค. การสร้างเอนโดสปอร์ (Endo-spore formation)

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar หรือ RAM agar สำหรับ Lactic acid bacteria ให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใน Anaerobic chamber (SHEL LAB) ตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-7 วัน โดยนำเซลล์มา smear ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Malachite green (ภาคผนวก ก2) ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้บนไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที คอยเติมสีไม่ให้แห้ง คีบสไลด์ออกวางให้เย็นลงเล็กน้อย ล้างสีออกด้วยน้ำจนสีหมด ย้อมทับรอย smear ด้วยสี Safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ซับ และทิ้งให้แห้ง ตรวจดูการติดสีของเซลล์ และ endospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus)

ง. การเคลื่อนที่ของเซลล์แบคทีเรีย (Motility)

ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรงเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS

agar (ที่เติม Agar 0.3%) แทงลงในอาหาร บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการกระจายของเชื้อจากรอยที่ใส่เชื้อลงในอาหาร

จ. การสร้างเอนไซม์ Catalase

ทดสอบการสร้างเอนไซม์ Catalase โดยใช้ Loop หรือไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar สำหรับ Lactic acid bacteria เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ป้ายลงบนแผ่นแก้วสไลด์ หยด Hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% (ภาคผนวก ข2) ลงบนเชื้อ 1 หยด ตรวจดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Catalase

ฉ. การสร้างเอนไซม์ Oxidase

วางแผ่นกระดาษกรอง (Whatman no. 4) ลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ข7) ลงบนกระดาษกรองให้พอเปียก ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ โดยขีดลากให้เป็นเส้นยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ตรวจดูการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Oxidase เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

ช. การสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส

ใช้ Loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar สำหรับ Lactic acid bacteria ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมเช่น MRS broth (ภาคผนวก ค1) บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) อยู่ เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลถ้าเกิดแก๊ส ที่แทนที่ของเหลวในหลอดดักแก๊ส ทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในหลอดดักแก๊ส

ซ. การย่อย (Hydrolysis) สารอาหาร

1) Casein โดย Point inoculation เชื้อบริสุทธิ์อายุ 24-48 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar สำหรับ Lactic acid bacteria ลงบนผิวอาหาร Skim milk agar (ภาคผนวก ค2) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการสร้างเอนไซม์ Caseinase โดยสังเกตบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อ

2) Starch โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรง point inoculation เชื้อบริสุทธิ์ลงบนผิวอาหาร Starch agar (ภาคผนวก ค3) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยหยด Iodine solution (ภาคผนวก 5.2.4) ลงบนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร Starch agar อ่านผลภายใน 2 นาที ผลบวกสังเกตจาก

บริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone

ฌ. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ

โดยย้ายแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมงที่เจริญในอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS agar สำหรับ Lactic acid bacteria จำนวน 2 loop ใส่ลงใน 5 มิลลิลิตรของอาหารเหลว เช่น MRS broth จำนวน 2 ซ้ำ เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญโดยไม่ให้อากาศ บ่มให้เจริญที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 42, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส pH 7.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่เกิดจากการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตรต่อเชื้ออีก 2 ครั้ง ตามวิธีดังระบุข้างต้น เพื่อยืนยันความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย

ญ. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ

โดยย้ายแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมงที่เจริญในอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS broth สำหรับ Lactic acid bacteria จำนวน 2 loop ใส่ลงในอาหารเหลว 5 มิลลิลิตร ที่เติม Sodium chloride (NaCl) 0, 3.0, 4.0, 6.5, 8.0, 10.0 และ 18.0% จำนวน 2 ซ้ำ เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญโดยไม่ให้อากาศ บ่มให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 7.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่เกิดจากการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ต่อเชื้ออีก 2 ครั้ง ตามวิธีดังระบุข้างต้น เพื่อยืนยันความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย

ฐ. ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญ

โดยเติมแบคทีเรีย อายุ 12-18 ชั่วโมงที่เจริญในอาหารที่เหมาะสมตามกลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ MRS broth สำหรับ Lactic acid bacteria โดยใช้ Loop เขี่ยเชื้อ จำนวน 2 loopful ใส่ลงใน 5 มิลลิลิตร MRS broth ที่มี pH เริ่มต้นต่างกันดังนี้ 4.0, 4.4, 4.8, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 และ 9.6 จำนวน 2 ซ้ำ เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในสภาพไร้ออกซิเจนใน Anaerobic chamber (SHEL LAB) บ่มให้เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือตามสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มที่คัดแยกและเลือกมาศึกษา วัดความขุ่นที่เกิดจากการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ต่อเชื้ออีก 2 ครั้ง ตามวิธีดังระบุข้างต้น เพื่อยืนยันความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย

ฎ. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบของ API Identification System (bioMérieux, bioMérieux®SA, France) ได้แก่ชนิด API 50CHต่อCHL สำหรับ Lactic acid bacteria โดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์อายุ 24-48 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ย้ายเชื้อลงใน API 50CHต่อCHL medium 10 มิลลิลิตร ย้าย Suspension ของเชื้อ 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ Microtube ใน API 50CHต่อ CHL strip ซึ่งมี 50 Microtubes และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

3.6.2 การเจริญของแบคทีเรีย (Bacterial growth)

ตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี standard plate count โดยนำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาเจือจางแบบ serial dilution ด้วย butterfield's buffered phosphate diluent และใช้เทคนิค spread plate บนอาหารวุ้นชนิดที่เหมาะสมตามเชื้อ ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนี (CFUต่อ มิลลิลิตร) ของแบคทีเรียที่พบ

3.6.3 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง pH meter (pHต่อmV Meter, UB-10, Denver Instrument, Germany)

3.6.4 ความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity)

วิเคราะห์สภาพกรดทั้งหมดในภาพกรดแล็กติกด้วย titration method ตาม AOAC Official Method 950.07 (AOAC International, 2000) นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสมา 5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำอุ่น 10 มิลลิลิตร ใส่ flask เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ไทเทรตสารละลายที่ได้ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 N และใช้สารละลาย ฟีนอฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือค่า pH ประมาณ 8.2 และทำแบลงค์ (blank) โดยใช้อาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ

3.6.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาปริมาณสับสเตรทที่เชื้อใช้ไประหว่างการเจริญในอาหารเหลว ด้วยวิธี colorimetric (phenol-sulphuric acid) method (Dubois et al., 1956) โดย ปิเปตตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม สารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex) (Vortex mixer, FineVotex, FinePCR, Korea) แล้วจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมวอร์เทค ให้เข้ากันดีแล้วตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลานาน 30 นาที ทำแบลงค์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.6 วิเคราะห์ความสามารถในการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น โดยการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมในตัวอย่าง ที่มีสภาพกรดทั้งหมดในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดทั้งหมดจากการไทเทรต ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์อีกครั้งโดย ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 10 นาที ปิเปตส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1200 Series LC System and Module, Agilent Technologies International sarl, Morges, Switzerland) ใช้คอลัมน์สำหรับการแยกวิเคราะห์กรดอินทรีย์ ion exclusion column, Vertisep OA, 8 ไมโครเมตร ความยาว 7.8×300 มิลลิเมตร โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร เป็น mobile phase ตั้งค่าอัตราการไหล (flow rate) ของ mobile phase เท่ากับ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดปริมาณกรดที่แยกได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ด้วย UV detector (Agilent Technologies International sarl) ระบุชนิดของกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L(+)-Lactic acids (Sigma, Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.) และ acetic acid, propionic acid, และ butyric acid (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) และคำนวณหาปริมาณกรดในอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อนั้น

3.6.7 การวิเคราะห์ค่าดัชนีพรีไบโอติก (Prebiotic index, PI)

การวิเคราะห์ค่า PI เริ่มต้นโดยการนับเชื้อที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium โดยใช้วิธี Fluorescent in situ hybridization (FISH) ดัดแปลงจากวิธีการของ Palframan et al., (2002) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบ่ม 24 ชั่วโมงปริมาตร 375 ไมโครลิตร มาเจือจางลงสี่เท่าโดยใช้ 4% โดยน้ำหนัก paraformaldehyde และทำการตรึงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวที่ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS (0.1 โมลาร์, pH 7.0) และเก็บใน PBSต่อethanol (1:1, โดยปริมาตร) จากนั้นทำการนับเชื้อภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 16 ไมโครลิตร ละลายใน 200 ไมโครลิตร ของ 40 มิลลิโมลาร์ Tris–HCl, 1.8 โมลาร์ NaCl, pH 7.2 และ 64 ไมโครลิตร ของน้ำที่เป็น HPLC grade จากนั้นนำตัวอย่าง 90 ไมโครลิตร มาเติม สีย้อม DAPI ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมตัวติดตาม หรือ probe ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็น rRNA ได้แก่ Bif164 จำเพาะต่อ *Bifidobacterium* sp. (Langendijk et al., 1995), Bac303 จำเพาะต่อ *Bacteroides* sp. (Manz et al., 1996), Lab158 จำเพาะต่อ *Lactobacillusต่อEnterococcus* sp. (Harmsen et al., 1999), และ His150 จำเพาะต่อ *Clostridium* sp. hystolyticum group (Clostridium clusters I and II) (Franks et al., 1998) (ตารางภาคผนวกที่ 10) จากนั้นบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส (Lab158 and Bac303) และ 50 องศาเซลเซียส (Bif164 and His150) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 20 มิลลิโมลาร์ Tris–HCl, 0.9 โมลาร์ NaCl, pH 7.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำเซลล์

ที่ค้างบนฟิลเตอร์ไปส่องด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้ 555 nm-excitation filter สำหรับเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วยสี DAPI เพื่อนับเซลล์ทั้งหมด และ 455 nm-excitation filter สำหรับเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วย probe ที่จำเพาะต่อจีนัส โดยนับบริเวณที่มีเซลล์อย่างน้อย 15-150 เซลล์ จำนวน 15 ซ้ำ แล้วนำค่าทั้งหมดมาเฉลี่ย เพื่อคำนวณหาค่า PI ตามสมการ

$$PI = \frac{Bif}{Total} - \frac{Bac}{Total} + \frac{Lac}{Total} - \frac{Clos}{Total}$$

โดย Bif คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ของ *Bifidobacterium* sp.

Bac คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ของ *Bacteroides* sp.

Lac คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ของ *Lactobacillus/Enterococcus* sp.

Clos คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ของ *Clostridium* sp. hystolyticum group (Clostridium clusters I, II)

Total คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด

3.6.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 17 และทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวีธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล

4.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

ในลำไส้ใหญ่ของคนมีแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่สามารถใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในการเจริญได้ ดังรายงานผลการทดลองของ Crittenden et al. (2001) ซึ่งได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bifidobacterium* 40 strains ร่วมกันกับแป้ง RS ในลักษณะเป็น synbiotic ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต พบว่ามีแบคทีเรีย *Bifidobacterium* เพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถใช้แป้ง RS ในการเจริญได้คือ *Bifidobacterium lactis* Lafti B94 สามารถมีชีวิตรอดผ่านสภาวะความเป็นกรดที่ระบบทางเดินอาหารและยังอยู่รอดผ่านกระบวนการผลิตโยเกิร์ตและสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ได้ ดังนั้นการศึกษาศักยภาพของประเภทของแป้งต้านทาน (RS) ในการทดลองนี้ได้ใช้แป้ง RS 3 ประเภทคือ RS2, RS3 และ RS4 ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีกรดแล็กติกเรียในสกุล *Lactobacillus* ที่รวบรวมจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Lact. acidophilus* TISTR 450, *Lact. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lact. plantarum* TISTR 543 และ *Lact. fermentum* TISTR 876 โดยทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว De Man, Rogosa Sharpe (MRS) broth ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานโดยเติมธาตุอาหารตามสูตรปรับส่วนประกอบ และเติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.1) พบว่าแบคทีเรีย *Lact. acidophilus* TISTR 450 และ *Lact. plantarum* TISTR 543 มีศักยภาพในการเจริญในอาหารที่เติมแป้ง RS ใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคสแต่สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคส ส่วนแบคทีเรีย *Lact. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860 และ *Lact. fermentum* TISTR 876 มีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารที่เติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 1 Log CFUต่อมิลลิลิตร มีค่า pH ลดลงในช่วงระหว่าง 5.54-5.81 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดในช่วงระหว่าง 0.063-0.113% ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการเจริญใกล้เคียงกันเท่ากับ 8.85 และ 8.95 Log CFUต่อมิลลิลิตร มีค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.51 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.502% และ 0.837% ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้นี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มแลคโตบาซิลลัสทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ มีความสามารถในการใช้แป้ง RS ได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสซึ่งใช้เป็นการทดลองควบคุม

ตารางที่ 3.1 การเจริญ ค่า pH และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน นาน 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ[m]	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
Lactobacillus acidophilus TISTR 450			
Glucose	8.80	4.17	1.269±0.021[a]
สูตร 1	8.40	5.29	0.180±0.019[b,c]
สูตร 2	8.41	5.30	0.171±0.014[b,c]
สูตร 3	8.33	5.21	0.185±0.023[b]
สูตร 4	7.98	5.40	0.153±0.017[b]
Lact. brevis subsp. *brevis* TISTR 860			
Glucose	8.85	4.51	0.502±0.027[a]
สูตร 1	7.91	5.65	0.099±0.032[b]
สูตร 2	7.86	5.68	0.099±0.018[b]
สูตร 3	8.02	5.54	0.081±0.013[b]
สูตร 4	7.81	5.71	0.063±0.019[b]
Lact. plantarum TISTR 543			
Glucose	8.83	4.57	0.900±0.019[a]
สูตร 1	8.36	5.22	0.207±0.014[b]
สูตร 2	8.33	5.45	0.149±0.014[c]
สูตร 3	8.35	5.20	0.207±0.018[b]
สูตร 4	8.13	5.54	0.108±0.021[d]
Lact. fermentum TISTR 876			
Glucose	8.95	4.51	0.837±0.023[a]
สูตร 1	8.09	5.52	0.113±0.021[b]
สูตร 2	7.56	5.81	0.090±0.019[b,c]
สูตร 3	8.19	5.60	0.108±0.027[b,c]
สูตร 4	7.52	5.59	0.099±0.021[b,c]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

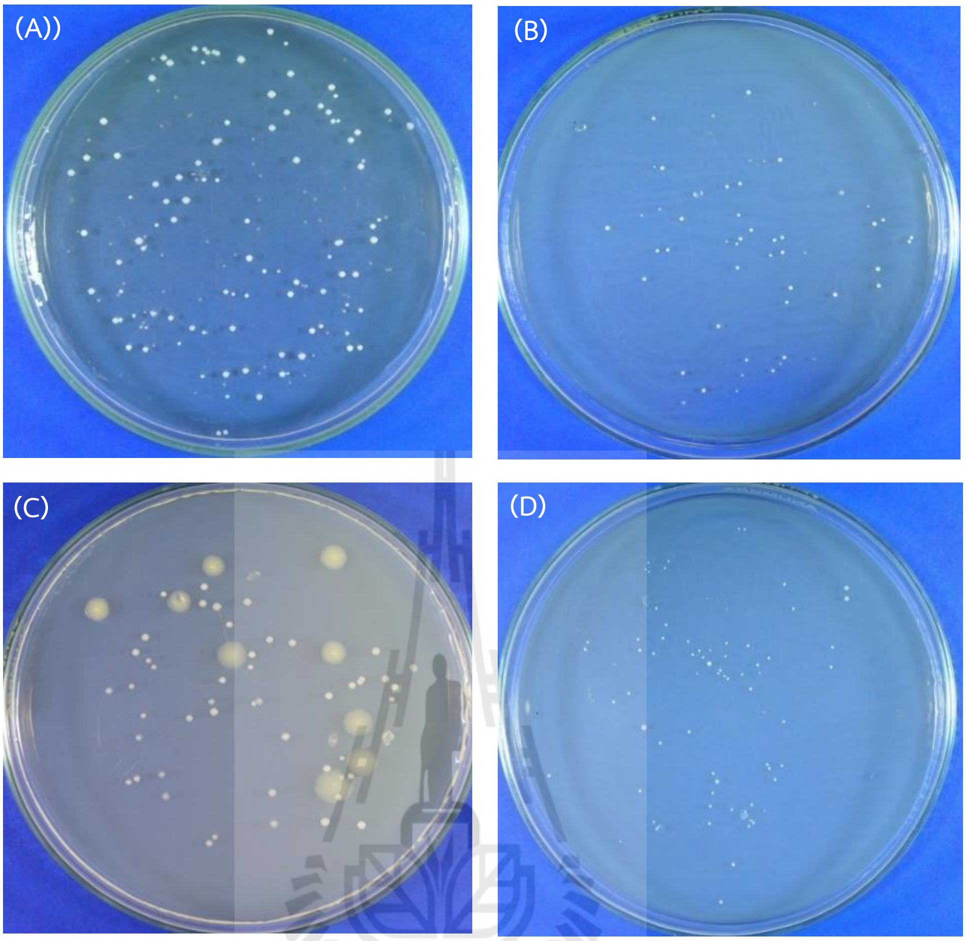
[m] สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีการปรับส่วนประกอบต่าง ๆ จากสูตรอาหารมาตรฐานได้เป็นสูตรปรับที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามตารางที่ 3.1

[n] ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องตามโครงสร้างของแป้ง RS2 ที่ซับซ้อนมากกว่าน้ำตาลกลูโคส โดยมีส่วนที่มีความเป็นผลึกสูง และมีลักษณะทางโครงสร้างของเม็ดแป้งที่ไม่มีรูหรือช่องเปิด (Sajilata et al., 2006; Sharma et al., 2008) เนื่องจากโดยธรรมชาติแล้วแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปเป็นสับสเตรทในการเจริญและผลิตกรดได้ดี (Wood and Holzapfel, 1995) ส่วนแป้ง RS เป็นพอลิแซ็กคาไลด์ (polysaccharide) ที่โมเลกุลมีขนาดใหญ่และมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าน้ำตาลกลูโคสมาก แบคทีเรียจึงสามารถใช้แป้งได้เฉพาะส่วนที่แป้งมีการบวมน้ำ และสูญเสียโครงสร้างไปในระหว่างที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนทำการทดลอง เนื่องจากโครงสร้างผลึกของแป้ง RS2 จะเริ่มถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงประมาณ 120 องศาเซลเซียส (Charalampopoulos and Rastall, 2009)

4.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อที่คัดแยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร

ทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อที่คัดแยกจากอุจจาระของอาสาสมัครได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการทดสอบศักยภาพแป้ง RS ทั้ง 3 ประเภทเพิ่มเติม โดยการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ปกติในสกุล *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus* และ *Streptococcus* (สายพันธุ์ที่สร้างกรดและไม่ก่อโรค) โดยคัดเลือกแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ตามวิธีมาตรฐานของ Vanderzant and Splittstoesser (1992) และเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar, Reinforced Clostridial agar (RCA), *Streptococcus faecalis* agar (SF), และ *Streptococcus thermophilus* agar (ST) ตามลำดับ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง RS ทั้ง 3 ประเภท แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ดี จากการทดสอบสมบัติทางสัณฐานและสรีรวิทยาตาม Brenner et al. (2005) พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทั้งหมด 66 ไอโซเลท มี 45 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (Gram-positive rods) และมี 21 ไอโซเลท ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเซลล์กลม (Gram-positive cocci) ซึ่งมีลักษณะโคโลนีหลากหลายลักษณะ (ตัวอย่างดังภาพที่ 3.1) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ทดสอบความสามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่แทนที่น้ำตาลกลูโคสด้วยแป้งข้าว (native rice starch) ความเข้มข้น 1% ในสูตรอาหารมาตรฐาน พบว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญได้ 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5 ภาพที่ 3.2) และนำโคโลนีของเชื้อที่ใช้แป้งได้มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีต่อไป (ข้อ 3.2.1)

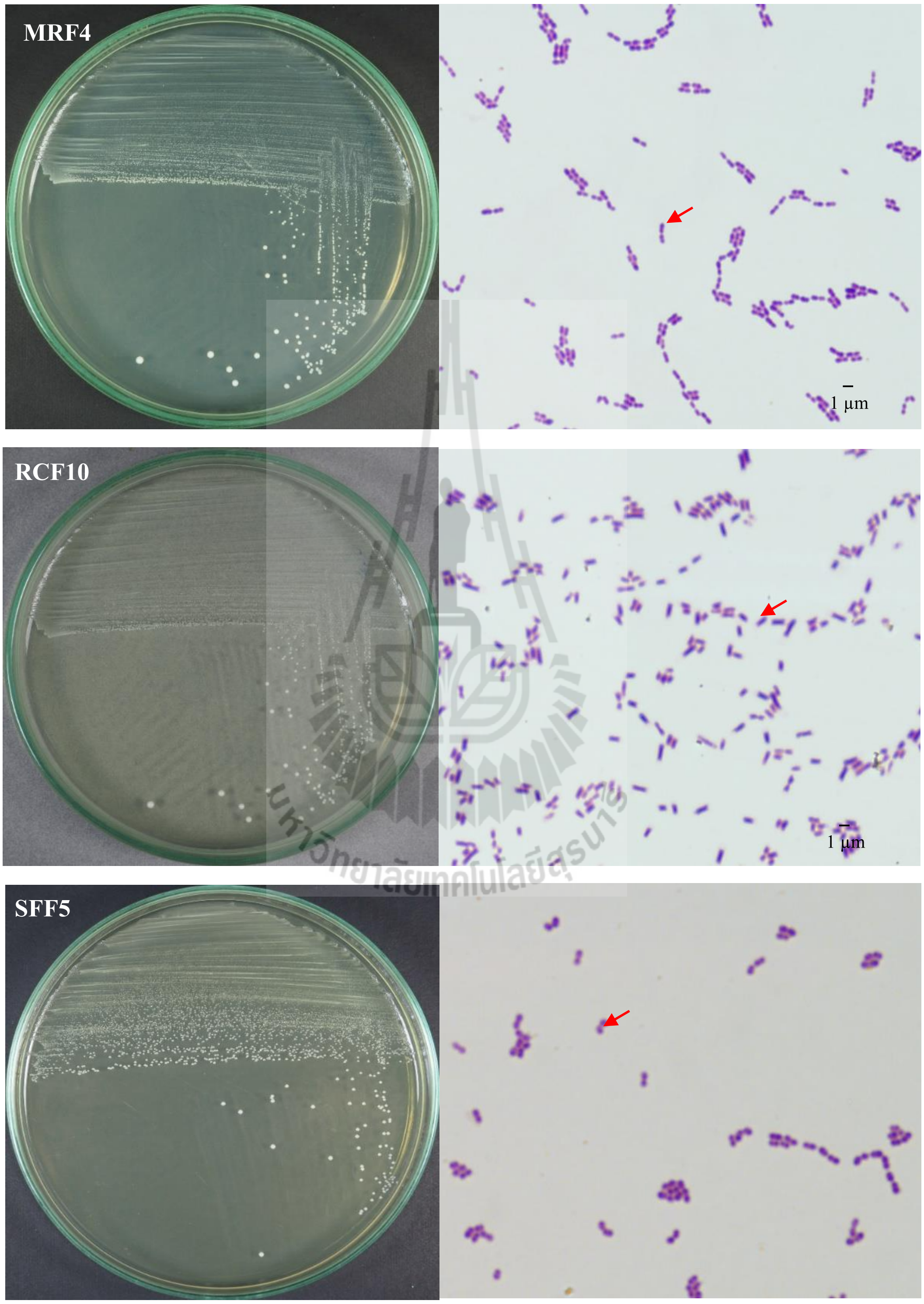


ภาพที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัครบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar (A), Reinforced clostridial (RC) agar (B), *Streptococcus faecalis* (SF) agar (C) และ *Streptococcus thermophilus* (ST) agar (D) ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2.1 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ใช้แป้งไอโซเลท MRF4, RCF10 และ SFF5 มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบระบบ API ชนิด API 50CH/CHL และ API 20 STREP (bioMérieux) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) พบว่า แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท (MRF4 และ RCF10) ที่คัดแยกจากอาหาร MRS agar และ RCA agar ได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเหมือน (% Identity) ของสมบัติทางชีวเคมีกับแบคทีเรียอ้างอิงในฐานข้อมูลระบบ API (bioMérieux)ไอโซเลท MRF4 และ RCF10 มีความเหมือนกับ *Lactobacillus acidophilus* 3 และ *Lactobacillus rhamnosus* 89.2 และ 99.0% ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท SFF5 ที่คัดแยกจากอาหาร *Streptococcus faecalis* agar ความเหมือนของสมบัติทางชีวเคมีกับ *Streptococcus mitis* 1

16.9% มีแนวโน้มที่อาจเป็นชนิดใหม่ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาสารพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S rRNA gene ต่อไป



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 3.2 ลักษณะโคโลนี (อายุ 48 ชั่วโมง) และสัณฐานวิทยาของเซลล์ (ลูกศร ย้อมสีแบบแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า) ของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5) ที่คัดแยกและเลือกศึกษา

ตารางที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอ้างอิงในสกุล *Lactobacillus* และ *Streptococcus* (Brenner et al., 2005)

ลักษณะ	MRF4	RCF10	SFF5	*Lactobacillus*	*Streptococcus*
Cell size (µm)	(0.5-1.0) ×(1.5-4.0)	(0.5-1.0) ×(2.0-4.0)	(0.8-1.0) ×(1.0-1.2)	(0.5-1.6) ×(1.0-10.0)	0.5-2.0
Cell shape	Rods	Rods	Ovoid	Rods, usually straight, sometime coccobacilli	Normally spherical or ovoid
Cell arrangement	Single, pairs, chains	Single, pairs, chains	Single, pairs, chains	Single, pairs, chains	Pairs or chains
Colony diameter (mm)	1.0-1.5	1.0-1.5	0.5-1.0	Usually small (2.0-5.0 mm)	0.5-1.0 no increase after prolonged incubation
Colony shape	Convex, white, entire edge,	Convex, white, entire edge,	Convex, white, entire edge,	Convex, smooth, without pigment, entire edge, opaque	Convex, without pigment, entire edge,
Gram stain	+	+	+	+	+
Spore formation	-	-	-	-	-
Catalase test	-	-	-	-	-
Oxidase test	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-
CO_2 production from glucose[a]	-	-	-	±	Sometime minor amount of CO_2
Hydrolysis of: starch	+	+	+	±	±
gelatin	-	-	-	-	-
Optimum growth temperature (องศาเซลเซียส)	37° C	37° C	37° C	30-40° C	37° C
Growth at 10องศาเซลเซียส	-	-	-	±	-
Growth at 45องศาเซลเซียส	+	+	+	±	±
Growth at 6.5% NaCl	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.4	+	+	-	±	-
Growth at pH 9.6	-	-	-	-	-
Habitat		Human faeces		Widespread in GI tract of mammals, fermentable materials	Human oral cavity upper respiratory tract and human faeces

+, positive; -, negative; ±, response varies between species; ND, not determined.

[a] Test for homo or heterofermentation of glucose; negative and positive denotes homofermentative and heterofermentative, respectively.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5) ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux)

ลักษณะการใช้น้ำตาล	**รหัสไอโซเลท**		
	MRF4	**RCF10**	**SFF5**
Acid from:	-	-	-
Glycerol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Ribose	-	+	-
D-Xylose	-	-	-
L- Xylose	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-
Methyl-β D-xylopyranoside	-	-	-
D-Galactose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
L-Sorbose	-	+	-
L-Rhamnose	-	+	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-Mannitol	-	+	-
D-Sorbitol	-	+	-
Methyl-α D-mannopyranoside	-	-	-
Methyl- α D-glucopyranoside	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	-	+
Amygdalin	-	-	+
Arbutin	-	-	+
Esculin	+	+	+
Salicin	-	+	+

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 3 ไอโซเลท (MRF4, RCF10 และ SFF5) ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux)

ลักษณะการใช้น้ำตาล	รหัสไอโซเลท		
	MRF4	**RCF10**	**SFF5**
D-Cellobiose	-	+	+
D-Lactose	-	+	+
D-Melibiose	+	-	-
D-Saccharose (Sucrose)	+	-	+
Inulin	-	-	-
D-Melezitose	-	+	-
Amidon (Starch)	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	-	-	+
D-Turanose	-	+	-
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	-	+	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-
Potassium gluconate	-	-	-
Potassium 2-Ketogluconate	-	-	-
Potassium 5-Ketogluconate	-	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.4 ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก 3 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกจากฐานข้อมูลที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API (bioMèrieux)

Bacterial isolate code	**Identification result from API database** (bioMèrieux)	**% Identity**[a]
MRF4	*Lactobacillus acidophilus* 3	89.2
RCF10	*Lactobacillus rhamnosus*	99.0
SFF5	*Streptococcus mitis* 1	16.9

[a] Identity ที่น้อยกว่า 99% มีแนวโน้มที่อาจเป็นชนิดใหม่ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาสารพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S rRNA gene ต่อไป

4.2.2 การทดลองเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

ทดลองปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลาย 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6 โดยมีการปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เชื้อจะสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เพื่อให้เชื้อได้ใช้สับสเตรทเป็นแป้งต้านทานแทนน้ำตาลกลูโคสจากสูตรอาหารมาตรฐาน เพื่อพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบในอาหาร MRS ปรับสูตรให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

ส่วนประกอบ	**ปริมาณ (กรัมต่อลิตร) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร**					
	Std.	**สูตร 1**	**สูตร 2**	**สูตร 3**	**สูตร 4**	**สูตร 5**
Glucose	20	-	-	-	-	-
แป้ง RS	-	10	10	10	10	-
Proteose peptone	10	10	10	5	5	10
Beef extract	10	10	-	4	-	10
Yeast extract	5	5	5	5	2.5	5
Polysorbate 80	1	1	-	-	-	1
Ammonium citrate	2	2	2	-	-	2
Sodium acetate	5	5	5	5	-	5

ตารางที่ 3.5 (ต่อ) ส่วนประกอบในอาหาร MRS ปรับสูตรให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร					
	Std.	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$MnSO_4.5H_2O$	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Dipotassium phosphate	2	2	2	2	2	2

ที่มา: ดัดแปลงจากสูตรอาหารมาตรฐานของ Atlas and Parks (2004)

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในอาหาร SF ปรับสูตรให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร					
	Std.	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
Glucose	4.0	-	-	-	-	
Starch	-	10	10	10	10	10
Pancreatic digest of casein	2.5	2.5	2.0	1.5	0.75	-
Yeast extract	2.5	2.5	2.0	2.0	1.75	2.0
K_2HPO_4	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
NaCl	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1
$MgSO_4.7H_2O$	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1
$MnSO_4.5H_2O$	-	-	0.05	0.05	0.05	0.05

ที่มา: ดัดแปลงจากสูตรอาหารมาตรฐานของ Atlas and Parks (2004)

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 (ตารางที่ 3.7) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 (ตารางที่ 3.6) เติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารสูตรที่ 1-4 โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 7.94-8.96 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 5.28-5.77 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นถึง 9.25 Log CFUต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร

ที่ 3 และสูตรมาตรฐานมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 0.468% และ 0.462% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 4 มีค่า 0.225%, 0.210%, และ 0.150% ตามลำดับ และเมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 มีค่าสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 19.4% และ 18.3% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสูตรที่ 2 (11.9%) และสูตรที่ 4 (10.3%) ตามลำดับ ส่วนในอาหารเหลวสูตรที่ 5 ซึ่งไม่ได้เติมทั้งแป้งและน้ำตาลกลูโคส พบว่าแบคทีเรียมีค่าการเจริญไม่แตกต่างกันกับกล้าเชื้อเริ่มต้น และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเพียง 0.042%

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (ตารางที่ 3.7) ในอาหารเลี้ยง ที่เติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารเหลวสูตรที่ 1-4 ในช่วง 7.99-8.51 Log CFUต่อมิลลิลิตร และมีค่า pH โดยเฉลี่ยในช่วง 4.38-4.85 ในขณะที่การทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอาหารมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นเท่ากับ 8.98 Log CFUต่อมิลลิลิตร มีค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.17 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงถึง 0.819% โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.453% ซึ่งมากกว่าสูตรที่ 1 และ 2 ที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เท่ากับ 0.333% และ 0.318% ตามลำดับ และมีค่ามากกว่าสูตรที่ 4 (0.270%) และเมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 มีค่าสับสเตรทที่ใช้ไป 18.5% และ 18.9% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสูตรที่ 4 (15.6%) และสูตรที่ 2 (15.3%) ตามลำดับ ส่วนในอาหารเหลวสูตรที่ 5 ซึ่งเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมทั้งแป้งและน้ำตาลกลูโคส พบว่าแบคทีเรียมีค่าการเจริญที่วัดได้ไม่ต่างกันกับเชื้อเริ่มต้น และพบค่าความเป็นกรดทั้งหมดเพียง 0.084%

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ตารางที่ 3.7) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารสูตรที่ 1-4 ในช่วง 9.05-9.47 Log CFUต่อมิลลิลิตร และมีค่า pH โดยเฉลี่ยในช่วง 4.29-4.90 ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญ 10.13 Log CFUต่อมิลลิลิตร ความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.756% โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.420% ซึ่งมากกว่าในอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 4 (มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.387%, 0.288% และ 0.174% ตามลำดับ) และเมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 มีค่าสับสเตรทที่ใช้ไป 17.0% และ 19.2% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสูตรที่ 2 (12.9%) และสูตรที่ 4 (11.5%) ตามลำดับ ส่วนในอาหารเหลวสูตรที่ 5 ซึ่งไม่มีการเติมทั้งแป้งและน้ำตาลกลูโคส พบว่าแบคทีเรียมีค่าการเจริญไม่ต่างจากกล้าเชื้อเริ่มต้น ส่วนค่า pH ลดลงเล็กน้อย และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเพียง 0.075% จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ มีความต้องการน้ำตาลหรือแป้งเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในกระบวนการหมักเพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญและสร้างกรดได้ดี และเมื่อพิจารณาจากค่าการเจริญ ค่าความเป็นกรดทั้งหมด และค่าสับสเตรทที่ใช้ไป พบว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกมาทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ เมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ซึ่งได้เติมธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบดังนี้ Proteose peptone

0.5%, Beef extract 0.4%, Yeast extract 0.5%, Sodium acetate 0.5%, Dipotassium phosphate 0.2%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.01%, $MnSO_4.5H_2O$ 0.005% และแป้ง RS 1% (สูตรที่ 3 ตารางที่ 3.1) แบคทีเรียมีแนวโน้ม ที่จะใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในการหมักได้ดีและเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถกระตุ้นการผลิตกรดทั้งหมดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่ 1 2 4 และ 5 จึงได้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานแต่ละประเภทต่อไป

ตารางที่ 3.7 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ[m]	**การเจริญ (Log CFU/mL)**	**pH**[n]	**น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)**	**ความเป็นกรดทั้งหมด (%)**
Lactobacillus sp. RCF10				
Glucose	9.25	5.22	15.4±0.016^{b}	0.468±0.012^{a}
สูตร 1	8.56	5.77	18.3±0.010^{a}	0.225±0.010^{b}
สูตร 2	8.17	5.67	11.9±0.012^{c}	0.210±0.021^{b}
สูตร 3	8.96	5.28	19.4±0.013^{a}	0.462±0.010^{a}
สูตร 4	7.94	5.49	10.3±0.020^{c}	0.150±0.014^{c}
สูตร 5	6.08	6.61	8.9±0.014^{c}	0.042±0.011^{d}
Lactobacillus sp. MRF4				
Glucose	8.98	4.17	14.8±0.012^{b}	0.819±0.010^{a}
สูตร 1	8.51	4.85	18.9±0.010^{a}	0.333±0.010^{c}
สูตร 2	7.99	4.75	15.3±0.011^{b}	0.318±0.021^{c}
สูตร 3	8.39	4.38	18.5±0.013^{a}	0.453±0.011^{b}
สูตร 4	8.18	4.48	15.6±0.012^{b}	0.270±0.014^{c}
สูตร 5	7.08	6.53	7.9±0.015^{c}	0.084±0.011^{d}

ตารางที่ 3.7 (ต่อ) การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ[m]	**การเจริญ (Log CFU/mL)**	**pH**[n]	**น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)**	**ความเป็นกรดทั้งหมด (%)**
Streptococcus sp. SFF5				
Glucose	10.13	4.21	13.7±0.011[c]	0.756±0.024[a]
สูตร 1	9.39	4.89	17.0±0.011[b]	0.387±0.040[b]
สูตร 2	9.05	4.90	12.9±0.010[c]	0.288±0.021[c]
สูตร 3	9.47	4.29	19.2±0.012[a]	0.420±0.014[b]
สูตร 4	9.31	4.76	11.5±0.013[c,d]	0.174±0.010[d]
สูตร 5	7.38	6.54	6.9±0.012[d]	0.075±0.014[e]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

[m] สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีการปรับส่วนประกอบต่าง ๆ จากสูตรอาหารมาตรฐาน ได้เป็นสูตรปรับที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามตารางที่ 3.1

[n] ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.2.3 การหาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

เนื่องจากประเภทของแป้ง และปริมาณแป้งที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับแบคทีเรียนั้นมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้แป้งของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ หากแบคทีเรียสามารถใช้แป้งได้ดีแต่ในอาหารมีการเติมแป้งในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญก็จะส่งผลให้แบคทีเรียมีอัตราการเจริญต่ำ และสร้างกรดซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากการหมักได้น้อย แต่หากแป้งที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเข้มข้นเกินความต้องการของแบคทีเรีย และด้วยคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งที่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ลดปริมาณน้ำอิสระ (water activity, Aw) ที่แบคทีเรียจะเจริญได้ส่งผลในการจำกัดอัตราการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นกัน จึงได้ทดลองหาปริมาณแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ตารางที่ 3.1) ที่ปรับจากสูตรอาหารมาตรฐาน และเติมแป้งข้าวดิบที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ไปแทนที่น้ำตาลกลูโคส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน

สภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 (ตารางที่ 3.8) พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 8.06-8.94 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 4.57-5.30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% ในขณะที่การทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเที่มีน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียมีการเจริญถึง 9.44 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.24 และพบค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงถึง 0.843% โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 1% มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.333% ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.5% และ 2% ซึ่งมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 มีการใช้สับสเตรทไปมากที่สุดเท่ากับ 19.4% เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งความเข้มข้น 1% และมีค่าสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 16.2%, 10.3% และ 6.3% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.5% และ 2% ตามลำดับ

แบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (ตารางที่ 3.8) มีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.25-9.40 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่าpH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 4.69-5.08 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญสูงถึง 10.05 Log CFUต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.910% โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 1% มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.342% ซึ่งมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง 0.5%, 1.5% และ 2% โดยมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 0.258%, 0.249% และ 0.234% ตามลำดับ และแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ใช้สับสเตรทไปมากที่สุดเท่ากับ 18.4% เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 1% และมีค่าสับสเตรทที่ใช้ไป 15.2%, 11.2% และ 4.9% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.5% และ 2% ตามลำดับ จากผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ตารางที่ 3.8) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.31-9.78 Log CFUต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญถึง 10.42 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.582% โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 1% พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.327% ซึ่งมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.5% และ 2% ซึ่งมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ และแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 ได้ใช้สับสเตรทไปมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 22.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง 1% และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง 0.5%, 1.5% และ 2% มีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 16.7%, 7.8% และ 4.3% ตามลำดับ

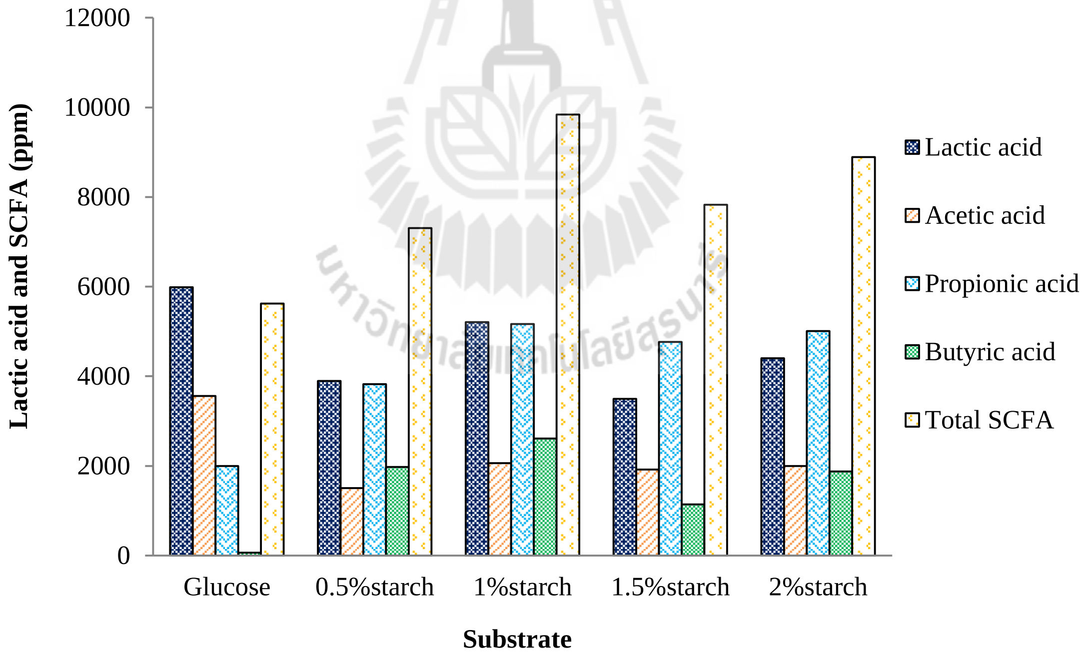
ตารางที่ 3.8 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH^n	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
Lactobacillus sp. RCF10				
Glucose	9.44	4.24	16.5 ± 0.012^b	0.843 ± 0.023^a
Rice starch content (%)				
0.5	8.19	5.30	16.2 ± 0.010^b	0.237 ± 0.014^c
1.0	8.94	4.57	19.4 ± 0.011^a	0.333 ± 0.010^b
1.5	8.06	4.88	10.3 ± 0.014^c	0.200 ± 0.021^c
2.0	8.67	5.04	6.3 ± 0.017^c	0.231 ± 0.019^c
Lactobacillus sp. MRF4				
Glucose	10.05	4.40	15.9 ± 0.011^b	0.910 ± 0.010^a
Rice starch content (%)				
0.5	9.25	5.08	15.2 ± 0.010^b	0.258 ± 0.010^c
1.0	9.40	4.69	18.4 ± 0.012^a	0.342 ± 0.018^b
1.5	9.31	4.97	$11.2\pm0.013^{c,d}$	0.249 ± 0.019^c
2.0	9.26	4.96	4.9 ± 0.011^d	0.234 ± 0.012^c
Streptococcus sp. SFF5				
Glucose	10.42	4.39	17.0 ± 0.011^b	0.582 ± 0.030^a
Rice starch content (%)				
0.5	9.31	5.13	16.7 ± 0.017^b	0.252 ± 0.018^c
1.0	9.78	4.80	22.5 ± 0.012^a	0.327 ± 0.014^b
1.5	9.46	4.97	7.8 ± 0.016^c	$0.243\pm0.019^{c,d}$
2.0	9.43	5.06	4.3 ± 0.021^c	0.210 ± 0.021^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^{n} ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นหลังจากการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2.0% ด้วยเครื่อง high per formance liquid chromatography (HPLC) พบว่าระดับความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงผลในภาพที่ 3.3 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 พบการผลิตกรดทั้งหมดในปริมาณที่ค่อนข้างสูงโดยมีกรดแล็กติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 5,210 ppm เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงใกล้เคียงกันกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคส และสามารถกระตุ้นให้เชื้อผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 2%, 0.5% และ 1.5% ที่มีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับ 4,400, 3,895 และ 3,500 ppm ตามลำดับ กรดไขมันสายสั้นประเภทกรดอะซีติก (acetic acid) มีปริมาณเท่ากับ 2,065 ppm เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกันกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส และสามารถกระตุ้นให้เชื้อผลิตกรดอะซีติก ได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 2%, 1.5%, และ 0.5% ที่มีปริมาณกรดกรดอะซีติกเท่ากับ 2,000, 1,920 และ 1,505 ppm ตามลำดับ



ภาพที่ 3.3 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% แทนน้ำตาลกลูโคส หลังการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) มีปริมาณเท่ากับ 5,165 ppm และ 5,010 ppm เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 2% ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส และสามารถกระตุ้นให้เชื้อผลิตกรดโพรพิโอนิกได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1.5% และ 0.5% โดยมีปริมาณกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 4,770 และ 3,825 ppm ตามลำดับ ส่วนกรดบิวทิริก (butyric acid) มีปริมาณเท่ากับ 2,610 ppm เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5%, 2.0% และ 1.5% ซึ่งมีกรดบิวทิริกเท่ากับ 1,975, 1,880 และ 1,140 ppm ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าการเจริญ ค่าความเป็นกรดทั้งหมด ค่าสับสเตรทที่ใช้ไปทั้งหมด และปริมาณการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกมาทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ มีแนวโน้มที่จะใช้แป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% ในการหมักได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.5% และ 2% และเป็นความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถใช้กระตุ้นผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ดี จึงได้คัดเลือกการแทนที่น้ำตาลกลูโคสด้วยแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ตารางที่ 3.1) ซึ่งได้เติมธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบดังนี้ Proteose peptone 0.5%, Beef extract 0.4%, Yeast extract 0.5%, Sodium acetate 0.5%, Dipotassium phosphate 0.2%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.01%, $MnSO_4.5H_2O$ 0.005% และแป้ง RS 1% เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรหลักที่ใช้ในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานแต่ละประเภทต่อไป

4.2.4 การทดสอบศักยภาพของแป้ง RS ในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์แยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร แบบไม่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง

จากการที่ได้ทดลองปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลายโดยมีการปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมที่เชื้อจะสามารถใช้แป้ง RS แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ดี ได้เลือกสูตรปรับ 3 (ตารางที่ 3.1) เป็นสูตรอาหารหลักมีการเติมสับสเตรทปริมาณความเข้มข้น 1% แทนที่น้ำตาลกลูโคส ได้แก่ แป้ง RS2, RS3, RS4 และเปรียบเทียบกับ FOS ทางการค้า ทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากอุจจาระของอาสาสมัครจำนวน 3 สายพันธุ์ (*Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4, และ *Streptococcus* sp. SFF5) เลี้ยงเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญ และการผลิตกรดทั้งหมดของแบคทีเรีย ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 (ตารางที่ 3.9) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดถึง 1.002% จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส (ตารางที่ 3.9) พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 1.200% และมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 27.4% ขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียมีการเจริญได้ใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส มีค่าการเจริญเท่ากับ 10.13 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.37 มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.570%

และมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป 15.2% ในขณะที่ในสูตรที่เติม RS2, RS4 และ FOS แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.27-9.88 Log CFUต่อมิลลิลิตร มีค่า pH ในช่วง 4.64-5.50 โดยในสูตรที่เติมแป้ง RS2 และ FOS มีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 0.291% และ 0.255% ตามลำดับ และยังมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 19.9% และ 19.8% ตามลำดับส่วนในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเพียง 0.183% และปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปน้อยที่สุดเท่ากับ 5.2% และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ตารางที่ 3.9) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดถึง 0.906% โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียมีการเจริญได้ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 10.31 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.22 และพบค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.423% ในขณะที่ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS2, RS4 และ FOS แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.69-9.77 Log CFUต่อมิลลิลิตร มีค่า pH ในช่วง 4.49-6.01 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.339%, 0.198% และ 0.252% ตามลำดับ และเมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป พบว่าแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 มีการใช้สับสเตรทไปเท่ากับ 22.2% ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติม FOS ซึ่งมากกว่าในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3, RS2 และ RS4 ตามลำดับ จากการศึกษาการหมักแป้ง RS ในระดับ *in vitro* ของ Topping and Clifton (2001) โดยใช้อุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีแสดงให้เห็นว่าการเจริญของแบคทีเรียและผลผลิตที่ได้จากการหมักแป้ง RS จะแตกต่างกันระหว่างแหล่งที่มาและประเภทของแป้ง RS Lesmes et al. (2008) ได้ศึกษาผลของแป้ง RS3 ด้วยการทดลองแบบ *in vitro* พบว่าโครงสร้างผลึกที่หนาแน่นของแป้ง RS3 มีผลต่อความสามารถในการหมักของแบคทีเรียในลำไส้ และจำนวนของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลต่อปริมาณกรดแล็กติกและไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.9 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 % เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	**การเจริญ (Log CFU/mL)**	**pH^{n}**	**น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)**	**ความเป็นกรดทั้งหมด (%)**
Lactobacillus sp. RCF10				
Glucose	10.24	5.09	29.2±0.013^{a}	1.002±0.038^{a}
FOS	9.89	4.78	21.6±0.012^{b,c}	0.249±0.019^{d}
RS2	9.75	4.62	11.1±0.018^{d,e}	0.357±0.014^{c}
RS3	10.07	4.13	16.2±0.013^{c}	0.534±0.031^{b}
RS4	9.58	5.67	4.7±0.019^{e}	0.162±0.018^{e}
Lactobacillus sp. MRF4				
Glucose	10.28	4.45	27.4±0.014^{a}	1.200±0.087^{a}
FOS	9.88	4.64	19.8±0.016^{b}	0.255±0.019^{c}
RS2	9.73	4.72	19.9±0.016^{b}	0.291±0.014^{c}
RS3	10.13	4.37	15.2±0.010^{c}	0.570±0.023^{b}
RS4	9.27	5.50	5.2±0.013^{d}	0.183±0.034^{c}
Streptococcus sp. SFF5				
Glucose	10.32	4.46	26.9±0.013^{a}	0.906±0.028^{a}
FOS	9.77	4.72	22.2±0.014^{b}	0.252±0.018^{d}
RS2	9.72	4.49	11.3±0.011^{d,e}	0.339±0.023^{c}
RS3	10.31	4.22	16.8±0.013^{c}	0.435±0.014^{b}
RS4	9.69	6.01	7.05±0.017^{e}	0.183±0.019^{e}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

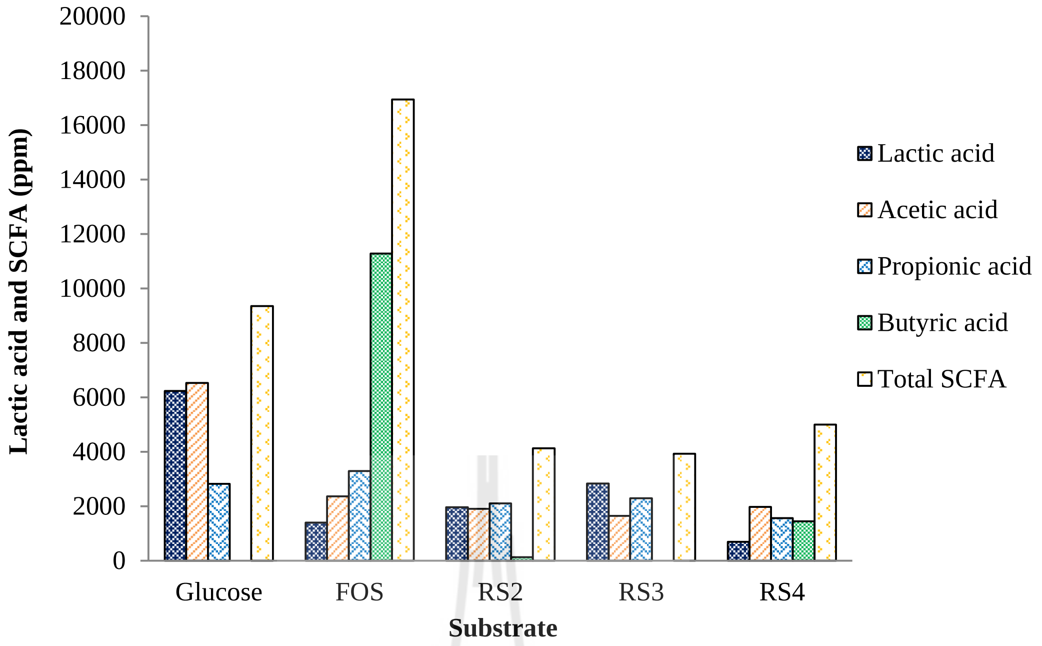
^{n} ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองของ Kleessen et al. (1997) ซึ่งได้ใช้ RS2 และ RS3 ปริมาณ 10 % ผสมในอาหารให้หนูทดลองกินเป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่าหนูที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS ทั้ง

2 ประเภท มีการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม bifidobacteria เป็นส่วนใหญ่ และมีปริมาณมากกว่าในตัวอย่างควบคุมอย่างเห็นได้ชัด และหนูที่ได้รับแป้ง RS3 มีการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli, enterococci และ streptococci มากกว่าในหนูที่ได้รับแป้ง RS2 เมื่อวัดปริมาณกรดไขมันสายสั้น โดยหลักๆจะพบกรดอะซิติก ซึ่งมีค่าอัตราส่วนอยู่ช่วงระหว่าง 64-69% และพบกรดโพรพิโอนิกในตัวอย่างที่เติมแป้ง RS3 ปริมาณมากกว่าแป้ง RS2 ส่วนกรดบิวทิริกพบในตัวอย่างที่เติมแป้ง RS2 มากกว่าแป้ง RS3 และจากผลการทดลองของ Brown et al. (1997) ได้ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS2 ในหมูเพศผู้ 12 ตัว โดยเปรียบเทียบระหว่างแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ (low-amylomaize starch) กับแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสสูง (high-amylomaize starch) ติดตามปริมาณอุจจาระและกรดไขมันสายสั้น โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริก และตรวจววัดปริมาณการเจริญของ bifidobacteria ต่อกรัมของอุจจาระ พบว่า high-amylomaize starch สามารถกระตุ้นการเจริญของ bifidobacteria ได้ดีทั้งยังมีการผลิตกรดไขในสายสั้นได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ low-amylomaize starch และให้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกันกับ FOS

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่ได้ ภายหลังการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแป้ง RS2, RS3, RS4 และเปรียบเทียบกับ FOS พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการผสมน้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 3.4) พบว่ามีปริมาณกรดแล็กติกสูงที่สุดเท่ากับ 6,240 ppm ในขณะที่ในอาหารสูตรที่มีแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณเท่ากับ 2,840 ppm ซึ่งแป้ง RS3 เป็นประเภทของแป้งที่กระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าแป้ง RS2, FOS และ RS 4 มีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับ 1,960, 1,400 และ 695 ppm ตามลำดับ พิจารณาจากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่ามีความสอดคล้องกันระหว่าง ปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้ กับค่าการเจริญ ความเป็นกรดทั้งหมด และปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป เห็นได้จากในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีการเติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียได้ดี และสามารถผลิตกรดทั้งหมดได้ดีกว่า RS2 และ RS4 จึงมีการใช้สับสเตรทมากกว่าและสามรถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่า

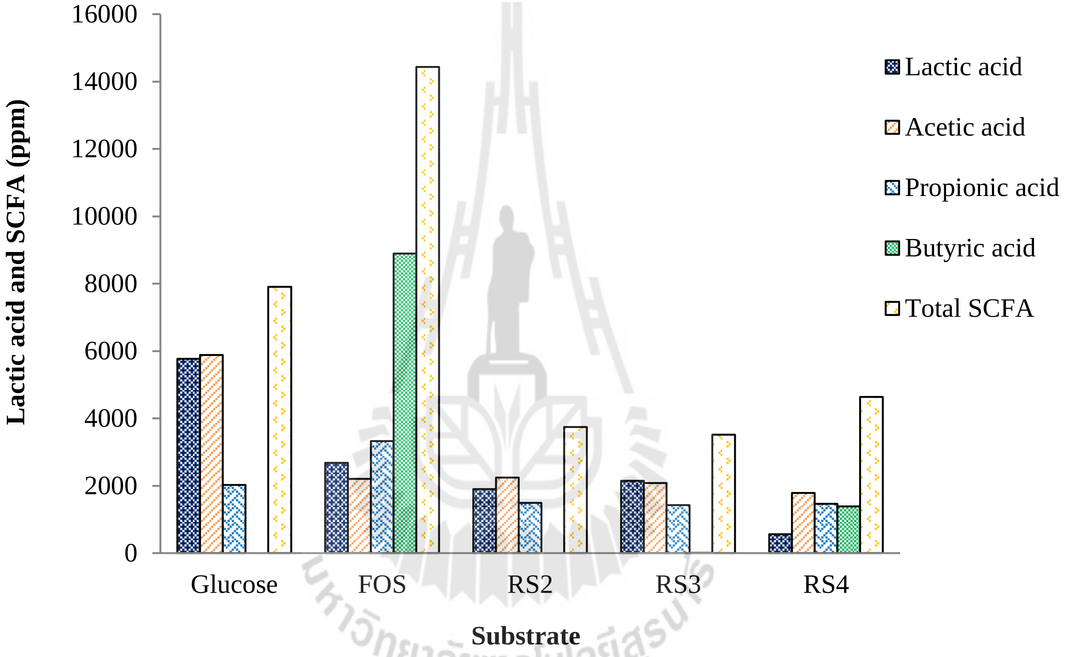
เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้น พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก เท่ากับ 11,280 3,295 และ 2,370 ppm ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS2 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่ากรดอะซิติก และกรดบิวทิริก เท่ากับ 2,105, 1,900 และ 125 ppm ตามลำดับ



ภาพที่ 3.4 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในขณะที่ในอาหารสูตรที่มีแป้ง RS3 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่ากรดอะซิติก เท่ากับ 2,290 และ 1,645 ppm ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่า กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก มีค่าเท่ากับ 1,980 1,570 และ 1,445 ppm ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (ภาพที่ 3.5) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีปริมาณกรดแล็กติกสูงที่สุดเท่ากับ 5,770 ppm ในขณะที่ในอาหารสูตรที่เติม FOS แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณเท่ากับ 2,685 ppm และเป็นประเภทของสับสเตรทที่กระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3, RS2 และ RS4 ตามลำดับ มีค่าปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับ 2,150, 1,900 และ 560 ppm ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้นแต่ละประเภท พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้มากกว่ากรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 5,885 และ 2,020 ppm ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส และไม่มีการผลิตกรดบิวทีริก ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดบิวทีริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก เท่ากับ 8,890, 3,330 และ 2,210 ppm ตามลำดับ และอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS2 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 2,245 และ 1,495 ppm ตามลำดับ และไม่ผลิตกรดบิวทีริก ในขณะที่ในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3 พบว่ามีกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก เท่ากับ 2,080, 1,430 และ 5 ppm ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรด

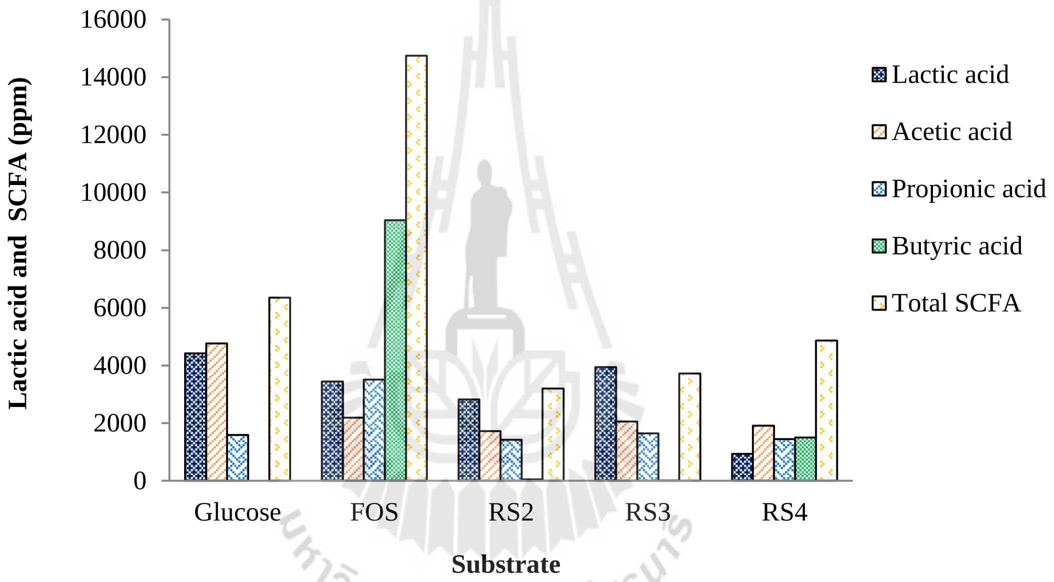
โพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เท่ากับ 1,790, 1,460 และ 1,385 ppm ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวนี้จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. MRF4 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นประเภทกรดอะซิติกได้ในอาหารสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคสมากกว่าสูตรที่เติมแป้ง RS2, FOS, RS3 และ RS4 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ในอาหารสูตรที่เติม FOS มากกว่าในสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS3 และ RS4 ส่วนกรดบิวทิริกสามารผลิตได้ดีในอาหารสูตรที่เติม FOS มากกว่าแป้ง RS4 และ RS3 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 3.5 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ภาพที่ 3.6) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสพบว่ามีปริมาณกรดแล็กติกสูงที่สุดเท่ากับ 4,420 ppm ในขณะที่ในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้เท่ากับ 3,940 ppm และเป็นประเภทของแป้งที่กระตุ้นให้เชื้อสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS, แป้ง RS2 และ RS4 ซึ่งมีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับ 3,450, 2,820 และ 940 ppm ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้น พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 4,765 และ 1,590 ppm ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรด

โพรพิโอนิก และกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 9,040, 3,510 และ 2,195 ppm ตามลำดับ ขณะที่อาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก มีค่าเท่ากับ 1,720, 1,425 และ 50 ppm ตามลำดับ และเช่นเดียวกันในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่าโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เท่ากับ 2,055, 1,650 และ 20 ppm ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS4 พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 1,915, 1,505 และ 1,450 ppm ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวนี้จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* sp. SFF5 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีในอาหารสูตรที่เติม FOS มากกว่าแป้ง RS3, RS4 และ RS2 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 3.6 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคสเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกจากอุจจาระของอาสาสมัครทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีในอาหารสูตรที่เติม FOS โดยเฉพาะกรดบิวทิริกทีมีปริมาณมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก ตามลำดับ และมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS2, RS3 และ RS4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ถึงแม้ว่ากรดไขมันสายสั้นทุกประเภทจะมีหน้าที่สำคัญในการช่วยบำรุงรักษาเยื่อบุผิวในระบบลำไส้ แต่กรดบิวทิริกเป็นกรดไขในสายสั้นที่มีรายงานผลการทดลองที่หลากหลายเกี่ยวกับประโยชน์หลัก ๆ ต่อสุขภาพของผู้บริโภคในด้านการช่วยลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ (Leleu et al., 2007; Sengupta et al., 2006; Mentschel and Claus, 2003; Hague et al., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกจากอุจจาระของอาสาสมัครทั้ง 3

สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่จะใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทได้น้อยกว่า FOS จากค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังมีการผลิตกรดไขมันสายสั้นทั้งหมดได้น้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องตามโครงสร้างของแป้ง RS แต่ละประเภทที่มีลักษณะซับซ้อนมากกว่า FOS โดยเป็นสายของพอลิเมอร์ที่เรียงชิดติดกัน มีส่วนที่มีความเป็นผลึกสูง ทั้งยังมีหมู่แทนที่แทรกระหว่างโครงสร้าง ทำให้แบคทีเรียใช้ได้ยากแบคทีเรียจึงสามารถใช้แป้ง RS ได้เฉพาะส่วนที่มีการบวมน้ำ และสูญเสียโครงสร้างไปในระหว่างที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนทำการทดลอง (Sajilata et al., 2006; Sharma et al., 2008) เนื่องจากโดยธรรมชาติแล้ว แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาใช้เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปเป็นสับสเตรทในการเจริญได้ดีกว่าแป้ง (Wood and Holzapfel, 1995) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า FOS เป็นสับสเตรทที่มีโครงสร้างที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการเจริญและการผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีมากกว่าแป้ง RS ทั้ง 3 ประเภท และมากกว่าสับสเตรทประเภทอื่น เช่น inulin, Polydextrose, และ Isomaltooligosaccharides ซึ่งมีโครงสร้างที่มีความซับซ้อนมากกว่า (Ghoddusi et al., 2007; Beards, Tuohy and Gibson, 2010) และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pompei et al. (2008) ได้ศึกษาผลของ oligofructose (OF) และ inulin ต่อการเจริญของ แบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัคร 7 ราย เมื่อตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ พบว่าพรีไบโอติกทั้ง 2 ประเภท สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ในสกุล bifidobacteira และ lactobacilli ได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นพบว่ามีกรดอะซิติกและกรดแล็กติกเป็นผลผลิตหลักจากการหมัก OF ซึ่งสัมพันธ์กันกับค่า pHที่ลดลง และมีปริมาณกรดไขมันสายสั้นมากกว่าเมื่อเทียบกับ inulin ส่วนในผลการทดลองในการใช้ FOS และแป้ง RS ผสมในอาหารสำหรับหนูทดลอง และวัดค่าpHภายในลำไส้ของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสม FOS มีค่าความเป็นกรดในลำไส้มากกว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสมแป้ง RS และเมื่อวัดค่าอัตราการเจริญระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่าในลำไส้ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกทั้งสองประเภทนี้ มีค่าอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มากกว่าแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ทั้ง FOS และ RS ซึ่งมีค่าการเจริญแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไม่ต่างกันทางสถิติ (Rodriguez-Cabezas ME et al., 2010)

4.2.5 การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง

ในการทดลองนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีทั้ง 3 สายพันธุ์ (*Lactobacillus* sp. RCF10, *Lactobacillus* sp. MRF4 และ *Streptococcus* sp. SFF5) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแป้ง RS2, RS3, RS4 และเปรียบเทียบกับ FOS ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 1 แทนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สูตรที่ 3 ตารางที่ 3.1) โดยการจำลองสภาวะการย่อยสับสเตรททุกประเภทผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (ดัดแปลงวิธีการจาก Słominska et al., 2010 และ Goderska et al., 2008) จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะของลำไส้ใหญ่แบบจำลองเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญ และการผลิตกรดทั้งหมดที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) จากตารางที่ 3.10 พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 สามารถใช้แป้ง RS3 ได้ดีกว่า RS2, RS4 และ FOS จากค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกันในช่วง 8.81-9.86 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงเฉลี่ยในช่วง 4.68-5.33 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดในช่วง 0.255%-0.387% เมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปก็พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปมากที่สุดเท่ากับ 41.4% และสูตรที่เติมแป้ง RS3 มีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปมากกว่าในสูตรที่เติม FOS, RS2 และ RS4 มีค่า 23.0%, 15.8%, 14.8% และ 7.6% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าความเป็นกรดทั้งหมดและปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป จะเห็นได้ว่าเมื่อเทียบระหว่างประเภทของแป้ง RS พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียและผลิตกรดทั้งหมดได้ดีกว่าดังนั้นจึงมีการใช้สับสเตรทมากกว่าเมื่อเทียบกับแป้ง RS2 และ RS4 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Silivi et al. (1999) ศึกษาผลของแป้ง RS3 ต่อการเจริญของเชื้อจากลำไส้หนูทดลอง พบว่าแป้ง RS3 15 กรัมต่อ 100 กรัมอาหาร มีผลช่วยให้ปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria เพิ่มขึ้นได้ $10\text{-}10^2$ CFUต่อมิลลิลิตร และยังมีผลต่อการลดจำนวนของ enterobacteria ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้แป้ง RS3 ยังมีผลส่งเสริมการผลิตกรดบิวทิริกในหนูทดลอง และช่วยลดปริมาณการผลิตแอมโมเนียและลดค่า pH ในกระพุ้งลำไส้ได้

ตารางที่ 3.10 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองสภาวะการย่อยผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนนาน 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	**การเจริญ (Log CFU/mL)**	**pH[n]**	**น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)**	**ความเป็นกรดทั้งหมด (%)**
Lactobacillus sp. RCF10				
Glucose	10.20	4.23	41.4±0.023[a]	0.687±0.032[a]
FOS	9.63	5.20	15.8±0.014[c]	0.261±0.027[c]
RS2	9.06	5.33	14.8±0.021[c]	0.255±0.011[c]
RS3	9.86	4.68	23.0±0.023[b]	0.387±0.027[b]
RS4	8.81	5.32	7.6±0.027[d]	0.297±0.014[c]
Lactobacillus sp. MRF4				
Glucose	9.92	4.57	39.4±0.024[a]	0.601±0.012[a]
FOS	9.08	5.15	12.3±0.013[d,e]	0.255±0.023[c]
RS2	9.33	5.23	19.9±0.016[c]	0.270±0.010[c]
RS3	9.90	4.91	27.7±0.023[b]	0.342±0.018[b]
RS4	8.76	5.46	5.6±0.012[e]	0.297±0.014[c]
Streptococcus sp. SFF5				
Glucose	9.83	5.02	39.0±0.013[a]	0.510±0.032[a]
FOS	8.67	5.16	16.6±0.011[b]	0.264±0.021[c]
RS2	8.85	5.29	9.3±0.018[c]	0.273±0.011[c]
RS3	9.26	4.88	15.3±0.021[b]	0.333±0.014[b]
RS4	8.64	5.42	9.5±0.029[c]	0.243±0.014[c]

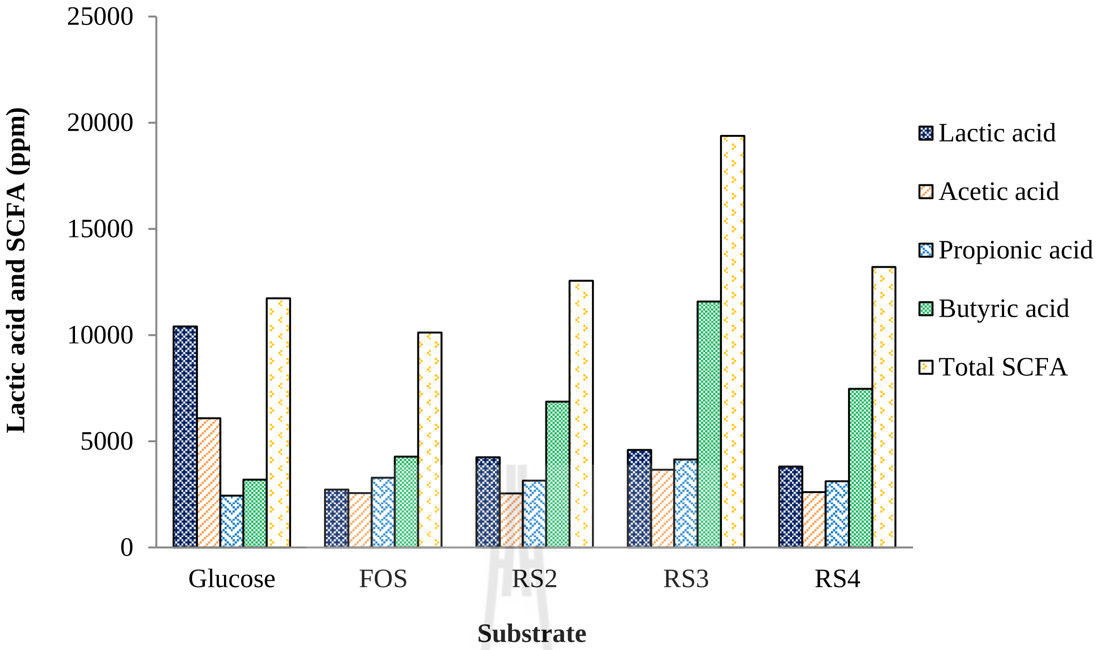
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[n] ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 8.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ในทำนองเดียวกันการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (ตารางที่ 3.10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียได้ดีใกล้เคียงกันเท่ากับ 9.90-9.92 Log CFUต่อมิลลิลิตร มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.601% และ 0.342% ตามลำดับ และมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 39.4% และ 27.7% ตามลำดับ ในขณะที่ในสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS4 และ FOS พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 8.76-9.33 Log CFU ต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ เท่ากับ 0.270%, 0.264% และ 0.255% ตามลำดับ และมีค่าสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 19.9%, 5.6% และ 12.3% ตามลำดับ

จากการทดลองแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ตารางที่ 3.10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 0.510% ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS3, RS3 และ FOS พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส มีค่าการเจริญในช่วง 8.64-9.26 Log CFUต่อมิลลิลิตร และค่า pH ลดลงเฉลี่ยในช่วง 4.88-5.42 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดในช่วง 0.243%-0.333% จากการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จำลองสภาวะการย่อยสับสเตรทผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) จากภาพที่ 3.7 เมื่อทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการผสมน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีปริมาณกรดแล็กติกสูงที่สุดเท่ากับ 10,410 ppm ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณเท่ากับ 4,600 ppm และเป็นประเภทของแป้งที่กระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมแป้ง RS2, RS4 และ FOS ตามลำดับ มีค่าปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับ 4,240, 3,810 และ 2,730 ppm ตามลำดับ

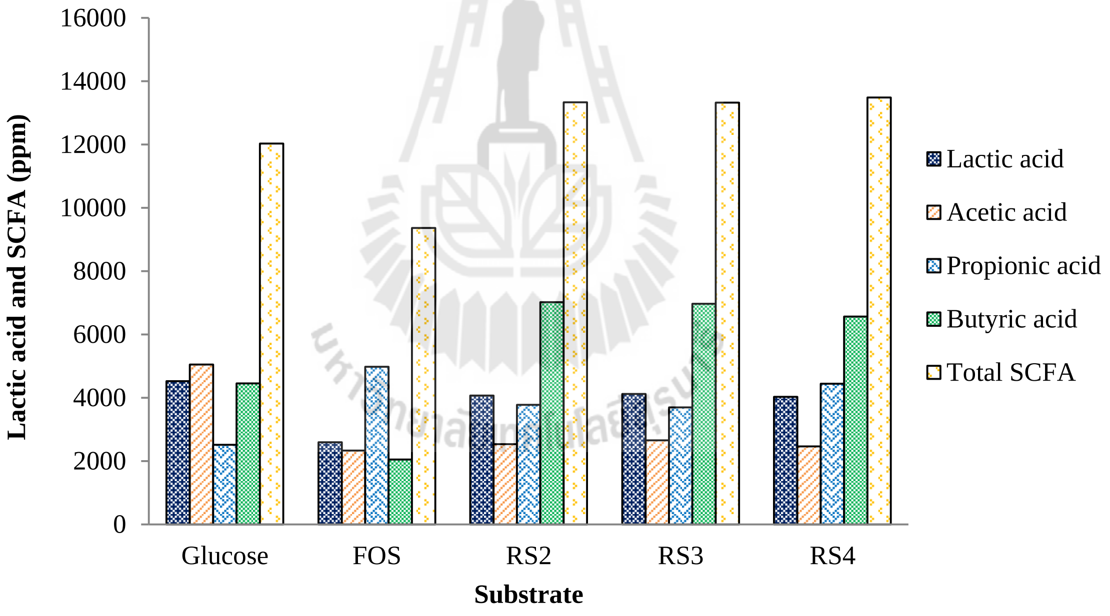


ภาพที่ 3.7 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้นจากภาพที่ 3.7 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 6,085, 3,200 และ 2,440 ppm ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดบิวทีริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 4,275, 3,285 และ 2,560 ppm ตามลำดับ และเช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแป้ง RS2 มีปริมาณกรดบิวทีริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 6870, 3,150 และ 2,540 ppm ตามลำดับ ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแป้ง RS3 มีปริมาณกรดบิวทีริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 11,575, 4,145 และ 3,660 ppm ตามลำดับ และเช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแป้ง RS4 มีปริมาณกรดบิวทีริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 7,475, 3,125 และ 2,610 ppm ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. RCF10 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 และมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS4 และ FOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่ามีปริมาณกรดบิวทีริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ตามลำดับ

เมื่อทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (ภาพที่ 3.8) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้ง RS3 พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณเท่ากับ 4,125 ppm และเป็นปริมาณที่

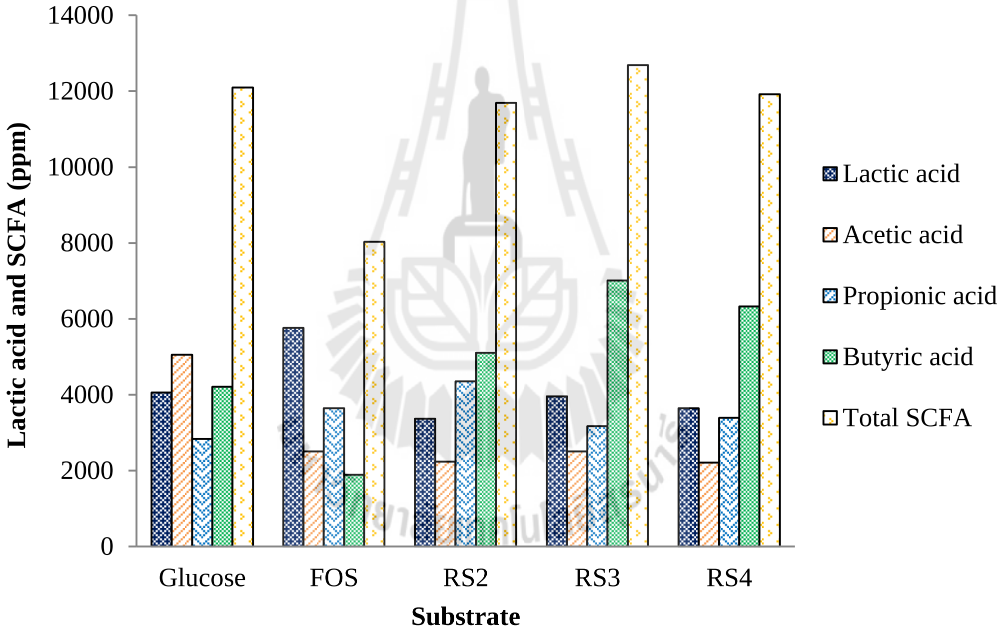
ใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมแป้ง RS2 และ RS4 ซึ่งมีค่าปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 4,075 และ 4,030 ppm ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2,595 ppm และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้นพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS3 และ RS4 มีกรดไขมันสายสั้นในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีกรดบิวทิริกปริมาณมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่ากรดอะซิติก และกรดบิวทิริก มีค่าเท่ากับ 4,980, 2,335 และ 2,050 ppm ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าแป้ง RS2, RS3 และ RS4 มีศักยภาพในการกระตุ้นให้แบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 มีการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นประเภทกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริกได้ดีไม่แตกต่างกันในระหว่างประเภทของแป้งและยังสามารถกระตุ้นให้แบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 มีการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นทั้งหมดได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ FOS พรีไบโอติกทางการค้าที่สามารถจัดหาได้ง่ายและมีการนำมาใช้เสริมสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพอย่างแพร่หลาย



ภาพที่ 3.8 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ภาพที่ 3.9) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี FOS พบว่ามีปริมาณกรดแล็กติกสูงที่สุดเท่ากับ 5,760 ppm ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณเท่ากับ 3,955 ppm และมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS4 และ RS2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3,640 และ 3,365 ppm ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้น จะ

เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* sp. SFF5 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 มีปริมาณกรดบิวทิริกสูงถึง 7,010 ppm ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับแป้ง RS4, RS2 และ FOS ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกันระหว่างปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้กับค่าการเจริญ ค่าความเป็นกรดทั้งหมด และปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการผลิตกรดทั้งหมดของแบคทีเรียได้ดีกว่าแป้ง RS2, RS4 และ FOS จึงมีการใช้สับสเตรทมากกว่าและยังสามารถผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ดีกว่า คล้ายกันกับผลการทดลองของ Dongowski et al. (2005) และ Jacobasch et al. (2006) ศึกษาสมบัติความเป็น พรีไบโอติกของแป้ง RS3 ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 มีการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม bifidobacteria ได้ดีและส่งผลให้สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นเพิ่มมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร และมีผลต่อการลดลงของค่า pH ในลำไส้ใหญ่ และอุจจาระของหนูทดลอง



ภาพที่ 3.9 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการจำลองสภาวะการถูกย่อยผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ มีผลทำให้แป้ง RS ทั้ง 3 ประเภทมีโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสัดส่วนของน้ำมากเมื่อมีการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส และก่อนทำการทดลองทำให้โครงสร้างของแป้งถูกทำลายไปบางส่วน (Hararumpu, (2000) เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารจึงสามารถเข้าไปย่อยแป้งในส่วนที่สูญเสียโครงสร้างนั้นได้ จึงส่งผลให้แบคทีเรียสามารถใช้แป้ง

RS เป็นสับสเตรทได้ดีขึ้น อีกทั้งยังมีศักยภาพในการกระตุ้นการผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีกว่า FOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในทางเดียวกัน Maathuis et al. (2008) ได้ทดลองศึกษาผลความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS ที่ได้จากผลิตภัณฑ์แป้งข้าวโพด ทำการทดลองแบบ *in vitro* ติดตามกิจกรรมและการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ โดยได้จำลองการย่อยแป้ง RS ผ่านระบบลำไส้ (pre- digested) แล้วดึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (di-saccharides) ออกแล้วจึงนำพอลิเมอร์ที่เหลือไปหมักกับจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ใหญ่ แบบจำลอง พบว่าแป้ง RS มีผลช่วยช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสกุล bifidobacteria และ lactobacilli ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันสายสั้นได้ดี และพบว่ามีการผลิตกรดแล็กติกในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันสายสั้น ซึ่งการหมักของคาร์โบไฮเดรตหลัก ๆ จะเกิดขึ้นที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น และผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการหมักประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้นได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก (Macfarlane and Cumming, 1992; Roberfroid, 2005a)

4.3 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร

4.3.1 การคัดเลือกปริมาณเชื้อที่เหมาะสม

การทดลองเพื่อทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ได้ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ซึ่งมีส่วนประกอบของธาตุอาหารตามสูตรของ Hashemi et al. (2013) เติมตัวแทนแป้งต้านทาน ได้แก่ แป้ง RS3 ความเข้มข้น 1% เป็นสับสเตรท และเติมเชื้อผสมที่ได้จากอุจจาระของอาสาสมัครที่ผ่านการแยกกากออกปริมาณ 5-30% เลี้ยงเชื้อผสมที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า (shaking incubator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากตารางที่ 3.11 พบว่าเชื้อมีการเจริญสูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ 10% โดยมีการเจริญเท่ากับ 9.0 Log CFU ต่อมิลลิลิตร จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.5 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ 5, 20 และ 30% มีการเจริญเท่ากับ 8.0, 8.7 และ 8.1 Log CFUต่อมิลลิลิตร จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.0, 8.7 และ 8.1 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า pH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 3.72-3.96 ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium โดยเฉลี่ยในช่วง 0.57-0.70% จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่น้อยเกินไป จะทำให้การเจริญน้อยตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่น้อย (5%) สามารถทำให้เชื้อเจริญเพิ่มขึ้นได้ถึง 0.9 Log CFU ต่อมิลลิลิตร แสดงถึงประสิทธิภาพการเจริญที่ดีอยู่ในช่วง log phase แต่เมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากเกินไป (20 และ 30%) จะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ และเข้าสู่ช่วง death phase ซึ่งการใช้ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ 20 และ 30% มีแนวโน้มของปริมาณสับสเตรทที่เหลือมากขึ้นคือ 26.4 และ 34.9 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ 10% มีปริมาณสับสเตรทที่เหลือคือ 17.8 แสดงให้เห็นว่าเป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด ผลการทดลองดังกล่าวนี้สอดคล้องกับ Ghoddusi et al., (2007) ซึ่งใช้ FOS,

inulin, isomaltooligosaccharides และ polydextrose เป็นสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร และใช้ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ 10% (โดยปริมาตร) โดยนับเชื้อเริ่มต้น และหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีค่า 8.2 Log CFUต่อมิลลิลิตร และหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมงมีค่า 8.8 Log CFUต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Mandalari et al., (2010) ซึ่งได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของผิวอัลมอนด์ โดยใช้ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ 10% (โดยน้ำหนัก) และนับเชื้อเริ่มต้นได้ 9.15 Log CFUต่อมิลลิลิตร และหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมงได้ 9.24 Log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้ปัจจัยในการเจริญของเชื้อผสมขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท รวมทั้งถิ่นที่อาศัย และพฤติกรรมการบริโภคของอาสาสมัครสุขภาพดีที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อต่อไป

ตารางที่ 3.11 การเจริญ ค่า pH ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติมเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร ปริมาณ 5-30% และบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน 24 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อผสมจากอุจจาระ (%)	การเจริญ (Log CFU/mL)		pH^n	สับสเตรทที่เหลือทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
	0 h	24 h			
5	7.1	8.0	3.89	23.9±0.53	0.59±0.01
10	8.5	9.0	3.72	17.8±0.28	0.70±0.01
20	9.0	8.7	3.8	26.4±0.18	0.67±0.02
30	9.7	8.1	3.96	34.9±0.23	0.57±0.02

^{n} ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.3.2 การคัดเลือกความเข้มข้นของแป้งต้านทานที่เหมาะสม

ในการทดลองนี้ได้มีการหาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อผสมที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อผสม 10% (โดยปริมาตร) และใช้ basal medium ที่เติม FOS และ RS3 ปริมาณ 0.5-2.0% บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากตารางที่ 3.12 พบว่าการใช้ 1.0% FOS (9.11 Log CFUต่อมิลลิลิตร) ให้ค่าการเจริญที่ 24 ชั่วโมงสูงกว่าการใช้ 0.5% FOS (8.85 Log CFUต่อมิลลิลิตร) ผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการใช้ RS3 เป็นสับสเตรท โดยการใช้ 1.0% RS3 (9.19 Log CFUต่อมิลลิลิตร) ให้ค่าการเจริญที่ 24 ชั่วโมงสูงกว่าการใช้ RS3 ที่ความเข้มข้นอื่นๆ การใช้ปริมาณ RS3 ช่วง 0.5-0.8% ส่งผลให้ค่าการเจริญน้อยตามไปด้วยโดยอยู่ในช่วง 8.28-9.03 Log CFUต่อมิลลิลิตรและมีแนวโน้มการเจริญของเชื้อที่ลดลง หรือเข้าสู่ death phase เมื่อใช้ RS3 มากกว่า 1.0% (8.58-

8.65 Log CFUต่อมิลลิลิตร) ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ประเภทของแป้ง และปริมาณแป้งที่ใช้เป็นสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้แป้งของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงเชื้อผสมซึ่งมีองค์ประกอบของเชื้อหลากหลายสายพันธุ์ หากในเชื้อผสมดังกล่าวมีสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้งได้ดี แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมแป้งในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญก็จะส่งผลให้มีอัตราการเจริญต่ำ และสร้างกรดอินทรีย์จากการหมักได้น้อย แต่หากเติมแป้งความเข้มข้นสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ลดปริมาณน้ำอิสระ ส่งผลให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียลดลงได้เช่นกัน สอดคล้องกับผลการทดลองในตารางที่ 3.10 ดังนั้นหากพิจารณาการเจริญของเชื้อเป็นหลัก จะพบว่าปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุดคือ 1.0% (โดยน้ำหนัก) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Palframan et al., (2002); Wynne et al., (2004); Sanz et al., (2005); Wichienchot et al., (2006); Depeint et al., (2008); Barczynska et al., (2010); Barczynska et al., (2012) และ Hashemi et al., (2013) ซึ่งใช้ปริมาณสับสเตรท 1.0% (โดยน้ำหนัก) ในการเลี้ยงเชื้อผสมที่มาจากอุจจาระของมนุษย์เพื่อทดสอบความเป็นพรีไบโอติกของสับสเตรทชนิดต่างๆกัน เมื่อพิจารณาค่า pH จากการใช้ FOS และ RS3 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 3.84-4.42 และค่าความเป็นกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.23-0.50% อีกทั้ง 1.0% FOS และ 1% RS3 ให้ค่า pH ต่ำที่สุด คือ 3.84 และ 4.07 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดสูงที่สุด คือ 0.50 และ 0.32% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ RS3 ให้มากกว่า 1% จะทำให้ปริมาณสับสเตรทที่เหลืออยู่เพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับเหตุผลที่ว่าการเติมแป้งความเข้มข้นสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ปริมาณน้ำอิสระลดลง ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยลง และเหลือสับสเตรทที่ไม่ได้ถูกใช้งานมากขึ้นอีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

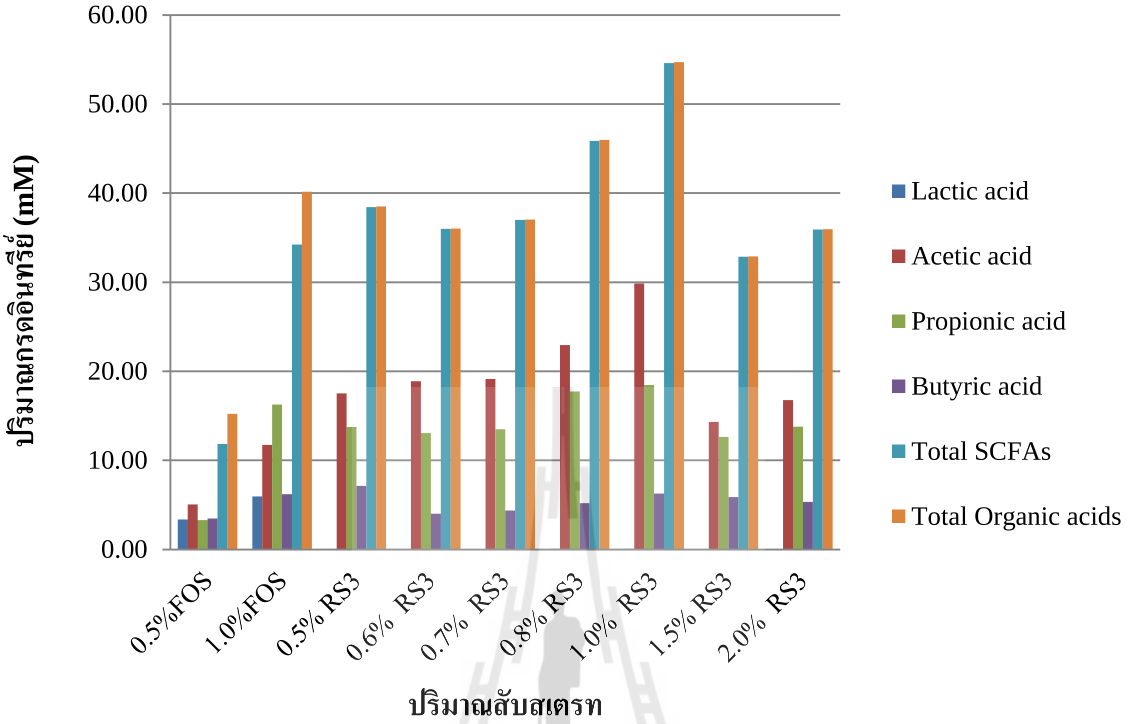
ตารางที่ 3.12 การเจริญ, ค่า pH, ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติม FOS และ RS3 ปริมาณ 0.5-2.0% และบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน 24 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	**การเจริญ (Log CFU/mL)**	**pH**[n]	**สับสเตรทที่เหลือทั้งหมด (%)**	**ความเป็นกรดทั้งหมด (%)**
FOS content (%)				
0.5	8.85	4.20	18.8±2.76	0.27±0.01
1.0	9.11	3.84	35.1±2.83	0.50±0.02
RS3 content (%)				
0.5%	8.44	4.42	32.9±1.70	0.23±0.01
0.6%	8.28	4.33	35.1±2.12	0.23±0.01
0.7%	8.55	4.19	37.3±1.70	0.27±0.01
0.8%	9.03	4.12	37.9±0.35	0.30±0.01
1.0%	9.19	4.07	46.4±2.69	0.32±0.01
1.5% RS3	8.58	4.11	55.8±2.90	0.30±0.01
2.0% RS3	8.65	4.14	62.3±1.13	0.25±0.01

[n] ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และกรดอินทรีย์ทั้งหมดจากภาพที่ 3.10 พบว่าการใช้ 1% FOS ให้ปริมาณกรดแอซีติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริกสูงที่สุด คือ 11.74, 16.28 และ 6.19 mM ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้ 0.5% FOS ในขณะที่การใช้ 1% RS3 ให้ปริมาณกรดแอซีติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริกสูงที่สุดเช่นกัน คือ 29.85, 18.46 และ 6.29 mM ตามลำดับ ส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันสายสั้นโดยรวมมีค่ามากที่สุด เปรียบเทียบกับการใช้ RS3 ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณกรดแล็กติก พบว่าการใช้ FOS ให้ปริมาณกรดแล็กติกอยู่ในช่วง 3.36-5.96 mM ในขณะที่ RS3 ทำให้เกิดปริมาณกรดแล็กติกที่น้อยมากโดยอยู่ในช่วง 0.03-0.09 mM ทั้งนี้เนื่องจากกรดแล็กติกจะเกิดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กๆได้ดีกว่า โดยเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท (pyruvate) และถูกรีดิวซ์กลายเป็นแล็กเตท (lactate) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่ซับซ้อน (den Besten et al., 2013) แตกต่างจากกระบวนการเปลี่ยนเป็นต้านทานเป็นกรดไขมันสายสั้นที่มีความซับซ้อนกว่า ปริมาณกรดไขมันสายสั้น และกรดอินทรีย์ทั้งหมดที่มากที่สุดได้มากจากการใช้ 1% RS3 ดังนั้นการเติมเชื้อผสมปริมาณ 10% (โดยปริมาตร) ต่อการใช้สับสเตรท

1% (โดยน้ำหนัก) จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการทดลองเพื่อให้เกิดผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากที่สุด



ภาพที่ 3.10 ปริมาณกรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และกรดอินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเหลวที่เติม FOS หรือ RS3 ปริมาณ 0.5-2.0% แทนน้ำตาลกลูโคสหลังการเจริญของเชื้อผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.3 การคัดเลือกหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

การหาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ และกรดไขมันสายสั้นสูงที่สุด ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อผสมจากอาสาสมัครโดยใช้เชื้อผสมปริมาณ 10% (โดยปริมาตร) ต่อการใช้สับสเตรท 1% (โดยน้ำหนัก) โดยบ่มเป็นเวลา 20, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง โดยนับเชื้อเริ่มต้นได้ 8.5 Log CFUต่อมิลลิลิตร จากตารางที่ 3.12 เมื่อเวลาผ่านไป 20, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็น 8.80, 9.05, 8.53 และ 3.59 Log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปนานกว่า 30 ชั่วโมง เชื้อจะเข้าสู่ช่วง stationery phase และ death phase ทำให้ปริมาณเชื้อลดลง การบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อยังคงอยู่ในช่วง log phase ทำให้ได้ปริมาณเชื้อสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม ค่า pH ที่ได้ เมื่อเวลาการบ่มผ่านไป 20, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง คือ 4.42, 3.89, 3.74 และ 3.66 ตามลำดับ สอดคล้องกับค่าปริมาณกรดทั้งหมด ได้แก่ 0.22, 0.34, 0.44 และ 0.53% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไปจะพบว่าปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณเชื้อค่อยๆลดลง ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดที่ยังคงปริมาณเชื้อในช่วง log phase และปริมาณกรดทั้งหมดที่ยอมรับได้คือที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม นอกจากนี้ เมื่อเวลาในการบ่ม

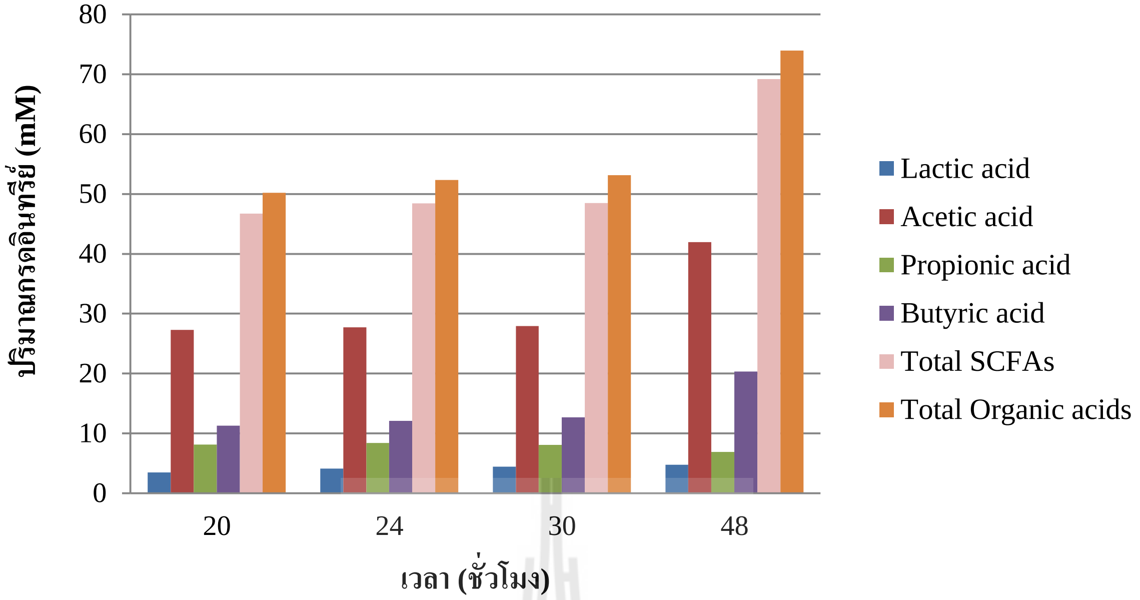
ยาวนานขึ้น จะส่งผลให้การใช้สับสเตรทของเชื้อดีขึ้น ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 3.13 ซึ่งปริมาณสับสเตรทลดลง การทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Palframan et al., (2002) และ Manderson et al., (2005) ซึ่งศึกษาการใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ inulin, FOS เป็นต้น บ่มด้วยเชื้อผสมที่มากจากอุจจาระเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกและกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้น ทั้งนี้การบ่มที่เวลา 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับระยะเวลาที่อาหารที่ไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็กตกค้างอยู่นานที่สุดในลำไส้ใหญ่ (Proano et al., 1990) ซึ่งเป็นเวลาที่สามารถเลียนแบบระบบการหมักภายในลำไส้ใหญ่ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 3.13 การเจริญ ค่า pH ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติมแป้งต้านทานชนิดที่ 3 ปริมาณ 1% และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20-48 ชั่วโมง

เวลาที่ใช้ในการบ่ม (ชั่วโมง)	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH^{n}	สับสเตรทที่เหลือทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
20	8.80	4.42	61.8±0.04	0.22±0.01
24	9.05	3.89	32.0±0.04	0.34±0.01
30	8.53	3.74	30.8±0.04	0.44±0.02
48	3.59	3.66	29.2±0.08	0.53±0.02

^{n} ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองภาพที่ 3.10 แสดงให้เห็นว่าเชื้อผสมจากอาสาสมัคร สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีเมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้น โดยเฉพาะกรดอะซิติก ทีมีปริมาณมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก ตามลำดับ โดยเมื่อบ่มที่เวลา 20, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณกรดอะซีติกในช่วง 27.31-41.94 มิลลิโมลาร์, ปริมาณกรดโพรพิโอนิกในช่วง 6.92-8.40 มิลลิโมลาร์ และปริมาณกรดบิวทิริกในช่วง 11.3-20.33 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ปริมาณกรดแล็กติกมีค่าอยู่ในช่วง 3.46-4.76 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณเชื้อจากตารางที่ 3.12 ร่วมกับปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ได้จากภาพที่ 3.11 จะพบว่าระยะเวลาการบ่มที่ดีที่สุดคือที่ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมและอยู่ในช่วง log phase



ภาพที่ 3.11 กรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเหลวที่เติม RS3 ปริมาณ 1.0% แทนน้ำตาลกลูโคส หลังการเจริญของเชื้อผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20-48 ชั่วโมง

4.3.4 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร

การทดลองเลี้ยงแบคทีเรียผสมที่มาจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแป้ง RS2, RS3, RS4 และเปรียบเทียบกับ FOS ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 1 แทนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (basal medium) โดยการจำลองสภาวะการย่อยสับสเตรททุกประเภทผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะของลำไส้ใหญ่แบบจำลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญและการผลิตกรดทั้งหมดที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) จากตารางที่ 3.14 พบว่าเชื้อผสมจากอุจจาระสามารถใช้แป้ง RS3 ได้ดีกว่า RS2, RS4 และ FOS จากค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกันในช่วง 9.19-9.76 Log CFUต่อมิลลิลิตร ค่า pH ลดลงเฉลี่ยในช่วง 3.67-4.37 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดในช่วง 0.32%-0.67% เมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปก็พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณสับสเตรทที่เหลืออยู่น้อยที่สุดเท่ากับ 14.20% และสูตรที่เติม RS3 มีปริมาณสับสเตรทที่เหลืออยู่ (24.5%) น้อยกว่าในสูตรที่เติม FOS, RS2 และ RS4 ซึ่งมีค่า 25.0, 46.3 และ 34.20% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าความเป็นกรดทั้งหมดและปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป จะเห็นได้ว่าเมื่อเทียบระหว่างประเภทของแป้ง RS พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียและผลิตกรดทั้งหมดได้ดีกว่า ดังนั้นจึงมีการใช้สับสเตรทมากกว่าเมื่อเทียบกับแป้ง RS2 และ RS4 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Silivi et al. (1999) ศึกษาผลของ RS3 ต่อการเจริญของเชื้อจากลำไส้หนูทดลอง พบว่า RS3 มีผลช่วย

ให้ปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria เพิ่มขึ้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้แป้ง RS3 ยังมีผลส่งเสริมการผลิตกรดบิวทิริกในหนูทดลอง และลดค่า pH ในลำไส้ใหญ่ได้ สอดคล้องกับการลดลงของค่า pH และการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดเมื่อใช้ RS3 เป็นสับสเตรท (ตารางที่ 3.14) เมื่อเปรียบเทียบกับ RS2 และ RS4

ตารางที่ 3.14 การเจริญ ค่า pH ปริมาณสับสเตรทที่เหลือทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium ที่เติมแป้งต้านทานปริมาณ 1% เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFUต่อมิลลิลิตร)	pH^n	สับสเตรทที่เหลือทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
Glucose	9.99 ± 0.53^a	3.67 ± 0.05^a	14.20 ± 0.90^a	0.69 ± 0.05^a
FOS	9.75 ± 0.52^a	3.67 ± 0.09^a	25.00 ± 3.12^b	0.67 ± 0.06^a
RS2	9.19 ± 0.65^a	4.37 ± 0.27^b	46.30 ± 8.29^d	0.32 ± 0.04^c
RS3	9.76 ± 0.51^a	$3.99\pm0.15^{a,b}$	24.50 ± 4.26^b	0.50 ± 0.11^b
RS4	9.66 ± 0.48^a	4.29 ± 0.44^b	34.20 ± 3.35^c	0.37 ± 0.06^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^{n} ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้น (ตารางที่ 3.15) พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกัน โดยกรดแล็กติกที่วิเคราะห์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติม RS2, RS3 และ RS4 มีปริมาณค่อนข้างน้อยมาก และมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ที่ช่วงระหว่าง 4.17-8.62 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ glucose และ FOS ซึ่งมีค่า 12.10 และ11.45 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณแตกต่างกันตามประเภทของสับสเตรท พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 23.85, 4.92 และ 5.29 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS2 และเช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 ก็พบว่าปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 32.60, 8.51 และ 6.07 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 29.21, 8.61 และ 5.71 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 37.88, 5.66 และ 4.80 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยปริมาณกรด

ไขในสายสั้นพบมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 ทั้งประเภทกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เมื่อเปรียบเทียบกับ FOS, RS2 และ RS4 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า จุลินทรีย์ผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร มีแนวโน้มการผลิตกรดแล็กติกได้ค่อนข้างน้อย แต่สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีโดยเฉพาะกรดอะซิติก และกรดบิวทิริกในทุกประเภทของสับสเตรท ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ในอุจจาระของอาสาสมัครมีเชื้อผสมหลากหลายสายพันธุ์ ทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostriduium* ที่ใช้สามารถแป้งได้และผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีโดยเฉพาะกรดบิวทิริกแล้วสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญให้กับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในกลุ่ม *Lactobacillus* และโดยเฉพาะ *Bifidobacterium* ที่มีภาพแบบกลไกการใช้สับสเตรทที่ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดอะซิติกและกรดแล็กติกในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 จึงส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันสายสั้นประเภทกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงกว่ากรดแล็กติก สอดคล้องกันกับรายงานผลการทดลองของ Renata et al. (2010) ในการใช้ citric acid-modified resistant dextrin เป็นสับสเตรทในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์กลุ่มโพรไบโอติก และจุลินทรีย์จากอุจจาระของอาสาสมัคร 3 ราย พบว่าแบคทีเรียผสมจากอุจจาระจะมีการผลิตกรดไขมันสายสั้นในปริมาณที่มากกว่า เมื่อเทียบกับผลการทดลองของแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยเฉพาะกรดบิวทิริก และกรดอะซิติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium* หรือกรดโพรพิโอนิกที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides* สอดคล้องกับผลการทดลอง Wronkowska et al. (2006) ได้ใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในการหมักกับเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ *Bifidobacterium* แล้วพบว่าในตัวอย่างที่เติมแป้ง RS พบกรดแล็กติกเพียง 12.7%-33.9% และพบกรดอะซิติกในปริมาณ 66.0%-87.3% ส่วนในเชื้อผสมจากลำไส้ของหนูทดลองที่ให้ได้รับอาหารตามปกติ และนำไส้หนูมาหมักกับแป้ง RS พบว่าปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุดถึง 45.9% และมากกว่าโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก มีค่า 6.9% และ 4.8% ตามลำดับ และพบกรดแล็กติกในช่วง 41.9%-43.7%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.15 ปริมาณกรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น และกรดอินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆปริมาณ 1.0% หลังการเจริญของเชื้อผสมที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของกรดอินทรีย์	**ปริมาณกรดอินทรีย์ตามชนิดของสับสเตรท (mM)**				
	Glucose	**FOS**	**RS2**	**RS3**	**RS4**
Lactic acid	12.10[a]	11.45[a]	4.36[b]	8.62[a,b]	4.17[b]
Acetic acid	32.29[a,b]	37.88[a]	23.85[c]	32.60[a,b]	29.21[b,c]
Propionic acid	1.84[b]	4.80[a,b]	5.29[a,b]	6.07[a]	5.71[a]
Butyric acid	0.00[b]	5.26[a]	4.92[a]	8.51[a]	8.61[a]
Total SCFAs	34.13[b]	47.94[a]	34.05[b]	47.18[a]	43.53[a]
Total organic acids	46.23[b,c]	59.38[a]	38.42[c]	55.80[a,b]	47.70[b,c]

4.3.5 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก

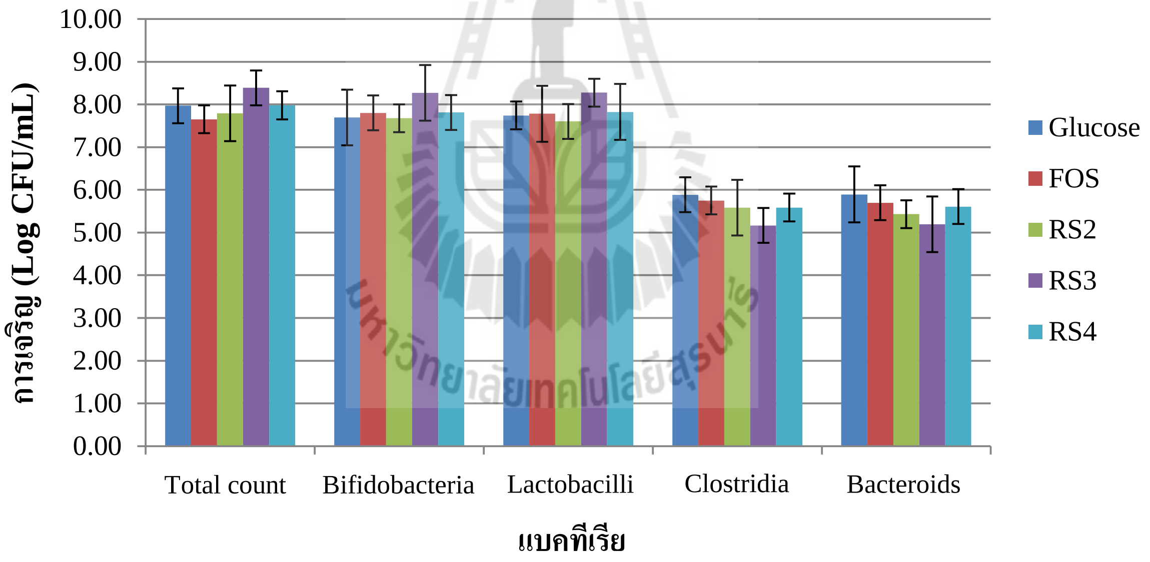
ศักยภาพของแป้งต้านทานต่อคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกได้ทดสอบตามวิธีการของ Palframan, Gibson and Rastall, (2002) โดยนับเชื้อแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของโพรไบโอติกได้แก่ *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp. ส่วนแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Clostridium* sp. (histolyticum subgroup) และ *Bacteroids* sp. และนำมาคำนวณเป็นค่า PI (prebiotic index, PI) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส และ FOS เป็นตัวอย่างควบคุม นับเชื้อดังกล่าวโดยใช้เทคนิค Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) โดยใช้ DNA ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อจากสกุลข้างต้น ดังแสดงในตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.16 ตัวติดตาม (Probe) ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย 4 สกุล เพื่อหาค่า Prebiotic index

Probe	**Bacterial genus**	**Sequence (5' → 3')**	**Reference**
Bif164	*Bifidobacterium*	CATCCGGCATTACCACCC	Langendijk et al. (1995)
Lab158	*Lactobacillus*	GGTATTAGCA(Cต่อT)CTGTTTCCA	Harmsen et al. (1999)
Bac303	*Bactreoids*	CCAATGTGGGGGACCTT	Manz et al. (1996)
Chis150	*Clostridium*	TTATGCGGTATTAATCT(Cต่อT)CCTTT	Harmsen et al. (1999)

จากผลการนับเชื้อดังแสดงในภาพที่ 3.12 พบว่าผลจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ทำให้ปริมาณแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Clostridium* sp. (histolyticum subgroup) และ *Bacteroids* sp. ต่ำกว่าแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของโพรไบโอติกโดยเฉลี่ย 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เวลาในการบ่ม 48

ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องของการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอินทรีย์ (ภาพที่ 3.11) ซึ่งทำให้ค่า pH ลดลง และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้ง RS3 ที่ให้ปริมาณ *Clostridium* spp. (histolyticum subgroup) และ *Bacteroids* spp. ต่ำที่สุด อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคสทำให้แบคทีเรียก่อโรคมีปริมาณมากกว่าการใช้สับสเตรทชนิดอื่นๆอีกด้วย ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงานว่าแป้งต้านทานสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ได้ดี (Fuentes-Zaragoza et al., 2011; Topping & Clifton 2001) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาในสัตว์ทดลองได้แก่ หนู (Rodríguez-Cabezas et al., 2010) โดยให้กลุ่มที่หนึ่งไม่ได้บริโภคแป้งต้านทาน และอีกกลุ่มบริโภคแป้งต้านทานปริมาณ 2 กรัมต่อวันเป็นเวลาสองสัปดาห์ ผลที่ได้ยืนยันประสิทธิภาพของแป้งต้านในการกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้บริโภคแป้งต้านทาน Mackey และ Gibson (1997) รายงานว่า *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ได้เองตามธรรมชาติ ก่อให้เกิดการยังยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองภาพที่ 3.12



ภาพที่ 3.12 การเจริญของแบคทีเรียที่นับจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเป็นตัวแทนของโพรไบโอติก (*Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp.) และแบคทีเรียที่อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรค (*Clostridium* spp. (histolyticum subgroup) และ *Bacteroids* spp.) ใน basal medium ที่เติมแหล่งคาร์บอนปริมาณ 1% เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แป้งต้านทานมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกกล่าวคือมีคุณสมบัติทนต่อการย่อย และการดูดซึมต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งถูกใช้เป็นสับสเตรทสำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ โดยกระตุ้นการเจริญหรือกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพได้ดี ตารางที่ 3.16 แสดงค่า PI ที่คำนวณจากการเจริญของแบคทีเรียในภาพที่ 3.12 พบว่า RS3 มีค่า PI สูงที่สุดคือ 4.82 ในขณะที่ RS2 มีค่า PI เท่ากับ 2.82, RS4 มีค่า PI เท่ากับ 3.44 ซึ่งมากกว่าตัวอย่างควบคุมได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (1.11) และ FOS (2.72) สอดคล้องกับปริมาณเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปตามภาพที่ 3.12 กล่าวคือเมื่ออัตราส่วนของ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ที่เพิ่มขึ้น ต่อ *Clostridium* spp. (histolyticum subgroup) และ *Bacteroids* spp. ที่ลดลง มีความแตกต่างกันมาก จะส่งผลให้ค่า PI ที่คำควณได้มีค่ามากตามไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือ RS3 และผลที่ได้ยังสอดคล้องกับปริมาณ propionic acid และ butyric acid ที่ได้จากการใช้ RS3 เป็นสับสเตรท ตารางที่ 3.17 ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าการใช้สับสเตรทชนิดอื่นๆอีกด้วย ซึ่งผลทีได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับ Śliżewska, (2013) ซึ่งศึกษาการดัดแปรแป้งด้วยกรดซิตริก จากนั้นใช้แป้งต้านทานที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวปริมาณ 1% เป็นสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทดสอบหาค่า PI เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่าค่า PI เป็นค่าบวก แสดงถึงปริมาณ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ที่เพิ่มขึ้น ในกรณีของ FOS ได้มีผู้ศึกษาค่า PI โดยใช้ FOS ปริมาณ 1% เป็นสับสเตรท เติมเชื้อปริมาณ 10% และหาค่า PI ที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่า PI อยู่ที่ 2.31 (Palframan et al., 2002) ในขณะที่การทดลองของ Ghoddusi et al., (2007) ใช้ FOS ปริมาณ 1% เป็นสับสเตรท เติมเชื้อปริมาณ 10% เช่นเดียวกัน พบว่ามีค่า PI สูงถึง 6 อย่างไรก็ตามคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสับสเตรทชนิดต่างๆขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้าง ขนาดโมเลกุล รวมทั้งเชื้อประจำถิ่นซึ่งแตกต่างกันออกไปตามพฤติกรรมการรับประทานอาหาร ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ทำให้ค่า PI ที่ได้แตกต่างกัน

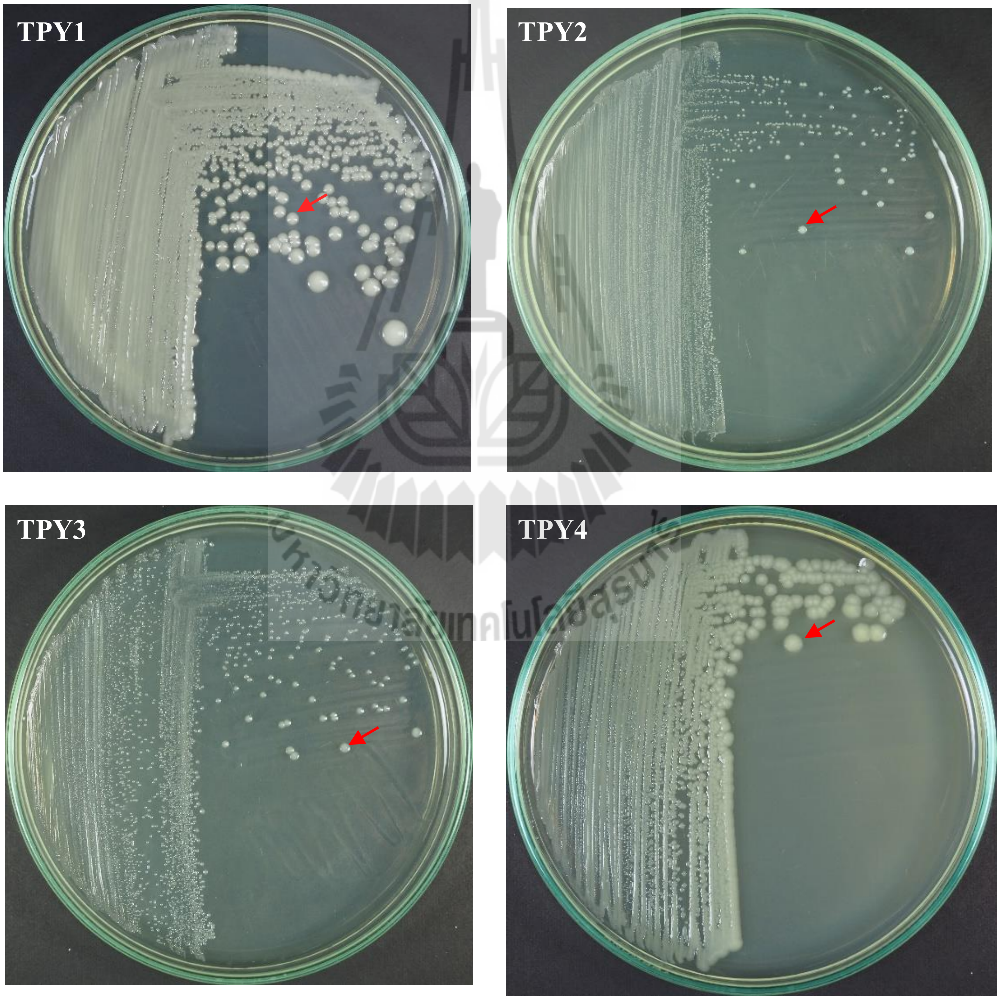
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.17 ค่า Prebiotic index (PI) ที่คำนวณจากการเจริญของแบคทีเรียในภาพที่ 3.12

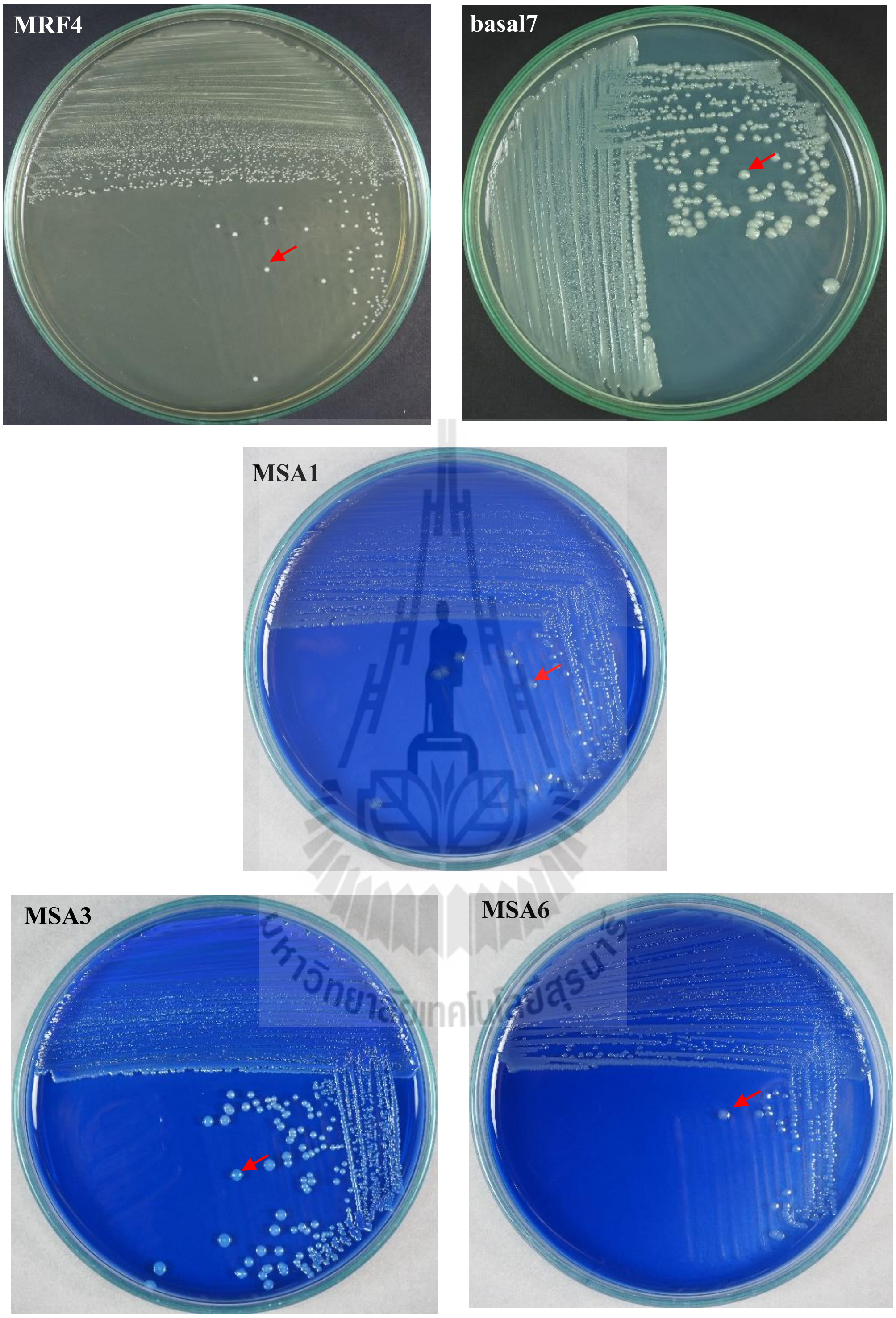
แหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	**PI**
Glucose	1.11±0.13
FOS	2.72±0.20
RS2	2.82±0.15
RS3	4.82±0.45
RS4	3.44±0.37

4.3.6 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกและคัดเลือกในขั้นตอนทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร

จากที่ได้คัดแยกและเลือกเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไอโซเลทเด่นที่พบในขั้นตอนทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร เลือกแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท (รูปที่ 3.13) มาระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเป็นหลัก (ตารางที่ 3.18 และ 3.19) เมื่อเทียบความเหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง ยังไม่สามารถระบุค่าความเหมือนกับชนิดใด แบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้อาจเป็นชนิดใหม่ จึงควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ต่อไป



ภาพที่ 3.13 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่แยกและคัดเลือกในขั้นตอนทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.18) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.13 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่แยกและคัดเลือกในขั้นตอนทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานกับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.18) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.18 ลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีของแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่คัดแยกและเลือกวิเคราะห์ชนิด

Colony morphology and cultivation medium	Bacterial isolate								
	TPY1	TPY2	TPY3	TPY4	MRF4	MRS3	basal7	MSA1	MSA3
Colony diameter (mm)	4-8	1-2	1.5-3	2-7	1-1.5	1-1.5	1-2	1.5-3	2-7
Colony shape	Cream, circular, entire, pulvinate, opaque, smooth	Cream, circular, entire, pulvinate, opaque, smooth	Cream, circular, entire, flat, opaque, smooth	Cream, circular, entire, flat, opaque, smooth	White, circular, entire, convex, opaque, smooth	White, circular, entire, convex, opaque, smooth	White, circular, entire, raised, opaque, smooth	Blue, circular, entire, raised, opaque, smooth	Blue, circular, entire, raised, opaque, smooth
Cultivation medium for growth	TPY agar	TPY agar	TPY agar	TPY agar	MRS agar	MRS agar	SF agar	MS agar	MS agar

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.19 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 9 ไอโซเลท ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux)

Carbohydrate fermentation	Bacterial isolate								
	TPY1	**TPY2**	**TPY3**	**TPY4**	**MRS3**	**basal7**	**MSA1**	**MSA3**	**MSA6**
Acid from:	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	+	-	-	-	-	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	-	-	+	+
D-Xylose	-	-	+	+	-	-	-	+	+
L- Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Glucose	-	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Fructose	-	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	-	-	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	-	+	-	-	-	+	+	-
D-Mannitol	-	+	+	-	-	-	-	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Methyl-α D-mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-α D-glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetylglucosamine	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Amygdalin	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Arbutin	-	+	-	+	+	-	-	-	-

ตารางที่ 3.19 (ต่อ) การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 9 ไอโซเลท ด้วยชุดทดสอบ API (bioMérieux)

Carbohydrate fermentation	Bacterial isolate								
	TPY1	TPY2	TPY3	TPY4	MRS3	basal7	MSA1	MSA3	MSA6
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	-	+	+	-	-	-	-
D-Cellobiose	+	+	-	+	+	+	+	-	-
D-Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose (Sucrose)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinose	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Amidon (Starch)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	+	-	+	+	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	+	+	-	-	+	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	+	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium gluconate	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Potassium 2-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium 5-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษาศักยภาพของประเภทของแป้งต้านทาน (RS) โดยใช้แป้ง RS 3 ประเภท คือ RS2, RS3 และ RS4 ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบเป็นปกติในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450, *Lact. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lact. plantarum* TISTR 543 และ *Lact. fermentum* TISTR 876 พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ มีแนวโน้มความสามารถในการใช้แป้ง RS ได้ค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคส สอดคล้องตามโครงสร้างของแป้งที่ซับซ้อนมากกว่าน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจากการหมักแป้ง RS ที่เติมลงในอาหารเหลวแทนน้ำตาลกลูโคส แล้วเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน พบว่ามีความเป็นกรดทั้งหมดในช่วงร้อยละ 0.063-0.207 จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง RS แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของคนในสกุล *Lactobacillus* และ *Streptococcus* (สายพันธุ์ที่สร้างกรดและไม่ก่อโรค) จากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ซึ่งคัดเลือกได้แบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง 3 ไอโซเลท เพื่อใช้แป้ง RS ความเข้มข้น 1% แทนที่น้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารมาตรฐาน เมื่อศึกษาการระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมี พบว่า 2 ไอโซเลท (RCF10 และ MRF4) ระบุได้เป็นชนิด *Lactobacillus* sp. RCF10 และ *Lactobacillus* sp. MRF4 ตามลำดับ และมี 1 ไอโซเลท (SFF5) เป็น *Streptococcus* sp. SFF5

ส่วนแบคทีเรียจากอาสาสมัครซึ่งได้จำลองการย่อยสับสเตรททุกประเภทผ่านระบบทางเดินอาหาร แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรทแต่ละประเภทมีการเจริญใกล้เคียงกันและมีค่าการเจริญสูงที่สุดถึง 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 20 ชั่วโมง และพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแป้ง RS2, RS4, และ FOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบกรดบิวทิริกปริมาณสูงที่สุด นอกจากนี้เมื่อทดลองโดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครพบว่าปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการบ่มคือ 10% (โดยปริมาตร), ปริมาณสับสเตรทที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือ 1% (โดยน้ำหนัก) และระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมที่สุดคือ 24 ชั่วโมง และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดีกว่า FOS, RS2 และ RS4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบกรดอะซิติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 32.60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าศักยภาพ

ความเป็นพรีไบโอติกของแป้ง RS แต่ละประเภทนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยแป้ง RS3 ให้ค่า PI สูงที่สุด คือ 4.82 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สับสเตรทชนิดอื่นๆ เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และจุลินทรีย์ผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครในการสร้างกรดแล็กติกและ กรดไขมันสายสั้นที่ส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K., and Darlington, G. (2005). A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. **American Journal of Clinical Nutrition.** 82: 471-476.

Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanuki, M., and Tanaka, R. (2001). Increased resistance of mice to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection by symbiotic administration of Bifldobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**. 91: 985-996.

Asp, N. G., and Bjorck, I. (1992). Resistant starch. **Trends in Food Science & Technology** 3 (5): 111–114.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. (2000). **Official Methods of Analysis** (17th ed.). Arlington, Virginia: USA**.**

Atlas, R. M. and Parks, L. C. (2004). **Handbook of Microbiological Media**. CRC Press, Boca Raton.

Axelsson, L. (1993). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright, and A. Ouwehand (eds.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects** (pp. 1-64). New York: Marcel Dekker.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright, and A. Ouwehand (eds.). **Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects** (3rd ed., pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.

Ballongue, J. (1989). Bifidobacteria and Probiotic Action. In S. Salminen, A. V. Wright, and A. Ouwehand (eds.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects** (2rd ed., pp. 519-573). New York: Marcel Dekker.

Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L. and Frigerio, G. (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhea in pediatrics. **Current Therapeutic Research**. 28: 927-936.

Berggren, A. M., Nyman, M. G. L. and Lundquist, I. (1996). Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats.

British Journal of Nutrition. 76: 287-294.

Barczynska, R., Jochym, K., Slizewska, K., Kapusniak, J., & Libudzisz, Z. (2010). The effect of citric acid-modified enzyme-resistant dextrin on growth and metabolism of selected strains of probiotic and other intestinal bacteria. **Journal of Functional Foods***, 2*(2), 126-133.

Barczynska, R., Slizewska, K., Jochym, K., Kapusniak, J., & Libudzisz, Z. (2012). The tartaric acid-modified enzyme-resistant dextrin from potato starch as potential prebiotic. **Journal of Functional Foods***, 4*(4), 954-962.

Barry, J. L., Hoebler, C., Macfarlane, G. T., Macfarlane, S., Mathers, J. C., Reed, K. A., Mortensen, P. B., Nordgaard, Rowland, I. R., and Rumney, C. J. (1995). Estimation of the fermentability of dietary fibre *in vitro* : a European interlaboratory study. **British Journal of Nutrition**. 74: 303-322.

Beynen, A. C., Buechler, K. and Molen, A.J. (1982). The effects of lactate and acetate on fatty acid and cholesterol biosynthesis by isolated rat hepatocytes. **International Journal of Biochemistry**. 14: 165-169.

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J. and von der Weid, T. (2003). Supplementation of food with Enterococcus faecium (SF68) stimulates immune functions in young dogs. **Journal of Nutrition**. 133: 1158-1162.

Birkett, A. M., Mathers, J. C., and Jones, G. P. (2000). Changes to the quantity and processing of starchy foods in a Western diet can increase polysaccharides escaping digestion and improve *in vitro* fermentation variables. **British Journal of Nutrition**. 84: 63-72.

Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., O'Dea, K. (1996). Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. Am J Clin Nutr 63:766-772

Breard. E. K., Tuohy, and Gibson, G. (2010). Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food Ingredients following *in vitro* fermentation by human colonic microbiota. **Anaerobe.** 16: 420-425.

Brenner. J. D., Krieg, R. N., and Staley, T. J. (2005). **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. (2nd ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

Brennan, M., Wanisaiil, B. and Ray, B. (1993). Prevalence of viable *lactobacillus acidophilus*

in dried commercial products. **Journal of Food Protein**. 46: 77-92.

Brown, I., Warhurst, M., Arcot, J., Playne, M., Illman, RJ., Topping, DL. (1997). Fecal numbers of bifidobacteria are higher in pigs fed Bifidobacterium longum with a high amylose cornstarchthan with a low amylose cornstarch. J Nutr 127:1822-1827

Boisen, S. and Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for Estimating digestibility in simple stomach animals. **Nutrition research review**. 4: 141-162.

Bomba, A., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Herich, R., Guba, P., and Mudronova, D. (2002). Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. **British Journal of Nutrition**. 88: 95-99.

Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourie, B., Brouns, F., Bornet, FR. (2004). The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. Am J Clin Nutr 80:1658-1664

Bournet, F. R., Brouns, F., Tashiro, Y. and Duvillier, V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology, and health implications. **Digestive and Liver Disease**. 34: 111-120.

Brouns, F., Kettlitz, B. and Arrigon, E. (2002). Resistant starch and Butyrate revolution. **Trends in Food Science and Technology**. 13:251-261.

Brown, I. L. (2004). Applications and uses of resistant starch. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**. 87 (3) : 727-732.

Brown, M. A., Storlien, L.H. and Brown, I.L. (2003). Cooking attenuates the ability of high-amylose meals to reduce plasma insulin concentrations in rats. **British Journal of Nutrition**. 90: 823-827.

Brown, I. L. Wang, X. and Topping, D. L. (1999). High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. **Food Australia**. 47: 272-275.

Brown, I., Warhurst, M. and Arcot, J. (1997). Fecal numbers of Bifidobacteria are higher in pigs fed *Bifidobacterium longum* with a high amylose cornstarch than with a low amylose cornstarch. **Journal of Nutrition**. 127: 1822-1827.

Buddington, K. K., Donahoo, J. B. and Buddington, R. K. (2002). Dietary oligofructose and inulin. protect mice from enteric and systemic pathogtens and tumor inducers. **Journal of Nutrition**. 132: 472-477.

Champ, M., Langkilde, A. M., & Brovns, F. (2003). Advances in dietary fiber characterization 1. Definition of dietary fiber, physiological relevance, health benefits and analytical benefits. **Nutrition Research Reviews**. 16: 71–82.

Cappuccino, J. G. and Sherman, N. (1999). **Microbiology: A Laboratory Manual**. (4th ed.). Benjamin/Cummings Science: California.

Cheng, H. H. and Lai, M. H. (2000). Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. **Journal of Nutrition**. 130: 1991-1995.

Cleary, L. J., Andersson, R., and Brennan, C. S. (2007). The behaviour and susceptibility to degradation of high and low molecular weight barley b-glucan in wheat bread during baking and in vitro digestion. **Food Chemistry**. 102: 889–897.

Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simplestomached animals. **Animal Food Science and Technology**. 123–124: 421–444.

Conway, P. L., Corback, S. L. and Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria In the human stomach and adhesion to intestinal cell. **Journal of Dairy Science**. 70: 1-12.

Crittenden, R. G., Morris, L. F., Harvey, M. L. (2001). Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a symbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**. 90: 268-278.

Crittenden, R.G., Morris, L.F., Harvey, M.L., Tran, L.T., Mitchell, H.L., Playne, M.J. (2001). Selection of a Bifidobacterium strain to complement resistant starch in a symbiotic yoghurt. **Journal Applied Microbiol.** 90:268-278

Cummings, J. H., Beatty, E. R. and Kingman, S. M. (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. **British Journal of Nutrition**. 75: 733-747.

Cummings, J. H., and Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effect of prebiotics. **British Journal of Nutition**. 87(2).: 145-151.

Cummings, J.H., Beatty, E.R., Kingman, S.M., Bingham, S.A., Englyst, H.N. (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. **British Journal of Nutition**. 75:733-747

David, L. T. and Peter, M.C. (2001). Short chain fatty acid and human colonic function : role of and non-starch polysaccharide. **Physiological Reviews**. 81(3): 1031-1064.

De Deckere, E. A., Kloots, W. J. and van Amelsvoort, J.M. (1993). Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. **Journal of Nutrition**. 123: 2142-2151.

Delzenne, N. M., and Kok, N. (2001). Effects of fructan-type prebiotics on lipid metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73: 456-458.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research** 54 (9): 2325-2340.

Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., Anson, K. I., & Gibson, G. R. (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity ofBifidobacterium bifidum NCIMB41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. **The American Jounal of Clinical Nutrition**, *87*, 785-791.

Devriese, L. A. and Pot, B. (1995). The genus Enterococcus. In: Wood, B. J. B. and Holzapfel, W.H. (Eds.), **The Lactic Acid Bacteria**. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, pp. 327– 367.

Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P. and Goossens, H., (1997). Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 47: 555-561.

Demigné, C., Jacobs, H., Moundras, C., Davicco, M. J., Horcajada, M. N., Bernalier. (2008). Comparison of native or reformulated chicory fructans, or nonpurified chicory, on rat ceca fermentation and mineral metabolism. European Journal of Nutrition. 47: 366-374.

Dongowski. G., Jacobasch, G., Schmiedl, D. (2005). Structural stability and prebiotic

properties of resistant starch type 3 increase bile acid turnover and lower secondary bile acid formation. **Jorunal Agric Food Chem.** 53:9257-9267

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N.,Purdom, E., Dethlefsen, L., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science 308:1635-1638

Eerlingen, R. C. and Delcour, J.A. (1995). Formation, Analysis, Structure and Properties of Type III Enzyme Resistant starch. **Journal of Cereal Science**. 22:129-138.

Englyst, H. N., Kingman, S. M. and Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**. 46 (2): S33-50.

Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T.J. and Cummings. (1999). Rapidly available glucose in foods: an *in vitro* measurement that reflects the glycemic response. **American Journal of Clinical Nutrition.** 69: 448-454.

Ferguson, L. R., Tasman-Jones, C. and Englyst, H. (2000). Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. **Nutrition and Cancer**. 36 (2): 230-237.

Fiordaliso, M., Kok, N., Desager, J. P., Goethals, F., Deboyser, D., Roberfroid, M., et al. (1995). Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. **Lipids**. 30: 163-167.

Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. **Environ Microbiol.** 9: 1101-1111

Forchielli, M. L., and Walker, W. A. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **British Journal of Nutrition**. 93(1): 41-48.

Frank, D.N., Amand, AL.S., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., et al. (2007). Molecularphylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **ProcNatl Acad Sci USA.** 104:13780-13785.

Fuentes-Zaragoza, E., S´ anchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., and Navarro, C. 2011. Resistant starch as prebiotic: a review. **Starch-Starke** 63:406–15.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. 66: 365-378.

Fuller, R. (1992). **Probiotics the scientific basis**. (first ed., pp. 355-372). London: Chapman

and Hall.

Fuller R (ed.) (1997). Probiotics 2: Application and Practical Aspects. Andover, UK: Chapman & Hall.

Garrett, D. A., Failla, M. L., and Sarama, R. J. (1999). Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 47: 4301–4309.

Gibson, G R. and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of human colonic microbiota inducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. 125: 1401-1412.

Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology.** 18 (2): 287-298.

Gilliland, S. E., Nelson, C. R. and Mexwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied Environment Microbiology**. 49:377-381.

Gillian Pocock and Christopher, D. Richards (2009). **The human body an Introduction for the biomedical and health sciences**. Oxford, New York, pp. 493– 531.

Ghoddusi, H. B.,Grandison, A. M., Grandison, S. A., and Tuohy, M.K. (2007). *In vitro* study on gas generation and probiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. **Anaerobe**. 13: 193-199.

Goderska, K., M. Gumienna, and Czarnecki, Z. (2008). Release of phenolic compounds from bean flour, bean-derived chips and black chokeberry juice and changes in their antioxidant activity during digestion in an *in vitro* gastrointestinal model. **Journal of Nutrition.** 64 (2): 255-261.

Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M., and Gorbach, S. L. (1980). Effect of Diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human faecal bacterial enzyme. **Journal of Nutrition**. 64 (2): 255-261.

Han, K. H., Fukushima, M., Kato, T., Kojima, M., Ohba, K., Shimada, K.(2003). Sterol excretion and hepatic mRNA levels in rats. **Lipids**. 38(9): 919–924.

Hashemi, S. M. B., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Milani, E., & Eshaghi, Z. (2013). Metabolism of extracted inulin from Helianthus tuberosusby Lactobacillus strains isolated from traditional Kordish cheese. **International Food Research Journal**, *20*(6), 3283-3286.

Hashimoto, N., Ito, Y., Han, K. H., Shimada, K., Sekikawa, M., Topping, D. L. (2006).

Potato pulps lowered the serum cholesterol and triglyceride levels in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. 52: 445–450.

Hararumpu, S. G. (2000). Resistant starch -a review of physical properties and Biological Impact of RS_3 **.Carbohydrate Polymer**. 41: 285-292.

Heijnen, M.L., van Amelsvoort, J.M., Deurenberg, P., Beynen, A.C. (1998). Limited effect of consumption of uncooked (RS2) or retrograded (RS3) resistant starch on putative risk factors for cencer in healthy men. **Journal Clinical Nutrition.** 67:322-331

Henningsson, A. M., Margareta, E., Nyman, G.L. (2003). Influences of dietary adaptation and source of resistant starch in the hindgut of rats. **British Journal of Nutrition**. 89 (3): 319-328.

Hernández, O., Emaldi, U., & Tovar, J. (2008). In vitro digestibility of edible films from various starch sources. **Carbohydrate Polymers**. 71: 648–655.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Snealth, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (9^{th} ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

Holzapfel, W. H. and Schillinger, Ulrich. (2002). Introduction to pre-and probiotics **Food Research International**. 35: 109-116.

Hoentjen, F., Welling, G. W., Harmsen, H. J., Zhang, X., Snart, J., Tannock, G. W., et al. (2005). Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. **Inflammatory Bowel Disease**. 11: 977-985.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Effect of various fiber addition on lipid digestion during *in vitro* digestion of beef patties. **Journal of Food Science**. 74: C653-C657.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A. and McClenents, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**. 125: 1-12.

Jenkins, D.J., Vuksan, V., Kandall, C.W., Wursch, P., effcoat, R., Waring, S., Mehling, C.C., Vidgen, E., Augustin, L.S., Wong, E. (1998). Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. J AM Coll Nutr 17:609-616

Kent, M. and Van de Graaff. (2000). **Human anatomy**. Wn. C. Brown Communication.

pp. 609-621.

Kim, W. K., Chung, M. K., Kang, N.E. (2003). Effect of resistant starch from corn or Rice on glucose control, colonic events, and blood lipid concentrations in streptozotocin -induced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 14: 166-172.

Kleessen, B., Stoof. G., Proll. J., Schmiedl. D., Noack. J.and Blaut. M. (1997). Feeding Resistant starch affects fecal and cecal microflora And Short-chain fatty acid in rats. **Journal of Animal Science**.75: 2453-2462.

Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet. I. D., Wright, A. V., Poutanan, K. and Sandholm. T. M. (1998). The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotics strain fed on fermented oat bran product effect on gastrointestinal microbiota. **Journal of Applied Microbiol Biotechnology**. 50: 246-252.

Krieg, N.R., Holt, J.G., Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. 2001. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (2^{nd} Edition). Baltimore: Williams and Wikins.

Kulkarni, S. D., Acharya, R., Rajurkar, N. S., and Reddy, A. V. R. (2007). Evaluation of bioaccessibility of some essential elements fro wheatgrass (Triticum aestivum L.) by *in vitro* digestion method. **Food Chemistry**. 103: 681–688.

Kulp, K. S., Fortson, S. L., Knize, M. G., and Felton, J. S. (2003). An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. **Food and Chemical Toxicology**. 41: 1701–1710.

Langlands, S. J., Hopkins, M. J., Coleman, N., and Cummings, J. H. (2004). Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. **Journal of Gut**. 53: 1610-1616.

Le Blay, G.M., Michel, C.D., Blottiere, H.M., Cherbut, C.J. (2003). Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. **Journal of Applied Microbiol Biotechnology**. 94:312-320

Lesmes, U., Beards, E.J., Gibson, G.R., Tuohy, K.M., Shimoni, E. (2008). Effects of resistant starch type III polymorphs on human colon microbiota and short chain fatty acids in human gut models. **Journal of Agricultural Food Chemistry.** 56:5415-5421

Leu, R. K., Hu, Y. and Young, G. P. (2002). Effects of resistant starch and nonstarch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. **Carcinogenesis**. 23 (5): 713–719.

Lunn, J., & Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. **Nutrition Bulletin**. 32: 21–64.

Liong, M. T. and Shah, N. P. (2005). Acid and Bile tolerance and the cholesterol Removal ability of bifidobacteria strains. **Bioscience Microflora**. Vol.24(1): 1-10.

Ljungh, A. and Wadstrom, T. Lactic Acid Bacteria as Probiotics. **Issues Intestional Microbiol**. 7: 73-90.

Maathuis, A., Hoffman, A., Evans, A., Sanders, L., Venema, K. (2008). Digestibility and prebiotic potential of nondigestible carbohydrate fractions from novel maize-based fibers in a dynamic in vitr model of the human intestine. **FASEB Journal.** 22: 1089-1087

Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. (1991). the colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG (eds) the large intestine: physiology, pathophysiology and disease. Raven Press Ltd., New York, pp. 51-92

Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Cummings, J.H. (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. J Appl Bacteriol. 72:57-64

Mackey, B.M., and Gibson, G.R. (1997). *Escherichia coli*0157-from farm to fork and beyond**. Society of General Microbiology Quarterly** 24:55– 57.

Mandalari, G., Faulks, R. M., Bisignano, C., Waldron, K. W., Narbad, A., & Wickham, M. S. J. (2010). In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (Amygdalus communis L.). **FEMS Microbiology Letters***, 304*(2), 116-122.

Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., Yadhav, M. P., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2005). In Vitro Determination of Prebiotic Properties of Oligosaccharides Derived from an Orange Juice Manufacturing By-Product Stream. **Applied and Environmental Microbiology***, 71*(12), 8383-8389.

Margaret, E., Smith, and Dion, G., Morton. (2010). **The digestive system** : Basic science and clinical conditions (2^{rd} ed.). Oxford, New York, pp. 51-171.

Mathé, D., Riottot, M., Rostaqui, N. (1993). Effect of amylomaize starch on plasma lipoproteins of lean and obese zucker rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**.

14: 17-21

Martı´nez-Murcia, A. J. and Collins, M. D., (1991). Enterococcus sulfureus, a new yellow-pigment Enterococcus species. **FEMS Microbiology Letters**. 64: 69-74.

Mentschel, J. and Claus, R. (2003). Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. **Metabolism**. 52 (11): 1400-1405.

Mikulíková, D., Masár, S., and Kraic, J. (2008). Biodiversity of legume health-promoting starch. **Starch**. 60: 426–432.

Moreno, R.M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and Vuyst, D.L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. **International Journal Of Food Microbiology**. 106: 1-24.

Muir, J.G., Yeow, E.G., Keogh, J., Pizzey, C., Bird, A.R., Sharpe, K., O'Dea, K., Macrae, F.A. (2004). Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. **American Journal of Clinical Nutrition.** 79:1020-1028

Nakamura, Y., Nosaka, S., Suzuki, M., Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yajima, T., et al. (2004). Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. **Clinical Experimental Immunology**. 137: 52-58.

Nugent, A. P. (2005).Health properties of resistant starch.**British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**. 30: 27-54.

Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Effect of pH and Dose on the Growth of Gut Bacteria on Prebiotic Carbohydrates in vitro. **Anaerobe**, *8*(5), 287-292.

Peuranen, S., Tiihonen, K., Apajalahti, J., Kettunen, A., Saarinen, M., and Rautonen, N. (2004). Combination of microbial ecosystem and immune responses in rat gastrointestinal tract. **British Journal of Nutrition**. 91: 905-914.

Pereira, A., Dora, I. and Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by Lactic acid bacteria and Bifidobacteria isolated from the Human gut. **Applied and Environmental Microbiology**. 68: 4689-4693.

Pierre, F., Perrin, P., Champ, M., Bornet, F., Meflah, K., and Menanteau, J. (1997). Shortchain

fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min mice. **Cancer Research**. 57: 225-228.

Phillips, J., Muir, H. G. and Birkett, A. (1995). Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation dependent events in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**. 62: 121-130.

Phillips, J., Muir, J.G., Birkett, A., Lu, Z.X., Jones, G.P., O'Dea, K., Young, G.P. (1995). Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. **American Journal of Clinical Nutrition.** 62: 121-130

Proano, M., Camilleri, M., Phillips, S. F., Brown, M. L., and Thomforde, G. M. (1990). Transit of solids through the human colon: regional quantification in the unprepared bowel. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology** 258 (6): G856-G862.

Qiang, X., YongLie, C., and QianBing, W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**. 77: 435-441.

Reimer, R. A., and Russell, J. C. (2008). Glucose tolerance, lipids, and GLP- secretion in JCR: LA-cr Ratf Fed h Higp Proteif Fibed Diet. **Obesity**. 16: 40-46.

Renata, B., Kamila, J., Katarzyna, S., Janusz, K., Zdzislawa, L. (2010). The effect of citric acid- modified enzyme-resistant dextrin on growth and metabolism of selected strains of probiotic and other intestinal bacteria. **Journal of functional foods**. 2: 126-133.

Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, and R., Rowland, I. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**. 104(2):51-63.

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. **Journal Nutrition.** 137:830S-837S

Roberfroid, M.B. (2005a). the digestive functions: inulin and oligofructose as dietary fiber. In: Roberfroid, M.B., Wolinsky I (eds) Inulin-type fructans: functional food ingredients. CRC Press, Boca Raton, pp. 103-131

Roberfroid, M.B. (2005b). The gastrointestinal system: A major target for functional foods. Roberfroid, M.B., Wolinsky, I. (eds). Inulin-type fructans: functional food ingredients. CRC Press, Boca Raton, pp. 103-131

Rodríguez-Cabezas, M. E., Camuesco, D., Arribas, B., Garrido-Mesa, N, Comalada, M.,

Bailón, E., Cueto-Sola, M., Utrilla, P., Guerra-Hernández, E., Pérez- Roca,C., Gálvez, J. and Zarzuelo, A. (2010). The combination offructo- oligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats**. Clinical Nutrition**. 30: 1- 8.

Rodríguez-Cabezas, M. E., Camuesco, D., Arribas, B., Garrido-Mesa, N., Comalada, M., Bailón, E., and Zarzuelo, A. (2010). The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. **Clinical Nutrition** 29 (6): 832-839.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., and Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT-Food Science and Technology**. 50: 1-16.

Sajilata, M. G., Singhal, R. S., and Kulkarni, P. R. (2006). Resistant Starch-A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 5:1-17.

Salminen, S. And Wright, A. (1993). Lactic acid bacteria. **Food science and technology**. Marcel Dekker, Inc.

Savage, G. P., and Catherwood, D. J. (2007). Determination of oxalates in Japanese taro corms using an in vitro digestion assay. **Food Chemistry**. 105: 383–388.

Słominska, L., Jaroslawski, L., Gumiena, M., Czarnecki, Z., Wyrzykiewicz, B. and Zielonka, R. (2010). The influence of chemical structure of starch hydrolysates on growth Of probiotic microflora under in vitro conditions. In M. Fiedorowicz, E. Bertoft (eds) **Recent Advances in Biopolymer Science And technology.** (pp. 145-156).

Scheppach, W., Bartram, P., Richter, A., Richter, F., Liepold, H., Dusel, G., et al. (1992). Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. 16(1): 43-48.

Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 34: 31-34.

Schmidl, D., Baurelein, M., Bengs, H. and Jacobasch, G. (2000). Production of heat- stable, butyrogenic resistant starch. **Carbohydrates polymer**. 43: 183-193.

Schwiertz, A., Lehmann, U., and Jacobasch, G. (2002). Influence of resistant starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing *Eubacterium* sp. in the human

intestine. **Journal of Applied Microbiology**. 93 (1): 157-162.

Scheppach, W., and Weiler, F. (2004). The butyrate story: old wine in new bottles Butyrate appears to be essential for a wide range of intestinal mucosal health benefits; however, the mechanisms behind this remain to be determined. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**. 7: 563-567.

Sharma, A., Yadav, B. S., and Ritika (2008). Resistant starch: Physiological roles and food applications. **Food Reviews International**. 24, 193–234.

Shibata, K., Flores, M. D., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. (2007). Direct l-lactic acid fermentate with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium.* **Enzyme and Microbial Technology**. 41: 149-155.

Shirota, M. (1962). . **Lactobacillus in health and disease**. Japan : Yakult Honsha Co., Ltd.

Scholz-Ahrens, K. E., and Schrezenmeir, J. (2007). Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. **Journal of Nutrition**. 137(11): 2513-2523.

Silvi, S., Rumney, C.J., Cresci, A., Rowland, I.R. (1999). Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. J Appl Microbiol 86:521-530

Śliżewska, K. (2013). The citric acid-modified, enzyme-resistant dextrin from potato starch as a potential prebiotic. **Acta Biochimica Polonica***, 60*(4), 671-675.

Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P., and Michalik, J. (2009). Transformation of phenolic compounds in an in vitro model simulating the human alimentary tract. **Food Technology and Biotechnology**. 47: 456–463.

Tharanathan, R. N.and Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes: A boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**. 14: 507–518.

Topping, D. L. and Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. **Physiological Reviews**. 81 (3): 1031-1064.

Topping, D.L., Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function:roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol Rev 81:1031-1064

Topping, D. L., Fukushima, M. and Bird, A. R. (2003). Resistant starch as a prebiotic and

sybiotic: state of the art. **Proceedings of the Nutrition Society**. 62: 171-176.

Vanderzant, C. and Splittstoesser.F.D. (1992). **Compendium of methods for the examination of foods**. (3rd ed.). American Public Health Association.

Videla, S., Vilaseca, J., Antolin, M., Garcia-Lafuente, A., Guarner, F., Crespo, E., et al. (2001). Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. **American Journal of Gastroenterology**. 96: 1486-1493.

Wang, X., Conway, P. L. and Brown, I. L. (1999) *In vitro* utilization of amylopectin and high-amylose maize (Amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 87: 631-639.

Williams, C. M., and Jackson, K. G. (2002). Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. **British Journal Nutrition**. 87: 261-264.

Wichienchot, S., Prasertsan, P., Hongpattarakere, T., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2006). In vitro Fermentation of Mixed Linkage Glucooligosaccharides Produced by Gluconobacter oxydans NCIMB 4943 by the Human Colonic Microflora. **Current Issues in Intestinal Microbiology,** *7*(1), 7-12.

Wynne, A. G., McCartney, A. L., Brostoff, J., Hudspith, B. N., & Gibson, G. R. (2004). An in vitro assessment of the effects of broad-spectrum antibiotics on the human gut microflora and concomitant isolation of a Lactobacillus plantarum with anti-Candida activities. **Anaerobe,** *10*(3), 165-169.

Wunderlich, P.F., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F. and Ja Zeltner, L., (1989). Double-blind report on the efficacy of lacticacid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhoea. **Journal of International Medical Research**. 17: 333-338.

Wronkowska, M. Smietana, S. M., Krupa, U. and Biedrzycka, E. (2006). *In vitro* fermentation of new modified starch preparations - changes of microstructure and bacterial end -products. **Enzyme and Microbial Technology**.40: 93-99.

Wursch, P. (1999). Resistant starch, pp. 385-394. In S.S. Cho, P. Prosky and M. Dreher, (eds.). **Complex Carbohydrates in Foods**. Marcel Dekker, Inc. New York.

Younes, H., Levrat, M. A. and Demige, C. (1995). Resistant starch is more effective than

cholestyramine as a lipid-lowering agent in the rat. **Lipids**. 30: 847-853.

Yue, P. and Waring, S. (1998). Resistant starch in food applications. **Cereal Foods World.** 43 (9): 690-695.

Zhang, G., Sofyan, M., and Hamaker, B. (2008). Slowly digestible state of starch : mechanism of slowly digestion property of gelatinized maize starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 58: 4695-4702.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ก. สีย้อมจุลินทรีย์

1) Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม		
Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

2) Malachite green

Malachite green	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

3) Safranin O (Gram stain)

Safranin O (2.5% solution ใน 95% Ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข. สารละลายและน้ำยาเคมี

1) Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน

2) Butterfield's buffered phosphate diluent

Stock Buffer Solution:

Potassium dihydrogenphosphate	34.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.2-7.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่ 4

องศาเซลเซียส สำหรับเป็น stock buffer solution

การเตรียม Buffer solution เพื่อใช้งาน:

ผสม Stock buffer solution 1.25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.2-7.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3) Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide (30% solution)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

4) Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

5) Iodine solution (ทดสอบการย่อยแป้ง)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	200.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

6) Phosphate buffer saline (PBS)

เตรียมจาก 0.2M Sodium-phosphate buffer ซึ่งได้จากการผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2M Monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.12H_2O$, 31.20 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2M Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 53.65 กรัม หรือ 71.70 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**	**A** (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.0	90.0	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ปรับความเข้มข้นตามต้องการ

7) Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%)

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask เก็บไว้ในขวดสีชา

ค สูตรอาหารสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัคร

1) Bacteroides mineral salts agar (Jost et al., 2012) สำหรับแบคทีเรีย *Bacteroides* sp. (pH 7.0 ± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Glucose	5.0	กรัม
$NaNO_3$	2.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
K_2HPO_4	1.2	กรัม
KH_2PO_4	0.14	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0. 5	กรัม
$CaCl_2$	0.15	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3 . H_2O$	0.01	กรัม
Gentamycin solution	0.1	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) Basal medium (Hashemi et al., 2013) สำหรับเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร (pH 7.0 ± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Glucose	10.0	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
KH_2PO_4	0.04	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$CaCl_2.6\ H_2O$	0.01	กรัม

$NaHCO_3$	2.0	กรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
Bile salt	0.5	กรัม
L-cysteine.HCl	0.5	กรัม
Heamin	0.05	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3) Clostridial agar (Goudarizi et al., 2014) สำหรับแบคทีเรีย *Clostridium* sp. (pH 7.0 ± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Glucose	5.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	17.0	กรัม
Pancreatic digest of soybean meal	3.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Na-thioglycolate	1.8	กรัม
Sodium formaldehyde sulphoxylate	1.0	กรัม
L-cystine	0. 25	กรัม
NaN_3	0.2	กรัม
Neomycin sulfate	0.15	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4) De Man, Rogosa Sharpe (MRS) agar (Atlas and Parks, 2004) สำหรับแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. (pH 6.5 ± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Glucose	20.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
$MnSO_4.5H_2O$	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5) Mitis salivarius agar (Atlas and Parks, 2004) สำหรับแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. (pH 7.0± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Sucose	50.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	15.0	กรัม
Pancreatic digest of animal tissue	5.0	กรัม
dextrose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	4.0	กรัม
Crystal violet	0.0008	กรัม
Trypan blue	0.075	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6) Skim milk salt agar

ปรับส่วนประกอบของอาหารให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่คัดแยกและเลือกศึกษาจากส่วนประกอบพื้นฐานดังนี้

ก. Salt solution

$MgSO_4.H_2O$	10.0	กรัม
KNO_3	2.0	กรัม
Sodium chloride	250.0	กรัม
Ferric citrate	trace	
Neopeptone	5.0	กรัม
Glycerol	10.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	900	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข. Reconstituted skim milk (10% solids)

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ผสม Reconstituted skim milk (10% solids) กับ Salt solution ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

7) Starch agar (amylase test ที่เติม 25% NaCl)

ส่วนประกอบของอาหารเหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่คัดแยก ที่ไม่เติมน้ำตาล

Soluble starch	100	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

8) *Streptococcus faecalis* (SF) agar (Atlas and Parks, 2004) สำหรับแบคทีเรีย *Enterococcu faecalis* (pH 6.8 ± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Glucose	4.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	2.5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
K_2HPO_4	3.8	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9) TPY agar (Atlas and Parks, 2004) สำหรับแบคทีเรีย *Bifidobacterium* sp. (pH 6.5 ± 0.2 ที่ 25องศาเซลเซียส)

Glucose	5.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	10.0	กรัม
Soy bean meal	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.5	กรัม
$ZnSO_4.7\ H_2O$	0.25	กรัม
$CaCl_2$	0.15	กรัม
$FeCl_3.\ 6H_2O$	1.0	ไมโครกรัม
Tween™80	1.0	มิลลิลิตร
Agar	13.5	กรัม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

นางสุนันทา ทองทา

นางสุนันทา ทองทา เกิดเมื่อวันที่ 27 ตุลาคม 2506 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (พัฒนาผลิตภัณฑ์) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2529 จบการศึกษาระดับปริญญาโท วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2533 จากนั้นเข้ารับราชการบรรจุตำแหน่งอาจารย์ที่ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีเดียวกัน ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 ได้รับทุน Fulbright จากมูลนิธิการศึกษาไทย-อเมริกัน ไปศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ University Of Illinois at Urbana-Champaign สหรัฐอเมริกา และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2541

นางสุนันทา ทองทา ได้มีผลงานทางวิชาการดังต่อไปนี้

1. ผลงานตีพิมพ์ ต่อ การประชุมระดับชาติและนานาชาติ

Chaisiricharoenkul, J. and **Tongta, S**. 2009. Effect of extrusion paprameters on starch digestion and physicochemical properties of Job' s Tear (*Coix lacryma jobi* L.) flour. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

Dalai, N. and **Tongta, S**. 2009. Physiochemical properties of waxy and high amylose rice flour during storage. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

Kiatponglarp, W. and **Tongta, S**. 2009. Comparative effect of different temperature cycling on resistant starch formation. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

Tongta, S. and Boonna, S. 2009. Physical modification of rice flour by extrusion. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

Tongta, S. and Kiatponglarp, W. 2009. Impact of enzyme concentration and hydrolysis time on resistant starch formation. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

Dalai, N. and **Tongta, S**. 2009. Physiochemical and textural properties of high amylose rice during storage. Poster presentation in Food Innovation Asia Conference 2009. June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand.

Boonna, S. ,**Tongta, S**. and Piyachomkwan, K. Effect of aging condition on resistant starch formation of rice starch. Poster presentation in 2009 IFT Annual Meeting. June 6-9, 2009. Anahiem, CA, USA.

Dalai, N. and **Tongta, S**. 2008. Comparative study on physical properties of waxy and non-waxy rice during storage. Poster presentation in The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.

Boonna, S. and **Tongta, S**. 2008. Effect of starch content and aging temperature on slowly digestible starch and resistant starch formation in debranched rice starch. Oral presentation in The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.

Apirattananusorn, S., **Tongta, S**., Cui, S.W., and Wang, Q. 2008. Chemical, molecular, and structural characterization of alkali extractable polysaccharides from Job's Tears. J. Agric. Food. Chem. 56:8549-8557.

Rareunrom, K., **Tongta, S**. and Yongsawatdigul, J. 2008. Effect of soy protein isolate on chemical and physical characteristics of meat analog. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 1(02):97-104.

Phoungchandand, S., Bhulaidok, S., Nantachai, K., Woraphuttaporn, W., **Tongta, S.** and Suvannason, V. 2007. Influence of various cereal flours on physical properties of expanded extrudates. Khon Kaen University Research Journal. 12(4):431-441.

Boonna, S. and **Tongta, S**. 2007. Effect of drum drying parameters on physical properties of pregelatinized rice flour. Poster presentation in Starch Update 2007: The 4th International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.

Kiatponglarp, W. and **Tongta, S**. 2007. Structural and physical properties of enzyme-resistant starch produced from debranched and retrogradation of cassava starch. Poster presentation in Starch Update 2007: The 4th International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.

Siriboon, B. and **Tongta, S**. 2007. Effect of annealing on physicochemical properties of waxy and normal rice starches. Poster presentation in Starch Update 2007: The 4th International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.

Chaisiricharoenkul, J. and **Tongta, S**. 2007. Physicochemical and antioxidant properties of Job's Tear Flour. Poster presentation in The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.

Rareunrom, K., **Tongta, S**. and Yongsawatdigul, J. 2007. Effect of soy protein isolate on chemical and physical characteristics of meat analog. Oral presentation in The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.

Siriboon, B. and **Tongta, S**. 2007. Effect of Annealing on Physicochemical Properties of Waxy Rice. Poster presentation in The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.

Kiatponglarp, W. and **Tongta, S**. 2007. Structural and Physical Properties of Debranched Tapioca Starch**.** Suranaree Journal of Science and Technology, 14(2):195-204.

Rareunrom, K., **Tongta, S**. and Yongsawatdigul. 2007. Effect of full fat soy flour on characteristics of soy protein meat analog. Suranaree Journal of Science and Technology, 14(2):185-193.

Pakdeechanuan, P., Intarapichet, K. and **Tongta, S**. 2007. Effect of extrusion parameters on conjugated linoleic acids of corn extrudate. J. Agric. Food. Chem., 55: 1463-1468.

Apirattananusorn, S., Cui, S.W., Wang, Q. and **Tongta, S**. 2006. Extraction and composition of water-unextractable arabinoxylans from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L.) (Abstract. pp. 238 and Poster presentation). 2006 CIFSTต่อ AAFC Joint Conference, May 28-30, 2006. Montreal, Canada.

Kiatponglarp, W. and **Tongta, S**. 2006. Effect of debranching on enzyme resistant starch formation in tapioca starch. Poster presentation in The 8th Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.

Tongta, S., Ningsanond, S. and Boonna, S. 2006. Influence of hydrocolloids and soy milk solid on physical and textural qualities of soy yoghurt. Poster presentation in The 8th Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.

Tongta, S. , Kiatponglarp, W. and K. Sriroth, K. 2004. Effect of aging temperature on retrogradation of concentrated cassava starch gel. In ‘ Starch: Progress in Structural studies, Modifications and Applications’ Tomasik, P., Yuryev, V.P. and Bertoft, E. (eds.). pp. 357-364. Drukarnia GS, Cracow.

Rareunrom, K., **Tongta, S**. and Yongsawatdigul. 2004. Structure and texture characteristic of soy protein meat analog. Poster presentation The 6th Agro-Industrial Conference. May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

Sottirattanapan, P. and **Tongta, S**. 2003. Effect of extrusion parameters on physical characteristics of rice extrudate. Suranaree Journal of Science and Technology. 10(3):220-229.

สถานที่ติดต่อ: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ (044) 22-4266 โทรสาร (044) 22-4150

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี