ศักยภาพของประเภทของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้

นางสาวชาลินี ทนันชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2556

POTENTIALITY OF TYPES OF RESISTANT STARCH FOR STIMULATING GROWTH OF INTESTINAL MICROFLORA

Chalinee Tananchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Food Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2013

ศักยภาพของประเภทของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(รศ. ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล)
ประธานกรรมการ

_____

(ผศ. ดร.สุนันทา ทองทา)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(ผศ. ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง)
กรรมการ

_____

(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)
กรรมการ

_____

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ชาลินี ทนันชัย : ศักยภาพของประเภทของแป้งต้านทานในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ (POTENTIALITY OF TYPES OF RESISTANT STARCH FOR STIMULATING GROWTH OF INTESTINAL MICROFLORA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา, 90 หน้า.

ประเภทของแป้งต้านทาน (RS) อาจจะมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์และการเพิ่มปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นซึ่งสันนิษฐานว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค แป้ง RS แบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท คือ สตาร์ชที่เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปได้ (RS1), เม็ดสตาร์ชต้านทานการย่อย (RS2), สตาร์ชที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (RS3) และ สตาร์ชดัดแปรทางเคมี (RS4) ซึ่งจัดเป็นพรีไบโอติกส์ที่สามารถใช้เสริมในอาหารสำหรับผู้บริโภค การศึกษาศักยภาพของแป้ง RS2, RS3 และ RS4 เปรียบเทียบกับพรีไบโอติกส์ทางการค้าคือ ฟรุคโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (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 ส่วนแบคทีเรียจากอาสาสมัครซึ่งจำลองการย่อยสับสเตรททุกประเภทผ่านระบบทางเดินอาหาร ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรทแต่ละประเภทมีการเจริญใกล้เคียงกันและมีค่าการเจริญสูงที่สุดถึง 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 20 ชั่วโมง และพบว่าแป้ง RS3 เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างกรดไขมันสายสั้น โดยพบกรดบิวทิริกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 11,575 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก นอกจากนี้เมื่อทดลองโดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครพบว่าแป้ง RS3 เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างกรดไขมันสายสั้น โดยพบกรดอะซิติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 8,560 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแป้ง RS3 แสดงความเป็นพรีไบโอติกส์ที่ส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

CHALINEE TANANCHAI : POTENTIALITY OF TYPES OF RESISTANT STARCH FOR STIMULATING GROWTH OF INTESTINAL MICROFLORA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUNANTA TONGTA, Ph.D., 90 PP.

RESISTANT STARCH/INTESTINAL MICROFLORA/DIGESTIVE MODEL SYSTEM

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 four types: physically inaccessible starch (RS1), resistant granular starch (RS2), retrograded starch (RS3), and chemically modified starch (RS4), 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, were studied by 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 20 hour cultivation. RS3 was best served as the substrate for producing SCFA. The highest content of SCFA was butyric acid, 11,575 ppm, which was higher than propionic and acetic acids. Furthermore, the investigation of mixed culture from fecal samples suggested that RS3 was also best served as the substrate for producing SCFA and the highest content of SCFA was acetic acid, 8,560 ppm, which was higher than butyric and propionic acids. Results revealed the promising beneficial effects of RS3 as a prebiotic.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Food Technology

Academic Year 2013

Student's Signature_____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้เงินทุนสนับสนุนในการศึกษาและเครื่องมืออุปกรณ์ในการวิจัย ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา ทองทา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้ความรู้ ให้ความเอาใจใส่ ทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำในด้านการศึกษาวิจัยและด้านอื่น ๆ ด้วยดียิ่งตลอดมา ตลอดจนเสียสละเวลาในการตรวจแก้ไขงาน และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียน และช่วยตรวจทานแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวชื่อมา ณ ที่นี้ ที่ให้ความรู้ในด้านวิชาการตลอดระยะเวลาที่ศึกษาในรั้วมหาวิทยาลัยแห่งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่อาคารศูนย์เครื่องมือ 2 และ 3 ทุกท่าน ที่คอยช่วยอำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในงานวิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ที่คอยอำนวยความสะดวกในด้านเอกสารการเรียนต่าง ๆ ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อนและน้องบัณฑิตศึกษาทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กันด้วยดีตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนด้วยความรัก ความเอาใจใส่ รวมถึงสนับสนุนทุนทรัพย์ในการศึกษาครั้งนี้ และขอบคุณทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจและส่งเสริมด้านการศึกษาเป็นอย่างดี จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ชาลินี ทนันชัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
2.1 แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS).....5
2.1.1 ประเภทของแป้ง RS.....6
2.2 ระบบทางเดินอาหารของคน.....11
2.2.1 กระเพาะอาหาร.....11
2.2.2 ลำไส้เล็ก.....12
2.2.3 ลำไส้ใหญ่.....13
2.3 จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของคน.....18
2.3.1 โพรไบโอติกส์ (Probiotics).....18
2.4 พรีไบโอติกส์ (Prebiotics).....22
2.4.1 ประเภทของพรีไบโอติกส์.....23
2.4.2 ประโยชน์ของพรีไบโอติกส์ (Health benefits of prebiotics).....23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3 วิธีดำเนินการวิจัย.....28
3.1 วัตถุดิบ และการเตรียมวัตถุดิบ…….....28
3.2 วิธีการวิจัย.....28
3.2.1 การทดสอบศักยภาพของแป้ง RS ต่อการเจริญ
ของเชื้อบริสุทธิ์…….....28
3.2.1.1 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ……..28
3.2.1.2 การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ……..29
3.2.1.3 การทดสอบแบคทีเรียบริสุทธิ์จากแหล่งเก็บ
เชื้อพันธุ์จุลินทรีย์…….....29
3.2.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยก
จากอุจจาระของอาสาสมัคร.....30
3.2.2.1 การเตรียมเชื้อจากอุจจาระของอาสาสมัคร…….....30
3.2.2.2 การทดลองคัดเลือกหาสูตรอาหารที่เหมาะสม
ต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์……...31
3.2.2.3 การหาระดับความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญ
ของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้…….31
3.2.2.4 การทดสอบการใช้แป้งต้านทานแบบไม่ผ่านการย่อย
ในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง……...32
3.2.2.5 การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อย
ในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง……....33
3.2.3 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระ
ของอาสาสมัคร.....34
3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....35
3.3.1 การเจริญของแบคทีเรีย (Bacterial growth)……..35
3.3.2 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH)……36
3.3.3 ความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity) ……36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars)……..36
3.3.5 วิเคราะห์ความสามารถในการผลิตกรดแล็กติก
และกรดไขมันสายสั้น……..37
3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ…….....37
4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.....38
4.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการเจริญ
ของเชื้อบริสุทธิ์.....38
4.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกจาก
อุจจาระของอาสาสมัคร.....40
4.2.1 การทดลองคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์……..43
4.2.2 การหาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์…….....46
4.2.3 การทดสอบศักยภาพของแป้ง RS ในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์
ที่คัดแยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร……51
4.2.4 การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางอาหารแบบจำลอง……..59
4.3 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระ
ของอาสาสมัคร.....66
5 สรุปผลการวิจัย.....69
เอกสารอ้างอิง…….....71
ภาคผนวก……..……..85
ประวัติผู้ขียน…….....90

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 การย่อยเชิงกลในระบบทางเดินอาหาร……..16

2 การศึกษาระบบการย่อยอาหารแบบจำลองในระดับ *in vitro* ……....17

3 จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักในตำแหน่งที่ต่างกัน
ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์….....19

4 ส่วนประกอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ
ศักยภาพของแป้งต้านทาน……..30

5 ส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อผสมจากตัวอย่างอุจจาระ
ของอาสาสมัคร……....35

6 การเจริญ ค่า pH และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย
Lactobacillus ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง….....39

7 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร
เปรียบเทียบกับแบคทีเรียอ้างอิง……..42

8 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10…….43

9 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 …….....44

10 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5……..……..45

11 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10…….……...……...47

12 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4…….……...48

13 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5…...……..…49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

14 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10……...……..51

15 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4…….…..….....52

16 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5……53

17 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองการย่อยสับสเตรทผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10…….60

18 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองการย่อยสับสเตรทผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4……..61

19 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองการย่อยสับสเตรทผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5……...61

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ภาพแสดงการบีบแบ่งเป็นส่วนของลำไส้เล็ก……..……..13

2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัคร
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar (A), RCA Agar (B), SF Agar (C)
และ ST Agar (D) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……....41

3 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นหลังการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4
ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0%.....50

4 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1%
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 ชั่วโมง……55

5 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารที่เติมสับสเตรท 1%
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 ชั่วโมง…..……...56

6 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1%
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 ชั่วโมง…….....57

7 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองการย่อยสับสเตรท
ผ่านระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp.RCF10
ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง…….....……..……...62

8 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองการย่อยสับสเตรท
ผ่านระบบทางเดินอาหารแบบจำลองเมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4
ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง…….....64

9 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองการย่อยสับสเตรท
ผ่านระบบทางเดินอาหารแบบจำลองเมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5
ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง…….....……...65

10 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 %
หลังการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร
ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง……..…….67

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีการใช้อาหารเพื่อการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ที่จัดเป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) กันอย่างแพร่หลาย จุลินทรีย์ดังกล่าวได้แก่ แบคทีเรียกรดแล็กติก (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 “พรีไบโอติกส์” (prebiotics) เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ทนต่อการย่อยและดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก มีการเลือกใช้เป็นสารอาหารสำหรับช่วยกระตุ้นการเจริญ และการทำงานอย่างจำเพาะของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ โดยสารที่จัดว่าเป็นพรีไบโอติกส์ ได้แก่ non-starch polysaccharides (NSP), inulin, oligosaccharides และ resistant starch (Gibson and Roberfroid, 1995; Gibson, 2004)

แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS) เป็นแป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่ถูกดูดซึมและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติ และจะผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่และถูกใช้เป็นสับสเตรท ในการหมักโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ จึงจัดได้ว่าเป็นพรีไบโอติกส์ (Asp, 1992; Englyst et al., 1992) ซึ่งแป้งต้านทานมีผลช่วยเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้นหลังจากการหมัก โดยหลัก ๆ ประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทีริก (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 โดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครจำนวน 3 ราย ได้รายงานว่าแป้ง RS, FOS และ inulin เป็นประเภทของสับสเตรทที่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ และสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดี สอดคล้องกับการทดลองใช้ FOS และแป้ง RS ผสมในอาหารสำหรับหนูทดลอง และวัดค่า pH ภายในลำไส้ของหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสม FOS มีค่าความเป็นกรดในลำไส้มากกว่า หนูทดลองที่ได้รับอาหารผสมแป้ง RS และเมื่อวัดค่าอัตราการเจริญระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่า ในลำไส้ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกส์ทั้งสองประเภทนี้ 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 prebiotics 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 ในหนูทดลองพบว่าช่วยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ในอุจจาระได้ดีกว่าให้อย่างใดอย่างหนึ่งแยกกัน แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแป้ง RS แต่ละประเภทในการกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์บริสุทธิ์เมื่อใช้เดี่ยว 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 และสตาร์ชสาคูเป็นสับสเตรทในการเจริญแล้วมีการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ (Shibata et al., 2007) ดังนั้นสายพันธุ์เฉพาะของ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, และ *Enterococcus* ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์และมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ จึงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมายที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถใช้แป้ง RS ในการเจริญได้ ปัจจุบันมีการใช้แป้ง RS เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จรูป โดยผู้บริโภคสามารถหาซื้อผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ทั่วไป นอกจากนี้แหล่งของแป้ง RS ที่สำคัญพบในพืชหลากหลายประเภทในธรรมชาติ อาทิเช่น ข้าวโพด มันฝรั่ง และโดยเฉพาะข้าวและมันสำปะหลังที่มีการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย ซึ่งสามารถสกัดเอาแป้งออกมาได้ง่าย มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถนำมาผ่านกระบวนการผลิตได้เป็นแป้ง RS3 และดัดแปรทางเคมีได้เป็นแป้ง RS4 โดยใช้ต้นทุนต่ำ ซึ่งนับว่าเป็นทางเลือกที่ดีหากสามารถบริโภคแป้ง RS เพื่อไปช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ให้ช่วยเพิ่มปริมาณของเชื้อเป้าหมายที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่แล้วในลำไส้ใหญ่ทดแทนการบริโภคโพรไบโอติกส์ โดยตรงได้ เนื่องจากโพรไบโอติกส์ที่บริโภคเข้าไปมีเพียงส่วนน้อยที่จะเหลือรอดไปถึงลำไส้ใหญ่ และอาจถูกล้างหมดไปจากระบบทางเดินอาหารได้ (washed out) (Topping et al., 2003) การบริโภคอาหารเสริมโพรไบโอติกส์โดยตรงนั้นจึงจำเป็นต้องบริโภคทุกวันซึ่งเป็นการสิ้นเปลือง การบริโภคแป้ง RS จะสามารถเพิ่มผลผลิตสุดท้ายที่เราต้องการที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการหมักสับสเตรทของจุลินทรีย์ได้โดยทางอ้อมซึ่งส่งผลที่เป็นประโยชน์ช่วยส่งเสริมสุขภาพได้เป็นอย่างดี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาศักยภาพของแป้ง RS 3 ประเภท คือ แป้ง RS2, RS3 และ RS4 ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

1.2.2 เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ที่สามารถใช้แป้ง RS ทั้ง 3 ประเภท ในการเจริญแล้วผลิตกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นได้ดี

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

แป้ง RS2, RS3 และ RS4 มีศักยภาพในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ในการทดลองแบบ *in vitro* ได้ดีไม่ต่างกันในแต่ละประเภท

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ปัญหาในครั้งนี้เน้นการศึกษาศักยภาพของแป้ง RS2, RS3 และ RS4 ต่อการกระตุ้นการเจริญและการทำงานของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อาศัยในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ โดยทำการทดลองในระดับปฏิบัติการ ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ (สายพันธุ์ที่สร้างกรดและไม่ก่อโรค) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียผสมที่ได้จากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี มีอายุอยู่ในช่วง 20 ถึง 40 ปี และไม่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงอย่างน้อย 3 เดือนก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระ ส่วนตัวอย่างแป้งที่ใช้จะมีทั้งในรูปของแป้งดิบ และแป้งที่จำลองการถูกย่อยผ่านสภาวะที่ใกล้เคียงกับระบบทางเดินอาหารจริงของมนุษย์ และเปรียบเทียบกับฟรุคโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) ทางการค้า

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ข้อมูลศักยภาพของแป้ง RS2, RS3 และ RS4 ในการกระตุ้นการเจริญของ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

1.5.2 ได้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ที่สามารถใช้แป้ง RS ในการเจริญแล้วผลิตกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นได้ดี

1.5.3 เพื่อให้เกิดความเข้าใจบทบาทหรือการทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS แต่ละประเภท และสามารถนำความรู้และข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS)

แป้ง (starch) สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามอัตราและระยะเวลาในการย่อย ได้แก่ แป้งสตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (rapidly digestible starch, RDS) แป้งสตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างช้า 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 แป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่ถูกดูดซึมและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติและจะผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่ และถูกเลือกใช้เป็นสารอาหาร ในการเจริญโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ (probiotic microorganisms) จึงจัดได้ว่าเป็น prebiotics (Englyst, Kingman, and Hudson, 1992) ซึ่ง resistant starch มีผลทำให้ได้ผลผลิตหลังจากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้นๆในปริมาณมาก โดยหลักๆประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นเหล่านี้จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์เยื่อบุในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตที่ลำไส้ใหญ่ และยั้บยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติในลำไส้ใหญ่ (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 4 ประเภทได้แก่ (Eerlingen et al., 1995; Brouns et al., 2002; Haralampu, 2000; Sajilata et al., 2006)

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

แป้ง RS2 (resistant granular starch) เป็นแป้ง RS ที่อยู่ในรูปเม็ดแป้งดิบ (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 ขนมปังและขนมอบกรอบ 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 RS สามารถใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารแทนการใช้เส้นใยอาหารจากแหล่งอื่น และใช้เพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร (fiber fortified) โดยปริมาณ RS ที่เติมลงในก็ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งที่ใช้ ชนิดของอาหาร และระดับความต้องการของเส้นใยอาหาร โดยใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำถึงปานกลาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ และผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จรูป 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 พบว่าสามารถลดระดับความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือด (total cholesteral) และลดระดับความเข้มข้นของ triglyceride ในเลือดจึงสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด และโรคหัวใจได้ (De Deckere et al., 1993 ; Younes et al., 1995; Mathe′ 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 และโพรไบโอติกส์คือ 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) ได้ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS2 และ FOS ในหนูทดลอง 18 ตัวโดยผสมในอาหารปริมาณ 9% เทียบกับการให้อาหารปกติเป็นระยะเวลานาน 14 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรีย และผลผลิตจากการหมักในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ลำไส้ใหญ่ส่วนปลายและอุจจาระ พบว่าทั้งแป้ง RS2 และ FOS ให้ผลทางพรีไบโอติกส์ได้ดีกว่าตัวอย่างอาหารควบคุม โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีการเจริญในอาหารที่เติม FOS ในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนปลายและอุจจาระ ส่วนในอาหารที่เติมแป้ง RS2 แบคทีเรียกรดแล็กติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนต้นและกระพุ้งลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งแป้ง RS2 และ FOS ให้ผลที่ส่งเสริมกันซึ่งการใช้ร่วมกันจะช่วยส่งผลประโยชน์ต่อสุขภาพของลำไส้ใหญ่ได้เป็นอย่างดี Brown et al. (1997) ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS2 ในหมูเพศผู้ 12 ตัว โดยเปรียบเทียบระหว่างแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ (low-amylomaize starch) กับแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสสูง (high-amylomaize starch) ติดตามปริมาณอุจจาระและกรดไขมันสายสั้นโดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริก และตรวจวัดปริมาณการเจริญของ bifidobacteria ต่อกรัมของอุจจาระ พบว่า high-amylomaize starch สามารถกระตุ้นการเจริญของ bifidobacteria ได้ดี ทั้งยังมีการผลิตกรดไขในสายสั้นได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ low-amylomaize starch และให้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกันกับ FOS Silivi et al. (1999) ศึกษาผลของแป้ง RS3 ต่อการเจริญของเชื้อจากลำไส้หนูทดลอง พบว่าแป้ง RS3 15 กรัมต่อ 100 กรัมอาหาร มีผลช่วยให้ปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria เพิ่มขึ้นได้ $10\text{-}10^2$ CFU/mL 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 ร่วมกันกับระยะเวลาในการสัมผัสกับพรีไบโอติกส์ซึ่งสามารถช่วยอธิบายผลที่เกิดขึ้นได้ดีกว่าผลของปริมาณของพรีไบโอติกส์ที่บริโภคเข้าไป

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 สามารถเพิ่มการขับถ่ายและเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นในอุจจาระได้ดี (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 ในรูปที่มีการดัดแปรเป็น resistant starch และรูปของ native starch ต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ *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) ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS3 ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่เติมแป้ง RS3 มีการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม bifidobacteria และมีการผลิตกรดไขมันสายสั้นเพิ่มมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร และส่งผลต่อการลดลงของค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ และอุจจาระของหนูทดลอง Lesmes et al. (2008) ได้ศึกษาผลของแป้ง RS3 ด้วยการทดลองแบบ *in vitro* พบว่า โครงสร้างผลึกที่หนาแน่นของแป้ง RS3 มีอิทธิพลต่อความสามารถในการหมักของแบคทีเรียในลำไส้ และจำนวนของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นนั้นมีผลต่อปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นด้วย จากรายงานผลการทดลองของFerguson, Jones and Englyst, (2000) พบว่าแป้ง RS2 ที่ได้จากมันฝรั่งดิบ (raw potato starch)

สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ butyrate ได้ดี สอดคล้องกับผลการทดลองทั้งในมนุษย์และในหนู ทดลองพบว่าแป้ง 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) ได้ศึกษาผลความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง 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 และช่วยลดผลผลิตที่เป็นพิษที่เกิดจากการหมักโปรตีนได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม 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 prebiotics 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 ระบบทางเดินอาหารของคน

2.2.1 กระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหารมีรูปร่างคล้ายอักษรตัวเจ (J-shaped) มีขนาดยาว 25 เซนติเมตร ขณะที่กระเพาะอาหารว่างจะมีปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร และสามารถขยายให้มีความจุได้ถึง 4 ลิตร ภายหลังอาหารมื้อใหญ่ (Pocock and Richards, 2009)

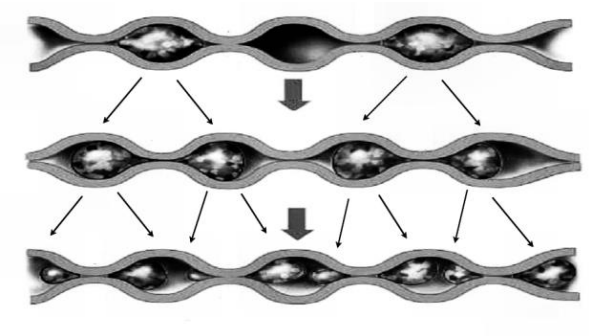
ต่อมในกระเพาะอาหาร (Gastric glands) มี 3 ชนิด คือ ต่อม Cardiac glands มีหน้าที่ขับเมือก ต่อม Peptic glands ต่อมนี้ประกอบด้วย Chief cells (ทำหน้าที่หลั่ง pepsinogen), Parietal cells (ทำหน้าที่สร้างและหลั่งกรดกรดไฮโดรคลอลิก ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการเปลี่ยน pepsinogen ให้เป็น pepsin ที่ใช้ในการย่อยโปรตีนอีกด้วย 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 ด้วยการกวน นวดอาหารให้ได้เป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ผสมกับน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร (gastric juice) หลั่งกรดไฮโดรคลอลิก 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 และอาหารจะถูกบดย่อยเล็กลงไปเป็นลำดับจนกระทั่งมีขนาดเล็กพอที่จะผ่านหูรูดปลายกระเพาะไปได้ 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 เมื่อมีอาหารอยู่ในลำไส้เล็กจะเป็นสิ่งกระตุ้นตัวรับการยืดในลำไส้เล็ก แล้วจะเป็นการเริ่มต้นการบีบของลำไส้เล็ก 2 ลักษณะคือ การบีบแบ่งเป็นส่วน (segmentation) และการบีบรูด (peristalsis) (Pocock and Richards, 2009) การบีบแบ่งเป็นส่วนนี้ทำให้เห็นว่าลำไส้เล็กแบ่งออกเป็นปล้อง ลักษณะการบีบแบ่งเป็นส่วนคือ ลำไส้เล็กช่วงนี้มีบริเวณที่บีบรัดอยู่สลับกับบริเวณคลาย จึงเห็นลักษณะเป็นปล้อง (รูปที่ 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)



รูปที่ 1 ภาพแสดงการบีบแบ่งเป็นส่วนของลำไส้เล็ก

ที่มา: Smith and Morton (2010)

กระบวนการบีบรูด (peristalsis) มีระบบควบคุมที่ซับซ้อนกว่าการบีบแบ่งเป็นส่วน ลักษณะเป็นการเคลื่อนของอาหารลงไปตามลำไส้เล็ก ระบบการทำงานประกอบด้วย การกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบ วงแหวนที่ลำไส้เล็กช่วงเหนือตำแหน่งที่มีอาหารอยู่หดตัว และให้กล้ามเนื้อเรียบตามยาวคลายตัว ในขณะเดียวกันจะควบคุมให้กล้ามเนื้อเรียบวงแหวนที่ลำไส้เล็กช่วงล่างอยู่ในสภาพคลายตัว และให้กล้ามเนื้อตามยาวช่วงนี้หดตัว เมื่อกล้ามเนื้อวงแหวนคลายตัวขณะที่กล้ามเนื้อตามยาวหดตัว ลำไส้เล็กจึงมีเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น และทำให้อาหารเคลื่อนลงมาอยู่ในลำไส้เล็กช่วงล่างได้ง่าย การบีบรูดจะเกิดเป็นคลื่นบีบรูดเคลื่อนไปตามลำไส้เล็กจากช่วงต้นไปช่วงปลายได้เป็นระยะทางสั้นๆ (Pocock and Richards, 2009; Smith and Morton, 2010) เมื่อภายในช่องลำไส้เล็กมีความดันเพิ่มขึ้น จะสามารถกระตุ้นให้ลำไส้เล็กบีบตัว ทั้งการบีบแบบแบ่งเป็นส่วนและแบบบีบรูด จึงสรุปว่าการบีบทั้งสองแบบนี้ เป็นการทำงานตอบสนองของลำไส้เล็กเมื่อมีอาหารอยู่ในลำไส้เล็ก 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 เหนือขึ้นไปด้านบนและโค้งไปทางด้านซ้ายในตำแหน่งที่ต่ำกว่าตับดิ่งลงมาที่ตำแหน่งเชิงกราน และสิ้นสุดที่ทวารหนัก ลำไส้ใหญ่มีน้ำหนักเปียกประมาณ 220 กรัม ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 90 กรัม จุอาหารได้ประมาณ 1-2 ลิตร ภายในประกอบด้วยกากอาหารเป็นส่วนของเหลวกึ่งแข็งที่ไม่ถูกย่อย (95 กรัมต่อวัน) ซึ่งตกมาถึงลำไส้ใหญ่ อุจจาระที่เป็น

ของแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการดูดของเหลวออกโดยปริมาตรสุดท้ายจะได้อุจจาระประมาณ 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 ลำไส้ใหญ่มีการบีบแบ่งเป็นส่วนและการบีบรูดเช่นเดียวกับลำไส้เล็ก ในเวลาที่ไม่ได้กินอาหารลำไส้ใหญ่มีการบีบรูดอยู่ในอัตราที่ช้ามาก การบีบรูดในช่วงเวลานี้จะทำให้อาหารเคลื่อนที่ไปได้ประมาณชั่วโมงละ 5 เซนติเมตร ช่วงหลังกินอาหารเสร็จใหม่ๆลำไส้ใหญ่จะบีบเร็วขึ้นและแรงขึ้น หลังกินอาหารแล้วประมาณ 15-30 นาที ลำไส้ใหญ่จะเริ่มบีบมากขึ้นและยังคงบีบติดต่อกันไปอีกนานกว่า 2 ชั่วโมง เหตุที่ลำไส้ใหญ่บีบได้แรงช่วงหลังกินอาหารเป็นเพราะการที่อาหารทำให้กระเพาะอาหารยืดออก ขณะเดียวกันใยประสาทที่เชื่อมโยงไปถึงระบบประสาทในลำไส้ใหญ่ จะกระตุ้นลำไส้ใหญ่บีบแรงขึ้นด้วย ต่อมาเมื่ออาหารมาอยู่ในลำไส้เล็กกระตุ้นให้ลำไส้เล็กบีบ จะกระตุ้นลำไส้ใหญ่ด้วยเช่นกัน 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 ซึ่งปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูงจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญและการหมุนเวียนของแบคทีเรีย และส่งผลในการลดลงของค่าพีเอชของลำไส้ประมาณ 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 และการเคลื่อนที่ของอาหารในแต่ละขั้นตอนภายในระบบทางเดินอาหารแต่ละส่วนจากปาก กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ไปจนถึงส่วนของลำไส้ใหญ่ดังไว้ในตารางที่ 1

ในด้านของการจำลองระบบการย่อยอาหารแบบ *in vitro* มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ เช่น ลักษณะสมบัติของตัวอย่าง กิจกรรมการทำงานของ enzyme ส่วนประกอบของไอออน ความกดดันของเชิงกล (mechanical stresses) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะการทดลองแบบ *in vitro* นั้นจะไม่ได้ถูกกระตุ้นอย่างสมบูรณ์ (Hur, Lim, Decker, and McClenents, 2011) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการทดลอง *in vitro* digestion models ในอาหารอย่างหลากหลาย (ตารางที่ 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 การย่อยเชิงกลในระบบทางเดินอาหาร

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

ที่มา: Kent and Van de Graaff (2000)

ตารางที่ 2 การศึกษาระบบการย่อยอาหารแบบจำลองในระดับ *in vitro*

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)

ที่มา: Hur et al. (2011)

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 3 ทั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อก่อโรค ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ดังกล่าวคือจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นสารเสริมชีวนะ (Probiotics) ของคน

2.3.1 โพรไบโอติกส์ (Probiotics)

โพรไบโอติกส์ คือ จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตสามารถอยู่รอดผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนบน โดยจะทนต่อสภาพกรดในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้ และอยู่ในน้ำดีได้ สามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ได้ดี เจริญเพิ่มปริมาณและมีกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolizing) ในลำไส้ใหญ่ ไม่ก่อให้เกิดโรค และยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพของ host (Fuller, 1992) เมื่อได้รับในปริมาณพอเพียงช่วยให้มีสุขภาพที่ดีขึ้น 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) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์ยังได้แก่แบคทีเรียอีกหลายชนิด ยีสต์ และรา (Fuller, 1992) กลุ่ม

แบคทีเรียทีเป็นโพรไบโอติกส์ *Bacillus* sp. (สายพันธุ์ที่นิยมใช้ได้แก่ *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 *Bifio. thermophilum, Bifio. adolescentis, Bifio. animalis, Bifio. bifidum, Bifio. infantis* และ *Bifio. longum)*

ตารางที่ 3 จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์หลักในตำแหน่งที่ต่างกันในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

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}

ที่มา: Salminen and Wright (1993)

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. (สายพันธุ์ที่

นิยมใช้ได้แก่ *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*) ส่วนกลุ่มยีสต์ที่เป็นโพรไบโอติกส์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pentoiepessi* และนอกจากนี้ยังมีกลุ่มราที่เป็นโพรไบโอติกส์ ได้แก่ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus niger*

โดยธรรมชาติโพรไบโอติกส์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้อย่างถาวร โดยโพรไบโอติกส์จะมีสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพได้ดีก็ต่อเมื่อผ่านระบบย่อยอาหารเข้าไปอยู่ในลำไส้ได้ ซึ่งมี โพรไบโอติกส์บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ (normal colonic microflora) งานวิจัยส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับโพรไบโอติกส์จะเกี่ยวข้องกับการสังเกตผลมากกว่าการอธิบายกระบวนการ ดังนั้นกระบวนการทำงานของโพรไบโอติกส์จึงไม่ค่อยได้มีคำอธิบายมากนัก (Fuller, 1992) โพรไบโอติกส์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดนั้นโดยมากได้แก่ *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 รับประทานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ที่มี *Lactobacillus acidophilus* และ *Lact. bulgaricus* แล้วลองให้ได้รับเชื้อ *E. coli* ชนิดที่สร้างเอ็นเทอโรท็อกซิน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งในอัตราการเกิดโรค ระยะฟักตัวและระยะเวลาในการเกิดโรค เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ ยีสต์ *Saccharomyces boularddii* ที่นำมาใช้ในการทดลองเกี่ยวกับการป้องกันและรักษาโรคท้องร่วงที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ใช้ผู้ป่วยจำนวนทั้งหมด 180 คน ในการทดลองเป็นกลุ่มควบคุม 20 คน พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับโพรไบโอติกส์ปริมาณร้อยละ 9.5 มีอาการท้องเสีย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอาการร้อยละ 22 ผู้เขียนสรุปว่าการใช้โพรไบโอติกส์ช่วยลดการเกิดอาการท้องร่วงที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ถึงแม้ว่ายีสต์ *Saccharomyces boulardii* จะไม่สามารถ

ป้องกันเชื้อก่อโรคได้ก็ตาม (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, and Bressollier, 2013; Axelsson, 2004)

โพรไบโอติกส์สามารถสร้างกรดแล็กติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (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) เมื่อโพรไบโอติกส์เจริญร่วมกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน สามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อก่อโรคจะเข้ายึดเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ และการเข้ายึดเกาะที่ผนังทางเดินอาหารของโพรไบโอติกส์นี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1992)

นอกจากนี้โพรไบโอติกส์ยังสามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนส (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 50.9μg/ml และ *Lact. acidophilus* D5 จะดูดซึมได้น้อยที่สุดคือ 28μg/ml และโพรไบโอติกส์สามารถสร้างกรดได้จากการหมักสารอาหาร ช่วยปรับสภาพในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์พวกก่อโรคเช่น บางสายพันธุ์ในกลุ่ม *Coliforms* เจริญได้ยาก มีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค มีความคงทนต่อสภาพแห้งแล้งได้นาน สามารถนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์ได้ ทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งมักพบหรือใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในการดื้อยา (Fuller, 1989)

จำนวนแบคทีเรียที่พบในแต่ละบริเวณของระบบทางเดินอาหาร แสดงในตารางที่ 3 โดยปกติในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีจุลิทรีย์ไม่มากเช่น *Streptococcus, Lactobacillus* และ ยีสต์ มีจำนวน 10–10^4CFU/ml แต่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) จะมีจุลินทรีย์จำนวน 10^6–10^8 CFU/ml โดยเป็นแบคทีเรียกในสกุล *Enterococcus, Bateroides, Clostridium, Streptococcus, และ Lactobacillus* จำนวนแบคทีเรียในลำไส้จะเพิ่มมากขึ้นเป็น 10^{11}–10^{12}CFU/ml เมื่อใกล้กับลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (sigmoid colon) (Salminen and Wright, 1993) จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบลำไส้มีความสำคัญต่อสุขภาพ การเจริญและระบบเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่จะขึ้นอยู่กับสารอาหารที่ได้รับ ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากอาหารที่เรารับประทานเข้าไป จึงมีความพยายามที่จะปรับเปลี่ยนโครงสร้างและกิจกรรม เมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่โดยใช้โพรไบโอติกส์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหาร เป็นที่ทราบกันดีว่ามีการนำจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก กลุ่มแลคโตบาซิลลัสและไบฟิโดแบคทีเรียมมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ในหารผลิตโยเกิร์ตและผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่นๆ จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ไม่เป็นพิษ มีชีวิตอยู่เป็นเวลานาน และสามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กไปสู่ลำไส้ใหญ่ได้ดี (Fuller, 1992)

2.4 พรีไบโอติกส์ (Prebiotics)

พรีไบโอติกส์ เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก มีการเลือกใช้เป็นสารอาหาร (substrate) สำหรับช่วยกระตุ้นการเจริญและการทำงานอย่างจำเพาะของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ และหลังจากมีการใช้พรีไบโอติกส์โดยจุลินทรีย์ใน

กระบวนการหมักแล้ว ได้กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นเป็นผลผลิตสุดท้ายที่ล้วนส่งผลให้เจ้าบ้าน (host) มีสุขภาพที่ดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995; Gibson, 2004)

2.4.1 ประเภทของพรีไบโอติกส์

สารที่จัดว่าเป็นพรีไบโอติกส์ ได้แก่ 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 prebiotics 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 ต่อการเจริญของ แบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัคร 7 ราย เมื่อตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ พบว่าพรีไบโอติกส์ทั้ง 2 ประเภท สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ในสกุล bifidobacteira และ lactobacilli ได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และ OF มีปริมาณแอมโมเนียน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น พบว่ามีกรดอะซิติกและกรดแล็กติกเป็นผลผลิตหลักจากการหมัก OF ซึ่งสัมพันธ์กันกับค่าพีเอชที่ลดลง และมีปริมาณกรดไขมันสายสั้นมากกว่าเมื่อเทียบกับ inulin อีกทั้ง FOS และ IN เป็น พรีไบโอติกส์ทางการค้าที่สามารถจัดหาได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้เป็นพรีไบโอติกส์สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพอย่างแพร่หลาย (Rodriguez-Cabezas ME et al., 2010; Beards, Tuohy and Gibson, 2010)

2.4.2 ประโยชน์ของพรีไบโอติกส์ (Health benefits of prebiotics)

ผลประโยชน์หลัก ๆ ของพรีไบโอติกส์คือ 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 เป็นประเภทของสับสเตรทที่สามารถ กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ และสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดี จากการทดลองใช้ FOS และแป้ง RS ผสมในอาหารสำหรับหนูทดลอง และวัดค่าพีเอชภายในลำไส้ของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสม FOS มีค่าความเป็นกรดในลำไส้มากกว่า หนูทดลองที่ได้รับอาหารผสมแป้ง RS และเมื่อวัดค่าอัตราการเจริญระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่าในลำไส้ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกส์ทั้งสองประเภทนี้ 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 พรีไบโอติกส์เพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ซึ่งอยู่ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของคนปกติ 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) พบว่าพรีไบโอติกส์ เช่น 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 และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

หลายสายพันธุ์ (*Clostridium* sp., *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* หรือ *Salmonella typhimurium*) ทั้งในลำไส้ของคนและสัตว์ทดลอง

ผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีรายงานว่าอาหาร functional foods มีผลช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับผู้บริโภคได้จริงๆแล้วส่วนประกอบในโภชนาการและผลิตผลของกระบวนการหมักมักมีความเชื่อมโยงกันกับเนื้อเยื่อของระบบน้ำเหลืองในลำไส้ (GALT) ซึ่งเป็นส่วนที่มีมากที่สุดในระบบภูมิคุ้มกันของลำไส้เล็ก อาหารที่มีอยู่ในลำไส้ อาจมีความจำเป็นสำหรับการแสดงบทบาทที่เหมาะสม และการพัฒนาการของระบบบน้ำเหลืองในลำไส้ (Scheppach, Bartram, Richter, Richter, et al., 1992) อย่างไรก็ตาม กลไกอื่นๆในระบบภูมิคุ้มกัน สันนิษฐานว่าการตอบสนองต่อการต้านทานการรุกรานแต่ดั้งเดิม สามารถถูกกระตุ้นผ่านการทำปฏิกิริยา ของน้ำตาลกับตัวรับการกระตุ้นบน plasma membrane ของเซลล์ ในส่วนของ 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 100g/kg เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีความผิดปกติของต่อมในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายลดลงหลังจากได้รับการสัมผัสกับสารกระตุ้นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมีความต้านทานต่อการติดเชื้อมากขึ้น ช่วยลดอัตราการตายเมื่อทดสอบกับเชื้อก่อโรค และในการรักษาภาวะลำไส้อักเสบ มีผลการทดลองที่ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของ inulin ในการปรับปรุงแผลของเซลล์เยื่อเมือกในลำไส้ตอนปลายของหนูทดลองให้ดีขึ้นได้ (Videla, Vilaseca, Antolin, Garcia-LafuenteGuarner, Crespo, et al., 2001) ตามจริงแล้วการบริโภคพรีไบโอติกส์นั้นจะช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ส่งผลในการปรับระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ หรือโดยทางผลของกรดไขมันสายสั้นที่สร้างจากการหมักพรีไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกในลำไส้ใหญ่โดยตรง ผลที่สุดคือการส่งเสริมการสร้างเซลล์เยื่อเมือกในลำไส้ นอกจากนี้การศึกษาทำงานร่วมกันของพรีไบโอติกส์ เช่น polydextros และ lactitol พบว่า มีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่าง การเจริญของจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารของหนูทดลอง และเพิ่มการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มการขับ immunoglobulin A (IgA) (Peuranen, Tiihonen, Apajalahti, Kettunen, Saarinen, and Rautonen, 2004)

ผลต่อการช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ กรดไขมันสายสั้นเป็นผลผลิตหลักที่ได้จากกระบวนการสันดาปของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ผ่านการหมักพรีไบโอติกส์ โดยหลัก 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 ได้มีการพิสูจน์ถึงผลของพรีไบโอติกส์ต่อเมทาบอลิซึมของไขมันในตับพบว่า 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) จากการศึกษาในหนูทดลองพบว่ากรดอะซิติก (acetic acid) ที่เกิดจากการหมักพรีไบโอติกส์ของจุลินทรีย์สามารถช่วยยับยั้งการสังเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอล (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) สามารถช่วยยับยั้งการ

สังเคราะห์กรดไขมัน และคอเลสเตอรอล จากการทดลองผสมพรีไบโอติกส์เป็นสารอาหารในคน 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 มีรายงานผลการทดลองในคนวัยหนุ่มสาวถึงการบริโภคร่วมกันของพรีไบโอติกส์ประเภทอินนูลินสายสั้นและสายยาวในแต่ละวันมีผลจะช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุแคลเซียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 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) รายงานว่าการทดลองส่วนมากมีข้อมูลสนับสนุนผลของพรีไบโอติกส์ในอาหารที่บริโภคเข้าไป ต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวในสัตว์ทดลองบางชนิด ผลที่ได้แสดงถึงการลดลงของมวลไขมันตามการให้อาหารที่ผสม inulin-type fructan (ITF) การลดลงนี้มีผลสัมพันธ์กับการลดอาหารหรือพลังงานที่รับเข้าไป ผู้เขียนรายงานว่าพรีไบโอติกส์ที่ใช้เสริมในอาหารสามารถแสดงศักยภาพ ในการขับ peptides เช่น glucagon-like peptide (GLP), Peptide YY (PYY) โดย endocrine cell ในลำไส้โดยการควบคุมอาหารที่บริโภคเข้าไปและพลังงานที่ได้รับ (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, and Bressollier, 2013)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ

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, Beneo™ P95, Orafti, Tienen, Belgium) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท DPO (Thailand) Ltd.

แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียบริสุทธิ์จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450, *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 และ *Lactobacillus fermentum* TISTR 876

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

เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี มีอายุอยู่ในช่วง 20 ถึง 40 ปี และไม่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงอย่างน้อย 3 เดือนก่อนเก็บตัวอย่างอุจจาระ เตรียมสารละลายกล้าเชื้อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutritive medium ที่เตรียมจากสารละลาย Carbonate-phosphate buffer ซึ่งมีส่วนประกอบตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Barry et al. (1995) (ตารางที่ 5)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ

เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Lactobacillus* species จากศูนย์วิจัยเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จาก stock culture ที่เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาวางไว้ให้ละลายที่อุณภูมิห้อง ปิเปตเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow, Biosafety cabinet class II, HRX-II, Haier, Chaina) และบ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน

ในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงหลังจากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว Cross streak ลงบนอาหารวุ้นแข็งแล้วบ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ (Pure culture) มา streak อาหารแข็ง บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมแบคทีเรียกลับคืนเข้า stock culture เก็บเข้า freezer ที่ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนที่เหลือไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆต่อไป

3.2.1.2 การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ตามสูตรมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) โดยนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (High pressure steam sterilizer, Autoclave SX-700, Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan) จากผลการทดลองขั้นพื้นฐานที่ผ่านมาซึ่งได้ใส่แป้ง RS เป็นแหล่งของคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารมาตรฐานแล้วพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติทั้ง 4 สายพันธุ์ มีแนวโน้มความสามารถในการใช้แป้ง RS ได้ค่อนข้างต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส สอดคล้องตามโครงสร้างของแป้งที่ซับซ้อนมากกว่าน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นจึงได้ปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลาย ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เชื้อจะสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานหลัก เพื่อให้เชื้อได้ใช้สับสเตรทของเราแทน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง RS2, RS3 และ RS4 แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ตามเป้าหมาย

3.2.1.3 การทดสอบแบคทีเรียบริสุทธิ์จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลว MRS สูตรมาตรฐานปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง หรือประมาณ 1 คืน ให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8CFU/mL (โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทียบกับข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง spectrophotometer SmartSpec^{TM}3000, BIO-RAD กับค่าจากการ spread plate) จากนั้นปิเปตเชื้อประมาณร้อยละ 2 ลงในอาหารเหลวที่เติมแป้ง RS แต่ละสูตร จะได้เชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง ประมาณ 10^6CFU/mL บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดผลการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS Agar บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ในสภาพไร้ออกซิเจน ใน anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกการเจริญเป็น CFU/mL บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการหมักโดยใช้เครื่อง pH-meter และวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดทั้งหมด (total acidity) ด้วย titration method ตาม AOAC Official Method 950.07 (AOAC International, 2000)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในอาหาร MRS ปรับสูตรสำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานแต่ละประเภท (pH6.5±0.2)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร					
	Std.	**สูตร 1**	**สูตร 2**	**สูตร 3**	**สูตร 4**	**สูตร 5**
Glucose	20	-	-	-	-	-
Starch	-	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
$MgSO_4.7H_2O$	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)

3.2.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์จากอุจจาระของอาสาสมัคร

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อจากอุจจาระของอาสาสมัคร

เก็บตัวอย่างเชื้อจากอุจจาระของอาสาสมัคร ตามวิธีมาตรฐานใน Vanderzant and Splittstoesser (1992) แล้วเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจากสูตรอาหารมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ในสกุล *Lactobacillus,*

Bifidobacterium, Enterococcus และ *Streptococcus* (สายพันธุ์ที่สร้างกรดและไม่ก่อโรค) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar, Reinforced Clostridial Agar (RCA), *Streptococcus faecalis* Agar (SF), และ *Streptococcus thermophilus* Agar (ST) ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 1-4) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถใช้แป้งได้ โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหารสูตรที่มีการแทนที่แป้ง soluble starch ความเข้มข้น 1% ลงในสูตรอาหารมาตรฐานแทนที่น้ำตาลกลูโคส และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่ใช้แป้งได้ มาทดสอบสมบัติทางสัณฐานและสรีรวิทยาตาม Brenner, Krieg, and Staley (2005) พร้อมทั้งทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบระบบ API ชนิด API 50CH/CHL และ API 20A (bioMérieux; bioMérieux, Inc.; France) เปรียบเทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) เพื่อทราบสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อไป

3.2.2.2 การทดลองคัดเลือกหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

มีการทดลองปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลาย โดยการปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) (ตารางที่ 4) ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เชื้อจะสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เพื่อให้เชื้อได้มีการใช้สับสเตรทของเราแทน และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้ง RS แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ตามเป้าหมาย

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 1 loopful ลงในอาหารเหลว MRS สูตรมาตรฐานปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง หรือประมาณ 1 คืน ให้มีกล้าเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/mL จากนั้นปิเปตเชื้อร้อยละ 2 ลงในอาหารเหลวที่เติมแป้ง RS แต่ละสูตร จะได้เชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง ประมาณ 10^6 CFU/mL 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 CFU/mL บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการหมักโดยใช้เครื่อง pH-meter และวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดทั้งหมด (total acidity) ด้วยวิธีการไทเทรต (AOAC International, 2000) แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugars) เพื่อหาปริมาณสับสเตรทที่เชื้อใช้ไประหว่างการเจริญในอาหารเหลว ด้วยวิธี colorimetric (phenol-sulphuric acid) method (Dubois et al., 1956)

3.2.2.3 การหาระดับความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้

โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับ 3 ที่ปรับจากสูตรอาหารมาตรฐานใน Atlas and Parks (2004) ดังแสดงในตารางที่ 4 และผสมแป้งข้าวดิบ (native rice starch) ความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5%, และ 2.0% ไปแทนที่น้ำตาลกลูโคส

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลว MRS สูตรมาตรฐานปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หรือประมาณ 1 คืน ให้มีกล้าเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/mL จากนั้นปิเปตเชื้อ 2% ลงในอาหารเหลวที่ผสมแป้ง RS แต่ละสูตร จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/mL 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 CFU/mL 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 ที่สามารถผลิตกรดทั้งในปริมาณที่ค่อนข้างสูงมา 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตเอาส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1200 Series LC System and Module, Agilent Technologies International *sarl*, Morges, Switzerland)

3.2.2.4 การทดสอบการใช้แป้งต้านทานแบบไม่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง

การเตรียมสับสเตรท (substrates) เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสับสเตรทที่นำมาใช้ในการทดลองได้แก่ แป้ง RS2, RS3, RS4 และ FOS เตรียมอาหารตามสูตรปรับ 3 ดังแสดงในตารางที่ 4 เติมใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร แล้วจากนั้นเติมสับสเตรท 1% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทดสอบการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกไว้สำหรับการทดลอง เติมกล้าเชื้อ 2% โดยปิเปตเชื้อ

จากอาหารเหลวอายุ 18-24 ชั่วโมง ที่มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/mL ใส่ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จะได้เชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมงประมาณ 10^6 CFU/mL บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

วัดผลการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS Agar บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกการเจริญเป็น CFU/mL บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่เวลา 20 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 โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1200 Series LC System and Module, Agilent Technologies International *sarl*, Morges, Switzerland)

3.2.2.5 การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง

การเตรียมสับสเตรทเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2.4 เตรียมอาหารตามสูตรปรับ 3 ดังแสดงในตารางที่ 4 เติมใส่ขวดทดลอง ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 190 มิลลิลิตร แล้วจากนั้นเติมสับสเตรท 1 % นึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 psi นาน 15 นาทีและหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อมีการให้สับสเตรท ได้ผ่านการย่อยก่อนโดยจำลองสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH), เติมเอนไซม์ และบ่มตามช่วงระเวลาการย่อยที่มีสภาวะใกล้เคียงกับกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (ดัดแปลงวิธีการจาก Słominska et al., 2010 และ Goderska, Gumienna and Czarnecki, 2008) ตามขั้นตอนในแต่ละตำแหน่งดังนี้

ขั้นตอนของกระเพาะอาหาร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ด้วยกรด HCl 6 M เติมเอนไซม์ pepsin ความเข้มข้น 60,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (P7000, Sigma) ที่ละลายใน 0.1 M HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน shaking incubator (shaker incubator, Innova 42R, association Thailand-Japan) เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนของลำไส้เล็ก ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 ด้วย NaOH 6 M เติม pancreatic-intestinal solution 10 มิลลิลิตร (pancreatic extract (P1750, Sigma) 0.02g/10 ml + bile salts 0.12g/10 มิลลิลิตร ละลายใน0.1 M $NaHCO_3$ 10 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน

shaking incubator (shaker incubator, Innova 42R, association Thailand-Japan) เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง

ขั้นตอนของลำไส้ใหญ่ ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 8.0 ด้วย NaOH 6 M ปิเปตเชื้อจากอาหารเหลว อายุ 18-24 ชั่วโมง มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/mL (โดยเทียบข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง spectrometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรกับค่าการเจริญ CFU/mL จากการ spread plate) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยแล้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะได้เชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมงประมาณ 10^6 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า (shaker incubator, Innova 42R, association Thailand-Japan) เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 20 ชั่วโมง โดยปิดฝาขวดให้แน่น (ซึ่งได้ทำการทดสอบแล้วว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ที่ทำการทดลองไม่มีการสร้างก๊าซเกิดขึ้น)

วัดผลการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS Agar บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน ในตู้บ่ม anaerobic chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกการเจริญเป็น CFU/mL บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่เวลา 20 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 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้น โดยใช้เครื่อง HPLC (Agilent 1200 Series LC System and Module, Agilent Technologies International *sarl*, Morges, Switzerland)

3.2.3 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร (ดัดแปลงตามวิธีการของ Barry et al., 1995)

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งสับสเตรทแต่ละประเภทได้แก่ RS2, RS3, RS4 และ FOS ประเภทละ 100 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่ง (Analytical balance, SI-234, Denver Instrument, Germany) โดยชั่งใส่ใน polypropylene vial ขนาด 50 มิลลิลิตร

เตรียมตัวอย่างอุจจาระโดยเก็บตัวอย่างอุจจาระใส่ในขวดกันความร้อน ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และทำการไล่ออกซิเจนด้วยการ flush ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เตรียมสารละลายกล้าเชื้อโดยชั่งน้ำหนักอุจจาระ 100 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutritive medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ทำจากสารละลาย Carbonate-phosphate buffer ซึ่งมีส่วนประกอบตามสูตรของ Barry et al. (1995) (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อัตราส่วนอุจจาระต่ออาหารเลี้ยงเชื้อคิดเป็น 1 : 5 จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (stomacher, Stomacher®400 circulator, Seward Medical, London, U.K.) นาน 2 นาที และกรองส่วนผสมที่ได้ผ่านผ้า gauze หนา 6 ชั้น จะได้กล้าเชื้อของแบคทีเรียผสม จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อผสม 10 มิลลิลิตร ใส่ในแต่ละ vials ซึ่งมี สับสเตรท 100 มิลลิกรัม อยู่แล้วปิดฝาขวดให้สนิทขั้นตอนนี้ทำในตู้บ่ม anaerobic chamber (SHEL LAB, BACTRON I, USA) แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่า (shaker incubator, Innova 42R, association Thailand-Japan) ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่างที่เวลา 20 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมา freezing ทันทีด้วย dry ice จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ผ่านการหมักที่เวลาต่างๆ ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตเอาส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่าง 10 เท่าเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้น ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1200 Series LC System and Module, Agilent Technologies International *sarl*, Morges, Switzerland)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutritive medium (carbonate-phosphate buffer solution) สำหรับแบคทีเรียผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร

Component	**Concentration (g/L)**
$NaHCO_3$	9.240
$Na_2HPO_4.12H_2O$	7.125
NaCl	0.470
KCl	0.450
Na_2SO_4	0.100
$CaCl_2$ (anhydrous)	0.055
$MgCl_2$ (anhydrous)	0.047
Urea	0.400
Trace elements	10 mL

ที่มา: Barry et al. (1995)

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.3.1 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 (CFU/ mL) ของแบคทีเรียที่พบ

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH)

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

3.3.3 ความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity)

วิเคราะห์สภาพกรดทั้งหมดในรูปกรดแล็กติกด้วย 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

3.3.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาปริมาณสับสเตรทที่เชื้อใช้ไประหว่างการเจริญในอาหารเหลว ด้วยวิธี colorimetric (phenol-sulphuric acid) method (Dubois et al., 1956) โดย ปิเปตตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex) (Vortex mixer, FineVotex, FinePCR, Korea) แล้วจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมวอร์เทค ให้เข้ากันดีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 30 นาที ทำแบลงค์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5 วิเคราะห์ความสามารถในการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น โดยการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมในตัวอย่าง ที่มีสภาพกรดทั้งหมดในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดทั้งหมดจากการไทเทรต ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร แยกเซลล์อีกครั้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 10 นาที ปิเปตส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้น 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

3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 15 และทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

ในลำไส้ใหญ่ของคนมีแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่สามารถใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในการเจริญได้ ดังรายงานผลการทดลองของ Crittenden et al. (2001) ซึ่งได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bifidobacterium* 40 สายพันธ์ร่วมกันกับแป้ง RS ในลักษณะเป็น synbiotic ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต พบว่ามีแบคทีเรีย *Bifidobacterium* เพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถใช้แป้ง RS ในการเจริญได้ คือ *Bifidobacterium lactis* Lafti B94 สามารถมีชีวิตรอดผ่านสภาวะความเป็นกรดที่ระบบทางเดินอาหาร และยังอยู่รอดผ่านกระบวนการผลิตโยเกิร์ตและสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ได้ ดังนั้นการศึกษาศักยภาพของประเภทของแป้งต้านทาน (RS) ในการทดลองนี้ได้ใช้แป้ง RS 3 ประเภทคือ RS2, RS3 และ RS4 ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกเรียในสกุล *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 (ตารางที่ 4) และเติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 6) 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% เป็นแหล่งคาร์บอนหลักโดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 1 Log CFU/mL มีค่า pH ลดลงในช่วงระหว่าง 5.54-5.81 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดในช่วงระหว่าง 0.063-0.113% ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการเจริญใกล้เคียงกันเท่ากับ 8.85 และ 8.95 Log CFU/mL มีค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.51 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.502% และ 0.837% ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้นี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มแลคโตบาซิลลัสทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ มีแนวโน้มความสามารถในการใช้แป้ง RS ได้ค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสซึ่งใช้เป็นการทดลองควบคุม

ตารางที่ 6 การเจริญ ค่า pH และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน นาน 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ[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 จากสูตรอาหารมาตรฐาน ได้เป็นสูตรปรับที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามตารางที่ 4

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

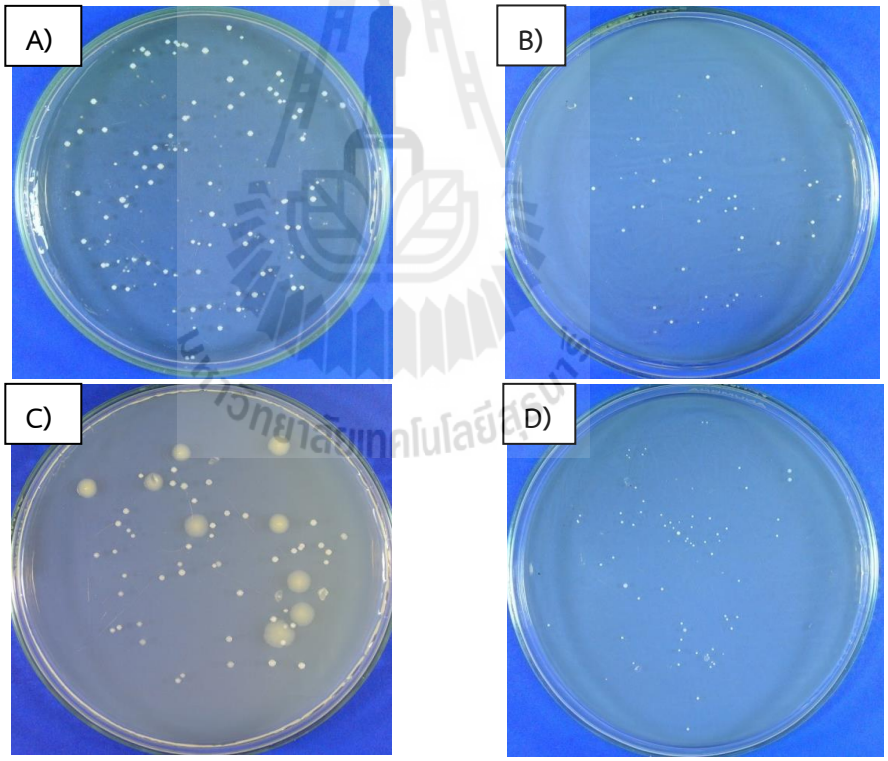
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

4.2 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อที่คัดแยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร

ได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการทดสอบศักยภาพแป้ง 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, Krieg, and Staley (2005) แสดงในตารางที่ 7 พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทั้งหมด 66 ไอโซเลท มี 45 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะเป็นรูปท่อน (Gram-positive rods) และมี 21 ไอโซเลท ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะเป็นรูปร่างกลม (Gram-positive cocci) ซึ่งมีลักษณะโคโลนีดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นคัดเลือกโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญได้ โดยทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหารสูตรที่มีการแทนที่แป้งข้าว (native rice starch) ความเข้มข้น 1% ลงไปในสูตรอาหารมาตรฐานแทนที่น้ำตาลกลูโคส พบว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการเจริญได้ 3 ไอโซเลท และนำโคโลนีของเชื้อที่ใช้แป้งได้มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบระบบ API ชนิด API 50CH/CHL และ API 20A (bioMérieux; bioMérieux, Inc.; France) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของ

แบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) พบว่า เชื้อ 2 ไอโซเลท (MRF4 และ RCF10) ที่คัดแยกจากอาหาร MRS Agar และ RCA Agar ได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเหมือน (% Identity) ของสมบัติทางชีวเคมีกับแบคทีเรียอ้างอิงในฐานข้อมูลระบบ API (bioMérieux) ไอโซเลท MRF4 และ RCF10 มีความเหมือนกับ *Lactobacillus* sp. MRF4 99.5% และ *Lactobacillus* sp. RCF10 99.7% ตามลำดับ มี 1 ไอโซเลท (SFF5) ที่คัดแยกจากอาหาร *Streptococcus faecalis* Agar เป็นเชื้อสกุล *Streptococcus* ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเหมือน (% Identity) ของสมบัติทางชีวเคมีกับแบคทีเรียอ้างอิงในฐานข้อมูลระบบ API (bioMérieux) ไอโซเลท SFF5 มีความเหมือนกับ *Streptococcus* sp. SFF5 99.9% จากนั้นจึงนำเชื้อที่ได้ไปใช้ในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานแต่ละประเภทต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้ต่อไป



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัครบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar (A), RCA Agar (B), SF Agar (C) และ ST Agar (D) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 3 ไอโซเลทเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอ้างอิงในสกุล *Lactobacillus* และ *Streptococcus*

Characteristics	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	0.5-1.0	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 (°C)	37° C	37° C	37° C	30-40° C	37° C
Growth at 10°C	-	-	-	±	-
Growth at 45°C	+	+	+	±	±
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.

ที่มา: Brenner et al. (2005)

4.2.1 การทดลองคัดเลือกหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์

ทดลองปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลาย 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยมีการปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เชื้อจะสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เพื่อให้เชื้อได้ใช้สับสเตรทของเราแทนน้ำตาลกลูโคสจากสูตรอาหารมาตรฐาน เพื่อพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 (ตารางที่ 8) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 (ตารางที่4) เติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารสูตรที่ 1-4 โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 7.94-8.96 Log CFU/mL ค่า pH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 5.28-5.77 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นถึง 9.25 Log CFU/mL

ตารางที่ 8 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ[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]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

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

โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 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 9) ในอาหารเลี้ยง ที่เติมแป้ง RS2 ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารเหลวสูตรที่ 1-4 ในช่วง 7.99-8.51 Log CFU/mL และมีค่า pH โดยเฉลี่ยในช่วง 4.38-4.85 ในขณะที่การทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอาหารมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นเท่ากับ 8.98 Log CFU/mL มีค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.17 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงถึง 0.819%

ตารางที่ 9 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ[m]	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
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]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

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

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 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ในช่วง 9.05-9.47 Log CFU/mL และมีค่า pH โดยเฉลี่ยในช่วง 4.29-4.90 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญ 10.13 Log CFU/mL

ตารางที่ 10 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ[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 4

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

ค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 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 4) แบคทีเรียมีแนวโน้ม ที่จะใช้แป้ง RS เป็นสับสเตรทในการหมักได้ดีและเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถกระตุ้นการผลิตกรดทั้งหมดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่ 1 2 4 และ 5 จึงได้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานแต่ละประเภทต่อไป

4.2.2 การหาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

เนื่องจากประเภทของแป้ง และปริมาณแป้งที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับแบคทีเรียนั้นมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้แป้งของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ หากแบคทีเรียสามารถใช้แป้งได้ดีแต่ในอาหารมีการเติมแป้งในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญก็จะส่งผลให้แบคทีเรียมีอัตราการเจริญต่ำ และสร้างกรดซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากการหมักได้น้อย แต่หากแป้งที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณเข้มข้นเกินความต้องการของแบคทีเรีย และด้วยคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งที่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ลดปริมาณน้ำอิสระ (water activity, Aw) ที่แบคทีเรียจะเจริญได้ส่งผลในการจำกัดอัตราการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นกัน จึงได้ทดลองหาปริมาณแป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 (ตารางที่ 4) ที่ปรับจากสูตรอาหารมาตรฐาน และเติมแป้งข้าวดิบที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ไปแทนที่น้ำตาลกลูโคส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37ºC ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 (ตารางที่ 11) พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 8.06-8.94 Log

CFU/mL ค่า pH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 4.57-5.30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% ในขณะที่การทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเที่มีน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียมีการเจริญถึง 9.44 Log CFU/mL ค่าpHลดลงเท่ากับ 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 12) มีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.25-9.40 Log CFU/mL ค่าpH ลดลงโดยเฉลี่ยในช่วง 4.69-5.08 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญสูงถึง 10.05 Log CFU/mL และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.910%

ตารางที่ 11 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	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]
0.5%rice starch	8.19	5.30	16.2±0.010[b]	0.237±0.014[c]
1%rice starch	8.94	4.57	19.4±0.011[a]	0.333±0.010[b]
1.5%rice starch	8.06	4.88	10.3±0.014[c]	0.200±0.021[c]
2%rice starch	8.67	5.04	6.3±0.017[c]	0.231±0.019[c]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

ตารางที่ 12 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
Lactobacillus sp. MRF4				
Glucose	10.05	4.40	15.9±0.011[b]	0.910±0.010[a]
0.5%rice starch	9.25	5.08	15.2±0.010[b]	0.258±0.010[c]
1%rice starch	9.40	4.69	18.4±0.012[a]	0.342±0.018[b]
1.5%rice starch	9.31	4.97	11.2±0.013[c,d]	0.249±0.019[c]
2%rice starch	9.26	4.96	4.9±0.011[d]	0.234±0.012[c]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

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 13) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอนหลักแบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.31-9.78 Log CFU/mL ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียมีการเจริญถึง 10.42 Log CFU/mL 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

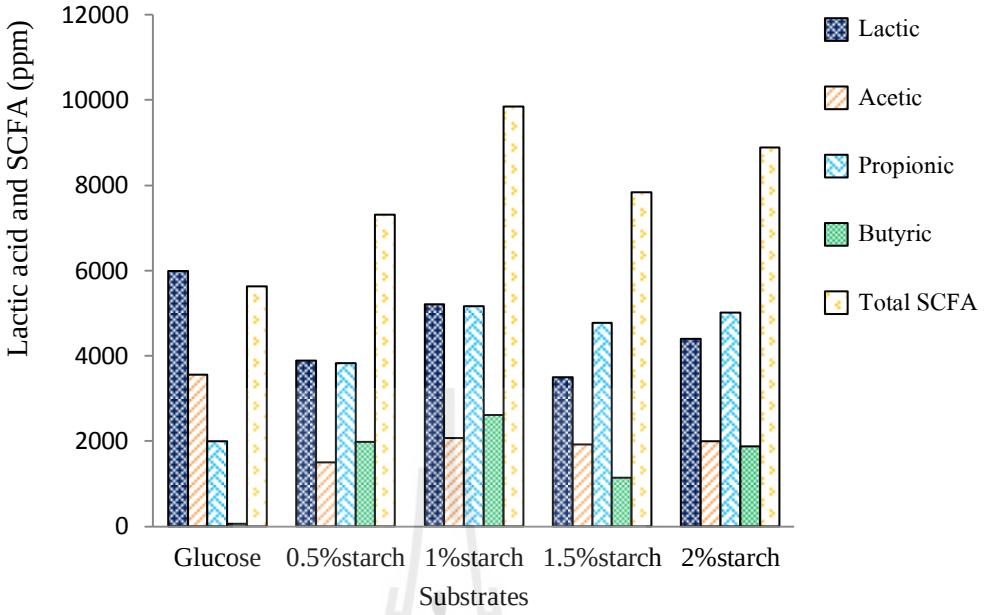
ตารางที่ 13 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
Streptococcus sp. SFF5				
Glucose	10.42	4.39	17.0±0.011[b]	0.582±0.030[a]
0.5%rice starch	9.31	5.13	16.7±0.017[b]	0.252±0.018[c]
1%rice starch	9.78	4.80	22.5±0.012[a]	0.327±0.014[b]
1.5%rice starch	9.46	4.97	7.8±0.016[c]	0.243±0.019[c,d]
2%rice starch	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 performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าระดับความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงผลในรูปที่ 3 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 พบการผลิตกรดทั้งหมดในปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยมีกรดแล็กติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 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



รูปที่ 3 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้งปริมาณ 0.5-2.0% แทนน้ำตาลกลูโคส หลังการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) มีปริมาณเท่ากับ 5,165 ppm และ 5,010 ppm เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 2% ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 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 4) 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

4.2.3 การทดสอบศักยภาพของแป้ง RS ในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์แยกจากอุจจาระของอาสาสมัคร แบบไม่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง

จากการที่ได้ทดลองปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความหลากหลายโดยมีการปรับลดปริมาณของส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมที่เชื้อจะสามารถใช้แป้ง RS แล้วผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ดี ได้เลือกสูตรปรับ 3 (ตารางที่ 4) 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 ($p<0.05$)

ตารางที่ 14 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 % เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	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]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 (ตารางที่ 14) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดถึง 1.002% จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส (ตารางที่ 15) พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 1.200% และมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 27.4% ขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียมีการเจริญได้ใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส มีค่าการเจริญเท่ากับ 10.13 Log CFU/mL ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.37 มีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.570% และมีปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป 15.2% ในขณะที่ในสูตรที่เติม RS2, RS4 และ FOS แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.27-9.88 Log CFU/mL 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 16) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดถึง 0.906%

ตารางที่ 15 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 % เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
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]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียมีการเจริญได้ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 10.31 Log CFU/mL ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.22 และพบค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.423% ในขณะที่ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS2, RS4 และ FOS แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกันในช่วง 9.69-9.77 Log CFU/mL มีค่า pH ในช่วง 4.49-6.01 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.339%, 0.198% และ 0.252% ตามลำดับ และเมื่อคำนวณปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปพบว่าแบคทีเรีย *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

ตารางที่ 16 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 % เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
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]

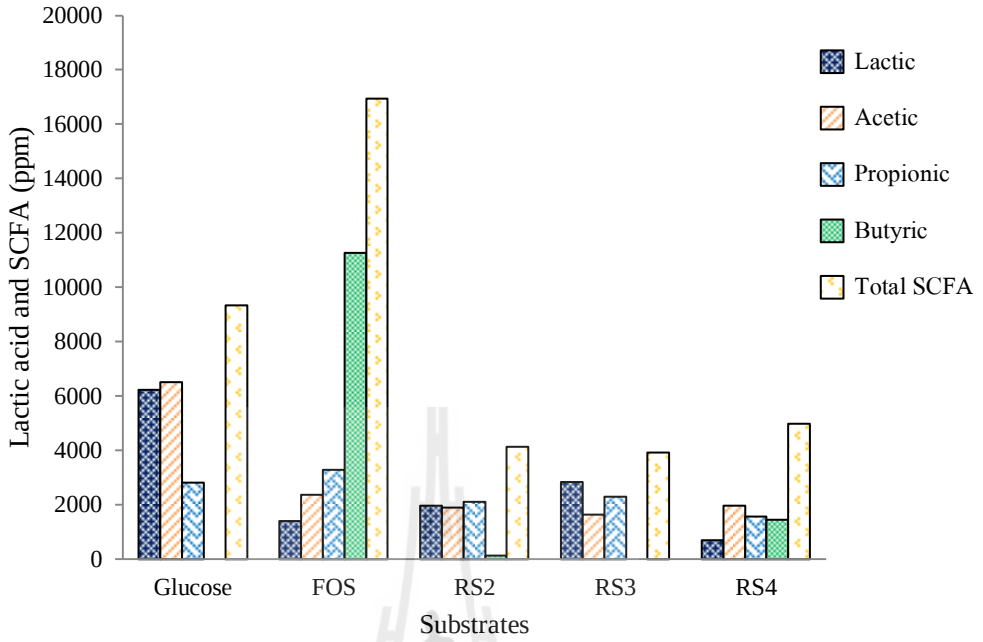
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

[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) ได้ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง 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

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่ได้ ภายหลังการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแป้ง RS2, RS3, RS4 และเปรียบเทียบกับ FOS พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการผสมน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 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 ปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้กับค่าการเจริญ ความเป็นกรดทั้งหมด และปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไป เห็นได้จากในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีการเติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียได้ดี และสามารถผลิตกรดทั้งหมดได้ดีกว่า RS2 และ RS4 จึงมีการใช้สับสเตรทมากกว่าและสามรถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่า

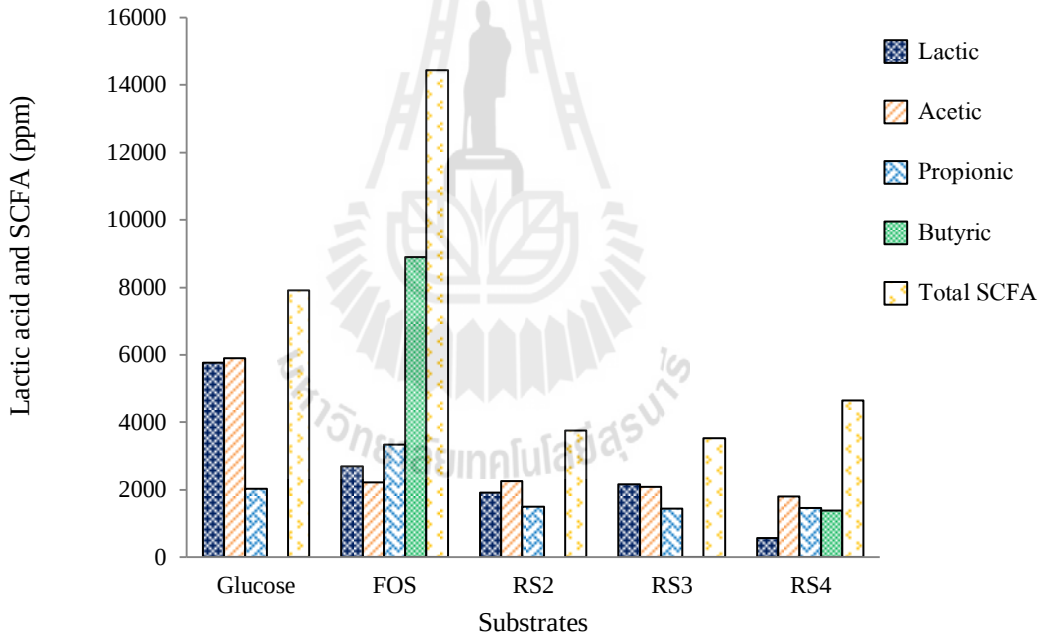
เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้น พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก เท่ากับ 11,280 3,295 และ 2,370 ppm ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS2 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากกว่ากรดอะซิติก และกรดบิวทิริกเท่ากับ 2,105, 1,900 และ 125 ppm ตามลำดับ



รูปที่ 4 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ในขณะที่ในอาหารสูตรที่มีแป้ง RS3 มีปริมาณกรดโพรพิโอนิกมากว่ากรดอะซิติก เท่ากับ 2,290 และ 1,645 ppm ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก มีค่าเท่ากับ 1,980 1,570 และ 1,445 ppm ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (รูปที่ 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 และไม่มีการผลิตกรดบิวทิริก ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก เท่ากับ 8,890, 3,330 และ 2,210 ppm ตามลำดับ และอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS2 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 2,245 และ 1,495 ppm ตามลำดับ และไม่ผลิตกรดบิวทิริก ในขณะที่ในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3 พบว่ามี

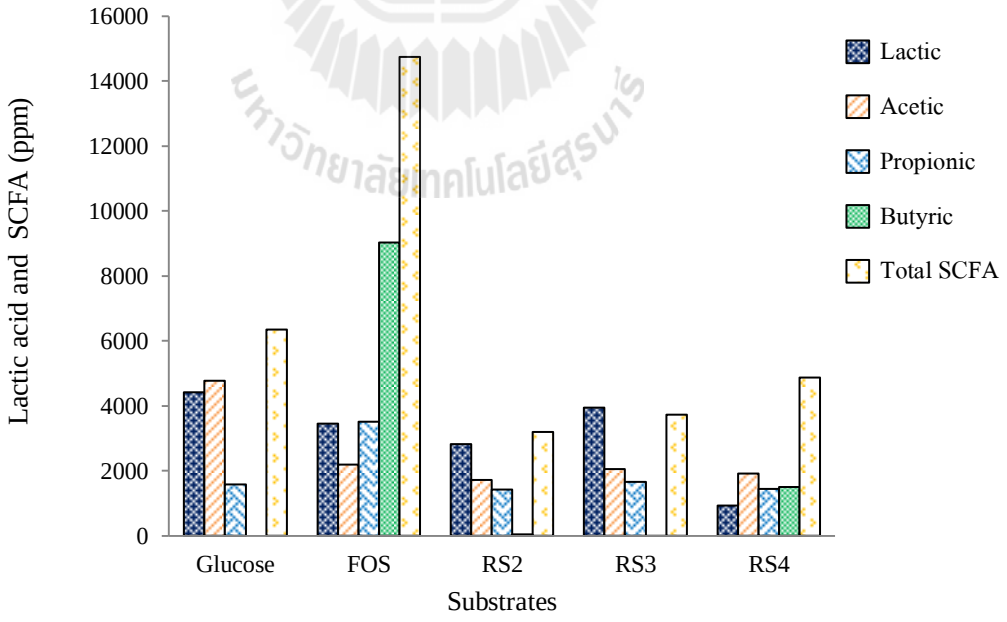
กรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เท่ากับ 2,080, 1,430 และ 5 ppm ตามลำดับ และในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เท่ากับ 1,790, 1,460 และ 1,385 ppm ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวนี้จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. MRF4 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นประเภทกรดอะซิติกได้ในอาหารสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคสมากกว่าสูตรที่เติมแป้ง RS2, FOS, RS3 และ RS4 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้ในอาหารสูตรที่เติม FOS มากกว่าในสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS3 และ RS4 ส่วนกรดบิวทิริกสามารผลิตได้ดีในอาหารสูตรที่เติม FOS มากกว่าแป้ง RS4 และ RS3 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 5 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (รูปที่ 6) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีปริมาณกรดแล็กติกสูงที่สุดเท่ากับ 4,420 ppm ในขณะที่ในอาหารสูตรที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้เท่ากับ 3,940 ppm และเป็นประเภทของแป้งที่กระตุ้นให้เชื้อ

สามารถผลิตกรดแล็กติกได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 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 มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก 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 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 6 กรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1% แทนน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกจากอุจจาระของอาสาสมัครทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีในอาหารสูตรที่เติม FOS โดยเฉพาะกรดบิวทิริกที่มีปริมาณมากกว่ากรดโพรพิโอนิก 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) เนื่องจากโดยธรรมชาติแล้วแบคทีเรียทั้ง 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 พบว่าพรีไบโอติกส์ทั้ง 2 ประเภท สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ในสกุล bifidobacteira และ lactobacilli ได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นพบว่ามีกรดอะซิติกและกรดแล็กติกเป็นผลผลิต

หลักจากการหมัก OF ซึ่งสัมพันธ์กันกับค่าpHที่ลดลง และมีปริมาณกรดไขมันสายสั้นมากกว่าเมื่อเทียบกับ inulin ส่วนในผลการทดลองในการใช้ FOS และแป้ง RS ผสมในอาหารสำหรับหนูทดลอง และวัดค่าpHภายในลำไส้ของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสม FOS มีค่าความเป็นกรดในลำไส้มากกว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารผสมแป้ง RS และเมื่อวัดค่าอัตราการเจริญระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียก่อโรค พบว่าในลำไส้ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกส์ทั้งสองประเภทนี้ มีค่าอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มากกว่าแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ทั้ง FOS และ RS ซึ่งมีค่าการเจริญแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไม่ต่างกันทางสถิติ (Rodriguez-Cabezas ME et al., 2010)

4.2.4 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 4) โดยการจำลองสภาวะการย่อยสับสเตรททุกประเภทผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (ดัดแปลงวิธีการจาก Słominska et al., 2010 และ Goderska et al., 2008) จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะของลำไส้ใหญ่แบบจำลองเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญ และการผลิตกรดทั้งหมดที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) จากตารางที่ 17 พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 สามารถใช้แป้ง RS3 ได้ดีกว่า RS2, RS4 และ FOS จากค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกันในช่วง 8.81-9.86 Log CFU/mL 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 กรัมอาหารมีผลช่วยให้ปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria เพิ่มขึ้นได้ 10-

10^2 CFU/mL และยังมีมลต่อการลดจำนวนของ enterobacteria ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้แป้ง RS3 ยังมีผลส่งเสริมการผลิตกรดบิวทิริกในหนูทดลองและช่วยลดปริมาณการผลิตแอมโมเนียและลดค่า pH ในกระพุ้งลำไส้ได้

ตารางที่ 17 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองสภาวะการย่อยผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาพไร้ออกซิเจนนาน 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	**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]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

ในทำนองเดียวกันการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (ตารางที่ 18) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียได้ดีใกล้เคียงกันเท่ากับ 9.90-9.92 Log CFU/mL 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/mL และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ เท่ากับ 0.270%, 0.264% และ 0.255% ตามลำดับ และมีค่าสับสเตรทที่ใช้ไปเท่ากับ 19.9%, 5.6% และ 12.3% ตามลำดับ

ตารางที่ 18 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองสภาวะการย่อยผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาพไร้ออกซิเจนนาน 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
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]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

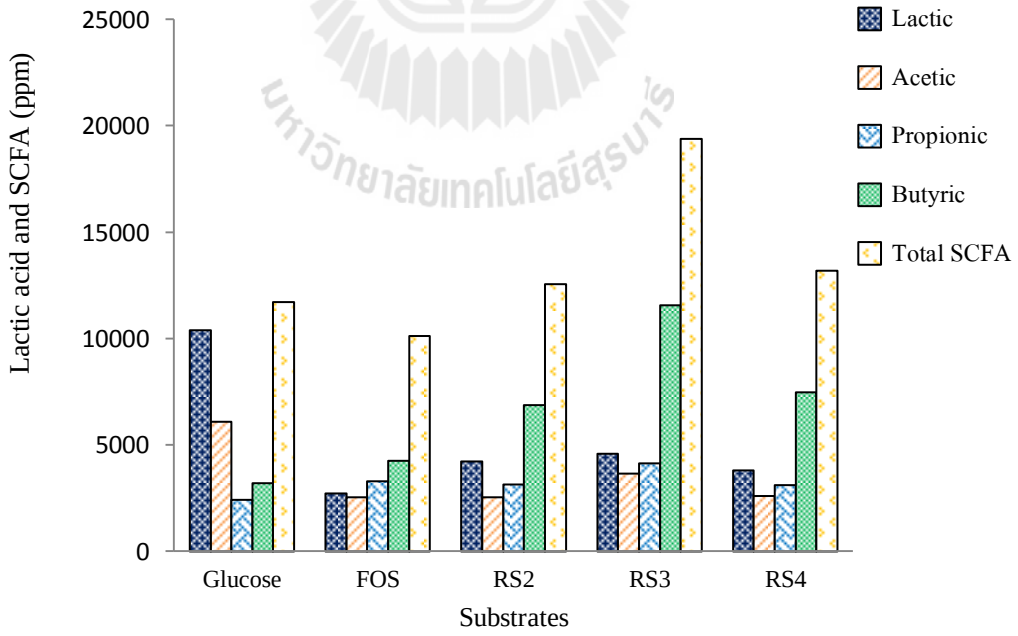
ตารางที่ 19 การเจริญ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด และค่าความเป็นกรดทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองสภาวะการย่อยผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาพไร้ออกซิเจนนาน 24 ชั่วโมง

รหัสกล้าเชื้อ/อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ (Log CFU/mL)	pH[n]	น้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมด (%)	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)
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: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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

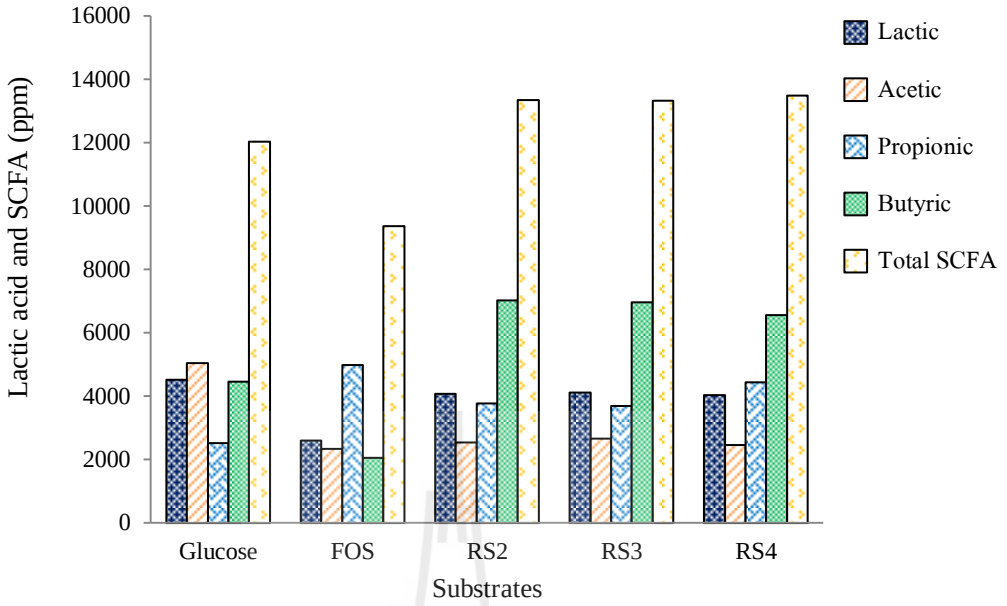
จากการทดลองแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (ตารางที่ 19) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีค่าความเป็นกรดทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 0.510% ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS3, RS3 และ FOS พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส มีค่าการเจริญในช่วง 8.64-9.26 Log CFU/mL และค่า pH ลดลงเฉลี่ยในช่วง 4.88-5.42 และมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดในช่วง 0.243%-0.333% จากการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จำลองสภาวะการย่อยสับสเตรทผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) จากรูปที่ 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



รูปที่ 7 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

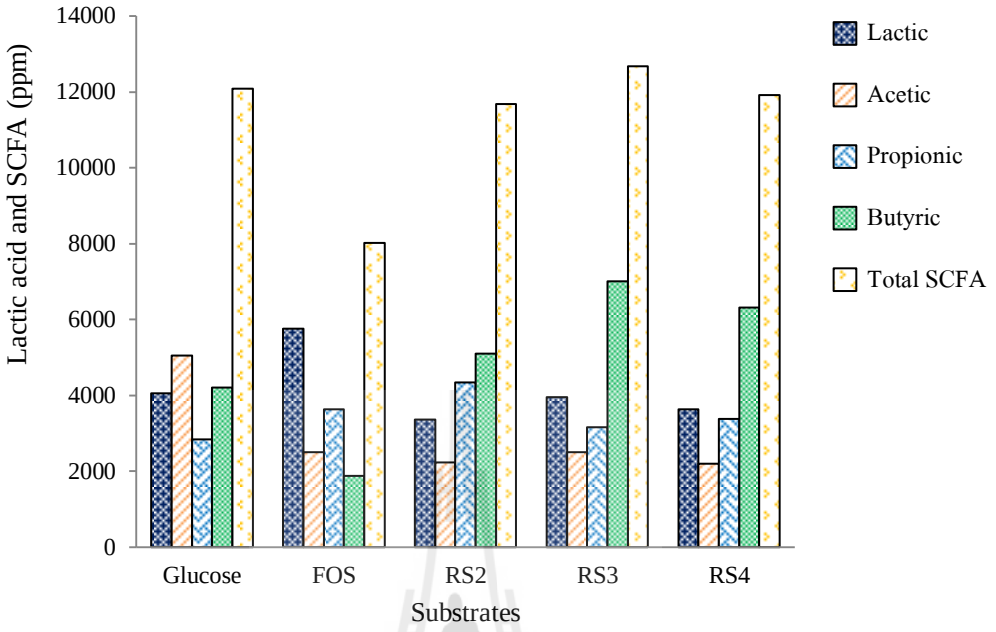
เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้นจากรูปที่ 7 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. RCF10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 6,085, 3,200 และ 2,440 ppm ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดบิวทิริกมากกว่ากรดโพรพิโอนิก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

เมื่อทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 (รูปที่ 8) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมแป้ง RS3 พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณเท่ากับ 4,125 ppm และเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมแป้ง RS2 และ RS4 ซึ่งมีค่าปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 4,075 และ 4,030 ppm ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี FOS มีปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2,595 ppm และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสายสั้น พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS2, RS3 และ RS4 มีกรดไขมันสายสั้นในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีกรดบิวทิริกปริมาณมากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติกตามลำดับ 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 และกรดบิวทิริกได้ดีไม่แตกต่างกันในระหว่างประเภทของแป้ง และยังสามารถกระตุ้นให้แบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. MRF4 มีการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นทั้งหมดได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ FOS พรีไบโอติกส์ทางการค้าที่สามารถจัดหาได้ง่ายและมีการนำมาใช้เสริมสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพอย่างแพร่หลาย



รูปที่ 8 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. MRF4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. SFF5 (รูปที่ 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 จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* sp. SFF5 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 มีปริมาณกรดบิวทิริกสูงถึง 7,010 ppm ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับแป้ง RS4, RS2 และFOS ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกันระหว่างปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตได้กับค่าการเจริญ ค่าความเป็นกรดทั้งหมด และปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 สามารถกระตุ้นการผลิตกรดทั้งหมดของแบคทีเรียได้ดีกว่าแป้ง RS2, RS4 และ FOS จึงมีการใช้สับสเตรทมากกว่าและยังสามรถผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นได้ดีกว่า คล้ายกันกับผลการทดลองของ Dongowski et al. (2005) และ Jacobasch et al. (2006) ศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS3 ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 มีการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์กลุ่ม bifidobacteria ได้ดี และส่งผลให้สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นเพิ่มมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร และมีผลต่อการลดลงของค่า pH ในลำไส้ใหญ่และอุจจาระของหนูทดลอง



รูปที่ 9 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเลี้ยง *Streptococcus* sp. SFF5 ที่อุณหภูมิ 37°C 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) ได้ทดลองศึกษาผลความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS ที่ได้จากผลิตภัณฑ์แป้งข้าวโพด ทำการทดลองแบบ *in vitro* ติดตามกิจกรรมและการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ โดยได้จำลองการย่อยแป้ง RS ผ่านระบบลำไส้ (pre- digested) แล้วดึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (di-saccharides) ออกแล้วจึงนำพอลิเมอร์ที่เหลือไปหมักกับจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ใหญ่แบบจำลอง พบว่าแป้ง RS มีผลช่วยช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสกุล bifidobacteria และ lactobacilli ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันสายสั้นได้ดี และพบว่ามีการผลิตกรดแล็กติกในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันสายสั้น ซึ่งการหมักของคาร์โบไฮเดรตหลัก ๆ จะเกิดขึ้นที่ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น และผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการหมัก

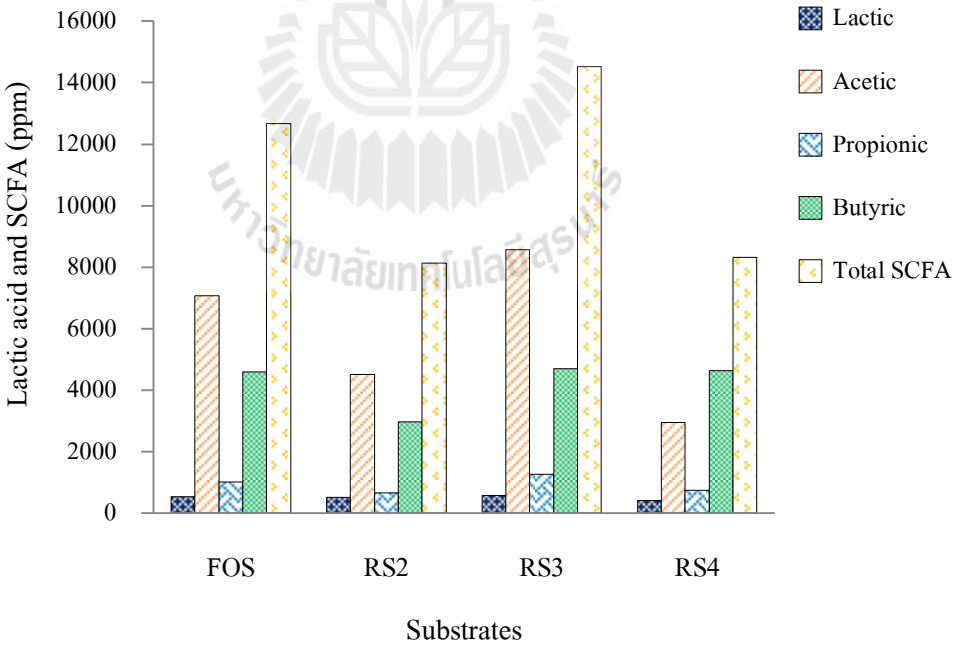
ประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้นได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก (Macfarlane and Cumming, 1992; Roberfroid, 2005a)

4.3 การทดสอบศักยภาพของแป้งต้านทานต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร

จากผลการเลี้ยงเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี โดยได้ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutritive medium ในสารละลาย carbonate- phosphate buffer solution ซึ่งมีส่วนประกอบของธาตุอาหารตามสูตรใน Barry et al. (1995) (ตารางที่ 5) และได้เติมแป้ง RS2, RS3, RS4 และ FOS ปริมาณความเข้มข้น 1% เป็นสับสเตรท เลี้ยงเชื้อผสมนั้นให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า (shaking incubator) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้น (รูปที่ 10) พบว่าประเภทของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกัน โดยกรดแล็กติกที่วิเคราะห์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติม RS2, RS3, RS4 และ FOS มีปริมาณค่อนข้างน้อยมาก และมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ที่ช่วงระหว่าง 415-580 ppm ส่วนปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณแตกต่างกันตามประเภทของสับสเตรท พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 4,500, 2,970 และ 660 ppm ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS2 และเช่นเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 ก็พบว่าปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 8,560, 4,700 และ 1,260 ppm ตามลำดับ

ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS4 มีปริมาณกรดบิวทิริกมากว่ากรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 4,630, 2,940 และ 740 ppm ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก มีค่าเท่ากับ 7,060, 4,600 และ 1,010 ppm ตามลำดับ โดยปริมาณกรดไขในสายสั้นพบมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เติมแป้ง RS3 ทั้งประเภทกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เมื่อเปรียบเทียบกับ FOS, RS2 และ RS4 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ผสมจากอุจจาระของอาสาสมัคร มีแนวโน้มการผลิตกรดแล็กติกได้ค่อนข้างน้อย แต่สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีโดยเฉพาะกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกในทุกประเภทของสับสเตรท ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ในอุจจาระของอาสาสมัครมีเชื้อผสมหลากหลายสายพันธุ์ ทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostriduium* ที่ใช้สามารถแป้งได้และผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ดีโดยเฉพาะกรดบิวทิริกแล้วสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญให้กับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในกลุ่ม *Lactobacillus* และโดยเฉพาะ *Bifidobacterium* ที่มีรูปแบบกลไกการใช้สับสเตรทที่ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดอะซิติกและกรดแล็กติกในอัตราส่วน

3 ต่อ 2 จึงส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันสายสั้นประเภทกรดอะซิติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงกว่ากรดแล็กติก สอดคล้องกับรายงานผลการทดลองของ Renata et al. (2010) ในการใช้ citric acid-modified resistant dextrin เป็นสับสเตรทในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียบริสุทธิ์กลุ่มโพรไบโอติกส์ และจุลินทรีย์จากอุจจาระของอาสาสมัคร 3 ราย พบว่าแบคทีเรียผสมจากอุจจาระจะมีการผลิตกรดไขมันสายสั้นในปริมาณที่มากกว่า เมื่อเทียบกับผลการทดลองของแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยเฉพาะกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *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%



รูปที่ 10 กรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสับสเตรท 1 % หลังการเจริญของเชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครในเครื่องเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

การเพิ่มปริมาณกรดไขมันสายสั้นจะถูกเหนี่ยวนำโดยการใช้แป้ง RS ของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ซึ่งกรดไขมันสายสั้นจะมีผลช่วยลดความเป็นกรดด่างในลำไส้ ส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มที่ก่อโรคปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสัมพันธ์กันกับปริมาณการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ (Coming et al., 1996; Hetjnen et al., 1990; Jenkins et al., 1998; Muir et al., 2004; Birkett et al., 1996; Phillips et al., 1995) และเช่นเดียวกันกับที่มีรายงานการศึกษาซึ่งพบว่าการให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแป้ง RS กับสัตว์ทดลองมีผลให้ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้นในกระพุ้งลำไส้ใหญ่ และในอุจจาระเพิ่มมากขึ้น (Wang et al., 1999; Ferguson et al., 2000; Henningson et al., 2003) Bouhnik et al. (2004) ได้ทดลองในคนพบว่าการบริโภคแป้ง RS3 ปริมาณ 10 กรัมต่อวัน จะช่วยส่งเสริมการสร้างผลิตผลจากแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้กลุ่ม bifidobacteria ได้ดี พบว่าผลการทดลองในคนส่วนใหญ่การบริโภคอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแป้ง RS ในปริมาณสูง สามารถช่วยเพิ่มการขับถ่ายอุจจาระ และเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นในอุจจาระได้ดี (Phillips et al.,1995; Silvester et al.,1995; Cumming et al.,1996; Birkerr et al.,2000; Muir et al., 2004)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

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 โดยพบกรดบิวทิริกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 11,575 ppm ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก นอกจากนี้เมื่อทดลองโดยใช้เชื้อผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 แบคทีเรียสามารถสร้างกรดไขมันสายสั้นได้ดีกว่า FOS, RS2 และ RS4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบกรดอะซิติกปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 8,560 ppm ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่ากรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิก ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าศักยภาพความเป็นพรีไบโอติกส์ของแป้ง RS แต่ละประเภทนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยแป้ง RS3 เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับ

แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และจุลินทรีย์ผสมจากอุจจาระของอาสาสมัครในการสร้างกรดแล็กติก และกรดไขมันสายสั้นที่ส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์

การมีน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบศักยภาพของแป้ง RS นั้น อาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบหลักของสายพอลิแซ็กคาไรด์ภายในโครงสร้างของแป้ง RS และน้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรทประเภทที่แบคทีเรียสามารถใช้ได้ง่ายที่สุด เพื่อให้ได้ผลการผลิตกรดไขมันสายสั้นจากแป้ง RS ควรมีการดึงเอาส่วนของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ภายหลังจากการย่อยแป้งผ่านสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารออกก่อน แล้วจึงนำส่วนของสายพอลิแซ็กคาไลด์ที่เหลือมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการทดสอบศักยภาพของแป้ง RS ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

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.

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. **American Journal of Clinical Nutrition.** 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.** (2^{nd} 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, R. J., Topping, D. L. (1997). Fecal numbers of bifidobacteria are higher in pigs fed Bifidobacterium longum with a high amylose cornstarchthan with a low amylose cornstarch. **Journal of Nutrition**. 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 malto-dextrins, 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, F. R. (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. **American Journal of Clinical Nutrition**. 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., and Brovns, F. (2003). Advances in dietary fiber characterization 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., and 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: 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.

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**. Blackie Academic and 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 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. **Journal of 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. **Journal of 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. **Environmental**

Microbiology. 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, L.S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., et al. (2007). Molecularphylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.** 104: 13780-13785.

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.

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 excretions and hepatic mRNA levels in rats. **Journal of Lipids**. 38(9): 919-924.

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., and 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., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (9^{th} ed.). Baltimore: Williams and 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., and 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. **Journal of 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.

American Journal of Clinical Nutrition. 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.

Kulkarni, S. D., Acharya, R., Rajurkar, N. S., and Reddy, A. V. R. (2007). Evaluation of bioaccessibility of some essential elements for wheatgrass (Triticum aestivum L.) by *in vitro* digestion method. **Journal of 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 and 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., and 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**. 24(1): 1-10.

Ljungh, A. and Wadstrom, T. Lactic Acid Bacteria as Probiotics. **International Journal of Microbiology**.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. **Journal of Applied Bacteriology**. 72:57-64.

Margaret, E., Smith, and Dion, G., Morton. (2010). **The digestive system** : Basic science and clinical conditions (2rd 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.

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 fructooligosaccharides 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 Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. **American Journal of Clinical Nutrition.** 62: 121-130

Qiang, X., YongLie, C., and QianBing, W. (2009). Health benefit application of functional oligo-saccharides. **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. **Journal of 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 of Nutrition.** 137:830-837.

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**. Journal of Clinical Nutrition**. 30: 1-8.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., and Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **Journal of 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. **Journal of 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. A. (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.

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 and 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.

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. **Journal of 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.

ภาคผนวก

สูตรอาหารสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียจากอุจจาระของอาสาสมัคร

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa Sharpe (MRS) Agar สำหรับแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. (pH 6.5 $\pm$ 0.2 ที่ 25°C)

Component	Concentration (g/L)
Glucose	20.0
Proteose peptone	10.0
Beef extract	10.0
Yeast extract	5.0
Polysorbate 80	1.0
Ammonium citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.1
$MnSO_4.5H_2O$	0.05
Dipotassium phosphate	2.0
Agar	15.0

ที่มา: Atlas and Parks (2004)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus faecalis* (SF) Agar สำหรับแบคทีเรีย *Enterococcu faecalis* (pH 6.5 $\pm$ 0.2 ที่ 25°C)

Component	Concentration (g/L)
Glucose	4.0
Pancreatic digest of casein	2.5
Yeast extract	2.5
K_2HPO_4	3.8
Agar	15.0

ที่มา: Atlas and Parks (2004)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 115°C เป็นเวลา 10 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 3 ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced Clostridial (RCA) Agar สำหรับแบคทีเรีย *Bifidobacterium* sp. (pH 6.5 ± 0.2 ที่ 25°C)

Component	Concentration (g/L)
Glucose	5.0
Pancreatic digest of casein	10.0
Beef extract	10.0
Yeast extract	3.0
Soluble starch	1.0
NaCl	5.0
Sodium acetate	3.0
L-cysteine.HCl.H_2O	0.5
Agar	13.5

ที่มา: Atlas and Parks (2004)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 115°C เป็นเวลา 10 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 4 ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus thermophilus* (ST) Agar สำหรับแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* (pH 6.5 ± 0.2 ที่ 25°C)

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Pancreatic digest of casein	10.0
Yeast extract	5.0
K_2HPO_4	2.0
Agar	15.0

ที่มา: Atlas and Parks (2004)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

การคำนวณค่าความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแล็กติกด้วย titration method ตาม AOAC International, (2000)

คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแล็กติก โดย 1 มิลลิลิตร ของปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มาล ที่ใช้เทียบเท่า ปริมาณกรดแล็กติก 0.0090 กรัม จากสูตร

$$\text{Total acidity (\%)} = \frac{(A-B)N\times 0.0090\times 100}{W\times 0.1}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรด่างที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

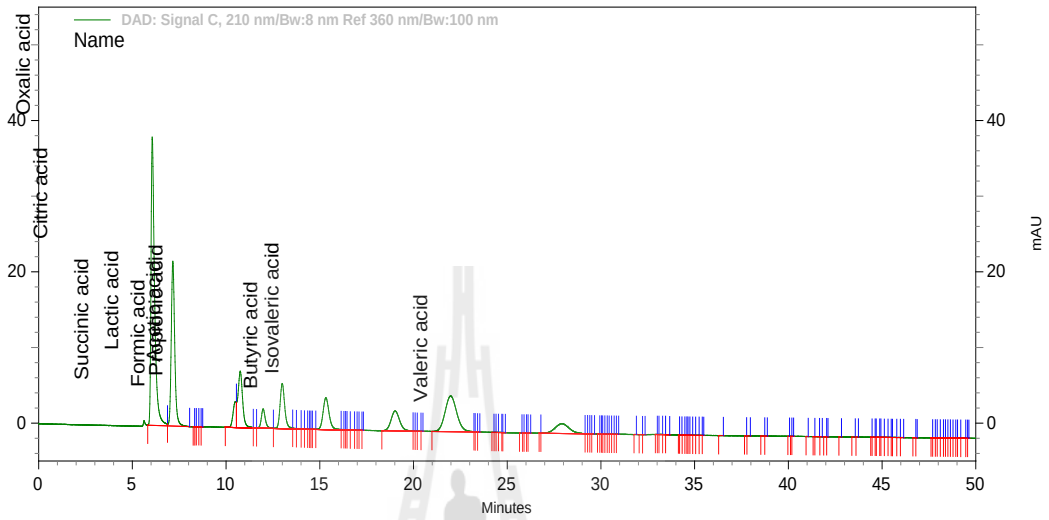
B คือ ปริมาตรด่างที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของด่าง (นอร์มาล)

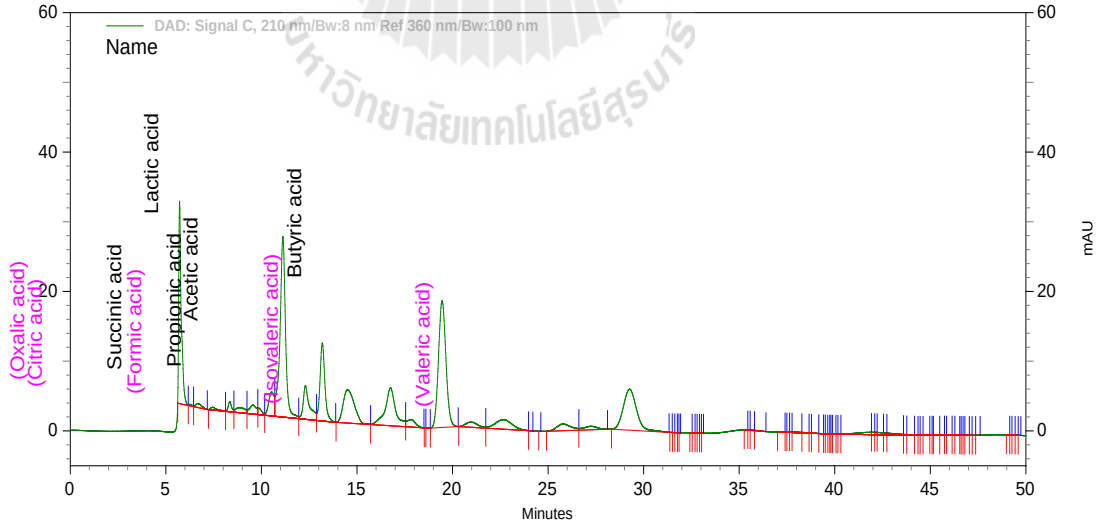
W คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

HPLC CHROMATOGRAMS



รูปภาคผนวกที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงสารละลายมาตรฐานของกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้น (0.1 mg/ml of each acids) ใช้ ion exclusion column, Vertisep OA ใช้ H_2SO_4 0.005 โมลาร์เป็น mobile phase และใช้ UV detector ที่ 210 นาโนเมตร



รูปภาคผนวกที่ 2 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณกรดแล็กติกและกรดไขมันสายสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้ง RS3 ที่จำลองการย่อยผ่านระบบทางเดินอาหาร เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus* sp. RCF10 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจนนาน 20 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชาลินี ทนันชัย เกิดเมื่อวันที่ 19 ตุลาคม พ.ศ. 2529 ที่อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม ศึกษาในระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนบ้านดอนแดงน้ำเกลี้ยงเวียงชัย จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนนาข่าวิทยาคม ในปี พ.ศ. 2548 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2552 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี