รหัสโครงการ SUT3-305-56-24-20

รายงานการวิจัย

การแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลัง
(Isolation of probiotics from cassava by-product)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการSUT3-305-56-24-20

รายงานการวิจัย

การแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลัง
(Isolation of probiotics from cassava by-product)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผศ.ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์
2. ผศ. ดร. อนันท์ อุ่นศิวิไลย์
3. ดร. จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารีย์
4. ผศ. ดร. ศิวัฒ ไทยอุดม
5. ดร. ธนาวิทย์ กุลรัตนรักษ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.(เกียรติคุณ) ดร. นันทกร บุญเกิด และ Prof. Dr. Lisbeth Truelstrup Hansen (Food and Environmental Microbiology, Department of Process Engineering and Applied Science, Faculty of Engineering, Dalhousie University) ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีความทนต่อกรด เกลือน้ำดี และมีคุณสมบัติในการลดปริมาณคอเลสเตอรอล จากกากมันสำปะหลังซึ่งเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารจำลอง โดยคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลจากตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่สุ่มเก็บในช่วงวันแรกจนถึงวันที่ 28 จากโรงงานอุตสาหกรมแป้งมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย นำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้งสิ้น 390 ไอโซเลท มาทำการทดสอบความสามารถในการเจริญในภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.50 ทดสอบความสามารถเจริญในภาวะความเป็นกรด-ด่าง 2-9 และทดสอบความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดีบนอาหารแข็งที่เติมเกลือน้ำดี (oxgall) ร้อยละ 0.3 พบว่าประมาณ 38 ไอโซเลทแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี จากผลการทดสอบการลดปริมาณคอเลสเตอรอลของแบคทีเรียที่คัดเลือก 3 ไอโซเลท (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) พบว่าสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในอาหารเหลวได้ 18-24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น และจากการทดสอบผลการใช้พรีไบโอติก พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถใช้ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS), แลคตูโลส และ อินนูลิน ได้และมีความสามารถในการเกาะติดกับผนังลำไส้ได้ดี จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) พบ *Lactobacillus plantarum, L. acidophilus* และ *L. fermentum* ตามลำดับ จากผลการศึกษาการเพิ่มความสามารถในการการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จำลอง พบว่าสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง แป้งข้าว และ รำข้าว สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในทางเดินอาหารจำลอง ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ประมาณ 7 log (CFU/มิลลิลิตร) ที่ภาวะความเป็นกรด-ด่าง 2 นาน 1 ชั่วโมง การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการลดระดับคอเลสเตอรอล

Abstract

The objectives of this study were to isolate and identify potential probiotic bacterial strains from cassava pulp based on their acid and bile salt tolerances and cholesterol lowering activities. In addition, the survival of potential probiotic lactic acid bacterial strains in simulated gastrointestinal conditions were studied. Cholesterol lowering probiotic bacteria were isolated from cassava pulp samples which were ramdomly collected from tapioca starch industries in Nakhon Ratchasima, Thailand from the first day to the 28thday. Three hundred and ninety isolates were tested for their tolerance on bile salt at concentrations of 0.15% and 0.50%, also from at pH 2 to 9 including bile salt hydrolase (BSH) activities were tested on plates containing 0.3% oxgall. Approximately 38 isolates showed BSH activity. Three selected strains (3C2-10, 21C2-10 and 21C2-12) could decrease cholesterol concentration in culture broth 18-24 µg/mL by only active cells. All selected strains (3C2-10, 21C2-10 and 21C2-12) showed the ability to metabolize prebiotics as Fructooligosaccharide (FOS), lactulose and inulin, and also showed the ability to strengthen cell adhesion. From 16S rDNA nucleotide sequence analysis, three strains (3C2-10, 21C2-10 and 21C2-12) were identified as *Lactobacillus plantarum, L. acidophilus and L. fermentum*, respectively. From the study related to the ability to survive in the simulated gastro-intestinal tract of selected strains, the results showed that the viability of three *Lactobacillus* strains (3C2-10, 21C2-10 and 21C2-12) were improved by approximately 7 log (CFU/mL) in the presence of cassava pulp, rice starch and rice bran at pH 2 with 1h incubation time. These studies demonstrated the potential of three selected isolates to be the probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญภาพ ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1
สมมติฐานของการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 2
วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล 2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 17
การแยกและคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง 17
การคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีผลต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในระดับ *in vitro* 18
การระบุชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก 18
ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกได้ 21
การศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในระบบทางเดินอาหารจำลอง 23
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 24
ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง 24
การคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีผลต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในระดับ *in vitro* 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การระบุชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก 28

ผลของปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกได้. 31

การเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในระบบทางเดินอาหารจำลอง 36

บทที่ 5 บทสรุป 40

บรรณานุกรม 41

ภาคผนวก 47

ภาคผนวก ก. 47

ภาคผนวก ข. 49

ประวัติคณะผู้วิจัย 51

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 Universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction 19

ตารางที่ 4.1 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่พบในกากมันสำปะหลังหมักที่ระยะเวลาต่างๆ 24

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดเลือก 25

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงคอเลสเตอรอล (cholesterol content) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวที่ระยะเวลาการเจริญ2ชั่วโมง 26

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก 28

ตารางที่ 4.5 แสดงการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทีคัดเลือกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL และการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนของ 16S rRNA gene 29

ตารางที่ 4.6 แสดงกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion 29

ตารางที่ 4.7 แสดง Cell sucface hydrophobicity (%) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยวิธี MATH และ Caco 2 cell lines 31

ตารางที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังและสารสกัดธัญพืช 34

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากมันสำหลังในประเทศไทย ปี 2015 6
รูปที่ 2.2 แผนภาพกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย 7
รูปที่ 2.3 คุณลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก 9
รูปที่ 2.4 เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกคุณสมบัติโพรไบโอติกเพื่อนำไปใช้ทางการค้า
และอุตสาหกรรมการผลิต 12
รูปที่ 2.5 บทบาทของโพรไบโอติกต่อโรคต่างๆ และสุขภาพ 16
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase 25
รูปที่ 4.2 แสดงระดับร้อยละของปริมาณคอเลสเตอรอลที่เหลือ 27
รูปที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12)
ที่ระยะต่างๆ 32
รูปที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12)
ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 °C 33
รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* strains ในสารสกัดกากมันสำปะหลัง
และสารสกัดธัญพืช 35
รูปที่ 4.6 แสดงค่า Prebiotic score ของ *Lactobacillus* strains (3C2-10, 21C2-10,
21C2-12, OC4-4 และ *L. plantarum* LAB 1465) 36
รูปที่ 4.7 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียแลคติกในสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง
และ ธัญพืชต่อการทนในสภาวะกระเพาะจำลอง (pH 2) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา
นาน 120 นาที 38
รูปที่ 4.8 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียแลคติกในสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง
และ ธัญพืชต่อการทนในสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลอง เมื่อบ่มต่อเนื่องเป็นระยะ
เวลานาน 240 นาที 39

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีการปลูกมันสำปะหลังคิดเป็นร้อยละ 54 ของพื้นที่ปลูกทั่วประเทศ (สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2550) โดยส่วนของมันสำปะหลังที่นำมาใช้ประโยชน์คือ ส่วนราก (Fibrous root system) สามารถนำมาสกัดแป้งเพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้วัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมัน ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์อื่นได้ เช่น การผลิตเอทานอลซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกในปัจจุบัน กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการผลิตแป้ง ซึ่งพบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 50-60 โดยน้ำหนักแห้ง (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์ และคณะ, 2549) ซึ่งเพียงพอต่อการนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการศึกษาจุลินทรีย์โพรไบโอติกหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้นั้นต้องเป็นชนิดที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกหรือจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Dunne et al., 2001; Vasilijevic and Shah, 2008) Saarela M, et al. (2000) ได้ระบุคุณลักษณะเบื้องต้นในการคัดเลือกโพรไบโอติก ต้องไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค มี phenotype และ genotype ที่มีความเสถียรไม่ผันแปรได้ง่าย สามารถอาศัยและเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ และมีความปลอดภัยเมื่อใช้ในอาหารและในทางคลินิก

การคัดเลือกโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งานและความเหมาะสมกับชนิดของผู้บริโภคโพรไบโอติกนั้นๆ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก มีหลากหลายสกุลที่แตกต่างกัน สายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นกลุ่มของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ *Lactobacillus enterococcus* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกโพรไบโอติกที่ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค มี phenotype และ genotype ที่มีความเสถียรไม่ผันแปรได้ง่าย สามารถอาศัยและเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ และมีความปลอดภัยเมื่อใช้ในอาหารและในทางคลินิก

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 เพื่อให้ได้เชื้อโพรไบโอติกจากการคัดแยกกากมันที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง

2.2 เพื่อให้ได้เชื้อโพรไบโอติกที่มีผลต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอล

2.3 เพื่อระบุชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์ และคุณสมบัติเฉพาะของจุลินทรีย์

2.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกได้

2.5 การศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในระบบทางเดินอาหารจำลอง

3. สมมติฐานของการวิจัย

กากมันสำปะหลังเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งที่มีปริมาณมากจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง จากองค์ประกอบทางเคมีที่พบในกากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นสารอาหารที่สามารถส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายกลุ่มได้ นอกจากนี้จากสภาพความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูงจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยในการคัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกกลุ่มที่ต้องการได้

4. ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง ทำการระบุชนิดหรือสายพันธุ์จุลินทรีย์ และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและลดปริมาณคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

5. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

5.1 วัตถุประสงค์ข้อที่ 1.

การแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง (Holzapfel and Schilinger, 2002; Nguyen, Kang and Lee, 2007) โดยคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 การแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Lactobacillus selection agar + 0.15% oxgall

5.1.2 คัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่สามารถทนกรด (acid tolerance) นำเชื้อโพรไบโอติกจากข้อ 5.1.1 มาเลี้ยงบนอาหารMRS broth pH 3

5.1.3 คัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่สามารถผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) นำเชื้อโพรไบโอติกจากข้อ 5.1.1 มาเลี้ยงบนอาหาร MRS agar+ 0.5%TDCA+0.37 g/L $CaCl_2$

5.2 วัตถุประสงค์ข้อที่ 2.

การคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีผลต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในระดับ *in vitro* (Sirilun, S et al., 2010; Nguyen, Kang and Lee, 2007)

นำเชื้อโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 มาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate assay) ตามวิธีของ Du Toit et al. 1998 และ Lim et al. 2004

5.3 วัตถุประสงค์ข้อที่ 3.

การระบุชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์ ที่มีผลตามข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 ตามวิธีของ Massi et al., 2004 และ Sharma and Trivedi, 2015

5.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเซลล์

5.3.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

5.3.3 การวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR

5.4 วัตถุประสงค์ข้อที่ 4.

ศึกษาปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง ตามวิธีของ Holzapfel and Schilinger, 2002; Sirilun, S et al., 2010; Nguyen, Kang and Lee, 2007 และ Holt et al. 1994.

5.4.1 ปัจจัยด้านสารอาหาร

- ศึกษาชนิดที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน
- ศึกษาผลของ oligosaccharide (Prebiotic index)

5.4.2 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

- ผลของอุณหภูมิ
- ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH)

5.5 วัตถุประสงค์ข้อที่ 5.

ศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่คัดเลือกในระบบทางเดินอาหารจำลอง ตามวิธีของ Liong and Shah, 2005; Begley, et al. 2006, Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A.2010; Sirilun, et al, 2010.

5.5.1 ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะจำลองของไอโซเลทที่คัดเลือก

5.5.2 ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะและลำไส้จำลองของไอโซเลทที่คัดเลือก

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

6.1 การเผยแพรในการประชุมวิชาการระดับชาติ นานาชาติ 2 ครั้ง

6.1.1 Nawong, S., Oonsivilai, R., and Boonkerd, N. (2013). Isolation and Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cassava Pulp for Cholesterol Lowering Property. 13th ASEAN Food Conference, September 9-11, 2013, Singapore. Proceedng-online

6.1.2. Nawong, S., Oonsivilai, R., Boonkerd, N. and Hansen, L.T. (2015). Protective effects of cereal extracts on the survival of potentially probiotic lactic acid bacteria under gastrointestinal tract conditions. Food Science and Technology Network between Vietnam and Belgium (VBFoodNet), November 24-29, 2015, Vietnam. Proceedng-online

7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

7.1 นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

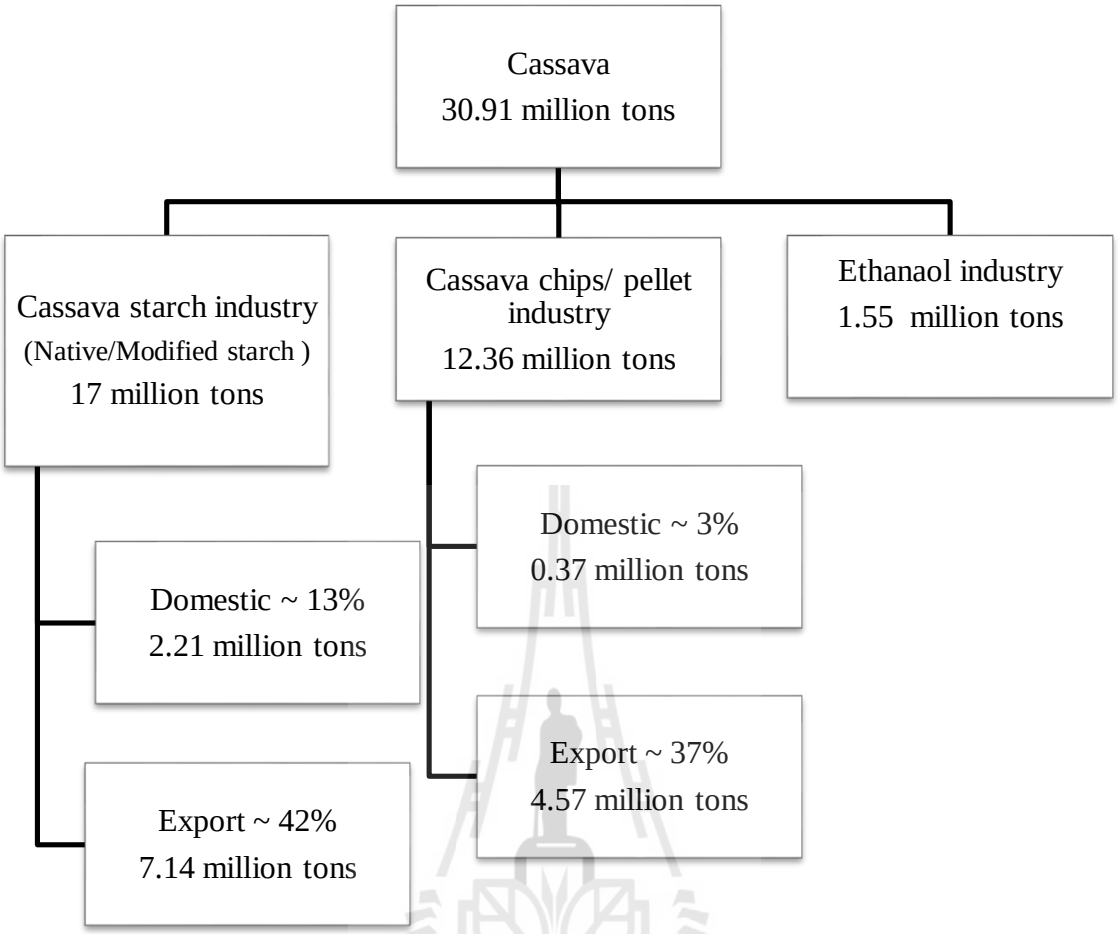
7.2 จัดฝึกอบรมแก่กลุ่มประชากรเป้าหมายหรือหน่วยงานในท้องถิ่นที่ผลิตและเผยแพร่หรือถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่กลุ่มอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง หรืออุตสาหกรรมที่มีของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตคือกากมัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มันสำปะหลัง (Cassava, Tapioca , Manioc) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Maniho esculenta Crantz* มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาใต้ จากข้อมูลปี 2549 พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั่วโลกประมาณ 113.8 ล้านไร่ ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 1.92 ตันต่อไร่ โดยประเทศไนจีเรียเป็นประเทศที่ผลิตมันสำปะหลังมากอันดับ 1 ของโลก ตามด้วย บราซิลและประเทศไทย (Kaplinsky et al., 2011) มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีการปลูกมันสำปะหลังคิดเป็นร้อยละ 54 ของพื้นที่ปลูกทั่วประเทศ ยกเว้นภาคใต้ ภาคที่มีการปลูกมาก รองลงมา คือ ภาคกลาง (ประมาณร้อยละ 33) และภาคเหนือ (ประมาณร้อยละ 15) พื้นที่รวม 48 จังหวัด คิดเป็นพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ (FAO, 2015) มันสำปะหลังมีทั้งหมดประมาณ 150 พันธุ์ แต่ละพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันไปทั้งลักษณะภายนอกและปริมาณของกรดไฮโดรไซยานิก ซึ่งเป็นส่วนประกอบทางสรีรวิทยา จากปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกที่ไม่เท่ากัน จึงแบ่งมันสำปะหลังออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดขม (Bitter Type) และ ชนิดหวาน (Sweet Type) โดยชนิดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันสำปะหลังคือชนิดขม สำหรับประเทศไทยมีสายพันธุ์ของมันสำปะหลังที่ใช้ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วยกันอยู่ 9 พันธุ์ คือ ระยอง1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 60 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 ศรีราชา1 และ พันธุ์ห้านาที (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546) โดยเฉลี่ยแล้วส่วนประกอบในหัวมันสำปะหลังประกอบด้วยน้ำ (60-70%), แป้ง (20-30%), โปรตีน (1%), เยื่อใย (2%), ไขมันและน้ำมัน (1%), เถ้า (0.9-2.4%) และ กรดไฮโดรไซยานิก (0.02%) (Román, 2016).

อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย โดยประเทศไทยสามารถผลิตแป้งมันสำปะหลังมากเป็นอันดับ 3 ของโลก โดยมีผลผลิตต่อปีประมาณ 30.91 ล้านตันต่อปี (รูปที่ 2.1) (OAE, 2015) การผลิตแป้งมันสำปะหลังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ แป้งมันสำปะหลังดิบ (Native Starch) และแป้งมันสำปะหลังดัดแปร (Modified Starch) ในปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานที่ผลิตแป้งมันสำปะหลังทั้งหมด 69 โรงงาน แบ่งเป็นโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังดิบ 47 โรงงาน โรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังดัดแปร 13 โรงงาน และโรงงานผลิตทั้ง 2 ประเภท 9 โรงงาน

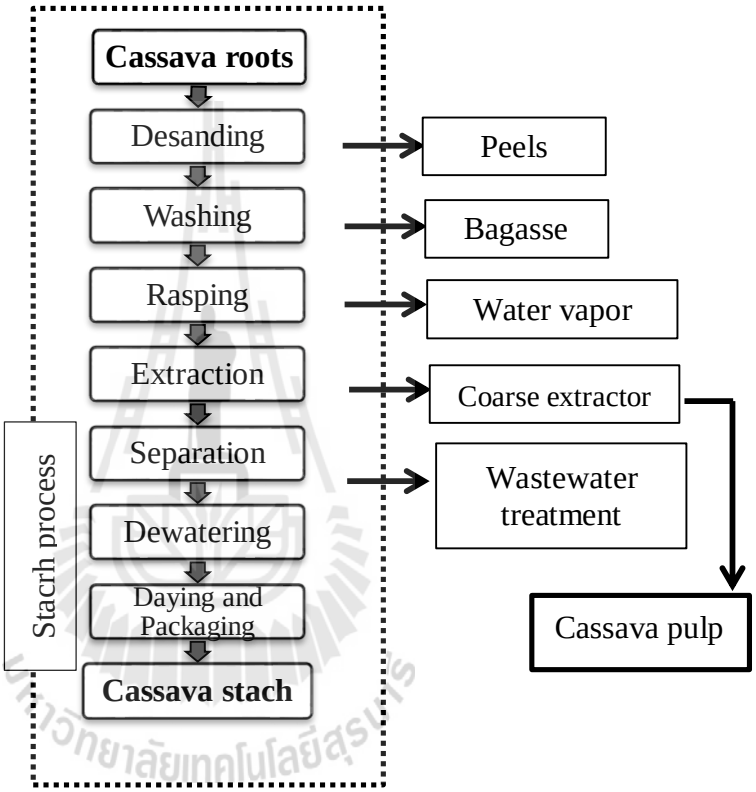


รูปที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากมันสำหลังในประเทศไทย ปี 2015
อ้างอิง: Office of Agricultural Economics (OAE, 2015).

การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง

ในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (รูปที่ 2.2) จะใช้ส่วนของราก (Fibrous root system) โดยนำมาสกัดแป้งเพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจากกระบวนการนี้ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมัน ของเสียประเภทของแข็งที่เกิดจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ได้แก่ ราก เหง้า ดิน ทราย และกากมันสำปะหลัง การนำราก เหง้า ดิน และทรายไปใช้ประโยชน์ หรือเพิ่มมูลค่ายังมีไม่แพร่หลายนัก ปัจจุบันของเสียประเภทนี้ถูกนำไปใช้ในการเพาะปลูก เช่น เป็นวัสดุเสริมในดิน นอกจากนี้ยังพบว่า กากมันสำปะหลังที่เป็นวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการผลิตแป้งนั้น มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 50-60 โดยน้ำหนักแห้ง (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์ และคณะ, 2549) ซึ่งแป้งในส่วนนี้จะอยู่ในลิกโนเซลลูโลส และเพคตินของเซลล์พืช เซลลูโลสและเส้นใยอยู่ร้อยละ 10-15 โปรตีนร้อยละ 1.5-5

และไขมันร้อยละ 0.1-4 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุในปริมาณที่ต่ำ กากมันสำปะหลังมีแร่ธาตุ Fe^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+} และ Zn^{2+} อยู่ในปริมาณ 155, 40, 1100, 4 และ 21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง ตามลำดับ (Coulin et al., 2006; Kurdi and Hansawasdi, 2015; Shigaki, 2016). สำหรับกากมันสำปะหลังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายวิธี ได้แก่ การผลิตอาหารสัตว์ การผลิตก๊าซชีวภาพ และการผลิตเอทานอล และยังเพียงพอต่อการนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย



รูปที่ 2.2 แผนภาพกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย
อ้างอิง: Tran et al., (2015).

ความหมายของโพรไบโอติก (Definition of Probiotics)

โพรไบโอติก หรือ จุลชีพเสริมชีวนะ คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และหรือเซลล์ตายแล้วซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่พอเพียง จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และกระตุ้นกลไกของระบบภูมิต้านทาน (Fuller, 1989 และ Holzapfel&Schillinger, 2002) International Life Science Institute (ILSI) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติก ว่าไม่ได้หมายรวมเฉพาะจุลินทรีย์ที่มี

ประโยชน์ต่อสุขภาพ ยังหมายรวมถึงอาหารที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปริมาณที่สามารถส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค ซึ่งจัดเป็น อาหารโพรไบโอติกในปี 2002 องค์การอาหารและเกษตรแห่งชาติ (FAO) และ องค์การอนามัยโลก (WHO) (2002) ได้ให้คำจำกัดความของ โพรไบโอติก ว่า คือ จุลินทรีย์มีชีวิตเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตาม โพรไบโอติกในรูปของเซลล์ตาย (dead cell) ยังคงมีส่วนประกอบเช่น โปรตีนของเซลล์ สารพันธุกรรม (DNA และ RNA) ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เอกโซโพลีแซคคาไรด์ ลิโปโพลีแซลคาไรด์ และส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์ที่มีบทบาทกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพ (Chuang et al., 2007; Maeda et al., 2009: Nan Li et al., 2009)

การคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Seledtion of Probiotics)

ปัจจุบันมีการนำโพรไบโอติกหลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย รา และยีสต์ไปใช้ในอย่างแพร่หลาย ทั้งในสัตว์และมนุษย์ โดยมุ่งเน้นเพื่อการเพิ่มผลผลิตและการส่งเสริมสุขภาพเป็นหลัก โดยเฉพาะกับมนุษย์จำเป็นต้องมีการศึกษาและทดสอบทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูล คุณสมบัติและประสิทธิผลต่อมนุษย์ รวมทั้งความปลอดภัย อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกก็ได้ให้การรับรอง จุลินทรีย์โพรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded as Safe หรือ GRAS).

เกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับในสิ่งมีชีวิตทั้งคนและสัตว์ โดยเฉพาะการนำโพรไบโอติกไปใช้ในมนุษย์ต้องคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัย และประโยชน์ที่จะได้รับเป็นหลัก (รูปที่ 2.3) (Dunne et al., 2001; Vasiljevic and Shah, 2008) ดังนั้นหลักเกณฑ์สำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมีคุณสมบัติหลัก ดังนี้

(1) สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้

(2) ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค

(3) สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้

(4) มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7-10^9 cfu/ml ของผลิตภัณฑ์)

รูปที่ 2.3 คุณลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก
อ้างอิง: Saarela M, et al. 2000 และ ชัยวัฒน์ ไชยสุต

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่คุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์หมักชนิดต่างๆ

ปัจจุบันความสนใจอาหารเพื่อสุขภาพโดยเฉพาะการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์มีมากขึ้น ดังนั้น จึงมีการกำหนดคุณสมบัติเพื่อใช้ในการคัดเลือกโพรไบโอติกเพื่อให้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมหรือเพื่อการค้าและสร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่างๆ

มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกตั้งแต่ปี 1900 จนปัจจุบัน มักพบว่าคัดแยกมาจาก นม และผลิตภัณฑ์นมเป็นส่วนใหญ่ เช่น B. *bifidum*, B. *breve*, L. *acidophilus*, L. *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, L. *plantarum*, L. *casei*, L. *lactis*. E. *faecium*, E. *durans* เป็นต้น (ไชยวัฒน์ ไชยสุต ,1994) นอกจากนี้ พบการรายงานการคัดแยกโพรไบโอติกที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เช่น *Staphyloccus sciuri* จากเนยแข็ง (Mogensen G, et al. 2002) และ *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *Boulardii* จาก Feta cheese (Psomas, E, et al. 2001; Mogensen G, et al. 2002)

อย่างไรก็ตามมีรายงาน การพบแบคทีเรียโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของพืช อยู่ในกลุ่มของ Amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) เช่น *Lactobacillus plantarum* จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่มี African cassava เป็นส่วนผสมหลัก (Nwankwo et al., 1989; Olympia et al., 1995) *L. manihotivorans* จากแป้งมันสำปะหลังหมัก *L. fermentum* และ *L. plantarum* จากอาหารหมักพื้นเมืองของ Nigeria (Agati et al., 1998; Sanni et al., 2002) เป็นต้น Gopa R. et al., 2008 พบว่า

ALAB มีความสามารถในการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ คือ โปรตีน และ แป้ง ได้ดี ซึ่งช่วยในการส่งเสริมระบบการย่อยสลายสารอาหารเพื่อการดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ได้

ในการคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลกติกที่จะนำมาใช้กับมนุษย์จำเป็นมีคุณสมบัติ (Lee et al. 1999; Morelli, 2000; Duangjitcharoen et al. 2008) ดังนี้

(1) ความสามารถในการเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 ทั้งนี้เพื่อให้สัมพันธ์กับสภาวะการหลั่งเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณร้อยละ 0.15 - 0.30 และเป็นแหล่งที่โพรไบติกแบคทีเรียอาศัยอยู่

(2) ความสามารถในการเจริญได้ในภาวะความเป็น กรด - ด่าง (ค่าพีเอช, pH unit) 2, 3, 4, 8 และ 9 ซึ่งเป็นระดับความเป็น กรด - ด่าง เช่นเดียวกับที่พบ ในกระเพาะอาหารของมนุษย์ ซึ่งมีความเป็นกรดที่ระดับค่าพีเอชเท่ากับ 3 หรือต่ำกว่า และในลำไส้เล็กที่มีความเป็นด่าง ในระดับค่าพีเอชประมาณ 8 ถึง 9 ทั้งนี้ ความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าว บ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญรอดชีวิตจากภาวะความเป็น กรด - ด่าง ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้

(3) ความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ คือ โปรตีน แป้งและไขมัน ซึ่งความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุล คือ ความสามารถในการส่งเสริมระบบการย่อยสารอาหารเพื่อการดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ได้

(4) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ทั้งนี้เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ยิ่งลึกลงไปยิ่งมีปริมาณอากาศที่เบาบางหรือไม่มีอากาศเลย ดังนั้นสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่สามารถเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ต้องมีคุณลักษณะที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีอากาศได้ ยิ่งสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันในทั้งสองสภาวะ ยิ่งเป็นผลดีต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

(5) การไม่แก่งแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ โดยการทดสอบความสามารถในการเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีวิตามินบี 12 (cobalamin free medium) ทั้งนี้เนื่องจากการดูดซึมวิตามินเข้าสู่ร่างกายมักเกิดที่ลำไส้เล็กและวิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำชนิดหนึ่งที่ถูกดูดซึมในบริเวณลำไส้เล็ก ซึ่งแหล่งที่มาของวิตามินบี 12 ในแหล่งอาหารจากธรรมชาตินั้น พบว่ามีเฉพาะในเนื้อสัตว์เท่านั้น ดังนั้นเมื่อแบคทีเรีย สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีวิตามินบี 12 คือไม่ต้องอาศัยวิตามินบี 12 ในการเจริญจึงน่าจะเป็น ประโยชน์ต่อผู้บริโภคกลุ่มมังสวิรัติหรือผู้ที่รับประทานอาหารมังสวิรัติที่ไม่ดื่มนมซึ่งมักจะมีระดับวิตามินบี 12 ในร่างกายต่ำ

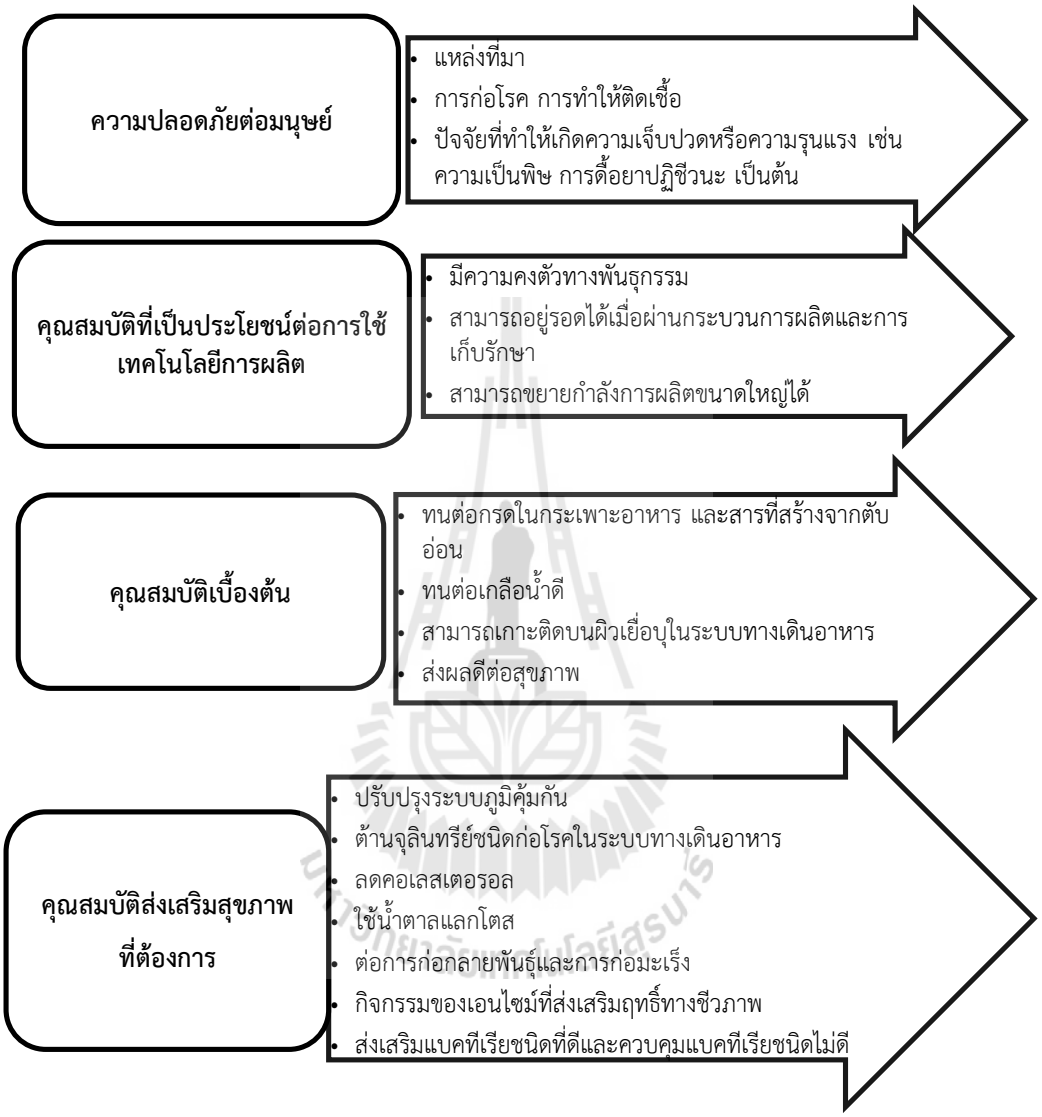
(6) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียรวมทั้งหมด 13 ชนิด ซึ่งคุณสมบัตินี้ของแบคทีเรียจะสามารถต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารอาจช่วยในการลดการก่อโรค และป้องกันปัญหาสุขภาพอื่น ๆ ที่มีแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นสาเหตุ

(7) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกจากยาปฏิชีวนะ โดยทั่วไปจะพบว่า มีแนวโน้มการตอบสนองต่อประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะใกล้เคียงกัน คือ ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ vancomycin และ bacitracin ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosidesเช่น gentamicin kanamycin และ Streptomycin ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Quinolones เช่น norfloxacin และดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ยาปฏิชีวนะ polymyxin B เป็นต้น

(8) อัตราการเจริญเติบโต แบคทีเรียโพรไบโอติก ที่มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าสามารถเชื่อมโยงกับการตอบสนองต่อภาวะต่าง ๆ ในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าด้วยเช่นกัน การที่จุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สามารถขยายกำลังการผลิตขนาดใหญ่ได้โดยง่ายและยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย

(9) ความสามารถในการเกาะติดและอาศัยอยู่บริเวณลำไส้ของสิ่งมีชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของเจ้าบ้าน เป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค เพราะเป็นการเริ่มต้นของการอาศัยในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตและช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านหรือผู้บริโภคได้ แบคทีเรียที่สามารถเกาะติดลำไส้ผู้บริโภคได้ จะเป็นตัวขับเคลื่อนสำคัญให้ร่างกายผู้บริโภคเกิดกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะในลำไส้นั้นมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกว่าร้อยละ 80 อยู่บริเวณนี้ จึงถือว่าระบบทางเดินอาหารเป็นแหล่งที่มีบทบาทสูงต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิต เมื่อแบคทีเรียเข้าไปในร่างกายจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันจดจำว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดดี หรือชนิดที่ไม่ดีและมีการตอบสนองที่แตกต่างกันอย่าง เช่น ถ้าเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกชนิดดีมีประโยชน์ เมื่อผ่านเข้ามาในระบบทางเดินอาหาร และเกาะติดผิวเยื่อบุบริเวณลำไส้ระบบภูมิคุ้มกันจะจดจำมีความทนทาน (oral tolerance) ยอมรับให้อยู่ร่วมกันโดยจุลินทรีย์จะอาศัยอาหารในการเจริญเติบโต และผลพลอยได้ก็คือทำให้เจ้าบ้านได้รับสิ่งที่เป็นประโยชน์ร่วมด้วย เป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย โดยโพรไบโอติกสามารถทำให้สภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่มีสภาพเป็นกรดทำให้เชื้อก่อโรคซึ่งมักไม่ทนกรดนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสารอาหารบางชนิดและสามารถผลิตวิตามิน สามารถผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้สามารถควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ซึ่งอาจส่งผลดีต่อสุขภาพในด้านอื่น ๆ เช่น ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยกระตุ้นหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยป้องกันการติดเชื้อ ลดการเกิดโรคมะเร็ง (Ouwehandet al., 1999; Zubillaga et al., 2001; Holzapfel and Schillinger, 2002). เพิ่มคุณค่าทางอาหารโดยช่วยให้ระบบย่อยอาหารทำงานได้ดี และช่วยบังคับการเคลื่อนที่ภายในระบบทางเดินอาหาร (Vaughan et al., 1999) แต่ในทางกลับกัน ถ้าเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ดีหรือเป็นเชื้อก่อโรคระบบภูมิคุ้มกันจะตอบสนองแบบต่อต้านโดยกลไกต่าง ๆ เป็นต้นว่า เหนี่ยวนำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันมาทำลายหรือดักจับแล้วขับออกจากร่างกาย หรืออาจเหนี่ยวนำให้ระบบภูมิคุ้มกันสร้างสารมา

ทำลายเชื้อโรคซึ่งถ้ารุนแรงอาจมีการทำลายเซลล์ของเราจนเกิดภาวะการอักเสบรุนแรงได้ ฉะนั้น คุณสมบัติการเกาะติดเซลล์เยื่อบุของโพรไบโอติกจึงเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญที่จะเป็นตัวขับเคลื่อนส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค



รูปที่ 2.4 เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกคุณสมบัติโพรไบโอติกเพื่อนำไปใช้ทางการค้าและอุตสาหกรรมการผลิต
อ้างอิง: Lee, YK, et al. 1999 และ ชัยวัฒน์ ไชยสุต

บทบาทของโพรไบโอติกต่อสุขภาพ (Effects of Probiotics on Health)

ปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนาอาหารและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกอย่างกว้างขวาง ซึ่งได้มีรายงานถึงผลของโพรไบโอติกต่อโรคต่างๆ (รูปที่ 2.5) และสุขภาพไว้มากมายเพื่อกล่าวอ้างถึงประสิทธิภาพของโพรไบโอติกนั้นต่อสุขภาพของผู้บริโภค จากรายงานการวิจัยและเอกสารต่าง ๆ ได้กล่าวถึงโพรไบโอติกและผลต่อสุขภาพโดยรวมดังนี้

1. การปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย

ส่วนใหญ่ภาวะท้องเสียมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียซึ่งพบมากในเด็กและผู้สูงอายุ หรือในผู้ที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น สถานเลี้ยงเด็ก สถานพักฟื้น เป็นต้น ทั้งนี้ โพรไบโอติกสามารถลดความถี่ ระยะเวลาของอาการท้องร่วงและลดอาการติดเชื้อภายในลำไส้ เนื่องจากโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้จะใช้อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างพลังงานแล้วได้กรดแลกติก และกรดอะซิติก ซึ่งกรดดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ โพรไบโอติกที่เจริญเติบโตดีอาจผลิตสารอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ (Heyman, 2000) จากตัวอย่างรายงานการใช้แบคทีเรียกรดแลกติก เช่น *Lactobacillus rhamnosus strain* GG (LGG) และ *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับ *Streptococcus thermophilus* เพื่อบรรเทาอาการท้องเสียในทารก โดยเฉพาะทารกที่ไม่ได้ดื่มนมมารดา พบว่าสามารถลดระยะเวลาและความรุนแรงของภาวะท้องเสียที่เกิดจาอาหารเป็นพิษได้ นอกจากนี้ โพรไบโอติก *Lactobacillus casei* strain *shirota* และ *Bifidobacterium* BB536 สามารถช่วยป้องกันและลดภาวะท้องผูก (constipation) โดยช่วยปรับปรุงความสามารถในการเคลื่อนไหวของลำไส้ ช่วยเพิ่มความถี่ของการเคลื่อนไหวของลำไส้และเพิ่มความนุ่มของอุจจาระช่วยให้ขับถ่ายได้คล่องขึ้น (Koebnink et al, 2003; Ogata et al., 1997)

2. การลดภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยหรือไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส (lactose intolerance)

ผู้ที่มีภาวะที่ไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส จะมีอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องเดินปวดท้องเมื่อร่างกายได้รับน้ำตาลแลกโตสซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบมากในน้ำนมวัวซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดจากร่างกายไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโตสได้ เพราะขาดเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยน้ำตาลแลกโตสหรือมีปริมาณของเอนไซม์ β-galactosidase น้อยจึงทำให้แลกโตสไม่สามารถถูกย่อยในทางเดินอาหาร จึงมักพบว่าเมื่อดื่มนมแล้วมีอาการดังกล่าว ซึ่งโพรไบโอติกสามารถผลิตน้ำย่อยเพื่อช่วยย่อยแลกโตสในนมได้ จึงทำให้แลกโตสเหลือน้อยหรือไม่มีเลย ดังนั้น ผู้ที่ไม่มีการสร้างน้ำย่อยดังกล่าวสามารถดื่มนม และผลิตภัณฑ์นมได้โดยไม่เกิดอาการดังกล่าว (De Vrese et al, 2001)

3. การป้องกันหรือลดระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง

โพรไบโอติกอาจเกี่ยวข้องกับการป้องกันมะเร็งในลำไส้ โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ เช่น อาจช่วยกดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ลดสารเมแทบอไลต์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แอมโมเนียม อินโดล สแกโทล และลดปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง กับการก่อมะเร็ง (procarcinogenic enzyme) ในลำไส้ใหญ่ (Guerin-Danan et al., 1998) โพรไบโอติกยังอาจควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสาร หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็งได้ และมีผลต่อการเคลื่อนไหวหรือการบีบตัวของลำไส้ ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์ สารก่อมะเร็งให้ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น (Khedkar et al., 2003)

4. การปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โพรไบโอติกช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ที่มีอยู่ทุกหนทุกแห่งไหลเวียนไปตามหลอดเลือดให้เคลื่อนมายังตำแหน่งที่เชื้อโรครุกเข้ามาสู่ร่างกาย แล้วโมโนไซต์ก็เติบโตเป็นแมคโครฟาจเพื่อจับกินเชื้อโรคนั้นนอกจากนี้ ยังหลั่งสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อโรค เช่น ไซโตคายน์ ชนิดแกมมาโกลบูลิน เอ (Immunoglobulin A; IgA) อินเตอร์ลิวคิน (Interleukin) และทูเมอนิวโครซีสแฟคเตอร์ แอลฟา (Tumor Necrosis Factor; TNF-α) (Kirjavainen et al., 1999; Herich and Levkut, 2002 Prisciandaro et al., 2009) ทำให้ร่างกายป้องกัน ต่อต้านและกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่เข้าสู่ร่างกายได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสารนี้คล้ายฮอร์โมนทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อมาช่วยกันต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรค หรือผู้รุกราน นอกจากโพรไบโอติกจะช่วยเพิ่มปริมาณสารต่อต้านเชื้อโรคในร่างกายแล้วยังทำให้มีการสื่อสารกับเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในชั้นใต้เยื่อบุลำไส้ (gut-associated lymphocyte tissue,GALT) ดียิ่งขึ้น ทำให้การสร้างสารป้องกันและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เข้าสู่ภาวะสมดุล นำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบป้องกันมากกว่าการตอบสนองแบบก่อการอักเสบหรือภูมิแพ้ ทำให้เนื้อเยื่อที่อักเสบบรรเทาลงและซ่อมแซมเซลล์ร่างกายที่บาดเจ็บให้ฟื้นตัวเร็วขึ้น (Ouwehand et al., 1999)

5. การลดภาวะภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรง

ภาวะโรคภูมิแพ้ (allergic diseases) เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ โดยปกติร่างกายจะสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อภูมิแพ้ของร่างกายเมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้ (allergen) เช่น ฝุ่นบ้าน ไรฝุ่น ละอองเกสรดอกไม้ รังแค ขนสัตว์ อาหาร เป็นต้น ซึ่งมักพบอาการในเด็กโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปี และเมื่อร่างกายได้รับสารก่อภูมิแพ้ก็จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างอิมมูโนโกลบูลิน ชนิดอี หรือ แอนติบอดี ไอจีอี (IgE antibody) ออกมาแทนการสร้างแอนติบอดี ไอจีจี (IgG antibody) ซึ่งโดยปกติร่างกายจะสร้างแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน ชนิด จี (IgG) เพื่อตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยจะสร้างออกมามากเพื่อทำหน้าที่ทำลายแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา

และสารพิษต่าง ๆ ของมนุษย์ที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ แต่ในสภาวะที่มีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่ก่อภูมิแพ้ได้ก็จะกระตุ้นให้สร้าง IgE เป็นสาเหตุให้เกิดอาการของโรคภูมิแพ้ (allergic diseases) และปัญหาสุขภาพที่เกี่ยวเนื่องจากโรคภูมิแพ้ชนิดต่าง ๆ ได้ ซึ่งโพรไบโอติกอาจช่วยในเรื่องของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ผลิตสารตอบสนองที่สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น (Kirjavainen et al., 1999) โพรไบโอติกสามารถกระตุ้น การสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยช่วยลดหรือป้องกันการสร้างโปรตีนหรือแอนติบอดี (antibody) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรงของร่างกายได้ ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิแพ้ ของร่างกาย คือ IgE และโพรไบโอติกยังช่วยกระตุ้น ให้ร่างกายสร้างสารตอบสนองต่อภูมิคุ้ม กันของร่างกายเพื่อไม่ให้เกิดการอักเสบรุนแรง เช่น อินเตอร์ลิวคิน-10 (IL-10) (Isolauri et al., 2001; Ezendam and Van Loveren, 2006)

6. การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

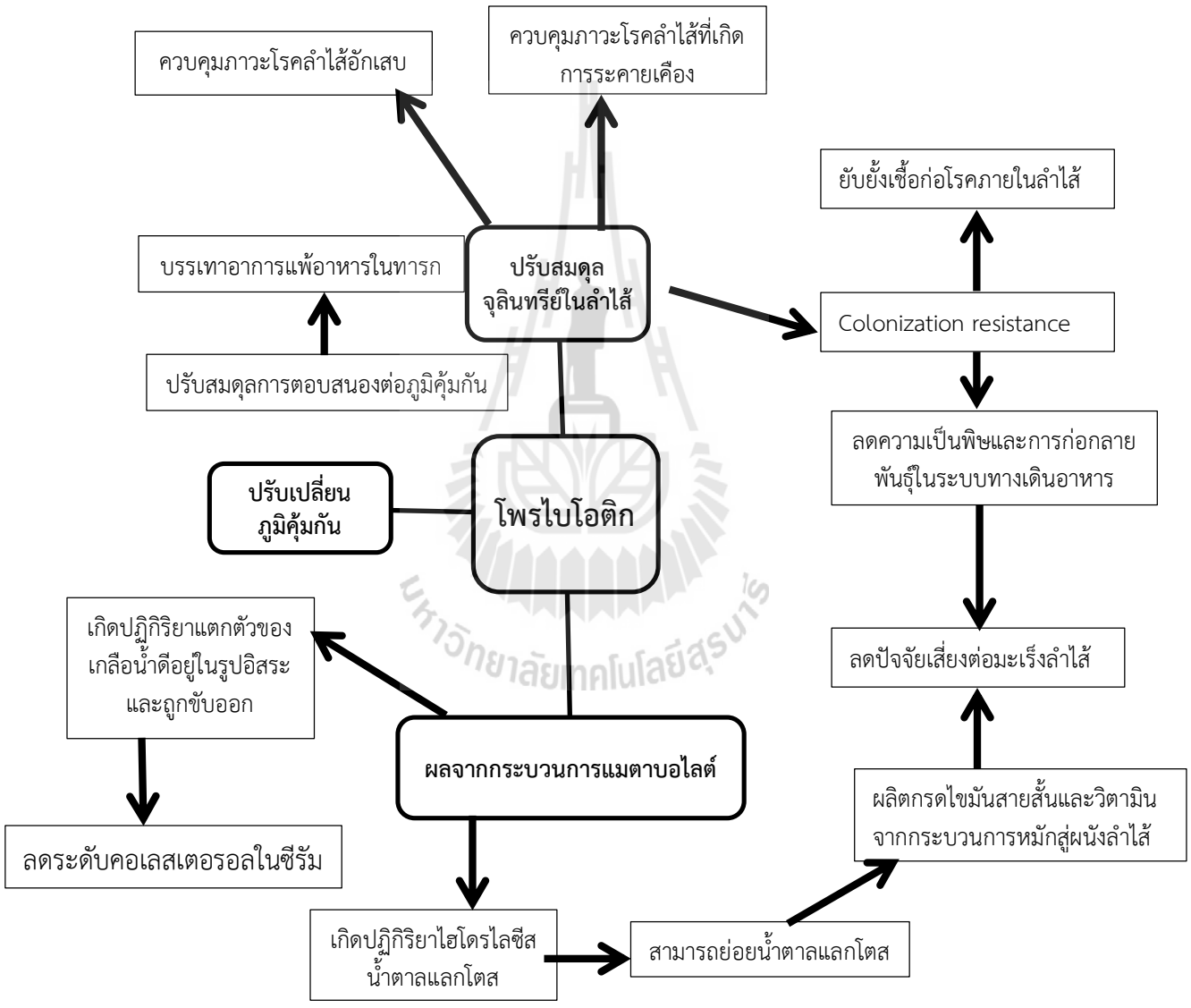
คอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เกลือน้ำดี โพรไบโอติกที่สามารถสร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีได้จะทำให้เกลือน้ำดีที่ถูกย่อยแล้วเป็นเกลือน้ำดีอิสระ (deconjugated bile salt) สามารถถูกขับออกทางอุจจาระได้ดี ทำให้ร่างกายใช้คอเลสเตอรอลมาสังเคราะห์เป็นเกลือน้ำดีทดแทนจึงส่งผลให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ นอกจากนี้อาจเนื่องจากการที่โพรไบโอติกนำเอาคอเลสเตอรอลไปใช้ได้โดยตรง เพื่อการสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง ซึ่งสมมติฐานของกลไกการลดคอเลสเตอรอลโดยโพรไบโอติกอาจเกิดจากกลไกการทำงานร่วมกัน ดังนี้

(1) ความสามารถของโพรไบโอติกในการผลิตเอนไซม์ Bile Salt Hydrolase (BSH) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเกลือน้ำดีกับกรดอะมิโน (conjugated bile salt) ได้เป็นเกลืออิสระน้ำดีในรูปที่อิสระละลายได้น้อยกว่าเกลือที่จับกับกรดอะมิโนทำให้เกิดการดูดซึมกลับเข้าไปยังตับลดลง และยังสามารถลอดผ่านผนังลำไส้และเข้าสู่กระแสเลือดได้ นอกจากนี้ยังตกตะกอนได้ดี จึงสามารถถูกขับออกทางอุจจาระได้ดี ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณของเกลือน้ำดีที่จะถูกส่งกลับเข้าไปยังตับ และหมุนเวียนระหว่างตับกับลำไส้เพื่อทำหน้าที่ย่อยและดูดซึมไขมันนั้นลดลง ดังนั้น น้ำดีจะต้องถูกสร้างขึ้นใหม่จากคอเลสเตอรอลภายในตับ จึงสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลภายในตับ และสามารถลดระดับปริมาณคอเลสเตอรอลที่จะส่งออกมาสู่กระแสเลือดได้ (Corzo and Gilliland, 1999; Tanaka et al., 1999; Knarreborg et al., 2002; Lim et al., 2004; Begley et al., 2006; Parvez et al., 2006)

(2) โพรไบโอติกสามารถนำคอเลสเตอรอลไปใช้ในการสร้างเซลล์ (cholesterol assimilation) ซึ่งอาจดึงคอเลสเตอรอลไปใช้ในการร่วมสร้างเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ใช้ในการเจริญของเซลล์

ในขณะที่แบคทีเรียกำลังอยู่ ในช่วงเจริญ (Gilliland et al., 1985; Pereira and Gibson, 2002; Liong and Shah, 2005; Park et al., 2007)

(3) เซลล์เมมเบรนของโพรไบโอติกอาจสามารถจับกับคอเลสเตอรอลได้ (cholesterol removal) ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง (Gilliland et al., 1985; Pereira and Gibson, 2002; Liong and Shah, 2005; Park et al., 2007)



รูปที่ 2.5 บทบาทของโพรไบโอติกต่อโรคต่างๆ และสุขภาพ
อ้างอิง: Parvez et al. 2006 และ ชัยวัฒน์ ไชยสุต

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง

ก. การแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง

แยกจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถลดคอเลสเตอรอลได้สูง จากตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ตามวิธีการของ Marcy and Fruett (2001) โดยตัวอย่างกากมันที่เก็บจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง 300 กรัม ผสมให้เข้ากันกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:3) จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0-28 วัน เก็บตัวอย่างกากมันที่ระยะเวลาต่างๆมาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกและตรวจนับจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่เจือจางด้วยวิธี Standard plate count และใช้เทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (ภาคผนวก ข3) บ่มให้เชื้อเจริญ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อตรวจหาแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เลือกเก็บโคโลนีตามความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อ

ข. การทดสอบความสามารถในการสร้าง Bile salt hydrolase enzyme โดยใช้อาหารแข็ง

นำไอโซเลทที่เลือกเก็บจากข้อ 3.1.1.ก มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase บนอาหาร MRS ที่เติม Oxgall 0.5% และ 0.37 g/l $CaCl_2$ ตามวิธีของ (Lim et al., 2004) บ่มให้เชื้อเจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตุโคโลนีที่เกินบริเวณขุ่นรอบโคโลนี (Precipitation zones) เลือกไอโซเลทที่เจริญได้ดีและสามารถสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase ได้ในปริมาณสูงโดยเทียบจากความกว้างของโคโลนีและบริเวณขุ่นรอบโคโลนี เพื่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ค. การทดสอบความสามารถในการทนกรด และ ด่าง

ทดสอบความสามารถในการทนสภาวะกรดและด่างของไอโซเลทที่คัดเลือกจากข้อ 3.1.1.ข ตามวิธีของ (Brink et al., 2006) นำมาทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่สภาวะ pH 2-9 โดยการเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มเชื้อในสภาวะการเจริญที่ไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นปิเปตเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ pH แตกต่างกัน บ่มเชื้อในสภาวะการเจริญที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจนับจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่เจือจางด้วยวิธี Standard plate count และใช้เทคนิค Spread plate บน

อาหารเลี้ยงเชื้อMRS agar บ่มให้เชื้อเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้และทำการทดลองเชื้อในขั้นต่อไป

ง. การทดสอบความสามารถในการทน Bile salt

ทดสอบเชื้อที่เจริญและสามารถทนต่อ Bile salt โดยวิธีการเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เติม 0.15 และ 0.5% Bile salt ตรวจสอบการเจริญ สังเกตไอโซเลทที่เจริญและสามารถสร้างเอนไซม์ Bile Salt Hydrolase ได้ปริมาณสูง โดยสังเกตความขุ่นรอบๆโคโลนี

3.1.2 การคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีผลต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในระดับ *in vitro*

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จาก 3.1.1ค ทดสอบความสามารถในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate assay) ตามวิธีของ (Lim et al., 2004) และวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอล โดยดัดแปลงจากวิธีการของ (Tamminen et al., 2004) และ (Sirilun et al., 2010) ด้วยเครื่อง Automated System ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.3 การระบุชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก

ระบุชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ชอบเจริญในที่เค็มที่สร้างโปรตีเนสกลุ่มเด่นที่คาดหวังที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา และศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ ตาม (Massi et al., 2004; Tamminen et al., 2004) พร้อมทั้งทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยระบบ API 50 CH (API System; bioMérieux, bioMérieux Inc., Lyon, France) เทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) และศึกษาเพื่อระบุสายพันธุ์ที่แน่ชัดโดยวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนของ 16S rRNA gene (Stackebrandt and Goodfellow, 1991) วิธีการเพื่อระบุชนิด/สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ มีดังนี้

ก. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเซลล์

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียมรอย Smear ของแบคทีเรียอายุ 2 วัน ที่เจริญบน MRS agar บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก1) ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบาๆ และหยด Gram's iodine (ภาคผนวก ก3) ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างรอย Smear ด้วยแอลกอฮอล์ (95%) (ภาคผนวก ก8) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมา แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย Smear ด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก4) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง แล้วตรวจดูรูปร่าง โครงสร้าง และการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, Olympus, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ข. การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติก ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้ Motility test medium (ภาคผนวก ข7) โดยใช้เข้มเขี่ยปลายตรง (Needle) เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ใส่ใน Motility test medium ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 37 อาศาเซลเซียส บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการกระจายของเชื้อจากรอยที่ใส่เชื้อลงไปในอาหาร

ค. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

(1) การสร้างเอนไซม์ Catalase

เชื้อที่ป้ายไว้บนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Catalaseใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ก2) ลงบนสไลด์ ที่มีเชื้อทดสอบอยู่ สังเกตฟองแก๊สที่เกิดขึ้น แสดงผลเป็นบวก

(2) ทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบระบบ API 50CH50 (bioMérieux) ตามกลุ่มของแบคทีเรียโดยเตรียม Suspension ของเซลล์ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ให้มีความขุ่นตาม Turbidity standard (ภาคผนวก ก9) ที่สอดคล้องกับข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

จ. การวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรีย

วิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนของ 16S rRNA gene ตามขั้นตอนดังนี้

(1) การสกัด Genomic DNA จากเซลล์แบคทีเรีย

ทำการสกัด Genomic DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA (UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc. Canada)

(2) การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene

เพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) สำหรับการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยใช้ Primers 16UNI-L และ 16UNI-R (ตารางที่ 3.1) และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermocycler (Biometra®, Biometra GmbH, Rodolf-wissell-Str.30 D-37079 Goettingen, Germany)

ตารางที่ 3.1 Universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

Primer	Primer sequence (5’ to 3’)	Target region[a]
16UNI-L	5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'	1300 bp
16UNI-R	5' GTGTGACGGGCGGTGTGTAC 3'	1300 bp

[a]*E. coli* numbering

(3) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S RNA gene

หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 16S rRNA gene โดยส่งวิเคราะห์ที่ McGill University and Gemone Quebec Innovation Centre Canada ตรวจสอบเพื่อให้ได้ Alignment ของ DNA sequence โดยใช้ MEGA 6 software program และเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลิโอไทด์ที่มีอยู่ใน Nueleotide sequence database ของ GenBank หรือ National Center for Biotechnological Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)

ฉ. ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค (antagosistic)

ทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ Abdelbasset and Djamila (2008) โดยนำไอโซเลทที่คัดเลือกมาเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มี 2.5% yeast บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrien (NA) ที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเจริญอยู่ จากนั้นปิเปตส่วนใสที่ได้ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารแข็งที่เจาะรูไว้ ใช้ Antibiotic และ 0.85% NaCl เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อเปรียบเทียบ บ่มที่สภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สังเกตการผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยจะพบลักษณะบริเวณใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบบริเวณที่เจาะรูไว้

ช. ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

นำแบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือกได้ ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง บนอาหาร Blood agar ด้วยวิธี Cross streak บนผิวหน้าอาหารแข็ง บ่มให้เชื้อเจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มให้เจริญเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยผลบวกสามารถสังเกตได้จากบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสามารถจัดจำแนกได้เป็น Beta hemolysis, Alpha hemolysis และ Gramma hemolysis

ซ. ทดสอบคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ (Cell surface hydrophobicity และ Caco-2 cell lines)

(1) ศึกษาคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้โดยทดสอบความมีขั้ว-ไม่มีขั้วโดยวิธี MATH (Microbial adhesion to hydrocarbons) ตามวิธีของ (Guellil et al., 1998) นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ เลี้ยงให้เจริญในอาหารเหลว MRS ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มให้เจริญเป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำเซลล์ ที่ได้ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PUM (ภาคผนวกที่ ง) และเติม 1.4 มิลลิตรของสารละลาย PUM ลงในเซลล์

แบคทีเรีย แล้วเติม 0.14 มิลลิลิตรของ Hexadecane หรือ iso-octane ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดความยาวคลื่นที่ 600 nm คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกาะติดดังนี้

$$\%H = \left(\frac{1 - \mathrm{A1}}{\mathrm{A0}}\right) x\ 100$$

A1: ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ส่วนที่แยกชั้น (aqueous cell suspension)
A0: ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้น (cell original suspension)

H% มากกว่าร้อยละ 70 จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำมาก (High hydrophobicity)
H% ระหว่างร้อยละ 50-70 จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำปานกลาง (Moderate hydrophobicity)
H% ต่ำกว่าร้อยละ 50 จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำต่ำ (Low hydrophobicity)

(2) ศึกษาคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้โดยทดสอบใช้ Caco-2 cell lines ตามวิธีของ Duary et al., (2011); Monteagudo-Mera et al., (2012)

นำเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เลี้ยงบน Caco-2 cell lines (The human colonic carcinoma cell line Caco-2 ; ATCC® ที่ถูกเตรียมตามวิธีของ Monteagudo-Mera et al., (2012) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี 5% ของ CO_2 เมื่อครบกำหนดเวลา นำเซลล์แบคทีเรียแลคติกที่สามารถยึกเกาะบน Caco-2 cell มาตรวจนับหาปริมาณแบคทีเรีย โดยใช้อาหารแข็ง MRS คำนวณหา Adhesion values (%) ดังนี้

$$\%Adhesion = \frac{V1\ \times 100}{V0}$$

V0: ค่าปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ทดสอบ
V1: ค่าปริมาณแบคทีเรียที่สามารถยึดเกาะ Caco-2 cells.

3.1.4 ศึกษาปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกได้

ก สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (Growth curve)

หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยเตรียมเชื้อที่คัดเลือกได้ ใน MRS broth ที่ pH 5 ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 620 nm ตรวจนับจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่เจือจางด้วยวิธี

Standard plate count และใช้เทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มให้เชื้อเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญของแบคทีเรียเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้และทำการทดลองเชื้อในขั้นต่อไป

ข ปัจจัยด้านสารอาหาร

(1) ศึกษาชนิดที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากธัญพืชชนิดต่างๆที่หาได้ง่ายทดแทน คือ กากมันสำปะหลัง รำข้าว และ ข้าวกล้องมะลิ โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Michida et al., 2006)

นำธัญพืช ทั้ง 3 ชนิด (กากมันสำปะหลัง รำข้าว และ ข้าวกล้องมะลิ) บดด้วยเครื่อง Hammer mill ให้ละเอียด จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างแป้งที่ได้ ผสมกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:9 ส่วน ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum) ให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^{11} cells/mL ใช้เชื้อเริ่มต้น 1 mL. ใส่ลงในอาหารเหลว (Cereal broth) แต่ละชนิดที่ทดสอบ 9 mL. ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้จุลินทรีย์เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4ก

(2) ทดสอบผลของ Oligosaccharide ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือก (Prebiotic activity)

ศึกษาความสามารถในการใช้พรีไบโอติกชนิดต่างๆต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ตามวิธีของ (Huebner et al., 2008) นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ เลี้ยงให้เจริญในอาหารเหลว MRS ที่เติม 2% พรีไบโอติก (inulin, Lactulose, fructooligosaccharide (FOS), Cellulose, DF (dietary fiber), กากมันสำปะหลัง และ แป้งแก่นตะวัน) บ่มให้เจริญเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

$$\text{Prebiotic activity score} = \left[\frac{(\text{probiotic log CFU on the prebiotic at 24 h} - \text{probiotic log CFU on the prebiotic at 0 h})}{probiotic \text{ log CFU on glucose at 24 h} - \text{probiotic log CFU on glucose at 0 h})}\right] - \left[\frac{(\text{enteric log CFU on the prebiotic at 24 h} - \text{enteric log CFU on the prebiotic at 0 h})}{\text{enteric log CFU on glucose at 24 h} - \text{enteric log CFU on glucose at 0 h})}\right]$$

ค ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

(1) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญ โดยเตรียมเชื้อที่คัดเลือกได้ ใน MRS broth ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่เจือจางด้วยวิธี Standard plate count และใช้เทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อMRS agar บ่มให้เชื้อเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้และทำการทดลองเชื้อในขั้นต่อไป

(2) อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเช่นเดียวกับการทดสอบ pH โดยใช้อาหาร MRS broth ที่มี pH 5 บ่มให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียเช่นเดียวกับการศึกษาผลของ pH

3.1.5 การศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในระบบทางเดินอาหารจำลอง

ก. ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะเจำลองของไอโซเลทที่คัดเลือก

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ให้มีความเข้มข้นของเชื้อสุดท้าย เท่ากับ $1X10^7$ CFU /mL โดยดัดแปลงจากวิธีของ Maragkoudakis et.al.(2006), Grimoud et al. (2010) และ Lapsiri et al.(2012). ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะอาหารด้วย pepsin (1:10,000,ICN) pH 2.0 บ่มสภาวะไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

ข. ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะและลำไส้จำลองของไอโซเลทที่คัดเลือก

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ให้มีความเข้มข้นของเชื้อสุดท้าย เท่ากับ $1X10^7$ CFU /mL โดยดัดแปลงจากวิธีของ Maragkoudakis et.al.(2006), Grimoud et al. (2010) และ Lapsiri et al. (2012). ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะอาหารด้วย pepsin (1:10,000,ICN) pH 2.0 บ่มสภาวะไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบการรอดชีวิตในระบบลำไส้ด้วย pancreatin pH 8 บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง

ก. การแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลังที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง

แยกและคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) จากตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากโรงงานแป้งมันในเขตจังหวัดนครราชสีมา ตามวิธีการของ (Jintanawit, 2006) โดยหมักตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่างๆ (0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน) ตรวจวัดค่า pH ของตัวอย่างหลังการหมักและตรวจนับการเจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ พบการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่มแลคติกในระยะ 7 แรกของการหมัก ($P<0.05$) และมีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าความเป็นกรดที่เพิ่มสูงขึ้น โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติกจะเจริญได้ดีที่ช่วง pH ประมาณ 5 ดังนั้นเมื่อความเป็นกรดเพิ่มสูงขึ้นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่ไม่สามารถทนกรดได้จึงลดลง ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากโคโลนีที่พบเด่นและที่มีลักษณะแตกต่างกันที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ได้รวมทั้งสิ้น 390 ไอโซเลท และช่วง pH ประมาณ 4 รายละเอียดปรากฏตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่พบในกากมันสำปะหลังหมักที่ระยะเวลาต่างๆ

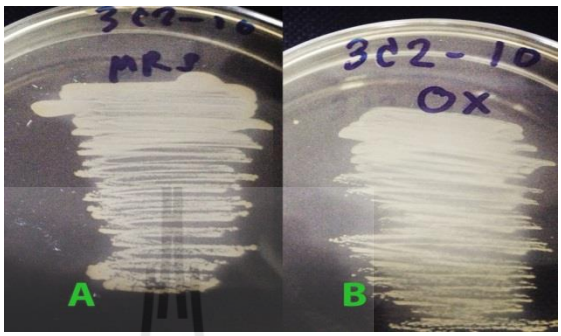
ชนิด	ระยะเวลา (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/g, mL)	pH
กากมันสำปะหลัง	0	7.31 ± 0.11^{b}	4.59 ± 0.04^{d}
	1	7.44 ± 0.08^{b}	4.47 ± 0.06^{d}
	3	7.50 ± 0.05^{b}	4.23 ± 0.13^{c}
	5	7.45 ± 0.24^{b}	4.16 ± 0.08^{c}
	7	7.39 ± 0.23^{b}	3.97 ± 0.06^{b}
	14	6.42 ± 0.06^{a}	3.89 ± 0.08^{b}
	21	6.72 ± 0.13^{a}	3.80 ± 0.02^{b}
	28	6.33 ± 0.07^{a}	3.49 ± 0.04^{a}

Different superscript letters are significantly different ($p<0.0.5$), n=6

ข. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase โดยใช้อาหารแข็ง

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase (BSH) เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำดี (Bile salt) นำไอโซเลทที่คัดแยกได้ จำนวน 390 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหารแข็ง

MRS ที่เติม 0.5% Oxgall และ 0.37% $CaCl_2$ ตามวิธีของ Lim, Kim & Lee, (2004) คัดเลือกไอโซเลท ที่สามารถเจริญและเกิดตะกอนขุ่นรอบโคโลนีได้ดี เอนไซม์ BSH ที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแลคติก จะตัดที่ตำแหน่งพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมอยู่กับ bile acid ทำให้ amino group หลุดออกจาก steroid core และเกิดการตกตะกอนของ unconjugated bile acid ในสภาวะที่เป็นกรด (Begley et al., 2006) ทำให้เห็นการเกิดตะกอนขุ่นรอบโคโลนี จากผลการทดลองพบ 38 ไอโซเลท ที่แสดงผลบวก บนอาหาร MRS ที่ทดสอบ แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง MRS (A) และ MRS agar ที่เติม 0.3% Oxgall (B)

ค. การทดสอบความสามารถในการทนกรด และ ด่าง

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก (จาก ข) ทั้ง 38 ไอโซเลท เลี้ยง บนอาหาร MRS ที่ปรับ pH ในช่วง 2-9 บ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามผลการเจริญ พบว่า แบคทีเรียแลคติก 3 ไอโซเลท คือ 3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12 สามารถเจริญได้ในช่วง pH 2-9 บนอาหาร MRS ในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดเลือก

Strains	Inoculum (Log CFU/g)	pH (Log CFU/g)								Bile salt	
		2	3	4	5	6	7	8	9	0.15%	0.50%
3C2-10	8.08±0.16	ND	7.58 ±0.03	7.43 ±0.02	7.24 ±0.09	7.11 ±0.05	7.79 ±0.01	7.79 ±0.02	7.15 ±0.01	+	+
21C2-10	8.53±0.05	ND	7.36 ±0.15	7.72 ±0.03	7.49 ±0.13	7.53 ±0.07	7.66 ±0.02	7.47 ±0.06	7.58 ±0.09	+	+
21C2-12	8.47±0.03	1.88 ±0.11	7.30 ±0.03	7.32 ±0.09	7.34 ±0.32	7.64 ±0.05	7.72 ±0.06	7.71 ±0.1	7.58 ±0.17	+	+

+, การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร MRS, ND: ไม่พบการเจริญ (not detect)

ง. การทดสอบความสามารถในการทน Bile salt

ทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม Bile salt ปริมาณ 0.15 และ 0.50% พบว่า ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญในอาหารที่เติม Bile salt ในทุกช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ คือ 0.15% และ 0.50 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) โดยปกติในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จะมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 0.15-0.30 % จากผลการทดสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ถึง 0.50% ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มีโอกาสอยู่รอดในระบบย่อยอาหารของมนุษย์

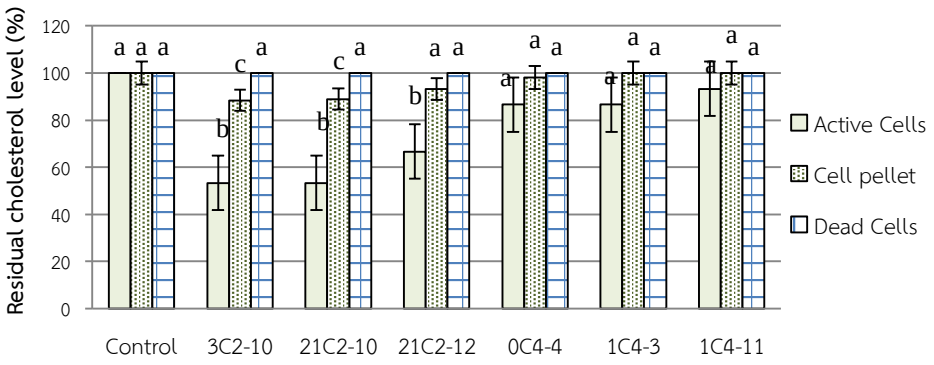
4.1.2 การคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีผลต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในระดับ *in vitro*

จากการทดสอบความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล ในระดับห้องปฏิบัติการในหลอดทดลอง โดยการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณคอเลสเตอรอล ด้วยเครื่อง Automated System ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่า 3 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ คือ 3C2-10 และ 21C2-10 สามารถลดคอเลสเตอรอลลงได้ 24 µg/mL ขณะที่ 21C2-12 สามารถลดคอเลสเตอรอลลงได้ 18 µg/mL ตามลำดับ ($P>0.05$) จะเห็นได้ว่าปริมาณคอเลสเตอรอลจะสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ BSH และค่า pH โดยเซลล์ที่สร้างเอนไซม์ BSH ได้ดีก็จะสามารถลดคอเลสเตอรอลได้ดีเช่นกัน อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3 ตัวอย่าง OC4-4, 1C4-3 และ 1C4-11 ไม่สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ BSH ได้ แต่ยังพบว่าสามารถลดคอเลสเตอรอลได้ คือ 2-6 µg/mL ซึ่งผลของการลดลงของคอเลสเตอรอลนี้น่าจะเป็นผลจากค่า pH ที่ลดลง

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงคอเลสเตอรอล (cholesterol content) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว ที่ระยะเวลาการเจริญ 20 ชั่วโมง

Strain	Cholesterol lowering activity (µg/mL)	pH	BSH activity
Control	0.00 ± 0.00^{a}	5.85 ± 0.05^{d}	-
3C2-10	24.00 ± 5.47^{b}	4.63 ± 0.08^{a}	+
21C2-10	24.00 ± 5.48^{b}	4.58 ± 0.07^{a}	+
21C2-12	18.00 ± 4.47^{b}	4.79 ± 0.02^{b}	+
0C4-4	6.00 ± 5.48^{a}	4.96 ± 0.11^{c}	-
1C4-3	8.00 ± 4.42^{a}	5.05 ± 0.06^{c}	-
1C4-11	2.00 ± 4.40^{a}	4.94 ± 0.04^{c}	-

Different superscript letters are significantly different ($p<0.0.5$), n=5



รูปที่ 4.2 แสดงระดับร้อยละของปริมาณคอเลสเตอรอลที่เหลือ (Residual cholesterol reduction level) ของ เซลล์มีชีวิต (active cells) ตะกอนเซลล์ (cells pellet) และ เซลล์ตาย (dead cells) เมื่อบ่มเป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องซาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.2 พบว่าเซลล์มีชีวิต (active cells) สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ดีกว่า ตะกอนเซลล์ (cells pellet) และ เซลล์ตาย โดยการลดลงของปริมาณคอเลสเตอรอลจะสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย (Liong and Shah, 2005) โดยจะเห็นได้ว่าเซลล์มีชีวิตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท (3C2-10 21C2-10 และ 21C2-12) สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในอาหารเหลวได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase ได้ดี ก็จะแสดงค่าการลดลงของปริมาณคอเลสเตอรอลได้ดีเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase ต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลของ Kumar et al., (2012) คือ จาก *Lactobacillus* ทั้ง 40 strain ที่ทดสอบพบว่า *L. plantarum* strains Lp91 และ Lp2 สามารถสร้างเอนไซม์ BSH ได้สูงที่สุดและยังแสดงค่าการลดลงของปริมาณคอเลสเอตรอลได้สูงสุดที่สุดด้วยเช่นกันคือ 69.30 และ 68.88 µg/mL นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าไอโซเลทที่ไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Bile salt hydrolase คือ 0C4-4, 1C4-3 และ 1C4-11 ก็จะไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคอเลสเตอรอลหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในอาหารเหลว ประมาณ 2-8 µg/mL ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างควบคุม การลดลงของปริมาณคอเลสเตอรอลนี้อาจเนื่องมาจากกรดที่ผลิตจากกระบวนการหมักของกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (ตารางที่ 4.3) จากการศึกษาของ Sirilun et al., (2010) พบว่าช่วงความเป็นกรดด่าง 4.63-5.05 มีผลต่อการตกตะกอนของคอเลสเตอรอล นอกจากนี้คุณสมบัติในการยึดเกาะคอเลสเตอรอลที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อการลดลงของปริมาณคอเลสเตอรอลด้วยเช่นกัน (Kimoto et al., 2002 และ Kumar et al., 2012). Li (2012) และ Lye et al., (2010) ได้อธิบายกลไลในการลดคอเลสเตอรอลของแบคทีเรียแลคติกว่า ในขณะที่เซลล์ของแบคทีเรียมีการเจริญคอเลสเตอรอลสามารถรวมตัวกับ cellular membranes ในส่วนของ phospholipid bilayer ของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ Huey-Shi et al., (2010) ตรวจพบปริมาณคอเลสเตอรอลในทุกส่วนประกอบของ phospholipid bilayer คือ phospholipid tails, upper phospholipids, และ polar heads

นอกจากนี้การหลวมรวมกันของคอเลสเตอรอลและผนังเซลล์แบคทีเรียนั้นส่งผลต่อการเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์แบคทีเรียต่อการแตกสลาย

4.1.3 การระบุชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก

ผลการทดสอบเพื่อระบุชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยระบุจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี จากตารางที่ 4.4 พบว่าคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีความแตกต่างกันเล็กน้อยโดยเฉพาะความสามารถในการใช้น้ำตาล (sugar fermentation) ที่ไม่เหมือนกัน จึงมีแนวโน้มที่แบคทีเรียจะมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และเมื่อระบุสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL และยืนยันผลการระบุสายพันธุ์โดย 16S rRNA gene (ตารางที่ 4.5) พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถระบุสายพันธุ์ ได้ดังนี้ 3C2-10 คือ *Lactobacillus plantarum* strain WG27 (99% similarity), 21C2-10 คือ *L. acidophilus* (99% similarity) และ 21C2-12 คือ *L. fermentum* strain LG1 (99% similarity)

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก

	Strains		
	3C2-10	**21C2-10**	**21C2-12**
Gram stain	G+	G+	G+
Spores formation	-	-	-
Catalase activity	-	-	-
Motility	+	+	+
Facultative anaerobic	+	+	+
Sugar Fermentation			
L-Arabinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
D-Xylose	-	+	+
Galactose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	+	+	-
Cellobiose	+	+	-
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Saacharose	+	+	+
Trehalose	+	+	-
Raffinose	+	+	-

-, negative ; +, positive

ตารางที่ 4.5 แสดงการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทีคัดเลือกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL และการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนของ 16S rRNA gene

Strains	Identification with API 50 CHL		Identification based on 16S rRNA gene		
	Identification	% identity	Identification	% similarity	NCBI Accession no.
3C2-10	*L. plantarum*	99.9	*L. plantarum* strain WG27	99	K5779104
21C2-10	*L. pentosus*	93.9	*L. acidophilus*	99	JQ350808
21C2-12	*L. brevis*	99.4	*L. fermentum* strain LG1	99	KC348395

ฉ. ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค (antagonistic)

ทดสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ของแบคทีเรียที่คัดเลือก 3 สายพันธุ์ (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค ดังนี้ *Enterobacter aerogenes* bcc6719, *Bacillus subtilis* TISTR008, *Escherichia coli* TISTR3436, *Bacillus cereus* TISTR687, *Pseudomonus aeruginosa* TISTR781 และ *Staphylcoccus aureus* TISTR1466 จากผลการทดลองตารางที่ 4.6 พบว่า 3C21-10 แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ในขณะที่ 21C2-10 และ 21C2-12 แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *Bacillus subtilis* TISTR008 เท่านั้น

ตารางที่ 4.6 แสดงกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion

Strains	Antagonistic activity		
	3C2-10	21C2-10	21C2-12
Gram negative			
Enterobacter aerogenes bcc6719	+	-	-
Escherichia coli TISTR3436	+	-	-
Pseudomonus aeruginosa TISTR781	+	-	-
Gram positive			
Bacillus subtilis TISTR008	+	+	+
Bacillus cereus TISTR687	+	-	-
Staphyloccus aureus TISTR1466	+	-	-

-, no inhibition ; +, inhibition ; TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technological Research.

ช. ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

นำแบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือกได้ ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง บนอาหาร Blood agar สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) พบว่าทุกไอโซเลทให้ผลลบ คือไม่พบบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี แสดงว่าไม่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทั้งที่เป็น Beta hemolysis, Alpha hemolysis และ Gramma hemolysis ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้ร่วมกับอาหารของมนุษย์ได้

ซ. ทดสอบคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ (Cell surface hydrophobicity : MATH)

การศึกษาคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้โดยทดสอบความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว เพื่อตรวจสอบความสามารถในการเกาะติดลำไส้ของแบคทีเรีย การเกาะติดของแบคทีเรียอาจเกิดจาก อันตรกิริยาจำเพาะและไม่จำเพาะ (specific and nonspecific interactions) เช่น ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งการเกาะติดโดยอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ สามารถทดสอบได้โดยการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารไฮโดรคาร์บอน จากผลการทดสอบพบแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี MATH โดยใช้ Hexadecane และ Iso-octane ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกัน คือ 21C2-10 แสดงค่าร้อยละ Cell surface hydrophobicity สูงที่สุด เมื่อทดสอบด้วย Hexadecane และ Iso-octane คือ 92.62 และ 76.14% ตามลำดับ ในขณะที่ 3C2-10 แสดงค่าร้อยละ Cell surface hydrophobicity เมื่อทดสอบด้วย Hexadecane และ Iso-octane น้อยที่สุด คือ 58.34 และ 46.16% ตามลำดับ โดยผลการทดสอบอยู่ในช่วง 48.27-92.62 % ดังนั้น ค่า hydrophobicity จัดอยู่ในระดับปานกลางถึงมาก ในการทดลองนี้ *L. plantalum* strain 1465 เป็นเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *L. plantalum* strain 1465 ถูกนำมาใช้เป็น positive control เพื่ออ้างอิงในการเปรียบเทียบคุณสมบัติการเกาะติด จากผลการทดลองจะพบว่า ถึงแม้ 3C2-10 จะแสดงค่าร้อยละ Cell surface hydrophobicity น้อยที่สุดแต่ก็ไม่แตกต่างทางสถิติกับ *L. plantalum* strain 1465 ดังนั้น แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ทดสอบด้วยวิธี MATH มีแนวโน้มที่จะมีคุณสมบัติเกาะติดได้ดี จากการศึกษาของ Duary et al. (2011) พบว่าการทดสอบความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยวิธี MATH ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการทดสอบด้วย Caco-2 และ HT-29 Cell lines โดย %Hydrophobicity อยู่ในช่วง 27.16-35.73 เมื่อวิเคราะห์ด้วย n-Hexadecane ให้ผล % Adhesion อยู่ในช่วง 8-12% เมื่อทดสอบด้วย Caco-2 และ HT-29 cell lines

ยืนยันผลการเกาะติดด้วย การทดสอบการยึดเกาะเซลล์ด้วย Caco-2 cell lines (ตารางที่ 4.7) พบว่า ไอโซเลท 21C2-10 และ 21C2-12 แสดงค่าการยึดเกาะคือ 13.23$\pm$1.08 % และ 8.78$\pm$0.90 % ตามลำดับ ขณะที่ 3C2-10 (5.14$\pm$0.35%) แสดงค่าการยึดเกาะไม่แตกต่างทางสถิติ กับ แบคทีเรียโพรไบโอติกทางการค้า *L. plantalum* strain 1465 (3.94$\pm$0.88%) ดังนั้นจากผลการทดสอบ Cell sucface hydrophobicity ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยวิธี MATH และ Caco 2 cell lines ให้ผลสอดคล้องกัน

และแสดงให้เห็นว่า 3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12 มีแนวโน้มที่จะมีคุณสมบัติในการเกาะติดกับผนังลำไส้มนุษย์ได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของแบคทีเรียโพรไบโอติก

ตารางที่ 4.7 แสดง Cell sucface hydrophobicity (%) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยวิธี MATH และ Caco 2 cell lines

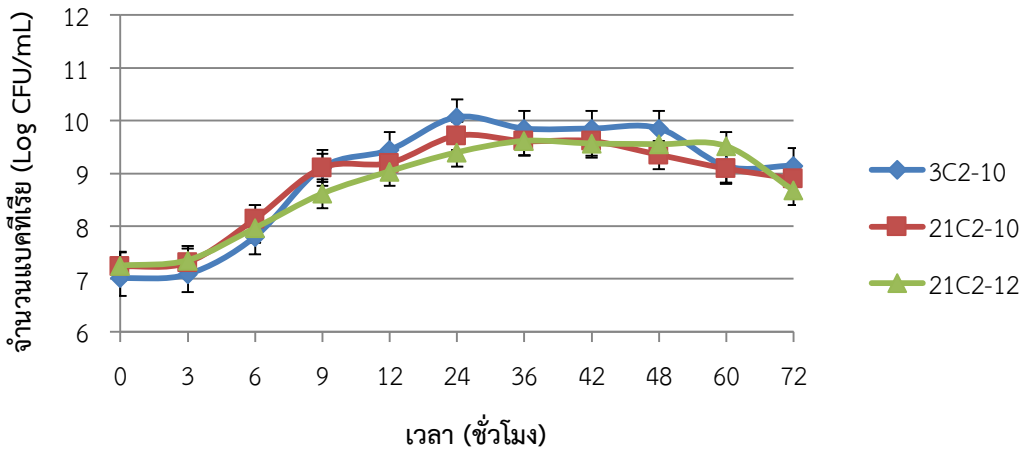
Strains	Cells surface hydrophobicity (%)		Cells Adhesion score
	Hexadecane	Iso-octane	(%)
3C2-10	58.34±2.60[a]	46.16±1.37[a]	5.14±0.35[a]
21C2-10	92.62±2.83[c]	76.14±1.93[c]	13.23±1.08[c]
21C2-12	87.40±1.04[b]	65.65±1.73[b]	8.78±0.90[b]
L.plantalum strain 1465 (commercial strain)	56.22±2.39[a]	48.27±2.70[a]	3.94±0.88[a]

Row with superscript different letters are significantly different ($p<0.05$), n=3

4.1.4 ศึกษาปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกได้

ก. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (Growth curve)

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ 3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12 พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลทมีอัตราการเจริญในลักษณะเดียวกัน เมื่อบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่ 37 ^{o}C ดังรูปที่ 4.3 โดยจะเห็นว่าที่ช่วงเวลา 0-3 ชั่วโมงแบคทีเรียมีการเจริญคงที่และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจาก 3 ชั่วโมง (3-24 ชั่วโมง) มีอัตราการเจริญสูงที่สุดที่ช่วงเวลาประมาณ 20-24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่อีกครั้งที่ช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง และหลังจาก 48-72 ชั่วโมง อัตราการเจริญมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากอาหารไม่เพียงพอต่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ขณะที่แบคทีเรียแลคติกเจริญจะผลิตกรดออกมาทำให้เกิดสภาวะกรดเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญของเซลล์แบคทีเรียจึงมีผลทำให้เซลล์ตายและลดจำนวนลง

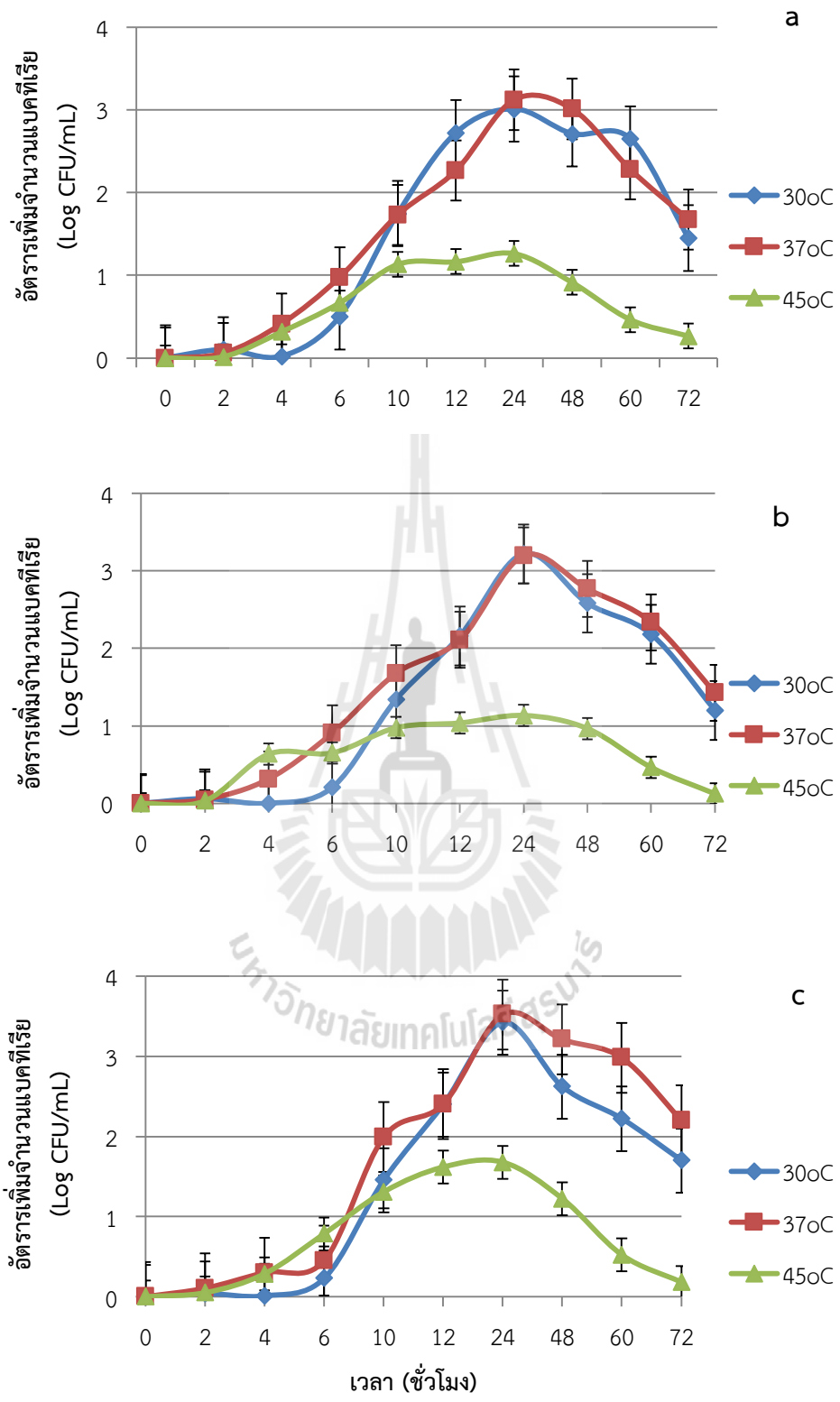


รูปที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) ที่ระยะต่างๆ เมื่อบ่มให้เจริญในอาหารเหลว MRS ในสภาวะไร้อากาศ ที่ 37 °C

ข. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

(1) อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 °C ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.4 พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณการเจริญที่ใกล้เคียงกันในช่วงอุณหภูมิ 30 และ 37 °C การเจริญสูงที่สุดในช่วงระยะเวลาการบ่ม 20-24 ชั่วโมง มีอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์ประมาณ 3 Log CFU/mL) ในขณะที่ อุณหภูมิ 45 °C มีอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์สุงสุดประมาณ 1.26 Log CFU/mL ทั้ง 3 ไอโซเลทมีอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 45 °C ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 °C ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียทั่วไปจะสามารถเจริญได้ดีในช่วง 25-40 °C ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ Coeurel et al (2004) พบว่า *L. acidophilus*, *L. casei L. rhamnosus* และ *L. zeae* สามารถเจริญและผลิตกรด acetic, formic และ succinic ได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และการเจริญและการผลิตกรดจะลดลงที่อุณหภูมิ 45 °C



รูปที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 °C ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS a) 3C2-10, b) 21C2-10 และ c) 21C2-12

ค ปัจจัยด้านสารอาหาร

(1) ศึกษาชนิดที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

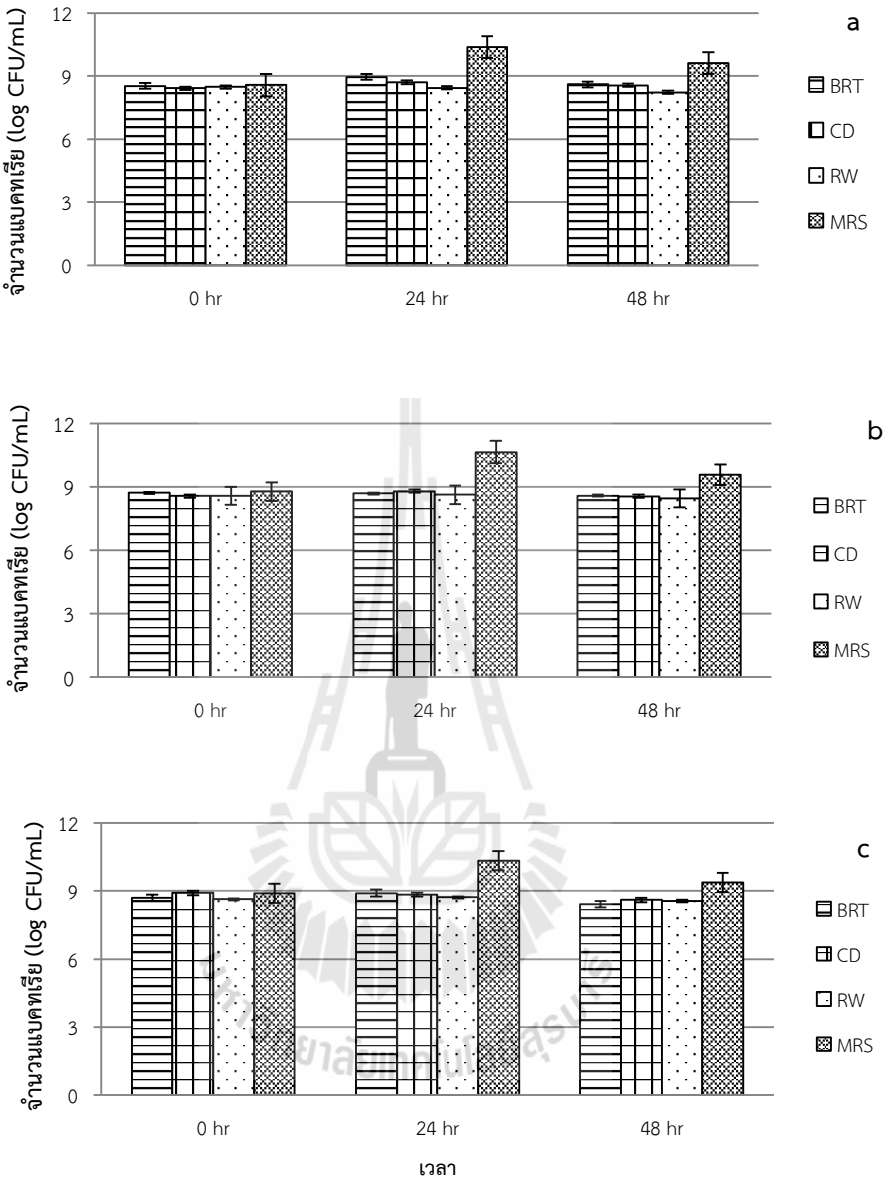
องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังและสารสกัดธัญพืชแสดงได้ดังตารางที่ 4.8 จากผลการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) ของกากมันสำปะหลัง ข้าวกล้อง รำข้าว และ MRS มีค่าสูงกว่าปริมาณ reducing sugar ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสัมพันธ์กับปริมาณของน้ำตาลซูโคสและปริมาณ oligosaccharides (Charalampopoulos et al., 2002) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากข้าวกล้องมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่ากากมันสำปะหลัง และ รำข้าว ในขณะที่ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในรำข้าวมีปริมาณสูงที่สุด อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามตารางที่ 4.8 จะเห็นได้ว่า กากมันสำปะหลัง ข้าวกล้อง และ รำข้าว มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในการนำไปใช้ในการเจริญของแบคทีเรียน้อยกว่าอาหาร MRS ซึ่งอาจจะส่งผลต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่ทดสอบ

ตารางที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังและสารสกัดธัญพืช

	MRS	กากมันสำปะหลัง	ข้าวกล้อง	รำข้าว
pH	5.85 ± 0.06^{a}	6.75 ± 0.16^{a}	6.54 ± 0.09^{a}	6.59 ± 0.13^{a}
Total sugars (ug/mL)	1191.35 ± 0.28^{a}	42.82 ± 0.17^{c}	103.45 ± 0.22^{b}	14.72 ± 0.15^{d}
Reducing sugars (ug/mL)	18.40 ± 0.18^{a}	5.36 ± 0.07^{c}	8.96 ± 0.13^{b}	2.46 ± 0.06^{d}
Free amino nitrogen (mg/L)	64.77 ± 2.25^{a}	2.10 ± 0.05^{d}	6.09 ± 0.03^{c}	11.71 ± 0.13^{b}

Row with superscript different letters are significantly different ($p<0.05$), n=3

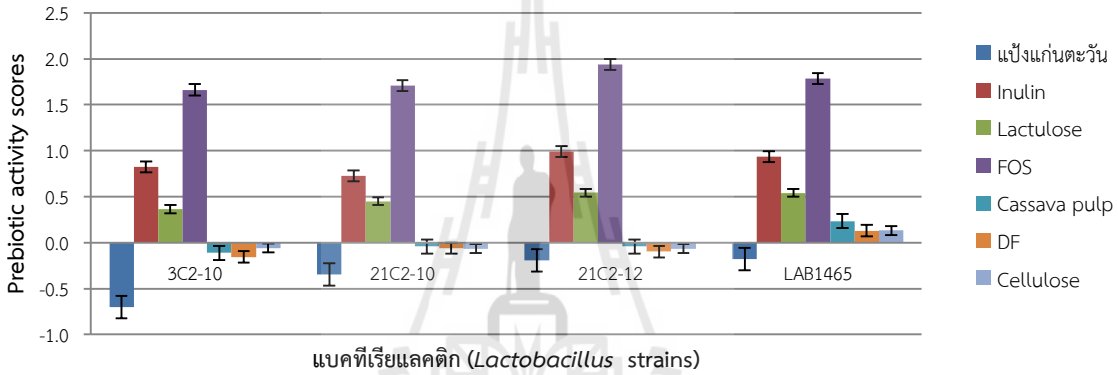
เมื่อทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ในอาหารที่เติม กากมันสำปะหลัง ข้าวกล้อง และ รำข้าว เปรียบเทียบกับ อาหารเหลว MRS บ่มให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามผลการเจริญที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงได้ดังรูปที่ 4.5 จากผลการทดสอบพบว่ากากมันสำปะหลัง และสารสกัดธัญพืช (ข้าวกล้อง และรำข้าว) ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของปริมาณเซลล์แบคทีเรียภายในระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าจำนวนของแบคทีเรียมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* strains ในสารสกัดกากมันสำปะหลัง และสารสกัดธัญพืช (BRT: brown rice, CD: cassava pulp และ RW: rice bran), a) 3C2-10, b) 21C2-10 และ **c**) 21C2-12**.** ค่าเฉลี่ย n=5

(2) ทดสอบผลของ Oligosaccharide ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือก (Prebiotic scores)

ทำการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือก (3C2-10, 21C2-10, 21C2-12 และ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียโพรไบโอติกทางการค้า *L. plantarum* LAB 1465) ใน prebiotic ชนิดต่างๆ คือ inulin, Lactulose, fructooligosaccharide (FOS), Cellulose, DF (dietary fiber), กากมันสำปะหลัง และ แป้งแก่นตะวัน จากผลการทดสอบพบว่า 3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12 สามารถเจริญได้ใน inulin Lactulose และ FOS แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน กากมันสำปะหลัง DF และ cellulose ขณะที่ แบคทีเรียโพรไบโอติกทางการค้า *L. plantarum* LAB 1465 สามารถเจริญได้ในทุกชนิดของ probiotic ที่ทดสอบ ยกเว้นแป้งแก่นตะวัน ทั้งนี้เนื่องมาจากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียแลคติกได้แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงค่า Prebiotic score ของ *Lactobacillus* strains (3C2-10, 21C2-10, 21C2-12 และ *Lactobacillus plantarum* LAB 1465).

4.1.5 การศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อที่คัดเลือกในระบบทางเดินอาหารจำลอง

ก. ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะจำลองของไอโซเลทที่คัดเลือก

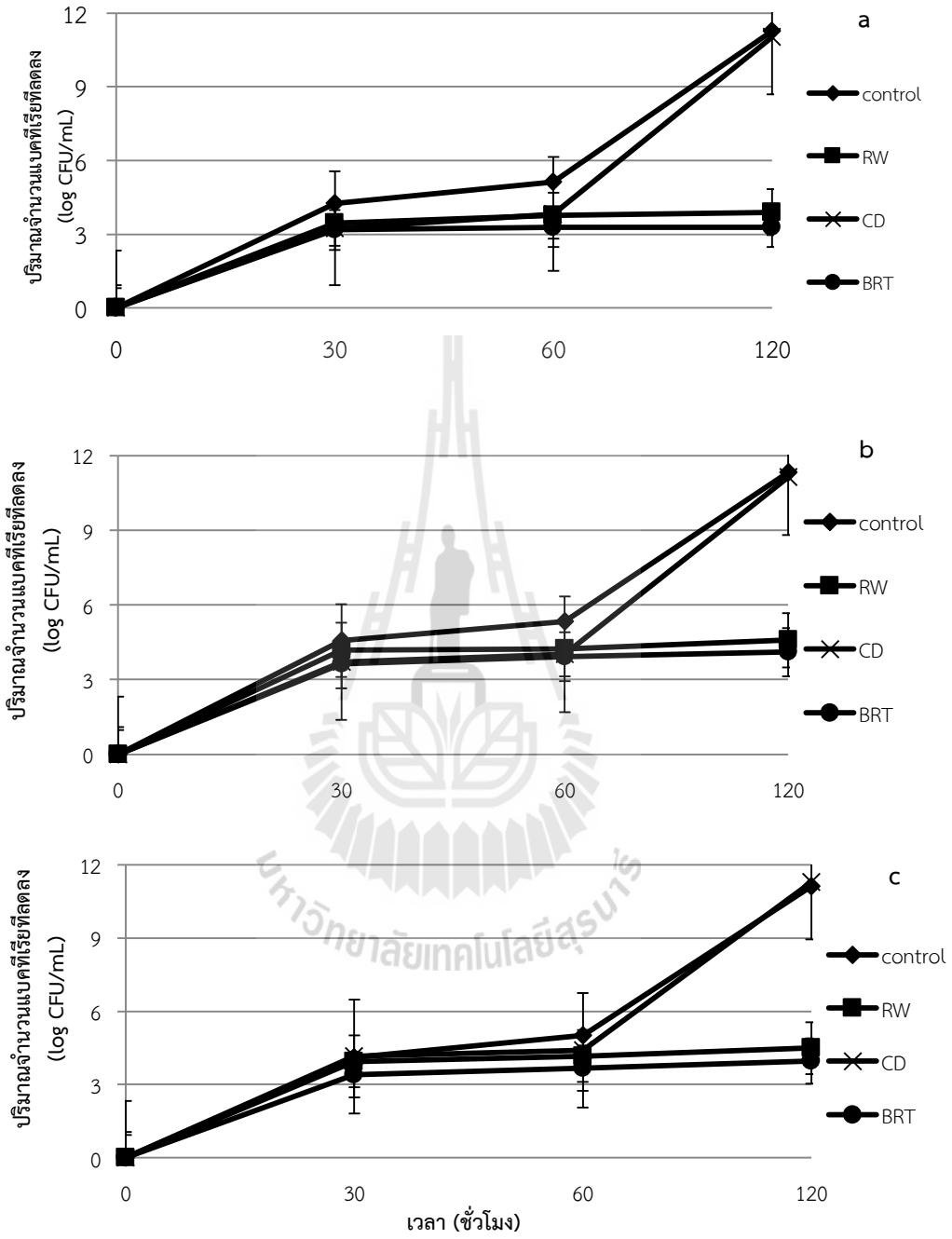
จากการศึกษาผลของสารสกัดจากกากมันสำปะหลังและธัญพืชต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะกระเพาะจำลอง ที่มีค่า pH 2 ภายในระยะเวลา 120 นาที ดังรูปที่ 4.7 พบว่า ปริมาณเซลล์ของ *Lactobacillus* strains (3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12) ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ไม่มีการเติมสารสกัดกากมันสำปะหลังและธัญพืช (ตัวอย่างควบคุม) มีปริมาณเซลล์ลดลง 4, 5 และ 11 log CFU/mL ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 120 นาที ตามลำดับ และปริมาณเซลล์ที่ลดลงของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลทเมื่อเติมสารสกัดกากมันสำปะหลังให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) ที่ระยะเวลา 120 นาที ที่ระยะเวลาการบ่มที่ 30 และ 60 นาที ในสภาวะกระเพาะจำลอง สารสกัดกากมันสำปะหลังและธัญพืช พบปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง

ควบคุม และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มในกระเพาะจำลองเป็น 120 นาที พบว่า สารสกัดจากข้าวกล้องและรำข้าวมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากข้าวกล้องและรำข้าวสามารถปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียในสภาวะกระเพาะจำลองได้ตลอดระยะเวลาการบ่ม 120 นาที โดยทั่วไปคุณสมบัติของโพรไบโอติกควรจะต้องสามารถผ่านกระเพาะที่มีช่วง pH 2-3 ได้ เพื่อให้มีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียเหลือรอดมากที่สุดก่อนไปถึงลำไส้เล็ก (Nase et al., 2001) ดังนั้น สารสกัดกากมันสำปะหลังและธัญพืชสามารถช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสภาวะความเป็นกรดสูงและผ่านไปถึงลำไส้เล็กได้ โดยปกติระยะเวลาในการไหลผ่านกระเพาะกรณีที่เป็นอาหารแข็งจะใช้เวลา 90-120 นาที ส่วนอาหารเหลวจะใช้เวลา 60 นาที (Kong and Singh, 2008) ดังนั้นโพรไบโอติกที่ดีควรจะต้องสามารถอยู่รอดในสภาะ pH 2-3 ได้นานอย่างน้อย 120 นาที

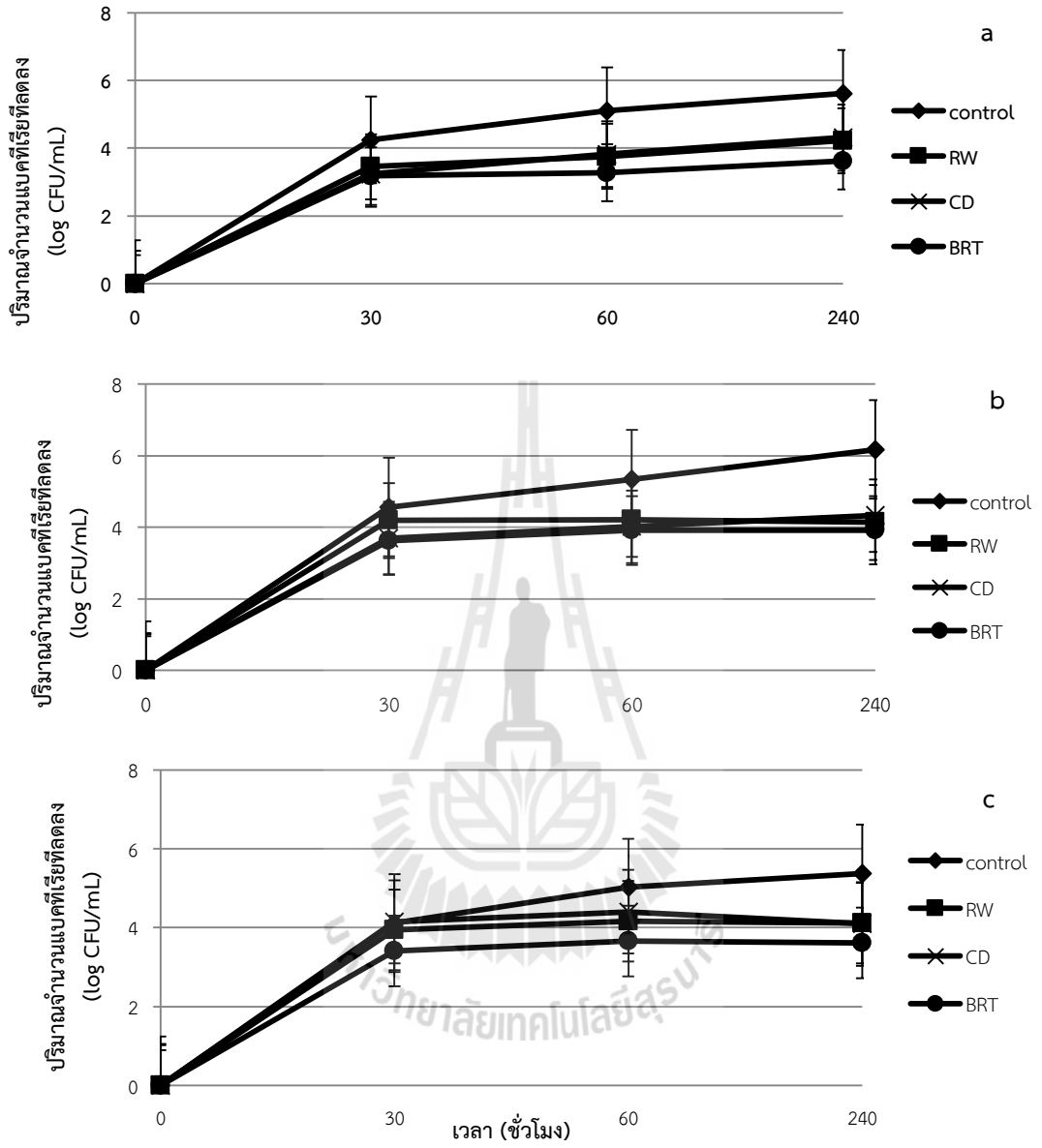
ข. ทดสอบการรอดชีวิตในระบบกระเพาะและลำไส้จำลองของไอโซเลทที่คัดเลือก

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากกากมันสำปะหลังและธัญพืชต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติก ในสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลอง เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ (ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัด) พบว่า ภายหลังจากการบ่มในสภาวะกระเพาะจำลอง (pH 2) นาน 30 นาที และบ่มต่อเนื่องในสภาวะลำไส้จำลอง นาน 60 และ 240 นาที (pH 7.4) ดังรูปที่ 4.8

เซลล์อิสระที่ไม่มีการเติมสารสกัดกากมันสำปะหลังและธัญพืช พบปริมาณเซลล์ลดลง 4 log CFU /mL เมื่อบ่มในสภาวะกระเพาะจำลอง 30 นาที และเมื่อบ่มต่อเนื่องในสภาวะลำไส้จำลองนาน 240 นาที พบการลดลงของเซลล์ 6 log CFU/mL ขณะที่ เซลล์ที่เติมสารสกัดจากกากมันสำปะหลังและธัญพืชสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติดที่ทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลทได้ โดยสังเกตได้จากผลการลดลงของปริมาณเซลล์ภายหลังการบ่มในสภาวะลำไส้จำลองนาน 240 นาที เพียง 3.62-4.33 log CFU/mL และไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกสารสกัดที่ทำการทดสอบ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบสารสกัดจากข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีต่อการเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียในระบบสภาวะทางเดินอาหารจำลอง (Charalampopoulos et al., 2003; Michida et al., 2006). โดยปกติจุลินทรีย์จะถูกยับยั้งการเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำ จึงส่งผลต่อการลดลงของปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเมื่อผ่านเข้าไปยังระบบทางเดินทางอาหาร (McDonald et al., 1990; Charalampopoulos et al., 2002) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า สารสกัดจากธัชพืชที่มีส่วนประกอบของ water-soluble fibers, oligosaccharides และ resistant starch จะช่วยทำหน้าที่ในการรักษาสภาพกรดเบสได้ดี (buffering capacity) (Blaiotta et al., 2013).



รูปที่ 4.7 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียแลคติกในสารสกัดจากกากมันสำปะหลังและธัญพืชต่อการทนในสภาวะกระเพาะจำลอง (pH 2) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา นาน 120 นาที (rice bran; RW, cassava pulp; CD และ brown rice; BRT) ของ *Lactobacillus* strains a) 3C2-10, b) 21C2-10 และ c) 21C2-12. ค่าเฉลี่ย n=5



รูปที่ 4.8 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียแลคติกในสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง และ ธัญพืช ต่อการทนในสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลอง เมื่อบ่มต่อเนื่องเป็นระยะเวลา นาน 240 นาที (rice bran; RW, cassava pulp; CD และ brown rice; BRT) ของ *Lactobacillus* strains a) 3C2-10, b) 21C2-10 และ c) 21C2-12. ค่าเฉลี่ย n=5

บทที่ 5
บทสรุป

จากผลการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการช่วยลดคอเลสเตอรอลจากกากมันสำปะหลัง ที่ระยะเวลาการหมัก 0-28 วัน สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจาก 390 ไอโซเลท ได้ 38 ไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี และสามารถทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้สูงสุดร้อยละ 0.50 โดยสามารถเจริญได้ในช่วง pH 2-9. จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแนวโน้วในการช่วยลดคอเลสเตอรอลได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ 3C2-10, 21C2-10 และ 21C2-12 โดยสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในอาหารเหลวที่ทดสอบได้ 18-24 µg/mL และระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้คือ *L.plantarum, L. acidophilus* และ *L. fermentum* ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกากมันสำปะหลังและธัญพืช (ข้าวกล้องและรำข้าว) สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ทดสอบในสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

ชัยวัฒน์ ไชยสุต 2554 หนังสือ โพรไบโอติก จุลินทรีย์เพื่อชีวิต สำนักพิมพ์ นวัตกรรมสุขภาพ บริษัท อินฟินิตี้ คัลเลอร์ พริ้นติ้ง จำกัด

วราพันธุ์ จินตณวิชญ์ และคณะ. 2549. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ในระหว่างการหมักกากมันสำปะหลัง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาสัตว์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์ หน้า 131-137.

Agati, V.J.P et al. 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. Journal of Applied Microbiology .85 pp. 512–20.

Begley, M., Hill, C., and Gahan, C. G. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Applied and environmental microbiology, 72(3): 1729-1738.

Blaiotta, G., et al. 2013. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. Food Microbiology, 36(2): 161-169.

Brink, M., Todorov, S. D., Martin, J. H., Senekal, M., and Dicks, L. M. T. 2006. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. Journal of Applied Microbiology, 100(4): 813-820.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S., and Webb, C. 2002. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. Journal of Applied Microbiology, 92(5): 851-859.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S., andWebb, C. 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. International Journal of Food Microbiology, 82(2): 133-141.

Chuang, L. et al. 2007. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell treated T cells. Journal Agricultural and Food Chemistry. 55 pp. 11080-11086.

Corzo, G., Gilliland, S.E. 1999. Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. Journal Dairy Science. 82: 466-471.

Coulin, P., Farah, Z., Assanvo, J., Spillmann, H., andPuhan, Z. 2006. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. International Journal of Food Microbiology, 106(2): 131-136.

De Man, J. C., Rogosa, M., andSharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, 23(1): 130-135.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richte,r B., Fensalau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J. 2001. Probiotics compensation for lactase insufficiency. American journal clinical nutrition. 73: 421S - 429S.

Du Toit, M., et al. 1998. Characterisation and selection of probiotic Lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. International Journal of Food Microbiology, 40(1-2): 93-104.

Duangjitcharoen Y, Kantachote D, Ongsakul M,Poosaran N, Chaiyasut C. 2009. Potential use of probiotic Lactobacillus plantarum SS2 isolated from a fermented plant beverage: safety assessment and persistence in the murine gastrointestinal tract. World Journal of Microbiology Biotechnology. 25: 315 – 321

Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., and Grover, S. 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic Lactobacilli to human colonic epithelial cells. Indian Journal of Medical Research, 134(5): 664-671.

Dune, C. et al. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. American journal clinical nutrition. 73 pp 386S-392S.

Ezendam, J. and van, L.H. 2006. Probiotics: Immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. Nutrition Reviews. 64(1): 1 - 14

FAO. (2015). Food outlook October 2015. from Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66 (5), pp 365–378.

Gilliland, S. E., Nelson, C. R., and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 49(2): 377-381.

Gopal, R. et al., 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. Biotechnology Advances. 26 pp 22-24

Guerin - Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C, Szylit O, Andrieux C. 1998. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. American journal clinical nutrition. 67:111-117.

Herich, R., Levkut, M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Journal of Veterinary Medical Science. 47: 169 - 180.

Heyman M. 2000. Effect of lactic acid bacteria on diarrhea diseases. Journal of the

American college of nutrition. 19: 137S - 146S.

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

Holzapfer, W.H. et al. 2002. Introduction to pre and probiotics. Food Research International. 35. pp 109-116.

Huey-Shi, L., Rahmat-Ali, G. R., andLiong, M. T. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by Lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal, 20(3): 169-175.

Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. Pediatrics. 88:90 - 97.

Jintanawit, W., Juttupornpong, S., Markranit, R., Srimongcholngam, S., and Viwatwongwana, N. 2006. A study of changing of population of lactic acid bacteria and yeast during ensilaging of cassava pul. 44th Kasetsart University Annual Conference., Kasetsart, Thailand.

Kaplinsky, R., Terheggen, A., andTijaja, J. 2011. China as a Final Market: The Gabon Timber and Thai Cassava Value Chains. World Development, 39(7): 1177-1190.

Kimoto, H., Ohmomo, S., andOkamoto, T. 2002. Cholesterol removal from media by Lactococci. Journal of Dairy Science 85(12): 3182-3188.

Kirjavainen, P.V. et al. 1999. New aspects of probiotics a novel approach in the management of food allergy. Allergy. 54. pp 909-915.

Koebnick, C. et al. 2003. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei*Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. 17 pp 655-659.

Knarreborg, A., Engberg, R.M., Jensen, S.K., Jensen, B.B. 2002 Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. Applied and Environmental Microbiology. 68: 6425 - 6428.

Kong, F., and Singh, R. P. 2008. Disintegration of solid foods in human stomach. Journal of Food science, 73(5): 67-80.

Kumar, R., Grover, S., andBatish, V. K. 2012. Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity Screening of Lactobacilli: *In vitro* Selection of Indigenous *Lactobacillus* Strains with Potential Bile Salt Hydrolysing and Cholesterol-Lowering Ability. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 4(3): 162-172.

Kurdi, P., and Hansawasdi, C. 2015. Assessment of the prebiotic potential of oligosaccharide mixtures from rice bran and cassava pulp. LWT - Food Science and Technology, 63(2): 1288-1293.

Lee, Y.K. et al.1999. Handbook of probiotics. New York. John Wiley & Sons, Inc.

Li, G. 2012. Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol. Procedia Environmental Sciences, 12, Part B: 1180-1186.

Lim, H. J., Kim, S. Y., andLee, W. K. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. Journal of Veterinary Science and Medicine, 5(4): 391-395.

Liong, M. T., and Shah, N. P. 2005. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. International Dairy Journal, 15(4): 391-398.

Lye, H.-S., Rahmat-Ali, G. R., andLiong, M.-T. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by Lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal, 20(3): 169-175.

Massi, M., Vitali, B., Federici, F., Matteuzzi, D., and Brigidi, P. 2004. Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina. Journal of Applied Microbiology, 96(4): 777-786.

McDonald, L. C., Fleming, H. P., andHassan, H. M. 1990. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology, 56(7): 2120-2124.

Maeda, N. et al. 2009. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. IntImmunopharm. 9 pp 1122-1125.

Michida, H., et al. 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochemical Engineering Journal, 28(1): 73-78.

Mogensen, G et al. 2002. Microorganisms with a documented history of use in food. Brussels: Int. Dairy Federation.

Morelli, L. et al. 2000. In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal. Curr Issues Intest Microbiol. 1 pp 59-67.

Nan, L.et al. 2009. Live and Heat-Killed Lactobacillus rhamnosus GG: Effects on Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines/Chemokines in Gastrostomy-Fed Infant Rats. 66 pp 203-207.

Nase, L., et al. 2001. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Research, 35(6): 412-420.

Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., and Lee, M. S. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. International Journal of Food Microbiology, 113(3): 358-361.

Nwankwo, D. et al 1989. Cassava fermenting organisms. MIRCEN J 5 pp 169– 79.

Ogata, T. et al. 1997.Effect of *Bifidobacteriumlongum* BB536 Administration on the IntestinalEnvironment, Defecation Frequency and Fecal Characteristics of Human Volunteers.BiosciMicroflora. 16. 53-58.

OAE. (2015). The cassava utilization in Thailand (Online). from Office of Agricultural Economics. Available http://www.oae.go.th/oae_report /export_import/export.php

O'Flaherty, S., and Klaenhammer, T. R. 2010. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. International Dairy Journal, 20(4): 262-268.

Ogata, T. et al. 1997. Effect of *Bifidobacteriumlongum* BB536 Administration on the IntestinalEnvironment, Defecation Frequency and Fecal Characteristics of Human Volunteers. BiosciMicroflora. 16. 53-58.

Olympia, M. et al. 1995. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "BurongIsda," and its amylolytic enzyme. Journal of Fermentation and Bioengineering. 80 pp 124– 30.

Ouwehand, A.C. et al. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. International Dairy Journal. 9. pp 43-52.

Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim SH, Whang KY. 2007. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. Journal of Microbiology and Biotechnology. 17: 655 - 662.

Parvez S, Kim HY, Lee HC, Kim DS. 2006. Bile salt hydrolase and cholesterol removal effect by *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976. World Journa Microbiology and Biotechnology. 22: 455 - 459

Pereira DI, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Applied and Environmental Microbiology. 2002; 68: 4689 - 4693.

Prisciandaro, L. et al. 2009. Probiotics and their derivatives as treatment for inflammatory bowel disease. Clinical Review. 15. Pp 1906-1914.

Psomas, E et al., 2001. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. Journal of Food Microbiology Vol. 69 (1-2) pp 125-133

Román, G. C. 2016. Chapter 17 - Cassava and Cyanide: Thursday, May 20, 1993 *Cuban Blindness*(pp. 115-124. San Diego: Academic Press.

Saarela, M. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology. 84 pp197-215.

Sanni, A. et al. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. International Journal of Food Microbiology.72 pp. 53– 62.

Sharma, A., and Trivedi, S. 2015. Evaluation of *in vitro* probiotic potential of phytase-producing bacterial strain as a new probiotic candidate. International Journal of Food Science & Technology, 50(2): 507-514.

Shigaki, T. (2016). Cassava: The Nature and Uses *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 687-693). Oxford: Academic Press.

Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D., andLuxananil, P. 2010. Characterization of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. African Journal of Microbiology Research, 4(10): 994-1000.

Tambekar, D. H., and Bhutada, S. A. 2010. Acid and bile tolerance, antibacterial activity, antibiotic resistance and bacteriocins activity of probiotic *Lactobacillus* species. Recent Research in Science and Technology. , 2(4): 94-98.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., Mierau, I. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. Journal of Dairy Science. 82: 2530 - 2535.

Tran, T., et al. 2015. A comparison of energy use, water use and carbon footprint of cassava starch production in Thailand, Vietnam and Colombia. Resources, Conservation and Recycling, 100: 31-40.

Vasiljevic, T. et al. 2008. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal. 18 pp 714-728.

Zubillaga, M. et al. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutrition Research. 21 pp 569-579.

ภาคผนวก ก

สารละลายและสีย้อม

1. Crystal violet (Gram stain)

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

2. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide (30%)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

3. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

4. Safranin (Gram stain)

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

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

5. PUM buffer

K_2HPO_4	22.2	กรัม
KH_2PO_4	7.26	กรัม
Urea	1.8	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น (ปรับปริมาตรให้ครบ)	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

6. Pepsin solution (SGJ-Simulated gastric juice)

Pepsin A from porcine stomach	0.3	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

mucosa P-7000 (0.2% NaCl)

NaCl (0.2%)	1000.0	มิลลิลิตร

ละลาย Pepsin A ใน 0.2%NaCl ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 กรัม/ลิตร

pH 2.0 $\pm$ 0.2

7. Pancreatin solution (SIJ-Simulated intestinal juice)

Pancreatin	8.0	กรัม
Bile salts	36.0	กรัม
Phosphate buffer (0.02 M)	1000.0	มิลลิลิตร

(ปรับปริมาตรให้ครบ)

pH 7.4 $\pm$ 0.2

8. Alcohol (95%)

Ethanol	95.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เป็นส่วนประกอบให้เข้ากัน

9. Turbidity standard

1% Barium chloride

1% Sulfuric acid

เตรียม McFarland nephelometer scale ดังนี้

McFarland tube no.	Sulfuric acid 1% aqueous solution (มิลลิลิตร)	Barium chloride 1% aqueous solution (มิลลิลิตร)	Corresponding density of bacteria (10^6)
1	9.9	0.1	300
5	9.5	0.5	1500

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Blood agar (Atlas and Parks, 1997)

Sodium chloride	5.00	กรัม
Pancreatic digest of casein	14.00	กรัม
Peptone	4.50	กรัม
Yeast extract	4.50	กรัม
Agar	12.50	กรัม
Sheep blood defibrinated	70.00	มิลลิลิตร

pH 6.0 $\pm$ 0.2

2. MRS broth

MRS broth เป็นอาหารสำเร็จ จากบริษัท Himedia (HIMEDIA LABORATORIES. PVT. LTD., India) ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. MRS agar

เตรียมได้จาก MRS broth ที่เติม Agar 15.0 กรัมต่อลิตร หลอมให้ Agar ละลายด้วยความร้อน ทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. MRS-medium

Proteose peptone	10.00	กรัม
Beef extract	10.00	กรัม
Yeast extract	5.00	กรัม
Dextrose หรือ Glucose	20.00	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.00	กรัม
Tween-80	1.00	มิลลิลิตร
di-Ammonium hydrogen citrate	2.00	กรัม
Sodium acetate	5.00	กรัม
Magnesium sulphate	0.20	กรัม
Manganese sulphate	0.04	กรัม
Agar	15.00	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.00	มิลลิลิตร

pH 5.7$\pm$0.2

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. Nutrient agar

Beef extract	1.5	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรืออาหารสำเร็จ Himedia (HIMEDIA LABORATORIES. PVT. LTD., India)

6. Plate count agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0$\pm$0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หรืออาหารสำเร็จ Himedia (HIMEDIA LABORATORIES. PVT. LTD., India)

7. Motility medium

Tryptose	10.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0$\pm$0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หรืออาหารสำเร็จ Himedia (HIMEDIA LABORATORIES. PVT. LTD., India)

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ ผศ. ดร. รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์
Asst. Prof. Dr. Ratchadaporn Oonsivilai

2. ที่อยู่ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422 - 4232 โทรสาร 0-4422 – 4387
Email address: roonsivi@sut.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาล)
สถาบัน คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีที่สำเร็จ 2530

ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
สถาบัน Dalhousie University, DalTech, Canada
ปีที่สำเร็จ 2543
หัวข้อวิทยานิพนธ์: “The Effect of Beta-Glucan Polymers on the Rheological and Filtration Properties of Wort”
แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนผู้ช่วยวิจัย NSERC Canada

ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สถาบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีที่สำเร็จ 2549
หัวข้อวิทยานิพนธ์ : “ Neutraceutical and Functional Properties of *Thunberga Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) Extract”
แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนพัฒนาอาจารย์ทบวงมหาวิทยาลัย

4. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ประสบการณ์การทำงาน

Jan 2007 – Present : Lecturer, Department of Food Technology Institute of Agricultural Technology Suranaree University Nakhon Ratchasima, Thailand
Jan.2002 - Dec 2006 : Ph. D. candidate, Suranaree University of Technology
Oct 2000 - Dec.2001 : Lecturer Department of Food Technology Institute of Agricultural Technology Suranaree university Nakhon Ratchasima, Thailand
Sept.1997 – Oct. 2000: Research Assistant Department of Food Science and Technology Dalhousie University DalTech Halifax, Nova Scotia, Canada
Oct. 1993 - Aug.1997 : Register Nurse, University Infirmary Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima Thailand

May.1987 - Sept.1993 : Register Nurse Intensive Care Unit, Srinakarin Hospital, Khonkaen University Khonkaen, Thailand

6. **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว**

1. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการประยุกต์ใช้ neural network สำหรับหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย beta-glucan
   แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ 2543: หัวหน้าโครงการ
2. โครงการ IRPUS: การเตรียมสารสกัดอุดมด้วยวิตามินซีจากหัวไชเท้า ทุนวิจัย สกว. 2550: หัวหน้าโครงการ
3. โครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเจี่ยวกู้หลาน ทุนวิจัย SUT-UBI: หัวหน้าโครงการ
4. โครงการ iTAP: การเตรียมโรงงานเพื่อขอการรับรองระบบ GMP : หัวหน้าโครงการ
5. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์สาหร่ายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ
6. โครงการ UBI: การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์สาหร่ายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ
7. โครงการ iTAP: โครงการการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างเครื่องซักผ้า : หัวหน้าโครงการ
8. .โครงการการศึกษาการปรับแต่งกระบวนการหมักเบียร์ที่เหมาะสมโดยใช้profileของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนด: หัวหน้าโครงการ
9. โครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เคอรี่พัพฟ์: หัวหน้าโครงการ
10. โครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำจิ้มสุกี้: หัวหน้าโครงการ
11. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดรางจืด ย่านางและ เครือหมาน้อย : หัวหน้าโครงการ
12. โครงการการศึกษาพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืด : หัวหน้าโครงการ
13. โครงการชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด : หัวหน้าโครงการ
14. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเห็ดกึ่งสำเร็จรูป: หัวหน้าโครงการ
15. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก: หัวหน้าโครงการ
16. โครงการ การสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไกลโคไซด์จากกระบองเพชรและลีลาวดี: หัวหน้าโครงการ
17. โครงการเตรียมสารสกัดน้ำมันเมล็ดทับทิมด้วยวิธีสกัดเย็น: หัวหน้าโครงการ
18. โครงการ iTAP : การผลิตเครื่องดื่มเชิงหน้าที่จากสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ : ผู้เชี่ยวชาญ
19. โครงการชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วขาว: หัวหน้าโครงการ
20. โครงการ การสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดจากหัวไชเท้า : หัวหน้าโครงการ
21. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากอาหารเลี้ยง Stem Cell: หัวหน้าโครงการ
22. โครงการการแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลัง: หัวหน้าโครงการ
23. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และการเข้าถึงชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร: หัวหน้าโครงการ
24. โครงการ Science Park SUT: การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของข้าวกาบาพร้อมรับประทานชนิด Synbiotics: ผู้เชี่ยวชาญร่วม

25. โครงการ iTAP: การพัฒนาเครื่องดื่มสมุนไพร : ผู้เชี่ยวชาญ
26. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์สมุนไพร : ผู้เชี่ยวชาญ
27. โครงการ iTAP: การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำหมักคาวตอง: ผู้เชี่ยวชาญ

7. งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

1. โครงการใยอาหารโภชนาการจากกากมัน: หัวหน้าโครงการ
2. โครงการ คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพาไทย: หัวหน้าโครงการ
3. โครงการ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อการควบคุมน้ำหนักจากสารสกัดธรรมชาติ: หัวหน้าโครงการ
4. โครงการ iTAP : การทดสอบประสิทธิผลในระดับ Pre-clinic ของสารประกอบฟินอลิคในเครื่องดื่มลำไยสกัดที่ผลิตโดยวิธีอินทรีย์ : ผู้เชี่ยวชาญร่วม
5. โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับนักกีฬาประเภททนทาน: หัวหน้าโครงการ
6. โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารซินไบโอติกส์จากกากมันสำปะหลัง: หัวหน้าโครงการ
7. โครงการ การพัฒนาผลิตภีณฑ์เสริมอาหารสำหรับผู้มีบุตรยาก: หัวหน้าโครงการ
8. โครงการ โภชนพันธุกรรมและสมดุลระบบภูมิคุ้มกันของผลิตภัณฑ์อาหาร นไบโอติกส์: หัวหน้าโครงการ
9. โครงการ ผลของสารกลุ่มเออโกเจนิเสริมประสิทธิภาพนักกีฬาต่อโภชนศาสตร์พันธุกรรม: หัวหน้าโครงการ

8. Peer-Reviewed Publications:

1) Nawong, S., Oonsivilai, R., Boonkerd, N., and Hansen, L. T. 2016. Entrapment in food-grade transglutaminase cross-linked gelatin-maltodextrin microspheres protects Lactobacillus spp. During exposure to simulated gastro-intestinal juices. Food research International. 85: 191-199.
2) Kachenpukdee, N., Santerre, C. R., Ferruzzi, M., and Oonsivilai, R. 2016. Modified dietary fiber from cassava pulp and assessment of mercury bioaccessibility and intestinal uptake using an in vitro digestion/Caco-2 model syatem. Journal of Food Science. 81(7): T1854 - T1863.
3) Kachenpukdee, N., Santerre, C. R., Ferruzzi, M., and Oonsivilai, R. 2016. Wnzymatic digestion optimization of dietary fiber from cassava pulp and their effect on mercury bioaccessibility and intestinal uptake from fish using an in vitro digestion/Caco-2 model. International Food Research Journal 23(2): 660 – 666.
4) Singthong, J., **Oonsivilai, R.**, Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. 2014. Bioactive compounds and encapsulation of Yanang (Tiliacora Triandra) leaves. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. Vol. 931-932: 76 – 84.

5) Chaicharoenaudomrung, N., Oonsivilai, A., **Oonsivilai, R**. 2014. Chlorophylls contents in Echinocactus grusonii extract. Advanced Materials Research. Vol. 931-932: 1507-1511.
6) Samruan, W., Gasaluck, P., and **Oonsivilai, R**. 2014. Total phenolics and flavonoid contents of soybean fermentation by Bacillus subtilis SB-MYP-1. Advanced Materials Research. Vol. 931-932: 1587 – 1591.
7) Chirinang, P., **Oonsivilai, R**., and Kulrattanarak, T. 2014. Ultrasound assisted extraction for preparation dietary fiber from cassava pulp. Advanced Materials Research. Vol. 931-932: 1502 -1506.
8) **Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2010. Differential evolution application in temperature profile of fermenting. WSEAS TRANSACTION on SYSTEMS. Issue. ISSN: 1109-2777. Issue 6(9): 618-628.
9) Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R**. 2009. A genetic algorithm application in natural cheese products. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 1, Vol 8, January, ISSN: 1109 – 2777, pp: 44 – 54.
10) Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R**. 2008 Parameter Estimation of Frequency Response Twin-Screw Food Extrusion Process using Genetic Algorithm. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 7 Volume 7, July, ISSN: 1109 – 2777
11) **Oonsivilai, R**., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. As. J. Food Ag-Ind. 1(02): pp 116 – 128.
12) **Oonsivilai, R**., Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology 114: 300– 306.
13) **Oonsivilai, R**., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. *FASEB Journal*. Vol. 20, no. 4, Part 1: A154
14) Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R**. 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.

Conference Oral Presentations:

1. Chirinang, P., Thaiudom, S., OOnsivilai, A., and OOnsivilai, R. Response surface method for promeganate seed oil preparation. International Conference of Pharma and Food (ICPAF 2016). Kyoto, Japan, September 19.
2. Chirinang, P., and Oonsivilai, R. 2016. Cholesterol-lowering properties of dietary fiber from cassava pulp in Wistar rats. International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.

3. Chaicharoenaudomrung, N., and Oonsivilai, R. Phytochemical, Antioxidant Activity, Digestive Stability and Bioaccessibility of Golden Barrel Cactus Extracts Using an In Vitro Digestion. International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.
4. Prasongdee, P., and OOnsivilai, R. 2016. Total phenolic, flavonoid contents and cellular antioxidant activity of Thai basil (Ocimum basilicum L.) International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.
5. Thaiudom, S., Pichayajittipong, P., and Oonsivilai, R. 2016. Value-added red colourant from red-peel of dragon fruit (Hylocerecus polyrhizus) and its bioactivity. International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.
6. Samruan, W. Oonsivilai, A., and Oonsivilai, R. 2012. Soybean and fermented soybean extract antioxidant activities. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 72: 1169-1172
7. Oonsivilai, R., Oonsivilai, A., and Piwondee, A. 2012. Effect of Rang Chuet Extract on Rat Liver Xenobiotic-Metabolizing Enzyme. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal.. 72: 1142-1144.
8. Singthong, J. **Oonsivilai, R**., Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. 2011. Phytochemical profile, antioxidant activity and cytotoxicity of Tiliacora triandra (Colebr.) Diels. (Yanang) extracts on Caco-2-cells. The 5th Thailand Congress of Nutrition 2011. September 5-7. Oral Presentation.
9. Posridee, K., Sripa, B. Jitsomboon, B., and **Oonsivilai, R**. 2011. Acute oral toxicity study of *Thunbergia laurifolia* Linn. Extracts**.** Asean Food Conference 2011. June, 16-18. Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
10. Manatwiyangkool, J. **Oonsivilai, R**. 2011. Modification of method for phaseolamin extraction from white kidney beans (Phaseolus vulgaris.). Asean Food Conference 2011. June, 16-18. Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
11. **Oonsivilai, R**., Chanphuak, C., Srisutor, P., Kulrattanarak, T., Sutheerawattananond, M., and Oonsivilai, A. 2011. Dietary Fiber Prepared from Cassava byproduct. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 60: 1120-1123.
12. **Oonsivilai, R.,** Manatwiyangkool, J. and Oonsivilai, A. 2011. Extraction Condition of Phaseolus vulgaris. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 60: 382-385.
13. **Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2010. Temperature profiling during fermenting processing differential evolution. Proceeding of the 9th WSEAS International conference on energy and environment. February 23-25, Cambridge, London

14. **R. Oonsivilai**, N. Chaijareonudomroung, Y. Huantanom., and A. Oonsivilai. 2010. Extraction condition of *Echinocactus grusonii*. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 70: 366: 369.
15. Posridee, K., Sripa, B. Jitsomboon, B., and **Oonsivilai, R**. 2010.The acute oral toxicity determination (LD50) of Rang Chute extract. 3rd SUT Graduate Conference. November 21-23. Suranaree University of Technology, Thailand.
16. Oonsivilai, R and Oonsivilai, A. 2008. Apply a genetic algorithm to natural cheese product. Proceeding of the 8th WSEAS International conference on applied computer science (ACS'08). ISSN 1790 – 5109, pp: 269 – 274.
17. **Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β-glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.
18. **Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β-glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.
19. **Oonsivilai, R**., Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.
20. **Oonsivilai, R**. Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation #OR-12, June 6-9, Kelowna, BC.

Conference Poster Presentations

1. Oonmetta-aree, J., Singthong, J., **Oonsivilai, R**. 2013. Effects of Krueo Ma Noy (Cissampelos pareira) crude extract as prebiotic on survival of encapsulated Lactobacillus acidophilus TISTRI 1338 under acidic and bile salt condition. 13th ASEAN Food Conference. Singapore. September 9-11.
2. Nawong, S., Boonkerd, N., **Oonsivilai, R**. 2013. Isolation and Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cassava Pulp for Cholesterol Lowering Property. 13th ASEAN Food Conference. Singapore.September 9-11.
3. J. Singthong, R. Oonsivilai, J. Oonmetta-aree, S. Ningsanond. 2012. Phytochemical profiles, antioxidant activity, and cytotoxicity of Cissampelos pareira (Krueo Ma Noy) extract on Caco-2 cells. The 14th Food Innovation Asia Conference 2012. BITEC, Bangna, Bangkok, June 14-15, Poster Presentation.

4. Posridee, K., Sripa, B., Jitsomboon, B. and Oonsivilai, R. 2012. The Sub-chronic oral toxicity study of Rang Chute extracts. IFT Annual Meeting 2012, Las Vegas, USA, June 23-29, Poster Presentation.
5. Oonsivilai, R., Singthong, J. Oonmetta-aree, J., and Ningsanond, S. 2012. Bioactivity, antioxidant activity, and cytotoxicity of Yanang, Kreu-Ma Noy, and Rang Chuet extracts. IFT Annual Meeting 2012, Las Vegas, USA, June 23-29, Poster Presentation.
6. Manatwiyangkool, J. **Oonsivilai, R**. 2010. Phaseolamin in white kidney beans (Phaseolus vulgaris.). 4th Thailand Congress of Nutrition. Sep, 5-7.EX-P-11(P33).
7. Seesan, T. and Oonsivilai, R. 2010. Promote health and well-being with phytochemical in Thai traditional food The 17th Tri-University International Joint Seminar & Symposium 2010. Role of Asia in Communities and Sustainable Development. November 10th-13th, Faculty of Engineering, Chiangmai University, Thailand.
8. **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.

9. อนุสิทธิบัตร: ยื่นจดอนุสิทธิบัตรเรื่องการเตรียมสารสกัดจากหัวไชเท้า เลขที่คำขอ 0801003939
   ยื่นจดสิทธิบัตรเรื่องการเตรียมน้ำมันเมล็ดทับทิม เลขที่คำขอ
10. ความลับทางการค้า: กรรมวิธีการผลิตสาหรายเว้นแก้ว วันที่ 19 ตุลาคม 2553
    สูตรและส่วนผสมสาหร่ายเส้นแก้ว วันที่ 8 พฤศจิกายน 2553
11. เอกสารประกอบการสอน Course Notes
    รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ . 2553. อาหารและโภชนาการ: เอกสารประกอบการสอนวิชาอาหารและโภชนาการ. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 499.หน้า
    (3 หน่วยกิต)

12. **Training Courses:**

1. โครงการพัฒนาบุคลากรให้เป็นผู้เชี่ยวชาญ ระบบ HACCP. สถาบันอาหาร 22-24 กรกฎาคม 2544

2. IRCA2009/Approved Food safety and Management System (ISO 22000: 2005) Lead Auditors training course. By National Food Institute of Thailand (NFI), Agro-Industry Academic Council Association, April 28-30, 2008. Amari Airport Hotel, Bangkok, Thailand.

3. ISO2200:2005 Food safety and Management System: Document & Implementation course. by National Food Institute of Thailand (NFI) , Agro-Industry Academic Council Association. June 9-11, 2008. Amari Airport Hotel, Bangkok, Thailand.

4. หลักสูตรความรู้พื้นฐานด้านความปลอดภัยอาหารและหลักเกณฑ์ที่ดีในการผลิตอาหารแปรรูปที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่าย (Primary GMP) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับสถาบันค้นคว้าและผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย วันที่ 4-7 มีนาคม 2557

5. หลักสูตรความรู้เบื้องต้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับสถาบันค้นคว้าและผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย วันที่ 4-7 มีนาคม 2557

6. หลักสูตรการบริหารจัดการธุรกิจและเทคนิคการตลาด (Food Business management and marketing) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับสถาบันค้นคว้าและผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย วันที่ 4-7 มีนาคม 2557

7. การรับรองฮาลาลในประเทศไทย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย วันที่ 24 มีนาคม 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี