

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus johnsonii*
เพื่อต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ *Helicobacter pylori*



ฤทัยมาศ วงศ์บัณฑิต

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus johnsonii*
เพื่อต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ *Helicobacter pylori*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus johnsonii*
เพื่อต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ *Helicobacter pylori*

ฤทัยมาศ วงศ์ปิ่นติ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา นาคประสม)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.วศิน เจริญทัศน์ธนกุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Lactobacillus johnsonii</i> เพื่อต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>Helicobacter pylori</i>
ชื่อผู้เขียน	นางสาวฤทัยมาศ วงศ์ป็นติ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน

บทคัดย่อ

Lactobacillus johnsonii เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพซึ่งมีคุณสมบัติที่เฉพาะเจาะจง เช่น สามารถทนกรดและน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ดี สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Helicobacter pylori* ที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารอักเสบและมะเร็งกระเพาะอาหารได้ จึงมีความน่าสนใจในการนำมาเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตชีวมวลสำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของแบคทีเรีย *L. johnsonii* ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ *H. pylori* ออกแบบอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยง *L. johnsonii* รวมทั้งศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์อาหารเสริม โดย *L. johnsonii* จากคลังเชื้อของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้แก่ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 ได้ถูกนำมายืนยันสายพันธุ์ด้วยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก พบว่า *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง มีคุณสมบัติในการทนกรดและน้ำดีจำลองในทางเดินอาหารได้สูง มีความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง ไวต่อยาปฏิชีวนะ และมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ *Escherichia coli* เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค agar spot test ในขณะที่ *H. pylori* นั้น พบว่าถูกยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์โดยสารเมแทบอลิท์ทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ของ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลต และสารเมแทบอลิท์ดังกล่าวยังกระตุ้นให้เซลล์ของ *H. pylori* จับกลุ่มกันด้วย คาดว่าเกิดจากโปรตีน GroEL ที่ *L. johnsonii* ผลิตขึ้น สำหรับผลการออกแบบสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีแหล่งคาร์บอนหลักจากนมผงพร่องมันเนยเพื่อเพาะเลี้ยง *L. johnsonii* เปรียบเทียบกับอาหารเหลวสูตร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 3.25% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตจาก 100 มิลลิลิตร เป็น 15 ลิตรโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

ดังกล่าว พบว่าสามารถเพิ่ม productivity ในการผลิตชีวมวลของไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 ได้ถึง 3.88 และ 12.15 เท่า ตามลำดับ หลังจากการขึ้นรูปชีวมวลโพรไบโอติกทั้งสองไอโซเลตให้เป็นผงด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ $59.16 \pm 0.23\%$ และ $72.59 \pm 0.47\%$ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำผงชีวมวลมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 มีอัตราการรอดชีวิต สูงถึง 98.44% และ 89.10% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่คุณภาพด้านความชื้น สี และกลิ่นมีการเปลี่ยนแปลงน้อย จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโพรไบโอติกและสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีมูลค่าสูงในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ : ผงโพรไบโอติก, แลกโตบาซิลลัสจอนสันนิไอ, เฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี, เชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร, อาหารเสริม



Title	DEVELOPMENT OF PROBIOTIC <i>Lactobacillus johnsonii</i> POWDER FOR PREVENTION OF PATHOGENIC <i>Helicobacter pylori</i>
Author	Miss Rutaimas Wongpanti
Degree	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Pairote Wongputtisin

ABSTRACT

Lactobacillus johnsonii is an effective probiotic bacterium that exhibits specific properties such as acid and bile resistance and production of antimicrobial substances, especially the ability in pathogenic *Helicobacter pylori* inhibition. This bacterium causes gastritis and gastric cancer. The industrial scale production of *L. johnsonii* biomass for utilizing as food supplement is very interesting. Therefore, the aims of this study were to investigate a potential of *L. johnsonii* for prevention of pathogenic *H. pylori*, formulate low-cost medium for cultivation of *L. johnsonii*, and study the optimal process in formulation of supplement product. *L. johnsonii* isolates from stock culture of Microbial technology Laboratory, Faculty of Science, Maejo university, including isolate CK3 and VCF2-9, were confirmed their species based on 16S rRNA sequence and tested probiotic properties. It was found that both *L. johnsonii* CK3 and *L. johnsonii* VCF2-9 were not hemolytic strains. They possess high level of acid and bile resistibility in simulated gastrointestinal tract, high autoaggregation ability and were susceptible to tested antibiotics. In addition, they exhibited antibacterial activity against pathogenic *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli* when agar spot test technique was used. In case of *H. pylori*, its growth was completely inhibited by extra- and intracellular metabolites of both isolates. Moreover, these metabolites promoted aggregation of *H. pylori* cells. It was expected that GroEL protein produced by *L. johnsonii* might be the reason. The development of low-cost liquid medium composing of skim milk powder as main carbon source for *L. johnsonii* cultivation

comparing to de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth was studied. The results showed that optimal conditions were 3.25% (w/v) skim milk powder, incubating temperature at 32.5 °C and 24 h of cultivation time. Then, the productivity of isolate CK3 and VCF2-9 biomass were enhanced 3.88 and 12.15 folds, respectively, after the cultivation scale was increased from 100 ml to 15 L under the optimized conditions. Subsequently, the biomass of both CK3 and VCF2-9 were powdered by spray drying and 59.16±0.23% and 72.59±0.47% of survival rate were obtained, respectively. It was also found that approximately 98.44% and 89.10% of CK3 and VCF2-9, respectively, could survive in a powder form under 4 °C for 3 months, which are higher than those at 37 °C. The other physical characteristics, including moisture, color and odor did not obviously change. From all the results above, It might be indicated that *L. johnsonii* CK3 and VCF29 could be effective probiotic candidates and further developed as commercially high-value functional.

Keywords : probiotic powder, *Lactobacillus johnsonii*, *Helicobacter pylori*, gastro pathogen, food supplement

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากคณาจารย์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ เรียนรู้เทคนิค ประสบการณ์ ตลอดระยะเวลาการปฏิบัติงานของข้าพเจ้าในห้องปฏิบัติการจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่อง ความเอาใจใส่ข้าพเจ้าอย่างดียิ่ง และให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ เจ้าของเชื้อแบคทีเรียแลกโตบาซิลลัสจอนสันนิโอ ผศ. ดร. กาญจนา นาคประสม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า ขอขอบคุณ อ. ดร. ทิพภา พิสิษฐ์กุล ในการวิเคราะห์การกระจายตัวของโปรตีน ขอขอบคุณ อ. ดร. ภัทรภรณ์ ศรีสมรรถการ ผศ. ดร. นีอร โฉมศรี สำหรับเครื่องมือในการวัดสีของตัวอย่าง ขอขอบคุณแหล่งทุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และขอขอบคุณ ดร. ณสพน โพธิ์วิจิตร จากบริษัท ดีทีออกซ์ (ประเทศไทย) จำกัด ผู้สนับสนุนหลักในการทำวิจัยครั้งนี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยให้การสนับสนุน ให้ความห่วงใยใส่ใจข้าพเจ้าจนการวิจัยประสบความสำเร็จ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และผู้มีส่วนร่วมทุกท่านที่ข้าพเจ้าเคารพรัก รวมทั้งพี่ๆ น้องๆ ที่ช่วยให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความสะดวกแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในพระคุณอย่างสูง หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่าคณาจารย์ บิดา มารดา และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน จนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่เข้ามาศึกษา เพื่อพัฒนางานวิจัยต่อไป ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

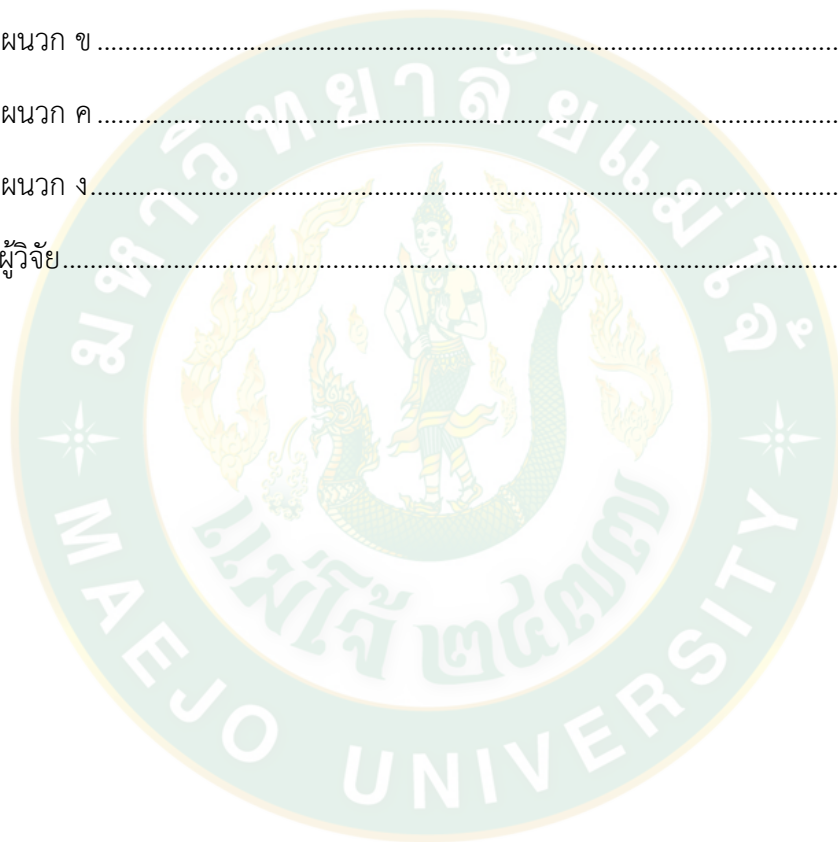
ฤทัยมาศ วงศ์ปันทิ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร.....	4
1. โพรไบโอติก (Probiotics).....	4
2. แล็กโตบาซิลลัส จอนสันนีไอ (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	7
3. เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลรี (<i>Helicobacter pylori</i>).....	9
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย.....	10
5. นมพร่องมันเนย (Skim milk).....	11
6. การออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยหลายปัจจัย.....	13
7. การขยายกำลังการผลิต (Scale up).....	15
8. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์	17
9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	23
อุปกรณ์และสารเคมี	23

วิธีการทดลอง	26
1.แบคทีเรีย <i>L. johnsonii</i>	26
2.การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ <i>L. johnsonii</i>	26
3.การออกแบบสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>L. johnsonii</i>	30
4.ทดสอบขยายกำลังการผลิตชีวมวลของ <i>L. johnsonii</i> ในถังหมักขนาด 20 ลิตร	34
5.ศึกษาความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปผงโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i>	34
6.ทดสอบคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ต้นแบบโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i> ชนิดผง.....	34
7.สถิติที่ใช้ในการวิจัย	35
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	36
1.การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก	36
2.การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก	37
2.1 การย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity).....	37
2.2 ความสามารถในการทนกรด และน้ำดี.....	39
2.3 ความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง (Auto-aggregation Assay)	41
2.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ	43
2.5 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร.....	44
3.การออกแบบสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>L. johnsonii</i>	52
3.1 การคัดเลือกองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ.....	52
3.2 ผลการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ <i>L. johnsonii</i>	54
3.3 ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ <i>L. johnsonii</i>	57
4.ผลการทดสอบขยายกำลังการผลิตชีวมวลของ <i>L. johnsonii</i>	63
5.ความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปผง <i>L. johnsonii</i> ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย	65

6.อายุการเก็บรักษาและคุณสมบัติบางประการของของผลิตภัณฑ์ต้นแบบผงโปรไบโอติก <i>L. johnsonii</i>	67
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	71
บรรณานุกรม.....	73
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก	82
ภาคผนวก ข	84
ภาคผนวก ค	90
ภาคผนวก ง.....	91
ประวัติผู้วิจัย.....	93



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	จุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นโพรไบโอติก.....	5
ตารางที่ 2	ตารางโภชนาการของนมผงพร่องมันเนย	12
ตารางที่ 3	Initial block สำหรับแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman.....	14
ตารางที่ 4	ตัวอย่างตารางการเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับ 3 Factors....	15
ตารางที่ 5	การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยโดยการออกแบบ Plackett and Burman.....	31
ตารางที่ 6	แผนการทดลอง Plackett-Burman ของทั้ง 8 ปัจจัย	32
ตารางที่ 7	การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยโดยการออกแบบ Central composite design (CCD) ของทั้ง 3 ปัจจัย.....	33
ตารางที่ 8	แผนการทดลอง Central composite design (CCD) ของทั้ง 3 ปัจจัย.....	33
ตารางที่ 9	กิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดงของ <i>Lactobacillus johnsonii</i>	38
ตารางที่ 10	ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง <i>L. johnsonii</i> JCM1022 และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791	43
ตารางที่ 11	กิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรคของ ของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง <i>L. johnsonii</i> JCM1022 และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791.....	45
ตารางที่ 12	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>H. pylori</i> จากสารเมแทบอลิท์ที่ผลิตโดย <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 ทั้งส่วนที่ผลิตและขับออกนอกเซลล์และอยู่ในเซลล์	46
ตารางที่ 13	การจับตัวกัน (co-aggregation) ระหว่างเซลล์แบคทีเรีย <i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> แต่ละไอโซเลต	48
ตารางที่ 14	การจับตัวกันของเซลล์ <i>H. pylori</i> เมื่อบ่มร่วมกับตัวอย่างสารเมแทบอลิท์จากภายในเซลล์ <i>L. johnsonii</i> แต่ละไอโซเลต	49
ตารางที่ 15	การจับตัวกันของเซลล์ <i>H. pylori</i> เมื่อบ่มร่วมกับตัวอย่างสารเมแทบอลิท์ที่ถูกขับออกภายนอกเซลล์เซลล์ <i>L. johnsonii</i> แต่ละไอโซเลต.....	50
ตารางที่ 16	การจับตัวกัน (auto-aggregation) ของเซลล์แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์.....	51
ตารางที่ 17	จำนวนเซลล์ <i>L. johnsonii</i> CK3 ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละชนิด	53

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ (ANOVA) ของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ <i>L. johnsonii</i> อย่างมีนัยสำคัญ.....	55
ตารางที่ 19 แผนการทดลอง Plackett-Burman ของทั้ง 8 ปัจจัย และค่าจริงและค่าทำนายของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9.....	56
ตารางที่ 20 แผนการทดลอง Central composite design (CCD) ของทั้ง 3 ปัจจัย และค่าจริงและค่าทำนายของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9	58
ตารางที่ 21 Analysis of variance (ANOVA) for the model regression	59
ตารางที่ 22 Coefficient estimate by the regression model.....	59
ตารางที่ 23 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตมวลเซลล์ <i>L. johnsonii</i> โดยอาหารสูตรต้นทุนต่ำและอาหารสูตรมาตรฐาน MRS	63
ตารางที่ 24 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และ ประสิทธิภาพการผลิต (Productivity) ในระดับ lab scale และ up scale	64
ตารางที่ 25 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในกระบวนการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย	66
ตารางที่ 28 ความชื้น (Moisture) ของผงเชื้อโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 จากการทำแห้งด้วยแบบพ่นฝอย.....	69
ตารางที่ 29 แสดงค่าการวิเคราะห์ค่าสี่ระบบ $L^*-a^*-b^*$ ของผงเชื้อโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i> CK3 และ VCF2-9 จากการทำแห้งด้วยแบบพ่นฝอย.....	69
ตารางที่ 30 การทดสอบกลิ่นของผงเชื้อโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 จากการทำแห้งด้วยแบบพ่นฝอย	70
ตารางที่ 31 ภาพโคโลนีของ <i>H. pylori</i> จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อจาก extracellular products และ intracellular products ของ <i>L. johnsonii</i> CK3, VCF2-9	90

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 <i>Lactobacillus johnsonii</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	7
ภาพที่ 2 <i>Helicobacter pylori</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	9
ภาพที่ 3 Central Composite Design สำหรับ 3 Factors.....	14
ภาพที่ 4 Scale-up Strategies.....	16
ภาพที่ 6 แสดงแบบแผนของระบบการห่อหุ้มแบบ matrix type ของแคปซูลที่เรียวโพรไบโอติกโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย.....	17
ภาพที่ 5 แสดงแบบแผนของระบบการห่อหุ้ม : (a) แบบกักเก็บ (reservoir type), (b) matrix type และ (c) coated matrix type.....	18
ภาพที่ 7 phylogenetic tree ของแคปซูลที่เรียวกรดแลคติกจากการทำ phylogenetic tree ของลำดับเบสบนยีน 16S rRNA.....	37
ภาพที่ 8 ความสามารถในการรอดชีวิตของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 ในน้ำย่อยจำลองของระบบอาหาร เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง <i>L. johnsonii</i> JCM1022 และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791	39
ภาพที่ 9 ความสามารถในการรอดชีวิตของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 ในน้ำดี เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง <i>L. johnsonii</i> JCM1022 และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791	40
ภาพที่ 10 ความสามารถในการเกาะตัวกันเอง (Auto-aggregation) ของ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง <i>L. johnsonii</i> JCM1022 และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791.....	42
ภาพที่ 11 SDS-PAGE ของการวิเคราะห์โปรตีน GroEL ของเชื้อ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9	52
ภาพที่ 12 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ <i>L. johnsonii</i> CK3 ในอาหารเหลวนมผงพร้อมมันเนยที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS broth และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	54
ภาพที่ 13 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ของ <i>L. johnsonii</i> CK3.....	60
ภาพที่ 14 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ของ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9	61

ภาพที่ 15 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>L. johnsonii</i> CK3 และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 ในถังหมัก ขนาด 15 ลิตร.....	64
ภาพที่ 16 ผงเชื้อ <i>L. johnsonii</i> CK3 และผงเชื้อ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9	65
ภาพที่ 17 อัตราการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์ต้นแบบโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i> CK3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	67
ภาพที่ 18 อัตราการรอดชีวิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบโพรไบโอติก <i>L. johnsonii</i> VCF2-9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	68



บทที่ 1

บทนำ

Helicobacter pylori เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยในกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบจนอาจทำให้เกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ ซึ่งอาการของโรคได้แก่ อาการปวดท้อง รู้สึกแสบร้อน เบื่ออาหาร น้ำหนักลด มีอาการแสบร้อนกลางอก อาหารไม่ย่อย มีเลือดในอุจจาระ และอาเจียน โดย *H. pylori* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเกลียวหรือโค้ง เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อใช้ในการเจริญ และใช้แฟกเจลลาในการเคลื่อนที่ (Diaconu *et al.*, 2017) ซึ่งสาเหตุการติดเชื้อ *H. pylori* สามารถเกิดขึ้นจากการรับประทานอาหารและน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนเชื้อจากทางเดินอาหาร (fecal-oral transmission) นอกจากนี้ยังมีการติดเชื้อจากสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคด้วย จากข้อมูลของกลุ่มวิจัยโรคกระเพาะอาหารสมาคมแพทย์ระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2558 ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* เป็นจำนวนมากในประเทศไทย โดยรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ในระยะเวลากว่า 15 ปีที่ผ่านมา จึงได้ศึกษาแนวทางเวชปฏิบัติในการวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ปัจจุบันแนวทางการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* สามารถทำได้โดยการใช้ยาปฏิชีวนะชนิด levofloxacin (ลิโวฟลอกซาซิน) และอาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะได้ จึงมีการศึกษาแนวทางใหม่ในการรักษาโดยใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก โดยโพรไบโอติกคือแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของผู้บริโภค เพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ ลดระดับของคอเลสเตอรอล สามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค กระตุ้นกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันได้ (Pandey *et al.*, 2015) และถูกยอมรับจากองค์การอาหารและยาแล้วว่าปลอดภัยในการบริโภค จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพหลายชนิดและได้รับความนิยมจากผู้บริโภคที่ใส่ใจต่อสุขภาพ

แบคทีเรีย *Lactobacillus johnsonii* จัดว่าเป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพสายพันธุ์หนึ่ง ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างท่อนเป็นส่วนใหญ่ ไม่สร้างสปอร์ และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดย *L. johnsonii* สามารถแยกได้จากอุจจาระของมนุษย์ หมู และไก่ และสามารถพบได้ในลำไส้ของมนุษย์และวัว เป็นต้น (Maldonado *et al.*, 2018) ซึ่งแบคทีเรีย *L. johnsonii* มีคุณสมบัติทนกรดได้สูง สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกและเยื่อบุเซลล์ผิวได้ และคุณสมบัติที่น่าสนใจคือมีความสามารถในการป้องกันการยึดเกาะเชื้อ *H. pylori* บนผนังทางเดินอาหาร โดยกระตุ้นให้เซลล์ auto-aggregation (Bergonzelli *et al.*, 2006) ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาจากคณะวิจัยหลายกลุ่ม เช่น Aiba *et al.* (2015) ที่ได้ศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* No. 1088 ในการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* พบว่า *L. johnsonii* No. 1088 สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดี และสามารถลดจำนวนของเชื้อก่อ

โรค *H. pylori* ได้ เป็นต้น อีกทั้งจากงานวิจัยที่ผ่านมาของนักวิจัยจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยี จุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้มีการคัดแยกแบคทีเรีย *L. johnsonii* หลายไอโซเลตจากทางเดินอาหารของสัตว์ ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงในการนำไปใช้ประโยชน์โดยพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และตอบสนองต่อผู้ที่สนใจในสุขภาพในปัจจุบัน

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้มีความสนใจศึกษากระบวนการพัฒนา *L. johnsonii* ให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมกลุ่มโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษายืนยันศักยภาพการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกของ *L. johnsonii* เสียก่อน จากนั้นจึงศึกษากระบวนการผลิตมวลเซลล์และขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้คือ เพื่อทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของ *L. johnsonii* ที่มีในห้องปฏิบัติการรวมถึงศึกษาศักยภาพในการกำจัด *H. pylori* วัตถุประสงค์ประการต่อมาคือเพื่อออกแบบสูตรอาหารต้นทุนต่ำในการผลิตมวลเซลล์ของ *L. johnsonii* และทำการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงที่มีองค์ประกอบของ *L. johnsonii* เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่โพรไบโอติก นอกจากนี้ตลาดผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพโดยเฉพาะยิ่งกลุ่มอาหารเชิงหน้าที่ (functional foods) กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมากจากผู้บริโภคในยุคปัจจุบัน ส่งผลให้งานวิจัยนี้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าในเชิงพาณิชย์ด้านสุขภาพในเรื่องของการต่อต้านการติดเชื้อในทางเดินอาหารได้ และยังตอบสนองนโยบายของประเทศในการส่งเสริมการพัฒนานวัตกรรมจากผลงานวิจัยเพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาศักยภาพของแบคทีเรีย *L. johnsonii* ในการเป็นโพรไบโอติกโดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ *H. pylori*
2. เพื่อออกแบบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต้นทุนต่ำสำหรับผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *L. johnsonii*
3. เพื่อศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ประกอบไปด้วยเชื้อ *L. johnsonii* ที่มีชีวิต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของ *L. johnsonii* แต่ละสายพันธุ์ และมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ *H. pylori* ได้
2. ได้สูตรอาหารต้นทุนต่ำในการเพิ่มปริมาณชีวมวลของ *L. johnsonii* เพื่อใช้ทดแทนสูตรอาหารเหลวมาตรฐาน MRS ที่มีราคาแพง ซึ่งจะสามารถลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้
3. ได้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีองค์ประกอบของผงเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. johnsonii* ที่มีความสามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ *H. pylori* ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่สูง นอกจากนี้ยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีระยะเวลาการเก็บรักษาได้นาน
4. ได้นำผลงานวิจัยจากห้องปฏิบัติการไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าในเชิงพาณิชย์ และยังส่งเสริมการพัฒนานวัตกรรมจากผลงานวิจัยเพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

1. โพรไบโอติก (Probiotics)

1.1 นิยาม

โพรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกายของเรา ซึ่งนิยามของโพรไบโอติกจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) กล่าวว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้มีประโยชน์ทางด้านสุขภาพต่อโฮสต์ (Gibson and Fuller, 2000) และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ประเทศไทย ได้นิยามโดยอ้างอิงจาก FAO/WHO ว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ด้านสุขภาพ (FAO/WHO, 2001)

ลักษณะทางสรีรวิทยาของโพรไบโอติกโดยทั่วไปมีรูปร่างท่อน รูปร่างคล้ายตัววาย (Y-shaped) และรูปร่างคล้ายตัววี (V-shaped) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่มีสี ไม่สร้างสปอร์ และสามารถเจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ แต่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Kumar and Kumar, 2015)

1.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับในสิ่งมีชีวิตทั้งคนและสัตว์ โดยเฉพาะการนำโพรไบโอติกไปใช้ในมนุษย์ต้องคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัย และประโยชน์ที่จะได้รับเป็นหลัก ดังนั้นหลักเกณฑ์สำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมีคุณสมบัติหลัก (Vasiljevic, *et al.*, 2008) ดังนี้

- (1) สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้นๆ ได้
- (2) ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค
- (3) สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้
- (4) มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7 - 10^9 CFU/ml ของผลิตภัณฑ์)

เกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติก ความสำคัญขึ้นอยู่กับความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะเมื่อนำโพรไบโอติกไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต จะต้องมีการพิจารณาถึงในเรื่องความปลอดภัย หรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่นอกเหนือจากประโยชน์ของโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว ดังนั้นในการที่จะนำจุลินทรีย์ชนิดใดมาเป็นโพรไบโอติก จะต้องมีการศึกษาและทดสอบทาง

วิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูลทั้งในเรื่องคุณสมบัติ ประสิทธิภาพต่อสุขภาพ และความปลอดภัย หรือได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ เช่น องค์การอนามัยโลกก็ได้ให้การรับรองว่าจุลินทรีย์ใดเป็นชนิดที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded as Safe หรือ GRAS) ซึ่งได้มีการศึกษาและนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิต มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รองรับถึงความปลอดภัยในการนำมาใช้

โดยคุณลักษณะเบื้องต้นของโพรไบโอติกเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกตามทฤษฎีเบื้องต้นในการคัดเลือก คือ เป็นเชื้อที่เริ่มต้นมาจากมนุษย์ มีชีวิต สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและน้ำดี สามารถยึดเกาะ ตั้งรกราก ดำรงชีวิตและคงอยู่ในลำไส้ได้ สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ทนทานต่อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุและเชื้อก่อโรค ปลอดภัยในอาหารและใช้ในทางคลินิก โดยมีตรวจสอบทางคลินิกและบันทึกผลกระทบต่อสุขภาพ และสามารถรอดชีวิตในกระบวนการผลิต (Saarela *et al.*, 2000)

1.3 จุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นโพรไบโอติก

ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง เช่น กลุ่มของ *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp. และยังมีแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่จัดว่าเป็นโพรไบโอติก แสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นโพรไบโอติก

Lactobacillus	Bifidobacterium	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Bacillus cereus</i> ('toyoi')
<i>L. crispatus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Escherichia coli</i> ('Nissle 1917')
<i>L. fermentum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

ที่มา: Holzapfel *et al.* (1998)

1.4 ประโยชน์ของโพรไบโอติก (ไชยวัฒน์, 2556)

1.4.1 การปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย

โพรไบโอติกสามารถลดความถี่และระยะเวลาของอาการท้องร่วง ลดอาการติดเชื้อภายในลำไส้ได้ เนื่องจากโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้จะใช้อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างพลังงาน เกิดกรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งกรดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้โพรไบโอติก สามารถช่วยป้องกันและลดภาวะท้องผูก (constipation) โดยช่วยปรับปรุงความสามารถในการเคลื่อนไหวของลำไส้ช่วยเพิ่มความถี่ของการเคลื่อนไหวของลำไส้และเพิ่มความนุ่มของอุจจาระช่วยให้ขับถ่ายได้คล่องขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคเพื่อปรับสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Ahasan *et al.*, 2015)

1.4.2. เพิ่มการย่อยน้ำตาลแลคโตสในร่างกาย (lactose intolerance)

โพรไบโอติกสามารถผลิตน้ำย่อยเพื่อช่วยย่อยแลคโตสในนมได้ ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิด β -galactosidase จึงทำให้ผู้ที่บริโภคสามารถดื่มนมและผลิตภัณฑ์นมได้ โดยไม่เกิดอาการท้องอืดท้องเฟ้อ หรือแน่นท้องได้

1.4.3. การป้องกันหรือลดระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง

โพรไบโอติกมีส่วนช่วยป้องกันมะเร็งในลำไส้ โดยอาศัยกลไกต่างๆ เช่น ลดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ลดสารที่เหนียวทำให้เกิดการกลายพันธุ์ การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อมะเร็ง และลดการดูดซึมของสารก่อมะเร็ง

1.4.4. การปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยอาศัยกลไกการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocyte) ที่มีอยู่ทุกหนทุกแห่งไหลเวียนไปตามหลอดเลือดให้เคลื่อนมายังตำแหน่งที่เชื้อโรครุกเข้ามาสู่ร่างกาย แล้วโมโนไซต์ก็เติบโตเป็นแมคโครฟาจ (macrophage) เพื่อจับกินเชื้อโรคนั้น นอกจากนี้ ยังหลั่งสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อโรค เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดแกมมาโกลบูลินเอ (Immunoglobulin A; IgA) อินเตอร์ลิวคิน (Interleukin) และทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ แอลฟา (Tumor Necrosis Factor; TNF- α) ทำให้ร่างกายป้องกัน ต่อด้านและกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายได้ยิ่งขึ้น

1.4.5. การลดภาวะภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรง

โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยช่วยลดหรือป้องกันการสร้างโปรตีนหรือแอนติบอดี (antibody) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรงของร่างกายได้ ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิแพ้ของร่างกาย คือ IgE และโพรไบโอติกยังช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างสารตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อไม่ให้เกิดการอักเสบรุนแรง เช่น อินเตอร์ลิวคิน-10 (IL-10) ซึ่งจากรายงานของ

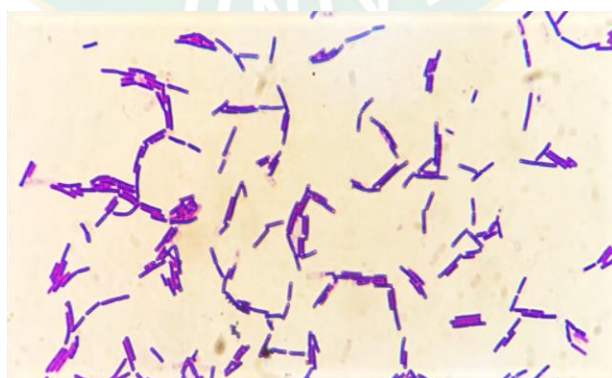
Kalliomki *et al.* (2001) พบว่าในเด็กอายุ 2 ปี ที่ได้รับ *Lactobacillus* GG สามารถลดการเกิดภาวะผื่นแพ้ได้ร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแบคทีเรียดังกล่าว

1.4.6. การลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

โคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลีโกลิไซด์ โพรไบโอติกสามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยกลีโกลิไซด์ได้จะทำให้กลีโกลิไซด์ที่ถูกย่อยแล้วเป็นกลีโกลิไซด์อิสระ (deconjugated bile salt) ดังนั้นสามารถถูกขับออกทางอุจจาระได้ ทำให้ร่างกายใช้โคเลสเตอรอลมาสังเคราะห์เป็นกลีโกลิไซด์ทดแทนจึงส่งผลให้ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้

2. แลกโตบาซิลลัส จอนสันนีย์ (*Lactobacillus johnsonii*)

เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์หนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีประโยชน์และมีคุณสมบัติต่างๆ โดยเฉพาะเจาะจง เช่น ความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบนเยื่อเมือกและเซลล์เยื่อผิวกระเพาะอาหาร และความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการจับตัวกันของเชื้อ *H pylori* ที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารอักเสบและโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร โดยลักษณะทางสรีรวิทยาของ *L. johnsonii* มีรูปร่างท่อน แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยแหล่งที่พบทั่วไปของ *L. johnsonii* สามารถแยกได้จากลำไส้ อุจจาระของมนุษย์ อุจจาระของหมู (Guinane *et al.*, 2011) อุจจาระของไก่ (Bagon *et al.*, 2018) และในลำไส้ของวัว (Maldonado *et al.*, 2018) ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีของ *L. johnsonii* สามารถหมักน้ำตาลกลุ่ม Amygdalin, D-cellobiose, Esculin, D-Fructose, D-Galactose, D-Lactose, D-Maltose, D-Melibiose, D- Raffinose, D-Mannose, Salicin, D-Sucrose และ D-Trehalose (Doi *et al.*, 2013) ได้



ภาพที่ 1 *Lactobacillus johnsonii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1 คุณสมบัติของ *L. johnsonii*

คุณสมบัติในการทนต่อกรดน้ำดีและกรดน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร จากงานวิจัยของ Yamano *et al.* (2007) ได้ทดสอบการทนต่อกรดน้ำดี 0.1% เป็นเวลา 15 ชั่วโมงและกรดน้ำย่อยในกระเพาะอาหารนาน 3 ชั่วโมงของแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* La1 เปรียบเทียบกับโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆ (*L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *B. longum* และ *B. breve*) พบว่า *L. johnsonii* La1 มีความสามารถในการทนกรดน้ำดีได้และทนต่อกรดน้ำย่อยในกระเพาะอาหารได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่น และในงานวิจัยของ Aiba *et al.* (2015) ได้ทดสอบการทนต่อค่าความเป็นกรดต่ำ (pH 2.0, 1.5 และ 1.0) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* La1, *L. johnsonii* No. 1088 และ *L. johnsonii* JCM2012 เปรียบเทียบกับโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆ (*L. gasseri* OLL2716, *L. casei shirota*, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* BF, *L. brevis* KB290 และ *L. gasseri* JCM1131) ในระยะเวลา 2 ชั่วโมงพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* มีความสามารถในการทนค่า pH 1.0, 1.5 และ 2.0 ได้ดีกว่าโพรไบโอติกกลุ่มอื่นๆ

คุณสมบัติในการยึดเกาะกับ Caco-2 cell แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* La1 มีความสามารถในการยึดเกาะกับ Caco-2 cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* La3, La4, La5, La7, La10 และ La18 โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับ *in vitro* (Yamano *et al.*, 2007)

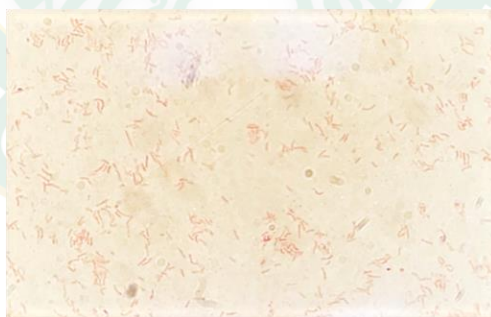
คุณสมบัติในการผลิต hydrogen peroxide จากงานวิจัยของ Pridmore *et al.* (2008) ที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* NCC533 ที่แยกได้จากลำไส้ของมนุษย์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีสามารถในการผลิต hydrogen peroxide ได้ถึง 617 ± 20 μM และสารที่ผลิตได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 ได้

คุณสมบัติการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ในแมคโครฟาจ (macrophage) และการทำให้เชื้อก่อโรค *H. pylori* จับตัวกันเองโดยโปรตีน GroEL จากงานวิจัยของ Bergonzelli *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษาโปรตีน GroEL ที่อยู่บนผนังเซลล์ของ *L. johnsonii* La1 (NCC 533) และได้รับการยืนยันว่ามีโปรตีน GroEL อยู่โดยใช้เทคนิค ELISA นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวใน supernatant ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคาดว่าจะถูกขนส่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งวิธีการศึกษาพวกเขาได้ทำการโคลนโปรตีน GroEL เข้าไปใน *E. coli* โดย recombinant GroEL ที่ได้จะนำไปทดสอบการยึดเกาะกับ mucus และเยื่อบุผิวของลำไส้ ผลการทดลองพบว่าโปรตีน GroEL มีบทบาทช่วยให้ *L. johnsonii* La1 ยึดเกาะกับเยื่อเมือกและผนังลำไส้ได้ และยังพบว่าโปรตีน GroEL สามารถกระตุ้นการหลั่ง interleukin-8 (IL-8) ในแมคโครฟาจ และ HT29 cells ได้ นอกจากนี้โปรตีน GroEL ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการจับตัวกันเองของเชื้อ *H. pylori* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ

Aiba *et al.*, (2015) ที่ได้ศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* No. 1088 ในการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* พบว่าเมื่อทำการทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (mixed cultures) ปริมาณหรืออัตราของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลดลงอย่างชัดเจน และเมื่อนำมาทดสอบในหนูทดลองที่ทำให้ติดเชื้อ *H. pylori* พบว่าเมื่อพรีตด้วยแบคทีเรีย *L. johnsonii* No. 1088 ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เชื้อก่อโรคมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *L. johnsonii* No. 1088 สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดี และสามารถลดจำนวนของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลงได้

3. เฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลรี (*Helicobacter pylori*)

เฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อโรคในกระเพาะอาหาร และทำให้เกิดการอักเสบของกระเพาะอาหาร อาจทำให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร หรือแผลในลำไส้เล็กส่วนต้น รวมถึงมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งลักษณะทางสรีระวิทยา มีรูปร่างเกลียว (spiral) หรือรูปร่างโค้งงอ (curved rod) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีขนาดกว้าง 0.5-0.9 ไมโครเมตร ยาว 2.0-4.0 ไมโครเมตร เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (Diaconu *et al.*, 2017) โดยสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน 5% และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5-10% บนอาหารที่มีเลือดผสมอยู่ เช่น อาหาร Oxoid brain heart infusion agar (BHI) และอาหารที่เสริมด้วยเลือดม้า 5% ผสมกับ IsoVitaleX 1% ซึ่งอาจจะมีการเสริมด้วยวิตามินต่างๆ ในการเจริญเติบโต เช่น วิตามิน B2, L-glutamine, L-cysteine โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3-5 วัน



ภาพที่ 2 *Helicobacter pylori* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลักษณะทางชีวเคมีของเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี ไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้ ไม่มีปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเตรตและ indoxyl acetate hydrolysis แต่มีความสามารถในการผลิต catalase และ cytochrome oxidase และที่โดดเด่นคือสามารถผลิตหรือมีกิจกรรมเอนไซม์ urease และ alkaline phosphatase ในระดับที่สูง (Owen, 1998)

ซึ่งโดยปกติแล้ว *H. pylori* จะอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหาร แต่เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีสภาพที่เป็นกรดอย่างแรงทำให้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่เชื้อ *H. pylori* จะมีลักษณะพิเศษที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ สามารถสร้างต่างออกมาได้ จึงทำให้เชื้อนี้สามารถอยู่และเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดอย่างแรงในกระเพาะอาหารได้

สาเหตุของการติดเชื้อ *H. pylori* เกิดจากการติดต่อระหว่างคนสู่คน ซึ่งอาจติดมาจากการปนเปื้อนในอาหารและอุจจาระ โดยส่วนมากจะพบอัตราการติดเชื้อตั้งแต่ในเด็ก โดยคาดว่าเป็นการติดเชื้อจากแม่สู่ลูก ซึ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาจะพบการติดเชื้อ *H. pylori* สูงเนื่องจากการดูแลด้านสุขอนามัยที่แตกต่างกัน โดยกลไกในการติดเชื้อในกระเพาะอาหาร คือเชื้อจะใช้เส้นใยขนาดยาวหรือแฟลกเจลลัม (flagellum) รวมถึงรูปร่างที่เป็นเกลียวในการเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในชั้นเยื่อเมือก (mucous) ที่เคลือบอยู่บนเยื่อผิวของกระเพาะอาหารและเข้าไปเกาะอยู่กับเซลล์เยื่อผิว โดยการอยู่ในชั้นเยื่อเมือกจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียถูกขับออกไปจากกระเพาะอาหารจากการบีบตัวของกระเพาะอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีเอนไซม์ urease ที่สามารถย่อยสลายสารยูเรียที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย จึงช่วยให้เกิดภาวะความเป็นด่างทำให้ความเป็นกรดรอบๆ ตัวของแบคทีเรียอ่อนลงได้ ดังนั้นจึงสามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารได้ เมื่อมีแบคทีเรียเข้ามาในร่างกาย ร่างกายจะไปกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ที่อยู่กระแสร่างกายออกมายังบริเวณเซลล์เยื่อผิวของกระเพาะอาหาร และปล่อยสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมา ทำให้เซลล์เยื่อผิวกระเพาะอาหารเกิดการอักเสบทำให้มีโอกาสที่จะเป็นแผลในกระเพาะอาหารหรือในลำไส้เล็กส่วนต้นได้ ดังนั้นในผู้ที่ติดเชื้อจะมีการอักเสบของเซลล์เยื่อผิวกระเพาะอาหารเกิดขึ้น เรียกว่า กระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) ซึ่งการอักเสบจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อและชนิดย่อยของเชื้อ หรืออาจทำให้กลายเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

4.1 แหล่งคาร์บอน ซับสเตรตหลายๆ ชนิดถูกใช้ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์จะได้จากการใช้แหล่งน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์ในการหมัก ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวผลผลิตต่ำ อย่างไรก็ตามแหล่งน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์นั้นมียาฆ่าเชื้อ จึงไม่คุ้มทุน ทำให้มีการใช้ผลผลิตที่เป็นของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น หางนม เวย์ และกากน้ำตาล เป็นต้น (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) จุลินทรีย์ต้องการคาร์บอนเป็นธาตุอาหารหลักเนื่องจากคาร์บอนเป็นส่วนประกอบของสารชีวโมเลกุลหลายชนิดในเซลล์โดยทั่วไป จุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเรียกกลุ่มนี้ว่า Autotrophs ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มที่ได้รับคาร์บอนจากสารอาหาร เช่น กรดอะมิโน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือสารอินทรีย์อื่นๆ จะเรียกกลุ่มนี้ว่า Heterotrophs

4.2 แหล่งไนโตรเจน การเติมสารแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงเพียงพอจะให้ผลที่ดีต่อการผลิตกรดแลคติก อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ซึ่งมีทั้งสารสกัดจากยีสต์ เพปโตน และสารสกัดจากเนื้อดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงสารสกัดจากมอลท์ ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น ดีเอ็นเอ กรดอะมิโน จูลินทรีย์ สามารถนำไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ได้ในหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์เช่น การได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ ไนเตรต ไนไตรท์หรือการได้รับโดยการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เป็นต้น

4.3 อุณหภูมิ การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการสร้างผลผลิตต่อหน่วยเวลาของแบคทีเรียกรดแลคติกยังมีการศึกษาน้อยกว่าผลของอุณหภูมิต่อความเข้มข้นของกรดแลคติก และผลผลิตกรดแลคติกที่ได้ มีการรายงานว่าเชื้อ *L. amylophilus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้ความสามารถในการสร้างผลผลิตต่อหน่วยเวลาและผลผลิตสูงสุด สำหรับเชื้อ *L. casei* และ *L. paracasei* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 37-44 องศาเซลเซียส

4.4 ธาตุอาหารอื่นๆ เช่น ออกซิเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส เป็นต้น ธาตุเหล่านี้มีความจำเป็นต่อกิจกรรมภายในเซลล์ ออกซิเจนเกี่ยวข้องกับการหายใจระดับเซลล์เพื่อสร้างพลังงานในจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบของ กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ซีสเทอีน ซีสตีอีน แบคทีเรียบางชนิดสร้างพลังงานจากการที่ซัลเฟอร์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์ ในขณะที่ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบของหมู่ฟอสเฟตในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการแบ่งเซลล์ (สุขสันติ, 2557)

5. นมพร่องมันเนย (Skim milk)

นมพร่องมันเนย (skim milk) หรือน้ำนมที่ขจัดเอาไขมันออกไป เช่น ไขมัน 0% ไขมัน 0.15% เป็นต้น เหมาะสำหรับคนที่ไม่ต้องการพลังงานจากการดื่มนม แต่ต้องการสารอาหารจากนม จะมีส่วนประกอบโดยประมาณของหางนม ได้แก่ น้ำ (90%) , โปรตีน (3.7%) , แลคโตส (5%) และแร่ธาตุ (1%) ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 กำหนดให้มีปริมาณมันเนย (butter fat) เหลืออยู่ไม่เกิน 0.1% ของน้ำหนักเมื่อนำมาทำแห้ง (dehydration) จะได้นมผงขาดมันเนย (skim milk powder) และ สภานมนานาชาติ (International Dairy Federation ; IDF) ได้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตได้ในผลิตภัณฑ์นมถึง 10^7 กรัมของผลิตภัณฑ์นม (Sahni and Gupta, 2014)

นมพร่องมันเนยมีประโยชน์สำหรับการเสริมสร้างกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นผลการศึกษาใหม่ ที่พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง การดื่มนมพร่องมันเนย กับนมถั่วเหลือง (soy milk) แล้วผู้ที่ดื่มนมพร่องมันเนยจะมีผลกับการเสริมสร้างกล้ามเนื้อที่ดีกว่า และเมื่อยึดผลการศึกษานานออกไปถึง 10 เดือนพบว่า ความแตกต่าง ในการพัฒนาของกล้ามเนื้อของผู้ที่ดื่มนมเมื่อเทียบกับนมถั่วเหลืองแล้ว มี

มากกว่าถึง 2 เท่าตัวที่เดียวสำหรับการตีผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรตีน ที่ดูดซึม "เร็ว" อย่าง Whey Protein หรือ Soy Protein นั้นจะมีส่วนช่วยในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อหลังจากการฝึก ส่วนการตีผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรตีนที่ดูดซึม "ช้า" อย่างเช่นนม จะมีส่วนช่วยป้องกันอาการสูญเสียของกล้ามเนื้ออันเกิดจากการฝึก ซึ่งทั้งสองอย่าง ล้วนแต่มีข้อดี ข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป การเลือกทานให้เหมาะสมทั้งโปรตีนที่ดูดซึมเร็ว และช้า จะช่วยให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด ในการเสริมสร้างและพัฒนากล้ามเนื้อ

นมพร้อมมันเนยถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลากหลายประเภท อาหารหลายประเภท เช่น ซุป ซอส ขนมและเบเกอรี่ ได้รับประโยชน์จากนมพร้อมมันเนยคุณสมบัติที่ดีคือเก็บรักษาได้นาน (Kelly, 2004) ซึ่งอาจจะต้องเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เอื้ออำนวยจึงจะทำให้ไม่มีความเหนียวและความเหนียวเกิดขึ้น

ตารางที่ 2 ตารางโภชนาการของนมผงพร้อมมันเนย

* Nutritional Information per 100 g		
Energy	363 kcal	From Fat 7.2 kcal
% Daily Value		
Total Fat	0.8 g	1.2%
Saturated Fat	0.4	2.0%
Cholesterol	14.5 mg	4.8%
Sodium	581.1 mg	24.2%
Total Carbohydrates	54.0 g	18.0%
Sugar (As lactose)	54.0 g	
Sugar (Added)	0.0 g	
Protein	35.0 g	70.0%
Vitamin A	4.1 mcg	0.2%
Phosphorus	0.8 mg	0.1%
Calcium	1379.9 mg	138.0%

6. การออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยหลายปัจจัย

การออกแบบการทดลองเป็นการออกแบบเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมโดยการหาค่าที่เหมาะสมที่สุด (Optimization) ซึ่งอาศัยแบบจำลองหรือสมการทางคณิตศาสตร์มา อธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณหรือคุณภาพของผลิตภัณฑ์ สามารถศึกษาผลของหลายๆ ปัจจัยพร้อมกันในเวลาเดียวกันด้วยวิธีใช้จำนวนการทดลองน้อยกว่าการศึกษาที่ละปัจจัย การออกแบบการทดลองจึงเป็นวิธีการเก็บข้อมูลที่มีประสิทธิภาพโดยการเปลี่ยนแปลงหรือปรับค่าของ input (factors) อย่างมีจุดมุ่งหมายที่จะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ output (response) ที่เกิดขึ้น กระบวนการที่มีปัจจัย (factor) หรือ input (X_1, X_2, X_3, X_4) ต่างๆ ที่ส่งผลต่อค่า Y ซึ่งเป็นคุณลักษณะด้านคุณภาพ (quality characteristic) ของกระบวนการ ในการออกแบบการทดลองเราต้องการทดลองอย่างเป็นระบบเพื่อที่จะหาความสัมพันธ์เชิงสถิติของ Y และ X ต่างๆ โดยที่พยายามใช้ทรัพยากรในการทดลองให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ความสัมพันธ์เชิงสถิติที่ได้จะทำให้เรามีความรู้เกี่ยวกับกระบวนการ (process knowledge) เพื่อนำไปปรับปรุงกระบวนการต่อไป

6.1 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman

Plackett และ Burman ได้นำเสนอวิธีการออกแบบที่ใช้สำหรับคัดเลือกปัจจัยสำคัญ กรณีมีปัจจัยจำนวนมาก หลังจากนั้นผลงานของพวกเขาก็ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางวิธีการคือเลือกใช้จำนวนการทดลองให้เป็นเลข 4 เท่าของเลขอนุกรม นั่นคือจะมีจำนวนการทดลองเป็น 8, 12, 16, และ 20 โดยให้จำนวนการทดลองมีค่ามากกว่าจำนวนปัจจัยอยู่ 1 เป็นอย่างน้อยเสมอ ดังนั้นเมื่อมีจำนวนปัจจัย 5 ปัจจัย จะได้จำนวนการทดลองเท่ากับ 8 หรือเมื่อมีจำนวนปัจจัย 7 ปัจจัยก็ได้จำนวนการทดลองเท่ากับ 8 เช่นกัน หรืออีกนัยหนึ่งจำนวนการทดลอง 8 การทดลอง สามารถออกแบบการทดลองสำหรับจำนวนปัจจัยได้สูงสุด 7 ปัจจัยนั่นเอง จะเห็นว่าแม้จำนวนปัจจัยเพิ่มขึ้น แต่จำนวนการทดลองอาจจะไม่เพิ่มก็ได้

การออกแบบการทดลองแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการออกแบบการทดลองแบบ แฟคทอเรียล (Factorial) หรืออาจจัดให้เป็นแฟคทอเรียลบางส่วน ที่มีการออกแบบให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตร หรือพัฒนากรรมวิธีการผลิตจาก 4-20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1-4 ปัจจัย โดยที่ไม่ต้องทำการทดลองในขนาดใหญ่ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ได้ การออกแบบการทดลองจะใช้การออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 2 ซึ่งแต่ละปัจจัยจะประกอบด้วย 2 ระดับเป็นพื้นฐาน โดยจะมีแบบแผนมาตรฐานดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Initial block สำหรับแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman

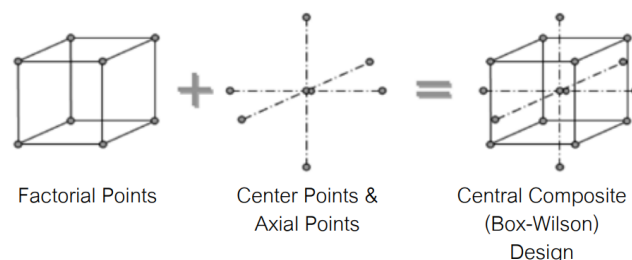
N	Initial block
8	+ + + - + - -
12	+ + - + + + - - - + -
16	+ + + + - + - + + - - + - - -
20	+ + - - + + + + - + - + - - - + + -
24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

* ดัดแปลงจาก Chauhan *et al.* (2007)

6.2 การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design

Central Composite Design (หรือ box-wilson design) เป็นการทดลองที่ 3 ปัจจัย 5 ระดับ (นิยามแทนด้วยสัญลักษณ์ $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) กล่าวคือ จะปรับตัวแปรที่ต้องการศึกษาตัวแปรละ 3 ค่า แต่แทนที่จะปรับตัวแปรแบบ Full Combination หรือ Full Factorial กลับเลือกบาง Runs หรือบางสถานะการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ โดย Model ที่ได้จะยังคงมีทั้ง Main Effect, Interaction และ Quadratic Terms โดยใช้ทรัพยากรไม่มากนักเกินไป

ตัวอย่างของ Central Composite Design สำหรับการศึกษิตัวแปร 3 ตัว ถูกแสดงไว้ดังภาพที่ 3 และตารางที่ 4 ซึ่งจะเห็นได้ว่า Design of experiment (DOE) ประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ 1. Factorial Points ซึ่งในที่นี้เป็นการนำ 2-Level Full Factorial มาเป็นส่วนหนึ่งของการทดลองนั่นเอง 2. Axial Points เป็นการปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในขณะที่ Fix ให้ค่าตัวแปรอื่นอยู่ที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) และ 3. Center Points เป็นการปรับค่าของตัวแปรทุกตัวแปรที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) สำหรับตัวอย่างในตารางที่ 1 เลือกค่า $\alpha = 1$ หรือ ระยะจาก Axial Point ไปยัง Center Point เป็น 1 ซึ่งค่าดังกล่าวมักจะเหมาะสมในทางปฏิบัติ (บางครั้งเรียก design ที่ $\alpha = 1$ แบบนี้ว่า face centered design) (จรัล, 2552)



ภาพที่ 3 Central Composite Design สำหรับ 3 Factors (จรัล, 2552)

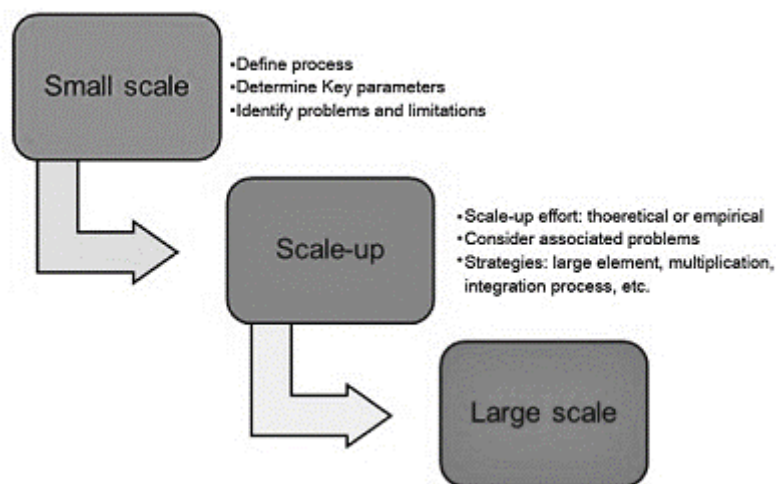
ตารางที่ 4 ตัวอย่างตารางการเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับ 3 Factors

Treatment	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Responses
1	-1	-1	-1	-
2	+1	-1	-1	-
3	-1	+1	-1	-
4	+1	+1	-1	-
5	-1	-1	+1	-
6	+1	-1	+1	-
7	-1	+1	+1	-
8	+1	+1	+1	-
9	$-\alpha$	0	0	-
10	$+\alpha$	0	0	-
11	0	$-\alpha$	0	-
12	0	$+\alpha$	0	-
13	0	0	$-\alpha$	-
14	0	0	$+\alpha$	-
15	0	0	0	-
16	0	0	0	-
17	0	0	0	-
18	0	0	0	-
19	0	0	0	-
20	0	0	0	-

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก จรัล (2552)

7. การขยายกำลังการผลิต (Scale up)

การขยายกำลังการผลิต คือการศึกษาหรือดำเนินการจากการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ โรงงานต้นแบบ เพื่อนำไปสู่ข้อมูลผลิตผล และสร้างการหมักขนาดใหญ่ในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามความสำคัญในระหว่างการขยายกำลังการผลิตต้องสามารถทดสอบขนาดความจุในการหมัก การทำซ้ำ ความสม่ำเสมอ หรือเมื่อปิดการผลิต ผลิตภัณฑ์การหมักในระดับอุตสาหกรรมต้องมีประสิทธิภาพเหมือนกับผลิตภัณฑ์การหมักในระดับห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 4 Scale-up Strategies (Wenten *et al.*, 2016)

วัตถุประสงค์สำคัญในการทำ Scale up นั้น เกิดขึ้นจากความต้องการที่จะนำผลความสำเร็จจากการทดลองในระดับ Lab-scale มาเพิ่มการผลิตเพื่อการพาณิชย์ให้ประสบความสำเร็จ ซึ่งการทำให้ได้ผลสำเร็จอย่างมั่นใจและปลอดภัย จะต้องเริ่มต้นจากการทดลองในระดับ Pilot หรือ Demo Plant ก่อนเพื่อเก็บข้อมูลมาช่วยในการออกแบบ และการดำเนินงาน เพื่อที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจากโรงงานที่ออกแบบในอัตราที่ออกแบบไว้ให้มีคุณภาพ และมีมูลค่าที่สามารถสร้างรายได้ แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ความปลอดภัยทั้งต่อชุมชนและสิ่งแวดล้อมด้วย จึงจะเป็น Successful scale-up

การศึกษาการดำเนินการในระหว่างการขยายกำลังการผลิต ประกอบด้วย การเจริญเติบโตของหัวเชื้อ (Inoculum development) การฆ่าเชื้อที่สมบูรณ์ (Sterilization: Establishing the Process) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น สารอาหารที่สภาพพร้อมใช้งาน ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ ค่าการละลายออกซิเจน ค่าการละลายคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น สภาวะของแรงเฉือน (Shear conditions) และการผลิตโฟม (foam production)

ปัจจัยที่ต้องควบคุมในระหว่างการหมัก คือ อุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมัก (process temperature) ความเป็นกรด-เบส (pH) ปริมาณหัวเชื้อในการผลิตแต่ละขั้นตอน (inoculation percentages (v/v) for each step) การกำหนดการตารางในการเพิ่มอาหารเข้าไปในระหว่างการหมัก (schedule of feed-media additions) และแนวทางในการป้องกันปัญหาและอุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการก้าวกระโดดจาก Lab-scale สู่ Full-scale ยกตัวอย่าง ปัญหาที่มักเกิดขึ้น เช่น ปัญหาสิ่งปนเปื้อน (impurity)

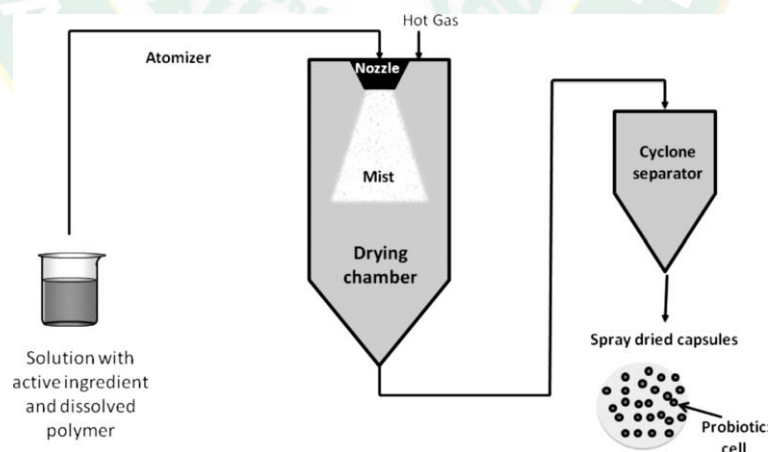
8. การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

เป็นการยืดอายุหรือช่วงระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์อยู่ในบรรจุภัณฑ์และในสภาวะที่กำหนดได้ยาวนานกว่าปกติ ซึ่งยังสามารถรักษาคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในระดับที่กำหนดได้

8.1 สารห่อหุ้ม (carried out)

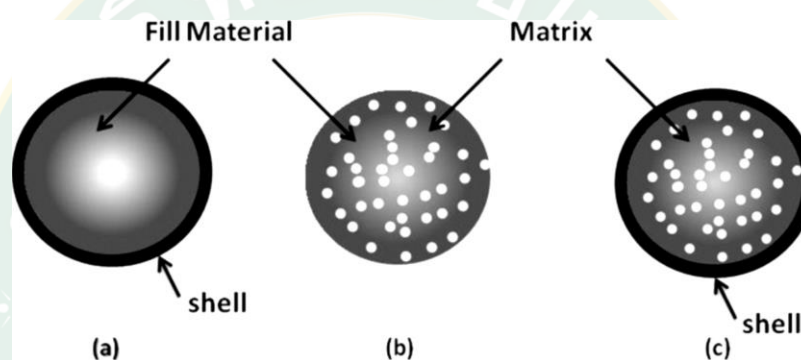
สารห่อหุ้มเป็นสารหรือวัสดุตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้เพื่อป้องกันการทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก สารห่อหุ้มมีหลายชนิด ซึ่งที่นิยมใช้ได้แก่ แอลจินेट แซนแทนกัม แป้ง ซูโครส มอลโตเดกตริน อินูลิน เวย์โปรตีน และนมพร่องมันเนย เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้วัสดุหรือตัวกลางในการห่อหุ้มจุลินทรีย์อย่างเหมาะสมจะทำให้โพรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงขึ้น

Spray drying หรือเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นเทคนิคทำให้อาหารเหลวเป็นละอองสัมผัสกับกระแสลมร้อนภายในห้องอบแห้ง (drying chamber) ทำให้น้ำในอาหารระเหยออกไปอย่างรวดเร็ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นผงแห้ง ตกลงสู่ภาชนะรองรับด้านล่าง ผงบางส่วนที่รวมอยู่กับลมร้อนจะถูกแยกออกด้วยระบบ แยกอาหาร ผงที่ได้มีความชื้นต่ำกว่า 5% สอดคล้องกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข เกี่ยวกับความชื้นของอาหารสำเร็จรูป และเครื่องตีชนิดแห้งที่มีการควบคุมความชื้นอยู่ในระดับ 5-10% จึงนิยมใช้ผลิตอาหารแห้งหรืออาหารที่เป็นผง ข้อควรระวัง ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพและคุณภาพ ของอาหารที่ทำแห้งด้วย เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ได้แก่ อัตราการไหลของ อาหารเหลวขาเข้า (feed) ความหนืดของอาหารเหลว อุณหภูมิของลมร้อนขาเข้า



ภาพที่ 5 แสดงแบบแผนของระบบการห่อหุ้มแบบ matrix type ของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Burgain *et al.*, 2011)

เทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) คือ กระบวนการห่อหุ้มสารบางชนิด เช่น วิตามิน ยารักษาโรค สารต้านอนุมูลอิสระ และจุลินทรีย์ เป็นต้น ด้วยพอลิเมอร์ให้อยู่ในรูปของแคปซูลชั้นบางๆ ขนาดเล็ก เรียกว่า ไมโครแคปซูล ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 จนถึง 1,000 ไมครอน เพื่อประโยชน์ในการคงตัวของสารตลอดการใช้งาน การห่อหุ้มสารที่มีความไวต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ไวต่อแสง อุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง เป็นต้น จะทำให้สารดังกล่าวมีความคงตัวดีขึ้นและเก็บรักษาได้ยาวนาน กระบวนการดังกล่าวยังช่วยป้องกันสารที่ระเหยง่าย นอกจากนี้การนำสารที่เป็นของเหลวมาอยู่ในไมโครแคปซูลอาจช่วยลดการทำปฏิกิริยาของสารผสม สะดวกต่อการนำไปใช้งาน รวมทั้งสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารไปสู่บริเวณที่ต้องการในเวลาที่เหมาะสมได้ จึงมีประโยชน์ช่วยลดความเสี่ยงในการใช้สาร



ภาพที่ 6 แสดงแบบแผนของระบบการห่อหุ้ม : (a) แบบกักเก็บ (reservoir type), (b) matrix type และ (c) coated matrix type (Burgain *et al.*, 2011)

โดยการจำแนกประเภทของไมโครแคปซูล แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ซึ่ง Reservoir type คือสารที่ต้องการห่อหุ้มอาจเป็นชนิดเดียวหรือไม่ก็ได้กระจายตัวอยู่ภายในส่วนของ encapsulation material ที่เป็น shell เรียกว่า core ส่วน Matrix type สารที่เราต้องการห่อหุ้มจะกระจายตัวอยู่ใน encapsulation material โดยเทคนิคการ encapsulation มีหลายวิธีด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น กระบวนการทางกายภาพ (physical process) ได้แก่ spray drying, freeze drying, spray chilling และ extrusion เป็นต้น กระบวนการทางเคมี (chemical process) ได้แก่ coacervation เป็นต้น และ กระบวนการทางเคมีฟิสิกส์ (Physicochemical) ได้แก่ phytosome และ liposome เป็นต้น

จากงานวิจัยของ Maciel *et al.* (2014) ที่ได้ทำการศึกษาเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (Microencapsulation) ของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* La-5 จากการสเปรย์ทรายโดยใช้สารจากผงเวย์ (sweet whey) และนมพร้อมมันเนยเป็นวัสดุห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก และพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์และยังทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง และนอกจากนี้

เขายังทดสอบอายุการเก็บรักษาซึ่งพบว่าเชื้อมีอัตราการลดลงจากเดิมเพียง 0.43 log CFU/g ในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน

8.2 อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ (Shelf life)

อายุการเก็บรักษา หมายถึง ช่วงระยะเวลาที่อาหารอยู่ในบรรจุภัณฑ์และการเก็บรักษาในสภาวะที่กำหนด ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารให้อยู่ในระดับที่กำหนดได้

ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้กำหนดอายุการเก็บของอาหาร ยกตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนแปลงทางเคมี (การเปลี่ยนสี (discolouration) การหืน (rancidity) การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส (staling และ texture) การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ (microbial spoilage และ ปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเกณฑ์ด้านความปลอดภัย) กฎระเบียบแนวทางปฏิบัติที่เกี่ยวข้องกับ food safety (*Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum*)

คุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยปกติแล้วการเปลี่ยนแปลงในขณะเก็บรักษาเป็นสิ่งที่ไม่เป็นที่ต้องการในการเก็บรักษา เพราะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะ ความคงตัว กลิ่นรส และเนื้อสัมผัส การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความสำคัญมากในการวิเคราะห์อายุการเก็บผลิตภัณฑ์ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหารทุกชนิดจะเปลี่ยนไปเมื่อเก็บรักษา อายุการเก็บผลิตภัณฑ์เป็นค่าที่ประมาณได้ยาก เนื่องจากถ้าใช้วิธีทดสอบอายุการเก็บตามหลักการคือ บรรจุอาหารตามเงื่อนไขการผลิต ตั้งไว้ในสภาวะที่ต้องการหาค่าอายุการเก็บจริง กำหนดค่าช่วงเวลาของการทดสอบแล้วนำตัวอย่างอาหารมาตรวจวัดค่าตัวแปรที่ใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพ ติดตามดูเวลาเก็บ เท่าใดที่ทำให้อาหารที่บรรจุเสื่อมสภาพ แต่การทดลองดังกล่าวให้เวลายาวนานและหากต้องการตรวจผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก เวลาที่ใช้ในการทดลองในแต่ละสภาวะจะเพิ่มมากขึ้นและในทางอุตสาหกรรมไม่สามารถรอผลการทดลองยาวนานได้ ดังนั้นจึงมีการทดลองในสภาวะเร่ง โดยทดสอบการเก็บตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเรียกว่า การทดสอบในสภาวะเร่ง (Accelerated Shelf Life Test, ASLT)

accelerated shelf life testing (ASLT) คือ การหาอายุการเก็บรักษาโดยใช้วิธีการประเมินทางวิทยาศาสตร์ ด้วยการใช้ค่า Q_{10} Factor ซึ่งเป็นวิธีการสากลที่นิยมใช้ในการหาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้เวลาการหาสั้นและประหยัดค่าใช้จ่าย แต่สามารถคาดคะเนอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาต่างๆ ได้ โดยไม่ต้องทดลองทุกอุณหภูมิ และยังใช้ประเมินอายุการเก็บที่เหลือหลังจากการเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วได้เช่นกัน แต่มีข้อจำกัดสำหรับอาหารบางชนิด เช่น การเพิ่มอุณหภูมิในระยะการบ่มอาจจะเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลง กระบวนการทางเคมีและกายภาพบางชนิด ทำให้การคาดคะเนอายุมีความคลาดเคลื่อนได้ (ธนกิจ และคณะ, 2561)

ซึ่งการอธิบายความสัมพันธ์ของค่า Q_{10} และ Q_1 ได้ต่อไปนี้

$$Q_{10} = \frac{\theta_s(T)}{\theta_s(T+10)} \quad \text{และ} \quad Q_1 = \frac{0.1}{10} \quad Q^{\Delta T} = \frac{Q_s(T)}{Q_s(T+\Delta T)}$$

เมื่อ $\theta_s(T)$ = อายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ T (วัน)

$\theta_s(T+10)$ = อายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ T + 10 (วัน)

Q_{10} = อัตราส่วนของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีอุณหภูมิต่างกัน 10 องศาเซลเซียส

Q_1 = อัตราส่วนของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีอุณหภูมิต่างกัน 1 องศาเซลเซียส

ΔT = ผลต่างของอุณหภูมิที่ทำนายกับ อุณหภูมิ T

จากงานวิจัยของ Achour *et al.* (2001) ที่ได้ทำการศึกษาอายุการเก็บรักษาในสภาวะเร่ง (accelerated shelf life testing) และอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactococcus* ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Lactococcus* มีอัตราการรอดชีวิตสูงในภาพรวม และมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เฉลี่ยอยู่ที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเทียบกับ 43 วันในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และงานวิจัย Senz *et al.* (2015) ที่ได้ทำการศึกษาการควบคุมลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โพรไบโอติก *L. acidophilus* เพื่อเพิ่มการคงตัวในระหว่างกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และนอกจากนี้ยังได้ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แบบสภาวะเร่ง (accelerated shelf life test, ASLT) ในการออกแบบการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 4, 20, 26, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ค่าทำนายการรอดชีวิต ในเวลา 2 (60 องศาเซลเซียส) ถึง 520 วัน (4 องศาเซลเซียส) ซึ่งในส่วนของผลการหาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์พบว่าตัวอย่างที่ทำการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่าอายุการเก็บรักษาที่ดีที่สุด ซึ่งการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRSD มีอายุการเก็บรักษาสูงถึง 7 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร GEM

9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cruchet *et al.* (2003) ได้ศึกษาในกลุ่มเด็กนักเรียนอายุระหว่าง 6-17 ปี 326 คนในประเทศชิลีซึ่งพบว่ามีการติดเชื้อ *H. pylori* โดยแบ่งนักเรียนเป็น 5 กลุ่ม คือกินผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเชื้อ *L. johnsonii* La1 (กลุ่มที่ 1) เชื้อ *L. paracasei* ST11 (กลุ่มที่ 3) เชื้อตายของ La1 (กลุ่มที่ 2) เชื้อตายของ ST11 (กลุ่มที่ 4) และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5) ทำการทดลองให้กินผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การกินเชื้อ *L. johnsonii* La1 อย่าง

สม่าเสมอจะช่วยขัดขวางการยึดเกาะของ *H. pylori* ในกลุ่มประชากรที่ศึกษานี้ได้ และช่วยลดความรุนแรงของผลจากการติดเชื้อ *H. pylori* นี้ได้

Bergonzelli *et al.* (2006) ทำการศึกษาโปรตีน GroEL ที่อยู่บนผนังเซลล์ของ *L. johnsonii* La1 ซึ่งยืนยันการมีอยู่ได้จากการใช้เทคนิค whole cell enzyme-linked immunosorbent assay นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวนี้ใน supernatant ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง La1 ด้วย ซึ่งคาดว่าจะถูกส่งออกมาจากเซลล์ไม่ใช่เกิดจากเซลล์ที่แตก โปรตีน GroEL ได้ถูกโคลนใน *E. coli* ซึ่ง recombinant GroEL ที่ได้นี้ได้ถูกนำไปจับ (binding) กับเยื่อเมือกและเยื่อเซลล์ผิว epithelial cell ของผนังลำไส้ผลการทดลองพบว่า GroEL นี้มีบทบาทช่วยให้ La1 ยึดจับกับเยื่อเมือกและเซลล์ผนังลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน GroEL กระตุ้นการหลั่ง interleukin-8 ใน macrophage และ HT29 cells ได้ และผลจากการทดลองที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก คือโปรตีน GroEL ของเชื้อ La1 นี้ สามารถกระตุ้นการจับตัวกันเองของเชื้อ *H. pylori* ได้

Yamano *et al.* (2007) ทำการศึกษาคุณสมบัติในการทนต่อกรดน้ำดีและกรดน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยได้ทดสอบการทนต่อกรดน้ำดี 0.1% เป็นเวลา 15 ชั่วโมงและกรดน้ำย่อยในกระเพาะอาหารนาน 3 ชั่วโมงของแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* La1 เปรียบเทียบกับโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆ (*L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *B. longum* และ *B. breve*) พบว่า *L. johnsonii* La1 มีความสามารถในการทนกรดน้ำดีได้และทนต่อกรดน้ำย่อยในกระเพาะอาหารได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่น และได้ทำการศึกษาคูณสมบัติในการยึดเกาะกับ Caco-2 cell โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับ *in vitro* พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* La1 มีความสามารถในการยึดเกาะกับ Caco-2 cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* La3, La4, La5, La7, La10 และ La18

Pridmore *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติในการผลิต Hydrogen peroxide โดยทำการศึกษากการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* NCC533 ที่แยกได้จากลำไส้ของมนุษย์ พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิต Hydrogen peroxide ได้ถึง 617 ± 20 ไมโครโมล และสารที่ผลิตได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 ได้

Aiba *et al.* (2017) ที่ได้ทำการศึกษากการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *H. pylori* โดยใช้แบคทีเรีย *L. johnsonii* No. 1088 ที่ไม่มีชีวิตแล้ว และที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน ผลการทดลองพบว่าในระดับหลอดทดลองเชื้อ *L. johnsonii* No. 1088 ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนแล้วมีความสามารถในการต้านเชื้อ *H. pylori* ลงได้ และเมื่อนำมาทดสอบในหนูทดลองที่ทำให้ติดเชื้อ *H. pylori* ก่อน หลังจากนั้น 24 วัน ทำการทรีต *L. johnsonii* No. 1088 ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนความเข้มข้น 6.8×10^8

cell/mice เป็นระยะเวลา 21 วัน ผลการทดลองพบว่าปริมาณของเชื้อ *H. pylori* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

Aiba *et al.* (2015) ที่ได้ศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* No. 1088 ในการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* พบว่าเมื่อทำการทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (mixed cultures) ปริมาณหรืออัตราของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลดลงอย่างชัดเจน และเมื่อนำมาทดสอบในหนูทดลองที่ทำให้ติดเชื้อ *H. pylori* พบว่าเมื่อพรีตด้วยแบคทีเรีย *L. johnsonii* No. 1088 ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เชื้อก่อโรคมียังมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *L. johnsonii* No. 1088 สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดี และสามารถลดจำนวนของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลงได้

Bulatović *et al.* (2014) หางนมที่เสริมด้วยสารสกัดยีสต์ 3.0% และอินนูลิน 1 % ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เมื่อทำการหมักแล้วการเจริญเติบโต *L. johnsonii* NRRL B-2178 และยังสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน

Hofvendahl and Hahn-Hagerdal (2000) การเติมสารแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงเพียงพอจะให้ผลที่ดีต่อการผลิตกรดแลคติก และซัสเตรทหลายๆ ชนิดถูกใช้ในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์จะได้จากการใช้แหล่งน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์ในการหมัก ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวผลผลิตต่ำ อย่างไรก็ตามแหล่งน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์นั้นมีราคาแพงจึงไม่คุ้มทุน ทำให้มีการใช้ผลผลิตที่เป็นของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น หางนม เว้ย และกากน้ำตาล เป็นต้น

Pantoflickova *et al.* (2003) *L. johnsonii* ในนมสามารถช่วยให้เยื่อเมือกของกระเพาะอาหารมีความหนาขึ้นและลดความเสี่ยงของการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เกิดจากเชื้อ *H. pylori*

La Ragione *et al.* (2004) *L. johnsonii* ในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก การศึกษาครั้งนี้พบว่า *L. johnsonii* ในลำไส้ไก่ช่วยยับยั้งโรคที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli* และ *Clostridium perfringens* ดังนั้น *L. johnsonii* จึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้โดยตรงในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกเพื่อเป็นทางเลือกแทนยาต้านจุลชีพ

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CK3	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
1.2 <i>Lactobacillus johnsonii</i> VCF 2-9	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
1.3 <i>Lactobacillus johnsonii</i> JCM1022	JCM, Japan
1.4 <i>Lactobacillus johnsonii</i> JCM8791	JCM, Japan
1.5 <i>Helicobacter pylori</i> ATCC49503	ATCC, USA
1.6 <i>Escherichia coli</i>	-
1.7 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	-
1.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	-
1.9 <i>Proteus vulgaris</i>	-

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.1 De Man, Rogosa, and Sharpe agar	Himedia, India
2.2 Eosin Methylene Blue agar	Himedia, India
2.3 <i>Salmonella-Shigella</i> agar	Himedia, India
2.4 Columbia Sheep Blood Agar	Biomedica, Thailand
2.5 Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar)	Himedia, India
2.6 Nutrient Broth (NB)	Himedia, India

3. สารเคมี

3.1 Lactic acid	RCI labscan, Thailand
3.2 ซูโครส (sucrose)	Fluka, Japan
3.3 Yeast extract	Himedia, India
3.4 Ammonium sulfate	RCI labscan, Thailand
3.5 Ammonium dihydrogen orthophosphate	Univer, Australia
3.6 Bromocresol purple	Fisher scientific, Thailand
3.7 Sodium chloride	Univer, Australia

3.8 เอนไซม์เพปซิน (pepsin)	-
3.9 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป	TIANamp Bacteria DNA Kit, China
3.10 Tris HCl	ChemCruz™ , Netherland
3.11 Coomassie blue	-
3.12 SDS (sodium dodecyl sulphate)	-
3.14 Tris base	-
3.15 Methanol	RCI labscan, Thailand
3.16 Acetic acid	RCI labscan, Thailand
3.17 β -mercaptoethanol	-
3.18 Acrylamide mix	Bio-rad, USA
3.19 Ammonium persulfate	RCI labscan, Thailand
3.20 TEMED	Himedia, India
3.21 Protein ladder	Bio-helix, Taiwan
3.22 Fetal bovine serum (FBS)	Gibco, Brazil
4. อุปกรณ์	
4.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	Genesys 20
4.2 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	Binder, USA
4.3 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)	Vortex-Genie-2, USA
4.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance)	Mettler-Toledo, Switzerland
4.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance)	OHAUS, USA
4.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (autoclave)	Sturdy, Thailand
4.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert, Germany
4.8 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)	Microtech, Thailand
4.9 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (incubator)	Gallenkamp
4.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Drawell
4.11 ไมโครเวฟ (microwave)	Sharp, Japan
4.12 ไมโครปิเปต (automatic pipette)	Gilson, France
4.13 ไมโครปิเปตทิป (pipette tip)	Hycon
4.14 งานเพาะเชื้อ (petri dish)	Hycon

4.15 หลอดทดลอง (test tubes)	PYREX
4.16 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack stainless)	-
4.17 ปีกเกอร์ (beaker)	KIMAX, USA
4.18 แท่งแก้วคนสาร (glass stirring rod)	-
4.19 กระบอกตวง (cylinder)	-
4.20 ขวดฝาเกลียว (duran)	Schott Duran, Germany
4.21 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)	Superclear, USA
4.22 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)	Schott Duran, Germany
4.23 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)	JSGW
4.24 ช้อนตักสาร (spatula)	-
4.25 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spatula)	-
4.26 พาราฟิล์ม (Parafilm)	BEMIS, USA
4.27 Gas pack	BD BBL™
4.28 โถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)	BD BBL™
4.29 colorimeter NR200	3nh
5. วัตถุดิบ	
5.1 ถั่วเหลือง (Soy bean)	Khaothong, Thailand
5.2 ถั่วเขียว (Mung bean)	Khaothong, Thailand
5.3 ถั่วดำ (Black bean)	Khaothong, Thailand
5.4 ถั่วแดง (Red bean)	Raitip, Thailand
5.5 นมผง (Anlene)	Anlene, Thailand
5.6 นมพร่องมันเนยผง (Skim milk powder)	Cottage Farm
5.7 นมพร่องมันเนย (Foremost)	Foremost, Thailand

วิธีการทดลอง

1. แแบคทีเรีย *L. johnsonii*

รวบรวมแบคทีเรีย *L. johnsonii* ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งแยกได้มาจากระบบทางเดินอาหารของไก่ (Niamsup *et al.*, 2003) และมีการเก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 20% แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำแต่ละไอโซเลตมากระตุ้นด้วยอาหารเหลวสูตร MRS จากนั้นยืนยันสปีชีส์อีกครั้งด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA โดยสกัด DNA ด้วย TIANamp Bacteria DNA Kit (China) ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และนำส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ 16S rRNA แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

นำลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *L. johnsonii* มาวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยโปรแกรม ClustalX สร้างสายวิวัฒนาการโดย alignment และทำ Bootstrap Neighbour-Joining tree แสดงผลในรูปสายวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Treeview วิเคราะห์หาค่า Bootstrap

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ *L. johnsonii*

2.1 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

ทำการขีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหาร blood agar (7% (v/v) sheep blood) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (Pieniz *et al.*, 2014) บันทึกลักษณะอาหารรอบโคโลนี ได้แก่ ไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) รอบโคโลนีเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบางส่วน (α -hemolysis) และรอบโคโลนีเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ทั้งหมด (β -hemolysis)

2.2 การทดสอบความสามารถในการทนกรด

ทำการเตรียมหัวเชื้อ *L. johnsonii* โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) แล้วปรับความขุ่นให้อยู่ที่ 0.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีและทำการล้างเซลล์โดยทำซ้ำอีก 2 รอบ จากนั้นดูดหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 2.5 และมีการเติมเอนไซม์เพปซิน 0.5% ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 1, 2 และ 3 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต โดยวิธีการเจือจางเป็นลำดับขั้น (Serial dilution) ครั้งละ 10 เท่า ด้วย 0.85% (w/v) Sodium chloride และหยดสารแขวนลอยของเชื้อในแต่ละหลอดการเจือจางปริมาณ 0.02

มิลลิลิตร บนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการตรวจสอบนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารในหน่วย CFU/ml โดยเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Rajam *et al.* (2012)

2.3 การทดสอบความสามารถในการทนน้ำดี

ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Ymano *et al.* (2007) เตรียมหัวเชื้อ *L. johnsonii* โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) แล้วปรับความขุ่นให้อยู่ที่ 0.5 จากนั้นดูดหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร MRS broth ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.2 และมีการเติมน้ำดี (oxgall bile) 0.3% (w/v) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เชื้อที่รอดชีวิตในชั่วโมงที่ 0, 1, 2 และ 3 ในหน่วย CFU/ml ด้วยเทคนิคเช่นเดียวกับข้อ 2.2

2.4 การทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง (Auto-aggregation Assay)

ทำการเพาะเชื้อลงในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยการล้างเซลล์ 2 รอบด้วยน้ำเกลือฆ่าเชื้อ แล้วเติม phosphate-buffered saline (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.2 ทำการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) แล้วปรับความขุ่นให้อยู่ที่ 0.5 จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการสังเกตการเกาะกลุ่มกันและตกตะกอนของเซลล์ที่ก้นหลอดและส่วนของสารละลาย PBS ทำการเก็บตัวอย่างสารแขวนลอยส่วนบนในชั่วโมงที่ 0 และ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า % aggregation ตามสูตรดังนี้

$$(1 - [A_t / A_0]) \times 100$$

เมื่อ A_t = ค่าการดูดกลืนแสงเวลา 2 ชั่วโมง และ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงเวลา 0 ชั่วโมง (Tarep *et al.*, 2013)

2.5 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบโดยใช้เทคนิค agar diffusion disk method ซึ่งดัดแปลงมาจาก Ghezziel *et al.* (2019) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. johnsonii* ในอาหารเหลวสูตร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% Sodium chloride ปรับปริมาตรเชื้อโดยใช้ 0.85% sodium chloride ให้ได้ตามความเข้มข้นของเชื้อตามมาตรฐาน 0.5 McFarland Standard แล้วทำการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ได้ป้ายลงบนอาหาร MRS agar หลังจากนั้นจึงนำแผ่นยาปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิด คือ cefoxitin (30 µg),

tetracycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), vancomycin (30 µg), ampicillin (10 µg) และ ceftriaxone (30 µg) วางลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS ที่ได้มีการ swab เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยระยะห่างของแผ่นยาแต่ละชนิดควรมีระยะห่างที่เหมาะสมแก่การอ่านผล และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการอ่านผลโดยการวัดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบแผ่นยาปฏิชีวนะ บันทึกขนาดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น แล้วเทียบขนาดวงใสกับฐานข้อมูล CLSI ปี 2017

2.6 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

2.6.1 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยใช้เทคนิค agar spot test

ใช้เทคนิค agar spot test ซึ่งดัดแปลงมาจาก Shokryazdan *et al.* (2014) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. johnsonii* ในอาหารเหลวสูตร MRS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน และทำการขีดเชื้อ *L. johnsonii* ลงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ MRS คัดเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อมาทำการ spot ลงบนจานอาหารแข็ง MRS ที่งไว้ให้แห้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจนทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* ในอาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion soft agar (BHI) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะที่มีอากาศ ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีค่า pH 7.2 ลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้กลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่า (Vortex) แล้วนำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคไปปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 0.5 ทำการถ่ายเชื้อที่ปรับค่าความขุ่นแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว BHI ที่มีวุ้น 0.7% หลังจากนั้นนำมาเททับบนจานอาหารแข็ง MRS ที่ได้ทำการ Spot เชื้อ *L. johnsonii* ไว้ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่มีวุ้น 0.7% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งในหลอดมีเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งโดยการสังเกตดูจากการเกิดวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบเขตที่เรียกจนสุดขอบวงใสของการยับยั้งและบันทึกขนาดวงใสที่เกิดขึ้น

2.6.2 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* โดยใช้เทคนิค mixed cultures

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรค *H. pylori* ภายใต้สภาวะ microaerophilic ในโถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ที่มี gas pack (CO_2 absorption) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. johnsonii* ในสภาวะไร้ออกซิเจน

ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใส เป็นตัวอย่างสารละลายของ extracellular product และนำตะกอนเซลล์มาละลายกับน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน และทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ภายใต้สภาวะ Ampl 65 % pulse on 30 วินาที pulse off 10 วินาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสเป็นตัวอย่างของ intracellular product จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *H. pylori* โดยใช้เทคนิค mixed cultures โดยทำการผสมตัวอย่างเชื้อก่อโรค *H. pylori* กับตัวอย่างสารละลายที่เป็น extracellular product และ intracellular product ในอัตราส่วน 1:0, 1:1 และ 0.5:1.5 ทำการบ่มตัวอย่างภายใต้สภาวะ microaerophilic ในโถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ที่มี gas pack (CO₂ absorption) ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0 และ 24 ชั่วโมง และนับจำนวนแบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิต โดยวิธีการเจือจางเป็นลำดับขั้น (Serial dilution) ครึ่งละ 10 เท่า ด้วย 0.85% (w/v) Sodium chloride แล้วเลือกกระดบความเจือจางที่เหมาะสม ทำการ drop บนอาหาร blood agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน ภายใต้สภาวะ microaerophilic ในโถบ่มไร้ออกซิเจนที่มี gas pack (CO₂ absorption) ทำการตรวจสอบนับจำนวนเชื้อก่อโรค *H. pylori* ที่สามารถเจริญบนอาหาร blood agar (CFU/ml) และบันทึกผล (Aiba *et al.*, 2015)

2.6.3 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยใช้เทคนิคการจับตัวกัน (aggregation assay)

เพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรค *H. pylori* ภายใต้สภาวะ microaerophilic เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.6.2 นำมาทดสอบการจับตัวกันโดยใช้ตัวอย่างสารละลาย extracellular product และ intracellular product ของเชื้อ *L. johnsonii* ที่เตรียมได้จากการทดลอง (ข้อ 2.6.2) โดยผสมสารแขวนลอยของ *H. pylori* กับตัวอย่างสารละลายผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจาก *L. johnsonii* แต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการจับตัวกันของเซลล์ *H. pylori* ภายในกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ ทำการทดสอบการกระตุ้นการจับตัวของเซลล์ *H. pylori* โดยสารแขวนลอยของเซลล์ที่สมบูรณ์ของ *L. johnsonii* และสารละลายบัฟเฟอร์ (ชุดการทดลองควบคุม) ด้วย

2.6.4 การวิเคราะห์โปรตีน GroEL เบื้องต้นโดยใช้เทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. johnsonii* ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดละลายส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์

ที่ได้มาแขวนลอยในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน และทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ ภายใต้สภาวะ Ampl 65% pulse on 30 วินาที pulse off 10 วินาที อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำของผสมที่ได้มาปั่นเหวี่ยงผ่าน amicon ultra centrifugal filters ขนาดรูพรุน (MW cut off) 50 kDa, 30 kDa และ 3 kDa ตามลำดับ นำตัวอย่างสารละลายส่วนใสที่ผ่านการกรองแต่ละขั้นตอนมาวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวและประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (ดังภาคผนวก ง) อ่านผลและบันทึกผลจากแผ่นเจลที่เทียบกับ protein marker แล้ววิเคราะห์ประมาณค่าของน้ำหนักโมเลกุล

3. การออกแบบสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii*

3.1 การคัดเลือกองค์ประกอบอาหารหลักที่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii*

ทำการคัดเลือกองค์ประกอบหลักที่เหมาะสมจากวัตถุดิบต่างๆ ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วแดง ถั่วเหลือง โดยกรรมวิธีเมล็ดพืชตระกูลถั่วนั้น ทำการเตรียมโดยแช่ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วแดง และถั่วเหลือง ด้วยอัตราส่วน 1 กรัม : 5 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วกรองน้ำออกและนำไปปั่นละเอียด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำให้เป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที แล้วจึงนำมากรองด้วยผ้าสีขุ่นร้อน รอให้เย็น บันทึกปริมาตรและเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอาหารทดสอบเลี้ยงเชื้อต่อไป

ในการทดสอบประสิทธิภาพกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *L. johnsonii* โดยวัตถุดิบแต่ละชนิดทำได้โดยนำวัตถุดิบแต่ละชนิดเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย *L. johnsonii* ลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS ทั้งนี้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของ *L. johnsonii* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS

เมื่อได้องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ จึงนำมาศึกษาระดับที่เหมาะสมโดยศึกษาที่ความเข้มข้นของแข็ง 5-20% (w/v) หลังจากถ่ายหัวเชื้อ *L. johnsonii* ลงไป ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในหน่วย log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 รวมทั้งหาร้อยละของประสิทธิภาพการผลิต (Productivity) ในหน่วย CFU/ml/h ต่อไป

3.2 การคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *L. johnsonii*

ศึกษาปัจจัยทั้งหมด 8 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) แอมโมเนียมฟอสเฟต ((NH₄)₃PO₄) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) น้ำตาลซูโครส ปริมาณหัวเชื้อ อุณหภูมิ นมผง

พว่องมันเนย และเวลาการเพาะเลี้ยง ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *L. johnsonii* ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ชนิด N=11 โดยกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยดังตารางที่ 4 ทำให้ได้จำนวนหน่วยการทดลองทั้งสิ้น 12 ทริตเมนต์ พร้อมกับเตรียมอาหารตามตารางที่ 5 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและทำการเติมหัวเชื้อ *L. johnsonii* ตามปริมาณที่ได้กำหนดไว้ในแต่ละทริตเมนต์และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะและเวลาที่กำหนดไว้สำหรับแต่ละทริตเมนต์ เก็บตัวอย่างแต่ละทริตเมนต์ มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) โดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Design-Expert® Software Version 7.0.0

ตารางที่ 5 การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยโดยการออกแบบ Plackett and Burman

ปัจจัย	ระดับสูง	ระดับต่ำ
แอมโมเนียมซัลเฟต (%)	1	0.01
แอมโมเนียมฟอสเฟต(%)	1	0.01
สารสกัดยีสต์ (%)	2.5	0.05
น้ำตาลซูโครส (%)	5	0.05
ปริมาณหัวเชื้อ (ml)	5	0.5
อุณหภูมิ (°C)	45	25
นมผงพว่องมันเนย (%)	5	0.5
เวลาการเพาะเลี้ยง (h)	3	18

ตารางที่ 6 แผนการทดลอง Plackett-Burman ของทั้ง 8 ปัจจัย

ทริตเมนต์	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.00	1.00	0.05	5.00	5.00	45.00	0.50	3.00
2	0.01	1.00	2.50	0.05	5.00	45.00	5.00	3.00
3	1.00	0.01	2.50	5.00	0.50	45.00	5.00	18.00
4	0.01	1.00	0.05	5.00	5.00	20.00	5.00	18.00
5	0.01	0.01	2.50	0.05	5.00	45.00	0.50	18.00
6	0.01	0.01	0.05	5.00	0.50	45.00	5.00	3.00
7	1.00	0.01	0.05	0.05	5.00	20.00	5.00	18.00
8	1.00	1.00	0.05	0.05	0.50	45.00	0.50	18.00
9	1.00	1.00	2.50	0.05	0.50	20.00	5.00	3.00
10	0.01	1.00	2.50	5.00	0.50	20.00	0.50	18.00
11	1.00	0.01	2.50	5.00	5.00	20.00	0.50	3.00
12	0.01	0.01	0.05	0.05	0.50	20.00	0.50	3.00

หมายเหตุ : 1 = แอมโมเนียมซัลเฟต (%), 2 = แอมโมเนียมฟอสเฟต (%), 3 = สารสกัดยีสต์ (%), 4 = น้ำตาลซูโครส (%), 5 = ปริมาณหัวเชื้อ (ml), 6 = อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C), 7 = นมผงพร่องมันเนย (%) และ 8 = เวลาการเพาะเลี้ยง (h)

3.3 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii*

จากปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii* ได้แก่ อุณหภูมิ นมผงพร่องมันเนย และเวลา ทำการศึกษาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยด้วยแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ชนิด 3 ปัจจัย โดยกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยดังตารางที่ 7 ได้หน่วยการทดลองทั้งสิ้น 20 ทริตเมนต์ ดังตารางที่ 8 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละทริตเมนต์ไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและทำการเติมหัวเชื้อ *L. johnsonii* ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละทริตเมนต์ ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่กำหนดตามแผนการทดลองในตารางที่ 8 เก็บตัวอย่างแต่ละทริตเมนต์ มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับอัตราการเจริญของ *L. johnsonii* จากนั้นนำค่าที่ได้ไปประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Design-Expert® Software Version 7.0.0

ตารางที่ 7 การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยโดยการออกแบบ Central composite design (CCD) ของทั้ง 3 ปัจจัย

ทรีตเมนต์	หน่วย	ระดับต่ำ	ระดับกลาง	ระดับสูง
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	15	32.50	50
นมผงพร้อมมันเนย	เปอร์เซ็นต์	1.5	3.25	5
เวลาการเพาะเลี้ยง	ชั่วโมง	12	24	36

ตารางที่ 8 แผนการทดลอง Central composite design (CCD) ของทั้ง 3 ปัจจัย

ทรีตเมนต์	อุณหภูมิ (°C)	นมผงพร้อมมันเนย (%)	เวลาการเพาะเลี้ยง (h)
1	15.00	1.50	12.00
2	50.00	1.50	12.00
3	15.00	5.00	12.00
4	50.00	5.00	12.00
5	15.00	1.50	36.00
6	50.00	1.50	36.00
7	15.00	5.00	36.00
8	50.00	5.00	36.00
9	3.07	3.25	24.00
10	61.93	3.25	24.00
11	32.50	0.31	24.00
12	32.50	6.19	24.00
13	32.50	3.25	3.82
14	32.50	3.25	44.18
15	32.50	3.25	24.00
16	32.50	3.25	24.00
17	32.50	3.25	24.00
18	32.50	3.25	24.00
19	32.50	3.25	24.00
20	32.50	3.25	24.00

4. ทดสอบขยายกำลังการผลิตชีวมวลของ *L. johnsonii* ในถังหมักขนาด 20 ลิตร

ทำการขยายกำลังการผลิต (Scale-up) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 15 ลิตร โดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้ทำการออกแบบและพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ ใช้รูปแบบการหมักแบบกะ (batch fermentation) เริ่มจากทำการเตรียมหัวเชื้อโดยการเพาะเลี้ยง *L. johnsonii* ในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์ทั้งหมดเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 150 มิลลิลิตรเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 ลิตร ในถังหมักขนาด 20 ลิตร โดยใช้นมผงพว่องมันเนย 30% (w/v) แล้วทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมหัวเชื้อลงไป ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างวัดอัตราการเจริญในช่วงเวลา 0, 12, 15, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS

5. ศึกษาความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปผงโปรไบโอติก *L. johnsonii*

จากการขยายกำลังการผลิตตามวิธีข้างต้น แล้วจึงทำการทดสอบความสามารถในการทำแห้ง เซลล์โปรไบโอติก *L. johnsonii* ด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ใช้อุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอากาศขาออก เท่ากับ 130 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่าง 1 กรัม นำมาวัดอัตราการรอดชีวิตด้วยเทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS และนำค่าที่ได้ไปประมวลผลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ นอกจากนี้ยังนำไปศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ต้นแบบในขั้นต่อไป

6. ทดสอบคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ต้นแบบโปรไบโอติก *L. johnsonii* ชนิดผง

ทำการบรรจุผลิตภัณฑ์ต้นแบบโปรไบโอติก *L. johnsonii* ชนิดผงลงในซองอลูมิเนียมฟรอยด์ขนาด 6*9 เซนติเมตร จากนั้นเก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน ระหว่างนั้นทำการเก็บตัวอย่างผงโปรไบโอติกเพื่อทดสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable total plate count, CFU/g) โดยนับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค drop plate บนอาหารแข็ง MRS และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ได้แก่ ความชื้น กลิ่น และสี

โดยการวัดสีมีการกำหนดหน่วยวัดสีมีสัญลักษณ์ $L^*-a^*-b^*$ โดยทั้ง 3 ตัวแปรมีรายละเอียดดังนี้

- แกน L^* บ่งบอกถึง ความสว่าง (lightness) มี ค่าตั้งแต่ 0-100 โดย 0 คือ สีดำ และ 100 คือ สีขาว

- แกน a^* บรรยายแกนสี จากสีเขียว ($-a^*$) จนถึงสีแดง ($+a^*$)

- แกน b^* บรรยายแกนสี จากสีน้ำเงิน ($-b^*$) จนถึงสีเหลือง ($+b^*$)

7. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ STATISIX[©] และวิเคราะห์ผลแผนการทดลอง Plackett-Burman Experimental Design และ Central composite design (CCD) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Design-Expert[®] Software Version 7.0.0 และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS Software Version 16.0

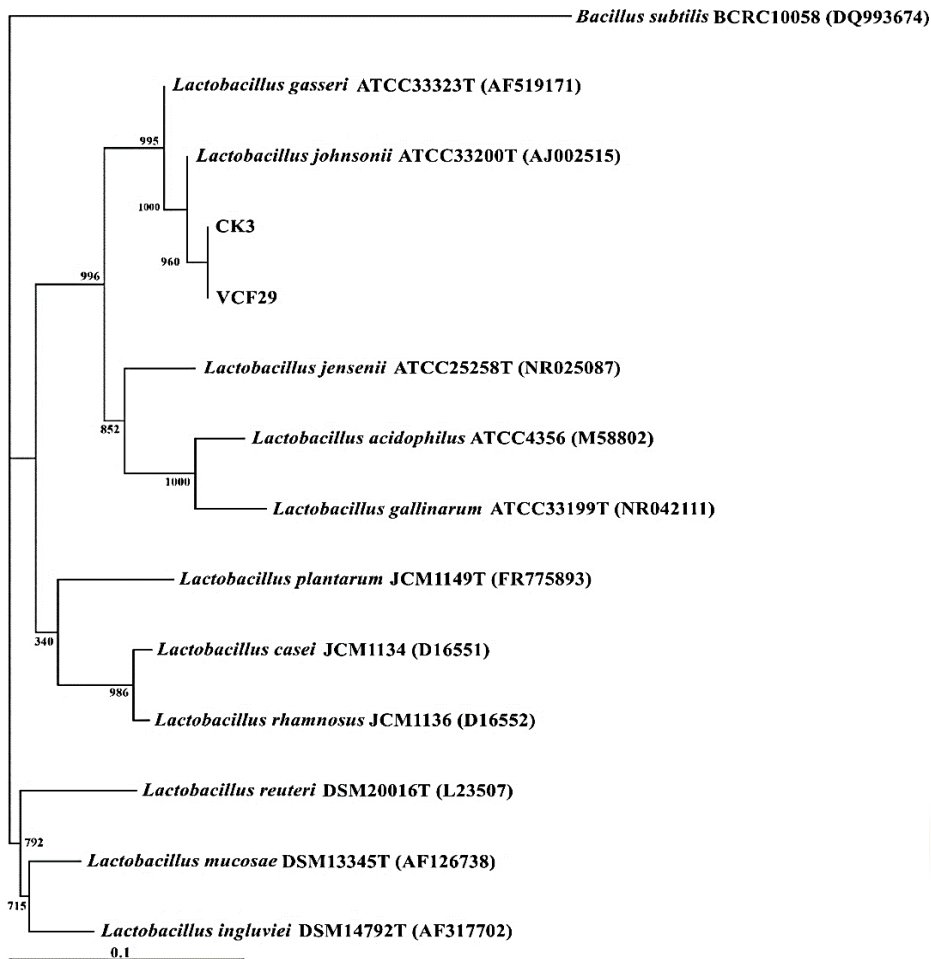


บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1.การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มายืนยันสปีชีส์โดยวิธีการหาลำดับเบสบนยีน 16S rRNA และวิเคราะห์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *L. johnsonii* ทั้งสิ้นจำนวน 2 ไอโซเลต (100% identity) ได้แก่ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตนี้แสดงได้ดังภาพที่ 7 ทั้งนี้ ในงานวิจัยนี้ยังได้นำเชื้อแบคทีเรีย *L. johnsonii* สายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *L. johnsonii* JCM1022 และ *L. johnsonii* JCM8791 จากคลังเชื้อ Japan Collection of Microorganisms (JCM) ประเทศญี่ปุ่น มาศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติด้านต่างๆ กับแบคทีเรียจากงานวิจัยด้วย อย่างไรก็ตาม *L. johnsonii* เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารคนและสัตว์อยู่แล้ว ซึ่งมีงานวิจัยหลายชิ้นที่รายงานดังกล่าว เช่น Bagon *et al.* (2018) ที่สามารถแยก *L. johnsonii* ได้จากมูลไก่เช่นกัน และจากงานวิจัยของ Davoren *et al.* (2018) สามารถแยก *L. johnsonii* 456 จากตัวอย่างอุจจาระของมนุษย์ได้ และมีคุณสมบัติในการทนกรดที่โดดเด่น



ภาพที่ 7 phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากการทำ phylogenetic tree ของลำดับเบสบนยีน 16S rRNA





2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

2.1 การย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

ในการทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของ *L. johnsonii* ทั้ง 4 ไอโซเลตคือ CK3, VCF2-9, JCM1022 และ JCM8791 ซึ่งแสดงผลการย่อยออกเป็นสามแบบคือ α - β - γ -hemolysis พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลตไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จัดอยู่ในกลุ่ม Gamma-hemolysis (γ) ทั้งหมด (ดังแสดงในตารางที่ 9) ซึ่งเป็นการบ่งบอกได้ว่าแบคทีเรีย *L. johnsonii* จะไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงภายในร่างกาย และยังสามารถบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะไม่ให้โทษและเป็นอันตรายต่อร่างกาย ซึ่งในงานวิจัยของ Pisano *et al.* (2014) ที่ทำการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ทั้งหมด 23 ไอโซเลต (*L. paracasei* 10 ไอโซเลต,

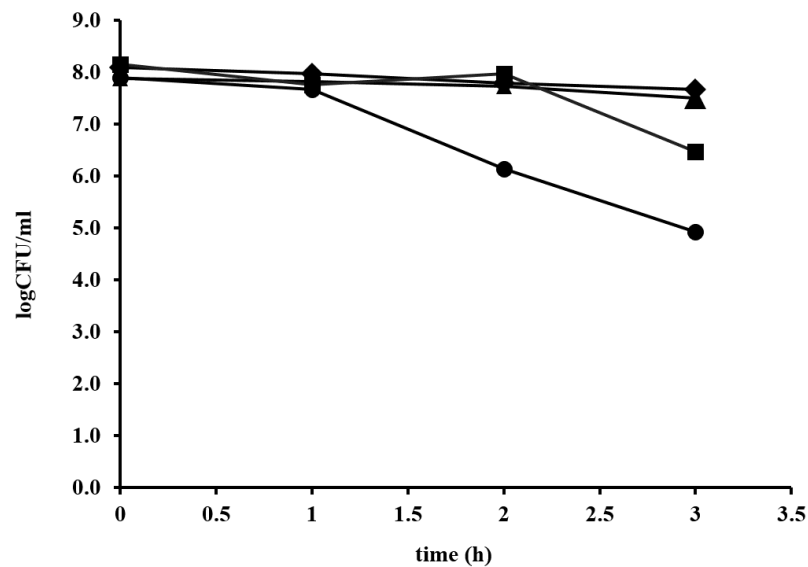
L. plantarum 9 ไอโซเลต, และ *L. brevis* 4 ไอโซเลต) พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ทั้งหมด 23 ไอโซเลตไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้งหมดเช่นกัน

ตารางที่ 9 กิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดงของ *Lactobacillus johnsonii*

แบคทีเรีย <i>L. johnsonii</i>	Hemolysis activity	ลักษณะในการย่อยเม็ดเลือดแดง
CK3	γ	
VCF2-9	γ	
JCM1022	γ	
JCM8791	γ	

2.2 ความสามารถในการทนกรด และน้ำดี

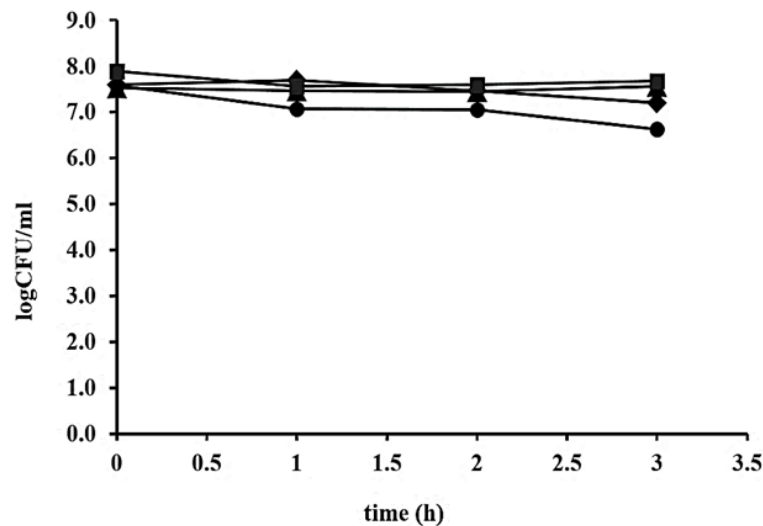
การทดสอบคุณสมบัติของ *L. johnsonii* ในการทนต่อสภาพกรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารมนุษย์ โดยใช้สารละลาย PBS pH 2.5 และเติมเอนไซม์เพปซินความเข้มข้น 0.5% เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VCF2-9 และ JCM1022 เป็นกลุ่มที่สามารถทนกรดได้ดีที่สุด โดยจากชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 8.09 ± 0.05 logCFU/ml และ 7.88 ± 0.09 logCFU/ml ตามลำดับ และเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 7.66 ± 0.01 logCFU/ml และ 7.50 ± 0.02 logCFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต JCM8791 ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่เมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมงกลับพบอัตราการรอดชีวิตลดลงเท่ากับ 6.47 ± 0.07 logCFU/ml และไอโซเลต CK3 มีความสามารถในการทนกรดได้น้อยที่สุด ซึ่งอัตราการรอดชีวิตลดลง ถึง 2 เท่า ภายหลังจากการบ่มภายใต้สภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ความสามารถในการรอดชีวิตของ *L. johnsonii* CK3 (●) และ *L. johnsonii* VCF2-9 (◆) ในน้ำย่อยจำลองของระบบอาหาร เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *L. johnsonii* JCM1022 (▲) และ *L. johnsonii* JCM8791 (■)

ส่วนการทดสอบคุณสมบัติในการทนน้ำดีในสภาวะจำลองของไอโซเลต CK3, VCF2-9, JCM1022 และ JCM8791 ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีความเข้มข้น 0.3% เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อน้ำดีได้ในระดับใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย *L. johnsonii* JCM8791 สามารถทนน้ำดีได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *L. johnsonii* JCM1022, VCF2-9 และ CK3

ตามลำดับ โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายหลังการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เท่ากับ 7.88 ± 0.02 , 7.52 ± 0.12 , 7.59 ± 0.08 และ 7.58 ± 0.05 logCFU/ml ตามลำดับ และเมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 7.67 ± 0.04 , 7.55 ± 0.12 , 7.19 ± 0.01 และ 6.62 ± 0.29 logCFU/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 9)



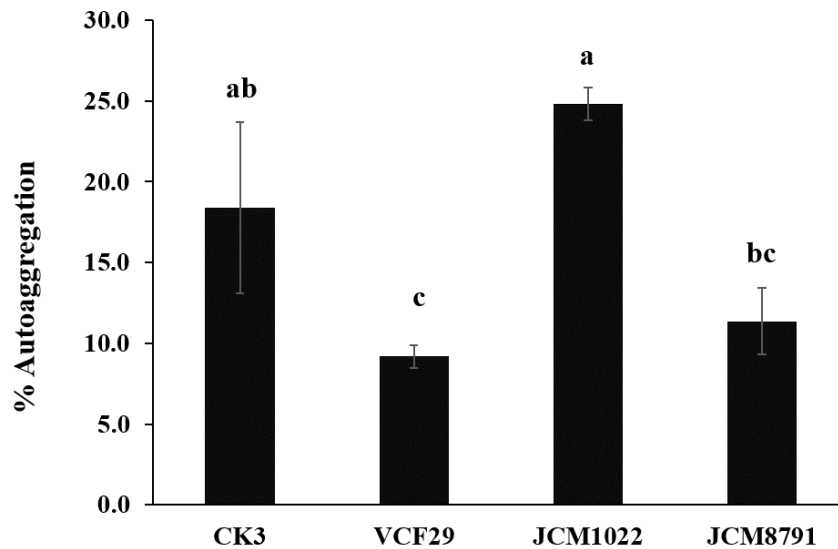
ภาพที่ 9 ความสามารถในการรอดชีวิตของ *L. johnsonii* CK3 (●) และ *L. johnsonii* VCF2-9 (◆) ในน้ำดี เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *L. johnsonii* JCM1022 (▲) และ *L. johnsonii* JCM8791 (■)

โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกจำเป็นต้องมีการรอดชีวิตจากสภาวะที่มีความรุนแรงสูงในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร และน้ำดีจากลำไส้เล็กส่วนต้น จากภาพที่ 8 และภาพที่ 9 แสดงความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมงหลังจากบ่มร่วมกับสภาวะจำลองที่มีน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (0.5% pepsin, pH 2.5) พบว่า VCF2-9 สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงได้ดีใกล้เคียงกับสายพันธุ์อ้างอิง JCM1022 และถึงแม้ว่าอีกสองสายพันธุ์จะมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ แต่ก็มีอัตราการรอดชีวิตถึง 65-80% ซึ่งไอโซเลต CK3 มีอัตราการรอดชีวิตในสภาวะความเป็นกรดต่ำที่สุด (ภาพที่ 8) ในส่วนของอัตราการรอดชีวิตในสภาวะน้ำดีจำลอง (0.3% bile acid) แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตได้ดี และแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 9) นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถทนต่อสภาวะน้ำดีจำลองได้ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 90% ซึ่งในการเป็นโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทนกรด และน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ดีเพื่อสามารถรอดชีวิตไปจนถึงลำไส้ใหญ่เพื่อเจริญเติบโตและยึดครองพื้นที่ได้ การรอดชีวิตของโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับการมีลักษณะเฉพาะเจาะจงของแต่ละสายพันธุ์เท่านั้น แต่อาจจะเกิดจาก

สารอาหารเชิงซ้อนหรือการแข่งขันของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารได้ จากผลการทดลองของ Aiba *et al.* (2015) และ Yamano *et al.* (2007) พบว่า *L. johnsonii* ในเชิงการค้าสามารถรอดชีวิตได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 1.0, 1.5 และ 2.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานถึง 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ *L. johnsonii* La1 มีความสามารถในการรอดชีวิตดีที่สุดที่สุด หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะทางเดินอาหารจำลองที่มีน้ำดีความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และยังสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะกรดจำลองได้ดีกว่าทุกไอโซเลตทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ซึ่งในกรณีของความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli และ Bifidobacteria เกี่ยวข้องกับกลไกมากมาย โดยกลไกการขจัดพิษของน้ำดี เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase) การกระตุ้นการไหลออกของกรดหรือเกลือน้ำดีและการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ เป็นต้น (Ruiz *et al.*, 2013)

2.3 ความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง (Auto-aggregation Assay)

พบว่าแบคทีเรีย *L. johnsonii* JCM1022 มีคุณสมบัติในการเกาะกลุ่มกันเองสูงที่สุดเท่ากับ $24.82 \pm 1.03\%$ รองลงมาคือ ไอโซเลต CK3, JCM8791 และ VCF2-9 มีค่าเท่ากับ 18.37 ± 5.30 , 11.35 ± 2.06 และ $9.19 \pm 0.71\%$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กรณี JCM1022 และ CK3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งโดยทั่วไป เซลล์โพรไบโอติกสามารถเกาะกลุ่มได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรค ความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองเกี่ยวข้องกับความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเซลล์ และจะขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเซลล์ที่ทำให้มีความสามารถเกาะกลุ่มกันให้สูงขึ้นด้วย นอกจากนี้การเกาะกลุ่มกันเองยังมีกลไกเกี่ยวข้องกับแบคทีริโอซินและกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค และช่วยป้องกันเซลล์และทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะกันได้มากขึ้น (กาญจนา, 2556) โดยโพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการเกาะกลุ่มกันสูง เพื่อช่วยในการป้องกันเซลล์และช่วยยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดียิ่งขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็เป็นการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อการยึดเกาะผนังลำไส้ได้ (Ouweland and Vesterlund, 2004)



ภาพที่ 10 ความสามารถในการเกาะตัวกันเอง (Auto-aggregation) ของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *L. johnsonii* JCM1022 และ *L. johnsonii* JCM8791

*Different letters represent significant difference ($p < 0.05$). Duncan's multiple range test

ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวในลำไส้ของแบคทีเรียสามารถทดสอบและวิเคราะห์โดยใช้วิธี auto-aggregation assay ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าการจับตัวกันเองมีค่าอยู่ระหว่าง 9.2% และ 24.8% ดังแสดงภาพที่ 10 หลังจากทำการบ่ม 2 ชั่วโมง การจับตัวกันเองของโพรไบโอติกสามารถพิจารณาจากความสามารถการจับตัวกันเองได้ และแสดงให้เห็นถึงการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวในลำไส้ได้ ดังนั้นการที่แบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวในลำไส้ได้จะเป็นการป้องกันการยึดเกาะ (colonization) ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อก่อโรคได้เช่นกัน การที่โพรไบโอติกยึดเกาะกับเยื่อผิวในลำไส้อาจจะทำให้ลดจำนวนของเชื้อก่อโรคลงโดยการลดค่าความเป็นกรดต่างในทางเดินอาหาร ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลโดยตรงในการต้านเชื้อก่อโรค (Vesterlund *et al.*, 2005) ดังนั้นไอโซเลต CK3 และ JCM1022 แสดงให้เห็นว่ามีศักยภาพในการยึดเกาะกับเยื่อผิวในลำไส้ได้สูง และความสามารถในการจับตัวกันเองของไอโซเลต CK3 มีค่าสูงกว่าเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆ และสูงกว่าอย่างโดดเด่นเมื่อเทียบกับเชื้อก่อโรบบางสายพันธุ์ในงานวิจัยของ Tareb *et al.* (2013) ถึงแม้ว่าบ่มเป็นระยะเวลาเพียงแค่ 2 ชั่วโมงในการทดลองครั้งนี้ เพราะฉะนั้นอาจกล่าวได้ว่า ไอโซเลต CK3 มีศักยภาพและได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งในโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะและแข่งขันในการจับกับเยื่อลำไส้ได้

2.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 8 ชนิด ของ *L. johnsonii* ทั้ง 4 ไอโซเลต โดยประเมินจากขนาดวงใสที่เกิดโดยรอบแผ่นยาปฏิชีวนะซึ่งบ่งบอกประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่ายาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ แต่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 ทนต่อยา erythromycin และ tetracycline ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต JCM8791 ทนต่อยา erythromycin และ clindamycin แต่ JCM1022 ไม่สามารถทนต่อยาชนิดใดได้ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า *L. johnsonii* ที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะเมื่อพิจารณาจากเกณฑ์มาตรฐานของฐานข้อมูล CLSI ปี 2017 เป็นต้น

ตารางที่ 10 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *L. johnsonii* JCM1022 และ *L. johnsonii* JCM8791

Antibiotics disc	CK3	VCF2-9	JCM1022	JCM8791
Cefoxitin	S	S	S	S
Tetracycline	S	R	S	R
Chloramphenicol	S	S	S	S
Erythromycin	R	S	S	S
Clindamycin	S	S	S	R
Vancomycin	S	S	S	S
Ampicillin	S	S	S	S
Ceftriaxone	S	S	S	S

* The inhibition zone diameters were measured, and susceptibility was expressed in terms of resistant (R) and susceptible (S).

จากผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มเหล่านี้จะไวต่อยาปฏิชีวนะ erythromycin, tetracycline, chloramphenicol และ ampicillin (Georgieva *et al.*, 2015) หากแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถต้านยาปฏิชีวนะอาจมีการส่งถ่ายยีนจากแบคทีเรียโพรไบโอติกไปสู่เชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ (Sharma *et al.*, 2017) ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่มีการต้านต่อยาปฏิชีวนะจึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์ในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อคิดเห็นที่เกี่ยวกับการโต้แย้งในประเด็นนี้เกิดขึ้น นั่นก็คือถ้าโพรไบโอติกมี

ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้แสดงว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกจะสามารถรอดชีวิตและอยู่ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านได้ในระหว่างที่มีการบำบัดด้วยยาปฏิชีวนะในกรณีที่เป็นโรคบางชนิดเกิดขึ้น แต่ในปัจจุบันพบมีเชื้อก่อโรคที่ปรับตัวสามารถต้านยาปฏิชีวนะได้สูงขึ้นและเกิดความเสี่ยงต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะจึงไม่ได้รับการยอมรับและสร้างความกังวล

2.5 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

2.5.1 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยใช้เทคนิค agar spot test

ความสามารถต้านแบคทีเรียก่อโรคทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของโพรไบโอติกทั้ง 4 ไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 11 แบคทีเรีย *L. johnsonii* ทุกไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทุกชนิดที่นำมาทดสอบ แต่อยู่ในระดับที่แตกต่างกัน การต้านเชื้อก่อโรคของไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 ให้ผลใกล้เคียงกัน ยกเว้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งแบคทีเรีย VCF2-9 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* มากที่สุด (zone of inhibition > 6 mm) อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *L. johnsonii* สายพันธุ์อ้างอิงทั้งสองไอโซเลตมีความสามารถในการต้านเชื้อก่อโรคทุกสายพันธุ์ได้ดีทั้งหมด กิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรคของแบคทีเรีย *L. johnsonii* ต่อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสายพันธุ์อื่น มีการรายงานในงานวิจัยของ Aiba *et al.* (2015) โดยแบคทีเรีย *L. johnsonii* No. 1088 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori*, *E. coli* O-157 และ *C. difficile* ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกส์มีความเป็นไปได้ในการต้านเชื้อก่อโรค โดยส่วนมากสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคหรือสารเมแทบอไลต์ชนิดต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ (acetic acid, propionic acid, butyric acid และ lactic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน เป็นต้น (Pridmore *et al.*, 2008)

ตารางที่ 11 กิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรคของ ของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *L. johnsonii* JCM1022 และ *L. johnsonii* JCM8791

Strains	Zone of inhibition (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
CK3	4.0±0.0	6.0±0.0	5.0±0.0	4.0±0.0
VCF2-9	10.3±0.6	6.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0
JCM1022	6.7±1.2	7.0±0.0	7.0±0.0	6.3±2.3
JCM8791	10.0±1.7	7.0±0.0	7.0±0.0	6.7±0.6

2.5.2 การทดสอบการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* โดยใช้เทคนิค mixed cultures

จากการทดสอบการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* โดยใช้เทคนิค mixed cultures โดยตัวอย่างจากเชื้อ *L. johnsonii* พบว่าสารละลายมีองค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (extracellular products) และที่มีองค์ประกอบของสารเมแทบอลิท์ในเซลล์ (intracellular products) ของ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลต (CK3 และ VCF2-9) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ลงได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยพบว่าตัวอย่างสารเมแทบอลิท์ภายนอกเซลล์ของ CK3 และ VCF2-9 ในอัตราส่วน 0.5:1.5 มีความสามารถโดดเด่นในการกำจัดเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลงได้โดยสมบูรณ์ (ตารางที่ 12) โดยไม่พบการเจริญของเชื้อก่อโรคที่มีชีวิตเมื่อทำการบ่มร่วมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่อัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ประมาณ 10 เท่า และ 60 เท่า ตามลำดับ ส่วนสารละลายของ intracellular ของ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างจาก VCF2-9 ดังตารางที่ 29 และลักษณะการเจริญโคโลนีของ *H. pylori* ของแต่ละชุดการทดลองแสดงดังภาคผนวก ค ซึ่งอาจจะมีกลไกต่างกันที่ทำให้ป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้

จากงานวิจัยของ Aiba et al. (2015) ที่ได้ศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. johnsonii* JCM2012 และ *L. johnsonii* No. 1088 ในการต้านเชื้อก่อโรค *H. pylori* No. 130 พบว่าเมื่อทำการทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (mixed cultures) ปริมาณหรืออัตราของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลดลงอย่างชัดเจน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่าง *H. pylori* No. 130 และ *L. johnsonii* JCM2012 ปริมาณหรืออัตราของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ลดลงประมาณ 300 เท่า ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยง *H. pylori* ร่วมกับ *L. johnsonii* No. 1088 ปริมาณเชื้อลดลงสูงถึง 3000 เท่า ซึ่งคาดว่ากลไกในการผลิตกรดอินทรีย์และความสามารถในการทนกรดได้สูงของเชื้อ *L. johnsonii* ถูกใช้ในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* No. 130

จากค่าความเป็นกรด-ต่างของสารละลาย intracellular products และ extracellular products ของ *L. johnsonii* CK3 และ VCF2-9 ทั้งสองไอโซเลต คือ 5.44 และ 5.06 ในกรณีของ intracellular products ส่วน 5.62 และ 5.01 ในกรณีของ extracellular products ตามลำดับ จัดได้ว่าสารละลาย intracellular products และ extracellular products มีค่าความเป็นกรดอ่อน และมีค่าความเป็นกรด-ต่างของสารละลายใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลอง และเนื่องจากเชื้อก่อโรค *H. pylori* เป็นแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดได้สูง ซึ่งปกติแล้วกระเพาะอาหารจะมีสภาพที่เป็นกรดอย่างแรงที่จะทำให้หน้าที่ทำลายแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* จะมีลักษณะพิเศษที่สำคัญคือ สามารถสร้างต่างมาหักล้างกับกรดได้ ทำให้เชื้อนี้สามารถอยู่และเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดอย่างแรงในกระเพาะอาหารได้ (Owen, 1998) ซึ่งในระบบการทดลองในงานวิจัยนี้มีค่า pH เพียง 5-6 ซึ่งไม่น่าจะเพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้ โดยสาเหตุการยับยั้งอาจจะไม่ได้มาจากกรดเพียงอย่างเดียว เพราะในชุดควบคุมเชื้อก่อโรคชนิดนี้ ไม่ได้ถูกการยับยั้งด้วยความเป็นกรดอ่อน และอาจจะเป็นไปได้ว่าสารละลายทั้งสองมีกลไกอื่นอีกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่แตกต่างกันออกไป



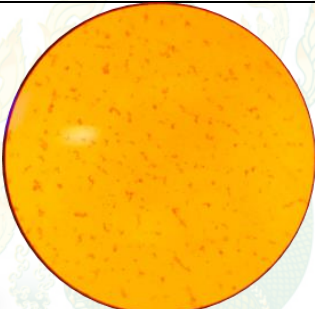
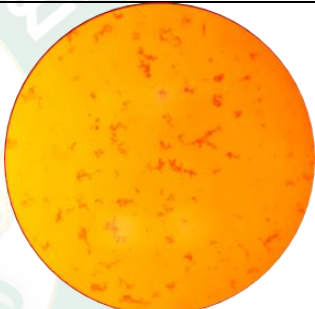
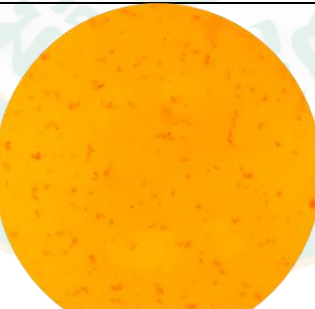
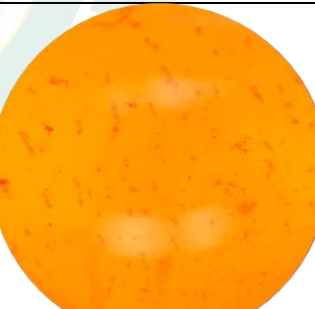
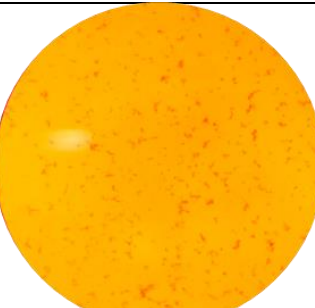
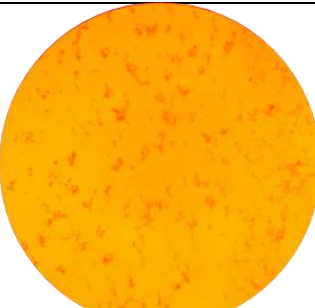
ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* จากสารเมแทบอลิท์ที่ผลิตโดย *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 ทั้งส่วนที่ผลิตและขับออกนอกเซลล์และอยู่ภายในเซลล์

Treatments	อัตราส่วน	H. pylori ที่มีชีวิต (CFU/ml)		การยับยั้ง (%)
		0 hr	24 hr	
HP : ECP-CK3	1 : 1	2.40×10^6	2.25×10^5	90.62
	0.5 : 1.5	3.32×10^5	0.00	100.00
HP : ICP-CK3	1 : 1	1.22×10^6	2.65×10^5	78.28
	0.5 : 1.5	3.92×10^5	1.85×10^5	52.81
HP : ECP-VCF2-9	1 : 1	1.37×10^6	4.00×10^2	99.97
	0.5 : 1.5	8.25×10^4	0.00	100.00
HP : ICP-VCF2-9	1 : 1	1.32×10^6	nd	nd
	0.5 : 1.5	1.37×10^5	6.50×10^2	99.53
HP : Buffer (ชุดควบคุม)	1 : 0	2.45×10^6	1.72×10^6	29.8


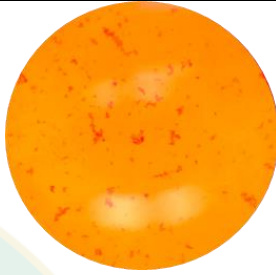
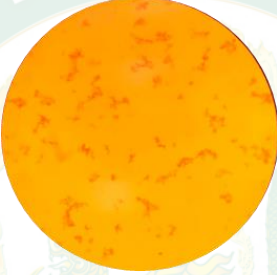



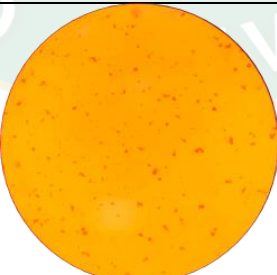
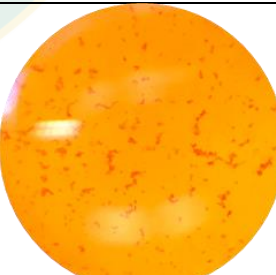
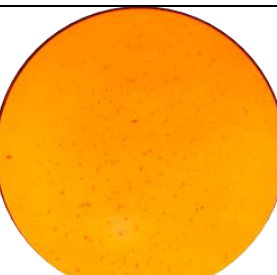
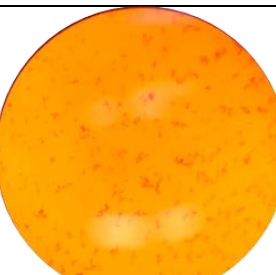
หมายเหตุ: HP = *Helicobacter pylori*, ECP = extracellular products, ICP = intracellular products, CK3 = *L. johnsonii* CK3, VCF2-9 = *L. johnsonii* VCF2-9

นอกจากนี้ ยังได้ทดสอบนำตัวอย่างสารเมแทบอลิต์ดังกล่าวทั้งจากภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ และเซลล์ *L. johnsonii* ที่สมบูรณ์มาทดสอบความสามารถกระตุ้นเซลล์ *H. pylori* ในการจับตัวกัน ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเซลล์ *L. johnsonii* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่บ่มร่วมกับสารแขวนลอยของ *H. pylori* สามารถกระตุ้นให้เซลล์ *H. pylori* จับตัวกันได้เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 13 และผลการทดสอบการกระตุ้นการจับตัวกันของเซลล์ *H. pylori* โดยใช้ตัวอย่างสารเมแทบอลิต์จากภายในเซลล์ *L. johnsonii* แต่ละสายพันธุ์ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน นั่นคือสามารถกระตุ้นการจับตัวของเซลล์ *H. pylori* ได้อย่างชัดเจน ยกเว้นตัวอย่างจาก VCF2-9 ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ *H. pylori* จับตัวกันตั้งแต่เริ่มต้นบ่มร่วมกัน แต่เมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วกลับไม่พบการจับตัวกันของ *H. pylori* ต่อไป (ตารางที่ 14) แต่ประเด็นที่น่าสนใจจากการทดลองนี้ ยังพบว่าตัวอย่างสารเมแทบอลิต์ที่ถูกขับออกภายนอกเซลล์ของ *L. johnsonii* ทุกสายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้เซลล์ *H. pylori* จับตัวกันได้ตั้งแต่เริ่มต้นทำการบ่มดังแสดงในตารางที่ 15 อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบยืนยันเป็นที่เรียบร้อยแล้วว่าเซลล์ของทั้ง *H. pylori* และ *L. johnsonii* ไม่ได้จับตัวกันเองโดยธรรมชาติ ดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 16 ทั้งนี้จากรายงานของนักวิจัยหลายกลุ่มได้รายงานว่ากลไกที่ *L. johnsonii* ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียก่อโรคให้จับตัวกันเองคือโปรตีน GroEL (Bergonzelli *et al.*, 2006)






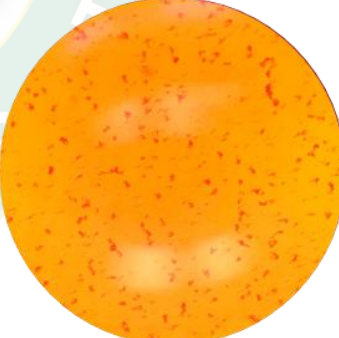
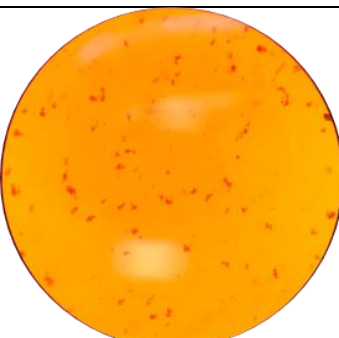

ตารางที่ 13 การจับตัวกัน (co-aggregation) ระหว่างเซลล์แบคทีเรีย *H. pylori* และ *L. johnsonii* แต่ละไอโซเลต

Sample	Aggregation assay	
	0 h.	1 h.
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> CK3		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> JCM1022		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791		





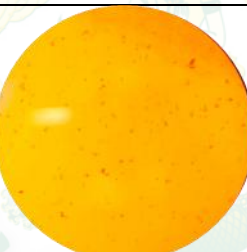
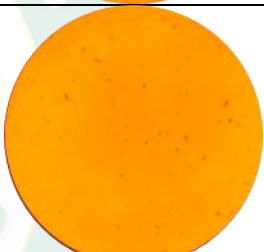
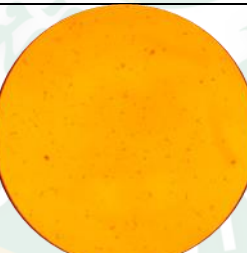



ตารางที่ 14 การจับตัวกันของเซลล์ *H. pylori* เมื่อบ่มร่วมกับตัวอย่างสารเมแทบอลิท์จากภายในเซลล์ *L. johnsonii* แต่ละไอโซเลต

Sample	Aggregation assay	
	0 h.	1 h.
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> CK3		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> JCM1022		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> No.1088		

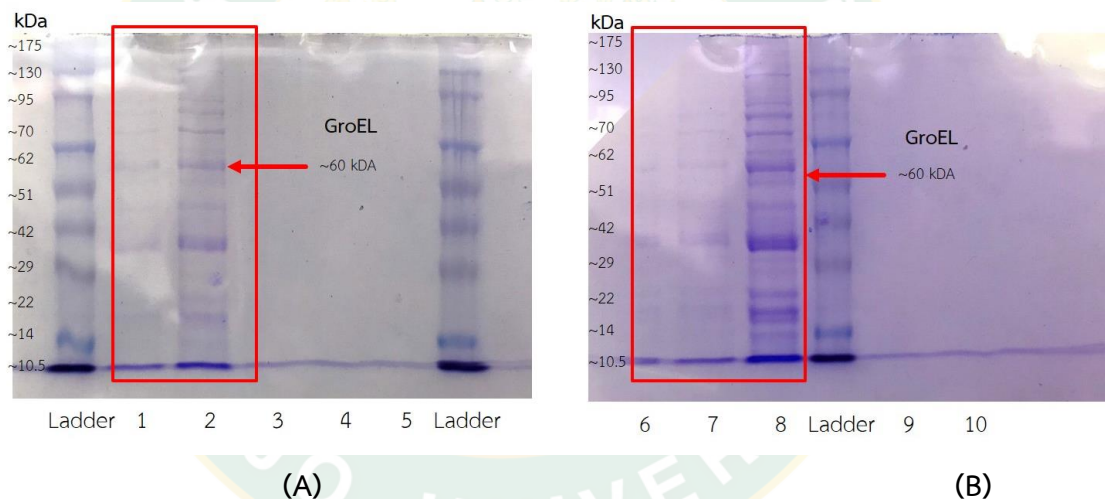
ตารางที่ 15 การจับตัวกันของเซลล์ *H. pylori* เมื่อบ่มร่วมกับตัวอย่างสารเมแทบอลิท์ที่ถูกขับออก
ภายนอกเซลล์เซลล์ *L. johnsonii* แต่ละไอโซเลต

Sample	Aggregation assay	
	0 h.	1 h.
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> CK3		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> VCF2-9		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> JCM1022		
<i>H. pylori</i> และ <i>L. johnsonii</i> JCM8791		

ตารางที่ 16 การจับตัวกัน (auto-aggregation) ของเซลล์แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

Sample	Aggregation assay	
	0 h.	1 h.
<i>H. pylori</i>		
<i>L. johnsonii</i> CK3		
<i>L. johnsonii</i> VCF2-9		
<i>L. johnsonii</i> JCM1022		
<i>L. johnsonii</i> JCM8791		

จากข้อมูลอ้างอิงหลายแหล่งที่ระบุว่าโปรตีน GroEL ของ *L. johnsonii* เป็นกลไกทำให้เซลล์ *H. pylori* จับตัวกัน ดังนั้นในเบื้องต้นจึงได้นำตัวอย่างสารเมแทบอลิท์ที่เตรียมจากไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 ข้างต้นมาทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของโปรตีนทั้งหมด โดยใช้เทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และพบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตน่าจะมีโปรตีน GroEL เนื่องจากพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60 kDa ดังแสดงภาพที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bergonzelli *et al.* (2006) ซึ่งได้รายงานขนาดของโปรตีน GroEL จาก *L. johnsonii* ไว้ที่ 60 kDa และได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์หาโปรตีน GroEL แล้วพบว่าแบคทีเรีย *L. johnsonii* มีโปรตีน GroEL อยู่ทั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์ และบนเยื่อเมือกและเยื่อบุเซลล์ผิว (mucins and intestinal epithelial cell) ของแบคทีเรีย *L. johnsonii* และโปรตีนชนิดนี้ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการจับตัวของเชื้อก่อโรค *H. pylori* ได้



ภาพที่ 11 SDS-PAGE ของการวิเคราะห์โปรตีน GroEL ของเชื้อ *L. johnsonii* CK3 (A) และ *L. johnsonii* VCF2-9 (B)

*หมายเหตุ: 1, 6 เป็น “โปรตีนหายาบ” และ 2, 7, 8 เป็น “โปรตีนหลังการกรองผ่านเยื่อกรอง 50 kDa cut off”

3.การออกแบบสูตรอาหารต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. johnsonii*

3.1 การคัดเลือกองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ

เมื่อทำการคัดเลือกองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อผลการทดลองพบว่านมวัวชนิดผงสามารถผลิตเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดถึง 8.02 logCFU/ml ซึ่งใกล้เคียงกับอาหารเหลวสูตร MRS ดังแสดง

ในตารางที่ 17 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นจึงพบว่าสามารถใช้นมวัวในการเพาะเลี้ยง *L. johnsonii* ทดแทนการใช้อาหารสำเร็จรูป MRS ซึ่งมีราคาสูงได้ อย่างไรก็ตามก็ตามในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้นมผงชนิดพว่องมันเนยแทนแม้ว่าจะให้ผลผลิตเซลล์ *L. johnsonii* ที่ต่ำกว่า เนื่องด้วยเหตุผลด้านราคาและความสะดวกในการเตรียมวัตถุดิบ

แต่อย่างไรก็ตามในการเตรียมวัตถุดิบหรือการสกัดวัตถุดิบ อาจจะมีปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกัน อันเป็นผลที่แสดงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. johnsonii* ที่แตกต่างกันออกไป ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละชนิดมีจำนวนที่แตกต่างกันออกไปเช่นกัน

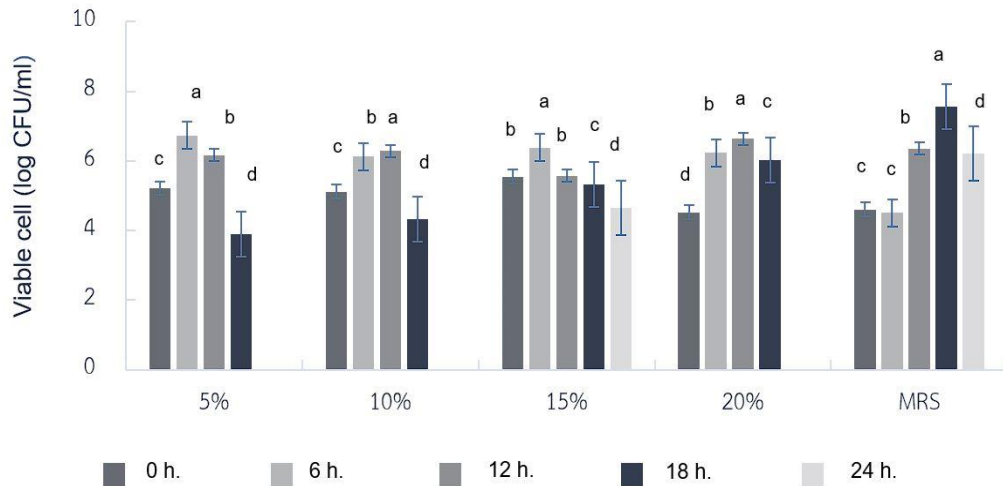
ตารางที่ 17 จำนวนเซลล์ *L. johnsonii* CK3 ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละชนิด

Sample	Viable cell (log CFU/mL \pm SD)*
สารสกัดจากถั่วดำ	7.79 \pm 0.08 ^b
สารสกัดจากถั่วแดง	6.63 \pm 0.04 ^d
สารสกัดจากถั่วเหลือง	6.75 \pm 0.02 ^d
สารสกัดจากถั่วเขียว	7.71 \pm 0.02 ^b
นมโค 100%	8.02 \pm 0.00 ^a
นมถั่วเหลือง	6.96 \pm 0.01 ^c
นมผงพว่องมันเนย	7.04 \pm 0.01 ^c
อาหารเหลวสูตรมาตรฐาน MRS	8.01 \pm 0.02 ^a

หมายเหตุ: “*” = ค่าเฉลี่ย \pm SD จาก 3 ซ้ำ อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Duncan’s multiple range test

จากการศึกษาระดับที่เหมาะสมของนมพว่องมันเนยในช่วงระหว่าง 5-20% โดยน้ำหนัก พบว่าจำนวนเซลล์สูงสุดที่ผลิตได้ในอาหารแต่ละสูตรค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่ใช้เวลาการเพาะเลี้ยงที่ไม่เท่ากันเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์สูงสุด อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงไอโซเลต CK3 ในนมพว่องมันเนยระดับ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมงสามารถผลิตเซลล์ได้ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ซึ่งสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาการผลิตมวลเซลล์ลงได้ รองลงมาคือการใช้นมพว่องมันเนย 20% ที่ถูกหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 15% ถูกหมักเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 10% ถูกหมักเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดังภาพที่ 12 ซึ่งเหตุผลที่นมพว่องมันเนยส่งเสริมการเจริญของ *L. johnsonii* ได้ดีเทียบเท่ากับอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน MRS อาจจะเป็นเพราะในนมพว่องมัน

เนยมีน้ำตาลแล็กโทสเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงพอสมควร จึงเป็นเหตุผลในการส่งเสริมการเจริญของ ของ *L. johnsonii* ได้



ภาพที่ 12 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. johnsonii* CK3 ในอาหารเหลวนมผงพร้อมมันเนยที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS broth และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
หมายเหตุ: “*” = ค่าเฉลี่ย±SD จาก 3 ซ้ำ อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Duncan’s multiple range test

3.2 ผลการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii*

จากการศึกษาข้อมูลของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าปัจจัยหลายๆชนิดที่มีผลต่อการเจริญ ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แอมโมเนียมฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) น้ำตาลซูโครส ปริมาณหัวเชื้อ อุณหภูมิ ปริมาณนมผงพร้อมมันเนย และเวลาในการทดลองการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *L. johnsonii* แต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญโดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman experimental design ผลที่ได้จะแสดงออกมาในค่าการเจริญของเชื้อ *L. johnsonii* ในหน่วยของ logCFU/ml ดังตารางที่ 19 พบว่าแต่ละทรีตเมนต์มีค่าการเจริญเติบโตที่ต่างกันออกไป และเชื้อ *L. johnsonii* ทั้งสองสายพันธุ์มีค่าการเจริญเติบโตในแต่ละทรีตเมนต์ไม่แตกต่างกันมากนัก และเมื่อทำการประมวลผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลต ได้แก่ เวลา อุณหภูมิ ปริมาณนมผงพร้อมมันเนย และปริมาณหัวเชื้อ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0024, 0.0104, 0.0122 และ 0.0223 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยปัจจัยที่ให้ผลในเชิงลบคือ

เวลา และอุณหภูมิ ส่วนปัจจัยที่ให้ผลในเชิงบวกคือปริมาณนมผงพร่องมันเนย และปริมาณหัวเชื้อ ส่วนปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii* ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต สารสกัดยีสต์ และน้ำตาลซูโครส ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ (ANOVA) ของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii* อย่างมีนัยสำคัญ

Source	SS	DF	MS	F-value	p-value	
Model	1.26	8	0.16	23.64	0.0125	significant
A-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.047	1	0.047	7.03	0.0769	
B-(NH ₄) ₃ PO ₄	0.019	1	0.019	2.85	0.1900	
C-Yeast extract	0.040	1	0.040	6.02	0.0915	
D-Sucrose	0.001974	1	0.001974	0.30	0.6237	
E-inoculum	0.13	1	0.13	19.02	0.0223	
F-temp	0.22	1	0.22	33.21	0.0104	
G-skim milk	0.20	1	0.20	29.64	0.0122	
H-time	0.61	1	0.61	91.02	0.0024	
Residual	0.020	3	0.006649			
Cor Total	1.281	1				

SS= Sum of Squares, DF=degrees of freedom, MS=mean square, A: ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต, B: แอมโมเนียมฟอสเฟต, C: สารสกัดยีสต์, D: น้ำตาลซูโครส, E: ปริมาณหัวเชื้อ, F: อุณหภูมิ, G: ปริมาณนมผงพร่องมันเนย และ H: เวลา

ตารางที่ 19 แผนการทดลอง Plackett-Burman ของทั้ง 8 ปัจจัย และค่าจริงและค่าทำนายของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9

ทรีตเมนต์	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	(NH ₄) ₃ PO ₄ (%)	สารสกัด ยีสต์ (%)	ซูโครส (%)	หัวเชื้อ (ml)	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	นมผง พร่องมัน เนย (%)	เวลา (h)	ค่าจริง CK3*	ค่า ทำนาย CK3*	ค่าจริง VCF2-9*	ค่า ทำนาย VCF2-9*
1	1.00	1.00	0.05	5.00	5.00	45.00	0.50	3.00	5.63	5.57	5.24	5.23
2	0.01	1.00	2.50	0.05	5.00	45.00	5.00	3.00	5.80	5.81	5.73	5.54
3	1.00	0.01	2.50	5.00	0.50	45.00	5.00	18.00	5.13	5.14	5.34	5.38
4	0.01	1.00	0.05	5.00	5.00	20.00	5.00	18.00	5.72	5.78	5.61	5.85
5	0.01	0.01	2.50	0.05	5.00	45.00	0.50	18.00	5.20	5.19	4.80	4.98
6	0.01	0.01	0.05	5.00	0.50	45.00	5.00	3.00	5.84	5.83	5.92	5.87
7	1.00	0.01	0.05	0.05	5.00	20.00	5.00	18.00	5.76	5.70	5.71	5.47
8	1.00	1.00	0.05	0.05	0.50	45.00	0.50	18.00	4.83	4.89	4.92	4.93
9	1.00	1.00	2.50	0.05	0.50	20.00	5.00	3.00	5.77	5.75	5.70	5.89
10	0.01	1.00	2.50	5.00	0.50	20.00	0.50	18.00	5.25	5.20	5.96	5.72
11	1.00	0.01	2.50	5.00	5.00	20.00	0.50	3.00	5.75	5.81	5.63	5.64
12	0.01	0.01	0.05	0.05	0.50	20.00	0.50	3.00	5.81	5.82	5.79	5.83

* = *L. johnsonii* CK3 (logCFU/ml), *L. johnsonii* VCF2-9 (logCFU/ml)

3.3 ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii*

จากการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *L. johnsonii* ข้างต้น พบว่าปัจจัยที่มีผลคือ ปริมาณหัวเชื้อ อุณหภูมิ ปริมาณนมผงพร้อมมันเนย และเวลาการเพาะเลี้ยง ที่ระดับนัยสำคัญ 95% จากนั้นจึงนำปัจจัยเหล่านี้มาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ CK3 และ VCF2-9 โดยใช้แผนการทดลอง CCD จากแผนการทดลองในตารางที่ 20 พบว่าไอโซเลต CK3 และ VCF2-9 สามารถเจริญได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเกือบทุกพรีดิเมนต์ ยกเว้นพรีดิเมนต์ที่ 6, 8 และ 10 ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทั้งสอง และจากการวิเคราะห์ ANOVA แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (model) และความสมบูรณ์ของแบบจำลอง (lack of fit) ที่ได้มีระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ (significant) ดังตารางที่ 21 และจากตารางที่ 22 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตมากที่สุดคือ อุณหภูมิและเวลา โดยมีค่า p-value เท่ากับ < 0.0001 และ 0.0028 ตามลำดับ และปัจจัยที่มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ร่วมกันได้แก่ อุณหภูมิและเวลา โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0008

จากความสมบูรณ์ของแบบจำลองที่ได้มีระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ (significant) สามารถบอกถึงโมเดลที่มีความผิดปกติ ความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีต่อการเจริญของเชื้ออาจไม่สามารถอธิบายอย่างแม่นยำด้วยสมการแบบ quadratic equation อาจเกิดจากสิ่งที่วัดผลหรือการประมวลผลยังมีความคาดเคลื่อนสูง

ตารางที่ 20 แผนการทดลอง Central composite design (CCD) ของทั้ง 3 ปัจจัย และค่าจริงและค่าทำนายของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9

ทรีตเมนต์	อุณหภูมิ (°C)	นมผงพร้อมมันเนย (%)	เวลา (h)	ค่าจริง CK3*	ค่าทำนาย CK3*	ค่าจริง VCF2-9*	ค่าทำนาย VCF2-9*
1	15.00	1.50	12.00	6.19	5.89	6.21	5.84
2	50.00	1.50	12.00	5.23	4.92	4.52	4.41
3	15.00	5.00	12.00	6.20	6.01	6.10	6.03
4	50.00	5.00	12.00	5.07	4.93	5.40	5.08
5	15.00	1.50	36.00	6.14	6.77	5.97	7.00
6	50.00	1.50	36.00	0.00	0.68	0.00	0.78
7	15.00	5.00	36.00	6.16	6.97	5.99	6.80
8	50.00	5.00	36.00	0.00	0.79	0.00	1.07
9	3.07	3.25	24.00	5.97	5.65	6.01	5.51
10	61.93	3.25	24.00	0.00	-0.37	0.00	-0.51
11	32.50	0.31	24.00	5.92	5.75	6.06	5.60
12	32.50	6.19	24.00	6.45	5.93	6.54	6.00
13	32.50	3.25	3.82	6.24	7.04	6.23	7.09
14	32.50	3.25	44.18	5.79	4.30	6.54	4.69
15	32.50	3.25	24.00	6.23	6.30	6.47	6.45
16	32.50	3.25	24.00	6.44	6.30	6.38	6.45
17	32.50	3.25	24.00	6.29	6.30	6.31	6.45
18	32.50	3.25	24.00	6.21	6.30	6.51	6.45
19	32.50	3.25	24.00	6.17	6.30	6.29	6.45
20	32.50	3.25	24.00	6.32	6.30	6.54	6.45

* = *L. johnsonii* CK3 (logCFU/ml), *L. johnsonii* VCF2-9 (logCFU/ml)

ตารางที่ 21 Analysis of variance (ANOVA) for the model regression

Source	SS	DF	MS	F-value	Significant value (p-value)
Model	90.17	9	10.02	17.11	< 0.0001
Residual	5.86	10	0.59		
Lack of Fit	5.81	5	1.16	119.75	< 0.0001
Pure Error	0.048	5	0.009699		
Total	96.03	19			

$R^2=0.9390$

SS= Sum of Squares, DF=degrees of freedom, MS=mean square

ตารางที่ 22 Coefficient estimate by the regression model

Independent variables (parameter)	Coefficient	Standard error	Significant value (p-value)
Intercept	6.30	0.31	
A-temp	-1.79	0.21	< 0.0001
B-skim milk	0.055	0.21	0.7952
C-time	-0.82	0.21	0.0028
AB	-0.025	0.27	0.9284
AC	-1.28	0.27	0.0008
BC	0.023	0.27	0.9329

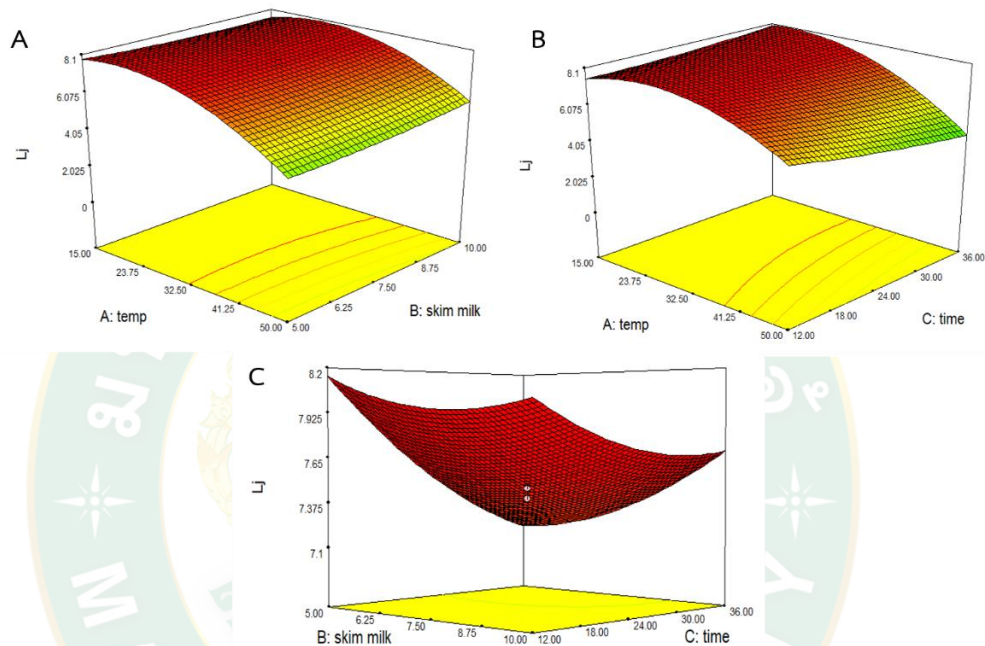
*Statistically significant at 95% of confidence level.

นอกจากนี้ภาพที่ 13 และที่ 14 ของกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ (Response Surface Quadratic Model) ยังยืนยันได้ว่าจุดสูงสุดของกราฟคือค่าที่มีอุณหภูมิ 32.50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และใช้ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 3.25% ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตมากที่สุด และสามารถสร้างสมการทำนายการเจริญของเชื้อทั้งสองไอโซเลต จากปัจจัยอุณหภูมิ ปริมาณปริมาณนมผงพร่องมันเนย และเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ได้จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งแสดงสมการ ดังนี้

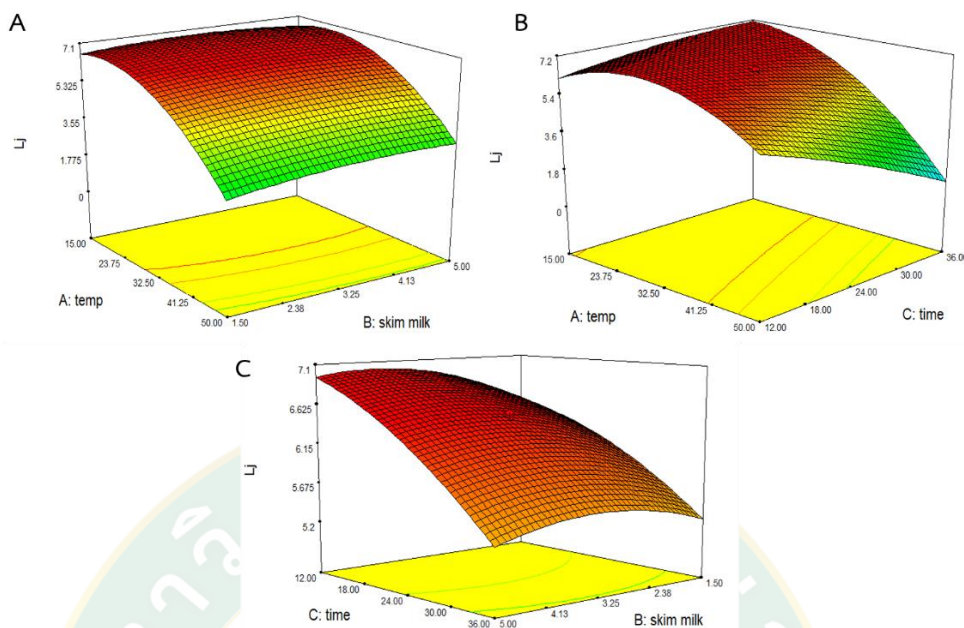
$$y = 6.30 - 1.79A + 0.055B - 0.82C - 1.28AC - 1.29A^2 - 0.16B^2 - 0.22C^2 \quad (1)$$

$$y = 6.45 - 1.79A + 0.12B - 0.71C - 1.20AC - 1.39A^2 - 0.23B^2 - 0.20C^2 \quad (2)$$

เมื่อ y =จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/ml), A=อุณหภูมิ, B=ปริมาณปริมาณนมผงพร้อมมันเนย, C=เวลาในการเพาะเลี้ยง คือค่าจริง (decoded values) ในสมการ ซึ่งสมการ (1) ใช้อธิบาย *L. johnsonii* CK3 และ (2) *L. johnsonii* VCF2-9



ภาพที่ 13 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ของ *L. johnsonii* CK3 (A: อุณหภูมิและปริมาณของนมผงพร้อมมันเนย, B: อุณหภูมิและเวลา และ C: ปริมาณของนมผงพร้อมมันเนยและเวลา)



ภาพที่ 14 กราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ของ *L. johnsonii* VCF2-9 (A: อุณหภูมิและปริมาณของนมผงพร่องมันเนย, B: อุณหภูมิและเวลา และ C: ปริมาณของนมผงพร่องมันเนยและเวลา)

จากผลการศึกษาข้างต้น ซึ่งพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตมีทั้งสิ้น 4 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณหัวเชื้อ อุณหภูมิ ปริมาณนมผงพร่องมันเนย และเวลาในการเพาะเลี้ยงนั้น โดยปริมาณหัวเชื้อมีผลในเชิงบวก กล่าวคือยิ่งเพิ่มปริมาณหัวเชื้อมากขึ้น ทำให้ได้มวลเซลล์เพิ่มขึ้น ในขณะที่อุณหภูมิและเวลาให้ผลเชิงลบ นั่นคือควรใช้อุณหภูมิต่ำและเวลาการเพาะเลี้ยงระยะสั้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเป็นผลดีในการลดค่าใช้จ่ายด้านพลังงานในการผลิตและเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้ ส่งผลให้มีการผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ส่วนปริมาณนมผงพร่องมันเนยให้ผลในเชิงบวก คือสามารถช่วยในการเจริญของ *L. johnsonii* และสามารถเพิ่มมวลเซลล์ได้สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen *et al.* (2015) ที่ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *L. acidophilus* โดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman พบว่าแหล่งคาร์บอนที่สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* ได้ดีที่สุด คือ Whey powder ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bulatovic *et al.* (2014) ที่ได้ศึกษาสารอาหารเสริมในการเจริญของ *L. johnsonii* NRRL B-2178 และก็พบว่า *L. johnsonii* NRRL B-2178 สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ในหางนมหรือ whey นอกจากนี้ Wong *et al.* (1978) ยังพบว่านมพร่องมันเนยมีปริมาณแร่ธาตุอื่นๆ สูงกว่าเวย์โปรตีน ดังนั้นการใช้หางนมหรือนมผงพร่องมันเนยเป็นแหล่งคาร์บอนก็สามารถช่วย

ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ดี สามารถใช้ทดแทนอาหารสำเร็จรูป MRS ที่มีราคาสูงได้ อีกทั้งยังลดต้นทุนในการผลิตลงได้สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลเหล่านี้ ในการทดลองยังหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้แผนการทดลอง CCD และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ สูตรอาหารที่ใช้ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 3.25% บ่มที่อุณหภูมิ 32.50 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ถึงแม้ในกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์จะเป็นจุดที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของแบคทีเรีย แต่ปริมาณนมผงพร่องมันเนย กลับไม่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) มีเพียงปัจจัยอุณหภูมิและเวลาที่มีผลที่สุด อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, significant) แต่ในงานวิจัยของ Polak-Berecka *et al.* (2011) ที่ศึกษาการผลิตมวลเซลล์ของ *L. rhamnosus* โดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman และ CCD พบว่า สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของกลูโคส 15.44 g/l, sodium pyruvate 3.92 g/l, meat extract 8.0 g/l, potassium phosphate 1.88 g/l, sodium acetate 4.7 g/l, และ ammonium citrate 1.88 g/l สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงกว่าอาหารสูตรมาตรฐาน MRS โดยอาหารสูตรนี้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. rhamnosus* 23 g/l ใช้ระยะเวลาในการหมัก 18 ชั่วโมง ในขณะที่อาหาร MRS ได้น้ำหนักเซลล์แห้งของ *L. rhamnosus* 21 g/l ในระยะเวลาการหมักเท่ากัน และในงานวิจัยของ Dong *et al.* (2014) ที่ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มมวลเซลล์ของ *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 โดยได้ใช้แผนการทดลอง CCD ซึ่งสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของ α -lactose 43.8 g/l, yeast extract 79.5 g/l และ Tween-80 5.15 g/l ใช้ระยะเวลาการหมัก 18 ชั่วโมง สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ 5.94×10^9 CFU/ml ซึ่งสูงกว่าอาหาร MRS ถึง 3 เท่า ดังนั้นสูตรอาหารที่ได้ออกแบบในงานวิจัยนี้มีปัจจัยคือนมผงพร่องมันเนยที่สามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นมีหลายปัจจัยที่ส่งผลและอาจจะเพิ่มค่าใช้จ่ายอีกหลายเท่า แต่ระยะเวลาในการหมักอาจจะใช้เวลานานกว่า ซึ่งการใช้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นเชิงอาหารก็สามารถนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมสำหรับคนรักสุขภาพได้อย่างปลอดภัย ทั้งนี้การออกแบบสูตรอาหารต้นทุนต่ำยังสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมในระดับอุตสาหกรรมมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง มีกำไรเพิ่มมากขึ้น และผู้บริโภคยังสามารถเลือกซื้อสินค้าที่มีราคาไม่สูงมากเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารต้นทุนต่ำ กับอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน MRS ดังตารางที่ 23 ถึงแม้ว่าสูตรอาหารต้นทุนต่ำจะส่งเสริมการเจริญของ *L. johnsonii* ได้ไม่เทียบเท่า แต่ก็สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. johnsonii* เพิ่มขึ้นสูงถึง 87-88% เมื่อเทียบกับอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน MRS

ตารางที่ 23 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตมวลเซลล์ *L. johnsonii* โดยอาหารสูตร ต้นทุนต่ำและอาหารสูตรมาตรฐาน MRS

condition	viable cells (CFU/ml)	viable cells (logCFU/ml)
<i>L. johnsonii</i> CK3 temp 32.50 °C, time 24 h and skim milk 3.25%	2.78×10^6	6.44±0.00
<i>L. johnsonii</i> VCF2-9 temp 32.50 °C, time 24 h and skim milk 3.25%	3.48×10^6	6.54±0.05
<i>L. johnsonii</i> CK3 temp 37 °C, time 24 h and MRS broth	2.21×10^7	7.34±0.04
<i>L. johnsonii</i> VCF2-9 temp 37 °C, time 24 h and MRS broth	2.58×10^7	7.41±0.02

4.ผลการทดสอบขยายกำลังการผลิตชีวมวลของ *L. johnsonii*

จากการทดสอบขยายกำลังการผลิต (Scale-up) ชีวมวลของ *L. johnsonii* ทั้งสองไอโซเลตจาก กำลังการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ 100 มิลลิลิตร ไปถึง 15 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้ทำการออกแบบและพัฒนาขึ้นคือ ใช้ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 3.25% อุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะ (batch fermentation) แต่เนื่องจากว่าการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าการใช้ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 3.25% ไม่สามารถเพิ่ม ปริมาณของชีวมวลได้ จึงเลือกที่จะใช้ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 30% ที่ได้ทดลองในระดับ ห้องปฏิบัติการและสามารถเพิ่มชีวมวลได้ ผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อสูงที่สุดของ CK3 และ VCF2-9 พบในชั่วโมงที่ 12 (ดังภาพที่ 15) จากอัตราการเจริญในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 5.35 ± 0.07 logCFU/ml และ 6.30 ± 0.09 logCFU/ml ตามลำดับ สามารถขยายกำลังการผลิตเพิ่มขึ้นถึง 7.86 ± 0.03 logCFU/ml และ 8.14 ± 0.08 logCFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพ การผลิต (productivity) ในระดับ scale-up ของทั้งสองไอโซเลตมีค่าเท่ากับ 5.99×10^6 และ

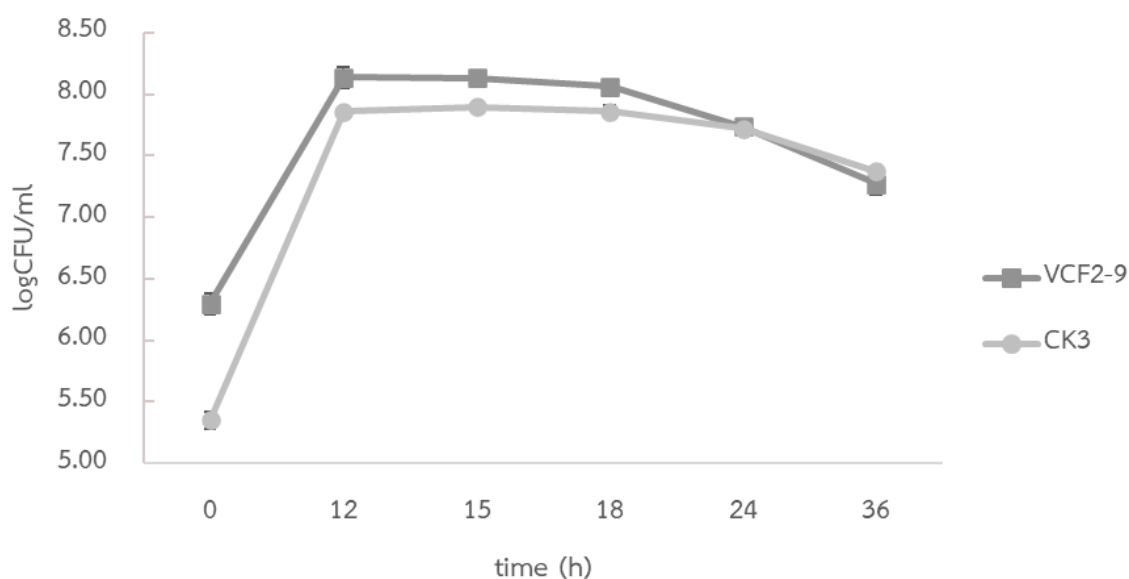
1.17×10^7 CFU/ml/h ซึ่งเพิ่มขึ้นจากระดับการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการถึง 3.88 เท่า และ 12.15 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 24

แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการขยายกำลังการผลิตจากระดับที่เพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 20-100 มิลลิลิตร จนเพิ่มขึ้นไปยัง 15 ลิตรในระดับอุตสาหกรรมสามารถเพิ่มมวลเซลล์ขึ้นได้เป็นจำนวนเท่าตัว

ตารางที่ 24 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และ ประสิทธิภาพการผลิต (Productivity) ในระดับ lab scale และ up scale

sample	h	viable count (CFU/ml)*		Productivity (CFU/ml/h)*	
		CK3	VCF2-9	CK3	VCF2-9
lab scale (100 ml)	0	7.05×10^6	7.53×10^6	1.54×10^6	9.63×10^5
	24	4.16×10^7	3.06×10^7		
up scale (15 L)	0	2.26×10^5	2.01×10^6	5.99×10^6	1.17×10^7
	12	7.21×10^7	1.38×10^8		

หมายเหตุ: "*" = ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ, CK3 = *L. johnsonii* CK3, VCF2-9 = *L. johnsonii* VCF2-9



ภาพที่ 15 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 ในถังหมักขนาด 15 ลิตร

5.ความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปผง *L. johnsonii* ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก CK3 และ VCF2-9 ภายใต้สภาวะและสูตรอาหารที่ศึกษาได้ข้างต้นแล้ว จึงได้ทดสอบนำมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยที่กำหนดอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอากาศขาออกเท่ากับ 130 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทำให้ได้ผงเชื้อที่มีชีวิตของไอโซเลต CK3 และ VCF29 ดังภาพที่ 16 ซึ่งพบว่าเชื้อผงที่ได้มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 1.88% และ 0.67% ตามลำดับ โดยไอโซเลต CK3 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนการทำแห้งเท่ากับ 4.50×10^8 CFU/g (8.65 ± 0.01 log CFU/g) แต่ภายหลังกการทำแห้งพบว่าจำนวนเซลล์ลดลง 3.53 ± 0.02 log CFU/g หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ $59.16 \pm 0.23\%$ (5.12 ± 0.02 log CFU/g) ส่วนไอโซเลต VCF2-9 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเท่ากับ 2.31×10^9 CFU/g (9.36 ± 0.08 log CFU/g) ภายหลังกการทำแห้งแบบพ่นฝอยพบว่าจำนวนเซลล์ลดลง 2.30 ± 0.07 log CFU/g หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ $72.59 \pm 0.47\%$ (6.79 ± 0.02 log CFU/g) ดังตารางที่ 25



1

2

ภาพที่ 16 ผงเชื้อ *L. johnsonii* CK3 (1) และผงเชื้อ *L. johnsonii* VCF2-9 (2)

ตารางที่ 25 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในกระบวนการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย

sample	treatment	CFU/g	logCFU/g*	%survival*
CK3	before spray dry	4.50×10^8	8.65 ± 0.01	
	after spray dry	1.32×10^6	5.12 ± 0.02	59.16 ± 0.23
	Log Reduction Value		3.53 ± 0.02	
VCF2-9	before spray dry	2.31×10^9	9.36 ± 0.08	
	after spray dry	6.20×10^6	6.79 ± 0.02	72.59 ± 0.47
	Log Reduction Value		2.57 ± 0.07	

หมายเหตุ: “*” = ค่าเฉลี่ย \pm SD จาก 3 ซ้ำ

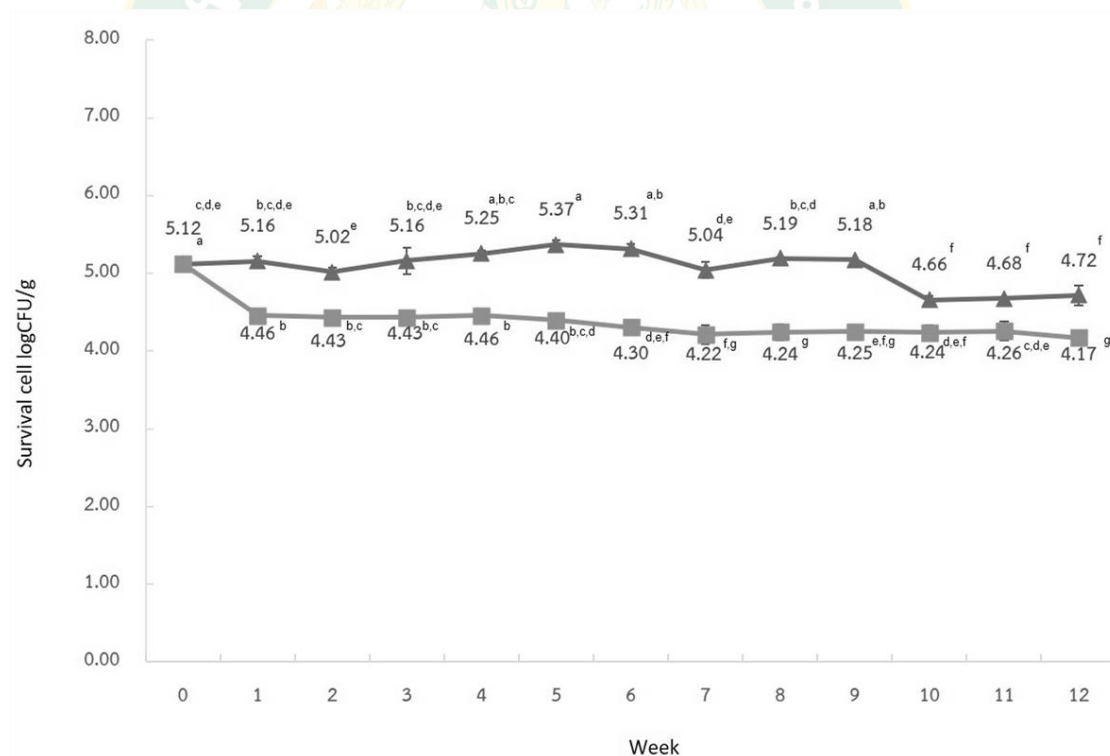
จากงานวิจัยของ Maciel *et al.* (2014) ที่ได้ทำการศึกษาเทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Microencapsulation) ของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* La-5 จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้สารจากผงเวย์ (sweet whey) และนมพร่องมันเนย (skim milk) เป็นวัสดุห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยมี total solids เท่ากับ 30% และพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์และยังทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง และงานวิจัยของ Guerin *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาการเอนแคปซูลเลชัน *L. rhamnosus* GG โดยใช้ spray-drying ที่มีตัวห่อหุ้มคือ milk proteins สามารถทำให้ *L. rhamnosus* GG รอดชีวิตได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Ilha *et al.* (2015) ที่ได้ทำการศึกษาคณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกในเรื่องของการทนต่อกรด เกลือ น้ำดี และความร้อน ภายหลังจากเทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Microencapsulation) ของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. paracasei* FNU จากการสเปรย์ดรายโดยใช้นมพร่องมันเนยและ cheese whey ซึ่งผลพบว่า ภายหลังจากการใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชันมีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. paracasei* FNU อยู่ที่ 9.49 ± 0.07 log CFU/g และ encapsulation yield (EY) อยู่ที่ 93.12 ± 2.15 g/100g จากงานวิจัยข้างต้นอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกสูงกว่าในงานวิจัยนี้เกือบ 1 เท่าตัว ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตสูงมาก แต่เนื่องจากเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แตกต่างจึงอาจเป็นไปได้ที่จะทนความร้อนได้ไม่เท่ากัน

จากอัตราการรอดชีวิตภายหลังจากกระบวนการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ยังมีค่าการรอดชีวิตที่น้อยกว่า เนื่องจากเมื่อผ่านกระบวนการหมักเรียบร้อยแล้ว จึงได้นำส่วนที่ผ่านการหมักแล้วมาขึ้นรูปเป็นผงโดยตรง เพื่อเป็นการลดกระบวนการในการผลิต ทำให้มีการข้ามขั้นตอนในการหาสภาวะที่เหมาะสม และตัวห่อหุ้มที่

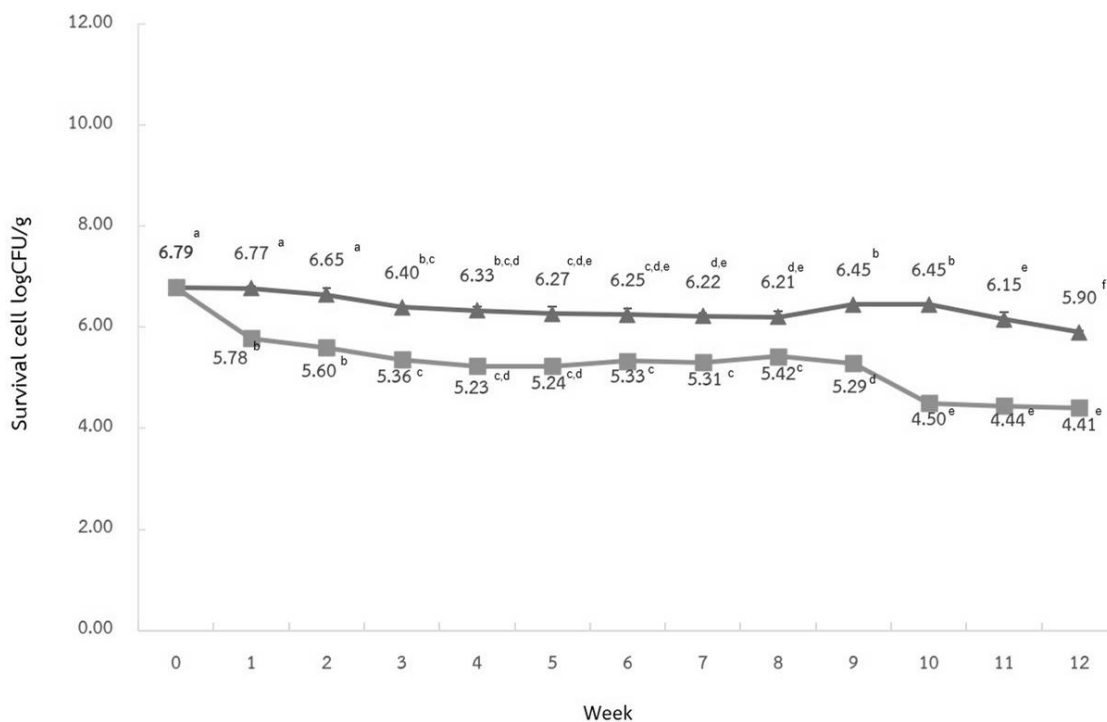
สามารถทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตได้สูงที่สุด จึงทำให้อัตราการรอดชีวิตระหว่างการขึ้นรูปมีค่าไม่สูง เทียบเท่ากับการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

6.อายุการเก็บรักษาและคุณสมบัติบางประการของของผลิตภัณฑ์ต้นแบบผงโปรไบโอติก *L. johnsonii*

จากการทดลองข้างต้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ ผงโปรไบโอติก CK3 และ VCF2-9 จึงได้นำมาวิเคราะห์คุณภาพในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าการรอดชีวิตของทั้งสองไอโซเลต มีแนวโน้มในทางเดียวกัน ซึ่งพบว่าเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าที่เก็บรักษาที่ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 3 เดือนของการเก็บรักษา ดังภาพที่ 17 และ 18 ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้วจึงพบว่า CK3 รอดชีวิต 92.18% และ 81.44% เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ ในขณะที่ VCF2-9 รอดชีวิต 86.89% และ 64.94% เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ



ภาพที่ 17 อัตราการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์ต้นแบบโปรไบโอติก *L. johnsonii* CK3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (▲) และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (■)



ภาพที่ 18 อัตราการรอดชีวิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบโปรไบโอติก *L. johnsonii* VCF2-9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (▲) และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (■)

นอกจากนี้ยังทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต้นแบบโปรไบโอติก *L. johnsonii* ชนิดผง โดยวิเคราะห์หาค่าของความชื้น สี และกลิ่น ของผลิตภัณฑ์ ดังตารางที่ 26-28 ในระยะเวลา 3 เดือน พบว่าความชื้นของผงเชื้อ CK3 และ VCF2-9 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนค่าสีความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) ค่าสีเหลือง (b*) มีแนวโน้มลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ในกรณีของ CK3 ส่วนค่าสีความสว่าง (L*) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ค่าสีแดง (a*) ค่าสีเหลือง (b*) มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อย ในกรณีของ VCF2-9 ส่วนคุณภาพกลิ่นของผลิตภัณฑ์ มีลักษณะกลิ่นสัมผัสหอมกลิ่นนมของหางนมผงที่เป็นองค์ประกอบหลัก ไม่มีกลิ่นหืนหรือกลิ่นอื่นเจือปน ในระยะเวลาตลอดการเก็บรักษา 3 เดือน

ตารางที่ 26 ความชื้น (Moisture) ของผงเชื้อโพรไบโอติก *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 จากการทำแห้งด้วยแบบพ่นฝอย

Sample	Month	%Moisture
CK3	0	1.88±0.44 ^b
	1	1.12±0.05 ^a
	2	1.75±0.10 ^b
	3	1.89±0.04 ^b
VCF2-9	0	0.67±0.34 ^a
	1	0.80±0.07 ^a
	2	1.41±0.03 ^b
	3	1.62±0.02 ^b

หมายเหตุ: “*” = ค่าเฉลี่ย±SD จาก 3 ซ้ำ อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Duncan’s multiple range test

ตารางที่ 27 แสดงค่าการวิเคราะห์ค่าสีระบบ L*-a*-b* ของผงเชื้อโพรไบโอติก *L. johnsonii* CK3 และ VCF2-9 จากการทำแห้งด้วยแบบพ่นฝอย

Sample	Month	L*	a*	b*
CK3	0	96.67±0.76 ^a	1.04±0.44 ^a	7.92±0.74 ^a
	1	92.12±0.26 ^c	0.46±0.02 ^b	6.73±0.28 ^b
	2	91.51±0.92 ^c	0.42±0.05 ^b	6.63±0.09 ^b
	3	95.10±0.63 ^b	0.29±0.04 ^b	7.40±0.36 ^{a,b}
VCF2-9	0	88.80±1.10 ^c	1.16±0.08 ^a	8.23±0.16 ^a
	1	96.05±0.95 ^a	0.06±0.32 ^c	5.44±0.18 ^c
	2	96.86±0.24 ^a	0.54±0.04 ^b	5.69±0.38 ^c
	3	91.78±0.28 ^b	0.62±0.17 ^b	6.71±0.11 ^b

หมายเหตุ: “*” = ค่าสีความสว่าง (L*), ค่าสีแดง (a*), ค่าสีเหลือง (b*) และค่าเฉลี่ย±SD จาก 3 ซ้ำ อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Duncan’s multiple range test

ตารางที่ 28 การทดสอบกลิ่นของผงเชื้อโพรไบโอติก *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 จากการทำแห้งด้วยแบบพ่นฝอย

Sample	Month	Characteristic
CK3	0-3	กลิ่นหอมนม จากหางนมผง ไม่มีกลิ่นหืน ปกติ
VCF2-9	0-3	กลิ่นหอมนม จากหางนมผง ไม่มีกลิ่นหืน ปกติ

ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wirunpan *et al.* (2016) ที่ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิต และอายุการเก็บรักษาของแบคทีเรีย *L. lactis* 1464 ในอาหารกึ่งชนิดเม็ดภายหลังการใช้เทคนิคทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เบด (fluidized bed drier) พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 75.94%-96.87% และเมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *L. lactis* 1464 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีค่าอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ปี ส่วนงานวิจัยของวิจัยของ Maciel *et al.* (2014) ที่ได้ทำการศึกษาเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (Microencapsulation) ของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* La-5 จากการสเปรย์ดรายโดยใช้สารจากผงเวย์ (sweet whey) และนมผงพร่องมันเนยเป็นวัสดุห่อหุ้มและศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* La-5 มีค่าลดลงเฉลี่ยอยู่ที่ 0.43 log CFU/g ภายในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 90 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

L. johnsonii CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 มีศักยภาพในการเป็นโพรไบโอติก โดยไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ hemolysis) สามารถทนกรดและน้ำดีในทางเดินอาหารได้สูง สามารถเกาะกลุ่มกันเองได้ดี มีความไวต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิด และมีความสามารถต้านแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus*, *P. vulgaris*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *H. pylori* ได้อย่างชัดเจน

สำหรับการออกแบบสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีแหล่งคาร์บอนหลักจากนมผงพร่องมันเนยในการผลิตชีวมวล *L. johnsonii* โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ปริมาณนมผงพร่องมันเนย 3.25% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และหลังจากการขยายขนาดการผลิตด้วยสูตรอาหารดังกล่าวพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ (productivity) การผลิตชีวมวลของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 ได้ถึง 3.88 และ 12.15 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

ในส่วนของการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการขึ้นรูปผงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ประกอบด้วยชีวมวล *L. johnsonii* ที่มีชีวิต ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าอัตราการรอดชีวิตหลังจากกระบวนการทำแห้งของ *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 เท่ากับ $59.16 \pm 0.23\%$ และ $72.59 \pm 0.47\%$ ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาผงชีวมวลของเชื้อทั้งสองไอโซเลตไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าเชื้อแบคทีเรียยังคงรอดชีวิตและมีคุณภาพด้านความชื้น สี และกลิ่นแทบไม่เปลี่ยนแปลง

จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า *L. johnsonii* CK3 และ *L. johnsonii* VCF2-9 มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก สามารถขยายขนาดการผลิตชีวมวลเพื่อขึ้นรูปเป็นผงที่เก็บรักษาได้โดยไม่เปลี่ยนแปลงคุณภาพ ทำให้สามารถนำงานวิจัยนี้ไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่มีมูลค่าสูงในเชิงพาณิชย์ และยังสามารถส่งเสริมให้ประเทศไทยเป็นประเทศแห่งสินค้านวัตกรรมจากงานวิจัยได้อย่างดียิ่ง

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษากลไกของ *L. johnsonii* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *H. pylori* ในเชิงลึกต่อ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตสารแบคทีริโอซิน และโปรตีนชนิด GroEL เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูง การปรับปรุงรูปแบบการหมักเพื่อผลิตชีวมวลของ *L. johnsonii* ให้ได้ yield ที่สูงยิ่งขึ้น การทดสอบประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (sensory test) และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้เป็นซินไบโอติกส์ (synbiotic) โดยคัดเลือกสารพรีไบโอติก (prebiotic) ที่มีความจำเพาะกับ *L. johnsonii* ไอโซเลตที่คัดเลือก แล้วผสมเข้าไปในผลิตภัณฑ์เดียวกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการส่งเสริมสมดุคของจุลินทรีย์ในลำไส้ให้สูงสุดได้



บรรณานุกรม

- กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่. ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- จรัล ทรัพย์เสรี. 2552. **Central Composite Design**. for Quality November 2009. 072. No. 145.
- ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2556. โปรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. นทบุรี : โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- ธนกิจ ถาหมี พิไลรัก อินธิปัญญา และ ดุษฎี บุญธรรม. การประเมินอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ชาขงใบหม่อนผสมผลหม่อนโดยวิธีสภาวะเร่ง. วารสารเกษตร 34(1): 157 - 166 (2561)
- สุขสันติ ประกอบวงษ์. 2557. **จุลชีววิทยาเบื้องต้น**. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- Achour, M., Mtimet, N., Cornelius, C., Zgouli, S., Mahjoub, A., Thonart, P. and Hamdi, M. 2001. Application of the accelerated shelf life testing method (ASLT) to study the survival rates of freeze-dried *Lactococcus* starter cultures. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 76(6), 624-628.
- Ahasan, A. S. M. L., Agazzi, A., Invernizzi, G., Bontempo, V. and Savoini, G. 2015. The beneficial role of Probiotics in monogastric animal nutrition and health. **Journal of dairy veterinary and animal research**, 2(4).
- Aiba, Y., Ishikawa, H., Tokunaga, M. and Komatsu, Y. 2017. Anti-*Helicobacter pylori* activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No.1088. **FEMS Microbiology Letters**, 364(11).
- Aiba, Y., Nakano, Y., Koga, Y., Takahashi, K. and Komatsu, Y. 2015. A highly acid-resistant novel strain of *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 has antibacterial activity, including that against *Helicobacter pylori*, and inhibits gastrin-mediated acid production in mice. **MicrobiologyOpen**, 4(3), 465-474.

- Bagon, B. B., Valeriano, V. D. V., Oh, J. K., Pajarillo, E. A. B., Cho, C.-S. and Kang, D.-K. 2018. Comparative exoproteome analyses of *Lactobacillus* spp. reveals species- and strain-specific proteins involved in their extracellular interaction and probiotic potential. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, 93(420-426).
- Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D. and Corthesy-Theulaz, I. E. 2006. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, 74(1), 425-434.
- Bulatović, M. L., Rakin, M. B., Vukašinić-Sekulić, M. S., Mojović, L. V. and Krunić, T. Ž. 2014. Effect of nutrient supplements on growth and viability of *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 in whey. **International Dairy Journal**, 34(1), 109-115.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, 104(4), 467-483.
- CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Chauhan, K., Trivedi, U., and Patel, K. 2007. Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, 98(1), 98–103.
- Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L. and Shu, G. 2015. Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, 14(3), 227-232.

- Cruchet, S., Obregon, M. C., Salazar, G., Diaz, E. and Gotteland, M. 2003. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. **Nutrition**, 19(9), 716-721.
- Davoren, M. J., Liu, J., Castellanos, J., Rodríguez-Malavé, N. I., and Schiestl, R. H. 2019. A novel probiotic, *Lactobacillus johnsonii* 456, resists acid and can persist in the human gut beyond the initial ingestion period. **Gut Microbes**, 10, 458–480.
- Diaconu, S., Predescu, A., Moldoveanu, A., Pop, CS., and Fierbințeanu-Braticevici, C. 2017. *Helicobacter pylori* infection: old and new. **Journal of Medicine and Life**, 10(2), 112-117.
- Doi, K., Phuong, O. T. A., Kawatou, F., Nagayoshi, Y., Fujino, Y. and Ohshima, T. 2013. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Rice Bran Product. **Advances in Microbiology**, 03(03), 265-272.
- Dong, Z., Gu, L., Zhang, J., Wang, M., Du, G., Chen, J., and Li, H. (2014). Optimisation for high cell density cultivation of *Lactobacillus salivarius* BBE 09-18 with response surface methodology. **International Dairy Journal**, 34(2), 230–236.
- FAO/WHO Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. report of a joint FAO/WHO expert consultation. 2001. cordoba, Argentina, 1.-4.10. 2001, pp 19-20.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rummyan, N. and Karaivanova, E. 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 29(1), 84-91.
- Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., Saidi, D., Fiocco,

- D., Kaddouri, H. and Capozzi, V. 2019. Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from algerian infant feces: towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 11(1), 113-123.
- Gibson, G. R., and Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **The Journal of Nutrition**, 130(2), 391S-395S.
- Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., Desobry, S., Scher, J., and Gaiani, C. 2017. *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. **Journal of Food Engineering**, 193, 10–19.
- Guinane, C. M., Kent, R. M., Norberg, S., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R. P. 2011. Host specific diversity in *Lactobacillus johnsonii* as evidenced by a major chromosomal inversion and phage resistance mechanisms. **PLOS ONE**, 6(4), 18740.
- Hofvendahl, K., and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, 26(2-4), 87–107.
- Holzappel, W.H., Haberler, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis In't Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 41(85–101).
- Ilha, E.C., da Silva, T., Lorenz, J.G., de Oliveira Rocha, G., and Sant'Anna, E.S. 2015. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research and Technology**, 240, 977–984.
- Kelly, P. M. 2004. Significance of lactose in milk powders. **Advanced dairy chemistry**.

3: 759

- Kumar, A. and Kumar, D. 2015. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. **Anaerobe**, 33, 117-123.
- La Ragione, R. M., Nrabad, A., Gasson, M. J., and Woodward, M. J. 2004. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* F19785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. **Letters in Applied Microbiology**, 38, 197–205.
- Maciel, G.M., Chaves, K.S., Grosso, C.R.F., and Gigante, M.L. 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, 97, 1991–1998.
- Maldonado, N. C., Ficooseco, C. A., Mansilla, F. I., Melián, C., Hébert, E. M., Vignolo, G. M. and Nader-Macías, M. E. F. 2018. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. **Livestock Science**, 212, 99-110.
- Niamsup, P., Sujaya, I. N. Tanaka M., Sone, T. Hanada, S. Kamagata, Y. Lumyong, S. Assavanig, A. Asano, K. Tomita, F. and Yokota, A. 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53(Pt 1), 263-268.
- Ouwehand, A. C., and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In lactic acid bacteria. Edited by salminen, S. won wright, A. and Ouwehand, A. 3 rd Edition. **New York: Marcel Dekker, Inc.:**377-378
- Owen, 1998. Helicobacter - Species classification and identification. **British Medical Bulletin**, 54, 17–30.
- Pandey, K. R., Naik, S. R. and Vakil, B. V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal of Food Science and Technology**, 52(12), 7577-7587.

- Pantoflickova, D., Corthesy-Theulaz, I., Dorta, G., Stolte, M., Isler, P., Rochat, F., and Blum, A. L. 2003. Favourable effect of regular intake of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* on *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 18(8), 805–813.
- Pieniz, S., R. Andrezza, T. Anghinoni, F. Camargo, and A. Brandelli. 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, 37, 251-256.
- Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., Deiana, M. and Cosentino, S. 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. **BioMed Research International**, 2014, 286-390.
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Kordowska-Wiater, M., Targoński, Z., and Kubik-Komar, A. 2011. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42(4), 1485–1494.
- Pridmore, R. D., Pittet, A. C., Praplan, F. and Cavadini, C. 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. **FEMS Microbiology Letters**, 283(2), 210-215.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S. and Anandharamakrishnan, C. 2012. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, 4(4), 891-898.
- Ruiz, L., A. Margolles, and B. Sanchez. 2013. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Microbiology**, 4(396).
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. **Journal**

of **Biotechnology**, 84, 197–215.

Sahni, C. and Gupta, K. R. 2014. Insignificant viability of the granules of probiotic and prebiotic with skimmed milk powder. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, 4, 603–605.

Senz, M., van Lengerich, B., Bader, J. and Stahl, U. 2015. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for enhanced cell stability during industrial processing. **International Journal of Food Microbiology**, 192, 34-42.

Sharma, C., Gulati, S., Thakur, N., Singh, B. P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S. K., Puniya, A. K., Gill, J. P. S. and Panwar, H. 2017. Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. **3 Biotech**, 7(1), 53.

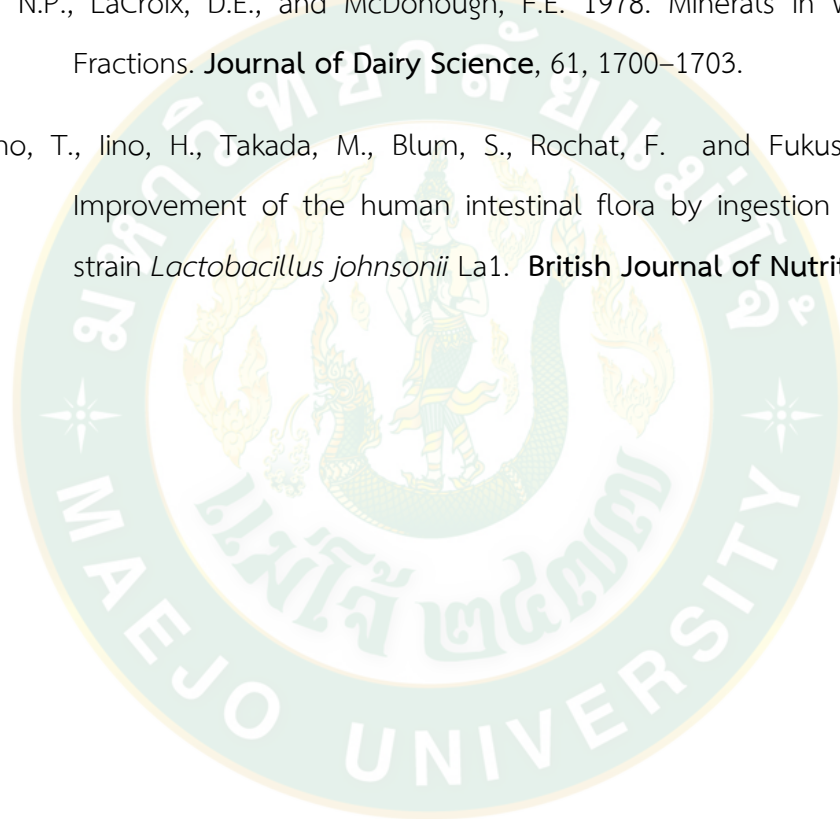
Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M. and Ho, Y. W. 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. **BioMed Research International**, 2014, 16.

Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M. and Vernoux, J. P. 2013. In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. **Journal of Medical Microbiology**, 62(Pt 4), 637-649.

Vasiljevic, T. and Shah, N. P. 2008. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, 18(7), 714-728.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., and Ouwehand, A. C. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. **Research in Microbiology**, 156, 238–244.

- Wenten, I.G., Khoiruddin, Aryanti, P.T.P., and Hakim, A.N. 2016. Scale-up strategies for membrane-based desalination processes: A review. **Journal of Membrane Science and Research**, 2, 42–58.
- Wirunpan, M., Savedboworn, W., and Wanchaitanawong, P. 2016. Survival and shelf life of *Lactobacillus lactis* 1464 in shrimp feed pellet after fluidized bed drying. **Agriculture and Natural Resources**, 50, 1–7.
- Wong, N.P., LaCroix, D.E., and McDonough, F.E. 1978. Minerals in Whey and Whey Fractions. **Journal of Dairy Science**, 61, 1700–1703.
- Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F. and Fukushima, Y. 2007. Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. **British Journal of Nutrition**, 95(02), 303.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. De Man, Rogoa, and Sharpe agar (MRS agar)

Peptone	10.0	g
Beef extract	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Glucose	20.0	g
Tween 80	1.0	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
Triammonium citrate	2.0	g
MgSO ₄ .12H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄	0.2	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000	ml

2. Eosin Methylene Blue agar (EMB agar)

Peptone	10.0	g
Lactose	5.0	g
Sucrose	5.0	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
Eosin	0.4	g
Methylene Blue	0.065	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000	ml

3. Salmonella-Shigella agar (SS-agar)

Peptone	5.0	g
Beef extract	5.0	g
Lactose	10.0	g

Bacto-bile salts No3	8.0	g
Sodium citrate	8.5	g
Sodium thiosulfate	8.5	g
Ferric citrate	1.0	g
Brilliant green	0.33	g
Neutral red	25	mg
Agar	15	g

4. Blood Agar

Heart Muscle, Infusion from (solids)	2.0	g
Pancreatic Digest of Casein	13.0	g
Yeast Extract	5.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Agar	15.0	g
Sheep Blood	70.0	ml

5. Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar)

Peptone Mixture	10.00	g
Beef Heart Infusion	10.00	g
Calf Brain Infusion	7.50	g
Dextrose	2.00	g
Disodium Phosphate	2.50	g
Sodium Chloride	5.00	g
Bacteriological Agar	15.00	g
Agar	15	g

ภาคผนวก ข
การจำแนกจุลินทรีย์โดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

วิธีการจำแนกจุลินทรีย์โดยใช้ข้อมูลของลำดับเบสบนยีน rRNA นั้น ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ ได้แก่ สกัด DNA ของแบคทีเรียและเชื้อรา การเพิ่มปริมาณยีน ด้วยวิธี PCR การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ การหาลำดับเบส และนำผลของลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูล

1.วิธีการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit

2.การทำ PCR และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit

ส่วนประกอบของ ปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	คูณจำนวนตัวอย่าง +1
PCR Mastermix	25	25*11=275
Primer I	4	4*11=44
Primer II	4	4*11=44
dH ₂ O	15	15*11=165
DNA	2	-
Total	50	

-สำหรับแบคทีเรีย Universal Primer ที่ใช้ คือ 27F และ 1522R

-สำหรับเชื้อรา Universal Primer ที่ใช้ คือ ITS1 และ ITS4

โปรแกรม PCR reaction

-สำหรับแบคทีเรีย (Primer 27F และ 1522R)

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 25 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส 5 นาที	
Set Hold	20 องศาเซลเซียส	

-สำหรับเชื้อรา (Primer ITS1 และ ITS4)

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส 52 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส 1 นาที	} 30 รอบ
Annealing	54 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส 5 นาที	
Set Hold	20 องศาเซลเซียส	

3. การตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการ run gel-electrophoresis ดังนี้

- 3.1 นำ 1.5% agarose gel ปริมาณ 30 ml ไปหลอมด้วยไมโครเวฟ
- 3.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เจลมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส
- 3.3 เติม gel star ปริมาตร 1 μ l/agarose gel 10 ml
- 3.4 เทเจลลงในแม่พิมพ์และเสียบหัวลิงไป เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยดตัวอย่าง
- 3.5 รอให้เจลแข็งและนำเจลไปบ่มไว้ที่มืด
- 3.6 เมื่อเจลแข็งให้ค่อยๆดึงหัวออกแล้วนำแผ่นเจลไปวางไว้ในเครื่อง electrophoresis
- 3.7 เติม TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล นำ marker และตัวอย่างมาหยอดลงในแต่ละช่องดังนี้
 - marker : marker 1 μ l+TAE buffer 4 μ l+ loading dye 2 μ l
 - sample : DNA 3 μ l+ loading dye 2 μ l
- 3.8 ปิดฝาเครื่อง electrophoresis โดยตั้งค่าไว้ที่ 100v ให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก
- 3.9 ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที จากนั้นปิดเครื่อง electrophoresis
- 3.10 นำแผ่นเจลไปวางบนเครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

4. นำผลของลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม bioEdit และเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTC
TCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCT
GAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCT
CAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTCTGTA
ACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGATTAG
GGTGAAG




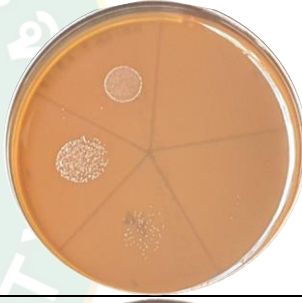
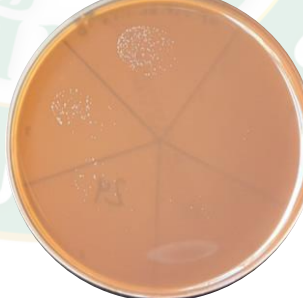



ACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCTC
AGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTCTGTAA
CACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGATTAGG
GTG



ภาคผนวก ค
โคโลนีของ *H. pylori*

ตารางที่ 29 ภาพโคโลนีของ *H. pylori* จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อจาก extracellular products และ intracellular products ของ *L. johnsonii* CK3, VCF2-9

Microorganism	sample	ratio	Colony	
			0 h	24 h
HP	control	1:0		
CK	HP : ECP-CK3	1:1		
VCF	HP : ICP-VCF2-9	0.5:1.5		

หมายเหตุ: HP = *Helicobacter pylori*, ECP = extracellular products, ICP = intracellular products, CK3 = *L. johnsonii* CK3, VCF2-9 = *L. johnsonii* VCF2-9

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียมเจล

1. separation gel

4.1	ml	H ₂ O
3.3	ml	gel solution 30% acrylamide/bis solution
2.5	ml	Tris HCl (1.5M) pH 8*
100	µl	10% SDS
32	µl	APS 10% (w/v) ammonium persulphate
10	µl	TEMED

2. stacking gel

6.1	ml	H ₂ O
1.3	ml	gel solution
2.5	ml	Tris HCl (0.5M) pH 7*
100	µl	10% SDS
100	µl	APS 10% (w/v)
10	µl	TEMED

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมส่วนของ separation gel ก่อนทิ้งไว้ให้แข็งตัว (กรณีเกิดฟองเติม isopropanol เมื่อเจลแข็งจึงขับออก)
2. พอเจลส่วนแรกแข็งตัว จึงเตรียมส่วนของ stacking gel โดยเทเข้าไปในส่วนที่สอง จากนั้นเสียบหัว ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
3. แกะแผ่นกระจกที่มีเจลมาประกอบเครื่องรันเจล แล้วแกะหัวออก

ขั้นตอนการ run gel

1. ประกอบเครื่องเท buffer ลงไปในส่วนที่เป็นตัวอย่างให้เต็มก่อน รอสักพักตรวจดูการรั่วไหล จากนั้นจึงเท buffer ลงไปในขีดที่กำหนด ส่วนของตัวอย่างผสมตัวอย่างกับ laemmli buffer ที่มีสารเติม BME 10% (v/v) 1:1 denature heat 90-95 °C 5 นาที
2. ปิดฝา จากนั้นต่อเครื่องตั้งค่า 120-150 v กด run รอประมาณ 1.30 ชั่วโมง เมื่อถึงระยะที่กำหนด ทำการปิดเครื่อง

ขั้นตอนการย้อมสีเจล

1. ค่อยๆ แกะเจลออกมาจากพิมพ์ใส่ลงในกล่อง จากนั้นเทสีย้อม Coomassie blue staining
2. นำไปเข้าไมโครเวฟ 15 วินาที แล้วย้อมสีข้ามคืนด้วยเครื่องเขย่าแบบอัตโนมัติ

ขั้นตอนการล้างเจล

1. Acetic acid 30 ml, methanol 50 ml และ H₂O 20 ml
2. Acetic acid 80 ml, methanol 160 ml และ H₂O 40 ml
3. Acetic acid 80 ml, methanol 160 ml และ H₂O 40 ml

การอ่านผล : ดูเทียบกับ protein ladder ในหน่วยของ kDa



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ฤทัยมาศ วงศ์ปอนด์
เกิดเมื่อ	8 กรกฎาคม 2538
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554-2556 มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนมัธยมวิทยา ลำปาง พ.ศ. 2557-2560 ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

