

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) จากตัวอย่างอาหารหมัก

การเก็บและแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่าง ได้รวบรวมตัวอย่างอาหารหมักจากพืช ประกอบด้วย น้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ น้ำหมักมะเฟือง น้ำหมักมะละกอ น้ำหมักมะขามป้อม น้ำหมักสมอไทย น้ำหมักกล้วย น้ำหมักลูกข่อย น้ำหมักพลูควาว น้ำหมักกระชายดำ น้ำหมักตะไคร้หอม น้ำหมักมะกรูด น้ำหมักผลไม้ป่า พืชหมัก ผักดอง ผลไม้ดอง เช่น ถั่วหมัก ถั่วเน่า ซาเมียง กระเทียมดอง ผักกาดดอง ผักกาดเขียวดอง มะนาวดอง ทอดดอง ผักเสี้ยนดอง หอมดอง กะหล่ำปลีดอง หัวไชเท้าดอง หน่อไม้ดอง และผักพื้นบ้านอื่นๆ ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์จากตัวอย่างอาหารหมักดองที่เก็บรวบรวมมา พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่ร้อยละ 97 ของจุลินทรีย์โดยรวมที่แยกได้ คือ แบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในอาหารหมัก ดังนั้นจึงได้เลือกกลุ่มนี้มาศึกษาต่อไป



ภาพที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เก็บรวบรวมเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

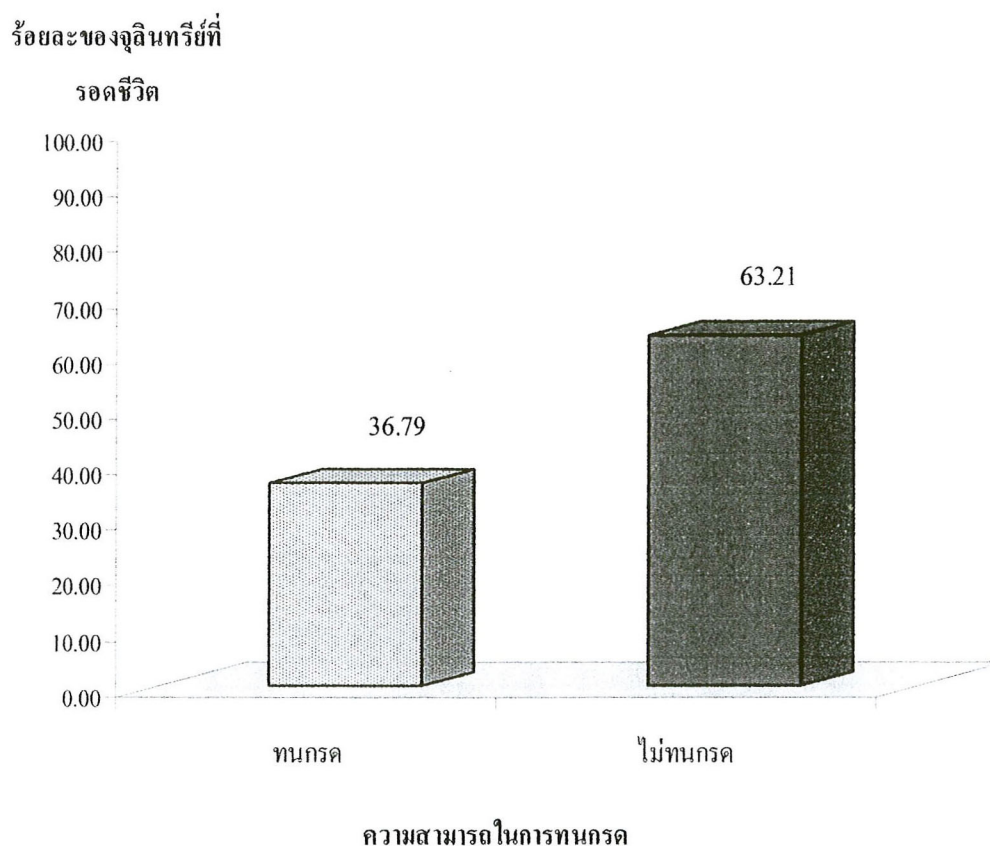
ตารางที่ 7 แสดงลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดองที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มา	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียกรด แลกติกที่แยก ได้ (ไอโซเลต)	ลักษณะแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้	
			รูปร่างกลม เรียงเป็น คู่หรือ 4 เซลล์	รูปร่างท่อน ต่อเป็นสาย
1. เชียงใหม่	25	109	26	83
2. เชียงราย	10	72	18	54
3. พะเยา	10	17	-	17
4. แม่ฮ่องสอน	120	183	81	102
5. ลำพูน	5	-	-	-
6. ลำปาง	5	-	-	-
7. ตาก	10	24	-	24
8. เพชรบูรณ์	10	37	-	37
9. จังหวัดใน ภาคอีสาน	100	242	58	184
10. จังหวัดใน ภาคกลางและ ภาคตะวันออก	30	22	-	22
11. จังหวัดใน ภาคตะวันตก และภาคใต้	10	36	-	36
รวมทั้งหมด	335	742	183	559

2. การทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียที่แยกได้

2.1 คุณสมบัติการทนต่อกรด (Acid tolerance)

ทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 742 ไอโซเลท เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มีพีเอชเท่ากับ 3 และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปตรวจการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับค่าในชั่วโมงที่ 0 พบว่าแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 273 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 36.79 ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้



ภาพที่ 6 ร้อยละของแบคทีเรียที่ทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรด

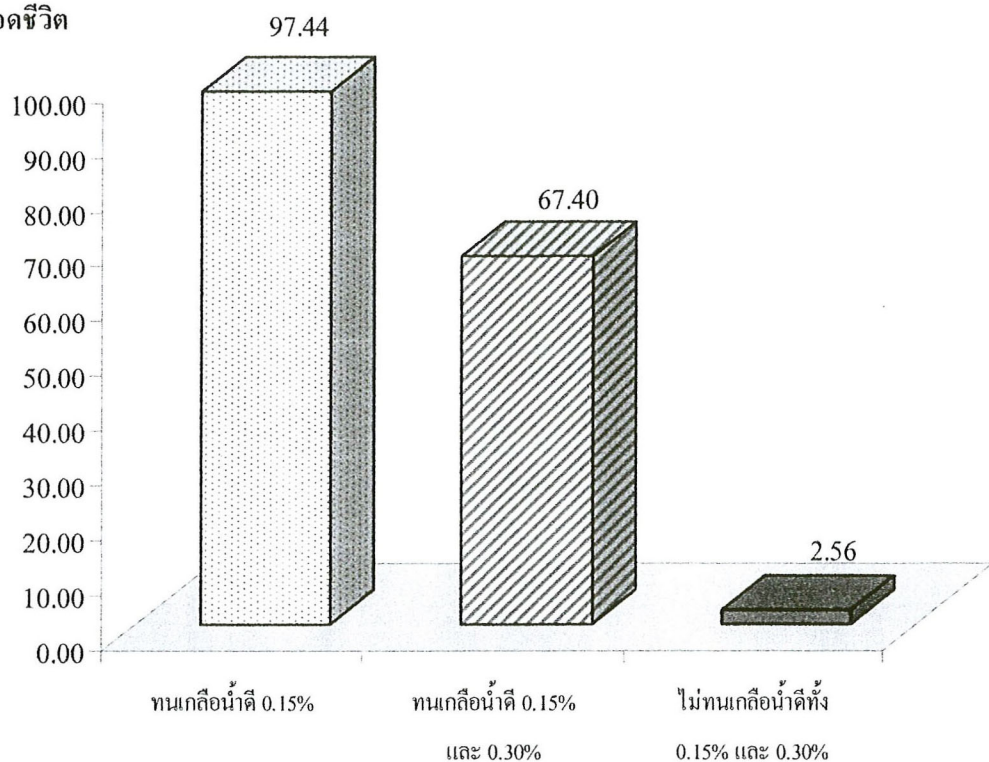
ความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรียแลคติกเป็นคุณสมบัติที่ทำให้สามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะอาหารได้ โดยกระเพาะเป็นด่านแรกในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาโดยการกิน (Dunne *et al.*, 2001) กระเพาะอาหารมีความเป็นกรด (pH อยู่ในช่วง 1.5 ถึง 4.5) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารที่บริโภคเข้าไปจะมีผลต่อความเป็นกรดของกระเพาะอาหารและช่วยป้องกันแบคทีเรียกรดแลคติกจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์และกรด (Lin *et al.*, 2006) นอกจากนี้หน้าที่หลักของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้คือ ทำให้เกิดสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ (Parvez *et al.*, 2006) ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกต้องทน และมีชีวิตรอดจากกระเพาะอาหารและน้ำดีจากลำไส้เล็ก

2.2 คุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt tolerance)

ทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือน้ำดี ซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 จากแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมดที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรด ทั้งหมด 273 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 จำนวน 266 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 97.44 ของแบคทีเรียทั้งหมด และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 จำนวน 184 ไอโซเลท คิดเป็น 67.40 ของแบคทีเรียทั้งหมด

ร้อยละของจุลินทรีย์

ที่รอดชีวิต



ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี

ภาพที่ 7 ร้อยละของแบคทีเรียที่ทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี

ซึ่งคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร คือ การทนต่อกรดและเกลือน้ำดีนี้เป็นสมบัติที่สำคัญของโปรไบโอติก สอดคล้องกับผลวิจัยของ Holzapfel และคณะ (1998) ที่กล่าวถึงการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นโปรไบโอติก ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานและสามารถมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และ Gilliland (1987) ได้กล่าวว่าความสามารถในการรอดชีวิตระหว่างการเดินทางผ่านระบบทางเดินอาหารนั้นขึ้นอยู่กับความทนทานต่อเกลือน้ำดี โดยน้ำดีถูกผลิตที่

ดับจากโคเลสเตอรอลแล้วถูกส่งไปยังลำไส้เล็กตอนบน และน้ำดียังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เรียกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Dunne *et al.*, 2001) ดังนั้นการทนต่อน้ำดีมีความสำคัญสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกในการเติบโตและอยู่รอดในส่วนลำไส้เล็กตอนบน โดยเชื่อมโยงกับความสามารถในการอยู่ร่วมกันกับกรดน้ำดี (Tannock *et al.*, 1989) ซึ่งความเข้มข้นเฉลี่ยของเกลือน้ำดีในลำไส้ 0.3% (Havenarr, 1992) แต่อาจจะสูงถึง 2.0% ในช่วงแรกของการย่อย แบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถทนเกลือน้ำดีได้เพราะต้องมีเอนไซม์จำเพาะคือ เอนไซม์ activity-bile salt hydrolase (BSH) สามารถย่อยสลายน้ำดีได้ ดังนั้นจึงมีผลต่อการลดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Du toit *et al.*, 1998) BSH จะมีมากในจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้หรืออุจจาระของสัตว์ ดังนั้นสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของโปรไบโอติก คือ ต้องสามารถทนต่อน้ำดีในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตได้ เพราะน้ำดีสามารถเป็นสารอันตรายต่อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน (fatty acid) ทำให้ง่ายต่อการถูกย่อยโดยน้ำดี (Jin *et al.*, 1998) ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีจึงมีความสำคัญสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Kociubinski *et al.*, 1999) และความเข้มข้นของน้ำดีเฉลี่ยที่ 0.3 เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Gilliland *et al.*, 1984)

2.3 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อน้ำดีจำนวน 184 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อินดิเคเตอร์ ได้แก่ แบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei* และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่าแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 12 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อินดิเคเตอร์ทดสอบทุกตัว ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

รหัส ตัวอย่าง แบคทีเรีย	จุลินทรีย์อินดิเคเตอร์						
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>		<i>Ps.</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 25922	ATCC 25923	<i>B. cereus</i>	<i>aeruginosa</i> ATCC27853			ATCC 90028
1 Libd33	+	++	++	+	+	+	+
2 Libd56	++	+++	+++	++	+	++	+
3 Libd67	++	+++	+++	++	+	++	+
4 Libd68	++	+++	+++	++	+	++	+
5 Libd69	++	+++	++	+	+	++	+
6 Libd114	+	++	++	+	+	+	+
7 Libd238	++	++	++	+	+	++	+
8 Libd354	++	++	+	+	+	++	++
9 Libd512	++	++	++	+	+	+	+
10 Libd557	+++	+++	+++	++	+	++	+
11 Libd619	++	+++	+++	++	+	++	+
12 Libd709	+++	+++	+++	+	++	++	++

หมายเหตุ +++ : ขนาดวงใส (inhibition zone) ≥ 10 มม.

++ : ขนาดวงใส (inhibition zone) อยู่ในช่วง 7-9 มม.

+ : ขนาดวงใส (inhibition zone) < 7 มม.

จุลินทรีย์ที่สามารถเป็นโปรไบโอติก ควรมีสมบัตียับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งคุณสมบัตินี้จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคติดเชื้อระบบทางเดินอาหารได้ และยังสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีสมบัติดังกล่าวมาใช้ในการช่วยลดหรือรักษาโรคติดเชื้อบางชนิดได้ ซึ่งความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลกติกนั้นอาจมาจากสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตออกมา เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลให้ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สภาวะไม่เหมาะสมการคงตัวหรือการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Tramer, 1966;

Gilliland and Speck, 1984; รุจา, 2544) ซึ่งนอกจากสารเมทาบอลไลต์ที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นช่วยในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแล้วนั้น ความสามารถในการเกาะติดเพื่อครอบครองพื้นที่ทางเดินอาหาร พบว่า *Lactobacilli* จะแย่งจับและก่อดั้วในทางเดินอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะหรือเจริญก่อดั้วในทางเดินอาหาร หรือป้องกันการเกาะดั้วโดยตรงต่อเซลล์ในทางเดินอาหาร สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ครอบครองพื้นที่ของผนังลำไส้เป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. กลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกรดแลกติกเจริญและยึดติดกับผนังลำไส้และสามารถเพิ่มจำนวน (Fuller, 1977) ต่อมาแบคทีเรียกรดแลกติกจะยึดครองบริเวณตัวรับ (receptor) ที่ผิวเซลล์ ทำให้แบคทีเรียที่ก่อโรคถูกกำจัดออกไปจากทางเดินอาหารได้ (Gusils *et al.*, 1999)

2.4 ศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 12 ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น นำมาศึกษาการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาหาค่า generation time และ specific growth rate โดยแสดงค่า generation time (G) และ specific growth rate หรือ μ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก generation time และ specific growth rate

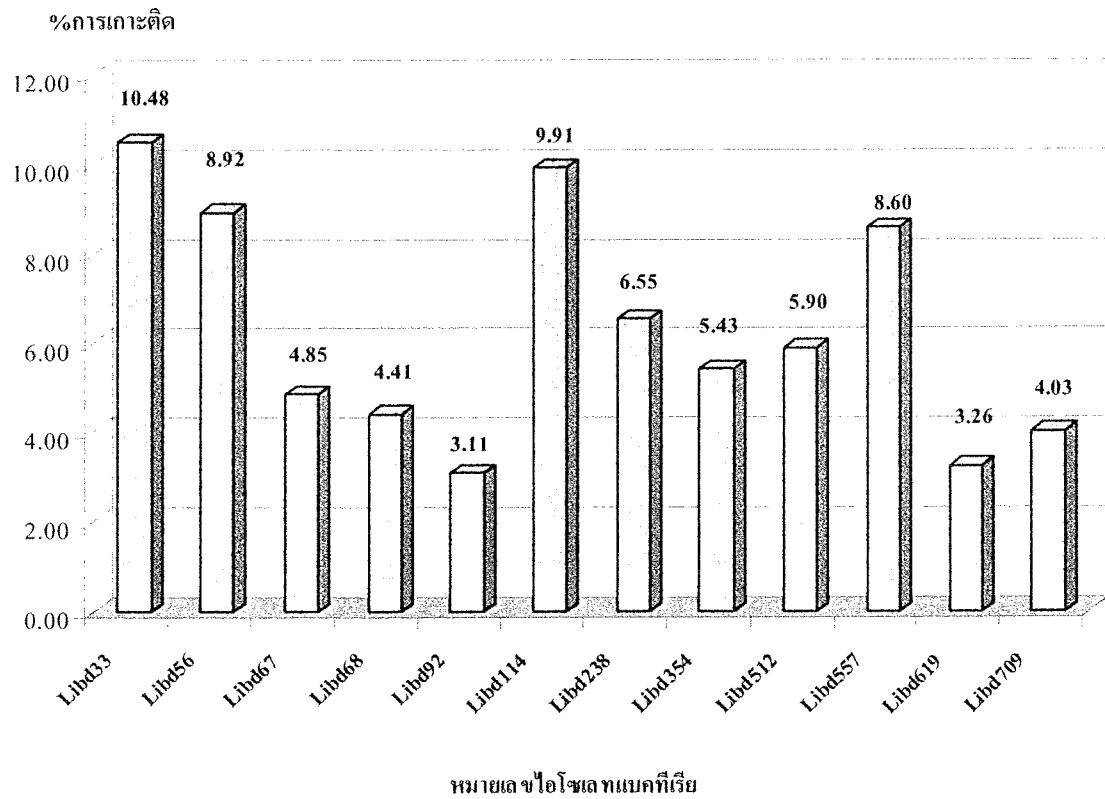
สายพันธุ์ แบคทีเรียกรดแลกติก	Generation time (min)	Specific growth rate: μ (hr^{-1})
1. Libd33	50.06	0.83
2. Libd56	55.32	0.75
3. Libd67	55.78	0.75
4. Libd68	53.88	0.77
5. Libd92	58.80	0.71
6. Libd114	52.14	0.81
7. Libd238	54.66	0.73
8. Libd354	55.20	0.77
9. Libd512	55.09	0.73
10. Libd557	60.12	0.67
11. Libd619	58.32	0.74
12. Libd709	54.87	0.72

พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก Libd33 มีค่า specific growth rate ของการเจริญสูงที่สุด คือ 0.83 hr^{-1} หรือมีค่า generation time ต่ำที่สุด ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติก Libd557 มีค่า specific growth rate ของการเจริญต่ำที่สุด คือ 0.67 hr^{-1} หรือมีค่า generation time สูงที่สุด

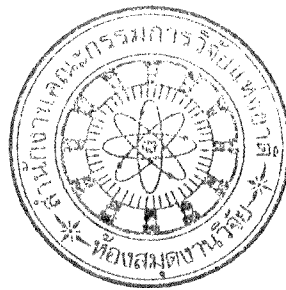
2.5 ทดสอบการเกาะติดของโปรไบโอติกกับเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

คุณสมบัติในการเกาะติดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งที่แสดงถึงความสามารถในการเกาะติด (Adhesion) กับผนังลำไส้ของโปรไบโอติก เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งผลการทดสอบความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรีย แสดงดังภาพที่ 8 และตารางที่ 10

การเกาะติดของแบคทีเรียต่อเซลล์ Caco-2



ภาพที่ 8 ความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การเกาะติด (%Adhesion)



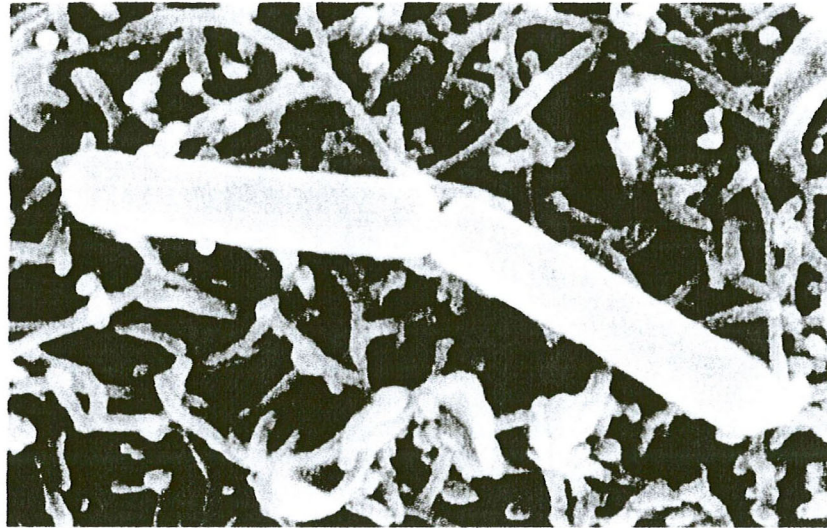
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลกติกทดสอบ

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติก	ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ($\text{Log}_{10}\text{cfu/ml}$)		% การเกาะติด
	เซลล์เริ่มต้น ชั่วโมงที่ 0 (Hr0)	เซลล์เกาะติด ชั่วโมงที่ 2 (Hr2)	
Libd33	7.16 $\pm$ 0.01	6.18 $\pm$ 0.01	10.48 $\pm$ 0.51
Libd56	7.17 $\pm$ 0.02	6.12 $\pm$ 0.01	8.92 $\pm$ 0.43
Libd67	7.16 $\pm$ 0.01	5.85 $\pm$ 0.01	4.85 $\pm$ 0.19
Libd68	7.20 $\pm$ 0.02	5.84 $\pm$ 0.01	4.41 $\pm$ 0.50
Libd92	7.11 $\pm$ 0.02	5.67 $\pm$ 0.01	3.11 $\pm$ 0.13
Libd114	7.22 $\pm$ 0.07	6.10 $\pm$ 0.01	9.91 $\pm$ 0.49
Libd238	7.21 $\pm$ 0.02	6.02 $\pm$ 0.01	6.55 $\pm$ 0.11
Libd354	7.22 $\pm$ 0.04	5.95 $\pm$ 0.01	5.43 $\pm$ 0.32
Libd512	7.20 $\pm$ 0.01	5.97 $\pm$ 0.01	5.90 $\pm$ 0.48
Libd557	7.20 $\pm$ 0.02	5.72 $\pm$ 0.01	8.60 $\pm$ 0.28
Libd619	7.11 $\pm$ 0.03	5.01 $\pm$ 0.01	3.26 $\pm$ 0.16
Libd709	7.71 $\pm$ 0.09	5.71 $\pm$ 0.07	4.03 $\pm$ 0.16

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากการทดลอง พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท มีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ Caco-2 ได้ โดยแบคทีเรีย Libd33 มีความสามารถในการเกาะติดสูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกาะติดเป็น 10.48 $\pm$ 0.51 ส่วนแบคทีเรีย Libd92 มีความสามารถในการเกาะติดต่ำที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกาะติดเป็น 3.11 $\pm$ 0.13 และแบคทีเรีย Libd56, Libd114 และ Libd557 ก็มีความสามารถในการเกาะติดสูงเช่นกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* GG ที่มีรายงานถึงความสามารถในการเกาะติดสูง และในการศึกษาความสามารถในการเกาะติด มักจะศึกษา แบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* GG อ้างอิงเป็นสายพันธุ์ที่เกาะติด หรือเป็นชุดควบคุมชนิดบวก (positive control) (Bogovic Matijasic *et al.*, 2003; Botes, 2008) และจากผลการทดลองนี้ สายพันธุ์แบคทีเรีย Libd33, Libd56 และ Libd114 มีความสามารถในการเกาะติดใกล้เคียงกับสายพันธุ์อ้างอิงดังกล่าว ซึ่งความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นคุณสมบัติที่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการเกาะติดกับผนังลำไส้ได้ เมื่อโปรไบโอติกผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต ส่งผลถึงความสามารถในการอยู่รอดได้ และส่งผลดีต่อลำไส้ของสิ่งมีชีวิตที่โปรไบโอติกนั้นอาศัยอยู่ เนื่องจาก

โปรไบโอติกที่เกาะติดลำไส้ได้จะครอบครองพื้นที่ของผนังลำไส้ และเกิดกลไกการป้องกันจุลินทรีย์ชนิดไม่ดี หรือจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เกาะติดผนังลำไส้ได้ จะขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Eschericia coli* และ *Salmonella* spp. กลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญ และยึดติดติดกับผนังลำไส้ และสามารถเพิ่มจำนวนได้ (Fuller, 1977; Coconnier *et al.*, 1992) ต่อมาแบคทีเรียกรดแลคติกจะยึดครองบริเวณตัวรับ (receptor) ที่ผิวเซลล์ ทำให้แบคทีเรียที่ก่อโรคถูกกำจัดออกไปจากทางเดินอาหาร (Gusils *et al.*, 1999)



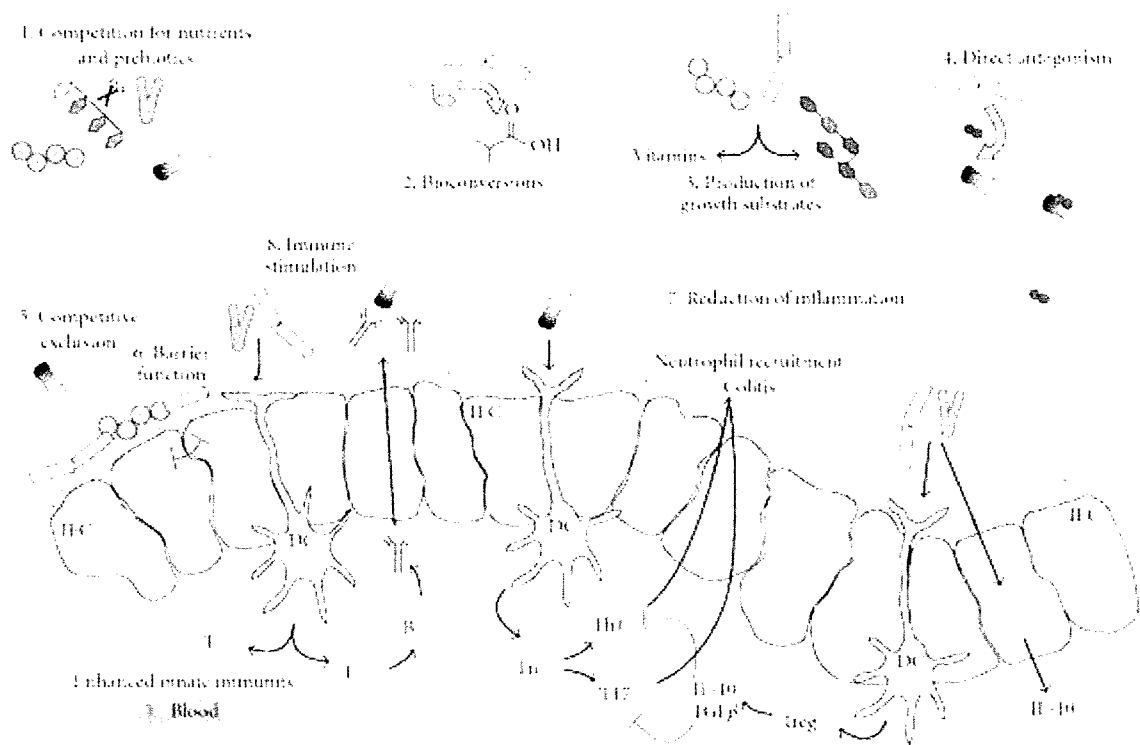
ภาพที่ 9 ลักษณะการเกาะติดกับเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส
ที่มา Sarem และคณะ, 1995

ความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียนี้ อาจเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนรูปของแอกตินและความเข้มข้นของโปรตีนหลักตัวอื่นๆจะมีผลต่อการเกาะติดของเชื้อ (Finlay *et al.*, 1992) ความสามารถในการเกาะติดกับผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจจะมีเกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์ของไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ไฮโดรโฟบิกจะเป็นการสัมผัสครั้งแรกระหว่างเซลล์แบคทีเรียและมิวคัสหรือเยื่อหุ้มชั้นนอกสุดของเซลล์ (mucus or epithelial cell) (Wadstrom, 1988) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียจะแสดงการจับกับเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บริเวณ receptor sites ซึ่งจะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของแบคทีเรีย การเกาะของแบคทีเรียจะไม่ขึ้นกับสายพันธุ์และตำแหน่งของการจับเท่านั้น แต่การเกาะอาจขึ้นอยู่กับ affinity ซึ่งจะทำให้ความสามารถในการเกาะติดดีขึ้น (Bogovic Matijasic *et al.*, 2003) โดยการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเป็นกรดต่ำ (pH), ระยะการเติบโตของแบคทีเรีย, ปริมาณของแบคทีเรีย และวิธีการทดลอง รวมทั้งปริมาณของเซลล์มีความสำคัญมาก (Greene and Klaenhammer, 1994) แต่จากการทดลองของ Botes และคณะ (2008) พบว่า *E.coli* ST4SA มี

ความสามารถในการเกาะกับเซลล์ Caco-2 ดังเพราะว่า *E.coli* ST4SA มีความเป็นไฮโดรโฟบิกต่ำ แต่อย่างไรก็ตามมีหลายงานวิจัย (Savage, 1992; Ouwehand *et al.*, 1999; Schillinger *et al.*, 2005) ที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรโฟบิกกับการเกาะติดกับเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการศึกษาที่แตกต่างกัน เป็นต้น

ความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังส่งผลต่อระบบทางเดินอาหารและสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่แบคทีเรียดังกล่าวอาศัยอยู่ด้วย โดยกลไกในการต่อต้านการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคใช้กระบวนการที่เรียกว่า competitive exclusion หรือ colonization resistance ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคสามารถถูกขับออกทางอุจจาระได้ ดังภาพที่

10



ภาพที่ 10 แสดงกลไกการต่อต้านการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่

ที่มา <http://www.hindawi.com> (วันที่ 27 ธันวาคม 2552)

ซึ่งนอกจากจะขัดขวางการเกาะของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคโดยตรงแล้ว โปรไบโอติกในทางเดินอาหารยังอาจผลิตสารซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ เช่น bacteriocins, bacteriocin-like substances, กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดแลกติก อะซิติก โพรพิโอนิก และบิวทิริก นอกจากนี้จะช่วยลด pH ของลำไส้และไส้ติ่งลงให้ไม่เหมาะสมสำหรับการขยายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้ว กรดที่ยังไม่ไอออนไนซ์ยังมีผลในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอย่างชะงัดด้วย (Meynell, 1963) แก๊ส

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ กรคน้ำดีอิสระ เช่น deoxycholic acid เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยป้องกันการเกาะและสร้างโคโลนี (colonization) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และสามารถแย่งอาหารกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้

3. คุณสมบัติของโปรไบโอติกต่อการต้านการอักเสบ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิด Cytokines ของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกทดสอบ

จากผลการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 12 สายพันธุ์ ในการเหนี่ยวนำให้เกิด Cytokines ของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 แสดงผลดังตารางที่ 11 และภาพที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณ Cytokines IL-6 และ IL-10 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้างขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

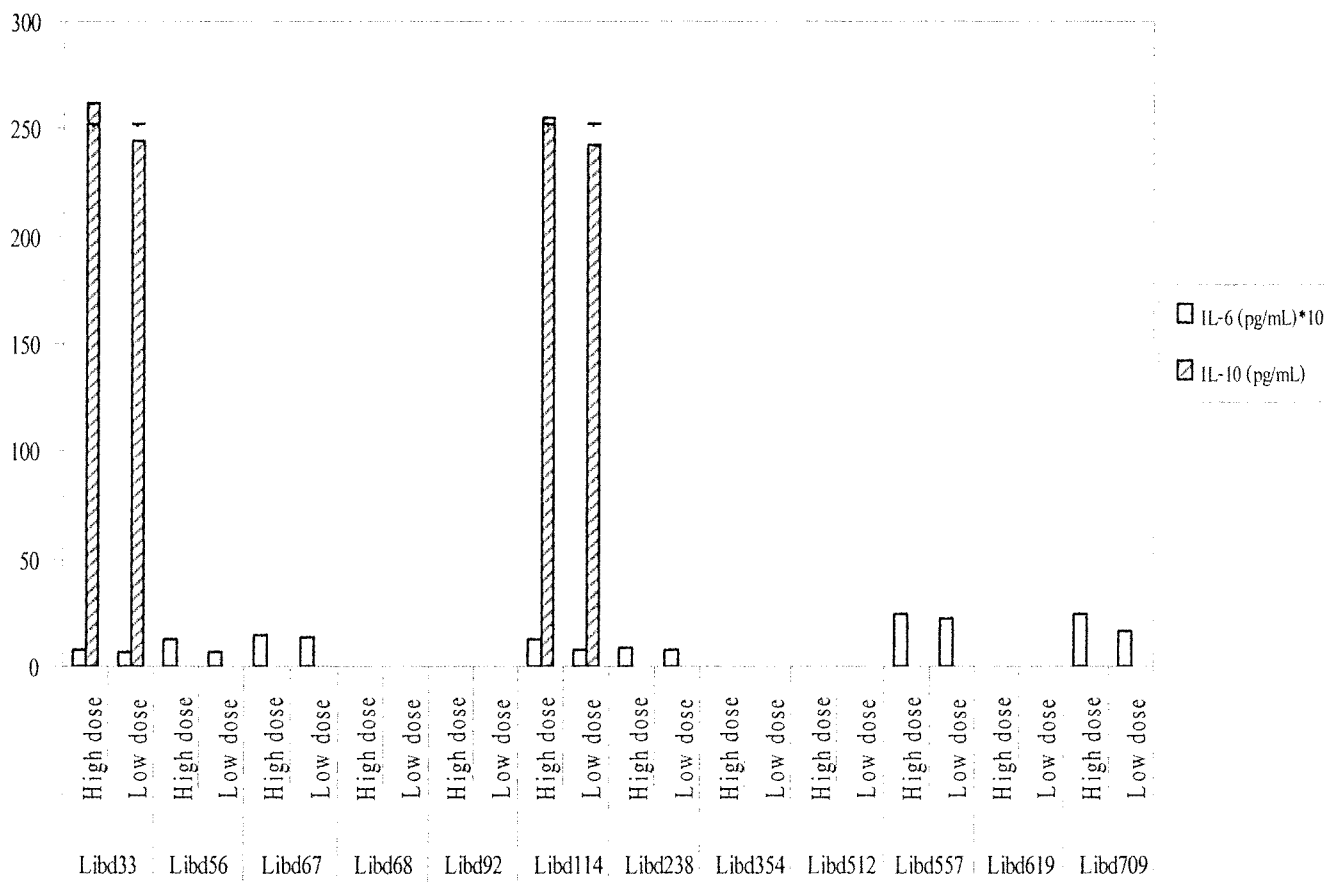
สายพันธุ์แบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้น	ปริมาณ Cytokines	
		IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Libd33	High dose	0.76±0.02	262.34±0.12
	Low dose	0.71±0.03	244.22±0.17
Libd56	High dose	1.3±0.01	ND
	Low dose	0.7±0.02	ND
Libd67	High dose	1.46±0.02	ND
	Low dose	1.32±0.03	ND
Libd68	High dose	ND	ND
	Low dose	ND	ND
Libd92	High dose	ND	ND
	Low dose	ND	ND
Libd114	High dose	1.23±0.01	255.46±0.09
	Low dose	0.82±0.02	242.37±0.07
Libd238	High dose	0.83±0.02	ND
	Low dose	0.77±0.01	ND
Libd354	High dose	ND	ND
	Low dose	ND	ND

ตารางที่ 11 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้น	ปริมาณ Cytokines	
		IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Libd512	High dose	ND	ND
	Low dose	ND	ND
Libd557	High dose	2.45	ND
	Low dose	2.22	ND
Libd619	High dose	ND	ND
	Low dose	ND	ND
Libd709	High dose	2.43±0.01	ND
	Low dose	1.62±0.03	ND

หมายเหตุ ND = Not detected level

ค่าที่ได้เกิดจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 11 ปริมาณ Cytokines IL-6 และ IL-10 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้างขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติก

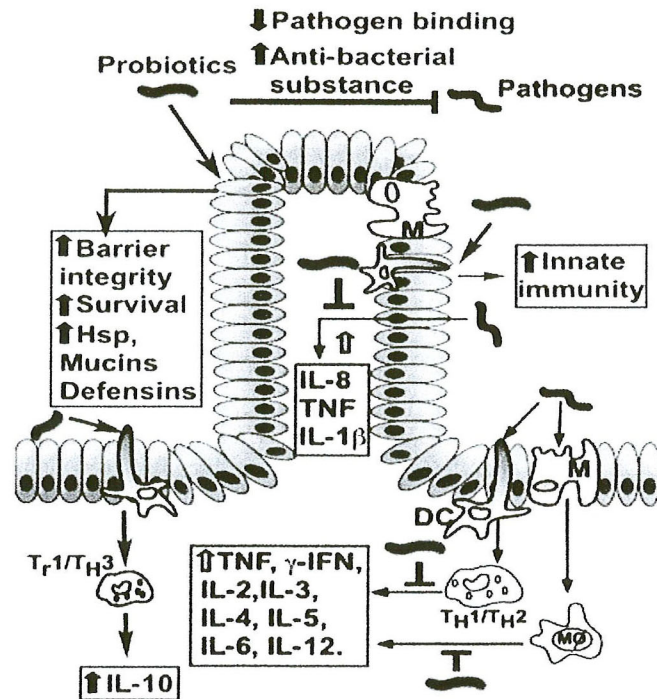
จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์แบคทีเรีย Libd 33 และ Libd 114 มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IL-10 โดยเซลล์ Caco-2 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันกับเซลล์แบคทีเรียดังกล่าว โดยพบว่าปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่ระดับ High dose และ Low dose ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันนั้น มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง IL-10 โดยแบคทีเรียที่ระดับ High dose สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้าง IL-10 ได้สูงกว่าที่แบคทีเรียระดับ Low dose เพียงเล็กน้อย หรือไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้นปริมาณแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับ High dose (ประมาณ 10^8 cfu/mL) และ Low dose (ประมาณ 10^6 cfu/mL) สามารถเหนี่ยวนำให้สร้าง IL-10 ได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งนอกจากสายพันธุ์แบคทีเรีย Libd 33 และ Libd 114 จะมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IL-10 แล้ว ยังสามารถเหนี่ยวนำให้สร้าง IL-6 ได้ แต่ตรวจพบในปริมาณต่ำ ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้นอกจากจะเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้าง cytokine IL-10 ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบได้แล้วยังยังสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง

cytokine IL-6 ซึ่งถึงแม้จะเป็น cytokine ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ แต่การตรวจพบในปริมาณต่ำนี้ อาจเป็นการกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันปกติ (immune response) ของเซลล์เจ้าบ้านเมื่อเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน อาจไม่ส่งผลต่อการเกิดภาวะอักเสบ อีกทั้งการตรวจพบ cytokine IL-10 ในปริมาณสูงยังช่วยในเรื่องการยับยั้งการอักเสบ เนื่องจาก IL-10 มีคุณสมบัติในการเป็นได้ทั้ง cytokine ที่จำกัดการทำงานของเซลล์ Th1 ในการสร้าง cytokine ที่ตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่ก่อให้เกิดภาวะอักเสบและเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ซึ่งเรียกการควบคุมการตอบสนองเป็นแบบ down-regulate proinflammatory cytokines และยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammation) ได้ (Gackowska *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2007) ดังนั้นแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้จึงมีคุณสมบัติในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันโดยการปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าการยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพียงอย่างเดียว คือ การยับยั้งไม่ให้เกิดการสร้าง cytokine ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นเพื่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ Libd56, Libd67, Libd238, Libd557, Libd709 เหนียวนำไปให้เซลล์ Caco-2 สร้าง IL-6 แต่ไม่สร้าง IL-10 โดยเฉพาะแบคทีเรีย Libd557 และ Libd709 เหนียวนำไปให้เซลล์สร้าง IL-6 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆดังกล่าว แต่ทั้งนี้ แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่สามารถเหนียวนำไปให้เซลล์ Caco-2 สร้าง IL-6 ได้นั้น พบว่าสร้างออกมาในปริมาณต่ำมาก และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ที่ปริมาณแบคทีเรียระดับ High dose และ Low dose ซึ่งในเรื่องของการอักเสบและคุณสมบัติการต้านการอักเสบนั้น เกี่ยวข้องกับ cytokines ชนิด Interleukin-6 (IL-6) และ Interleukin-10 (IL-10) แสดงดังภาพที่ 12 คือ

IL-6 ผลิตโดยแมคโครฟาจ (macrophage) โดย IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่มีหน้าที่หลายอย่าง กล่าวคือ ทำหน้าที่กระตุ้น T cell โดยเฉพาะ Th2, mononuclear-phagocyte system cells และ endothelial cells IL-6 มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบรวมถึงการสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนในตับซึ่งเกี่ยวกับการตอบสนองแบบเฉียบพลัน อย่างเช่น C-reactive protein, clotting, coagulation และ complement factor เป็นต้น (Peakman and Vergani, 1997) Hidemura และคณะ (2003) พบว่า *L. kefiranofaciens* M1 และ *L. kefiranofaciens* (BCRC16059) มีรูปแบบการหลั่ง IL-6 ที่แตกต่างกัน แสดงว่าจะมี immunogenicity ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของสายพันธุ์ Cross (2002) พบว่าการกระตุ้นการตอบสนองของเจ้าบ้านโดยแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ และแบคทีเรียกรดแลคติกต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่างกัน (Cross *et al.*, 2004; Tejada-Simon and Pestka, 1999)

IL-10 ผลิตโดย regulatory T cell โดยจะทำหน้าที่ในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่ง IL-10 สามารถเป็นได้ทั้ง anti-inflammatory และ immunoregulatory การตอบสนองของภูมิคุ้มกันจะควบคุมไซโตไคน์ให้มีความสมดุลในสิ่งมีชีวิต (Opal *et al.*, 1998) Hidemura และคณะ (2003) พบว่าถ้าความเข้มข้นของ IL-10 เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบของเจ้าบ้านมากขึ้นโดยการกระตุ้นให้มี pro-inflammatory เพิ่มมากขึ้น IL-10 จะยับยั้งการผลิต Interferon-gamma หรือ IFN-gamma (IFN-gamma เป็นสารที่ทำให้เกิดการอักเสบและอาจชักนำให้เกิดความเป็นพิษในระดับเซลล์ได้) และกลายเป็นการตอบสนอง

ของระบบภูมิคุ้มกัน และ IL-10 อาจมีผลต่อ activated macrophages และ antigen presenting cells ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการตอบสนองต่อการอักเสบได้ IL-10 มีหน้าที่สำคัญในการจำกัดการผลิตไซโตไคน์และเคโมไคน์จากแมคโครฟาจและเดนไดรติก



ภาพที่ 12 การควบคุมให้เกิดภาวะสมดุลในลำไส้ของโปรไบโอติก โดยโปรไบโอติกจะกระตุ้นการตอบสนองของเจ้าบ้าน

ที่มา: Vanderpool และคณะ (2008)

เนื่องจาก IL-10 มีผลต่อการควบคุมไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบได้ ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ Libd 33 และ Libd 114 ซึ่งมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้าง IL-10 ได้ ทั้งนี้แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ยังมีความสามารถในการเกาะติดเซลล์ Caco-2 ได้สูง จึงอาจเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างไซโตไคน์ เพื่อตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ได้ จากผลการทดลองนี้ จึงเป็นไปได้ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นโปรไบโอติกที่มีความสามารถในการด้านการอักเสบ หรือเพื่อเป็นต้นเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีวัตถุประสงค์ในการด้านการอักเสบของลำไส้ได้

4. เติบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

จากผลการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยวิธีทางชีวเคมี โดยอ้างอิงตามการเทียบเคียงแบคทีเรียกรดแลกติกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Volume 2 (2001) ได้ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 12

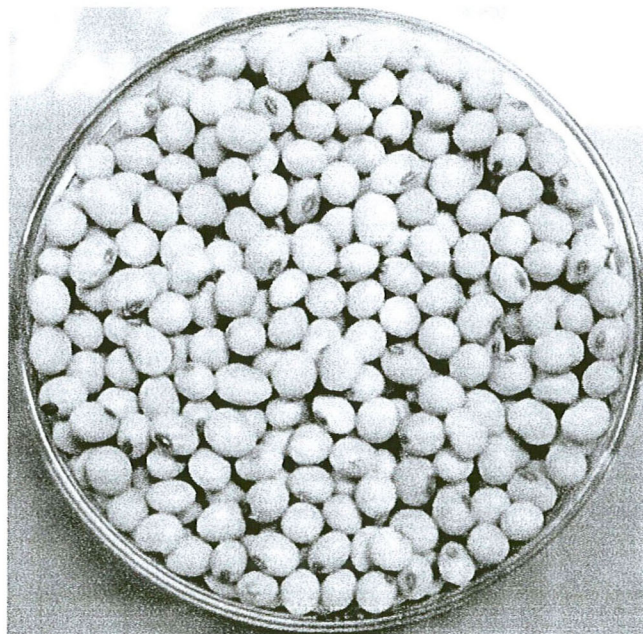
ตารางที่ 12 แสดงผลการเทียบเคียงแบคทีเรียกรดแลกติกโดยการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

การทดสอบ	แบคทีเรีย	
	Libd 33	Libd 114
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน
การติดสีแกรม	บวก	บวก
catalase test	-	-
gas from glucose	-	-
growth 15/45 องศาเซลเซียส	+/-	+/-
การใช้คาร์โบไฮเดรต		
Amygdalin	+	+
Arabinose	+	+
Cellobiose	+	+
Esculin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Lactose	+	-
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Raffinose	-	+
Rhamnose	-	-
Ribose	+	+
Sorbitol	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง มีคุณสมบัติตามการทดสอบนั้น หรือสามารถเจริญในสภาวะทดสอบนั้น
- หมายถึง ไม่มีคุณสมบัติตามการทดสอบนั้น หรือไม่สามารถเจริญในสภาวะทดสอบนั้น

จากการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียทดสอบเบื้องต้น พบว่าใกล้เคียงแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* ทั้งสองไอโซเลท เมื่อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ พบว่า แบคทีเรีย Libd33 มีความสามารถในการเกาะติดสูงสุด และมีความสามารถในการเจริญได้ดีที่สุด (พิจารณาจากค่า specific growth rate และ generation time) และ Libd33 มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สามารถสร้าง IL-10 ได้สูงกว่า Libd114 เล็กน้อย ดังนั้น จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ Libd33 เป็นตัวแทนในการศึกษาเป็นต้นเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลือง เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเป็นต้นเชื้อ และคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตได้จากต้นเชื้อที่คัดเลือกได้

5. เตรียมต้นเชื้อโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลือง และทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60

เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อนำมาเป็นต้นเชื้อสำหรับผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลืองได้แล้วนั้น ยังได้คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลือง โดยถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในการผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลืองคือ สายพันธุ์ เชียงใหม่ 60 เนื่องจาก

- เป็นพันธุ์ที่ผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตร
- เป็นพันธุ์ที่แพร่หลายและนิยมปลูกในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคเหนือ
- ให้ผลผลิตต่อไร่สูง มีความทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศ และทนต่อโรคต่างๆ สูง

และนำมาผลิตเป็นนมเปรี้ยวถั่วเหลืองโดยใช้ต้นเชื้อ Libd33 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ นมถั่วเหลืองที่ไม่เติมต้นเชื้อ และชุดควบคุมที่เป็นลบ โดยใช้ต้นเชื้อ Libd92 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ตรวจพบว่ามีสมบัติการเกาะติดต่ำกว่าสายพันธุ์ทดสอบอื่นๆ และตรวจไม่พบการเหนียวนำไปให้สร้าง IL-6 และ IL-10 จึงนำมาศึกษาเป็นต้นเชื้อควบคุมชนิดลบในการผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลือง ติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ชีวภาพได้ผลดังนี้

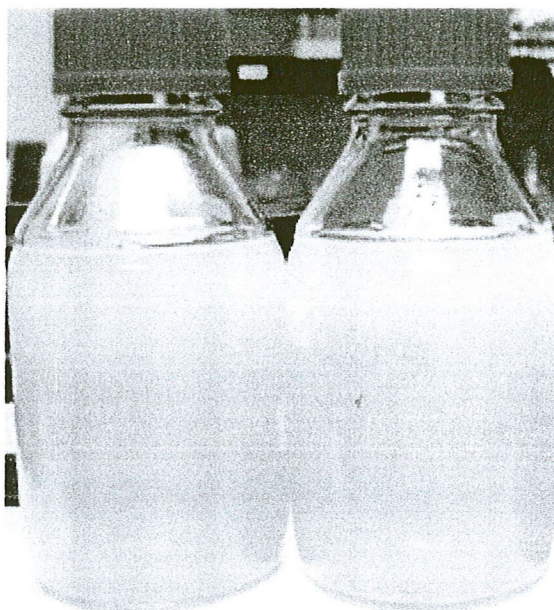
ตารางที่ 13 แสดงลักษณะของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ณ ระยะเวลาต่างๆ

เวลาของการหมัก	ตัวอย่าง	pH	ลักษณะทางกายภาพ				
			สี	กลิ่น	รสชาติ	ความขุ่น	การเกิดฟอง/แก๊ส
วันที่ 0	SM	6.83	ครีมปนเหลือง	ถั่วเหลืองอ่อนๆ	หวาน	ขุ่นเล็กน้อย	-
	FSM33	6.32	ครีมปนเหลือง	ถั่วเหลืองอ่อนๆ	หวาน	ขุ่นเล็กน้อย	-
	FSM92	6.21	ครีมปนเหลือง	ถั่วเหลืองอ่อนๆ	หวาน	ขุ่นเล็กน้อย	-
วันที่ 30	SM	6.76	ครีมปนเหลือง	ถั่วเหลืองอ่อนๆ	หวาน	ขุ่นเล็กน้อย	-
	FSM33	3.14	น้ำตาลอ่อน	หอมและมีกลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	มีการแยกชั้นและตกตะกอนสีครีมปนเหลืองส่วนบนค่อนข้างใส	มีฟองที่ผิวหน้า
	FSM92	3.46	น้ำตาลอ่อน	หอมและมีกลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	มีการแยกชั้นและตกตะกอนสีครีมปนเหลืองส่วนบนค่อนข้างใส	มีฟองที่ผิวหน้า

หมายเหตุ Soybean milk: SM (นมถั่วเหลืองที่ไม่เติมดินเชื้อ)

Fermented soybean milk33: FSM (นมถั่วเหลืองเปรี้ยวซึ่งหมักโดยเติมดินเชื้อ Libd33)

Fermented soybean milk92: FSM (นมถั่วเหลืองเปรี้ยวซึ่งหมักโดยเติมดินเชื้อ Libd92)



ภาพที่ 14 แสดงลักษณะผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง

5.1 การตรวจปริมาณกรดแลกติกโดยเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ ณ วันที่ 0 และ 30 ของการหมัก

จากการตรวจสอบปริมาณกรดแลกติกในการผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลือง ในวันแรก (วันที่ 0) และวันสุดท้าย (วันที่ 30) ของการหมัก พบว่าปริมาณกรดแลกติกของตัวอย่างนมเปรี้ยวถั่วเหลืองและกลุ่มควบคุมมีปริมาณเริ่มต้นใกล้เคียงกันอยู่ที่ประมาณ 0 - 0.08 g/100 มล. ตัวอย่างนมถั่วเหลือง และในผลิตภัณฑ์ และในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ณ วันที่ 30 ของการหมัก ตรวจพบกรดแลกติกอยู่ในช่วง 0.62-0.87 g/100 มล. ตัวอย่างนมถั่วเหลือง ยกเว้นในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมดินเชื้อ ตรวจไม่พบปริมาณกรดแลกติก

ตารางที่ 14 ปริมาณกรดแลกติกที่ตรวจพบในตัวอย่างนมและนมเปรี้ยวถั่วเหลือง

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแลกติก (g/100 มล. ตัวอย่าง)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
FSM	0.00	0.02
FSM33	0.07±0.01	0.87±0.03
FSM92	0.08±0.01	0.72±0.05

จากผลการทดลอง พบว่าในนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd33 และ Libd92 ตรวจพบปริมาณกรดแลกติกในนมเปรี้ยวที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd33 สูงกว่า Libd92 เพียงเล็กน้อย แต่ในชุดควบคุมที่ไม่เติมต้นเชื้อ ตรวจไม่พบปริมาณกรดแลกติก เนื่องจากไม่เกิดกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ชนิดใดๆ

5.2 ตรวจสอบชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนเพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยต่อการบริโภคโดยเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ตารางที่ 15 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นมและนมเปรี้ยวถั่วเหลือง

ตัวอย่าง	จำนวน จุลินทรีย์ ทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์และรา (CFU/ml)	coliform bacteria (MPN/ 100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/ 100 ml)	<i>Salmonella</i> sp. (CFU/ml)	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (CFU/ml)	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> (CFU/ml)	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> (CFU/ml)
FSM	ไม่พบ	ไม่พบ	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
FSM33	6.3×10^7	ไม่พบ	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
FSM92	2.6×10^6	ไม่พบ	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ ค่าที่ได้ คือ ค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

CFU (Colony forming unit) = จำนวนกลุ่มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการตรวจสอบชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในนมและนมเปรี้ยวถั่วเหลือง ณ วันที่ 30 ของการทดลอง พบว่าในนมถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น (SM) ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ เนื่องจากได้ผ่านกระบวนการพาสเจอไรซ์ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน และไม่ได้เติมต้นเชื้อ ส่วนนมเปรี้ยวถั่วเหลือง Libd33 และ Libd92 ณ วันที่ 30 ของการหมัก ตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมด 6.3×10^7 CFU/ml และ 2.6×10^6 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมดที่ตรวจพบในนมเปรี้ยวถั่วเหลืองนี้ เป็นแบคทีเรียต้นเชื้อที่เติมลงไปในการผลิต ซึ่งนมเปรี้ยวที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ พบว่าในนมเปรี้ยวที่

เดิมต้นเชื้อ Libd33 พบมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าในนมเปรี้ยวที่เดิมต้นเชื้อ Libd92 ประมาณ 1 Log cycle แต่อย่างไรก็ตาม ในนมเปรี้ยวที่เดิมต้นเชื้อทั้งสองชนิดเมื่อผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 30 วัน ยังตรวจพบปริมาณแบคทีเรียต้นเชื้อในปริมาณสูงถึงล้านเซลล์พอที่จะส่งเสริมสุขภาพเมื่อบริโภคได้ นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์ทั้งหมด ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อน คือ ตรวจไม่พบยีสต์ รา และแบคทีเรียชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร คือ *E. coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus*

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าในนมและนมเปรี้ยวถั่วเหลืองตรวจไม่พบแบคทีเรีย *S. aureus*, *Salmonella* sp., *C. perfringens* ตลอดการหมัก ซึ่งเป็นไปได้ว่าในกระบวนการหมักผ่านขั้นตอนการพาสเจอร์ไรซ์เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน รวมทั้งค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าต่ำ คือ จะอยู่ในช่วง 3.14 – 3.46 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *C. perfringens* จะอยู่ในช่วง 6.0 – 7.6 ค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *Salmonella* spp. อยู่ในช่วง 6.0 – 7.5 และ ค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *E. coli* อยู่ในช่วง 6.0 – 8.0 จึงทำให้ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อน และจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารดังกล่าว นอกจากนี้ยังตรวจพบปริมาณแบคทีเรียแลคติกในปริมาณสูงในผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้กรดแลคติกที่พบนั้นเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมักนี้ ส่วนผลการตรวจวิเคราะห์นมถั่วเหลืองที่ไม่ได้เดิมต้นเชื่อนั้น ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนทุกชนิด ถึงแม้ค่าพีเอชยังมีค่าสูงและแทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงก็ตาม อาจเป็นเพราะว่า ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ในการทดลอง และอยู่ในระบบปิด อีกทั้ง เริ่มต้นนั้น วัตถุดิบที่นำมาผลิต ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีสปอร์หรือทนความร้อนสูง จึงทำให้การกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยการพาสเจอร์ไรส์สามารถเกิดได้สมบูรณ์ โดยไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดใด เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลาจนถึง 30 วัน ที่อุณหภูมิการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

ดังนั้นจากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าว จะสามารถทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหมักถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักโยเด็มเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อความปลอดภัยและผลเบื้องต้นต่อสุขภาพในการบริโภคได้ ว่าในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักมีความปลอดภัย ทั้งปลอดภัยจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดที่ก่อโรค นอกจากนี้ก็ทั้งพบว่าข้อมูลเรื่องปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจพบยังคงมีปริมาณสูงในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งจะสามารถใช้เป็นแนวทางช่วยในการเลือกบริโภคในแง่ของการบริโภคเพื่อต้องการ probiotic ซึ่งจะต้องเลือกบริโภคในช่วงที่แบคทีเรียแลคติกมีปริมาณสูงพอเหมาะ

5.3 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก โดยทำการทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของต้นเชื้อเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์ และความสามารถในการเจริญของเชื้อเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์

5.3.1 การทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพ

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของนมและนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ พบว่า ตัวอย่าง ณ วันที่ 0 ของการหมัก ทุกตัวอย่างไม่พบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ แต่ในตัวอย่างที่ผลิตโดยการเดิมต้นเชื้อทั้ง Libd33 และ Libd92 ณ วันที่ 30

ของการหมัก พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ ยกเว้นในชุดควบคุมที่ไม่เติมต้นเชื้อ ซึ่งนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อ Libd33 และ Libd92 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ใกล้เคียงกัน แสดงดังตารางที่ 16 ซึ่งตัวอย่างที่พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้นั้น คือ ตัวอย่างที่เติมต้นเชื้อคังนั้น เมื่อต้นเชื้อมีความสามารถในการเจริญได้ในผลิตภัณฑ์ จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจเกิดจาก สารเมแทบอลิไต์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ต้นเชื้อเมื่อเจริญในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง ซึ่งเมแทบอลิไต์ที่อาจถูกผลิตออกมาและมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ เช่น กรดแลกติก, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, แบคทีริโอซิน และสารอื่น ๆ เป็นต้น โดยฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแบคทีเรียต้นเชื้อนี้เมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์แล้ว ยังทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีฤทธิ์เช่นเดียวกับเมื่อทดสอบกับต้นเชื้อโดยตรง

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของนมและนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อโปรไบโอติก

ชนิดตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของขนาด inhibition zone ที่ทดสอบต่อเชื้อ (มิลลิเมตร)									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i>		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	
	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 0	วันที่ 30	วันที่ 0	วันที่ 30
SM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSM33	-	+++	-	+++	-	+++	-	++	-	+++
FSM92	-	++	-	+++	-	+++	-	++	-	++

หมายเหตุ - : ไม่เกิดโซนใส (clear zone)

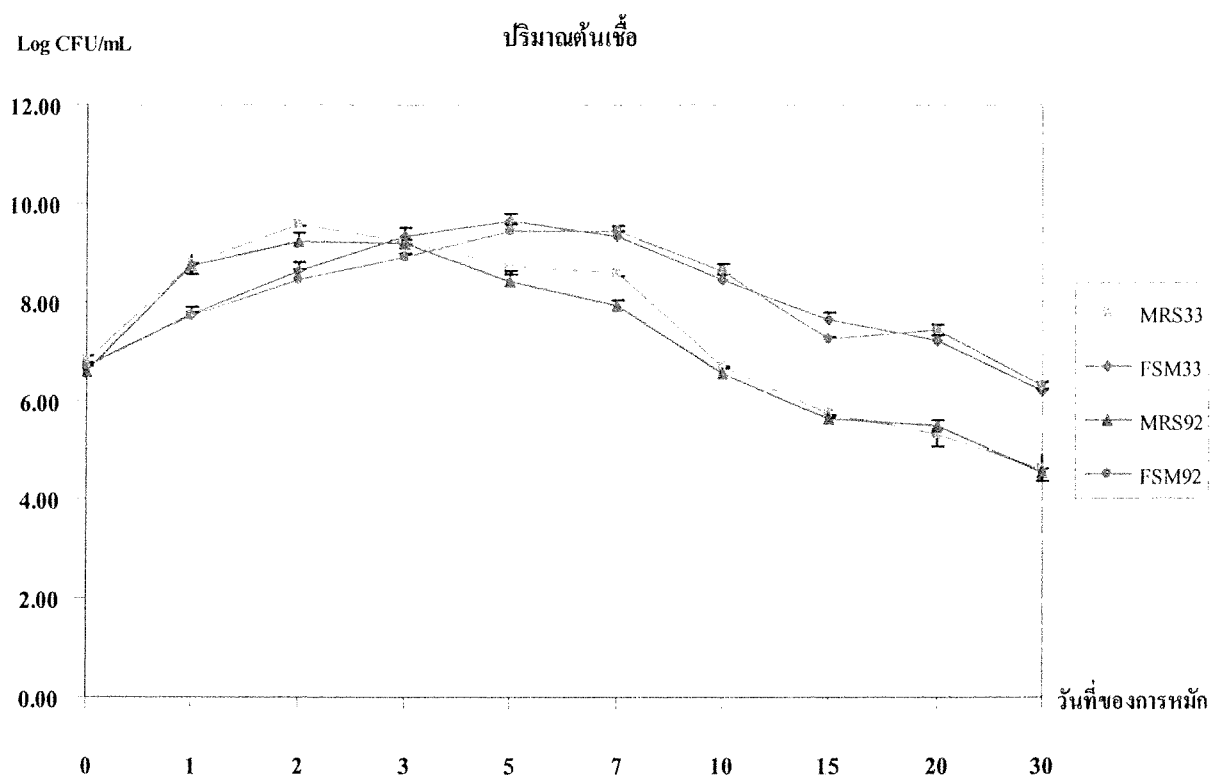
+++ : ขนาดวงใส (inhibition zone) ≥ 20 มม.

++ : ขนาดวงใส (inhibition zone) อยู่ในช่วง 11-19 มม.

+: ขนาดวงใส (inhibition zone) < 10 มม.

5.3.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์จากการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก โดยการตรวจสอบความสามารถในการเจริญของต้นเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก (*L. plantarum*) เมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับเมื่ออยู่ในอาหารเหลวมาตรฐานที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก โดยตรวจสอบตัวอย่าง ณ วันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 30 ของการหมัก พบว่า รูปแบบการเจริญของแบคทีเรียต้นเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ คือ Libd33 (MRS33 และ FSM33 คือ ต้นเชื้อแบคทีเรีย Libd33 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS และในนมถั่วเหลืองตามลำดับ) และ Libd92 (MRS92 และ FSM92 คือ ต้นเชื้อแบคทีเรีย Libd92 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

MRS และในนมถั่วเหลืองตามลำดับ) มีแนวโน้มการเจริญเหมือนกัน มีปริมาณการเจริญแตกต่างกันเล็กน้อย ในช่วงของการหมัก ซึ่งเมื่อเริ่มต้น ณ วันที่ 0 ของการหมัก ดันเชื้อมีปริมาณอยู่ที่ 6 log cycle และแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเพิ่มจำนวนถึง 2 log cycle อย่างรวดเร็ว ณ วันที่ 1 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth และ ณ วันที่ 2 ของการหมัก เมื่อเลี้ยงในนมถั่วเหลือง และแบคทีเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 5-7 ของการหมัก และมีแนวโน้มลดลงหลังจากวันที่ 7 ของการหมักสำหรับในนมถั่วเหลือง ส่วนในอาหาร MRS broth นั้น พบว่าแบคทีเรียเจริญรวดเร็วและมีปริมาณสูงสุด ณ วันที่ 2 ของการหมัก และมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น และเมื่อผ่านการหมัก 30 วัน พบว่า แบคทีเรียดันเชื้อมีปริมาณลดลงอยู่ที่ 4 log cycle เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth และอยู่ที่ประมาณ 6 log cycle เมื่อเลี้ยงในนมถั่วเหลือง ซึ่งปริมาณแบคทีเรียดันเชื้อที่ยังหลงเหลืออยู่ในปริมาณสูงสำหรับในนมถั่วเหลือง ถึงแม้ว่าจะผ่านระยะเวลาการหมักแล้วถึง 30 วัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารอาหารในนมถั่วเหลืองนั้น ช่วยในการเจริญ และทำให้แบคทีเรียดันเชื้อยังคงสภาพอยู่ได้ในปริมาณสูงพอที่จะส่งเสริมสุขภาพได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสารอาหารมาตรฐานที่เป็นส่วนผสมของอาหาร MRS broth ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ปริมาณแบคทีเรียดันเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในนมและนมเปรี้ยวถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐาน MRS broth

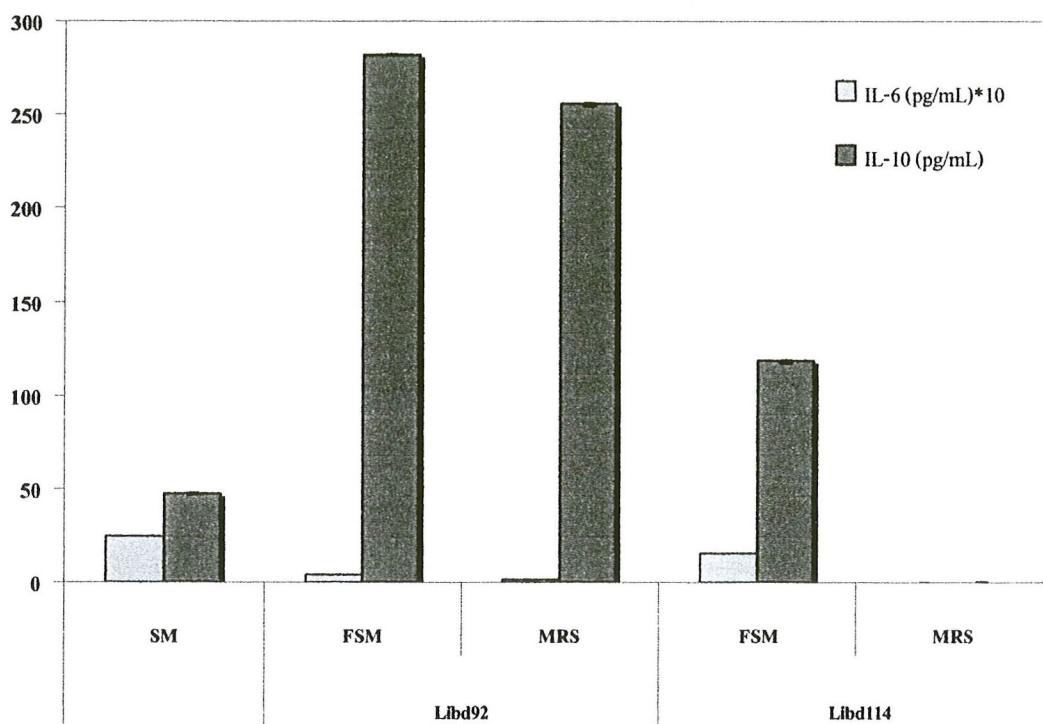
5.4 ทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองต่อการสร้าง cytokines

จากการทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้าง cytokines ชนิด IL-6 และ IL-10 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ Libd33 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-10 ในปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ทดสอบอื่นๆ ซึ่ง IL-10 นี้ เป็น cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบได้ จึงคัดเลือกสายพันธุ์ Libd33 มาเป็นต้นเชื้อผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง ทั้งนี้ยังได้คัดเลือกสายพันธุ์ Libd92 ที่ตรวจไม่พบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง cytokines ทั้งสองชนิด คือ IL-6 และ IL-10 จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์นี้มาเป็นต้นเชื้อผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองด้วยเช่นกัน เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมชนิดลบ แล้วจึงตรวจสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-6 และ IL-10 โดยนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตด้วยแบคทีเรียต้นเชื้อทั้งสองชนิด เปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 17 และภาพที่ 16

ตารางที่ 17 ปริมาณ Cytokines IL-6 และ IL-10 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้างขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์ทดสอบ	ปริมาณ Cytokines	
		IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
	SM	24.26±0.04	47.45±0.08
Libd33	FSM	4.28±0.03	282.13±0.23
	MRS	1.23±0.01	255.46±0.09
Libd92	FSM	15.36±0.12	118.21±0.15
	MRS	ND	ND

หมายเหตุ SM = นมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักโดยต้นเชื้อแบคทีเรีย
 FSM = นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักโดยต้นเชื้อแบคทีเรีย (ประมาณ 10^8 cfu/ml)
 MRS = ต้นเชื้อแบคทีเรีย (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ที่เลี้ยงในอาหาร MRS
 ND = Not detected level
 ค่าที่ได้เกิดจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 16 ปริมาณ Cytokines IL-6 และ IL-10 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 สร้างขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติก ($n = 3$)

จากผลการทดลอง พบว่า นมถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมต้นเชื้อแบคทีเรีย และนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อ Libd33 และ Libd92 มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 ผลิต cytokines IL-6 และ IL-10 ได้ จะเห็นได้ว่า ผลของการเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต cytokine IL-6 และ IL-10 ของแบคทีเรียต้นเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน MRS broth และนมถั่วเหลือง โดยเฉพาะสายพันธุ์ Libd92 ซึ่งเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth นั้น ตรวจไม่พบปริมาณ cytokine ทั้งสองชนิด แต่เมื่อเลี้ยงในนมถั่วเหลือง หรือเป็นต้นเชื้อผลิตนมถั่วเหลืองเปรี้ยวนั้น กลับพบว่า ผลิตทั้ง IL-6 และ IL-10 ได้ทั้งสองชนิด ซึ่งตรวจพบมีปริมาณ IL-10 ที่ต่ำกว่าและปริมาณ IL-6 ที่สูงกว่าสายพันธุ์ Libd33 ทั้งที่เลี้ยงในอาหาร MRS และเป็นต้นเชื้อผลิตนมเปรี้ยว ส่วนสายพันธุ์ Libd33 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS นั้น ตรวจพบปริมาณ IL-6 สูงกว่าในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันนี้เล็กน้อย แต่ตรวจพบปริมาณ IL-10 ในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนในนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียนั้น พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง cytokine ทั้งสองชนิดได้เช่นกัน แต่ตรวจพบปริมาณ IL-10 ต่ำกว่าและ IL-6 สูงกว่าทั้งนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า นอกจากแบคทีเรียต้นเชื้อจะมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้สร้าง cytokine ที่มีผลต่อการยับยั้งการอักเสบได้แล้วนั้น

นมถั่วเหลืองก็มีคุณสมบัติเช่นเดียวกัน แต่ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่าในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งความสามารถของนมถั่วเหลืองในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-6 และ IL-10 ได้นั้นอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่พบในนมถั่วเหลืองสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง cytokine ได้ เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งสารสำคัญในถั่วเหลืองที่อาจมีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น โปรตีนอาหาร (dietary protein) สารไอโซฟลาโวนทั้งที่เป็น glycosides (genistin, daidzin) และ aglycone (genistein, daidzein) โดยเฉพาะสาร aglycone เป็น phytoestrogen ซึ่งคล้ายกับฮอร์โมน estrogen ในมนุษย์ จึงอาจไปเกาะกับ estrogen receptors และเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยการผลิต cytokines ดังกล่าวได้ ทำให้นมถั่วเหลืองและนมเปรี้ยวถั่วเหลืองสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง cytokine ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2006) และ Ryan-Borchers และคณะ (2006) และเมื่อผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลืองโดยต้นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง cytokine ได้ จึงอาจเสริมฤทธิ์กัน ทำให้ตรวจพบปริมาณ IL-10 ในนมถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อสายพันธุ์ Libd33 สูงกว่าเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ดังนั้นจึงเห็นได้ว่านมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd92 ซึ่งเดิมเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ปกติ นั้น ตรวจไม่พบฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเซลล์ให้สร้าง cytokine ทั้งสองชนิด แต่เมื่อเป็นต้นเชื้อผลิตนมเปรี้ยว กลับตรวจพบว่ามีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากการที่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ Libd92 โดยตรงไม่พบความสามารถในการเหนี่ยวนำเซลล์ Caco-2 ให้สร้าง cytokines IL-6 และ IL-10 แต่อาจสามารถเปลี่ยนหรือสร้างสารบางอย่างในนมเปรี้ยวถั่วเหลืองซึ่งมีความสามารถเหนี่ยวนำเซลล์ให้สร้าง IL-6 และ IL-10 ได้ สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2006) และ Ryan-Borchers และคณะ (2006) ที่รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างเอนไซม์ β -glucosidase ที่สามารถไฮโดรไลส์ glycoside ที่พบในนมถั่วเหลือง ให้เป็น aglycone ได้ ซึ่งอาจจะไปจับกับ estrogen receptor ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยการสร้าง cytokine ดังกล่าวได้ จึงทำให้ทั้งนมถั่วเหลือง และนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อที่ตรวจไม่พบว่ามีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้าง IL-6 และ IL-10 ได้ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ จึงทำให้ทราบว่า ในการบริโภคนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อโปรไบโอติกนั้น อาจช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันและผลต่อสุขภาพได้ดีกว่าการบริโภคเพียงตัวเซลล์ของแบคทีเรียนั้นๆได้

6. ทดสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ต่อผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้โปรไบโอติกเป็นต้นเชื้อ ซึ่งทดสอบโดยใช้ Ratio Profile Test (RPT) (ดัดแปลงอ้างอิงจากปราณี, 2547)

- Soybean milk (SM) = ผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก
- Fermented Soybean Milk (FSM) = ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง

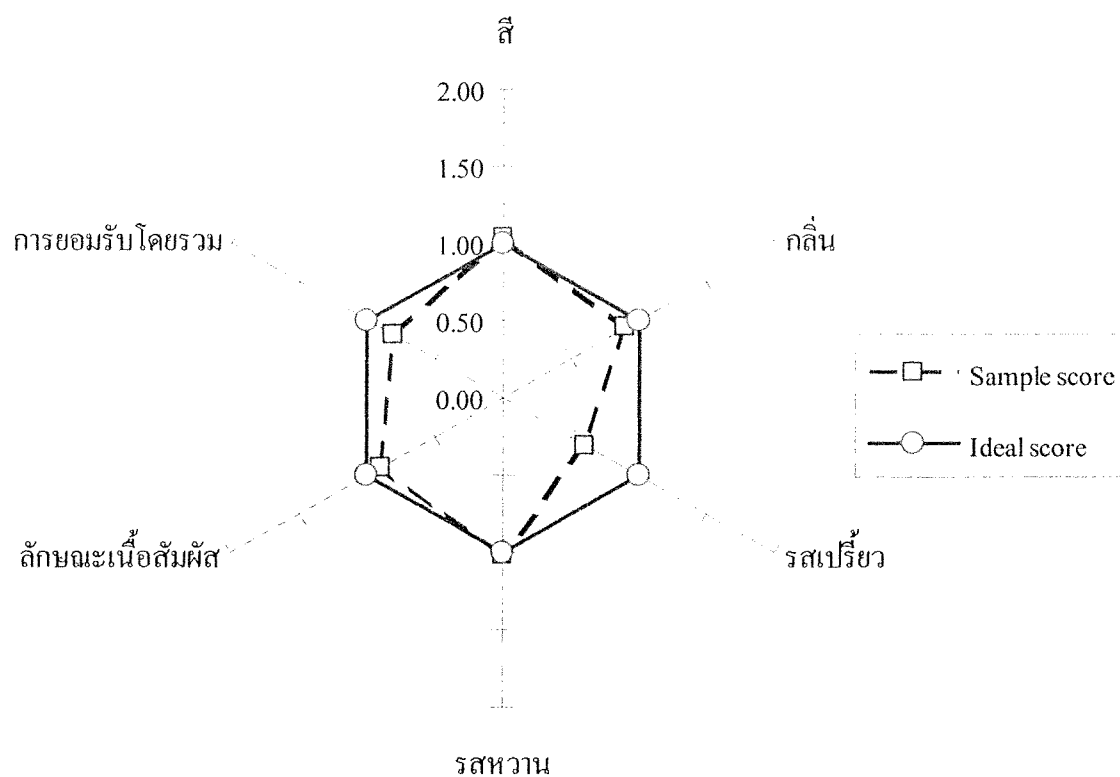
ตารางที่ 18

แสดงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ทำการทดสอบ

ลำดับที่	คุณลักษณะ
1	สี
2	กลิ่น
3	รสเปรี้ยว
4	รสหวาน
5	เนื้อสัมผัส
6	การยอมรับโดยรวม

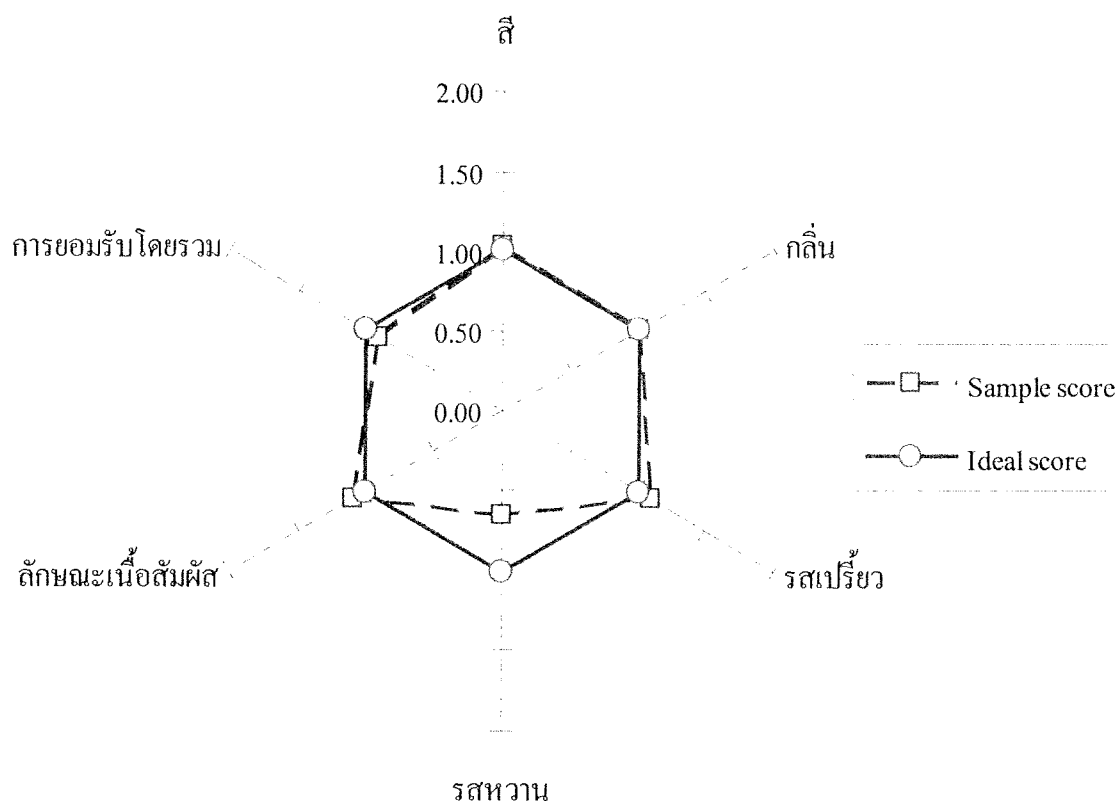
I = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ (ideal score)

S = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เป็นอยู่จริง (sample score)



ภาพที่ 17 แสดง Ratio Profile Test (RPT) ของผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองชุดควบคุม (ไม่เค็มต้นเชื้อ)

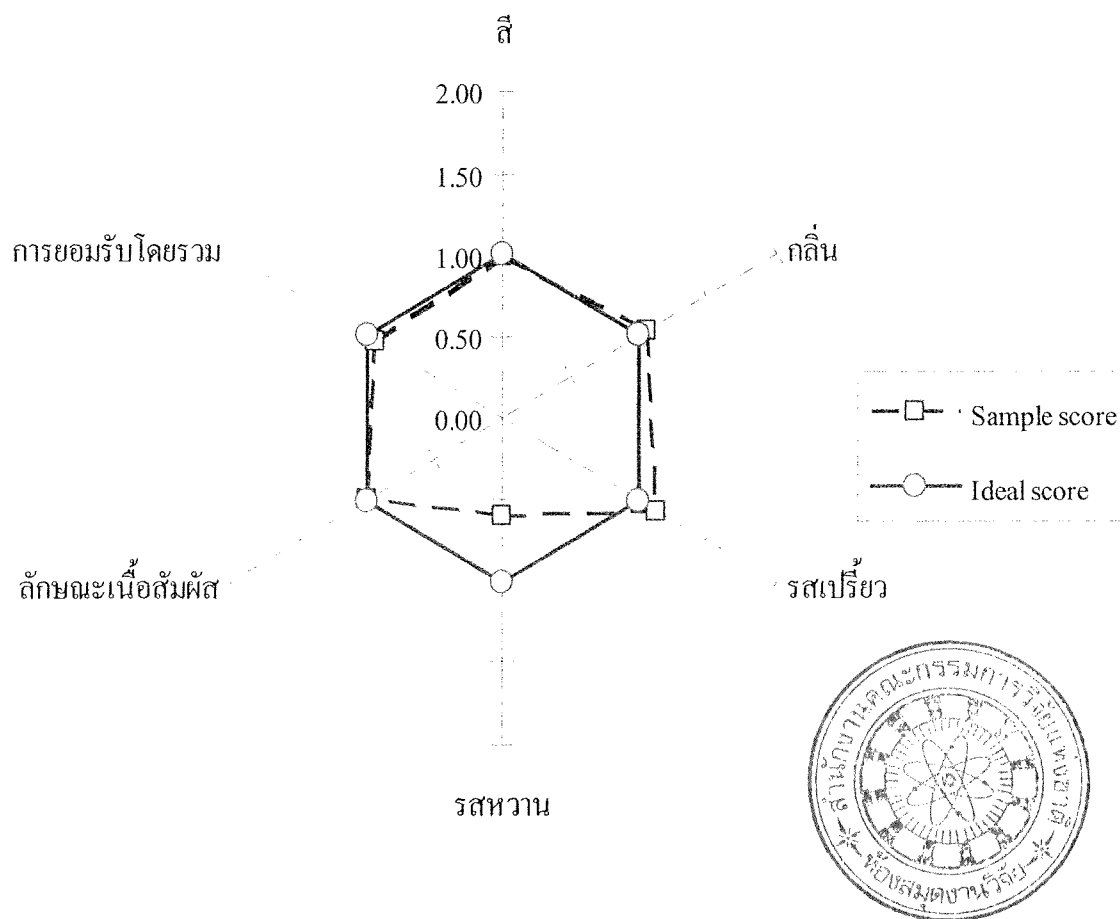
จากผลการทดสอบการยอมรับโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว
ถั่วเหลืองชุดควบคุมโดยใช้วิธี Ratio profile test (RPT) พบว่า คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ประกอบไปด้วย
กลิ่น รสชาติเปรี้ยว รสชาติหวานลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม มีค่า Ideal ratio score (S/I)
เฉลี่ยต่ำกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าคุณลักษณะของนมถั่วเหลืองนี้มีค่าที่ต่ำกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของ
ผู้บริโภคในเชิงของการเป็นผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง ซึ่งคุณลักษณะของนมถั่วเหลืองที่มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า
1 นี้ อาจเนื่องมาจากผู้ทดสอบไม่พึงพอใจในรสชาติและกลิ่นของถั่วเหลืองเป็นสำคัญ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมี
การเพิ่มระดับคุณลักษณะดังกล่าวขึ้นไป ส่วนคุณลักษณะอื่นๆของผลิตภัณฑ์คือ สี มีค่า Ideal ratio score
(S/I) เฉลี่ยต่ำกว่า 1 เพียงเล็กน้อย จึงจำเป็นต้องมีการลดระดับคุณลักษณะดังกล่าวลงมาเพียงเล็กน้อย และ
ผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองนี้จำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนา
ปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป



ภาพที่ 18 แสดง Ratio Profile Test (RPT) ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd33

จากผลการทดสอบการยอมรับโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว
ถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd33 โดยใช้วิธี Ratio profile test (RPT) พบว่า คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์
ประกอบไปด้วย รสชาติหวาน และการยอมรับโดยรวม มีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยต่ำกว่า 1 ซึ่ง

หมายความว่าคุณลักษณะของนมถั่วเหลืองนี้มีค่าที่ต่ำกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของผู้บริโภค เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากระบวนการหมักน้ำตาลโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจึงได้กรด ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว จึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มระดับคุณลักษณะรสชาติหวาน และค่าการยอมรับโดยรวมขึ้นไป ส่วนคุณลักษณะอื่นๆของผลิตภัณฑ์คือ สี กลิ่น รสชาติเปรี้ยว ลักษณะเนื้อสัมผัส มีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยต่ำกว่า 1 เพียงเล็กน้อย จึงจำเป็นต้องมีการลดระดับคุณลักษณะดังกล่าวลงมาเพียงเล็กน้อย และผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองนี้จำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป และผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองนี้จำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป



ภาพที่ 19 แสดง Ratio Profile Test (RPT) ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd92

จากผลการทดสอบการยอมรับโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ Libd92 โดยใช้วิธี Ratio profile test (RPT) พบว่า คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ประกอบไปด้วย รสชาติหวาน และการยอมรับโดยรวม มีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยต่ำกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าคุณลักษณะของนมถั่วเหลืองนี้มีค่าที่ต่ำกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของผู้บริโภค เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากระบวนการหมักน้ำตาลโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจึงได้กรด ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว

จึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มระดับคุณลักษณะรสชาติหวาน และค่าการยอมรับโดยรวมขึ้นไป ส่วนคุณลักษณะอื่นๆของผลิตภัณฑ์คือ สี กลิ่น รสชาติเปรี้ยว ลักษณะเนื้อสัมผัส มีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยต่ำสูงกว่า 1 เพียงเล็กน้อย จึงจำเป็นต้องมีการลดระดับคุณลักษณะดังกล่าวลงมาเพียงเล็กน้อย และผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองนี้จำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป และผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองนี้จำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป

7. ทดสอบคุณสมบัติการคงสภาพ (Stability)

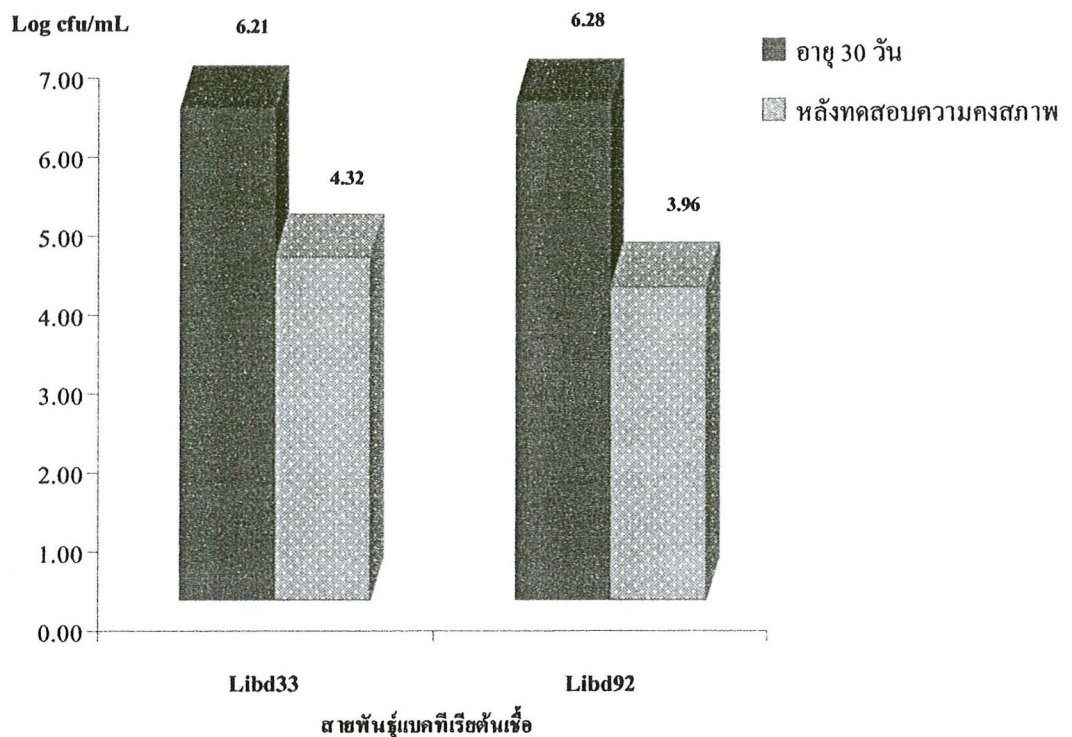
โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบรรจุในภาชนะบรรจุที่มีความเหมาะสมแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องสลับกันจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 วัน ในแต่ละอุณหภูมิ (60 วัน) และนำผลิตภัณฑ์สุดท้ายมาผ่านการทดสอบความคงสภาพมาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

1. การยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Ratio Profile Test (RPT)

จากผลการทดลองทั้งในเรื่องลักษณะ คุณสมบัติ และประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง นำมาทดสอบการคงสภาพและนำมาทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสอีกครั้ง พบว่ามีแนวโน้มคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ประกอบไปด้วย สี กลิ่น รสชาติหวาน รสชาติเปรี้ยว ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม มีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ย ไม่แตกต่างจากค่าของผลิตภัณฑ์ก่อนการทดสอบการคงสภาพของผลิตภัณฑ์

2. คุณสมบัติความอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์

จากการทดสอบการคงสภาพของผลิตภัณฑ์เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Libd33 และ Libd92 มีแนวโน้มปริมาณต้นเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกลดลงเรื่อย ๆ ในระหว่างการทดสอบเนื่องจากข้อจำกัดทางด้านอาหาร และปัจจัยส่งเสริมการเจริญต่าง ๆ เช่น สารอาหารในนมถั่วเหลือง และน้ำตาลที่เป็นส่วนผสมในการผลิตนมถั่วเหลืองถูกแบคทีเรียใช้ไปในการหมักจนหมดแล้ว ดังนั้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จึงไม่มีทั้งอาหารและปัจจัยส่งเสริมการเจริญของต้นเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก จึงทำให้ไม่มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ นอกจากจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวแล้ว ยังมีแนวโน้มการลดลงของแบคทีเรียอีกด้วย ซึ่งมีสาเหตุจากในช่วงการหมักที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตนั้นได้ผลิตสารเมแทบอลิต์ออกมาด้วย ซึ่งเมื่อแบคทีเรียมีการใช้อาหารมากขึ้น และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น สารเมแทบอลิต์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาก็มีปริมาณที่มากเพียงพอที่จะเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียเองด้วย จึงส่งผลให้จำนวนต้นเชื้อแบคทีเรียลดลงเรื่อย ๆ อันเนื่องมาจากปริมาณสารเมแทบอลิต์ที่มากเกินไปนั่นเอง ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของต้นเชื้อแบคทีเรียหลังการทดสอบความคงสภาพ แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ปริมาณต้นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Libd33 และ Libd92 ในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองอายุหมัก 30 วัน และหลังการทดสอบความคงสภาพ

จากผลการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยต้นเชื้อ และ Libd92 ซึ่งแบคทีเรีย Libd92 เป็นแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกเช่นเดียวกับ แบคทีเรียสายพันธุ์ Libd33 แต่ตรวจไม่พบการเหนี่ยวนำเซลล์ Caco-2 ให้สร้าง cytokines IL-6 และ IL-10 เมื่อทดสอบในระดับหลอดทดลอง (In vitro) จึงได้คัดเลือกมาทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Libd33 ดังกล่าว และเมื่อตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆของนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ได้จากการผลิตโดยต้นเชื้อทั้งสอง พบว่า คุณสมบัติของต้นเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเป็นต้นเชื้อแล้วมีประสิทธิภาพส่งเสริมให้ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ได้มีคุณสมบัติการเป็น โปรไบโอติกใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ยกเว้นคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์ Caco-2 ให้สร้าง cytokines IL-6 และ IL-10 ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ Libd33 และ Libd92 เป็นต้นเชื้อแบคทีเรียที่ดีและมีประสิทธิภาพของการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก