บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ผลิตภัณฑ์นมได้รับความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคทุกเพศทุกวัย เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีน วิตามิน แคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ดี ส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรง การบริโภคผลิตภัณฑ์นมจึงมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของคนไทย แม้กระทั่งรัฐบาลเองก็ยังส่งเสริมโครงการนมโรงเรียนในทุกพื้นที่ของประเทศ เพื่อให้เด็กนักเรียนไทยได้ดื่มนมและมีสุขภาพดีกันอย่างทั่วถึง อย่างไรก็ตาม ยังมีผู้บริโภคบางส่วนที่มีอาการผิดปกติหลังจากบริโภคนมโค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการแพ้โปรตีนนม หรือการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยสารอาหารบางชนิดในน้ำนมโคได้ จนทำให้เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องเสีย

นมแพะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภค โดยนมแพะมีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันใกล้เคียงกับนมโค แต่โปรตีนในนมแพะย่อยง่ายกว่า ทำให้เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อน้อยกว่า และเม็ดไขมันในนมแพะก็มีขนาดเล็กกว่าเม็ดไขมันในนมโค จึงย่อยง่ายและร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ดีกว่า นอกจากนี้นมแพะยังมีแคลเซียมและวิตามินดีสูงกว่านมโค ผู้บริโภคบางส่วนที่ให้ความสำคัญกับสุขภาพจึงหันมาให้ความสนใจผลิตภัณฑ์จากนมแพะกันมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นไอศกรีมหรือโยเกิร์ตนมแพะ แต่ในประเทศไทย การบริโภคนมแพะยังไม่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากปริมาณการผลิตนมแพะในประเทศต่ำกว่าปริมาณการผลิตนมโค ทำให้ผลิตภัณฑ์จากนมแพะยังมีราคาค่อนข้างสูง

โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่สามารถผลิตได้จากนมของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น นมโค นมแพะ หรือนมแกะ เหมาะสำหรับผู้ที่มีอาการแพ้น้ำตาลในนม (lactose intolerance) เนื่องจากน้ำตาลในนมจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก (หัวเชื้อ) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลกติก (lactic acid bacteria) หลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ (probiotics) กล่าวคือ ส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วสามารถเจริญเติบโตได้ในลำไส้ใหญ่ ช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย หัวเชื้อหมักโยเกิร์ตที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบันส่วนใหญ่แยกได้จากนมโค อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาจุลินทรีย์กรดแลกติกในนมแพะไม่มากนัก

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากนมแพะ คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติกส์ และมีความเป็นไปได้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดแยกได้ในการเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต และผลิตโยเกิร์ตนมแพะที่มีเอกลักษณ์ โดยมุ่งหวังให้เป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภค เพื่อส่งเสริมสุขภาพร่างกายให้สมบูรณ์แข็งแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้บริโภคที่เป็นเด็กเล็ก ผู้สูงวัย และผู้ป่วยที่เป็นโรคในระบบทางเดินอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์

1. แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากนมแพะ และศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อที่แยกได้

2. คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นโพรไบโอติกส์และการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้

3. ศึกษาการผลิตโยเกิร์ตนมแพะจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลสำเร็จที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้ คือ ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่มีประสิทธิภาพ ทั้งในแง่ของการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค และในแง่ของการเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต และได้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมแพะ ที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตในผู้บริโภควัยเด็ก ช่วยให้ผู้สูงวัยและผู้ป่วยมีสุขภาพร่างกายแข็งแรง

งานวิจัยนี้ยังจะศึกษาการผลิตโยเกิร์ตนมแพะในลักษณะ small scale โดยใช้เครื่องมือขนาดเล็กและวัสดุอุปกรณ์ที่หาได้ง่าย ผลการวิจัยนี้จึงอาจสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมแพะรสชาติต่างๆ ที่มีความหลากหลายมากขึ้น เพื่อเป็นต้นแบบในการผลิตโยเกิร์ตนมแพะให้กับกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะนม ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตและช่วยเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร หรือเป็นแนวทางให้กับผู้ที่รักสุขภาพ ในการผลิตโยเกิร์ตนมแพะไว้รับประทานเองในครัวเรือน

นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้ยังส่งเสริมความร่วมมือด้านการวิจัยแบบบูรณาการ ระหว่างคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และยังเป็นการพัฒนาทักษะในการทำงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นเยาว์ โดยมีกลุ่มเป้าหมายเป็นนักศึกษาระดับปริญญาตรีและปริญญาโทในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

บทตรวจสอบเอกสาร

2.1 นมวัวและนมแพะ

นมแพะมีคุณค่าทางโภชนาการเช่นเดียวกับนมวัว ความแตกต่างของนมแพะและนมวัว เช่น โปรตีนในนมแพะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าในนมวัว นมแพะจึงมีคุณสมบัติในการย่อยง่ายกว่านมวัว เพราะโปรตีนที่อยู่ในนมแพะที่เรียกว่า เคซีน ซึ่งพบในนมวัวเช่นกัน แต่เคซีนของนมแพะมีเอกลักษณ์ไม่ซ้ำกับรูปแบบของนมวัวและนมคน โดยโปรตีนเคซีนในนมแพะมีองค์ประกอบหลัก คือ เบต้าเคซีน สูงถึงร้อยละ 70.2 ซึ่งเป็นปริมาณใกล้เคียงกับนมคน ส่วนองค์ประกอบรองคือ แอลฟ่าเคซีน มีอยู่ร้อยละ 29.85 และโปรตีนแอลฟ่าเอสวันเคซีน (Alpha S1 Casein) จะมีปริมาณน้อยกว่าในนมวัว ส่งผลให้มีการย่อยในกระเพาะอาหารจะเกิดเป็นก้อนที่นิ่มกว่าของนมวัว ส่งผลให้นมแพะย่อยง่ายและเร็วกว่า ในนมแพะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 4.29 ไขมันร้อยละ 4.78 เมื่อเทียบกับนมวัวแล้วจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่า

ในนมแพะมีแลคโตส (น้ำตาลในนม) น้อยกว่านมวัว จึงอาจเป็นทางเลือกสำหรับเด็กที่แพ้แลคโตส หากเด็กแพ้นมวัวอาจเลือกให้เด็กดื่มนมแพะแทน ยิ่งไปกว่านั้นโปรตีนในนมแพะยังพบแอลฟ่าเอสวันเคซีนน้อยกว่าในนมวัวอีกด้วย นอกจากนี้นมแพะยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ซึ่งร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ จึงต้องได้รับจากอาหารรวมทั้งวิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินเอ และวิตามินเอที่พบในนมแพะพร้อมถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมากกว่าที่พบในนมวัว นมแพะยังอุดมด้วยวิตามินบี 2 มากกว่านมวัว ซึ่งจะช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้นกันและกระตุ้นภูมิต้านทานโรค

ไขมันในนมแพะ

ไขมันในนมส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของหยดไขมัน (fat droplet) ไขมันในนมแพะมีเม็ดไขมัน (fat globules) ขนาดเล็ก มีกรดไขมันสายสั้นและสายกลางในปริมาณที่มากกว่าในนมวัว (ตารางที่ 3) โดยในนมแพะพบกรดไขมันสายสั้นและสายกลางประมาณ 35% ส่วนในนมวัวนั้นพบประมาณ 17% เป็นผลทำให้ไขมันที่ได้จากนมแพะมีความสามารถในการถูกย่อยได้ง่ายกว่าไขมันในนมวัว ทำให้ใช้เวลาในการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายเพียง 20 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับนมวัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยระยะพักฟื้นและผู้ที่มีปัญหาในการย่อยไขมัน (มานิตย์ วาสุเทพย์รังสรรค์, 2548) นมแพะมีกรดไขมันคาโพรอิก (caproic), คาพริลิค (caprylic) และคาพริก (capric) ประมาณ 15% แต่พบในนมวัว 5% กรดไขมัน 3 ตัวนี้มีประโยชน์ในทางการแพทย์โดยใช้ในการรักษาโรคดูดซึมอาหารผิดปกติ (malabsorption syndrome) โรคการทำงานผิดปกติของลำไส้ (intestinal disorders) โรคพังผืดที่ปอด (cystic fibrosis) และโรคนิ่วในถุงน้ำดี (Gallstone) เนื่องจากสามารถทำให้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารช่วยลดยับยั้งและสลายการสะสมคอเลสเตอรอล

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของนมจากสัตว์ชนิดต่าง ๆ (โดยเฉลี่ย)

สัตว์ชนิดต่างๆ	**องค์ประกอบเคมีของนม**				
	น้ำ (%)	**ไขมัน (%)**	**โปรตีน (%)**	**แลคโตส (%)**	**เถ้า (%)**
มนุษย์	87.60	1.20	3.80	7.0	0.21
วัว	87.29	3.66	3.42	4.92	0.71
แพะ	87.37	3.00	4.00	4.84	0.79
แมว	83.65	4.50	7.00	4.85	0.60
กระบือ	82.44	7.40	4.74	4.64	0.78
สุนัข	74.55	10.20	3.15	11.30	0.80
แกะ	80.60	8.28	5.44	4.78	0.90

ที่มา: จิตธนา แจ่มเมฆ, 2549

ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่จำเป็นในนม 100 กรัม

ชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็น	**ชนิดของนม**		
	แพะ	**วัว**	**มนุษย์**
Phenylalanine	0.155	0.159	0.046
Tyrosine	0.179	0.159	0.053
Methionine	0.08	0.083	0.021
Cysteine	0.046	0.03	0.019
Lysine	0.29	0.261	0.068
Arginine	0.119	0.119	0.043
Isolysine	0.207	0.199	0.05
Valine	0.24	0.22	0.063
Threonine	0.163	0.149	0.046
Tryptophan	0.044	0.046	0.017
Histidine	0.089	0.089	0.023

ที่มา: Posati et al., (1976)

แร่ธาตุและวิตามินในนมแพะ

วิตามินและแร่ธาตุในอาหารมีประโยชน์ในการควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายให้เป็นปกติ นมแพะมีวิตามินและแร่ธาตุในปริมาณที่สูงกว่าในนมวัว (ตารางที่ 4) วิตามินหลักที่พบในนมแพะ ได้แก่ วิตามินบีรวม ซึ่งสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง วิตามินเคสังเคราะห์ได้จากกระเพาะและลำไส้ วิตามินเอ, วิตามินดี, วิตามินซีได้มาจากอาหารที่รับประทานเข้าไป นอกจากนี้ยังพบว่านมแพะมีวิตามินเอมากกว่านมวัว นมแพะจะเปลี่ยนคาโรทีนทั้งหมดให้อยู่ในรูปของวิตามินเอ จึงทำให้นมแพะมีสีจะค่อนข้างขาวกว่านมวัว (อุไรพร จิตแจ้ง, 2547)

ตารางที่ 3 กรดไขมันในนม 100 กรัม

ชนิดของกรดไขมัน	**ชนิดของนม**		
	แพะ (กรัม)	**วัว (กรัม)**	**มนุษย์ (กรัม)**
Butyric	0.13	0.11	-
Caproic	0.09	0.06	-
Caprylic	0.10	0.04	-
Capric	0.26	0.08	0.06
Lauric	0.12	0.09	0.26
Myristic	0.32	0.34	0.32
Palmitic	0.91	0.88	0.92
Oleic	0.98	0.84	1.48
Linoleic	0.11	0.08	0.37
Linolenic	0.04	0.05	0.05

ที่มา: Posati et al., (1976)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของนมแพะ นมวัว และนมมนุษย์ จากการวิเคราะห์ในประเทศสหรัฐอเมริกา (ปริมาณน้ำนม 100 กรัม)

สารอาหาร	ชนิดของนม		
	นมแพะ	นมวัว	นมมนุษย์
น้ำ (กรัม)	87	88	87.5
แป้ง (กรัม)	4.15	4.66	6.89
ไขมัน (กรัม)	4.14	3.34	4.38
คอเลสเตอรอล (มก.)	11	14	14
โปรตีน (กรัม)	3.56	3.29	1.03
น้ำตาลแลคโตส (มก.)	4.45	4.66	6.89
แร่ธาตุ			
แคลเซียม	134	119	32
ฟอสฟอรัส	111	93	14
เหล็ก	0.05	0.05	0.05
แมกนีเซียม	14	13	3
โปแตสเซียม	204	152	51
วิตามิน			
วิตามินเอ (ยูนิต)	185	126	241
วิตามินบี6 (มก.)	0.046	0.042	0.011
วิตามินบี12 (มคก.)	0.065	0.357	0.045
วิตามินซี (มก.)	01.29	0.9	5

ที่มา: Ensminger et al., (1995)

<u>แหล่งผลิตน้ำนมแพะ</u>

ในการวิจัยครั้งนี้ ใช้ตัวอย่างน้ำนมแพะจากกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะนม ในหมู่บ้านชาวไทยมุสลิม ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี เป็นน้ำนมจากแพะสายพันธุ์ซาเนน (Saanen) ที่มีต้นกำเนิดมาจากแถบ Saanental ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เป็นหนึ่งในสายพันธุ์แพะนมให้ที่ปริมาณน้ำนมมากที่สุดในโลก โดยมีอัตราการให้นมเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม/ตัว/วัน ในระยะให้นม (lactation) โดยปกติเกษตรจะขายนมแพะที่รีดได้ในรูปน้ำนมดิบ ราคาขายปลีกกิโลกรัมละ 50 บาท แต่สำหรับลูกค้าประจำจะได้ราคาขายส่งจะอยู่ที่กิโลกรัมละ 35-40 บาท เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะนมได้รับการอบรมจากเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ทั้งในเรื่องการเลี้ยงและดูแลแพะ ให้ปลอดจากโรคแท้งติดต่อ (brucellosis) โรคปากเท้าเปื่อย และโรคสมองอักเสบ น้ำนมแพะที่ได้จึงสะอาด ปลอดภัย และเกษตรกรยังใส่ใจในกระบวนการรีดนมแพะ เพื่อให้นมแพะสัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด ช่วยป้องกันการเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์จากการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันในนมแพะได้เป็นอย่างดี (ข้อมูลจากการสัมภาษณ์ ผู้ใหญ่อุดร หมันมณี ผู้นำหมู่บ้าน, มกราคม 2560)

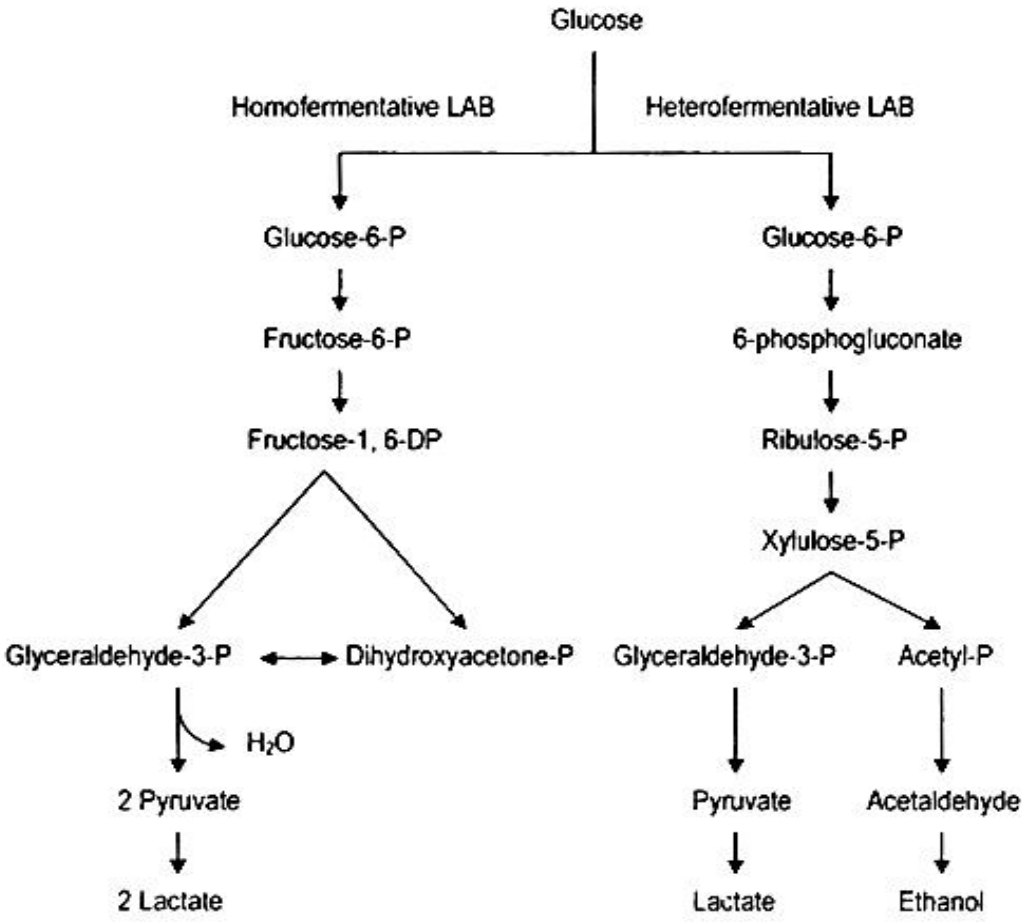
2.2 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase negative) ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) โดยไม่ใช้ออกซิเจนแต่บางชนิดอาจมีเอนไซม์แคตาเลสเทียม (pseudo catalase) สามารถทนต่ออากาศได้ ทนต่อความเป็นกรด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม

แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดแลกติกจากปฏิกิริยา 2 ทาง คือ วิถีทางที่ได้แลตเตทเพียงอย่างเดียวเรียกว่า โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และวิถีทางที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกันเรียกว่า เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) (สมใจ ศิริโภค, 2537)

1) Homofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 85-95% จากการหมักคาร์โบไฮเดรต มีการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลแลคโตสแล้วซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาซึม (Caplice and Fitzgerald, 1999) เชื้อที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *Enterococcus faecalis, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantarum* และ*Lactococcuslactis* subsp. *lactis* (Holzapfel and Wood, 1995) ซึ่งกระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1A

2) Heterofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลกติกประมาณ 50% ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะซิติก (acetic acid) แอลกอฮอล์ (alcohol) และคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide: CO2) จากการหมักคาร์โบไฮเดรต (Caplice and Fitzgerald, 1999) เชื้อที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus brevis, L. bifermentans, L. fermentum, Leuconostoc lactis* และ *L. mesenteroides* (Holzapfel and Wood, 1995) ซึ่งกระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1B



(A) (B)

รูปที่ 1 กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคลของแบคทีเรียกรดแลกติก
(A) Homofermentative (B) Heterofermentative

ที่มา : Caplice and Fitzgerald (1999)

2.3 โพรไบโอติกส์

2.3.1 นิยามของโพรไบโอติกส์

รากศัพท์ของคำว่า “โพรไบโอติกส์” (probiotics = pro+biotos) มาจากภาษากรีกของคำว่า “โพร” (pro) และ “ไบโอทอส” (biotos) ซึ่งหมายถึง “สำหรับชีวิต” (for life) หรือ “ส่งเสริมชีวิต” ตรงข้ามกับคำว่า “แอนติไบโอติก” (antibiotics) ซึ่งหมายถึง “ต่อต้านชีวิต” หรือ “ปฏิชีวนะ” โดยยับยั้งหรือต่อต้านสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งซึ่งอาจหมายถึงจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค ส่วนโพรไบโอติกส์นั้นใช้เพื่อส่งเสริมสิ่งมีชีวิต ดังนั้นโพรไบโอติกส์ก็คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งอาจเป็นชนิดเดี่ยวหรือชนิดผสมและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ

2.3.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์

โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่จะนำมาใช้กับคนและสัตว์นั้นมีแนวทางหลัก ๆ คือ

- สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้

- ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค

- สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้

- มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7 - 10^9 cfu/ml ของผลิตภัณฑ์) (Dunne et al., 2001; Vasiljevic and Shah, 2008) แต่เมื่อจะใช้โพรไบโอติกส์นั้น สำหรับมนุษย์สิ่งที่ต้องมุ่งเน้นก็คือ เรื่องความปลอดภัย หลักเกณฑ์ของการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ตามหลักทฤษฎีเบื้องต้นจะครอบคลุมถึงเรื่องความปลอดภัย ประโยชน์ และลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำโพรไบโอติกส์ไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์

2.3.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติกส์

- มีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่ ไม่มีการกลายพันธุ์

- สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร

- ความสามารถในการยึดเกาะพื้นผิวของผนังลำไส้

- การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์หลายชนิดสามารถผลิตสารเมตาบอไลท์บางชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งสารที่ผลิตขึ้นบางครั้งก็มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไดอะเซทิลและริวทีริน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั่วไปได้แบบไม่เจาะจง และบางครั้งก็ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นและมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่จำเพาะมากขึ้นได้แก่ แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

2.3.4 กลไกการทำงานของโพรไบโอติกส์

จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จะมีกลไกการทำงานในการต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคดังนี้ แย่งที่ยึดเกาะกับจุลินทรีย์ใหม่บนผนังลำไส้เล็ก โดยปกติแล้วโพรไบโอติกส์จะเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารโดยธรรมชาติอยู่แล้ว ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีความสามารถในการต่อต้านการเกาะของจุลินทรีย์ใหม่บนผนังลำไส้โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โดยกระบวนการที่เรียกว่า Competitive Exclusion หรือ Colonization Resistance นอกจากนั้นยังมีการผลิตสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่เข้าไปใหม่ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แย่งอาหารกับจุลินทรีย์ชนิดใหม่โดยจุลินทรีย์ โดยโพรไบโอติกส์จะแย่งอาหารในบริเวณที่เกาะตั้งถิ่นฐานไม่ให้เหลือพอสำหรับจุลินทรีย์ชนิดใหม่ผลิตสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยโพรไบโอติกส์จะผลิตสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารบูดเสีย เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแบคเทอริโอซินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น ไนซินที่สร้างจาก *Lactococcus lactis*

2.3.5 โพรไบโอติกส์กับการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้

จากข้อมูลของมะเร็งวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ในปี 2557 พบว่าโรคมะเร็งลำไส้ เป็นโรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตายลำดับที่ 3 ในประเทศไทย โดยการรับประทานนมหมักและโยเกิร์ตที่มีโพรไบโอติกส์เป็นองค์ประกอบ พบว่าสามารถส่งเสริมสุขอนามัยของระบบการย่อยอาหารของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยศึกษาถึงผลกระทบของโพรไบโอติกส์ต่อการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยผลจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีต่างๆ

แบคทีเรียกรดแลกติก เป็นกลุ่มโพรไบโอติกส์หลักที่พบในน้ำนม โดยพบว่าสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* 606 และ *Lactobacillus casei* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีและมีความเป็นพิษที่ต่ำเมื่อทดสอบกับเซลล์ไฟโบบลาสต์จากตัวอ่อนมนุษย์ โดยโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำจาก *L. acidophilus* 606 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด โดยทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 จากการแตกหักของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ [16] จากการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของโพรไบโอติกส์ พบว่าการผลิตสารในกลุ่มไอโซเมอร์ของกรดไขมันลีโนเลอิก ที่เรียกว่า conjugated linoleic acid (CLA) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HT-29 และ Caco-2 โดยมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน PPAR-gamma ในปี 2016 Dubey และคณะ ได้รายงานว่าเชื้อโพรไบโอติกส์จากอาหารหมักของอินเดีย ชื่อว่า *Pediococcus pentosaceus* ผลิต CLA ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HCT-116 โดยทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ และผลการศึกษาในหนูทดลองให้ผลในทิศทางเดียวกันโดยสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านกลไกการลดภาวะเครียดออกซิเดชั่น

กลไกหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเซลล์มะเร็งของโพรไบโอติกส์พบว่าเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งของเชื้อและความสามารถในการผลิตกรดไขมันสายสั้น จากงานวิจัยของ Kahouli และคณะในปี 2015 ค้นพบว่า *L. reuteri* แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันสายสั้นที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. pentosus* B281 และ *L. plantarum* B282 พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับเซลล์มะเร็ง Caco-2 ได้ดี โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งโดยยับยั้ง ที่ G1-phase และทำให้ลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ นอกจากนี้พบสารที่ออกฤทธิ์กลุ่มนี้สามารถทนความร้อนได้ โดยคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- แบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากนมแพะ

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- De Man, Rogosa & Sharpe Medium (MRS agar และ broth)

3.1.3 สารเคมี

- Absolute ethanol
- Bile salt
- Ultrapure water
- Bromocresol purple
- 70 % ethanol
- 95 % ethanol
- Phosphate buffer saline

3.1.4 เครื่องมือ

-เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW)
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW)
- เครื่องปั่นแยก (Centrifuge: Hettich)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope: Nikon, E200)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter: Metrohm, 713)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer: Vision Scientific, KMC-1300V)
- ตู้อบแห้ง (Hot air oven: Memmert)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave: Hirayama, Japan)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: Fisher Scientific, ISOTEMP 228)
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Freezer: SANYO)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator: SANYO, MIR-253)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow: LABOGENE, Scanlaf Mars)
- ตู้เย็น (Refrigerator)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากน้ำนมแพะ

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากหมู่บ้านชาวไทยมุสลิม ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี หลังจากนั้นนำมาทำ serial dilution โดยปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเจือจางของเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^{-1} จากนั้นนำสารละลายมาทำการ spread บนอาหาร MRS agar ที่เติม Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโนลีเดี่ยวที่แยกได้ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลืองมา streak บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนกว่าจะได้เชื้อที่บริสุทธิ์และเก็บรักษาเชื้อใน 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร MRS agar มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการตรวจสอบการติดสีแกรม (Gram staining) รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการเกลี่ยสารแขวนลอยแบคทีเรียลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดปล่อยให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 3-5 ครั้ง หยด Crystal violet จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที ต่อมาล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา แล้วย้อมต่อด้วย Gram iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย 95% (v/v) Ethanol แล้วย้อมต่อด้วย Safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา นำสไลด์ไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

3.2.3 การทดสอบ Catalase

หยดสารละลาย H_2O_2เข้มข้น 3% ลงบนสไลด์ 1 หยด เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากขั้นตอนการแยกเชื้อด้วยลูป (loop) มาเล็กน้อยทำการ smear เชื้อลงบนสไลด์ที่มี H_2O_2 การอ่านผลการทดลอง ถ้าเกิดฟองอากาศให้ผลบวก (positive) เกิดคะตาเลส ถ้าไม่เกิดฟองอากาศให้ผลเป็นลบ (negative) ไม่เกิดคะตาเลส

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility)

ทำได้โดยใช้ needle เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ แล้วแทง (stab) ลงในอาหาร Motility teat agar โดยแทงลงไปตรง ๆ บ่มหลอดเพราะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมงแบคทีเรียเคลื่อนที่ได้จะสังเกตเห็นการเจริญรอบ ๆ รอยแทง (stab) จางกว่าพวกที่เคลื่อนที่ไม่ได้และมีการกระจายตัวของเชื้อทั่วหลอดให้บันทึก motility + แต่มีการเจริญเฉพาะบริเวณรอยแทง (stab) ให้บันทึก motility -

3.2.5 การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์

3.2.5.1 การทดสอบการทนกรดและเกลือน้ำดี

เตรียม inoculum ของเชื้อโดยนำเอาเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ต่อมาทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งโดยนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วน supernate ออก แล้ว resuspend เชื้อด้วย PBS (pH 2.5) นำมาปรับให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $10^8 - 10^9$ CFU/ml โดยการเทียบกับ 0.5 McFarland จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บผลโดยวิธีการ spread plate ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บนอาหาร MRS agar สำหรับการทดสอบการทนเกลือน้ำดีทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบทนกรด แต่ใช้ PBS ที่มี 0.3% bile salt เก็บผลโดยวิธีการ spread plate ที่เวลา 0, 3 ,6 และ 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/ml) และรายงานอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\log \text{CFU N1}}{\log \text{CFU N0}} \times 100$$

โดย N_0 = จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น

N_1 = จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงสุดท้าย

3.2.5.2 การทดสอบความปลอดภัย

ทดสอบ Haemolytic activity โดย streak เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบในข้อ 5.1 ลงบนอาหาร blood agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (haemolysis) บนอาหาร blood agar ที่แตกต่างกันดังนี้ (Fadda et al., 2017)

- alpha-haemolysis มีการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar เพียงบางส่วน เห็นเป็นสีเขียวรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

- beta-haemolysis มีการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar อย่างสมบูรณ์ เห็นเป็นวงใส ๆ รอบโคโลนีของเชื้อ ให้บันทึกผลเป็นบวก (positive)

- gamma-haemolysis ไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar

3.2.5.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion

- นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนสารละลายใสไว้ใช้ (Ohmomo *et al*., 1998)

- นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 073 , *Bacllus subtilis* TISTR 001, *Salmonells Typhinurium* TISTR 2519, *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 มาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml โดยการเทียบกับ 0.5 McFarland

- ใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ป้ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้ว swab บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Nutrient agar หลังจากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วดูดส่วนสารละลายใสที่ได้จากข้อ 5.3.1 หยดลงในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) (Bao et al., 2010) รายงานผลขนาดของ clear zone (มิลลิเมตร) โดยคำนวณจาก

Clear zone (มิลลิเมตร) = เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก – เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน

3.2.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกกรดแลกติกที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตขึ้น เรียกส่วนนี้ว่า fermentate นำ fermentate ที่ได้มาต้มและกรองเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วจึงทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) จากนั้นนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อทำเป็น condition media นำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ T-25 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ 5% CO_2 Incubator เปลี่ยนอาหารทุก 3-4 วัน

จากนั้นวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง โดยนำเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเซลล์เริ่มต้นหลุมละ 120,000 เซลล์ บ่มเลี้ยงในตู้ 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 2 วัน ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ที่ความเข้มข้น 5% 10% และ20% โดยปรับ pH 7-7.5 และ fermentative supernatant ของโพรไบโอติกส์ YC-X16 และ GM 11 ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% ใน DMEM ทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบ MTT นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.2.7 การศึกษาการผลิตโยเกิร์ตนมแพะจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการหมักโยเกิร์ตนมแพะ โดยศึกษาอุณหภูมิในการหมักและระยะเวลาที่ใช้หมักเพื่อให้เกิดเคิร์ด ลักษณะของเคิร์ดที่ได้ ค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณกรด พร้อมทั้งประเมินอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมแพะที่ได้โดยการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar และวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

บทที่ 4

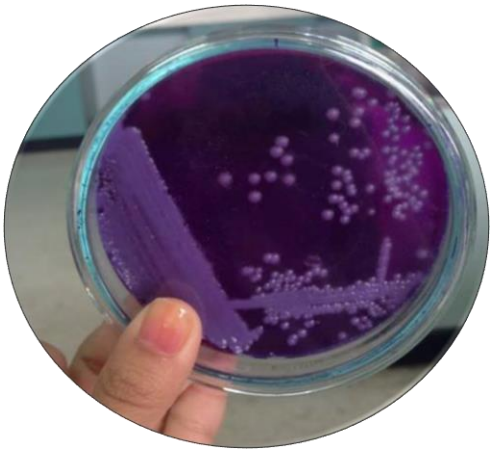
ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากน้ำนมแพะ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างน้ำนมแพะที่ได้จากแม่แพะทั้งหมด 13 ตัวอย่าง จากหมู่บ้านชาวไทยมุสลิม ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี เป็นน้ำนมจากแพะสายพันธุ์ซาเนน (Saanen) ดังตารางที่ 5 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ (รูปที่ 2) พบว่าแยกเชื้อได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท โดยแยกได้จากน้ำนมแพะ GM1 3 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM3 ได้ 1 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM4 ได้ 2 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM5 ได้ 2 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM6 ได้ 2 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM7 ได้ 3 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM8 ได้ 3 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM9 ได้ 2 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM10 ได้ 1 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM11 ได้ 4 ไอโซเลท, น้ำนมแพะ GM12 ได้ 1 ไอโซเลท และน้ำนมแพะ GM13 ได้ 2 ไอโซเลท ซึ่งมีลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่แตกต่างกันดังตารางที่ 6 ส่วนน้ำนมแพะ GM2 ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 5 ข้อมูลของตัวอย่างน้ำนมแพะที่นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
1	แม่น้อย (GM1)	13 มิถุนายน 2560
2	แม่พริ้ง (GM2)	13 มิถุนายน 2560
3	หนูนา (GM3)	25 กรกฎาคม 2560
4	ดาวเรือง (GM4)	25 กรกฎาคม 2560
5	เดือน (GM5)	25 กรกฎาคม 2560
6	กะทิ (GM6)	25 กรกฎาคม 2560
7	มะลิ (GM7)	25 กรกฎาคม 2560
8	ขาว (GM8)	17 กันยายน 2560
9	แป้ง (GM9)	17 กันยายน 2560
10	แดง (GM10)	17 กันยายน 2560
11	แตม (GM11)	17 กันยายน 2560
12	ใหญ่ (GM12)	17 กันยายน 2560
13	เล็ก (GM13)	17 กันยายน 2560



รูปที่ 2 ลักษณะอาหารแข็ง MRS ที่มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์

รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์

ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS

ชื่อแม่แพะ	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
แม่น้อย (GM1)	3	GM11	สีขาวขุ่น กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM12	สีขาวครีม กลม ขนาดเล็ก ผิวมันวาว ขอบเรียบ
		GM13	สีขาวครีม กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
หนูนา (GM3)	1	GM31	สีขาวขุ่น กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
ดาวเรือง (GM4)	2	GM41	สีขาวขุ่น กลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ
		GM42	สีขาวขุ่นกลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
เดือน (GM5)	2	GM51	สีขาวขุ่น กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM52	สีขาวครีม กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
กะทิ (GM6)	2	GM61	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่ นูน
		GM62	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก นูน
มะลิ (GM7)	3	GM71	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่
		GM72	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM73	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
ขาว (GM8)	3	GM81	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM82	สีขาวขุ่น กลม ขอบไม่แน่นอนและใส ขนาดใหญ่
		GM83	สีขาวขุ่น กลม ขอบไม่แน่นอนและใส ขนาดใหญ่
แป้ง (GM9)	2	GM91	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM92	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
แดง (GM10)	1	GM101	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
แตม (GM11)	4	GM111	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM112	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่
		GM113	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก
		GM114	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก
ใหญ่ (GM12)	1	GM121	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่
เล็ก (GM13)	2	GM131	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่
		GM132	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่

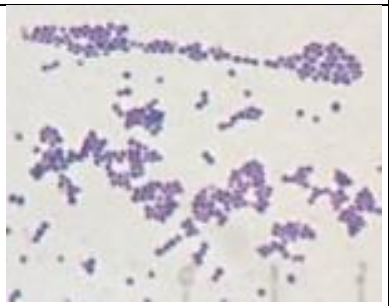
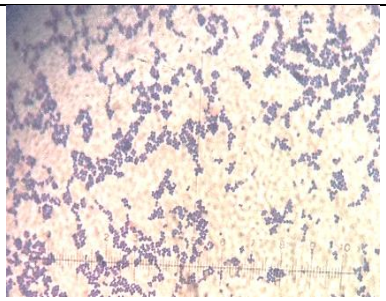
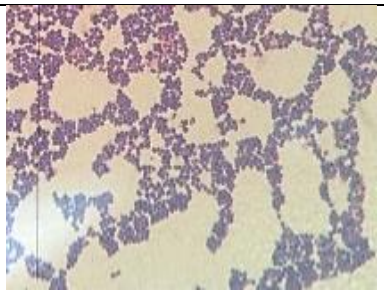
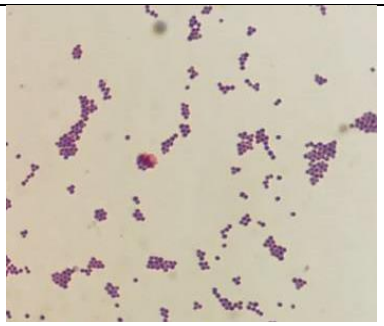
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X พบว่าทั้ง 26 ไอโซเลท ติดสี Crystal violet ซึ่งเป็นแกรมบวก (Gram positive) แต่มีรูปร่างของเซลล์แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 7 และตารางที่ 8

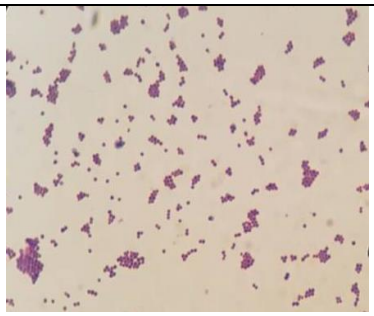
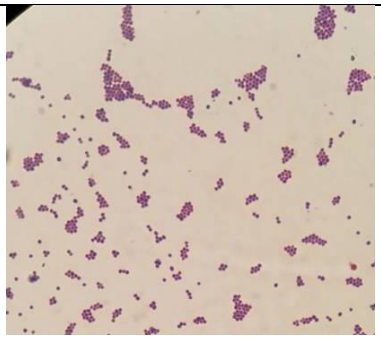
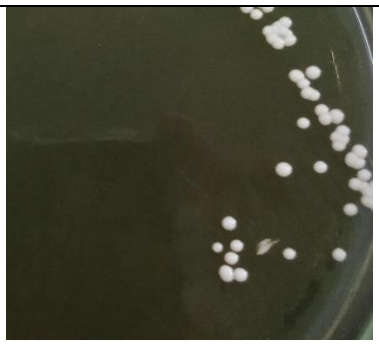
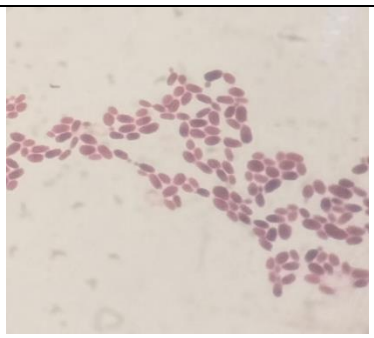
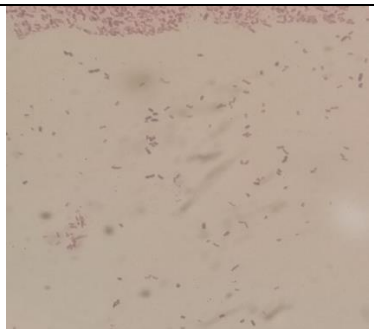
ตารางที่ 7 ผลการศึกษาการย้อมแกรม รูปร่างลักษณะของเซลล์ และการจัดเรียงตัว

ชื่อแม่แพะ	ไอโซเลท	การย้อมแกรม	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ขนาด (µM)
แม่น้อย (GM1)	GM11	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM12	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM13	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
หนูนา (GM3)	GM31	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
ดาวเรือง (GM4)	GM41	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM42	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
เดือน (GM5)	GM51	Positive	ท่อนสั้น	2.0-3.0 x 2.0-4.0
	GM52	Positive	ท่อน ต่อเป็นสายโซ่	1.0-2.0 x 2.0-3.0
กะทิ (GM6)	GM61	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM62	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
มะลิ (GM7)	GM71	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM72	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM73	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
ขาว (GM8)	GM81	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM82	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM83	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
แป้ง (GM9)	GM91	Positive	ท่อนสั้น	1.0 x 2.0
	GM92	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
แดง (GM10)	GM101	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
แตม (GM11)	GM111	Positive	ท่อน ต่อเป็นสายโซ่	0.5 X 1.0
	GM112	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM113	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
	GM114	Positive	ท่อนสั้น	1.0 x 1.5
ใหญ่ (GM12)	GM121	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0
เล็ก (GM13)	GM131	Positive	ท่อนสั้น	1.0 x 2.0
	GM132	Positive	กลม เกาะเป็นกลุ่ม	1.0 x 1.0

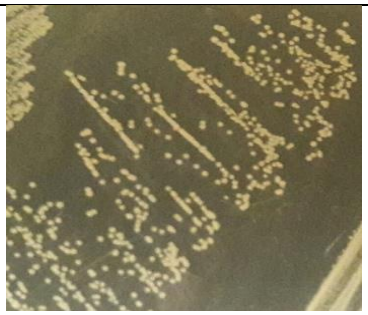
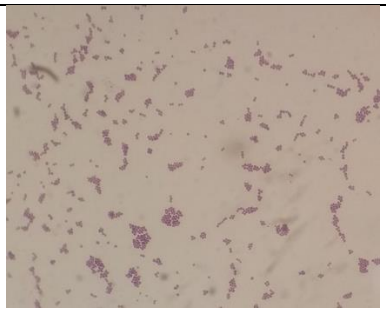
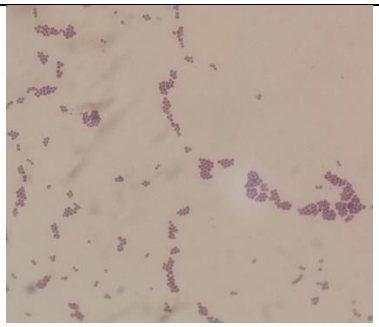
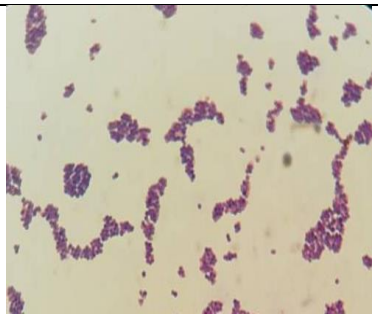
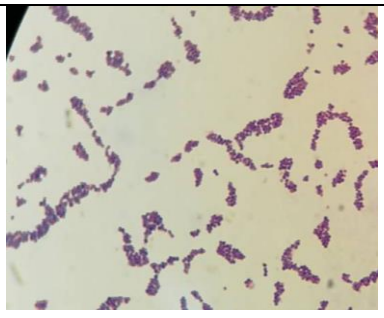
ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่าง	รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	ลักษณะภายใต้กล้อง
GM11			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM12			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM13			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM31			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน

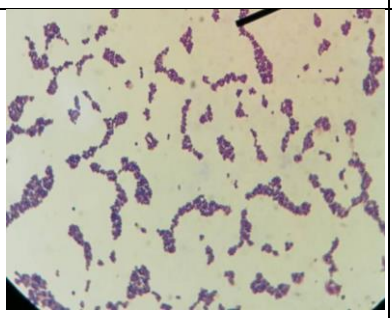
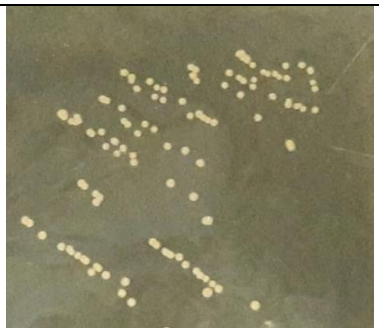
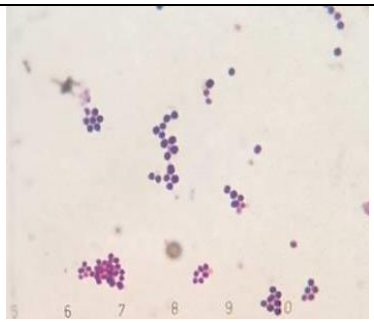
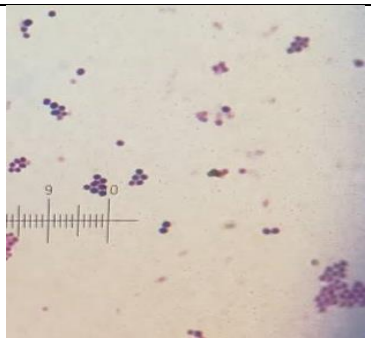
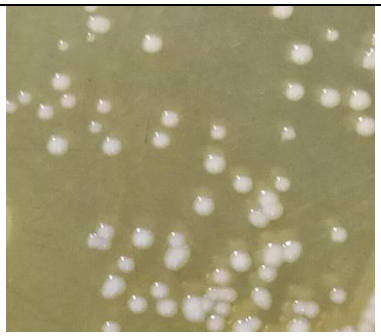
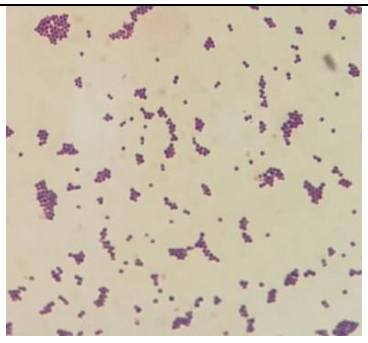
ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (ต่อ)

ตัวอย่าง	รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	ลักษณะภายใต้กล้อง
GM41			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM42			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM51			เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น มีขนาดประมาณ 2.0-3.0 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM52			เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น มีขนาดประมาณ 1.0-2.0 x 2.0-3.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวต่อเป็นสายโซ่

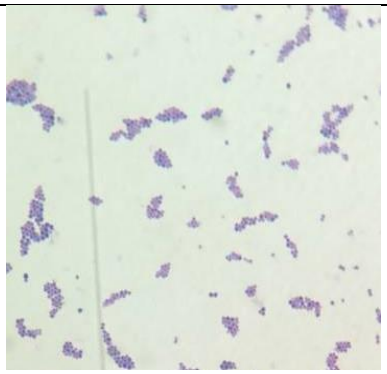
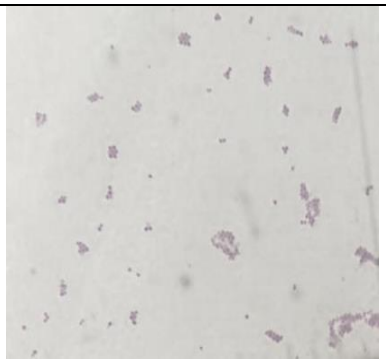
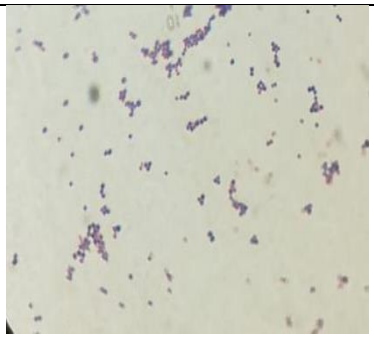
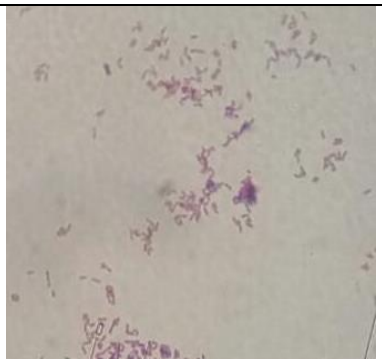
ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (ต่อ)

ตัวอย่าง	รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	ลักษณะภายใต้กล้อง
GM61			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM62			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM71			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM72			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน

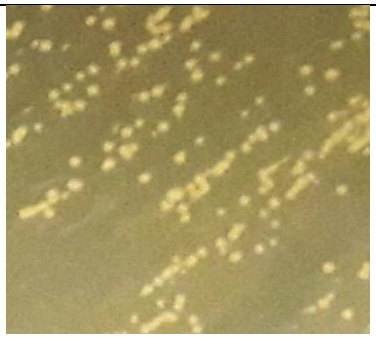
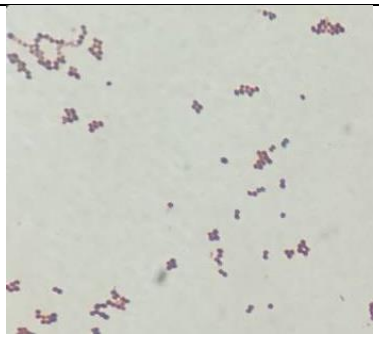
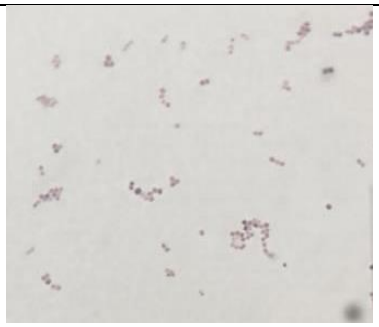
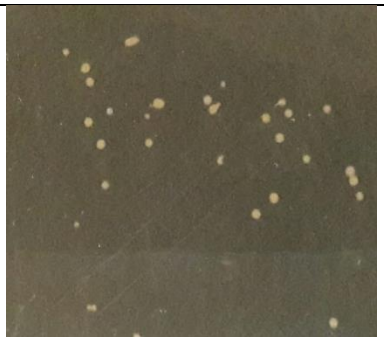
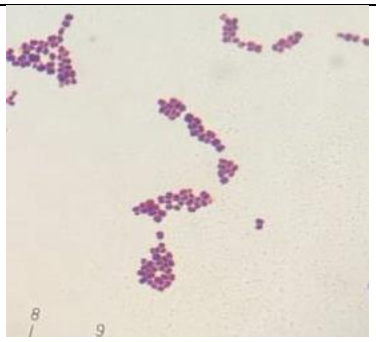
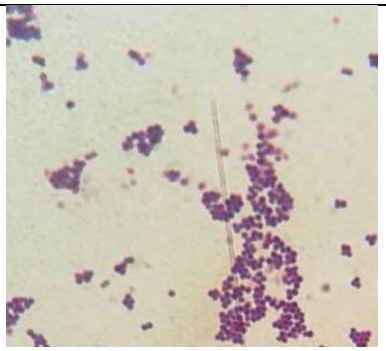
ตารางที่ 8 ลักษณะโคลีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (ต่อ)

ตัวอย่าง	รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	ลักษณะภายใต้กล้อง
GM73			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM81			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM82			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM83			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน

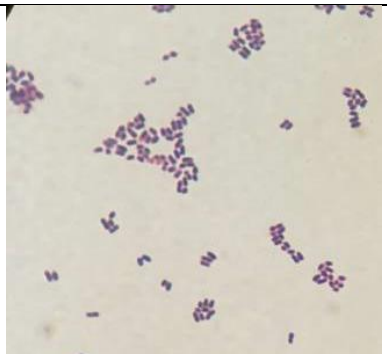
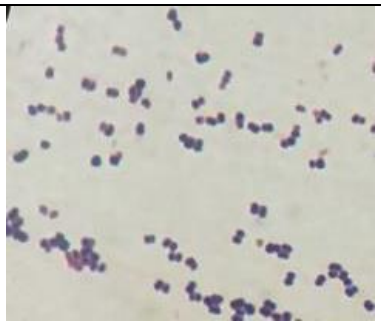
ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (ต่อ)

ตัวอย่าง	รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	ลักษณะภายใต้กล้อง
GM91			เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น มีขนาดประมาณ 1.0 x 2.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM92			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM101			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM111			เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน มีขนาดประมาณ 0.5x1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ

ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (ต่อ)

ตัวอย่าง	รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)	ลักษณะภายใต้กล้อง
GM112			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM113			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM114			เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน มีขนาดประมาณ 1.0x1.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM121			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน

ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (ต่อ)

ตัวอย่าง	**รูปเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS**	**รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100X)**	**ลักษณะภายใต้กล้อง**
GM131			เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน มีขนาดประมาณ 1.0x2.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน
GM132			เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 1.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก จับกลุ่มเรียงตัวไม่แน่นอน

4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) และความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility)

แบคทีเรียกรดแลกติกมีคุณสมบัติไม่เคลื่อนที่ และไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) แต่แบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสเทียม (Pseudocatalase) (Axelsson, 1998) ได้ เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) และทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ได้ 21 ไอโซเลท และไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส 5 ไอโซเลท ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไม่มีการเคลื่อนที่ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการสร้างเอนไซม์คะตาเลส และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ

ชื่อแม่แพะ	ไอโซเลท	Catalase	Motility
แม่น้อย (GM1)	GM11	+	-
	GM12	+	-
	GM13	+	-
หนูนา (GM3)	GM31	+	-
ดาวเรือง (GM4)	GM41	+	-
	GM42	+	-
เดือน (GM5)	GM51	+	-
	GM52	+	-
กะทิ (GM6)	GM61	+	-
	GM62	-	-
มะลิ (GM7)	GM71	-	-
	GM72	+	-
	GM73	+	-
ขาว (GM8)	GM81	+	-
	GM82	+	-
	GM83	+	-
แป้ง (GM9)	GM91	+	-
	GM92	+	-
แดง (GM10)	GM101	-	-

ตารางที่ 9 ผลการสร้างคะตาเลส (catalase) และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) (ต่อ)

ชื่อแม่แพะ	ไอโซเลท	Catalase	Motility
แตม (GM11)	GM111	+	-
	GM112	+	-
	GM113	+	-
	GM114	+	-
ใหญ่ (GM12)	GM121	+	-
เล็ก (GM13)	GM131	-	-
	GM132	-	-

โดยจาการศึกษาของ รุจ วัลยะเสวี (2539) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์คะตาเลสในแบคทีเรียกรดแลกติกพบว่า 87 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum, L. pentosus, L. sake, L. fermentum, Lactobacillus spp., Pediococcus pentosaccus, P. acidilactici Pediococcus spp.* สามารถสร้างเอนไซม์ true catalase สำหรับเชื้อในกลุ่ม aerobe ในสายพันธุ์ staphylococci และ micrococci พบว่าทุกเชื้อในสายพันธุ์นี้มี pseudocatalase activity ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ true catalase ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ในงานวิจัยนี้ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) อาจเป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น

4.4 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้

นำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 26 ไอโซเลท มาทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยเกณฑ์การทดสอบ ได้แก่ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS, การทดสอบการสร้างคะตาเลส (catalase), การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถทำการจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 13 กลุ่ม ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 กลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้และผลการทดสอบคุณสมบัติบางประการของโพรไบโอติกส์

กลุ่ม	ชื่อแม่แพะ	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	Catalase	Motility	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ขนาด (μM)
1	แม่น้อย (GM1)	GM11	สีขาวขุ่น กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	หนูนา (GM3)	GM31	สีขาวขุ่นกลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	ดาวเรือง (GM4)	GM42	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่ นูน	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	กะทิ (GM6)	GM61	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	มะลิ (GM7)	GM72	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	มะลิ (GM7)	GM73	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	ขาว (GM8)	GM81	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	แป้ง (GM9)	GM92	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	แตม (GM11)	GM112	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	ใหญ่ (GM12)	GM121	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
2	แม่น้อย (GM1)	GM12	สีขาวครีม กลม ขนาดเล็ก ผิวมันวาว ขอบเรียบ	+	-	กลม	1.0 x 1.0
3	แม่น้อย (GM1)	GM13	สีขาวครีม กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
4	ดาวเรือง (GM4)	GM41	สีขาวขุ่น กลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	แตม (GM11)	GM113	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก	+	-	กลม	1.0 x 1.0
5	เดือน (GM5)	GM51	สีขาวขุ่น กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	ท่อนสั้น	2.0-3.0 x 2.0-4.0
6	แตม (GM11)	GM111	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	ท่อน	0.5 X 1.0

ตารางที่ 10 กลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้และผลการทดสอบคุณสมบัติบางประการของโพรไบโอติกส์ (ต่อ)

กลุ่ม	ชื่อแม่แพะ	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	Catalase	Motility	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ขนาด (μM)
7	เดือน (GM5)	GM52	สีขาวครีม กลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	ท่อน	1.0-2.0 x 2.0-3.0
8	กะทิ (GM6)	GM62	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก นูน	-	-	กลม	1.0 x 1.0
9	มะลิ (GM7)	GM71	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่	-	-	กลม	1.0 x 1.0
	แดง (GM10)	GM101	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	-	-	กลม	1.0 x 1.0
	เล็ก (GM13)	GM132	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่	-	-	กลม	1.0 x 1.0
10	ขาว (GM8)	GM82	สีขาวขุ่น ขอบไม่แน่นอนและใส ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
	ขาว (GM8)	GM83	สีขาวขุ่น ขอบไม่แน่นอนและใส ขนาดใหญ่	+	-	กลม	1.0 x 1.0
11	แตม (GM11)	GM114	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก	+	-	ท่อนสั้น	1.0 x 1.5
12	เล็ก (GM13)	GM131	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน ขนาดใหญ่	-	-	ท่อนสั้น	1.0 x 2.0
13	แป้ง (GM9)	GM91	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ขนาดใหญ่	+	-	ท่อนสั้น	1.0 x 2.0

4.5 การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์

4.5.1 การทดสอบการทนกรด

จากการนำเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มจำนวนทั้งหมด 13 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 โดยเปรียบเทียบกับ *Streptococcus thermophiles* (reference strain YC-X16) ซึ่งคัดแยกจากหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตทางการค้า (Chr. Hansen) ผลการทดสอบความสามารถการทนต่อกรด (ตารางที่ 11) พบว่ามีทั้งหมด 5 ไอโซเลท สามารถทนกรดที่ pH 2.5 ที่เวลา 4 ชั่วโมง ได้แก่ GM11, GM12, GM13, GM51 และ GM111 โดยที่ไอโซเลท GM13 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 87.33% รองลงมาคือไอโซเลท GM11 มีอัตราการรอดชีวิต 76.10% ไอโซเลท GM111 มีอัตราการรอดชีวิต 63.80% ไอโซเลท GM51 มีอัตราการรอดชีวิต 63.49% และไอโซเลท GM12 มีอัตราการรอดชีวิต 57.97% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับ reference strain YC-X16 (46.42%) สำหรับไอโซเลทที่มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้แก่ GM71 (63.57%) และ GM82 (58.66%) ส่วนไอโซเลท GM41, GM52, GM62, GM91, GM114, GM131 ไม่มีความสามารถในการทนต่อกรดที่ pH 2.5

จากรายงานของ Erkkilä และ Petäjä (2000) พบว่า ปกติในกระเพาะอาหารมีค่า pH เท่ากับ 2 แต่เมื่อมีอาหารในกระเพาะอาหารจะมีค่า pH เพิ่มขึ้นจาก pH 2 เป็น pH 3 และอาหารจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารของมนุษย์นาน 2-4 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ได้ทดสอบความสามารถการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้ไอโซเลท GM41, GM52, GM62, GM71, GM82, GM91, GM114 และ GM131 ไม่สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงไม่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์

จากผลการทดลองนี้พบว่ามี 5 ไอโซเลท คือ GM11, GM12, GM13, GM51 และ GM111 ที่มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่กล่าวไว้ข้างต้นในบทที่ 2 ข้อ 3.3 และตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ปี 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในอาหาร โดยในการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นโพรไบโอติกส์ ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานตลอดจนต้องมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Holzapfel et al., 1998 และ Vinderola et al., 2003)

ตารางที่ 11 อัตราการรอดชีวิต (%) ของแบคทีเรียที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (n=3, $\bar{x}$ ± SD)

กลุ่มที่	ไอโซเลท	Log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ					อัตราการรอดชีวิต (%) ที่ 4 ชั่วโมง
		0 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	
control	YC-X16	9.95±0.01	8.35±0.03	6.94±0.05	5.13±0.05	4.62±0.03	46.42
1	GM11	9.13±0.12	8.74±0.57	8.39±0.69	7.96±0.04	6.95±0.04	76.10*
2	GM12	9.75±0.03	6.93±0.05	6.43±0.02	6.05±0.16	5.65±0.13	57.97
3	GM13	8.24±0.03	8.09±0.07	7.97±0.03	7.72±0.07	7.19±0.07	87.21
4	GM41	9.07±0.12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
5	GM51	10.09±0.06	9.03±0.05	8.02±0.03	7.14±0.04	6.41±0.01	63.49
6	GM111	9.08±0.07	8.21±0.15	7.37±0.50	6.26±0.07	5.79±0.10	63.80
7	GM52	9.19±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
8	GM62	9.39±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
9	GM71	8.43±0.03	5.36±3.09	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
10	GM82	9.38±0.03	5.51±3.18	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
11	GM91	9.28±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
12	GM114	8.03±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**
13	GM131	8.87±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00**

หมายเหตุ * เป็นผลการทดลองจากนางสาวเจนจิรา สนธิสกุล

** ไอโซเลทที่ไม่สามารถทนกรดที่ pH 2.5 ที่ 4 ชั่วโมง

4.5.2 การทดสอบการทนเกลือน้ำดี

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มจำนวนทั้งหมด 13 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt) โดยเปรียบเทียบกับ *Streptococcus thermophiles* (reference strain YC-X16) ซึ่งคัดแยกจากหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตทางการค้า (Chr. Hansen) ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 12

พบว่ามีทั้งหมด 8 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้แก่ GM13, GM41, GM51, GM52, GM62, GM71, GM91 และ GM114 โดยที่ไอโซเลท GM52 มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 74.11% รองลงมาคือไอโซเลท GM114 มีอัตราการรอดชีวิต 70.66% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับ reference strain YC-X16 (68.54%) สำหรับไอโซเลท GM13, GM41, GM51, GM62, GM71 และ GM91 พบอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า reference strain YC-X16

ไอโซเลท GM111 พบอัตราการรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง แต่ไม่พบอัตราการรอดชีวิตที่เวลาตั้งแต่ 6 ชั่วโมง สำหรับอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ GM11, GM12, GM82 และ GM131 ไม่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt)

จากคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่กล่าวไว้ข้างต้นในบทที่ 2 ข้อ 3.3 และตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ปี 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในอาหาร โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ควรมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี (bile salt resistance) และจากผลการทดลองนี้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากนมแพะทั้งหมด 8 ไอโซเลท ได้แก่ GM13, GM41, GM51, GM52, GM62, GM71, GM91 และ GM114 มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt)

Chowdhury และคณะ (2012) รายงานการศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากโยเกิร์ตนมกระบือ พบว่าสามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำดีถึง 0.3% ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำดีที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์

นอกจากนั้นรายงานของ Margolles และคณะ (2003) พบว่า *Bifidobacterium bifidum* CECT 4549 และ *Bifidobacterium bifidum* M6 สามารถทนต่อ cholate ที่ความเข้มข้น 0.05-1.25% (cholate เป็นองค์ประกอบของเกลือน้ำดี) เนื่องจากน้ำดีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยจะไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการทำลายด้วยน้ำดี ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีจึงมีความสำคัญกับการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์

ตารางที่ 12 อัตราการรอดชีวิต (%) ของแบคทีเรียในสภาวะที่มี 0.3% bile salt ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (n= 3, $\bar{x}$ ± SD)

กลุ่มที่	ไอโซเลท	Log CFU/ml ที่เวลาต่างๆ				อัตราการรอดชีวิต (%) ที่ 24 ชั่วโมง
		0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	
control	YC-X16	9.11±0.06	7.09±0.02	6.83±0.16	6.25±0.03	68.54
1	GM11	9.11±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00*
2	GM12	9.52±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00*
3	GM13	8.97±0.12	5.90±0.50	6.05±0.05	5.22±0.06	58.24
4	GM41	9.37±0.58	6.59±0.09	6.53±0.05	6.05±0.02	64.56
5	GM51	9.72±0.07	8.05±0.07	7.37±0.03	6.55±0.05	67.38
6	GM111	8.54±0.10	6.57±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00*
7	GM52	9.93±0.05	8.05±0.04	8.78±0.07	7.36±0.02	74.11
8	GM62	9.66±0.10	7.19±0.01	5.52±0.05	4.94±0.03	51.14
9	GM71	10.11±0.15	6.18±0.06	5.39±0.02	4.96±0.04	49.00
10	GM82	9.21±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00*
11	GM91	9.39±0.05	5.98±0.04	4.97±0.04	4.57±0.08	48.68
12	GM114	8.08±0.06	6.65±0.07	6.29±0.05	5.71±0.10	70.66
13	GM131	8.13±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00*

หมายเหตุ * ไอโซเลทที่ไม่สามารถทนเกลือน้ำดี (0.3% bile salt) ที่ 24 ชั่วโมง

4.5.3 การทดสอบความปลอดภัย

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท มาทดสอบความปลอดภัยโดยวิธีทดสอบ Haemolytic activity เปรียบเทียบกับ reference strain YC-X16 พบว่ามี 14 ไอโซเลท ได้แก่ GM11, GM12, GM31, GM42, GM62, GM71, GM72, GM73, GM92, GM101, GM111, GM112, GM113 และ GM121 เกิดการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar อย่างสมบูรณ์ จัดอยู่ในกลุ่ม beta-haemolysis (ตารางที่ 13 และรูปที่ 4 A) และมี 10 ไอโซเลท ได้แก่ GM13, GM41, GM61, GM81, GM82, GM83, GM91, GM114, GM131 และ GM132 เกิดการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar เพียงบางส่วน จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-haemolysis (ตารางที่ 13 และรูปที่ 5) สำหรับไอโซเลท GM51, GM52 และ reference strain YC-X16 ไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar จัดอยู่ในกลุ่ม gamma-haemolysis (ตารางที่ 13 และรูปที่ 4 B)

จากการศึกษางานวิจัยของ Maragkoudakis และ Zoumpopoulou (2006) ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมจำนวน 29 ไอโซเลท โดยทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนบน Blood agar พบว่ามี *Lactobacillus* 25 ไอโซเลทที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และมี *Lactobacillus* 4 ไอโซเลท ได้แก่ *L paracasei* subsp. *Paracasei, Lactobacillus* spp. และ *L casei* ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเพียงบางส่วน (alpha-haemolysis) โดยกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงถือว่าเป็นข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสำหรับการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ ซึ่งสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส์จะต้องไม่เกิดกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

โดยจากผลการทดลองพบว่าไอโซเลท GM51 และ GM52 ไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (gamma-haemolysis) จึงนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion ต่อไป

ตารางที่ 13 ผลความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (haemolysis) บนอาหาร blood agar

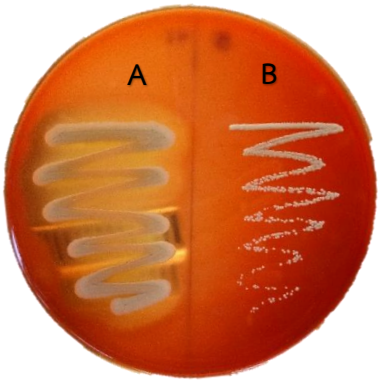
ชื่อแม่แพะ	**ไอโซเลท**	**ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (haemolysis) บนอาหาร blood agar**		
		beta-haemolysis[a]	**alpha-haemolysis**[b]	**gamma-haemolysis**[c]
แม่น้อย (GM1)	GM11	✓		
	GM12	✓		
	GM13		✓	
หนูนา (GM3)	GM31	✓		
ดาวเรือง (GM4)	GM41		✓	
	GM42	✓		
เดือน (GM5)	GM51			✓
	GM52			✓
กะทิ (GM6)	GM61		✓	
	GM62	✓		
มะลิ (GM7)	GM71	✓		
	GM72	✓		
	GM73	✓		
ขาว (GM8)	GM81		✓	
	GM82		✓	
	GM83		✓	
แป้ง (GM9)	GM91		✓	
	GM92	✓		
แดง (GM10)	GM101	✓		
แตม (GM11)	GM111	✓		
	GM112	✓		
	GM113	✓		
	GM114		✓	
ใหญ่ (GM12)	GM121	✓		
เล็ก (GM13)	GM131		✓	
	GM132		✓	

หมายเหตุ

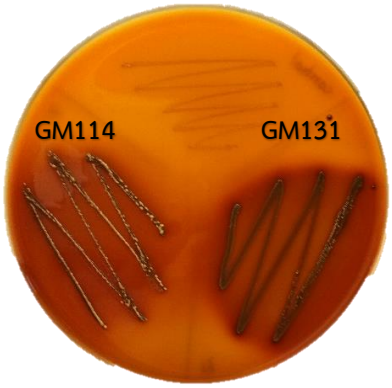
[a] beta-haemolysis มีการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar อย่างสมบูรณ์ เห็นเป็นวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ

[b] alpha-haemolysis มีการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar เพียงบางส่วน เห็นเป็นสีเขียวรอบโคโลนีของเชื้อ

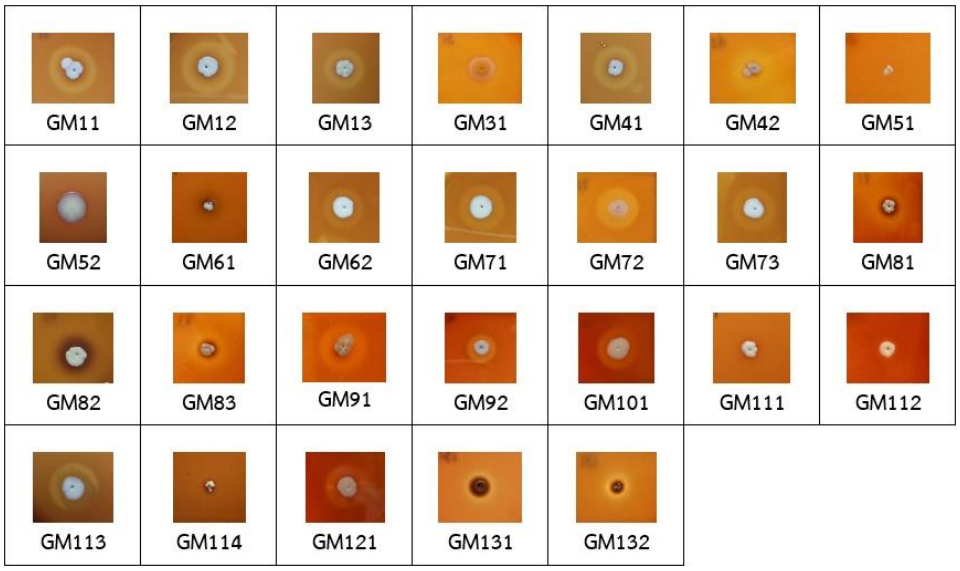
[c] gamma-haemolysis ไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar



รูปที่ 4 ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงบน blood agar (A) การสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (beta-haemolysis) (GM91) และ (B) ไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดง (gamma-haemolysis) (GM51)



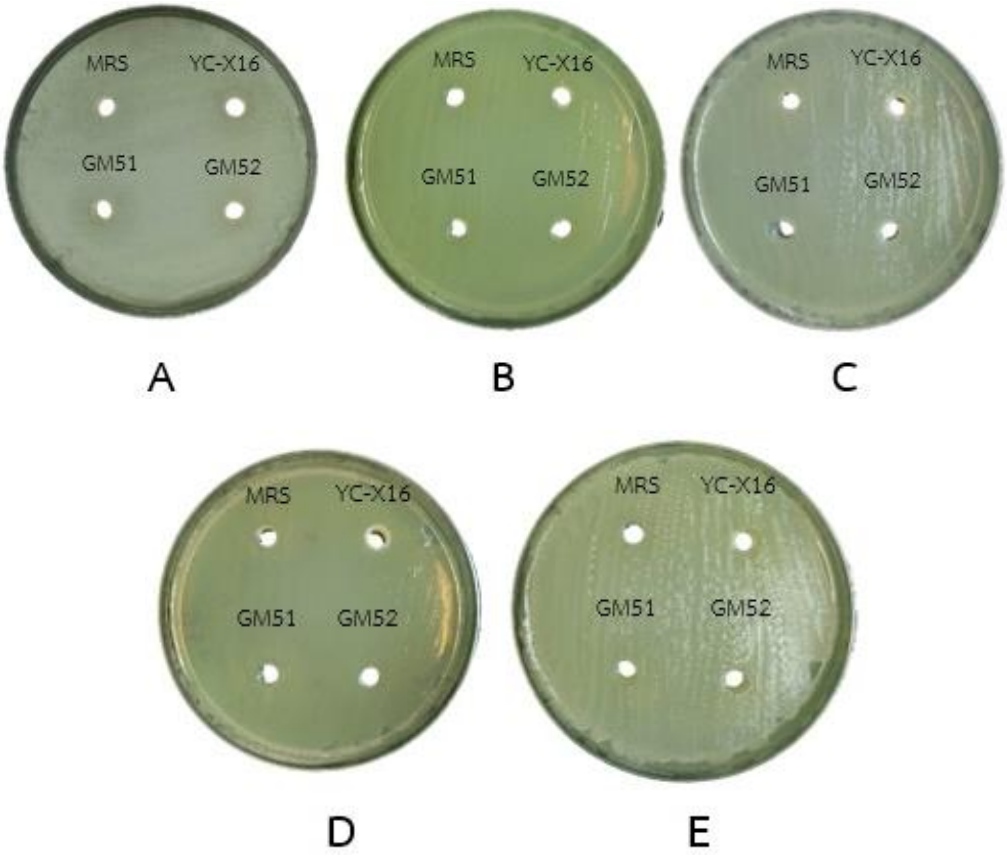
รูปที่ 5 ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงบน blood agar เพียงบางส่วน (alpha-haemolysis) (GM114 และ GM131)



รูปที่ 6 ลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 26 ไอโซเลท

4.5.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion

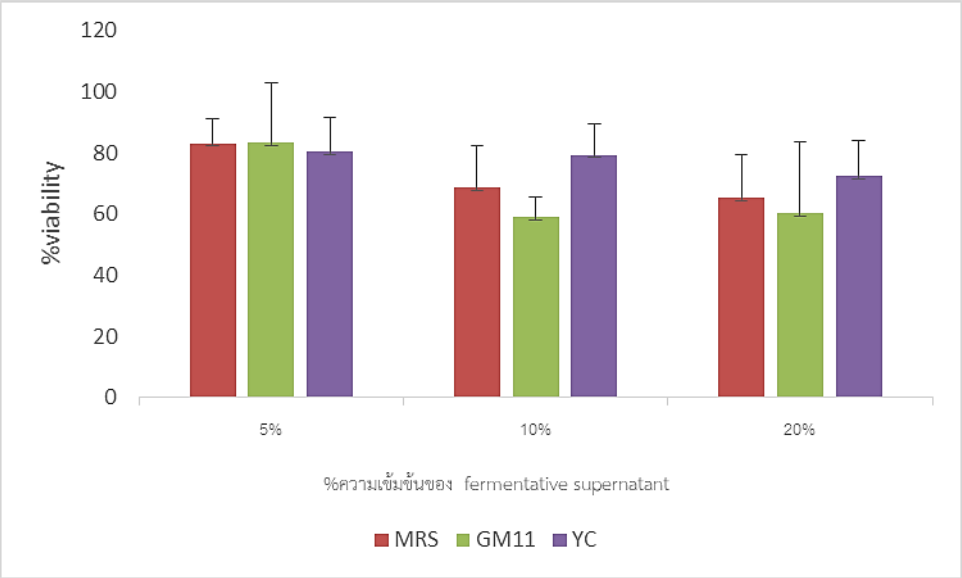
จากการทดสอบความปลอดภัยโดยวิธีทดสอบ haemolytic activity พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar (gamma-haemolysis) ได้แก่ GM51 และ GM 52 หลังจากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 073, *Bacillus subtilis* TISTR 001, *Salmonella* Typhimurium TISTR 2519, *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 โดยเปรียบเทียบกับ reference strain YC-X16 ซึ่งคัดแยกจากหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตทางการค้า (Chr. Hansen) ผลการทดสอบพบว่า ไอโซเลท GM51 และ GM52 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion (A) *Escherichia coli* TISTR 073, (B) *Bacillus subtilis* TISTR 001, (C) *Salmonella* Typhimurium TISTR 2519, (D) *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 และ (E) *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287

4.5.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)

ทำการทดสอบผลของ fermentative supernatant จากเชื้อ GM51 และ GM52 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20% ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เปรียบเทียบกับหัวเชื้อทางการค้า YC-X16 พบว่าสารที่เชื้อ GM51, GM52 และ YC-X16 ผลิตขึ้นไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 (p>0.05) โดยผลการทดสอบของไอโซเลท GM51 แสดงดังรูปที่ 8 จึงสรุปได้ว่าทั้ง 2 ไอโซเลทและหัวเชื้อทางการค้าไม่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29

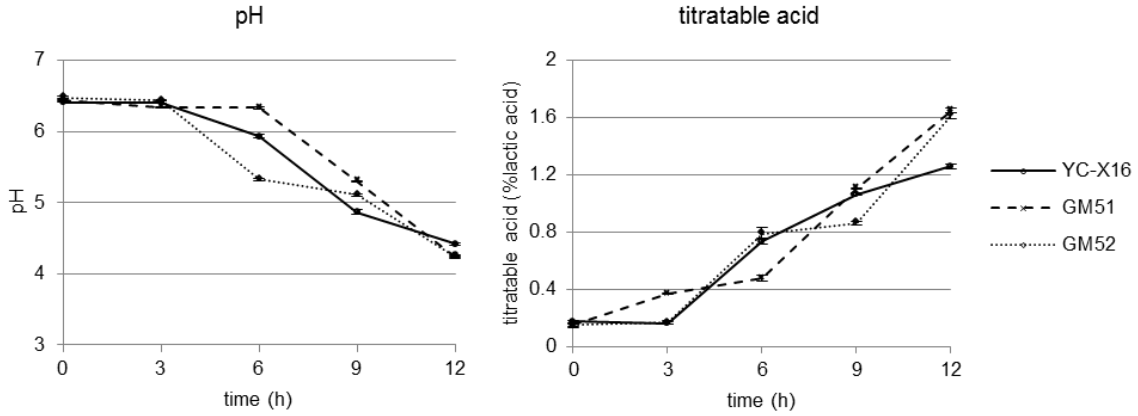


รูปที่ 8 แสดงผลเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกส์สูตร MRS แบบปรับ pH และสารที่เชื้อ GM51 เชื้อ YC-X16 ผลิตขึ้นขณะเจริญเติบโต (supernatant) ที่ความเข้มข้น 5%(v/v), ความเข้มข้น 10%(v/v) ความเข้มข้น 20%v/v) ต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HT-29 โดยวิธี MTT assay

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะ

4.6.1 การติดตาม pH และปริมาณกรดระหว่างการหมักนมแพะ

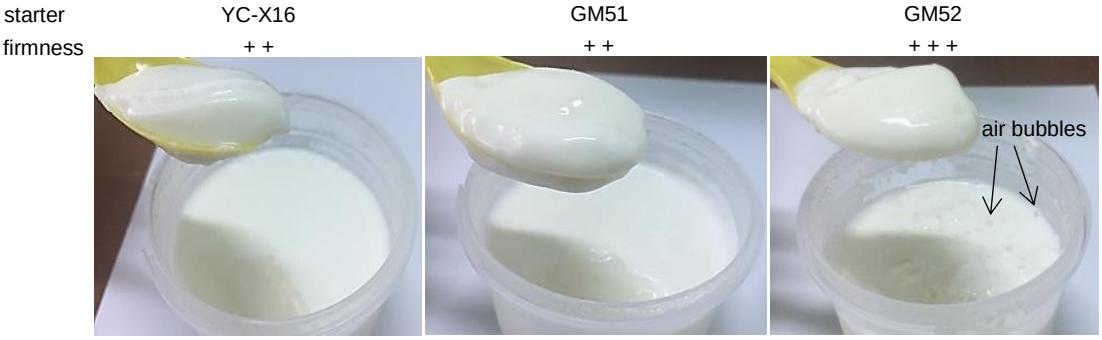
ค่า pH ตั้งต้นของส่วนผสมทั้งหมดอยู่ที่ประมาณ 6.4-6.5 (รูปที่ 9) และปริมาณกรดที่ไตเตรตได้อยู่ที่ 0.15-0.16 %กรดแลกติก ซึ่งบ่งชี้ว่านมแพะดิบที่ใช้เป็นส่วนประกอบหลักมีคุณภาพดี หลังจากเริ่มหมักใน 3 ชั่วโมงแรกค่า pH ยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่เริ่มลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหัวเชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้ระยะเวลาช่วงแรกในการฟื้นตัวจากสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส) จึงยังไม่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในช่วง 3 ชั่วโมงแรก ทั้งนี้ ในอุตสาหกรรมนม นิยมหยุดการหมักของโยเกิร์ตชนิดคงตัวเมื่อค่า pH ลดลงถึง 4.6 ในการทดลองนี้พบว่าหัวเชื้อทั้ง 3 ชนิดใช้เวลาหมักนานกว่า 9 ชั่วโมง โดยเมื่อชั่วโมงที่ 12 YC-X16 มีค่า pH อยู่ที่ 4.4 ในขณะที่ GM51 และ GM52 มีค่า pH อยู่ที่ 4.2 และในทางกลับกัน ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ในโยเกิร์ตที่หมักด้วย GM51 และ GM52 อยู่ที่ประมาณ 1.6% ซึ่งสูงกว่า YC-X16 (1.3%) ดังแสดงในรูปที่ 9 แสดงว่า GM51 และ GM52 มีอัตราการหมักกรดที่สูงกว่า YC-X16 ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ



รูปที่ 9 ค่า pH และปริมาณกรดระหว่างการหมักนมแพะด้วย GM51, GM52 และหัวเชื้อทางการค้า YC-X16

4.6.2 คุณลักษณะของโยเกิร์ตนมแพะที่ผลิตได้

หลังจากหมักไปได้นาน 6 ชั่วโมง สังเกตได้ว่าเริ่มเกิดเคิร์ด (curd) ที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เมื่อครบ 12 ชั่วโมง โยเกิร์ตที่หมักด้วย YC-X16 มีลักษณะเคิร์ดคงตัวดี มีกลิ่นรสเฉพาะของโยเกิร์ต ส่วนโยเกิร์ตที่หมักด้วย GM51 มีลักษณะเคิร์ดที่คงตัวดีเช่นเดียวกัน แต่มีกลิ่นเปรี้ยวมากกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้น่าจะเกิดจากอัตราการหมักกรดที่สูงกว่า ทำให้ได้ปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์สุดท้ายมากกว่า สำหรับโยเกิร์ตที่หมักด้วย GM52 มีลักษณะเคิร์ดคงตัวดี แต่มีกลิ่นของแอลกอฮอล์ และมีฟองอากาศในเนื้อโยเกิร์ต (รูปที่ 10) ทั้งนี้สันนิษฐานว่าไอโซเลท GM52 น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่ม heterofermentative ที่ผลิตได้ทั้งกรดแลกติก แอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Caplice and Fitzgerald, 1999) ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต ทั้งนี้โยเกิร์ตนมแพะชนิดคงตัวที่ผลิตได้ทุกกลุ่มทดลองไม่มีกลิ่นสาบแพะ



รูปที่ 10 ค่า pH ลักษณะปรากฏของโยเกิร์ตนมแพะชนิดคงตัวที่ผลิตได้

ผลการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสพบว่าโยเกิร์ต YC-X16 มีความหนืดสูงกว่า GM51 และ GM51 (ตารางที่ 14) แม้ว่าปริมาณกรดจะน้อยกว่าก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากหัวเชื้อที่คัดเลือกมาใช้ในทางการค้าส่วนใหญ่ผลิต exopolysaccharide (EPS) ซึ่งเป็นตัวที่ช่วยให้เกิดโครงสร้างร่างแหในโยเกิร์ตได้ดีขึ้น และทำให้หนืดขึ้นด้วย ส่วนไอโซเลทที่คัดแยกได้เอง อาจไม่มีความสามารถในการผลิต EPS หรือผลิตได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์พบว่า โยเกิร์ตที่ผลิตได้ทุกกลุ่มทดลองมีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน คือ มากกว่า 10^9 CFU/g

ตารางที่ 14 ลักษณะเนื้อสัมผัส (ความหนืดและความแข็ง) และปริมาณจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

หัวเชื้อหมัก	ความหนืด (cP)	ความแข็ง (N)	ปริมาณจุลินทรีย์ (log cfu/g)
YC-X16	20075±249[a]	48.72±0.57[a]	9.86±0.92[a]
GM51	13020±736[b]	29.78±3.16[b]	9.53±0.74[a]
GM52	17225±813[c]	33.12±3.83[b]	9.71±0.46[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b, c ที่ต่างกันในบรรทัดเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

บทที่5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำนมแพะและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากหมู่บ้านชาวไทยมุสลิม ตำบลสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 13 ตัวอย่าง เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS ที่มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าแยกเชื้อได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X พบว่าทั้ง 26 ไอโซเลท ติดสี Crystal violet ซึ่งเป็นแกรมบวก (Gram positive) ลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่พบมี 2 ลักษณะ คือ รูปร่างท่อน 6 ไอโซเลท และรูปร่างกลม 20 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) และทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ได้ 21 ไอโซเลท และไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส 5 ไอโซเลท ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไม่มีการเคลื่อนที่ จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยเกณฑ์การทดสอบ ได้แก่ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS, การทดสอบการสร้างคะตาเลส (catalase), การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถทำการจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 13 กลุ่ม

จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียทั้ง 13 กลุ่ม โดยเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 ผลการทดสอบพบว่ามีทั้งหมด 5 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 2.5 ที่เวลา 4 ชั่วโมง ได้แก่ GM11, GM12, GM13, GM51 และ GM111 โดยไอโซเลท GM11 (76.10%), ไอโซเลท GM13 (87.33%), ไอโซเลท GM111 (63.80%), ไอโซเลท GM51 (63.49%) และไอโซเลท GM12 (57.97%) มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อเทียบกับ reference strain YC-X16 (46.42%) ไอโซเลทที่มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้แก่ GM71 (63.57%) และ GM82 (58.66%) ส่วนไอโซเลท GM41, GM52, GM62, GM91, GM114 และ GM131 ไม่มีความสามารถในการทนต่อกรด pH 2.5 ผลการทดสอบความสามารถการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt) พบว่ามีทั้งหมด 8 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้แก่ GM13, GM41, GM51, GM52, GM62, GM71, GM91 และ GM114 โดยที่ไอโซเลท GM52 (74.11%) และ GM114 (70.66%) มีอัตราการรอดงสูงกว่า reference strain YC-X16 (68.54%) ไอโซเลท GM13 (58.24%), GM41 (64.56%), GM51 (67.38%), GM62 (51.14%), GM71 (49.00%) และ GM91 (48.68%) มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า reference strain YC-X16 และไอโซเลท GM111 พบอัตราการรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง สำหรับอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ GM11, GM12, GM82 และ GM131 ไม่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3 % bile salt)

จากการทดสอบความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ GM51 และ GM52 ที่ไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดง (gamma-haemolysis) ต่อมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 073, *Bacillus subtilis* TISTR 001, *Salmonella* Typhimurium TISTR 2519, *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 โดยวิธี agar well diffusion พบว่าจากผลการทดสอบไอโซเลท GM51 และ GM52 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ และเมื่อทำการทดสอบผลของ fermentative supernatant จากเชื้อ GM51 และ GM52 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20% ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เปรียบเทียบกับหัวเชื้อทางการค้า YC-X16 พบว่าสารที่เชื้อ GM51, GM52 และ YC-X16 ผลิตขึ้นไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 (p>0.05) จึงสรุปได้ว่าทั้ง 2 ไอโซเลทและหัวเชื้อทางการค้าไม่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29

เมื่อนำไอโซเลท GM51 และ GM52 ที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะ พบว่าทั้ง GM51 และ GM52 มีอัตราการหมักกรดค่อนข้างสูง โดยได้ปริมาณกรดสุดท้ายก่อนเก็บโยเกิร์ตอยู่ที่ 1.5-1.6% ในขณะที่หัวเชื้อทางการค้า YC-X16 หมักได้ปริมาณกรด 1.2% ที่เวลาเท่ากัน แต่โยเกิร์ตที่ได้จาก YC-X16 มีค่าความหนืดสูงกว่ามาก ทั้งนี้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์สุดท้ายใกล้เคียงกัน คือ สูงกว่า 10^9 CFU/g นอกจากนี้พบว่าโยเกิร์ตที่ผลิตจาก GM51 มีลักษณะเนียน นุ่ม มีกลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ต คล้ายกับ YC-X16 แต่โยเกิร์ตจาก GM52 นั้นมีกลิ่นของแอลกอฮอล์ปนอยู่ และมีฟองอากาศอยู่ในเนื้อโยเกิร์ตด้วย สันนิษฐานว่า GM52 เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่ม heterofermemtative ซึ่งไม่เหมาะกับการนำมาเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต จึงสรุปได้ว่ามีเพียง GM51 เท่านั้นที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะได้ต่อไปในอนาคต

แนวทางในการดำเนินงานวิจัยต่อไป

ในงานวิจัยนี้จากการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียทั้ง 13 กลุ่ม พบว่าไอโซเลทที่มีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท GM51 โดยมีความสามารถในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 ทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3% และผ่านการทดสอบความปลอดภัยโดยไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดง (gamma-haemolysis) โดยไอโซเลทที่มีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้นำมาทดสอบการหมักโยเกิร์ตแล้ว พบว่าสามารถหมักโยเกิร์ตนมแพะได้โดยใช้เวลาในการหมักใกล้เคียงกับหัวเชื้อทางการค้า มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะได้ แต่เนื่องจากโยเกิร์ตที่หมักได้มีความหนืดไม่สูงนัก จึงน่าจะเหมาะสมกับการผลิตโยเกิร์ตชนิดกวนมากกว่าโยเกิร์ตชนิดคงตัว และนอกจากนี้ ก่อนที่จะทำไปผลิตเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตจริง จะต้องมีการพิสูจน์ทราบสปีชีส์ของไอโซเลท GM51 ก่อน อาจทำได้โดยหาลำดับดีเอ็นเอของ 16s rDNA และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST เพื่อยืนยันความปลอดภัยของจุลินทรีย์ที่จะใช้กับอาหาร

เอกสารอ้างอิง

จิตธนา แจ่มเมฆ. (2549). วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มานิตย์ วาสุเทพย์รังสรรค์. (2548). น้ำนมแพะ ชื่อธรรมดาที่ไม่ธรรมดา สรรพคุณคล้ายยาช่วยรักษาโรค. สำนักพัฒนาปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี, กรมประมง, เชียงใหม่.

วินัย ประลมพกาญจน์. (2538). อาหารและการให้อาหารแพะ. ภาควิชาสัตวศาสตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร วิทยาเขตหาดใหญ่, สงขลา. หน้า 255.

รุจ วัลยะเสวี. (2539). การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ Catalase และเอนไซม์ Nitrate Reductase และ Ritrite Reductase ในแบคทีเรียแลคติคและการศึกษาทางพันธุวิศวกรรมของเอนไซม์ ในแบคทีเรีย Lactobacillus plantarum. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. [ระบบออนไลน์].
แหล่งที่มา http://www1a.biotec.or.th/rdereport/prjbiotec.asp?Id=137 (10 ธันวาคม 2560)

สมใจ ศิริโภค. (2537). เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ. หน้า 250.

อุไรพร จิตแจ้ง. (2547). นมแพะผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ/เกษตรกรรมธรรมชาติ. บริษัท รุ่งเรืองสาส์นการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 46.

Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiology. 33: 282-291.

Axelsson L., (1998) Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd Edition, Marcel Dekker Inc., New York, 1-72.

Caplice E. and Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 131–149.

Chowdhury A., Hossain M. N., Mostazir N. J., Fakruddin M., Billah M. M., and Ahmed M. M. (2012) . Screening of *Lactobacillus* spp. from Buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial Activity. Journal of Bacteriology and Parasitology, 3(8).

De M. J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E., (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, 23, 130-135.

Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan GC. and Shanahan F., Collins J. K. (2001).

In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr, 73, 386-392.

Ensminger A. H., Ensminger M. E., Konlande J. E. and Robson J. R. K. (1995). The concise encyclopedia of Foods and nutrition. CRC press Inc. USA. 693.

Erkkila S. and Petaja E. (2000). Screening of Commercial Meat Starter Cultures at Low pH and in the Presence of Bile Salts for Potential Probiotic Use. Meat Science, 55, 297-300.

Fadda M., Mossa V., Deplano M., Pisano M. B. and Cosention S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from fiore sardo cheese for potential use as probiotic. Food Science and Technology, 75, 100-106.

Fredriksson N. J., Hermansson M. and Wilén B. M. (2013). The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. PLoS ONE, 8(10).

Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66, 365-378.

Fuller R. (1991). Probiotics in human medicine. Gut, 32, 439-442.

Gismondo M. R., Drago L. and Lombardi A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. Int J Antimicrob Agents, 12, 287-292.

Goldin B. R. (1998). Health benefits of probiotics. British J Nutr, 80, 203-207.

Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, 41, 85–101.

Hongoh Y., Yuzawa H., Ohkuma M. and Kudo T. (2003). Evaluation of primer and PCR conditionds for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS Microbiology Letters, 221, 299-304.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strain isolated from dairy products. Int. Dairy J. 16, 189-199

Margolles A., García L., Sánchez B., Gueimonde M., and Reyes-Gavilán C. (2003). Characterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate – A preliminary study. International Journal of Food Microbiology, 82, 191–198.

Ohmomo S., Daengsubha W., Yoshikawa H., Yuri M., Nozaki K., Nakajima T., and Nakamura I. (1998). Screening of anaerobic bacteria with the ability to decolorize molasses melanoidin. Agricultural and Biological Chemistry, 52, 2429-2435.

Posati L. P. and Orr M. L. (1976). Composition of Foods, Dairy and Egg Products. Agr. Handbook No. 8- 1, USDA-ARS, Washington, D.C., 144.

Teare J.M., Islam R., Flanagan R., Gallagher S., Davies M.G. and Grabau C. (1997). Measurement of Nucleic Acid Concentrations Using the DyNA QuantÔ and the GeneQuantÔ. Bio Techniques, 22, 1170-1174.

Vasiljevic T. and Shah N. P. (2008). Probiotics from Metchnikoff to bioactives. Int Dairy J, 18, 714-728.

Vinderola G., Chaia C. G. and Reinheimer J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘‘in vitro’’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36, 895-904.

Wood B. J. B. and Holzapfel W. H. (1995). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall. 161-162.

ภาคผนวก

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - สกุล

   (ภาษาไทย) นางงสาว พรศรี เจริญพานิช

   (ภาษาอังกฤษ) Miss Pornsri Charoenpanich

2. วัน เดือน ปีเกิด 25 มีนาคม 2525

3. รหัสประจำตัวผู้วิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี).....-.....

4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ☐ ข้าราชการ ☑ พนักงาน

   ☑ อาจารย์ ☐ ชำนาญการ

   ☐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ☐ เชี่ยวชาญ

   ☐ รองศาสตราจารย์ ☐ เชี่ยวชาญพิเศษ

   ☐ ศาสตราจารย์ ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

5. สถานที่ทำงาน

   ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

   คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

   มหาวิทยาลัยศิลปากร

   โทร. 034219361

   อีเมล pornsri_aum@yahoo.com

   ที่อยู่ปัจจุบัน

   บ้านเลขที่ 291/43 หมู่ 5 ลีลาวดี ต.โพรงมะเดื่อ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

   โทรศัพท์มือถือ 0983533590

6. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558 Doctor of Natural Science (Dr. rer. nat.) in Biology (summa cum laude)
มหาวิทยาลัยมาร์บวร์ก (Philipps-Universität Marburg) ประเทศเยอรมนี

พ.ศ. 2553 Diplom Biology
มหาวิทยาลัยไฟรบวร์ก (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) ประเทศเยอรมนี

พ.ศ. 2547 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) ชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับ 1)
มหาวิทยาลัยศิลปากร

7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

   - ระดับปริญญาโท (ปีที่ดำเนินการ 2009-2010)

     ชื่อเรื่อง Characterization of the Sin quorum sensing system regulatory targets in *Sinorhizobium meliloti*

- ระดับปริญญาเอก (ปีที่ดำเนินการ 2010-2015)

ชื่อเรื่อง Regulatory mechanisms of the Sin quorum sensing system and its impact on survival of the soil-dwelling bacterium *Sinorhizobium meliloti*

8. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา (microbial genetics and agricultural microbiology)

ผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ที่<u>กำลังดำเนินการ</u>

เรื่องที่ 1

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การเพิ่มศักยภาพการผลิต และการพัฒนาผลิตภัณฑ์นมจากนมแพะ ของหมู่บ้านชาวไทยมุสลิม อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

(ภาษาอังกฤษ) Improvement of production efficiency and development of goat milk products in Muslim Village, Cha-Am, Petchaburi

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☑ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☑ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ 330,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 ถึงปี พ.ศ. 2561

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

☑ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☑ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

เรื่องที่ 2

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาเทคนิคแลมป์เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลา

(ภาษาอังกฤษ) Development of LAMP technique for the detection of *Salmonella spp.*

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☑ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ 75,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 ถึงปี พ.ศ. 2561

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

☑ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☑ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

เรื่องที่ 3

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การเฝ้าระวังและรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากเนื้อไก่ในเขตจังหวัดนครปฐม

(ภาษาอังกฤษ) Surveillance and antibiogram pattern of *Salmonella* spp. Isolated from chicken meat in Nakhon Pathom province

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☑ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ 212,500 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561 ถึงปี พ.ศ. 2562

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

☑ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☑ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

ผู้ร่วมวิจัย 1

ตอนที่ 1 : ข้อมูลทั่วไป

1. **ชื่อ (ภาษาไทย)** นางสาวทักษวัน ทองอร่าม
   ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Miss Taksawan Thongaram
2. **วัน เดือน ปีเกิด** 3 มกราคม พ.ศ. 2515 (เพื่อเก็บในฐานข้อมูลนักวิจัย)
3. **รหัสประจำตัวผู้วิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ** (ถ้ามี)
4. **ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน**

☐ ข้าราชการ	✓ พนักงาน
✓ อาจารย์	☐ ชำนาญการ
☐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์	☐ เชี่ยวชาญ
☐ รองศาสตราจารย์	☐ เชี่ยวชาญพิเศษ
☐ ศาสตราจารย์	☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)

5. **สถานที่ทำงาน**

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

โทรศัพท์ 034 245 337 ต่อ 28808 โทรสาร 034 245 336 โทรศัพท์เคลื่อนที่ 089 205 5582

อีเมล: thongaram_t@silpakorn.edu

ที่อยู่ปัจจุบัน

159/14 ถ.ราชวิถี ต.พระปฐมเจดีย์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

โทรศัพท์มือถือ (โปรดระบุ) 089 2055582

6. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2558	เอก	Ph.D.	Food Science and Human Nutrition	University of Illinois at Urbana-Champaign	สหรัฐอเมริกา
2548	เอก	วท.ด.	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

2542	โท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย
2537	ตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศิลปากร	ไทย

7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

ชื่อเรื่อง Screening of lytic bacteria for the control of toxic cyanobacteria

ปีที่ดำเนินการ 2538-2542

- ระดับปริญญาเอก

ชื่อเรื่อง Probiotic metabolism of human milk oligosaccharides (HMOs) and prebiotics

ปีที่ดำเนินการ 2552-2557

8. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Prebiotic fermentation by probiotics, Genetic manipulation of lactobacilli, Gut microbiota and metagenomics

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1. Researcher, Enzyme technology laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 2006-2008.
   - Developed quick and efficient techniques for construction of metagenomic libraries and enzymes detection kit. Planned and executed workshop in order to promote organization in association with university groups.
   - Supervised undergraduate and graduate students in conducting their educational research.
     1) Construction of metagenomic fosmid library of termite gut and isolation of novel genes encoding lignocellulose-degrading enzymes using activity-based approach.
     2) Prokaryotic diversity in the rumen of swamp buffalo and Holstein cattle.
2. RIKEN, Asian Program Associate (current RIKEN International Program Associates, Research training at Environmental Molecular Biology Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Saitama, Japan, 2002-2005.
   Research: Comparison of bacterial communities of the alkaline gut segment among various species of higher termites.

Experience: Microbiology and molecular biology techniques (16S rDNA sequencing, T-RFLP analysis, and clone libraries etc).

3. Research assistant, Microbiological Resource Center (MIRCEN), Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Thailand, 1996-1999.
   Research: Screening, isolation, and identification of potent cyanobacteriolytic microorganisms.
   Experience: High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) for toxic analysis.

ผลงานวิจัยที่ผ่านมา

สิทธิบัตร

1. กรรมวิธีการตรวจและคัดกรองเอนไซม์ต่างๆอย่างรวดเร็ว เลขที่คำขอ: 0701002712 วันที่ขอ: 1 มิถุนายน 2550 เลขที่ประกาศ: 112259 วันที่ประกาศ: 20 กุมภาพันธ์ 2555 ผู้ขอจดทะเบียนสิทธิบัตร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ผู้ประดิษฐ์/ออกแบบ: นางรัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, นายอุกฤษฎ์ รัตนโฉมศรี, นางสาวลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, นางสาวสุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, นางสาวปิยนันท์ หาญพิชาญชัย, **นางสาวทักษวัน ทองอร่าม**, นายวีระวัฒน์ แช่มปรีดา

2. เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสและเอสเทอเรสชนิดใหม่ เลขที่คำขอ: 0701003516 วันที่ขอ: 13 กรกฎาคม 2550 เลขที่ประกาศ: 115333 วันที่ประกาศ: 31 กรกฎาคม 2555 ผู้ขอจดทะเบียนสิทธิบัตร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ผู้ประดิษฐ์/ออกแบบ: นายวีระวัฒน์ แช่มปรีดา, **นางสาวทักษวัน ทองอร่าม**, นางสาวปิยนันท์ หาญพิชาญชัย, นางสาวสุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, นางสาวลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, นางรัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, นางสาวภควดี ติรวงศาโรจน์, นายกุศล ภูธนกิจ

3. กระบวนการฟอกเยื่อกระดาษโดยไม่ต้องปรับพีเอชด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสทนด่างจากเมต้าจีโนมของแบคทีเรียในลำไส้ปลวก เลขที่คำขอ: 1101002054 วันที่ขอ: 15 กันยายน 2554 เลขที่ประกาศ: 135637 วันที่ประกาศ: 28 กรกฎาคม 2557 ผู้ขอจดทะเบียนสิทธิบัตร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ผู้ประดิษฐ์/ออกแบบ: นางสาวธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ, นางสาวลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, **นางสาวทักษวัน ทองอร่าม**, นางพึงใจ ติณสูลานนท์, นางสาวเสาวนีย์ อาภาวศิน

บทความทางวิชาการ

1. **Thongaram T**, Hoeflinger J, Chow J, and Miller MJ. 2017. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *J Dairy Sci.* 100 (10): 7825-7833. doi: 10.3168/jds.2017-12753.
2. **Thongaram T**, Hoeflinger J, Chow J, and Miller MJ. 2017. Prebiotic galactooligosaccharide metabolism by probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J Agric Food Chem*. 65 (20): 4184–4192. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00851.

3. Nimchua T, **Thongaram T**, Uengwetwanit T, Pongpattanakitshote S, and Eurwilaichitr L. 2012. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 462–469.
4. **Francl AL, Thongaram T,** and **Miller MJ. 2010.** The PTS transporters of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. *BMC Microbiol*. 10: 77.
5. Bunterngsook B, Kanokratana P, **Thongaram T**, Tanapongpipat S, Uengwetwanit T, Rachdawong S, Vichitsoonthonkul T, and Eurwilaichitr L. 2010. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74:1848-54.
6. Tirawongsaroj T, Sriprang R, Harnpicharnchai P, **Thongaram T,** Tanapongpipat S, Pootanakit K, and Eurwilaichitr L. 2008. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J. Biotech*. 133: 42-49.
7. Harnpicharnchai P, **Thongaram T**, Sriprang R, Champreda V, Tanapongpipat S, and Eurwilaichitr L. 2007. An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified troughing method. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 387-389.
8. **Thongaram T**, Hongoh Y, Kosono S, Ohkuma M, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, and Kudo T. 2005. Comparison of bacterial communities of the alkaline gut segment among various species of higher termites. *Extremophiles.* 9: 229-238.
9. **Thongaram T**, Kosono S, Ohkuma M, Hongoh Y, Kitada M, Yoshinaka T, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, and Kudo T. 2003. Gut of higher termites as a niche for alkaliphiles as shown by culture-based and culture-independent studies. *Microb. Environ*. 18: 152-159.
10. Ohkuma M, Shimizu H, **Thongaram T**, Kosono S, Moriya S. Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, and Kudo T. 2003. An alkaliphilic and xylanolytic *Paenibacillus* species isolated from the gut of a soil-feeding termite. *Microb. Environ*. 18: 145-151.
11. Mahakhant A, Sano T, Ratanachot P, **Thongaram T**, Srivastava VC, Watanabe MM, and Kaya, K. 1998. Detection of microcystins from cyanobacterial water blooms in Thailand fresh water. *Phycological Research*; 46: 25-29.

การนำเสนอผลงาน

1. Noocharoen, B, Jamornman T, *Waithaisong* K, Borirak O, Romreun U, Charoenpanich A, Charoenpanich P, and **Thongaram T**. 2018. Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from goat milk. Proceedings of the International BioScience Conference and the 7th Joint International PSU-UNS BioScience Conference 2018, Krabi, Thailand, September 17-18, 2018. (Poster presentation).
2. Leaujaroen T, Phanthong S, **Thongaram T**, Charoenpanich A, and Charoenpanich P. 2018. Proceedings of the International BioScience Conference and the 7th Joint International PSU-UNS BioScience Conference 2018, Krabi, Thailand, September 17-18, 2018. (Oral presentation).
3. Borirak O, **Thongaram T**, Romreun U, and *Waithaisong* K. 2018. Proceedings of the International BioScience Conference and the 7th Joint International PSU-UNS BioScience Conference 2018, Krabi, Thailand, September 17-18, 2018. (Poster presentation).
4. **Thongaram T** and Singtabut S. *In vitro* evaluation of selected probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Thai traditional fermented vegetable. Proceeding of the International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics – IPC 2016, Budapest, Hungary, June 21-23, 2016. (Poster presentation).
5. Nimchua T, **Thongaram T**, Uengwetwanit T, Pongpattanakitshote S, and Eurwilaichitr L. Metagenome-derived clones encoding novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite gut inhabiting microbes. Abstract of 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition. EXCO, Daegu, Republic of Korea. September 16-21, 2012. (Oral presentation).
6. **Thongaram T**, Miller MJ, and Chow J**.** Fermentation of prebiotics and human milk oligosaccharides by selected probiotics. ASM 2012 General Meeting, San Francisco, California, June 16-19, 2012. (Poster presentation).
7. Miller MJ, Chow J and, **Thongaram T**. Fermentation of prebiotics and human milk oligosaccharides by Bifidobacteria. FASEB Summer Research Conference on Probiotics, Intestinal Microbiota and the Host: Physiological and Clinical Implications, Carefree, Arizona, July, 2011. (Poster presentation).
8. Nimchua T, **Thongaram T**, Uengwetwanit T, Kanokrattana P, Champreda V, Pongpattanakitshote S, and Eurwilaichitr L. Isolation and functional characterization of novel genes encoding alkali-tolerant lignocellulose-degrading enzymes from metagenomic fosmid library of termite gut bacteria. Abstract of 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Prince of Songkla University, *Trang* Campus, Thailand, October 20–22, 2010. (Oral presentation).

9. **Thongaram T**, Hongoh Y, Kosono S, Ohkuma M, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, and Kudo T. Culture-based and culture-independent studies showed the gut of higher termites as a niche for alkaliphiles. Japan-Thailand International Cooperative Research, Bio-recycle Project, Japan Science and Technology Agency, RIKEN, Saitama, Japan, February, 2004. (Poster presentation).
10. **Thongaram T**, Hongoh Y, Kosono S, Ohkuma M, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, and Kudo T. Characterization of alkaliphilic bacteria from the gut of higher-termites in Thailand. Nihon University, Fujisawa, Kanakawa, Japan, April, 2003. (Oral presentation).
11. **Thongaram T**, Hongoh Y, Kosono S, Ohkuma M, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, and Kudo T. Isolation and characterization of alkaliphilic bacteria from the gut of higher-termites in Thailand. University of Tokushima, Tokushima, Japan, December, 2002. (Poster presentation).
12. **Thongaram T**, Mahakhant A, Ratanachot P, Kaya K, and Arunpairojana V. Control of toxic cyanobacteria by *Alcaligenes* sp. Proceeding of international conference on Asian Network on Microbial Research held at Chiang Mai Plaza Hotel, Chiang Mai, Thailand. Nov.29-Dec.1, 1999, TISTR, RIKEN, p.307-321.
13. Ratanachot P, Mahakhant A, **Thongaram T**, Kaya K, Watanabe MM, and Arunpairojana V. Factors affecting growth and toxin production of the toxic cyanobacterial strains, *Microcystis aeruginosa.* Proceeding of International Conference on Asian Network on Microbial Research held at Chiang Mai Plaza Hotel, Chiang Mai, Thailand. Nov.29-Dec.1, 1999, TISTR, RIKEN, p.336-350.
14. Mahakhant A, **Thongaram T**, Ratanachot P, Arunpairojana V, Sano T, Watanabe MM, and Kaya K. Controlling of toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* TISTR 8325 by *Cytophaga* sp. Proceeding of International Conference on Asian Network on Microbial Research, Gedjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia, Gedjah Mada University, The Institute of Physical and Chemical Research; Science and Technology Agency, Japan, Feb.23-25, 1998, p.432-440.

ตอนที่ 2 : ผลงานวิจัยที่ดำเนินการเสร็จแล้ว

ตอนที่ 2.1

เรื่องที่ 1

1. **ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน** “เอนไซม์ฟอกเยื่อกระดาษจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก (เอนบลีช)”

2. **ลักษณะโครงการ /ผลงาน** ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม

☐ เป็นหัวหน้า ✓ เป็นผู้ร่วม

3. **สาขาวิชา** วิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย

4. **ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย** ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 ถึงปี พ.ศ. 2551

5. **ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน**

✓ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)

✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

6. **การเผยแพร่ผลงานวิจัย**

✓ เผยแพร่แล้ว

✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์ ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

✓ ต่างประเทศ

Nimchua T, **Thongaram T**, Uengwetwanit T, Pongpattanakitshote S, and Eurwilaichitr L. 2012. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 462–469.

✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

✓ ต่างประเทศ

Nimchua T, **Thongaram T**, Uengwetwanit T, Pongpattanakitshote S, and Eurwilaichitr L. Metagenome-derived clones encoding novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite gut inhabiting microbes. The 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition. EXCO, Daegu, Republic of Korea. September 16-21, 2012. (Oral presentation).

เรื่องที่ 2

1. **ชื่อเรื่อง** การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์
2. **ลักษณะโครงการ /ผลงาน** ✓ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
   ☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม
3. **สาขาวิชา** (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
4. **จำนวนงบประมาณ** 50,000 บาท

   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึงปี พ.ศ. 2559
5. **ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน**

   ✓ ในประเทศ

   ☐ ภาควิชา ✓ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ✓ อื่นๆ (โปรดระบุ) ทุนส่วนตัว

   ☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

   ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

6. **การเผยแพร่ผลงานวิจัย**

   ✓ เผยแพร่แล้ว

   ✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

   ✓ ต่างประเทศ

   Thongaram T and Singtabut S. *In vitro* evaluation of selected probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Thai traditional fermented vegetable. Proceeding of the International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics –IPC 2016, Budapest, Hungary, June 21-23, 2016. (Poster presentation).

เรื่องที่ 3

1. **ชื่อเรื่อง** การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์
2. **ลักษณะโครงการ /ผลงาน** ✓ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
   ☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม
3. **สาขาวิชา** (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
4. **จำนวนงบประมาณ** 30,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึงปี พ.ศ. 2559

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

✓ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ✓ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ✓ อื่นๆ (โปรดระบุ) ทุนส่วนตัว

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

หากผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ข้างต้นเคยได้รับรางวัลโปรดกรอกส่วนที่ 2

ตอนที่ 2.2

เรื่องที่ 1 “เอนไซม์ฟอกเยื่อกระดาษจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก (เอนบลีช)”

1. **ชื่อรางวัล** รางวัลสภาวิจัยแห่งชาติ: รางวัลผลงานประดิษฐ์คิดค้น ประจำปี 2556
2. **หน่วยงานที่ให้รางวัล** สภาวิจัยแห่งชาติ
3. **ปี พ.ศ.ที่ได้รับรางวัล** 2556
4. **สาขาวิชาที่ได้รับรางวัล** วิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรม (รางวัลระดับดี)

ตอนที่ 3 ผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ที่<u>กำลังดำเนินการ</u> (กรุณากรอก 1 เรื่องต่อ 1 ส่วน)

เรื่องที่ 1

1. ชื่อเรื่อง “การศึกษาบทบาทและการจำแนกชนิดในระดับโมเลกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการใช้พรีไบโอติกส์เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงลูกสุกร”
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
   ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ✓ เป็นผู้ร่วม
3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
4. ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ถึงปี พ.ศ. 2561
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
   - ✓ ในประเทศ
     - ✓ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ✓ อื่นๆ (โปรดระบุ) ทุนส่วนตัว
     - ✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
   - ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

เรื่องที่ 2

1. ชื่อเรื่อง “Culture-independent discovery of bioactive compounds from soil metagenomes”
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
   ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ✓ เป็นผู้ร่วม
3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
4. ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ถึงปี พ.ศ. 2561
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
   - ✓ ในประเทศ
     - ✓ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ✓ อื่นๆ (โปรดระบุ) ทุนส่วนตัว
     - ✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
   - ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

ผู้ร่วมวิจัย 2

ตอนที่ 1 : ข้อมูลทั่วไป

1. ชื่อ - สกุล

(ภาษาไทย) นางสาวอดิศรี เจริญพานิช

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Adisri Charoenpanich

2. วัน เดือน ปีเกิด 30 กรกฎาคม 2526 (เพื่อเก็บในฐานข้อมูลนักวิจัย)

3. รหัสประจำตัวผู้วิจัย (ถ้ามี).....

4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ☐ ข้าราชการ √ พนักงานมหาวิทยาลัย

√ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

5. สถานที่ทำงาน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์ 092-327-9607

e-mail address: charoenpanich_a@silpakorn.edu

ที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 291/43 หมู่ 5 ต.โพรงมะเดื่อ อ.เมือง จ.นครปฐม 7300

โทรศัพท์มือถือ 092-327-9607

6. ประวัติการศึกษา

Ph.D. (Biomedical Engineering) University of North Carolina at Chapel hill, and North Carolina State University, USA (2013)

M.Sc. (Biomedical Engineering) University of North Carolina at Chapel hill, and North Carolina State University, USA (2010)

วท.บ. (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยศิลปากร (2549)

7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท (ปีที่ดำเนินการ 2007-2010)

ชื่อเรื่อง Microarray analysis of human adipose-derived adult stem cells undergoing osteogenic differentiation in the presence and absence of 10% uniaxial cyclic tensile strain

- ระดับปริญญาเอก (ปีที่ดำเนินการ 2010-2013)

ชื่อเรื่อง Analyses of Human Adipose Derived Stem Cells and Human Mesenchymal Stem Cells for Functional Tissue Engineering using Biomimetic Physical Stimuli

8. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ) โปรดระบุแขนงวิชา และแนวเรื่องย่อยด้วย

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา เซลล์ต้นกำเนิดและวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ตอนที่ 2 : ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ทางด้านศิลปะและการออกแบบที่<u>ดำเนินการเสร็จแล้ว</u> (กรุณาให้ข้อมูลทุกเรื่องที่ท่านทำโดยกรอก 1 เรื่องต่อ 1 แผ่น)

<u>ตอนที่ 2.1</u>

1. ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน “ผลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทและคอลลาเจนเปปไทด์ต่อการเจริญเติบโต และการเจริญ พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก ของสเต็มเซลล์จากไขกระดูก”

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม √ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ.....150,000..... บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2557.... ถึงปี พ.ศ.....2559.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

√ ในประเทศ

☐ ภาควิชา √ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

√ เผยแพร่แล้ว

☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

◊ ในประเทศ

◊ ต่างประเทศ: **Charoenpanich, A.**, Gumlungpat, N., and Sinlapavilawan, P. (2016) Human mesenchymal stem cells recognize extracellular collagen as a sequence specific peptide or as amino acid substrates? The 10th World Biomaterials Congress (WBC), Montreal, Canada May 17-22, 2016.

ตอนที่ 2.2

1. ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน "Highly Cu^{2+}-sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: Utilizations in batch, flow analysis and living cell imaging"

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า √ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

4. จำนวนงบประมาณ..... บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2558.... ถึงปี พ.ศ.....2559.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

☐ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

√ เผยแพร่แล้ว

□ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

◊ ต่างประเทศ Tachapermpon, Y., Chaneam, S., **Charoenpanich, A.**, Sirirak, J., and Wanichacheva, N. (2016). Highly Cu 2+-sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: Utilizations in batch, flow analysis and living cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *241*, 868-878. *Impact factor (2015)* ***4.758***

ตอนที่ 3 ผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ที่<u>กำลังดำเนินการ</u> (กรุณากรอก 1 เรื่องต่อ 1 ส่วน)

เรื่องที่.....1.....

1. ชื่อเรื่อง: “The effect of betulinic acid on cell proliferation, osteogenic differentiation and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.”

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม √ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ.....700,000..... บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2559.... ถึงปี พ.ศ....2562.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

√ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

√ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) ทุนวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

เรื่องที่.....2.....

1. ชื่อเรื่อง: “ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)”

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม √ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ.....150,000..... บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2559.... ถึงปี พ.ศ....2560.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

√ ในประเทศ

☐ ภาควิชา √ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

เรื่องที่.....3.....

1. ชื่อเรื่อง: “ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผลอ่อนมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเซลล์มะเร็งตับ มะเร็งปากมดลูก และมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์”

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า √ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

4. จำนวนงบประมาณ.....180,000..... บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2559.... ถึงปี พ.ศ....2560.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

√ ในประเทศ

☐ ภาควิชา √ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

ผลงานทางวิชาการ

- Kraithong, S., Sangsuwan, R., Worawannotai, N., Sirirak, J., **Charoenpanich, A**., Thamyongkit, P. and Wanichachewa, N., 2018. Triple detection modes for Hg 2+ sensing based on a NBD-fluorescent and colorimetric sensor and its potential in cell imaging. *New Journal of Chemistry*.

- Kaewnok, N., Petdum, A., Sirirak, J., **Charoenpanich, A**., Panchan, W., Sahasithiwat, S. Wanichacheva, N. (2018). Novel cu 2 -specific “Turn-ON” fluorescent probe based on [5]

helicene with very large stokes shift and its potential application in living cells. New Journal of Chemistry, 42(7), 5540-5547.

- Sakunkaewkasem, S., Petdum, A., Panchan, W., Sirirak, J., **Charoenpanich, A**., Sooksimuang, T., & Wanichacheva, N. (2018). Dual-analyte fluorescent sensor based on [5] helicene derivative with super large stokes shift for the selective determinations of Cu2 or Zn2 in buffer solutions and its application in living cell. ACS Sensors, 3 (5), 1016–1023

- Tachapermpon, Y., Chaneam, S., **Charoenpanich, A.,** Sirirak, J., Wanichacheva, N. (2017). "Highly Cu 2+-sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: Utilizations in batch, flow analysis and living cell imaging." Sensors and Actuators B: Chemical, 241: 868-878. (ISI)

- Tachapermpon, Y., Thavornpradit, S., **Charoenpanich, A.,** Sirirak, J., Burgess, K., Wanichacheva, N. (2017). "Near-infrared aza-BODIPY fluorescent probe for selective cu 2 detection

and its potential in living cell imaging." Dalton Transactions, 46(46), 16251-16256.

- **Charoenpanich, A.**, Bodle, J., & Loboa, E. (2017). The role of cyclic tensile strain on osteogenesis and angiogenesis in human mesenchymal stem/stromal cells. *The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells*, 208-221.

- **Charoenpanich, A.**, Sangthong, T., Gumlungpat, N., and Vejaratpimol, R. (2016) A Comparative Cytotoxicity Analysis of Cadmium Chloride on Three Mammalian Cell Lines: L929, BHK21, and HepG2 with Trypan Blue, Neutral Red, MTT, Clonogenic, and Micronucleus Assays. The 2nd Environment and Natural Resource International Conference, Phra Nakhon Si Ayutthaya, November 16-17, 2016

- **Charoenpanich, A.** (2016) Induced cell death in mesenchymal stem cells and cancer cell lines by Thai herbal extracts. Cell death 2016: New Concepts in Cell Death Research: From Basic Mechanisms to Clinical Opportunities, Girona, Spain, July 3-8, 2016

- **Charoenpanich, A.**, Gumlungpat, N., and Sinlapavilawan, P. (2016) Human mesenchymal stem cells recognize extracellular collagen as a sequence specific peptide or as amino acid substrates?. 10th World Biomaterials Congress (WBC), Montreal, Canada May 17-22, 2016.

- **Charoenpanich, A**., Wall, M. E., Tucker, C. J., Andrews, D. M., Lalush, D. S., Dirschl, D. R., & Loboa, E. G. (.(2 0 1 3 Cyclic Tensile Strain Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Mesenchymal Stem Cells from Osteoporotic Donors. Tissue Eng Part A. 2014 Jan;-67:(2-1) 20 ..78

-**Charoenpanich, A**., Wall, M. E., Tucker, C. J., Andrews, D. M. K., Lalush, D. S., & Loboa, E. G. (.(2011Microarray analysis of human adipose-derived stem cells in three-dimensional collagen culture: Osteogenesis inhibits bone morphogenic protein and wnt signaling pathways, and cyclic tensile strain causes upregulation of proinflammatory cytokine regulators and angiogenic factors. Tissue Engineering Part A, Nov;27-2615:(22-21)17

- Cha-um, S., **Charoenpanich, A.**, Roytrakul, S., & Kirdmanee, C. (2009). Sugar accumulation, photosynthesis and growth of two indica rice varieties in response to salt stress. Acta Physiologiae Plantarum, 31(3), 477-486