



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยเพื่อค้นหาสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการสกัดอินนูลิน
เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารสัตว์

Screening of Potential Thai Medicinal Plants for Inulin as Feed Additive

โดย ดร. วิณา นุกุลการ และคณะ

มีนาคม พ.ศ. 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยเพื่อค้นหาสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการสกัดอินนูลิน
เพื่อใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์
Screening of Potential Thai Medicinal Plants for Inulin as Feed Additive

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. อ.ดร. วิณา นุญการ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3. นางสาวศิริขวัญ ทิมรัตน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคลากรที่ให้การสนับสนุนและให้การอนุเคราะห์ในการวิจัยครั้งนี้ดังต่อไปนี้

1. หน่วยวิจัยกลาง ภาควิชาเกษตรอินทรีย์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกด้านการใช้เครื่องมือที่จำเป็นต่อการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่บุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ
2. ศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญประภัสร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ในการวิจัย และ ศาสตราจารย์ ดร. วงศ์สถิตย์ ชั่วกุล ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชต่างๆ
3. คุณเบญจมาศ แสงไฟ ในการทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัยในการวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
Executive summary	3
วัตถุประสงค์	5
ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	5
วัสดุและวิธีวิจัย	10
ตัวอย่างพืช	10
ขั้นตอนการวิจัย	10
การศึกษาวิธีการตรวจสอบสารอินนูลินในเบื้องต้นที่มีอยู่ในพืช	10
การเตรียมสารสกัดอินนูลินจากพืช	11
ศึกษาการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากพืชสมุนไพร	11
การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยปฏิกิริยาการเกิดสี	11
การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วย HPLC	13
ทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินต่อการเจริญของเชื้อ	
<i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i>	13
ทดสอบผลของสารมาตรฐานอินนูลินต่อการเจริญ	
ของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> สายพันธุ์ต่างๆ	14
ทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรต่อการเจริญ	
ของเชื้อ <i>Lactobacilli</i>	15
ทดสอบผลของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i> ที่เพาะเลี้ยง	
ในอาหารผสมสารสกัดอินนูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค	18
การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น	18
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Agar well diffusion method	18
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Microtiter plate assay	19

สารบัญ (ต่อ)

การศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินูลิน	
และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดที่เหมาะสมจากพืชสมุนไพร	19
ศึกษาผลของอัตราส่วนน้ำต่อปริมาณพืชที่นำมาสกัด	19
ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการช่วยสกัด	20
ศึกษาผลของวัสดุกรอง	20
ผลการวิจัย	22
ผลการศึกษาวิธีการตรวจสอบสารอินูลินในเบื้องต้นที่มีอยู่ในพืช	22
ผลการศึกษาการตรวจสอบอินูลินในเบื้องต้นโดย	
ใช้วิธีการส่องกล้องจุลทรรศน์	22
ผลการศึกษาการตรวจสอบอินูลินในเบื้องต้นโดยใช้วิธี TLC	23
ผลการศึกษาการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินูลินในสารสกัดจากพืชสมุนไพร	24
ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินูลินโดยปฏิกิริยาการเกิดสี	24
ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินูลินด้วยวิธี HPLC	28
ผลของสารสกัดอินูลินต่อการเจริญของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i>	32
ผลของอินูลินมาตรฐานต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> สายพันธุ์ต่างๆ	32
ผลของสารสกัดอินูลินจากสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lactobacilli</i>	45
ผลของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม	
สารสกัดอินูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค	54
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Agar well diffusion method	54
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Microtiter plate assay	56
การศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินูลิน	
และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดที่เหมาะสมจากรากสามสิบ	61
ผลของอัตราส่วนน้ำต่อปริมาณพืชที่นำมาสกัด	61
ผลของอุณหภูมิต่อการช่วยสกัด	61
ผลของวัสดุกรอง	62
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	63
การศึกษาวิธีการตรวจสอบสารอินูลินในเบื้องต้นที่มีอยู่ในพืช	63
การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินูลินในสารสกัดจากพืช	63

สารบัญ (ต่อ)

การศึกษาผลของสารสกัดอินูลินต่อการเจริญของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i>	64
การศึกษาผลของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสมสารสกัดอินูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค	64
การศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินูลิน และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดที่เหมาะสมจากรากสามสิบ	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	68

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ปริมาณ Inulin และ Oligofructose ในอาหารชนิดต่างๆ	6
2. ผลการตรวจสอบอินนูลินด้วยกล้องจุลทรรศน์และ % yield ของพืชทั้ง 17 ชนิด	22
3. ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในสารสกัดจากพืช	25
4. ปริมาณของ reducing sugar ในสารสกัดจากพืช	26
5. ปริมาณของอินนูลินในสารสกัดจากพืช	27
6. ปริมาณ % yield ของอินนูลินในสารสกัดจากพืช	28
7. Peak area ของ calibration work solution	29
8. ค่า Repeatability ของสารสกัดรากสามสิบ	30
9. ผลวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในพืชแต่ละชนิด	31
10. การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> ในการเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศ	33
11. การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> ในการเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ	35
12. การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	38
13. การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> โดยการนับจำนวน colonies ของเชื้อเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	41
14. ค่า pH เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	43
15. การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> เมื่อมีการเติมสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุน	46
16. ค่า optical density ของเชื้อ <i>Lactobacilli</i> เมื่อมีการปรับสูตรอาหารเพาะเลี้ยง	48
17. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>E. coli</i> ของเชื้อ <i>L. plantarum</i> ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	57
18. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>E. coli</i> ของเชื้อ <i>B. longum</i> ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	58
19. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ของเชื้อ <i>L. plantarum</i> ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	59
20. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ของเชื้อ <i>B. longum</i> ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	60
21. ปริมาณอินนูลินหลังการใช้อัตราส่วนน้ำต่างๆ	61
22. ปริมาณอินนูลินหลังการใช้อุณหภูมิในการช่วยสกัด	62
23. ปริมาณอินนูลินหลังการใช้อัตราส่วนต่างๆ	62
24. เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	69

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. การกระจายตัวของแบคทีเรีย เปรียบเทียบหลังได้รับอาหารปกติและได้รับอินนูลินเสริม	7
2. เซลล์ของแก่นตะวัน ก่อน (A) และหลัง (B) ย้อมด้วย α -naphthol และ sulfuric acid	23
3. TLC pattern ของสารสกัดจากพืชก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อินนูลินเนส	23
4. Calibration curve ของน้ำตาลฟรุกโตสมาตรฐาน	29
5. โครมาโตแกรมสารสกัดจากรากสามสิบก่อน (A) และหลัง (B) spike ด้วยน้ำตาลฟรุกโตส มาตรฐาน	30
6. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบในสภาวะไม่มีอากาศ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ inulin	34
7. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบในสภาวะมีอากาศ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ inulin	37
8. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้แหล่ง Carbon source ต่างๆ โดยวัดค่า OD	40
9. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ใช้แหล่ง Carbon Source ต่างๆ โดยการนับจำนวน colonies ของเชื้อ	42
10. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้แหล่ง Carbon source ต่างๆ โดยวัดค่า pH	44
11. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium เปรียบเทียบ เมื่อเติมสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุน	47
12. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ระดับ ความเข้มข้นของอินนูลินต่างๆ เมื่อมีการปรับสูตรอาหารเพาะเลี้ยง	50
13. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยใช้ Inulin standard เป็น Carbon Source	52
14. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเอง โดยใช้ สารสกัดจากรากสามสิบ เป็น Carbon Source	53
15. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> และ <i>Bifidobacterium longum</i>	55
16. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ <i>S. aureus</i> ของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> และ <i>Bifidobacterium longum</i>	56
17. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>E. coli</i> ของเชื้อ <i>L. plantarum</i> ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	57

สารบัญรูป (ต่อ)

18. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>E. coli</i> ของเชื้อ <i>B. longum</i> ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	58
19. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ของเชื้อ <i>L. plantarum</i> ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	59
20. ฤทธิ์การต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ของเชื้อ <i>B. longum</i> ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด	60
21. เซลล์พืชหลังจากย้อมด้วย naphthol และกรดซัลฟูริก	70
22. โครมาโตแกรมของสารสกัดสามสิบแสดงถึง Repeatability ของระบบ	74
23. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดฝรั่ง	75
24. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกระเทียม	76
25. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดเผือก	77
26. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดสาเก	78
27. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดมันแกว	79
28. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดหัว	80
29. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกระเจี๊ยบ	81
30. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดขุ่น	82
31. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดหอมหัวใหญ่	83
32. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดหอมแดง	84
33. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกล้วย	85
34. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกล้วย	86
35. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดมันมือเสือ	87
36. ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดมันฝรั่ง	88
37. โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุคโตสของสารสกัดสามสิบที่อัตราส่วนน้ำต่างๆ	89
38. โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุคโตสของสารสกัดสามสิบที่ sonicate ระยะเวลาต่างๆ	91
39. โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุคโตสของสารสกัดสามสิบผ่านวัสดุกรองต่างๆ	93

โครงการ การวิจัยเพื่อค้นหาสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการสกัดอินนูลิน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารสัตว์

Screening of Potential Thai Medicinal Plants for Inulin as Feed Additive

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้นเพื่อค้นหาพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการสกัดอินนูลินเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารสัตว์ โดยการทำงานวิจัยในครั้งนี้ครอบคลุมตั้งแต่การเก็บตัวอย่างพืช พัฒนาวิธีคัดกรองพืชในเบื้องต้น พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินที่มีในพืช การทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินจากพืชในแง่ของการเป็นสารพรีไบโอติก รวมทั้งการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดจากพืช เพื่อให้ได้ปริมาณอินนูลินที่ดีที่สุด ซึ่งข้อมูลที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลในเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกพืชที่มีศักยภาพในประเทศไทยในการเป็นแหล่งของสารพรีไบโอติกอินนูลิน ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรต่อไป

ในการวิจัยนี้ได้ทำการคัดกรองพืชสมุนไพร 17 ชนิดในเบื้องต้นด้วยเทคนิคการตรวจลักษณะสารอินนูลินด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมเซลล์พืชด้วย α -naphthol ในเอทานอลแล้วตามด้วยกรดซัลฟูริก และการใช้เทคนิค TLC ในการตรวจสอบน้ำตาลฟรุกโตสในสารสกัดพืชก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส โดยใช้ silica gel GF254 เป็น stationary phase และใช้ acetone:water (9:1) เป็น mobile phase จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินที่มีในสารสกัดจากพืชโดยใช้เทคนิค HPLC-RI เปรียบเทียบกับการใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี พบว่ามีพืชที่นำมาทดสอบมีอินนูลินอยู่ถึง 13 ชนิด โดยสารสกัดหยาบจากสามสิบให้ปริมาณอินนูลินที่สูงที่สุดถึง 5.50% yield เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบจากแก่นตะวันที่ให้อินนูลิน 4.98% yield และเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อโปรไบโอติกและเชื้อก่อโรค พบพืชที่มีศักยภาพในแง่ของการเป็นพรีไบโอติกอยู่หลายชนิด เช่น สามสิบ แก่นตะวัน มันแกว ฝรั่ง หอมหัวใหญ่ หอมแดง เป็นต้น นอกจากนี้จากการวิจัยพบว่าผลของอัตราส่วนตัวทำละลายต่อพืช การใช้อุณหภูมิต่ำ และวัสดุกรองต่างๆ มีผลต่อปริมาณอินนูลินในการเตรียมสารสกัดจากพืช โดยสารสกัดอินนูลินจากสามสิบจะมีปริมาณอินนูลินมากเมื่อใช้อัตราส่วนตัวทำละลายต่อพืชเป็น 1:2 ใช้อุณหภูมิต่ำช่วยเป็นเวลา 15 นาที และการกรองผ่านสำลีให้ปริมาณอินนูลินดีที่สุด ขณะที่สารสกัดจะมีลักษณะดีและใส เมื่อกรองผ่านผงคาร์บอน

Abstract

This study aimed to preliminarily search for the inulin in Thai medicinal plants in order to provide a source of inulin as feed additive. The study covered sampling and collecting plants, developing criteria for plant screening, developing analytical procedures to determine amount of inulin in plants, testing of extracted inulin for prebiotics activities, and finding optimal good-yielding condition for extraction. The data from this study would provide a guide for selecting potential Thai medicinal plants as a source of prebiotics inulin, which would be valuable in agriculture and industry development.

Seventeen herbal plants were screened for the presence of inulin by microscopic α -naphthol-sulfuric acid staining. The TLC technique was used to examine a fructose sugar in extracts before and after hydrolysis with inulinase. The silica gel GF254 was used as stationary phase while acetone:water (9:1) was used as mobile phase. The amount of inulin in extracts was quantitatively determined by HPLC-RI and colorimetric method. The result showed that thirteen plants containing inulin. Crude extract from *Asparagus racemosus* Willd. had 5.50% yield of inulin, whereas *Hilanthus tuberosus* had 4.98% yield of inulin. The potential prebiotics activity was shown in a number of studied plants, such as *Asparagus racemosus* Willd, *Hilanthus tuberosu*, *Ipomoea batatas* L., *Psidium guajava*, *Allium cepa* L. cv group cepa, and *Allium cepa* L. cv group aggregatum. Interestingly, ratio of extract solvent to dry plants, ultrasound-assisted extraction, and filter material had effects on the amount of extracted inulin. For example, the highest amounts of inulin in *Asparagus racemosus* Willd. crude extract was obtained by using 1:2 of solvent and plants, ultrasonication for 15 minutes, and filtering extracts through cotton wool. Although, the appearance of crude extract was good and clear when the extract was filter through carbon.

Executive Summary

ปัจจุบันการนำพืชสมุนไพรและสารสกัดจากพืชสมุนไพรผสมเสริมในอาหารสำหรับสัตว์กำลังได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากแนวความคิดที่ว่าการใช้สมุนไพรนั้นย่อมปลอดภัยมากกว่าการใช้สารสังเคราะห์เคมี นอกจากนี้แล้ว สมุนไพรยังมีประโยชน์ในแง่การช่วยลดต้นทุนในด้านการผลิตอีกด้วย มีการใช้สมุนไพรผสมสำหรับอาหารสัตว์เพื่อผลในหลายๆ ด้าน อาทิเช่น การใช้สมุนไพรเพื่อแทนที่ยาปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ เพื่อเพิ่มน้ำหนักของสัตว์ เพื่อเพิ่มผลผลิตไข่ เพื่อรักษาโรคและลดคลอเลสเทอรอล เหล่านี้เป็นต้น อินนูลินจัดเป็นสารสำคัญจากพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ อินนูลินเป็นคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของสารจำพวกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลฟรุคโตสต่อกันเป็นสายยาวและมีน้ำตาลกลูโคสปิดหัวท้าย ช่วยในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันและการสังเคราะห์วิตามินบี ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง เบาหวาน หัวใจ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ในลำไส้ใหญ่ของสัตว์ และช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Coliform* และ *Clostridium* อินนูลินจึงจัดเป็นสารอาหาร prebiotic ที่ดี มีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารและระบบภูมิคุ้มกัน เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ (feed additive) เพื่อทดแทนการใช้และการนำเข้ายาปฏิชีวนะ อินนูลินที่มีการศึกษาและนำมาใช้ส่วนใหญ่แล้วได้มาจากการสังเคราะห์จากน้ำตาลซูโครสหรือจากพืชบางชนิด เช่น ส่วนรากของต้นชิโครี (chicory) ส่วนหัวของต้นแก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) สำหรับในประเทศไทย ยังไม่พบรายงานการวิจัยการศึกษาจากพืชสมุนไพรอื่นๆ ในเชิงการสกัดสารอินนูลินเพื่อใช้สำหรับเป็นวัตถุเติมในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

โครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะสามารถคัดกรองหาพืชสมุนไพรในประเทศที่มีศักยภาพในการสกัดสารอินนูลิน ด้วยวิธีการตรวจสอบสารอินนูลินในเบื้องต้นที่ง่ายและสะดวก วิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินนูลินในพืชที่เลือกแต่ละชนิด ทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินที่ได้จากพืชที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อลำไส้จำพวก *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* และพัฒนาวิธีการสกัดสารอินนูลินแบบหยาบสำหรับใช้ในรูปแบบอุตสาหกรรมต่อไป เพื่อให้เป็นอีกหนึ่งแนวทางเลือกในการใช้สมุนไพรทดแทนในการผลิตสัตว์ ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำการคัดกรองพืชสมุนไพรทั้งหมด 17 ชนิดในเบื้องต้น ได้แก่ แก่นตะวัน (*Hilanthus tuberosus*; Asteraceae) กระเทียม (*Allium sativum*; Alliaceae) กระเจี๊ยบ (*Trapa bicornis* L.; Trapaceae) กล้วย (*Musa sapientum*; Musaceae) กระทือ (*Zingiber amaricans*; Zingiberaceae) กลอย (*Dioscorea hispida*; Dioscoreaceae) ขนุน (*Artocarpus heterphyllus* Lam; Moraceae) มันแกว (*Ipomoea batatas* L.; Convolvulaceae) มันมือเสือ (*Dioscorea esculenta*; Dioscoreaceae) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*; Solanaceae)

เผือก (*Colocasia esculenta*; Araceae) ฝรั่ง (*Psidium guajava*; Myrtaceae) หอมแดง (*Allium cepa* L. cv group aggregatum; Alliaceae) หอมหัวใหญ่ (*Allium cepa* L. cv group cepa; Alliaceae) แห้ว (*Cyperus tuberosus*; Cyperaceae) สามสิบ (*Asparagus racemosus*; Asparagaceae) และสาคุ (*Maranta arundinacea* L.; Marantaceae) โดยใช้เทคนิคการตรวจลักษณะสารอินนูลินด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมเซลล์พืชด้วย α -naphthol ในเอทานอลแล้วตามด้วยกรดซัลฟูริกเพื่อดูผลึกสีม่วงอมแดง และการใช้เทคนิค TLC ในการตรวจสอบน้ำตาลฟรุกโตสในสารสกัดพืชก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส โดยใช้ silica gel GF254 เป็น stationary phase และใช้ acetone:water (9:1) เป็น mobile phase ทำการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินที่มีในสารสกัดจากพืชโดยใช้เทคนิค HPLC-RI โดยใช้คอลัมน์ Hypersil APS2-C18 ซึ่งเป็นคอลัมน์ชนิด reverse phase มีระบบเฟสเคลื่อนที่แบบ isocratic ของ acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 25:75 อัตราเร็วในการไหลของตัวพาคือ 0.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย refractive index เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสในสารสกัดพืชก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส จากนั้นคำนวณหาปริมาณอินนูลินที่อยู่ในสารสกัดพืช เปรียบเทียบกับการใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีโดยทำการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณ reducing sugar แล้วหาผลต่างคำนวณเทียบปริมาณอินนูลิน ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าพืชที่นำมาทดสอบมีอินนูลินอยู่ถึง 13 ชนิด โดยสารสกัดหยาบจากสามสิบให้ปริมาณอินนูลินที่สูงที่สุดถึง 5.50% ขณะที่สารสกัดหยาบจากแก่นตะวันให้อินนูลิน 4.98% และเมื่อดูผลของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* และผลของสารสกัดเมื่อผสมในอาหารเพาะเลี้ยงของ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ต่อแบคทีเรียก่อโรค พบพืชที่มีศักยภาพในแง่ของการเป็นโปรไบโอติกอยู่หลายชนิด เช่น สามสิบ แก่นตะวัน มันแกว ฝรั่ง หอมหัวใหญ่ หอมแดง เป็นต้น ซึ่งสารสกัดจากสามสิบจะให้ผลที่ดีทั้งในแง่ของปริมาณอินนูลินและผลต่อการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้จากการวิจัยพบว่าผลของอัตราส่วนตัวทำละลายต่อพืช การใช้อุณหภูมิต่ำ และวัสดุกรองต่างๆ มีผลต่อปริมาณอินนูลินในการเตรียมสารสกัดจากพืช โดยสารสกัดอินนูลินจากสามสิบจะมีปริมาณอินนูลินมากเมื่อใช้อัตราส่วนตัวทำละลายต่อพืชเป็น 1:2 ใช้อุณหภูมิต่ำช่วยเป็นเวลา 15 นาที และการกรองผ่านสำลีให้ปริมาณอินนูลินดีที่สุด ขณะที่สารสกัดที่กรองผ่านผงคาร์บอนจะมีลักษณะดีและใส

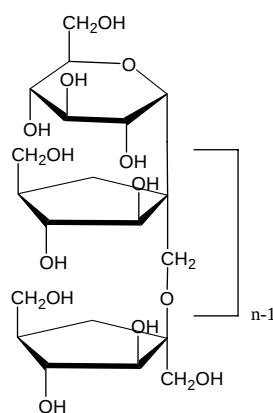
จากผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการนำพืชในประเทศมาเตรียมสารสกัดหยาบอินนูลินเพื่อใช้ประโยชน์ต่างๆ รวมถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์ ซึ่งอาจนำมาใช้สำหรับทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ลดผลข้างเคียงและการนำเข้าของยาปฏิชีวนะ และช่วยส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์คุ้มค่า

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองหาพืชสมุนไพรในประเทศที่มีศักยภาพ โดยวิธีการตรวจสอบสารอินนูลินในเบื้องต้นและวิเคราะห์ปริมาณเปรียบเทียบ
2. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินจากพืชสมุนไพรที่เลือกในแง่ของการเป็นสารพรีไบโอติก
3. เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารอินนูลินแบบหยาบจากพืชที่เลือกแต่ละชนิด สำหรับพัฒนาใช้ในรูปแบบอุตสาหกรรม

ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

อินนูลินเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่พืชเก็บสะสมอยู่ในรูปของ fructan-type carbohydrate โมเลกุลของอินนูลินประกอบด้วย fructosyl unit ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า (2,1) ดังรูป ซึ่งอาจจะปรากฏ side chain ซึ่งเป็น fructosyl unit ในบางตำแหน่งโดยเชื่อมด้วยพันธะเบต้า (2,6) อินนูลินที่มาจากพืชส่วนใหญ่ตรงปลายสายยาวมักปรากฏส่วนของ glucosyl unit ดังนั้นสูตรโมเลกุลทั่วไปของอินนูลินจึงแสดงด้วยGF_n หรือ F_m โดยที่ G หมายถึงส่วนปลายของ glucosyl unit และ F หมายถึง fructosyl unit โดยที่ n และ m แสดงถึงจำนวนของ fructosyl unit ที่เชื่อมด้วยพันธะเบต้า (2,1) และ/หรือ พันธะเบต้า (2,6)



โครงสร้างอินนูลิน

ตัวเลขของ $n+1$ จะแสดงถึงค่าของ degree of polymerization (DP) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงจำนวนของ saccharide unit ทั้งหมดในโมเลกุลของอินนูลิน ค่า DP จะบอกถึงคุณสมบัติในการละลาย การดูดซึมของอินนูลิน และโดยทั่วไปแล้วอินนูลินที่ได้จากพืชมักจะมีค่า DP ในช่วง 2 ถึง 100 ขณะที่อินนูลินที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดมีค่า DP ในช่วงสูงถึง 115,000 สำหรับค่า DP ของพืชที่มีช่วงกว้างนั้นเพราะมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของพืช การปลูกและการเก็บเกี่ยว รวมทั้งขั้นตอนการสกัดสาร โดยอินนูลินที่มีสายยาวจะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้น้อยกว่า อินนูลินที่มีค่า $DP < 10$ จะเรียกว่า

เป็นพวกอินนูลิโอดีโกลิแซคคาไรด์ (inulo-oligosaccharide) หรือ ฟรุคโตโอลิโกลิแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) หรือบางครั้งจัดให้อยู่ในประเภทอินนูลินสายสั้น ซึ่งอินนูลินที่มีทางการค้าทั่วไป เช่น ที่ได้จากรากชิโครีและหัวต้นแก่ตะวันที่จะมีค่า DP อยู่ในช่วง 6-10

อินนูลินที่ใช้ทางอุตสาหกรรมได้มาจากพืช ซึ่งส่วนใหญ่แล้วสกัดจากรากของต้นชิโครี แต่มีบ้างที่ได้จากส่วนหัวของต้นเจรูซาเล็มอาร์ติโช๊คหรือแก่ตะวัน (*Helianthus tuberosus*) หรืออาจมาจากส่วนหัวของต้น blue agave ตัวอย่างอินนูลินที่มีทางการค้า เช่น Raftiline[®] และ Fibruline[®]

อินนูลินมีรายงานการวิจัยว่าพบในพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่มักอยู่ในวงศ์ *Asteraceae*, *Graminae*, *Compositae* เช่น dahlia (*Dahlia variabilis*), Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), chicory (*Cichorium intybus*), dandelion (*Taraxacum officinale*) นอกจากนี้ยังพบได้ใน หัวหอม, กระเทียม, กัลวย, ข้าวสาลี, ข้าวไรย์, ข้าวบาเลย์ โดยแต่ละชนิดจะมีปริมาณของอินนูลินและโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) ซึ่งได้จากการย่อย (hydrolyse) อินนูลิน แตกต่างกันไป ดังตัวอย่างในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณ Inulin และ Oligofructose ในอาหารชนิดต่างๆ¹

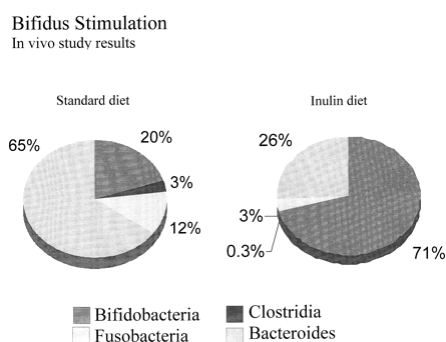
	ปริมาณ Inulin (%)	ปริมาณ Oligofructose (%)
หัวหอม (Onion)	2 - 6	2 - 6
เจรูซาเล็ม อาร์ติโช๊ค (Jerusalem artichoke)	16 - 20	16 - 20
ชิโครี (Chicory)	15 - 20	5 - 10
แอสปารากัส (Asparagus)	1 - 30	1 - 20
ต้นกระเทียม (Leek)	3 - 10	2-5
กระเทียม (Garlic)	9-16	3-6
อาร์ติโช๊ค (Artichoke)	3 - 10	<1
กล้วย (Banana)	0.3 - 0.7	0.3 - 0.7
ข้าวสาลี (Wheat)	1 - 4	1 - 4
ข้าวไรย์ (Rye)	0.5 - 1	0.5 - 1
ข้าวบาเลย์ (Barley)	0.5 - 1.5	0.5 - 1.5

สำหรับประโยชน์ของอินนูลินนั้น ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้อินนูลินเพื่อเป็นสารให้พลังงานต่ำ (low-calorie) เนื่องจากอินนูลินให้แคลอรีต่ำและมีความหวานน้อย จึงใช้ผสมบางส่วนหรือทดแทนน้ำตาล นอกจากนี้อินนูลินยังไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหารจึงไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด จึงมีการ

นำมาใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ และอาจนำมาผลิตเป็นสารอาหารลดความอ้วนได้อีกด้วย นอกจากนี้แล้วอินนูลินยังใช้ผสมกับอาหารเพื่อช่วยให้ลักษณะเนื้อดีขึ้น รวมทั้งอาจใช้เพื่อทดแทนไขมันเนื่องจากอินนูลินสามารถขึ้นรูปเจลเมื่อผสมกับน้ำได้ โดยให้เนื้อที่คงตัว เนียน และเป็นลักษณะครีม ให้รสชาติที่ดีอีกด้วย อินนูลินยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเป็นอาหารเส้นใยได้ (dietary fiber) โดยทำให้ระบบขับถ่ายดีขึ้น นอกจากนี้ ยังมีผลในการลดคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์เมื่อเทียบกับการยาหลอก² อินนูลินมีรายงานการทดลองในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง มีการจดสิทธิบัตรหลายฉบับเกี่ยวกับการการใช้ประโยชน์จากอินนูลินในอาหาร³ เช่นในการทำชอคโกเลต ในเครื่องดื่ม รวมทั้งการผสมอินนูลินเพื่อเพิ่มรสชาติในเครื่องปรุง

จากรายงานการวิจัยพบว่า อินนูลินมีประโยชน์ในแง่การดูดซึมแร่ธาตุ มีผลช่วยลดไขมันในเลือด โดยมีรายงานการให้สารสกัดจากรากชิโครี (ซึ่งเป็นแหล่งผลิตอินนูลิน) และอินนูลินกับหนู เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชิโครี และหนูที่ได้รับอินนูลิน มีปริมาณ HDL เพิ่มขึ้นและมีปริมาณ LDL ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับ อินนูลิน 5% ยังมีน้ำหนักกระพุ้งลำไส้ใหญ่ (cecal) มากกว่ากลุ่มควบคุม และหนูทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชิโครี และ อินนูลิน 5% ยังมีปริมาณกรด propionic สูงกว่าด้วย

นอกจากนี้แล้ว ยังมีรายงานการวิจัยที่ยืนยันว่าอินนูลินมีผลทางด้าน bifidogenic effect หรือ prebiotic กล่าวคืออินนูลินสามารถกระตุ้นการเจริญและเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ได้ เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ขณะเดียวกันก็มีผลลดจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ที่ก่อโรคได้ เช่น *Clostridia*, *Bacteroides* และ *Fusobacteria* อย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการกระจายตัวของแบคทีเรีย เปรียบเทียบหลังได้รับอาหารปกติและได้รับอินนูลินเสริม⁴

เนื่องจาก fructo-oligosaccharide (FOS) และอินนูลิน จะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและในลำไส้เล็กของมนุษย์ เพราะมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า (2,1) แต่เอนไซม์ที่ใช้ย่อยในมนุษย์เช่น sucrase, maltase-isomaltase และ alpha-glucosidase นั้น มีความจำเพาะสำหรับ

แอลฟา-glycosidic linkage ดังนั้น FOS จึงเป็น oligosaccharide ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ อย่างไรก็ตาม FOS และอินนูลิน จะถูกหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ให้กลายเป็น short chain fatty acid (SCFA) ซึ่ง SCFA ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ pH ลดลง มีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ pathogenic bacteria นอกจากนี้ butyrate ที่เกิดขึ้นจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต หยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และช่วยเพิ่มการตายตามธรรมชาติของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งคุณสมบัติทั้ง 3 นี้ อาจมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งได้ และยังพบว่า FOS และอินนูลินช่วยให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมในลำไส้ใหญ่ ทำให้มีการดูดซับแร่ธาตุได้ดีขึ้นและยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นให้กับ epithelial cell ในลำไส้ด้วย อีกทั้งความเข้มข้นของแคลเซียมในลำไส้ที่สูงขึ้น จะช่วยให้เกิด insoluble bile หรือเกลือของกรดไขมัน ซึ่งจะช่วยลดอันตรายจากผลของ bile หรือกรดไขมันที่มีต่อเซลล์ในลำไส้ใหญ่ (colonocytes) ได้ และความเข้มข้นของ cation ที่สูงขึ้นในลำไส้ใหญ่นี้ อาจช่วยควบคุมอัตราการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ (cell turnover) ได้ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า อินนูลินยังช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อีกด้วย^{5,6}

สำหรับประโยชน์ของ prebiotics นั้น พบว่าช่วยลดความเป็นพิษต่อยีน (antigenotoxicity) ที่เกิดจากน้ำอุจจาระ (ทำให้เกิดการทำลายของ DNA) ว่า เมื่อมีการนำสารละลายส่วนใดที่ได้จากการบ่มเชื้อ probiotics ร่วมกับ prebiotics มาเลี้ยง HT29 human adenocarcinoma cells มีผลทำให้เซลล์นี้มีความต้านทานต่อน้ำอุจจาระได้มากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ FOS, inulin, raftiline, raftilose และ actilight จะได้ผลดีที่สุด และได้ผลเล็กน้อยเมื่อใช้ galacto-oligosaccharide และ maltodextrin⁷

Bielecka M. และคณะ⁸ ได้รายงานการให้ oligosaccharides (prebiotics) ผสมในอาหาร และให้แบคทีเรีย *Bifidobacterium* (probiotics) ที่มีชีวิตกำหนดเป็นเวลา 14 วัน จากการทดสอบ *in vitro* พบว่าหนูกลุ่มที่ให้เชื้อ probiotics มีปริมาณ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น 18 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 30 สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่ คือ *B.longum* และ *B.animalis* ส่วนหนูที่ให้ prebiotics พบว่ามีปริมาณ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น 1.6 log cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะ *B.longum* แต่เมื่อให้ทั้ง prebiotics และ probiotics (synbiotic) ร่วมกัน กลับมีการเพิ่มขึ้นของ *Bifidobacterium* 1.4 log cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Bouhnik Y. และคณะ⁹ ได้รายงานผลของการให้ transgalacto-oligosaccharide กับอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีจำนวน 8 คน เป็นเวลา 21 วัน โดยให้วันละ 10 กรัม พบว่าผู้เข้าร่วมการทดลองทั้งหมดมีไฮโดรเจนออกมากับลมหายใจลดลง และมี *Bifidobacterium* ในอุจจาระ (fecal) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ยังเพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากการทดลองใน *in vitro* แล้ว ยังมีการทดลองใน *in vivo* เพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ด้วย เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะนั้น มีความสำคัญมากในการจัดการอุตสาหกรรมสัตว์ปีกจากฟาร์มมาสู่การผลิตในโรงงาน พบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นตัวกระตุ้นการ

เจริญเติบโตถึง 13.7 % ซึ่งผู้เชี่ยวชาญด้านสุขภาพได้กล่าวว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นตัวกระตุ้นนี้อาจทำให้เกิดจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่ดื้อต่อยา นั้น ๆ ได้ อีกทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับลำไส้ (enteric disease) ก็ยังเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีก คือจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตต่ำ มีการตายเพิ่มขึ้น และมีการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ จึงได้มีการศึกษาการนำ prebiotics และ probiotics มาใช้มากขึ้น เพื่อช่วยปรับสภาวะภายในลำไส้ โดยพบว่าการใช้ prebiotics หรือ probiotics อย่างใดอย่างหนึ่ง จะช่วยให้ลักษณะต่างๆ ของสัตว์ปีกดีขึ้น โดยปราศจากการใช้ยาปฏิชีวนะ¹⁰

สำหรับการใช้ prebiotics ในประเทศไทยนั้น ได้มีการทดลองใช้ fructo-oligosaccharide จาก Jerusalem artichoke (Jerusalem artichoke) ผสมในอาหารให้สุกร เพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร โดยเปรียบเทียบระหว่างสุกรที่ได้รับ fructo-oligosaccharide กับสุกรที่ได้รับอีเอ็มผสมน้ำดื่ม พบว่า สุกรที่ได้รับ fructo-oligosaccharide เพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้เร็วจาก 0.39 mg/kg เหลือ 0.28 mg/kg ในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนสุกรที่ได้รับ fructo-oligosaccharide ร่วมกับอีเอ็มผสมน้ำดื่ม ปริมาณแอมโมเนียจะลดลงได้มากที่สุดจาก 0.39 mg/kg เหลือ 0.23 mg/kg ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากสุกรทั้ง 2 กลุ่มน้อยกว่าสุกรที่ได้รับอีเอ็มผสมน้ำดื่มเพียงอย่างเดียว นั่นคือ การให้ FOS ผสมในอาหารให้กับสุกรจะช่วยลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกรได้^{11,12}

ในด้านการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลิน ถึงแม้ว่าอินนูลินจะมีคุณสมบัติเป็น dietary fiber แต่วิธีวิเคราะห์ทั่วไปของ dietary fiber ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์อินนูลิน เนื่องจากอินนูลินจะตกตะกอนในขั้นตอนการใช้เอธานอล ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่จำเพาะกับอินนูลินหลากหลายวิธี การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินส่วนใหญ่อาศัยหลักการการใช้เอนไซม์ เช่น inulinase เพื่อย่อยอินนูลินให้กลายเป็นหน่วยน้ำตาลย่อย เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และ ซูโครส และวัดปริมาณของน้ำตาลหน่วยย่อยนั้นด้วยวิธีต่างๆ เช่น high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), การใช้ *p*-hydroxybenzoic acid (PAHBAH) เพื่อวัด reducing sugar, gas-liquid chromatography รวมทั้ง high performance liquid chromatography with refractive index detector (HPLC-RI) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารต่างๆ เช่น resorcinol, anthrone, diphenylamine, indole-3-acetic acid เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีกับฟรุคโตส แต่ปฏิกิริยาการเกิดสีเหล่านี้มักให้ผลที่คลาดเคลื่อน และสารเคมีที่ใช้อาจก่อให้เกิดพิษอีกด้วย

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำสารสกัดอินนูลินจากพืชมาใช้ประโยชน์ต่างๆ รวมถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์ ในโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงการคัดเลือกพืชในประเทศที่มีศักยภาพเพื่อนำมาเตรียมสารสกัดหยาบบินนูลิน ซึ่งอาจนำมาใช้สำหรับทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ลดผลข้างเคียงและการนำเข้าของยาปฏิชีวนะ และส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์คุ้มค่า

วัสดุและวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ โดยในเบื้องต้นจะคัดเลือกพืชที่เคยมีรายงานในต่างประเทศมาแล้ว รวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ ที่มีในประเทศที่น่าจะมีแนวโน้มการสะสมสารอินนูลินอยู่ และเน้นที่เป็นพืชรับประทานได้ โดยในงานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างพืชทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ แก่นตะวัน (*Hilanthus tuberosus*; Asteraceae) กระเทียม (*Allium sativum*; Alliaceae) กระเจี๊ยบ (*Trapa bicornis* L.; Trapaceae) กล้วย (*Musa sapientum*; Musaceae) กระเทียม (*Zingiber amaricans*; Zingiberaceae) กลอย (*Dioscorea hispida*; Dioscoreaceae) ขนุน (*Artocarpus heterphyllus* Lam; Moraceae) มันแกว (*Ipomoea batatas* L.; Convolvulaceae) มันมือเสือ (*Dioscorea esculenta*; Dioscoreaceae) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*; Solanaceae) เผือก (*Colocasia esculenta*; Araceae) ฝรั่ง (*Psidium guajava*; Myrtaceae) หอมแดง (*Allium cepa* L. cv group aggregatum; Alliaceae) หอมใหญ่ (*Allium cepa* L. cv group cepa; Alliaceae) เหหัว (*Cyperus tuberosus*; Cyperaceae) สามสิบ (*Asparagus racemosus*; Asparagaceae) และสาคุ (*Maranta arundinacea* L.; Marantaceae)

2. ขั้นตอนวิธีวิจัย

2.1 การศึกษาวิธีการตรวจสอบสารอินนูลินในเบื้องต้นที่มีอยู่ในพืช

2.1.1 ศึกษาการตรวจสอบอินนูลินในเบื้องต้นโดยใช้วิธีการส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้ในการคัดกรองพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ โดยนำมาพืชสดย่อยเซลล์ด้วย α -naphthol ใน ethanol และ sulphuric acid ถ้าพืชมีอินนูลินสะสมอยู่จะปรากฏผลึกสีแดงอมม่วงและจะค่อยๆ หายไป โดยทำการเปรียบเทียบกับผงมาตรฐานอินนูลิน ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส ถ่ายภาพบันทึกไว้

2.1.2 ศึกษาการตรวจสอบอินนูลินในเบื้องต้นโดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยเปรียบเทียบ spot ของน้ำตาลฟรุคโตสก่อนและหลังทำปฏิกิริยาพืชด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส (inulinase) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำสารสกัดพืชแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 1% มา 1 ml ผสมกับเอนไซม์อินนูลินเนส ใน phosphate buffer pH 4.5
2. สารละลายที่ได้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเป็นเวลา 15 นาที
3. นำส่วนใสที่ได้มา spot เทียบกับสารสกัดก่อนทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ บนแผ่น TLC จากนั้น develop ด้วยระบบนำพา acetone:water ในอัตราส่วน 9:1 แล้วใช้ spraying reagent 10% sulfuric acid เป่าลมร้อนที่ 100°C จนเกิดสี เปรียบเทียบ spot กับน้ำตาลมาตรฐาน (ฟรุคโตส และกลูโคส)

2.2 การเตรียมสารสกัดอินนูลินจากพืช เพื่อใช้ในการวิจัยในขั้นตอนการทดสอบเชื้อและการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยวิธี HPLC

นำพืชแต่ละชนิดมาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัด และบดให้ละเอียด ทำการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยใช้สัดส่วนพืชต่อน้ำร้อนในอัตราส่วน 1:1 โดยแช่ผงพืชในน้ำอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ต้มต่อจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองผ่านสำลีเพื่อแยกสิ่งสกปรกออก นำส่วนสกัดที่ได้ไป lyophilize ทำให้แห้ง ซึ่งน้ำหนัก คำนวณ % yield ของสารสกัดที่ได้

2.3 ศึกษาการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากพืชสมุนไพร

ทำการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในพืชสมุนไพรที่เลือก โดยการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่อ้างอิงจาก Lingyun, W., et al. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79; 1087-1093 ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณ reducing sugar และการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณอินนูลินในพืชแต่ละชนิด โดยแต่ละวิธีมีขั้นตอนโดยละเอียดดังนี้

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยปฏิกิริยาการเกิดสีโดยหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณ reducing sugar

2.3.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric acid assay

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม calibration curve ด้วย 1 mg/L หรือ 0.1% sugar standard (inulin std.) ในน้ำกลั่น ทำการ aliquot ให้ได้ในช่วง 5-50 μ l และเติม 4%phenol ปริมาตร 500 μ l และ 2.5 ml ของ 96% sulfuric acid ลงใน หลอดทดลองขนาด 10 ml

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm

3. สำหรับสารสกัดจากพืชสามารถทำการวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลรวมทั้งหมดได้ดังนี้คือ เติม 1% สารละลายตัวอย่างในปริมาตร 1 μ l ลงในหลอดทดลองขนาด 10 ml หลังจากนั้นเติม 500 μ l ของ 4%phenol ปริมาตร 500 μ l และ 2.5 ml ของ 96% sulfuric acid ตามลำดับ เมื่อสารละลายทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นโดยสมบูรณ์แล้ว สารละลายจะเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองอมส้ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm

4. คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดจากพืช

2.3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Reducing sugar โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid colorimetric assay

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม calibration curve ด้วย 1 mg/L sugar standard (fructose std.) ในน้ำกลั่นทำการ aliquot ให้ได้ในช่วง 0.2-2.4 ml ลงใน หลอดทดลองขนาด 10 ml จากนั้นทำการเติมสารละลายดังที่แสดงในตารางดังนี้

หลอดทดลอง (ปริมาตรสุทธิ 6 ml)	ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐาน (ml)	ปริมาตรของน้ำ (ml)	ปริมาตรของ DNS reagent (ml)
Blank	0	3.0	3.0
1	0.2	2.8	3.0
2	0.4	2.6	3.0
3	0.6	2.4	3.0
4	0.8	2.2	3.0
5	1.0	2.0	3.0
6	1.2	1.8	3.0
7	1.4	1.6	3.0
8	1.6	1.4	3.0
9	1.8	1.2	3.0
10	2.0	1.0	3.0
11	2.2	0.8	3.0
12	2.4	0.6	3.0

2. ให้ความร้อนสารละลายที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 5-15 นาทีจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง

4. เติม 1 ml ของ 40% potassium sodium tartrate solution (Rochelle salt) เพื่อให้สีคงตัว

5. ทำให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm

6. สำหรับสารสกัดจากพืชเติมสารต่างๆ ตามปริมาณดังตารางดังนี้

หลอดทดลอง (ปริมาตรสุทธิ 6 ml)	ปริมาตรของสารละลาย ตัวอย่าง 0.1 % (ml)	ปริมาตรของน้ำ (ml)	ปริมาตรของ DNS reagent (ml)
Test	0.001	3.0	3.0

จากนั้นทำการทดลองตามข้อ 2-5

7. คำนวณปริมาณ reducing sugar ของสารสกัดจากพืช

จากนั้นคำนวณหาปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากพืช โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{Inulin content} = \text{Total carbohydrate} - \text{Reducing sugar}$$

$$\text{Inulin extraction yield (\%)} = \frac{(\text{Inulin content} \times \text{volume of extraction liquid or mass of extract powder})}{\text{mass of extract powder}} \times 100$$

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วย HPLC

ทำการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยวิธี HPLC โดยใช้หลักการวัดปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส เปรียบเทียบก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส โดยสภาวะในการวิเคราะห์มีดังนี้

Column: Hypersil APS2-C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm)

Mobile Phase: Acetonitrile:Water (25:75)

Flow rate: 0.5 ml/min

Detector: Refractive index

2.3.2.1 การเตรียม Calibration curve

ซึ่งสารมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตสละลายในน้ำเตรียมเป็น stock solution จากนั้นเตรียม calibration work solution โดยเจือจาง stock solution ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.02-2 mg/ml

2.3.2.2 การเตรียมสารสกัดพืช

เตรียมสารสกัดจากพืชให้ได้ความเข้มข้น 1% w/v นำไปกรองผ่านเมมเบรน 0.45 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.3.2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC (Validation of the method)

ทำการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยดูผลจากค่า calibration curve, specificity, repeatability

2.4 ทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินต่อการเจริญของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli*

ในการศึกษาผลของสารสกัดอินนูลินต่อเชื้อ probiotics นั้น จะทำการผสมสารสกัดจากพืชที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยจะใช้ BSM broth สำหรับ *Bifidobacteria* และ

MRS broth สำหรับ *Lactobacilli* ซึ่งจะต้องควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง pH 6.8 จากนั้นทำการเพาะเชื้อแต่ละชนิด และทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่ 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ในการทดลองมีการปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ probiotics โดยในขั้นตอนการทดลองแรกๆ จะใช้สารมาตรฐาน inulin ในการทดลองเพื่อดูสภาวะการทดสอบที่เหมาะสม รายละเอียดและผลการทดลอง ดังต่อไปนี้

2.4.1 ทดสอบผลของสารมาตรฐานอินนูลินต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* สายพันธุ์ต่างๆ

โดยในขั้นตอนนี้จะทำการทดสอบผลของสารมาตรฐานอินนูลินต่อเชื้อ *Lactobacilli* ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ และผลของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยทำการเปรียบเทียบเมื่อใช้ปริมาณของสารมาตรฐานอินนูลินต่างๆ กัน ดังนี้

2.4.1.1 ในสภาวะ anaerobic (มี paraffin) นับจำนวนเชื้อโดยวัดค่า OD

Microorganisms: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

Lactobacillus plantarum No. 4

Lactobacillus sp. Pro.5

Lactobacillus sp. Pro.23

Inulin: สารมาตรฐาน ใส่ในปริมาณ 0%, 1%, 2%, และ 4%

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ในสภาพ anaerobic

2. ปรับค่า OD ของแต่ละเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ที่ λ 590 nm

3. ใส่สารละลายปริมาตร 200 μ l ซึ่งประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ 125 μ l เชื้อ 25 μ l และ พาราฟิน 50 μ l ลงใน 96 well microtiter plate โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีส่วนผสมของสารอินนูลิน อยู่ ปริมาณ 0%, 1%, 2%, และ 4%

4. ทำการนับจำนวนเชื้อแต่ละชนิดโดยวัดค่า optical density ที่ 590 nm

2.4.1.2 ในสภาวะ aerobic ไม่มี paraffin นับจำนวนเชื้อโดยนับจำนวน colony

Microorganisms: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

Lactobacillus plantarum No. 4

Lactobacillus sp. Pro.5

Lactobacillus sp. Pro.23

Inulin: สารมาตรฐาน ใส่ในปริมาณ 0%, 1%, 2%, และ 4%

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ในสภาพ anaerobic
2. ปรับค่า OD ของแต่ละเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ที่ λ 590 nm
3. ใส่สารละลายปริมาตร 250 μ l ซึ่งประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 μ l เชื้อ 50 μ l ลงใน 96 well microtiter plate โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีส่วนผสมของสารอินนูลินอยู่ 0%, 1%, 2%, และ 4%
4. ทำการ dilution สารละลายให้อยู่ในช่วง 10^{-3} - 10^{-5} นำสารละลายมา spread plate โดยคิดเป็นนาที่ที่ 0
5. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4 ในทุกๆ 24, 48, 72, 96 และ 120 hr.
6. นับจำนวน colonies เชื้อที่เจริญบน agar plate บันทึกผล

2.4.1.3 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เชื้อต้องการใช้

Microorganisms: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

Lactobacillus plantarum No. 4

Lactobacillus sp. Pro.5

Lactobacillus sp. Pro.23

แหล่งคาร์บอน: 2% glucose, inulin, lactose, dextrose

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ในสภาพ anaerobic
 2. ปรับค่า OD ของแต่ละเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 1.0 ที่ λ 590 nm
 3. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 μ l นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
 4. เติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดในปริมาตร 2 μ l คิดเป็น 2%
 5. บ่มเชื้อ 7 วัน ระหว่างนั้นดื่มน้ำหมักมาวิเคราะห์โดยวัด
 - 1) ค่า OD
 - 2) นับจำนวนเชื้อโดยนับจำนวน colonies
 - 3) ค่า pH
- 2.4.2 ทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* เพื่อศึกษาถึงผลของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ probiotics

2.4.2.1 ทดสอบกับสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุนซึ่งจากผลการวิจัยในเบื้องต้นคาดว่าจะมีอินนูลินอยู่

Microorganisms: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

Lactobacillus plantarum No. 4

สารสกัด: ปริมาณ 0, 2, 4, และ 6%

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ในสภาพ anaerobic

2. ปรับค่า OD ของแต่ละเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 1.0 ที่ λ 590 nm

3. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 μ l นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. เติมสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุนในอัตราส่วน 0, 2, 4, และ 6% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. เติมเชื้อลงไป 0.5 ml บ่มเชื้อ 7 วัน ระหว่างนั้นดื่มน้ำหมักมาวิเคราะห์โดยวัดค่า optical density

2.4.2.2 ปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเตรียมขึ้นเอง เติมแหล่งคาร์บอนอินนูลินแทนที่ dextrose

Microorganisms: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

Lactobacillus plantarum No. 4

Lactobacillus sp. Pro.23

แหล่งคาร์บอน: อินนูลิน ปริมาณ 0, 1, 2, และ 4%

Media: (g/L)

Inulin	10.0/20.0/40.0 g
Peptone	10.0 g
Beef extract	8.0 g
Sodium lactate	5.0 g
Yeast extract	4.0 g
Dipotassium phosphate	2.0 g
Tween 80	1.0 g
Ammonium acetate	2.0 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.05 g
Mg·SO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเอง ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ในสภาพ anaerobic

2. ปรับค่า OD ของแต่ละเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 1.0 ที่ λ 590 nm

3. เตรียมสารละลายปริมาตร 275 μ l ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 μ l และเชื้อทดสอบ 25 μ l โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีอินนูลินผสมอยู่ 0, 1, 2, และ 4%

3. บ่มเชื้อ 7 วัน ระหว่างนั้นดื่มน้ำหมักมาวิเคราะห์โดยวัดค่า optical density

2.4.2.3 ผลการทดสอบเมื่อใช้สารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้สูตรอาหารเตรียมขึ้นเอง

Microorganisms: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

Lactobacillus brevis ATCC14869

Bifidobacterium sp.

แหล่งคาร์บอน: สารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรแต่ละชนิด ปริมาณ 0, 1, 2, 4%

Media: (g/L)

Plant extract	10.0/20.0/40.0	g
Peptone	10.0	g
Beef extract	8.0	g
Sodium lactate	5.0	g
Yeast extract	4.0	g
Dipotassium phosphate	2.0	g
Tween 80	1.0	g
Ammonium acetate	2.0	g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.05	g
Mg·SO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเอง ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ในสภาพ anaerobic

2. ปรับค่า OD ของแต่ละเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 1.0 ที่ λ 590 nm

3. เตรียมสารละลายปริมาตร 275 μ l ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 μ l และเชื้อทดสอบ 25 μ l โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ผสมอยู่ 2%

3. บ่มเชื้อ 2-3 วัน ระหว่างนั้นดื่มน้ำหมักมาวิเคราะห์โดยวัดค่า optical density

2.5 ทดสอบผลของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสมสารสกัดอินนูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค

ทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยง *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ใน MRS agar ที่ผสมสารสกัดอินนูลิน จากนั้นเททับด้วย TSA medium ที่ผสมเชื้อ *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium* ทำการบ่มเพาะต่อและดูผลการยับยั้งเชื้อทดสอบเหล่านี้ที่ 24 ชั่วโมง เทียบกับ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ที่เพาะเลี้ยงใน MRS agar ที่ปราศจากสารสกัดอินนูลิน

2.5.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 และ *Bifidobacterium longum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. นำเชื้อทั้ง 2 ชนิด ที่ปรับระดับความขุ่นที่ $OD_{600} = 0.1$ เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งน้ำตาลอื่น โดยเติมสารสกัดหยาบจากพืชเข้าไปแทนที่ในอัตราส่วน 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้ Inulin standard (อินนูลินมาตรฐาน) เป็นสารควบคุม พืชเหล่านี้ได้แก่

- Tripe (สามสิบ)
- Artichoke (แก่นตะวัน)
- Guava (ฝรั่ง)
- Yam bean (มันแกว)
- Onion (หอมหัวใหญ่)

3. จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเอาเซลล์ของเชื้อออกที่ความเร็วหมุนเหวี่ยง 10000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ทำการเก็บส่วนใสไว้ และนำไปทำให้เข้มข้นเป็น 5 เท่า ด้วยเครื่อง speed vacuum เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Agar well diffusion method

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่า

2. ปรับระดับความขุ่นของเชื้อให้ได้ $OD_{600} = 0.1$

3. นำเชื้อนี้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เตรียมไว้แล้ว ผึ่งทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที แล้วทำการเจาะหลุมลงบน plate

4. เติมส่วนผสมที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 ปริมาตร 90 ไมโครลิตร/หลุม
5. นำ plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. วัดผล clear zone ที่ปรากฏ พร้อมทั้งบันทึกผล

หมายเหตุ : Control คือ เชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 หรือ เชื้อ *B. longum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากการเติมสารสกัดหยาบ

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Microtiter plate assay

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่า
2. เติมสารต่างๆให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 200 ไมโครลิตร/หลุม ซึ่งประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เชื้อที่ระดับความขุ่น $OD_{600} = 0.1$ และส่วนผสมที่ได้จากข้อที่ 1.1 ลงใน 96 well microtiter plate
3. นำ 96 well microtiter plate ไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ให้นำไปวัดการเจริญของเชื้อที่ OD_{600}
5. ทำการ spread plate เพื่อคำนวณหาการเจริญของเชื้อเป็น cfu/ml ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม

- บันทึกผลการทดสอบ

2.6 การศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินูลิน และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดที่เหมาะสมจากพืชสมุนไพร

จากการคัดกรองพืชจากวิธีวิจัยในข้อ 2.3-2.5 เลือกพืชที่ให้ปริมาณอินูลินที่ดีที่สุดและมีผลต่อการเจริญของเชื้อ probiotics และมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค มาศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดอินูลินและสภาวะที่เหมาะสม โดยจะทำการศึกษถึงขั้นตอนการสกัดโดยใช้น้ำ ไม่อาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งอาจจะมีผลในการเตรียมเป็นสารสกัดสำหรับอาหารสัตว์ ศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ อุณหภูมิ ระยะเวลาต่างๆ ขั้นตอนการกรองเพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อน เช่น สารโมเลกุลใหญ่พวกโปรตีน เพคติน ด้วยวัสดุกรองชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมให้ได้ปริมาณสารสกัดอินูลินที่ดีที่สุด ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.6.1. ศึกษาผลของอัตราส่วนน้ำต่อปริมาณพืชที่นำมาสกัด

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัด และบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก ทำการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยใช้สัดส่วนพืชต่อน้ำร้อนในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 2:1

2. นำพืชในน้ำร้อนแต่ละอัตราส่วนมาแช่ต่อน้ำอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และต้มต่อจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองผ่านสำลีเพื่อแยกสิ่งสกปรกออก นำส่วนสกัดที่ได้ไป lyophilize ทำให้แห้ง

3. เตรียมสารสกัดพืชให้มีความเข้มข้น 1% นำมา 1 ml ผสมกับเอนไซม์อินนูลินเนส ใน phosphate buffer pH 4.5

4. สารละลายที่ได้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเป็นเวลา 15 นาที

5. วิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วย HPLC เปรียบเทียบการใช้ปริมาณน้ำต่อพืชในอัตราส่วนต่างๆ

2.6.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการช่วยสกัด (Ultrasound-assisted extraction)

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัด และบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก ทำการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยใช้สัดส่วนพืชต่อน้ำร้อนในอัตราส่วน 1:1

2. แช่พืชใน ultrasound cleaning bath พร้อมตั้งอุณหภูมิ 80°C จากนั้น sonicate เป็นเวลาต่างๆ คือ 15, 30, 45 และ 60 นาที

3. พืชที่ผ่านการ sonicate แต่ละชุด นำมาต้มต่อจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองผ่านสำลีเพื่อแยกสิ่งสกปรกออก นำส่วนสกัดที่ได้ไป lyophilize ทำให้แห้ง

4. เตรียมสารสกัดพืชให้มีความเข้มข้น 1% นำมา 1 ml ผสมกับเอนไซม์อินนูลินเนส ใน phosphate buffer pH 4.5

5. สารละลายที่ได้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเป็นเวลา 15 นาที

6. วิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วย HPLC เปรียบเทียบการใช้การ sonicate ช่วงระยะเวลาต่างๆ

2.6.3 ศึกษาผลของวัสดุกรอง

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัด และบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก ทำการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยใช้สัดส่วนพืชต่อน้ำร้อนในอัตราส่วน 1:1

2. นำพืชในน้ำร้อนมาแช่ต่อน้ำอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และต้มต่อจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองผ่านสำลีเพื่อแยกสิ่งสกปรกออก แล้วผ่านวัสดุกรองต่างๆ ดังนี้ กระดาษกรอง ขนาด 0.45 µm, activated charcoal และ celite

3. นำส่วนสกัดที่ได้ไป lyophilize ทำให้แห้ง

4. เตรียมสารสกัดพืชให้มีความเข้มข้น 1% นำมา 1 ml ผสมกับเอนไซม์อินนูลินเนส ใน phosphate buffer pH 4.5
5. สารละลายที่ได้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเป็นเวลา 15 นาที
6. วิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วย HPLC เปรียบเทียบการใช้วัสดุของชนิดต่างๆ

ผลการวิจัย

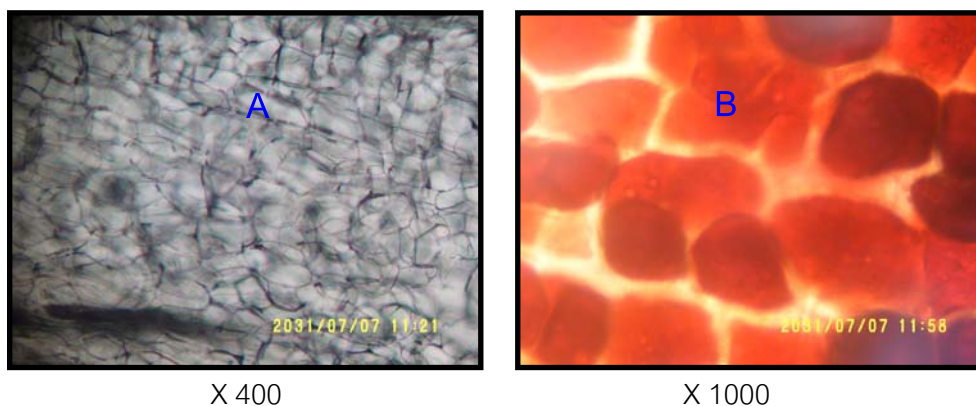
3.1 ผลการศึกษาวิธีการตรวจสอบสารอินนูลินในเบื้องต้นที่มีอยู่ในพืช

3.1.1 ผลการศึกษาการตรวจสอบอินนูลินในเบื้องต้นโดยใช้วิธีการส่องกล้องจุลทรรศน์

จากการคัดกรองพืชสมุนไพร 17 ชนิดเบื้องต้น โดยใช้วิธีการย้อมเซลล์พืชด้วย α -naphthol in ethanol และ sulphuric acid แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถ้าพืชมีอินนูลินสะสมอยู่จะปรากฏผลึกสีแดงอมม่วงดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งเป็นผลึกจากแก่นตะวัน ซึ่งสีแดงอมม่วงที่เห็นนี้จะค่อยๆ หายไป โดยทำการเปรียบเทียบกับผงมาตรฐานอินนูลิน ผงชูโครส กลูโคส ฟรุคโตส ซึ่งจากผลการทดลองในเบื้องต้นพบว่าพืชที่ให้ผลึกสีแดงอมม่วง ได้แก่ แก่นตะวัน กระเทียม หอมใหญ่ หอมแดง มันฝรั่ง แห้ว กล้วยหอม มันแกว เม็ดขนุน กระเจี๊ยบ ฝรั่ง สามสิบ และกระเทียม ผลการส่องผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์และการสกัดพืชแต่ละชนิดตามวิธีการวิจัยข้อ 2.2 ได้ % yield ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 21

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบอินนูลินด้วยกล้องจุลทรรศน์และ % yield ของพืชทั้ง 17 ชนิด

ชนิดพืช	ส่วนของพืชที่นำมาทดลอง	ผลการส่องกล้องดูผลึกอินนูลิน	น้ำหนักแห้งหลังทำ lyophilize (g)	% yield
1. แก่นตะวัน	หัว	✓	14.86	19.79
2. กระเทียม	หัว	✓	54.44	12.86
3. มันฝรั่ง	หัว	✓	14.31	3.58
4. หอมใหญ่	หัว	✓	20.31	5.08
5. หอมแดง	หัว	✓	20.85	5.21
6. แห้ว	หัว	✓	14.40	3.60
7. กล้วยหอม	ผล	✓	13.65	3.41
8. มันแกว	หัว	✓	14.08	3.52
9. ขนุน	เม็ด	✓	40.12	10.03
10. กระเจี๊ยบ	หัว	✓	49.81	12.45
11. เผือก	หัว	✗	52.24	13.04
12. ฝรั่ง	ผล	✓	14.87	3.72
13. สามสิบ	ราก	✓	7.66	10.21
14. กลอย	หัว	✗	17.97	4.49
15. สาครู	ราก	✗	13.65	3.41
16. กระเทียม	หัว	✓	2.75	7.86
17. มันมือเสือ	หัว	✗	20.33	5.08



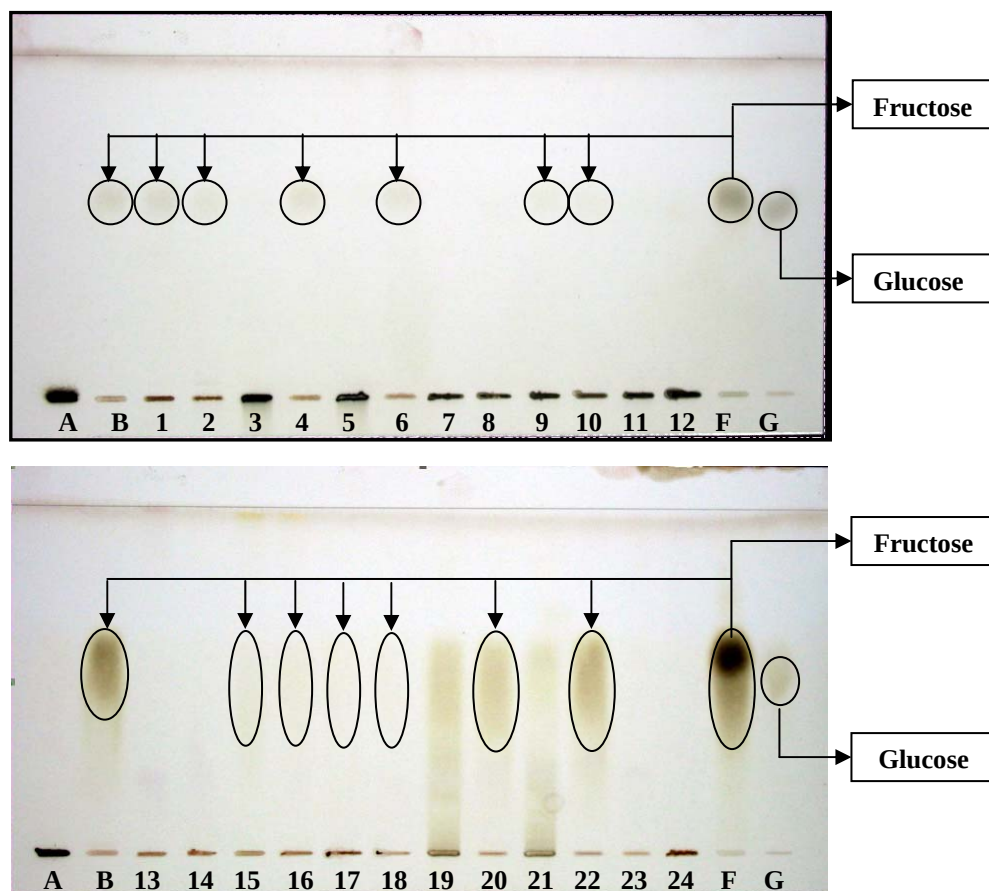
X 400

X 1000

รูปที่ 2 เซลล์ของแก่นตะวัน ก่อน (A) และหลัง (B) ย้อมด้วย α -naphthol และ sulfuric acid

3.1.2 ผลการศึกษาการตรวจสอบอินนูลินในเบื้องต้นโดยใช้วิธี TLC

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อตรวจสอบด้วย TLC เปรียบเทียบ spot ของ fructose ก่อนและหลังใช้เอนไซม์อินนูลินเนสในพืชแต่ละชนิด โดยใช้ silica gel F254 เป็น stationary phase และใช้ acetone:water ในอัตราส่วน 9:1 เป็น mobile phase พบว่าสารสกัดจากรากสามสิบและหัวแก่นตะวันให้ผลที่ชัดเจนกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม spot ของสารสกัดบางชนิดยังไม่ชัดเจน อาจเนื่องมาจากปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่น้อย นอกจากนี้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ยังไม่สามารถแยก spot ของ glucose และ fructose ได้ชัดเจน ผลดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 TLC pattern ของสารสกัดจากพืชก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อินนูลินเนส

*A - Inulin Standard, B - Inulin Standard+Inulinase, F - Fructose, G - Glucose

1- ฝรั่ง 2 - ฝรั่ง+Inulinase 3 - แก่นตะวัน 4 - แก่นตะวัน+Inulinase 5 - สามสี 6 - สามสี+Inulinase 7 - สาข 8- สาข+Inulinase 9- มันแกว 10- มันแกว+Inulinase 11- หัว 12- หัว+Inulinase 13- เผือก 14-เผือก+Inulinase 15- ขนุน 16- ขนุน+Inulinase 17- กระเทียม 18- กระเทียม+Inulinase 19- กลอย 20- กลอย+Inulinase 21- หัวหอม 22- หัวหอม+Inulinase 23- หอมแดง 24- หอมแดง+Inulinase 25- กระเจี๊ยบ 26- กระเจี๊ยบ+Inulinase

3.2 ผลการศึกษากาววิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากพืชสมุนไพร

การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินสามารถทำได้หลายวิธี ในการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เลือกวิธีการวิเคราะห์แบบง่าย คือการใช้เทคนิคปฏิกิริยาการเกิดสีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด และปริมาณ reducing sugar เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณอินนูลินในพืช ซึ่งอ้างอิงจาก Lingyun, W., et al. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79; 1087-1093 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและทำได้รวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ปริมาณอาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากความจำเพาะน้อย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC อีกวิธีหนึ่ง โดยใช้หลักการวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลฟรุคโตสเปรียบเทียบกับก่อนและหลังจากไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีตรงมีความจำเพาะและแม่นยำมากกว่า ผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีมีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยปฏิกิริยาการเกิดสีโดยหาผลต่างระหว่างปริมาณ คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณ reducing sugar

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total carbohydrate โดยวิธี Phenol-sulfuric acid assay ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Reducing sugar โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid colorimetric assay และผลการคำนวณปริมาณอินนูลินและ % yield ของอินนูลินในพืชแต่ละชนิดได้ผลดังตารางที่ 3-6 พบว่าสารสกัดจากให้ผลชี้ว่าสารสกัดจากหัวให้ % yield ของอินนูลินมากที่สุดคือ 5.590% และ % yield ของอินนูลินจากสารสกัดเผือกน้อยที่สุดประมาณ 0.027% ขณะที่สารสกัดจากรากสามสีให้ปริมาณอินนูลินที่สูงเช่นเดียวกันคือ 4.226% ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากแก่นตะวันที่ให้ค่าอยู่ที่ 3.403%

ตารางที่ 3 ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในสารสกัดจากพืช

Results of Total Sugar	Optical Density (490 nm)			Average of Optical Density	Average-Blank	X=Y/0.0009 (mg/ml)
	1	2	3			
1. สารสกัดสามสิบ	0.082	0.081	0.079	0.081	0.039	43.704
2. สารสกัดแก่นตะวัน	0.075	0.073	0.073	0.074	0.032	35.926
3. สารสกัดฝรั่ง	0.074	0.074	0.074	0.074	0.033	36.296
4. สารสกัดมันแกว	0.075	0.075	0.077	0.076	0.034	38.148
5. สารสกัดแห้ว	0.092	0.094	0.094	0.093	0.052	57.778
6. สารสกัดกระเจี๊ยบ	0.087	0.087	0.089	0.088	0.046	51.481
7. สารสกัดกระเทียม	0.084	0.082	0.080	0.082	0.041	45.185
8. สารสกัดมันฝรั่ง	0.088	0.090	0.088	0.089	0.047	52.593
9. สารสกัดกระเทียม	0.077	0.081	0.080	0.079	0.038	42.222
10. สารสกัดมันมือเสือ	0.077	0.079	0.083	0.080	0.038	42.593
11. สารสกัดกล้วย	0.076	0.074	0.071	0.074	0.032	35.926
12. สารสกัดเผือก	0.044	0.045	0.045	0.045	0.003	3.704
13. สารสกัดสาคุ	0.077	0.080	0.078	0.078	0.037	41.111
14. สารสกัดกลอย	0.078	0.077	0.080	0.078	0.037	41.111
15. สารสกัดหอมแดง	0.072	0.074	0.074	0.073	0.032	35.556
16. สารสกัดหัวหอม	0.077	0.077	0.079	0.078	0.036	40.370
17. Inulin Standard (Artichoke)	0.079	0.084	0.084	0.082	0.041	45.556
18. Inulin standard (Chicory)	0.079	0.079	0.081	0.080	0.038	42.593

ตารางที่ 4 ปริมาณของ reducing sugar ในสารสกัดจากพืช

Results of Reducing sugar	Optical Density (560 nm)			Average of Optical Density	Average-Blank	X=Y/0.3975 (mg/ml)
	1	2	3			
1. สารสกัดสามสิบ	0.578	0.641	0.621	0.613	0.572	1.439
2. สารสกัดแก่นตะวัน	0.774	0.809	0.798	0.794	0.752	1.893
3. สารสกัดฝรั่ง	1.162	1.199	1.172	1.178	1.136	2.859
4. สารสกัดมันแกว	0.565	0.569	0.560	0.565	0.523	1.317
5. สารสกัดแห้ว	0.782	0.790	0.790	0.787	0.746	1.877
6. สารสกัดกระเจี๊ยบ	0.664	0.689	0.678	0.677	0.636	1.599
7. สารสกัดกระเทียม	0.353	0.339	0.348	0.347	0.305	0.768
8. สารสกัดมันฝรั่ง	1.263	1.259	1.260	1.261	1.219	3.068
9. สารสกัดกระเทียม	0.829	0.838	0.834	0.834	0.792	1.993
10. สารสกัดมันมือเสือ	0.264	0.294	0.278	0.279	0.237	0.597
11. สารสกัดกล้วย	0.882	0.854	0.876	0.871	0.829	2.086
12. สารสกัดเผือก	1.405	1.408	1.406	1.406	1.365	3.434
13. สารสกัดสาคุ	0.249	0.264	0.255	0.256	0.215	0.540
14. สารสกัดกลอย	0.581	0.567	0.576	0.575	0.533	1.342
15. สารสกัดหอมแดง	0.782	0.789	0.790	0.787	0.746	1.876
16. สารสกัดหัวหอม	0.684	0.689	0.678	0.684	0.642	1.616
17. Inulin Standard (Artichoke)	0.806	0.829	0.820	0.818	0.777	1.955
18. Inulin standard (Chicory)	0.687	0.752	0.724	0.721	0.680	1.710

ตารางที่ 5 ปริมาณของอินนูลินในสารสกัดจากพืช

Samples	Total sugar (A) $Y=0.0009X$, $R^2=0.9428$	Reducing sugar (B) $Y=0.4032X$, $R^2=0.9912$	Inulin content* (A)-(B) (mg/ml)
1. สารสกัดสามสิบ	43.704	1.439	42.285
2. สารสกัดแก่นตะวัน	35.926	1.893	42.265
3. สารสกัดฝรั่ง	36.296	2.859	34.033
4. สารสกัดมันแกว	38.148	1.317	33.438
5. สารสกัดแห้ว	57.778	1.877	36.832
6. สารสกัดกระเจี๊ยบ	51.481	1.599	55.901
7. สารสกัดกระเทียม	45.185	0.768	49.882
8. สารสกัดมันฝรั่ง	52.593	3.068	44.417
9. สารสกัดกระเทียม	42.222	1.993	49.525
10. สารสกัดมันมือเสือ	42.593	0.597	40.229
11. สารสกัดกล้วย	35.926	2.086	41.996
12. สารสกัดเผือก	3.704	3.434	33.840
13. สารสกัดสาหร่าย	41.111	0.540	0.270
14. สารสกัดกลอย	41.111	1.342	40.571
15. สารสกัดหอมแดง	35.556	1.876	39.769
16. สารสกัดหัวหอม	40.370	1.616	33.680
17. สารสกัดเม็ดขนุน	48.186	1.591	46.595
18. Inulin Standard (Artichoke)	45.556	1.955	38.754
19. Inulin standard (Chicory)	42.593	1.710	43.601

*ได้จากการคำนวณ Inulin content = Total Sugar - Reducing sugars

ตารางที่ 6 ปริมาณ % yield ของอินนูลินในสารสกัดจากพืช

Samples	Inulin content	Volume of extraction liquid (ml)	Inulin extraction yield (%)
1. สารสกัดสามสิบ	42.285	0.001	4.226
2. สารสกัดแก่นตะวัน	42.265	0.001	3.403
3. สารสกัดฝรั่ง	34.033	0.001	3.344
4. สารสกัดมันแกว	33.438	0.001	3.683
5. สารสกัดแห้ว	36.832	0.001	5.590
6. สารสกัดกระเจี๊ยบ	55.901	0.001	4.988
7. สารสกัดกระเทียม	49.882	0.001	4.442
8. สารสกัดมันฝรั่ง	44.417	0.001	4.953
9. สารสกัดกระเทียม	49.525	0.001	4.023
10. สารสกัดมันมือเสือ	40.229	0.001	4.200
11. สารสกัดกล้วย	41.996	0.001	3.384
12. สารสกัดเผือก	33.840	0.001	0.027
13. สารสกัดสาหร่าย	0.270	0.001	4.057
14. สารสกัดกลอย	40.571	0.001	3.977
15. สารสกัดหอมแดง	39.769	0.001	3.368
16. สารสกัดหัวหอม	33.680	0.001	3.875
17. สารสกัดเม็ดขนุน	46.595	0.001	4.6595

3.2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยวิธี HPLC

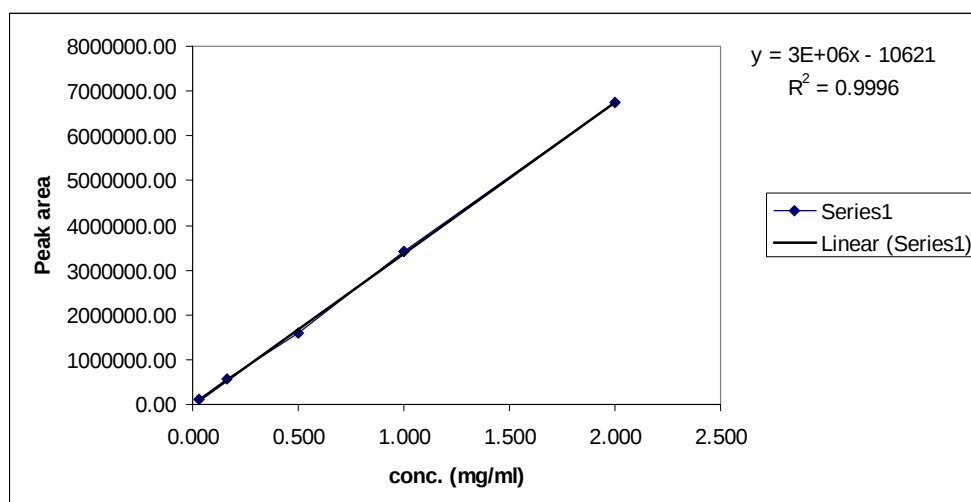
การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ RP-18 (250x4.6 nm) ใช้ mobile phase ระบบ isocratic (acetonitrile:water, 25:75) อัตราการไหลที่ 0.5 ml/min วัดด้วย Refractive Index

3.2.2.1 เส้นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

จากการทดลองได้เส้นกราฟมาตรฐานที่มีค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.9996 ผลดังตารางที่ 7 และรูปที่ 4

ตารางที่ 7 Peak area ของ calibration work solution

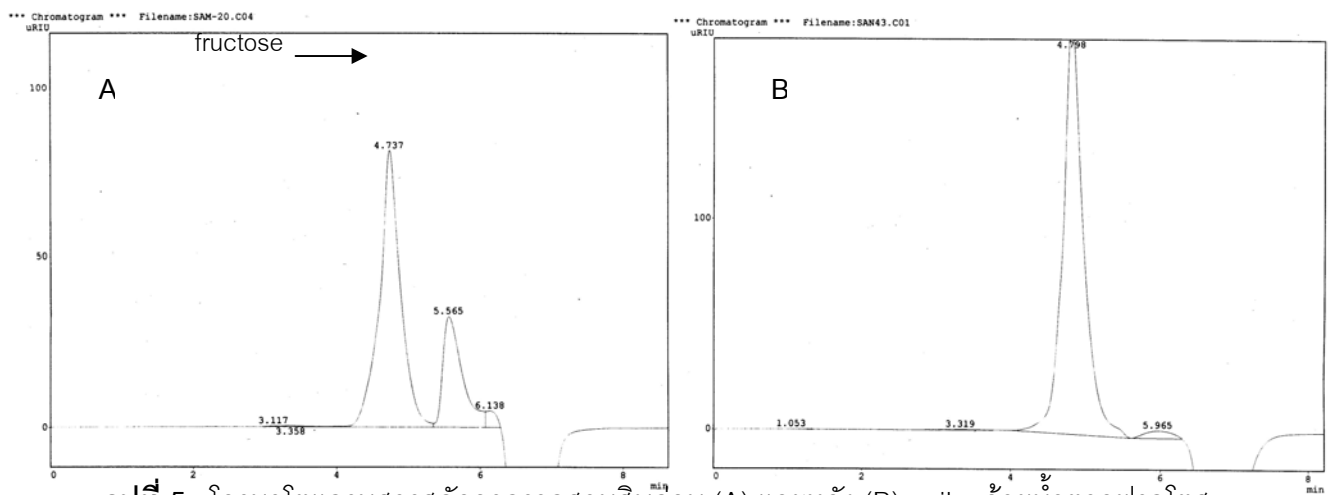
Conc. (mg/ml)	Rep1		Rep 2		Rep 3		Average Peak area
	R _t (min)	Area	R _t (min)	Area	R _t (min)	Area	
0.032	4.755	98850	4.754	102358	4.755	100547	100585.00
0.160	4.758	566406	4.750	576932	4.752	560329	567889.00
0.500	4.758	1549945	4.762	1631744	4.755	1608766	1596818.33
1.000	4.760	3377189	4.756	3468711	4.761	3437237	3427712.33
2.000	4.760	6746609	4.726	6775082	4.760	6728751	6750147.33



รูปที่ 4 Calibration curve ของน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐาน

3.2.2.2 ค่า Specificity

รูปที่ 5 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดรากสามสิบ (รูปที่ 5a) และโครมาโตแกรมของสารสกัดรากสามสิบ spike ด้วยน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐาน ซึ่งค่า retention time อยู่ที่ประมาณ 4.7 นาที



รูปที่ 5 โคโรมาโตแกรมสารสกัดจากรากสามสิบก่อน (A) และหลัง (B) spike ด้วยน้ำตาลฟรุกโตสมาตรฐาน

3.2.2.3 ค่า Repeatability

ตารางที่ 8 และรูปที่ 22 แสดงข้อมูล repeatability (n = 6) ของสารสกัดรากสามสิบที่ได้จากการเตรียมสารสกัดตามวิธีวิจัยข้อที่ 2.2

ตารางที่ 8 ค่า Repeatability ของสารสกัดรากสามสิบ

Sample	R _t	Peak Area	Mean $\pm$ SD
1	4.629	33326389	34124740 $\pm$ 757900.8
2	4.630	33901637	
3	4.633	33930409	
4	4.622	33484512	
5	4.663	34966472	
6	5.657	35139018	

3.2.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินจากพืชแต่ละชนิด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลินจากพืชโดยคำนวณจากสูตร¹³

$$\% \text{ Yield Inulin} = \frac{1.1 (R1 - R2)}{100/P}$$

โดยที่ R1 = ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสทั้งหมดหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส

R2 = ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสอิสระ

P = ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในพืชแต่ละชนิด พบว่าด้วยเทคนิค HPLC รากสามสิบ ให้ปริมาณอินนูลินมากที่สุด 5.50% yield ซึ่งมีปริมาณมากกว่าอินนูลินในแก่นตะวันที่วิเคราะห์ได้ 4.89% yield นอกจากนี้พืชชนิดอื่นๆ ที่ให้ปริมาณอินนูลินที่สูง ได้แก่ กลัวย กระจับ มันฝรั่ง หอมแดง หัวหอม เป็นต้น ส่วนสาคุให้ปริมาณอินนูลินน้อยที่สุด ซึ่งให้ผลทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยการหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณน้ำตาล reducing sugar ผลการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วย HPLC ได้ผลดังข้อมูลในตารางที่ 9 (แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 9 ผลวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในพืชแต่ละชนิด

Sample	Average Peak Area ^a	R1 (mg/ml)	Average Peak Area ^b	R2 (mg/ml)	P (mg/ml)	% yield Inulin
แก่นตะวัน	291031.33	0.5450	1624465.67	0.1006	10.000	4.89
กลัวย	106548.33	0.3527	1047330.33	0.0391	10.002	3.45
กระจับ	146824.33	0.4213	1253328.00	0.0525	10.001	4.06
กระเทียม	257449.00	0.3319	985153.33	0.0894	10.002	2.67
กระเทียม	2162778.00	0.9115	2723872.00	0.7245	10.001	2.06
กลอย	879560.67	0.5333	1589150.67	0.2967	10.001	2.60
ขนุน	1949479.67	0.8579	2563128.00	0.7476	10.002	0.34
มันแกว	1008665.00	0.5877	1752359.33	0.3398	10.003	2.73
มันฝรั่ง	401309.67	0.4303	1280291.00	0.1373	10.001	3.22
มันมือเสือ	1248004.00	0.5932	1769078.33	0.4195	10.002	1.91
เผือก	1719838.33	0.6075	1811877.67	0.5768	10.001	1.21
ฝรั่ง	396880.00	0.3984	1184551.33	0.1358	10.000	2.89
หอมแดง	1777046.00	0.8691	2596725.00	0.5959	10.003	3.00
หัวหอม	154147300	0.8345	2492730.00	0.5174	10.000	3.49
แห้ว	1786322.33	0.6910	2062388.67	0.5990	10.002	1.01
สามสิบ	618999.00	0.7100	2119282.67	0.2099	10.000	5.50
สาคุ	1733464.00	0.6703	2000179.33	0.5814	10.001	0.98

^a Average Peak Area ของน้ำตาลฟรุคโตสจากสารสกัดพืชหลังเติมเอนไซม์อินนูลินเนส

^b Average Peak Area ของน้ำตาลฟรุคโตสจากสารสกัดพืชก่อนเติมเอนไซม์อินนูลินเนส

3.3 ผลของสารสกัดอินนูลินต่อการเจริญของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli*

3.3.1 ผลของอินนูลินมาตรฐานต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* สายพันธุ์ต่างๆ

3.3.1.1 ในสภาวะ anaerobic (มี paraffin) นับจำนวนเชื้อโดยวัดค่า OD

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีอากาศ โดยผสมสารอินนูลินมาตรฐานในปริมาณต่างๆ พบว่า เชื้อ *Lactobacilli* ทั้ง 4 สายพันธุ์มีการเจริญแตกต่างกัน ดังตารางที่ 9 และรูปที่ 6 โดย *L. plantarum* ATCC 14917 มีการเจริญมากที่สุด เมื่อมีอินนูลินผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 2% โดยเฉพาะช่วงที่เป็น steady state ขณะที่ control ซึ่งไม่มีอินนูลินผสมอยู่พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อลดลงเมื่อเข้าสู่ช่วง steady state ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่มีอินนูลินผสมอยู่ในปริมาณ 1% และ 4%

สำหรับเชื้อ *L. plantarum* No.4 และ *Lcatobacillus* sp. No.5 พบว่า การเจริญในสภาวะไม่มีอากาศเมื่อเติมอินนูลิน ให้ผลการเจริญที่ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control และปริมาณเชื้อที่เจริญได้ดีเท่า *L. plantarum* ATCC 14917 โดยจะมีจำนวนเชื้อน้อยกว่าประมาณ 3 เท่า

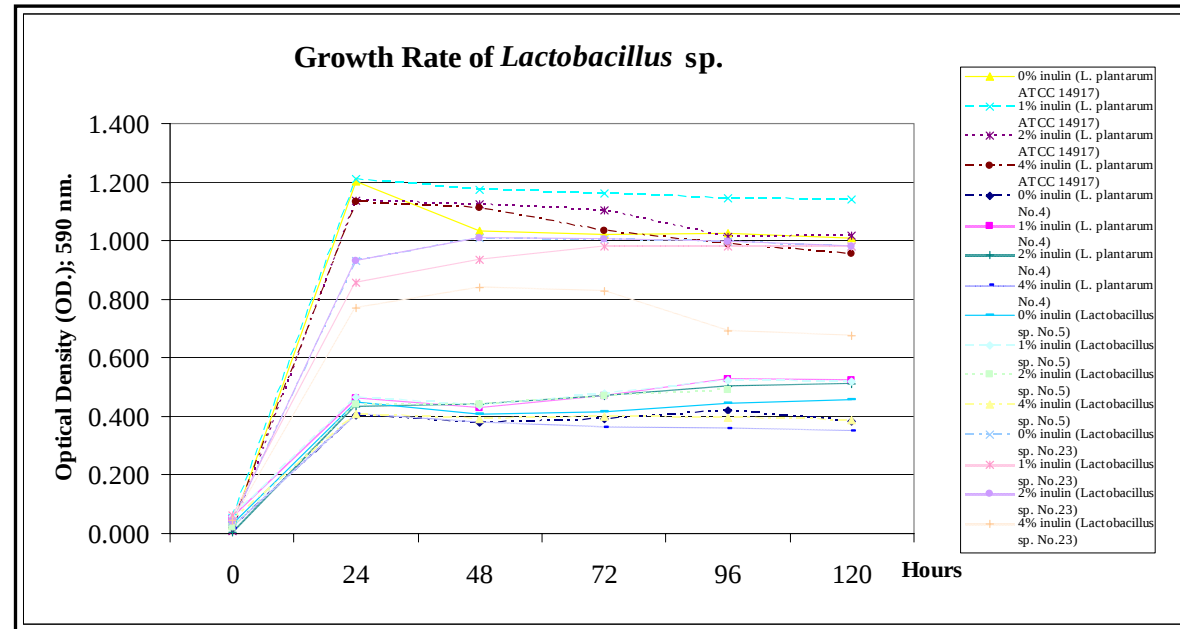
ส่วนเชื้อ *Lcatobacillus* sp. No. 23 มีอัตราการเจริญที่ดีกว่ากลุ่ม control โดยมีการเจริญที่ดีที่สุดเมื่อเติมอินนูลินในปริมาณ 2% ตามด้วย 1% และ 4% ตามลำดับ

ซึ่งจากผลที่ได้จะเห็นว่าในสภาวะไม่มีอากาศ เชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 มีการเจริญที่ดีที่สุด ตามด้วย *Lcatobacillus* sp. No. 23 โดยทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเติมอินนูลินในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 2% จะให้อัตราการเจริญที่ดีที่สุด ขณะที่การเจริญของเชื้อ *L. plantarum* No.4 และ *Lcatobacillus* sp. No.5 ในสภาวะไม่มีอากาศมีการเจริญที่น้อยกว่าไม่ว่าจะมีอินนูลินหรือไม่ (ตารางที่ 10 และรูปที่ 6)

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacilli* ในการเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศ

Microorganisms	Hours	Optical density values			
		0% Inulin	1% Inulin	2% Inulin	4% Inulin
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	0.031	0.055	0.009	0.030
	24	1.204	1.212	1.136	1.133
	48	1.032	1.172	1.123	1.113
	72	1.020	1.160	1.103	1.032
	96	1.023	1.145	1.014	0.988
	120	1.010	1.142	1.016	0.956
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> No.4	0	0.021	0.048	0.003	0.015
	24	0.405	0.462	0.434	0.406
	48	0.379	0.429	0.442	0.379
	72	0.391	0.469	0.469	0.361
	96	0.420	0.526	0.501	0.357
	120	0.382	0.522	0.510	0.348
3. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 5	0	0.032	0.058	0.021	0.047
	24	0.450	0.466	0.440	0.406
	48	0.409	0.435	0.441	0.391
	72	0.417	0.478	0.470	0.400
	96	0.443	0.522	0.490	0.397
	120	0.458	0.520	0.500	0.389
4. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 23	0	0.040	0.062	0.023	0.045
	24	0.932	0.858	0.773	0.770
	48	1.011	0.935	0.884	0.841
	72	1.006	0.978	0.929	0.828
	96	0.997	0.978	0.922	0.692
	120	0.979	0.979	0.921	0.676

รูปที่ 6 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบในสภาวะไม่มีอากาศ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ inulin



3.3.1.2 ในสภาวะ aerobic ไม่มี paraffin นับจำนวนเชื้อโดยนับจำนวน colony

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีอากาศ โดยวิธีการวัดการเจริญของเชื้อดูจากการนับจำนวน colonies ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 11 และรูปที่ 7 พบว่า ผลการเจริญของเชื้อทั้งสี่สายพันธุ์ดีที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงแต่หลังจากนั้น ไม่ว่าจะมียินนูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือไม่ การเจริญของเชื้อจะลดลงเรื่อย ๆ ยกเว้นเชื้อ *L. plantarum* No.4 ที่มีอินนูลิน 4% จะให้การเจริญที่คงที่ที่ประมาณ 10^9 cfu/ml

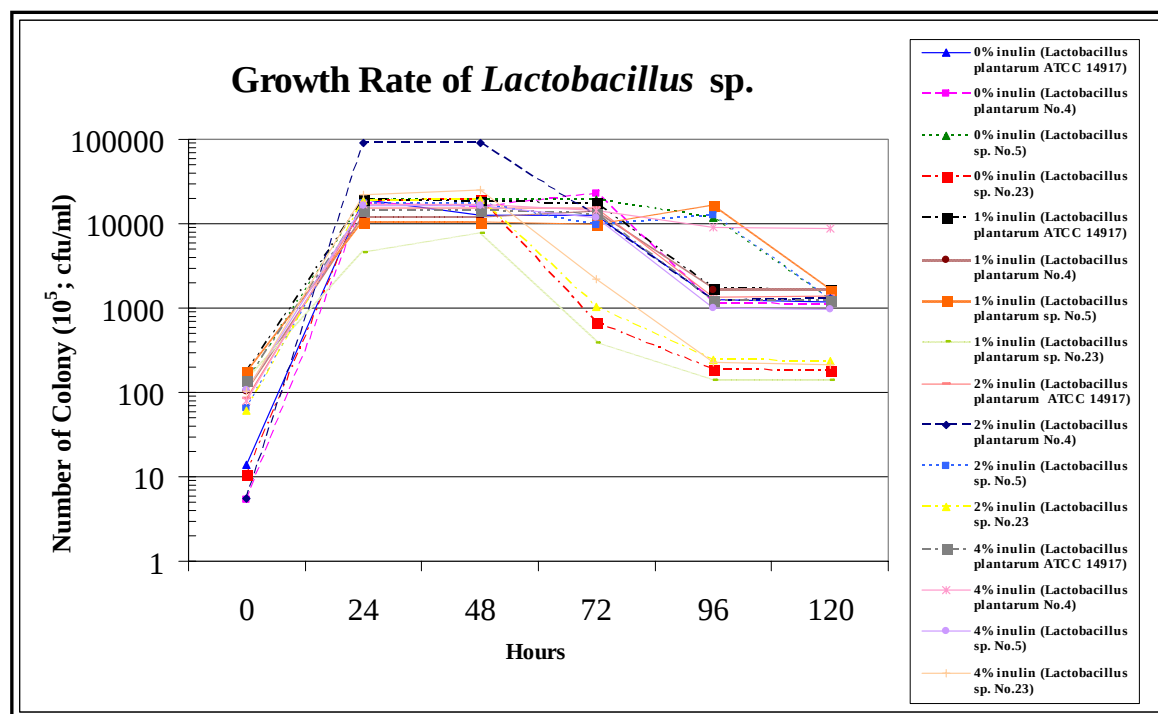
จะเห็นได้ว่าการที่เชื้อมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างจากผลในหัวข้อ 3.3.1.1 โดยจะเห็นได้ว่าการเจริญในสภาวะไม่มีอากาศให้ผลการเจริญที่ดีกว่า ดังนั้นการทดลองหลังจากนี้จึงจะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีอากาศ นอกจากนี้วิธีการวัดการเจริญของเชื้อ ซึ่งการใช้วิธีการนับจำนวน colony อาจให้ผลที่ไม่แม่นยำได้ ซึ่งในการทดลองการศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เชื้อต้องการใช้ในหัวข้อ 3.3.1.3 จะมีการเปรียบเทียบให้เห็นผลที่แตกต่างระหว่างวิธีการวัดการเจริญโดยดูจากค่า optical density และการนับจำนวน colony ของเชื้อ

ตารางที่ 11 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacilli* ในการเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศ

Microorganisms	Hours	Number of colonies (cfu/ml)			
		0% inulin	1% inulin	2% inulin	4% inulin
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	1.41×10^6	1.77×10^7	8.43×10^6	1.37×10^7
	24	1.91×10^9	1.91×10^9	1.55×10^9	1.45×10^9
	48	1.25×10^9	1.82×10^9	1.54×10^9	1.43×10^9
	72	1.26×10^9	1.73×10^9	1.53×10^9	1.32×10^9
	96	1.25×10^8	1.70×10^8	1.33×10^8	1.20×10^8
	120	1.18×10^8	1.65×10^8	1.38×10^8	1.21×10^8
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> No.4	0	5.37×10^5	1.03×10^7	5.53×10^5	7.90×10^6
	24	1.77×10^9	1.17×10^9	8.97×10^8	1.72×10^9
	48	1.59×10^9	1.16×10^9	8.93×10^8	1.67×10^9
	72	2.27×10^9	1.39×10^9	1.22×10^9	1.44×10^9
	96	1.14×10^8	1.65×10^8	1.23×10^8	9.13×10^8
	120	1.11×10^8	1.62×10^8	1.28×10^8	8.70×10^8

Microorganisms	Hours	Number of colonies (cfu/ml)			
		0% inulin	1% inulin	2% inulin	4% inulin
3. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 5	0	1.34×10^7	1.77×10^7	6.43×10^6	1.07×10^7
	24	1.94×10^9	1.05×10^9	1.74×10^9	1.62×10^9
	48	1.91×10^9	1.02×10^9	1.73×10^9	1.62×10^9
	72	1.93×10^9	9.73×10^8	9.53×10^8	1.17×10^9
	96	1.17×10^9	1.66×10^9	1.25×10^9	9.93×10^7
	120	1.24×10^8	1.61×10^8	1.25×10^8	9.53×10^7
4. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 23	0	1.08×10^6	1.43×10^7	6.1×10^6	1.03×10^7
	24	1.87×10^9	4.57×10^8	1.87×10^9	2.22×10^9
	48	1.94×10^9	7.57×10^8	1.91×10^9	2.52×10^9
	72	6.77×10^7	3.83×10^7	1.02×10^8	2.22×10^8
	96	1.88×10^7	1.39×10^7	2.41×10^7	2.26×10^7
	120	1.78×10^7	1.39×10^7	2.39×10^7	2.10×10^7

รูปที่ 7 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบในสภาวะมีอากาศ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ inulin



3.3.1.3 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เชื้อต้องการใช้

ในการทดลองนี้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เชื้อเลือกใช้ในการเป็นแหล่งอาหาร ทั้งนี้เพื่อต้องการทราบว่า ถ้าในสภาวะอาหารเพาะเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆอยู่ เชื้อจะชอบการเจริญเมื่อมีน้ำตาลชนิดใด ซึ่งในการทดลองนี้เปรียบเทียบระหว่าง glucose, dextrose, lactose, inulin ในปริมาณ 2%

จากผลการทดลองดังตารางที่ 12 และรูปที่ 8 เมื่อวัดการเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่า optical density (OD) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ATCC14917 ให้ผลการเจริญที่ดีที่สุด เป็นไปทางเดียวกับในหัวข้อ 3.3.1.1 โดยเชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเติม glucose ตามด้วย dextrose, lactose และ inulin ตามลำดับ แต่กราฟการเจริญของเชื้อเมื่อมี dextrose จะไม่คงที่ มีการลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป สำหรับเชื้ออีกสามสายพันธุ์พบว่า มีการเจริญที่น้อยกว่า *L. plantarum* ATCC14917 ประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้ทั้งสามสายพันธุ์จะมีการเจริญที่ดีที่สุดเมื่อมีการเติม glucose เช่นเดียวกัน

แต่เมื่อทำการวัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการนับจำนวน colonies พบว่าให้ผลที่ไม่ดี การเจริญของเชื้อมีอัตราขึ้นลงไม่แน่นอน (ตารางที่ 13 และรูปที่ 9) ซึ่งอาจเนื่องจากวิธีการวัดที่อาจมีความผิดพลาดดังที่ได้กล่าวมาในหัวข้อ 3.3.1.2 ดังนั้นในการทดลองหัวข้อต่อไปจึงจะเลือกใช้วิธีวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่า OD แทน

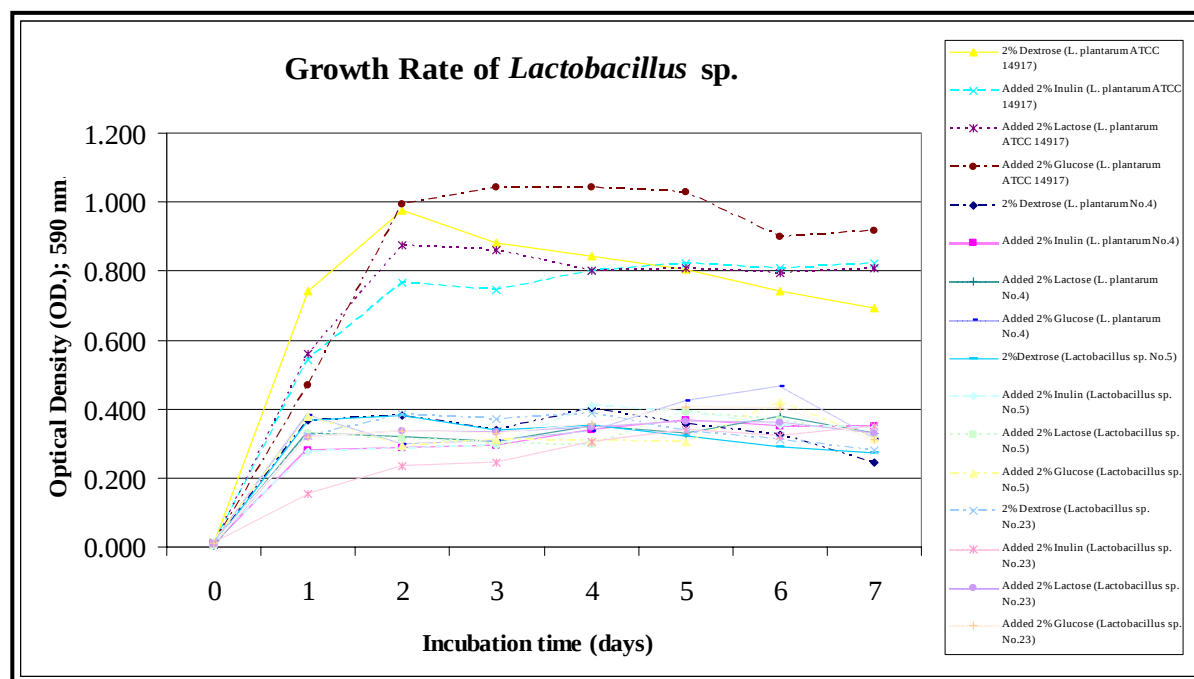
ส่วนในการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดต่างที่ได้หลังจากเชื้อเจริญ พบว่าไม่ว่าจะเติมแหล่งคาร์บอนใด ค่าความเป็นกรดจะเพิ่มขึ้นโดยจะให้ค่าในช่วงใกล้เคียงกัน คือประมาณ pH 4.0-4.5 ผลดังตารางที่ 14 และรูปที่ 10 ซึ่งจากผลที่ได้ดังกล่าว อาจสรุปได้ว่าเชื้อ *Lactobacilli* จะมีการเจริญที่ดีที่สุดเมื่อมีน้ำตาล glucose เป็นแหล่งอาหาร

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacilli* เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

Microorganisms	Days	Optical density values			
		2% Dextrose	2% Inulin	2% Lactose	2% Glucose
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	0.012	0.010	0.007	0.009
	1	0.743	0.542	0.561	0.467
	2	0.975	0.765	0.876	0.994
	3	0.880	0.746	0.861	1.043
	4	0.844	0.802	0.802	1.041
	5	0.806	0.823	0.807	1.027
	6	0.743	0.808	0.796	0.900
	7	0.692	0.823	0.807	0.918

2. <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> No.4	0	0.009	0.012	0.005	0.013
	1	0.368	0.281	0.330	0.380
	2	0.380	0.286	0.320	0.297
	3	0.339	0.293	0.304	0.308
	4	0.401	0.340	0.350	0.335
	5	0.356	0.366	0.330	0.423
	6	0.326	0.350	0.378	0.465
	7	0.244	0.350	0.328	0.310
3. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 5	0	0.006	0.014	0.005	0.013
	1	0.366	0.277	0.330	0.379
	2	0.381	0.288	0.316	0.295
	3	0.339	0.295	0.302	0.312
	4	0.354	0.409	0.297	0.307
	5	0.323	0.391	0.392	0.304
	6	0.291	0.353	0.369	0.418
	7	0.274	0.346	0.326	0.313
4. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 23	0	0.015	0.010	0.005	0.011
	1	0.320	0.155	0.318	0.317
	2	0.383	0.234	0.336	0.336
	3	0.370	0.244	0.333	0.327
	4	0.389	0.303	0.347	0.358
	5	0.336	0.340	0.364	0.407
	6	0.313	0.323	0.362	0.402
	7	0.281	0.350	0.328	0.310

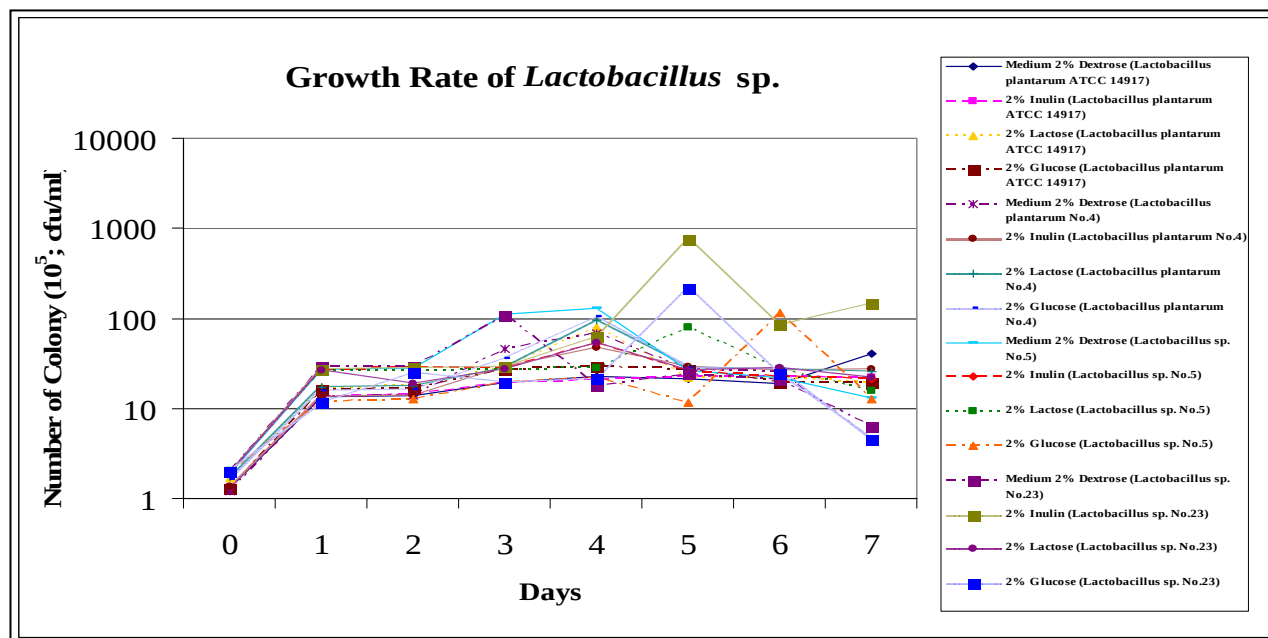
รูปที่ 8 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
ที่ใช้แหล่ง Carbon source ต่างๆ โดยวัดค่า OD



ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacilli* โดยการนับจำนวน colonies ของเชื้อเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

Microorganisms	Days	Number of colonies (cfu/ml)			
		2%Dextrose	2% Inulin	2% Lactose	2%Glucose
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	1.32×10^5	1.31×10^5	1.70×10^5	1.28×10^5
	1	1.35×10^6	1.34×10^6	1.74×10^6	1.60×10^6
	2	1.41×10^6	1.42×10^6	1.79×10^6	1.68×10^6
	3	1.96×10^6	1.97×10^6	2.88×10^6	2.73×10^6
	4	2.29×10^6	2.10×10^6	7.87×10^6	2.89×10^6
	5	2.12×10^6	2.25×10^6	2.17×10^6	2.73×10^6
	6	1.90×10^6	2.27×10^6	2.17×10^6	1.95×10^6
	7	3.97×10^5	2.17×10^6	1.95×10^6	1.94×10^6
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> No.4	0	1.21×10^5	1.35×10^5	1.75×10^5	1.61×10^5
	1	1.35×10^6	1.34×10^6	1.74×10^6	1.59×10^6
	2	1.41×10^6	1.40×10^6	1.76×10^6	1.64×10^6
	3	4.53×10^6	2.87×10^6	2.80×10^6	3.57×10^5
	4	6.80×10^6	4.67×10^6	9.43×10^6	1.04×10^7
	5	2.76×10^6	2.92×10^6	2.81×10^6	2.81×10^6
	6	2.53×10^6	2.62×10^6	2.74×10^6	2.70×10^6
	7	4.53×10^5	2.75×10^6	2.54×10^6	4.17×10^5
3. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 5	0	1.91×10^5	1.93×10^5	2.01×10^5	1.96×10^5
	1	2.75×10^6	2.72×10^6	2.61×10^6	1.18×10^6
	2	2.81×10^6	2.78×10^6	2.66×10^6	1.25×10^6
	3	1.11×10^7	2.81×10^6	2.72×10^6	1.96×10^6
	4	1.30×10^6	5.40×10^6	2.81×10^6	2.17×10^6
	5	2.66×10^6	2.60×10^6	7.97×10^6	2.11×10^6
	6	2.22×10^6	2.27×10^6	2.76×10^6	1.14×10^7
	7	1.32×10^6	2.16×10^6	1.59×10^6	1.26×10^6
4. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 23	0	1.97×10^5	1.97×10^5	1.96×10^5	1.96×10^5
	1	2.92×10^6	2.72×10^6	2.64×10^6	1.17×10^6
	2	2.94×10^6	2.79×10^6	1.91×10^6	2.52×10^6
	3	1.07×10^7	2.94×10^6	2.76×10^6	1.93×10^6
	4	1.77×10^7	6.17×10^6	5.40×10^6	2.13×10^6
	5	2.44×10^6	1.24×10^6	7.37×10^6	2.66×10^6
	6	2.08×10^6	8.55×10^6	2.83×10^6	2.38×10^6
	7	6.33×10^5	1.45×10^7	2.22×10^6	4.47×10^5

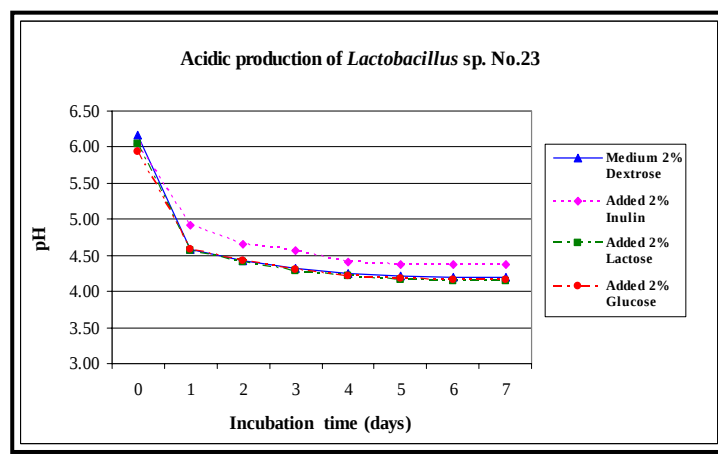
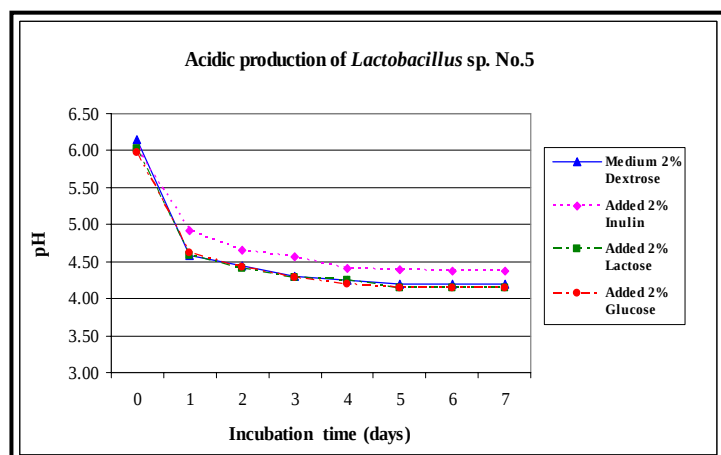
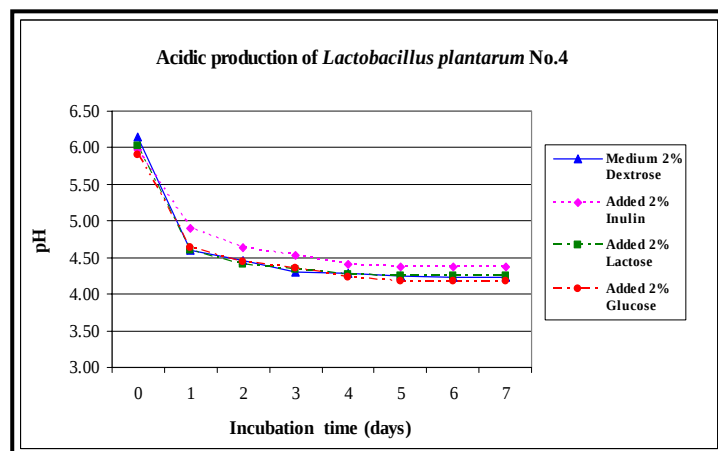
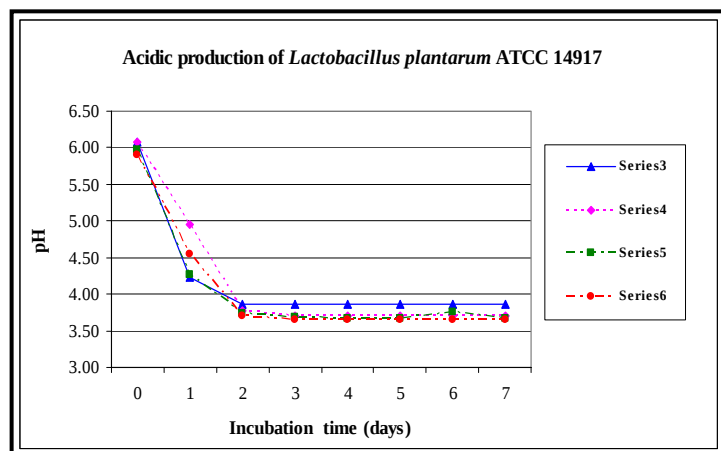
รูปที่ 9 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ใช้แหล่ง Carbon Source ต่างๆ
โดยการนับจำนวน colonies ของเชื้อ



ตารางที่ 14 ค่า pH เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

Microorganisms	Days	pH Level			
		2% Dextrose	2% Inulin	2% Lactose	2% Glucose
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	6.08	6.08	5.98	5.90
	1	4.23	4.95	4.27	4.54
	2	3.87	3.78	3.73	3.71
	3	3.87	3.70	3.69	3.65
	4	3.87	3.70	3.67	3.65
	5	3.87	3.70	3.67	3.65
	6	3.87	3.70	3.76	3.65
	7	3.87	3.70	3.67	3.65
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> No.4	0	6.15	5.97	6.02	5.90
	1	4.60	4.90	4.60	4.63
	2	4.46	4.64	4.40	4.44
	3	4.31	4.53	4.33	4.35
	4	4.29	4.40	4.27	4.23
	5	4.25	4.37	4.25	4.18
	6	4.23	4.37	4.24	4.17
	7	4.23	4.37	4.24	4.17
3. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 5	0	6.14	6.02	6.02	5.97
	1	4.58	4.91	4.58	4.61
	2	4.44	4.65	4.40	4.43
	3	4.31	4.57	4.28	4.29
	4	4.24	4.41	4.25	4.20
	5	4.20	4.39	4.15	4.15
	6	4.20	4.38	4.15	4.15
	7	4.20	4.38	4.15	4.15
4. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 23	0	6.17	6.04	6.04	5.93
	1	4.59	4.91	4.56	4.59
	2	4.43	4.66	4.40	4.42
	3	4.32	4.56	4.29	4.30
	4	4.25	4.41	4.22	4.21
	5	4.21	4.38	4.16	4.17
	6	4.20	4.38	4.15	4.16
	7	4.20	4.38	4.15	4.16

รูปที่ 10 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
ที่ใช้แหล่ง Carbon source ต่างๆ โดยวัดค่า pH



3.3.2 ผลของสารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli*

3.3.2.1 ทดสอบกับสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุน (ซึ่งจากผลการวิจัยในเบื้องต้น คาดว่าจะมีอินนูลินอยู่)

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.1 ที่ผ่านมามีพบว่า การเติมอินนูลินในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้เชื้อมีการเจริญที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ดังนั้นในหัวข้อการทดลองนี้จึงทำการทดลองเมื่อใช้อินนูลิน ที่อยู่ในรูปของสารสกัดจากพืชที่มีผลเบื้องต้นว่าน่าจะมีอินนูลินเป็นส่วนประกอบอยู่มาศึกษา เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะให้ผลการเจริญของเชื้อที่ดีที่สุด โดยเลือกสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุน ทำการทดลองโดยใช้ปริมาณ 0, 2, 4, และ 6%

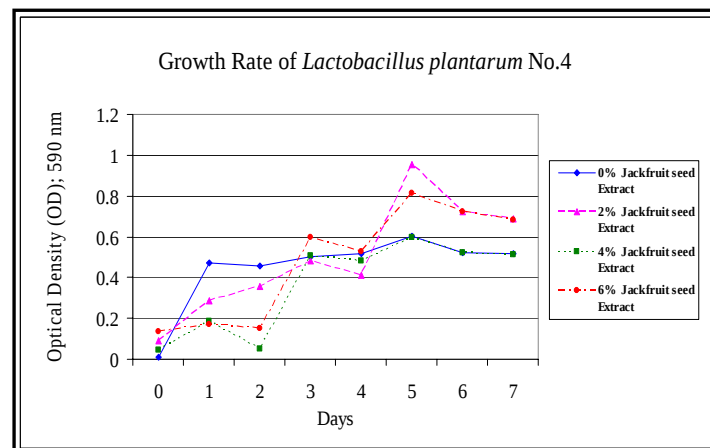
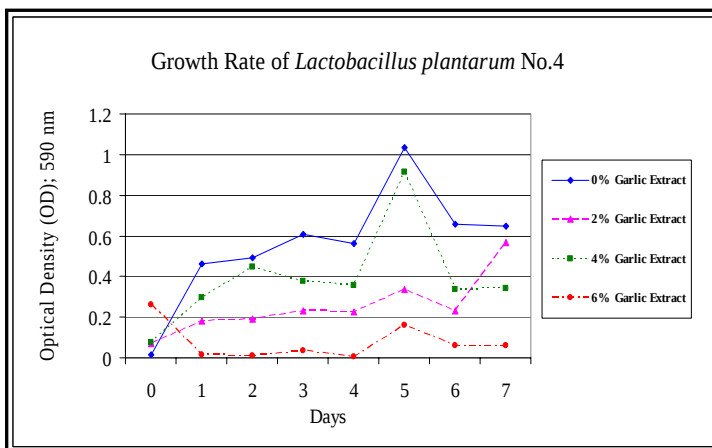
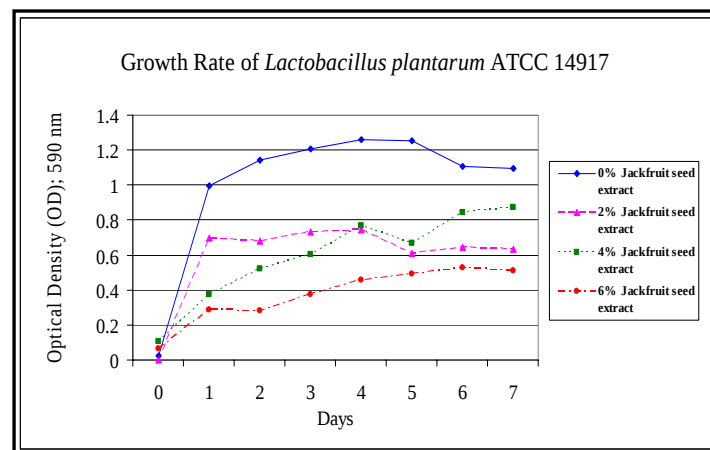
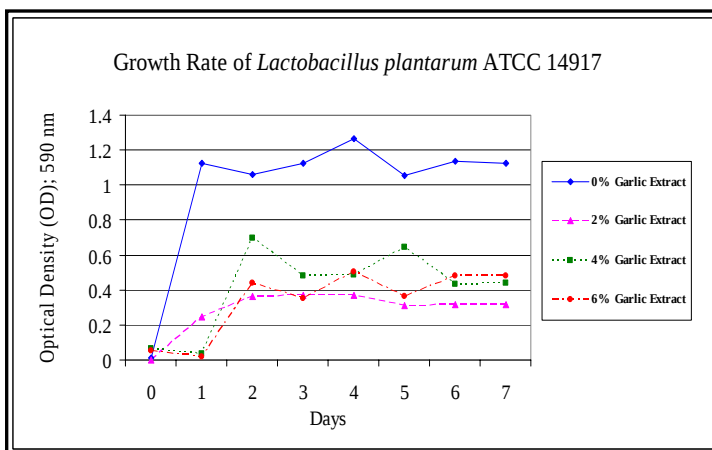
แต่จากผลการทดลองดังตารางที่ 15 และรูปที่ 11 กลับพบว่าการเติมสารสกัดทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลให้การเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* ทั้งสองสายพันธุ์คือ *L. plantarum* ATCC 14917 และ *L. plantarum* No.4 น้อยกว่ากลุ่ม control ยกเว้นกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเม็ดขนุนต่อเชื้อ *L. plantarum* No.4 ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่ม control

ผลที่ได้นี้อาจเนื่องมาจากปริมาณอินนูลินที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดมีน้อย นอกจากนี้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดลองเป็นอาหารสำเร็จรูปซึ่งมีน้ำตาล dextrose ผสมอยู่ อาจทำให้เชื้อเลือกใช้แหล่งคาร์บอนจาก dextrose แทนที่ inulin ดังผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.1.3 ดังนั้น เพื่อให้ผลการทดลองไม่ถูกรบกวนจากปัจจัยดังกล่าว ในการทดลองต่อไป จึงจะเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นเอง โดยให้สารสกัดจากพืชที่มีอินนูลินเป็นสารสำคัญเป็นแหล่งคาร์บอนแทนที่น้ำตาล dextrose

ตารางที่ 15 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacilli* เมื่อมีการเติมสารสกัดจากกระเทียมและเม็ดขนุน

Microorganisms	Days	Optical Density Values							
		Garlic				Jackfruit seed			
		0% extract	2% extract	4% extract	6% extract	0% extract	2% extract	4% extract	6% extract
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	0.012	0.002	0.063	0.052	0.026	0.002	0.107	0.067
	1	1.127	0.244	0.034	0.019	0.995	0.697	0.374	0.286
	2	1.063	0.365	0.698	0.439	1.141	0.678	0.519	0.280
	3	1.125	0.368	0.482	0.349	1.208	0.734	0.602	0.377
	4	1.265	0.369	0.488	0.504	1.260	0.745	0.765	0.457
	5	1.056	0.311	0.644	0.363	1.255	0.611	0.668	0.493
	6	1.136	0.315	0.434	0.479	1.105	0.643	0.843	0.524
	7	1.123	0.317	0.437	0.480	1.096	0.635	0.875	0.512
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> No.4	0	0.014	0.069	0.078	0.262	0.008	0.093	0.047	0.136
	1	0.462	0.181	0.297	0.014	0.474	0.287	0.186	0.169
	2	0.491	0.192	0.445	0.011	0.456	0.355	0.051	0.152
	3	0.610	0.229	0.378	0.033	0.502	0.480	0.505	0.599
	4	0.560	0.225	0.356	0.006	0.515	0.413	0.480	0.530
	5	1.033	0.338	0.916	0.161	0.604	0.955	0.599	0.816
	6	0.657	0.233	0.336	0.060	0.521	0.724	0.520	0.724
	7	0.649	0.569	0.341	0.059	0.518	0.688	0.512	0.682

รูปที่ 11 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium
เปรียบเทียบเมื่อเติมสารสกัดจากกระเทียมและเมล็ดขนุน



3.3.2.2 ปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเตรียมขึ้นเอง เติมแหล่งคาร์บอนอินนูลินแทนที่ dextrose

ในหัวข้อนี้ได้ทำการปรับสูตรอาหารเพาะเชื้อ โดยแทนที่ dextrose ด้วยสารอินนูลินมาตรฐาน เพื่อดูว่าการเจริญของเชื้อจะให้ผลอย่างไรเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นอินนูลินแทน

จากผลการทดลองตามตารางที่ 16 และรูปที่ 12 พบว่าเชื้อ *Lactobacilli* ทั้งสามสายพันธุ์มีการเจริญที่ดีมากกว่ากลุ่ม control อย่างชัดเจนหลังจาก 48 ชั่วโมง เมื่อเติมอินนูลินในปริมาณ 2% โดยการเจริญให้กราฟลักษณะเพิ่มขึ้นตลอด และพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. Pro.23 มีการเจริญที่ดีที่สุด โดยให้ค่า OD สูงสุดที่วันที่ 7

อย่างไรก็ตาม พบว่าการเจริญของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ ไม่ให้ผลแตกต่างจากกลุ่ม control เมื่อเติมอินนูลินในปริมาณ 1 และ 4%

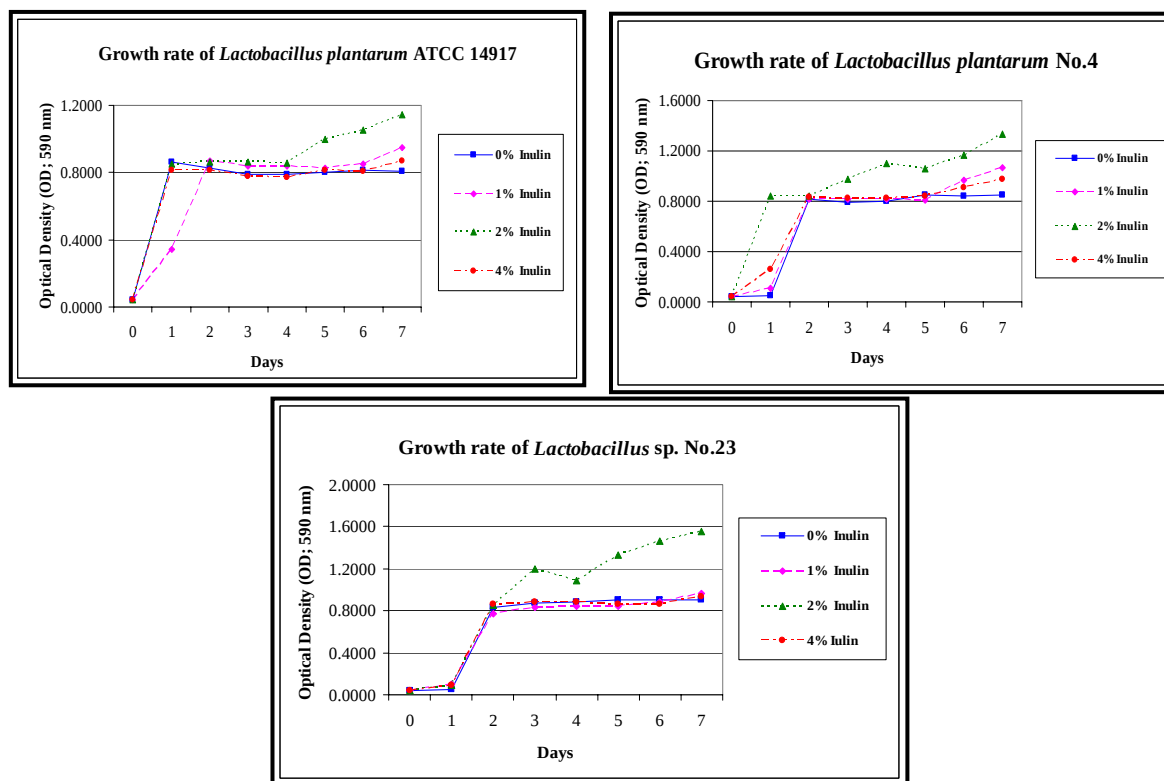
ดังนั้นในหัวข้อการทดลองลำดับต่อไป จะศึกษาถึงผลของสารสกัดจากพืชที่มีอินนูลิน โดยใช้สูตรอาหารที่เตรียมขึ้นเอง

ตารางที่ 16 ค่า optical density ของเชื้อ *Lactobacilli* เมื่อมีการปรับสูตรอาหารเพาะเลี้ยง

Microorganisms	Days	Optical density values			
		0% Inulin	1% Inulin	2% Inulin	4% Inulin
1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0	0.0403	0.0410	0.0420	0.0453
	1	0.8627	0.3407	0.8513	0.8130
	2	0.8273	0.8697	0.8623	0.8130
	3	0.7907	0.8390	0.8643	0.7767
	4	0.7883	0.8380	0.8597	0.7737
	5	0.8047	0.8280	0.9950	0.8127
	6	0.8117	0.8493	1.0513	0.8060
	7	0.8067	0.9490	1.1427	0.8713
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> No.4	0	0.0403	0.0400	0.0417	0.0453
	1	0.0470	0.1063	0.8447	0.2570
	2	0.8157	0.8190	0.8447	0.8327
	3	0.7887	0.8163	0.9763	0.8267
	4	0.8020	0.8163	1.1037	0.8243
	5	0.8470	0.8050	1.0577	0.8447
	6	0.8453	0.9693	1.1680	0.9107
	7	0.8483	1.0680	1.3327	0.9790

3. <i>Lactobacillus</i> sp. No. 23	0	0.0420	0.0407	0.0413	0.0440
	1	0.0510	0.1010	0.0950	0.0910
	2	0.8320	0.7717	0.8550	0.8640
	3	0.8727	0.8327	1.1960	0.8843
	4	0.8787	0.8397	1.0880	0.8790
	5	0.9067	0.8387	1.3283	0.8590
	6	0.9040	0.8820	1.4593	0.8673
	7	0.9050	0.9643	1.5570	0.9320

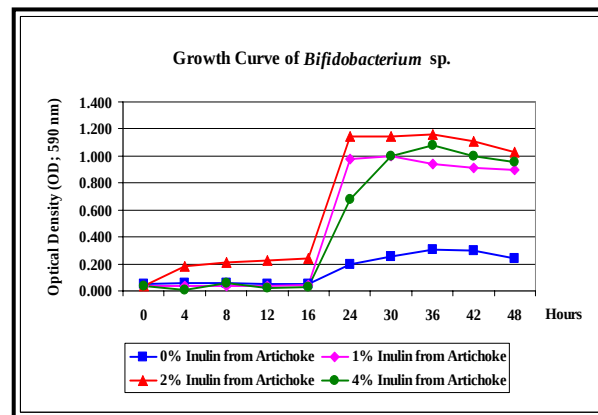
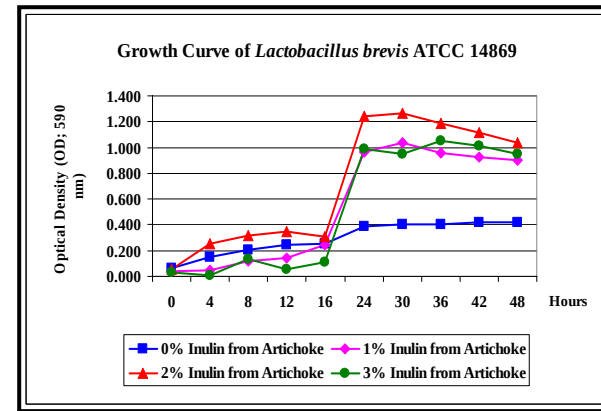
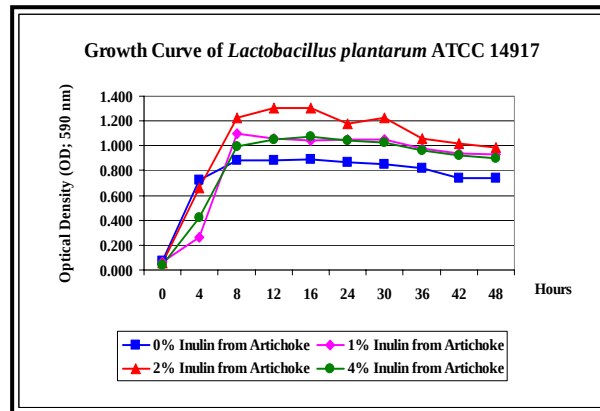
รูปที่ 12 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium ที่ระดับความเข้มข้นของอินนูลินต่างๆ เมื่อมีการปรับสูตรอาหารเพาะเลี้ยง



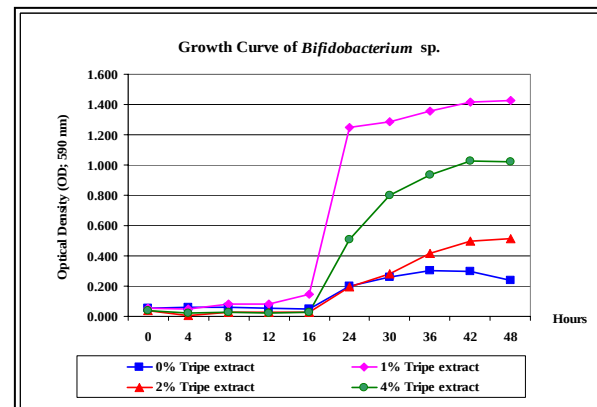
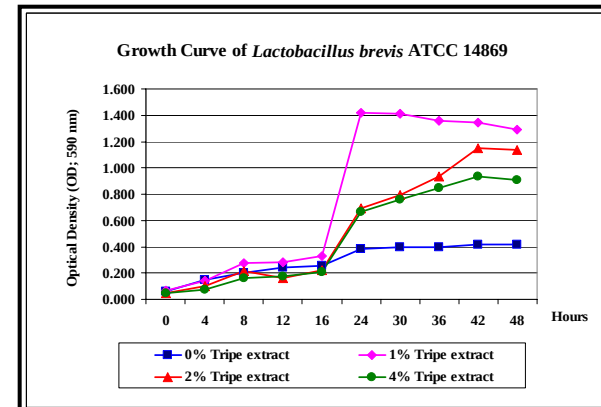
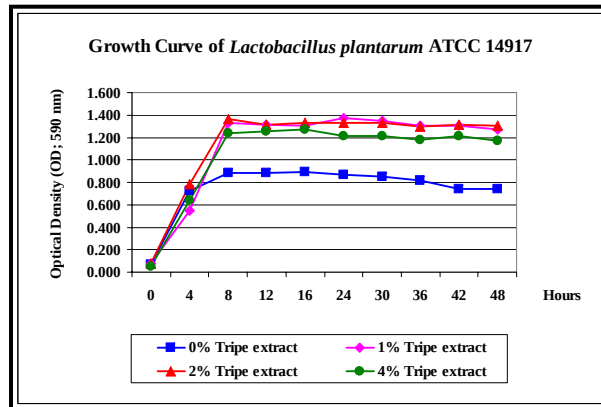
3.3.2.3 ผลการทดสอบเมื่อใช้สารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ สูตรอาหารเตรียมขึ้นเอง

ผลการเติมสารสกัดพืชที่นำมาทดสอบทั้ง 17 ชนิดมีผลต่อการเจริญของเชื้อ probiotics ทั้ง *Lactobacilli* และ *bifidobacterium* แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัดจากรากสามสิบแสดงผลเพิ่มการเจริญของเชื้อ probiotics ทั้ง *Lactobacilli* และ *Bifidobacterium* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ปริมาณสารสกัดที่ 1% จะให้ผลดีที่สุด ทั้งนี้พบว่าผลการเพิ่มการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. จากสารสกัดรากสามสิบให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมสารอินนูลินมาตรฐานอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14 นอกจากนี้ยังมีพืชอื่นๆ ที่ให้ผลที่ดีต่อการเจริญของเชื้อ probiotics ทั้งสองชนิด ได้แก่ แก่นตะวัน ฝรั่ง กระเทียม หัวหอม หอมแดง โดยส่วนใหญ่ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4% จะให้ผลดีที่สุด ยกเว้นจากสารสกัดฝรั่ง ปริมาณสารสกัด 1% เพิ่มการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าปริมาณอื่นๆ ส่วนพืช เช่น มันทือเสือ กระเจี๊ยบ และมันแกว ให้ผลเพิ่มการเจริญของเชื้อ probiotic เฉพาะเชื้อ *Bifidobacterium* แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* นอกจากนี้การเติมสารสกัดจากพืช ได้แก่ มันฝรั่ง กลอย กัลวีย เม็ดขนุน แห้ว และเผือก มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium* ดังแสดงในรูปที่ 23-36

รูปที่ 13 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเอง โดยใช้
Inulin standard เป็น Carbon Source



รูปที่ 14 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเอง โดยใช้
สารสกัดจากรากสามสิบ เป็น Carbon Source

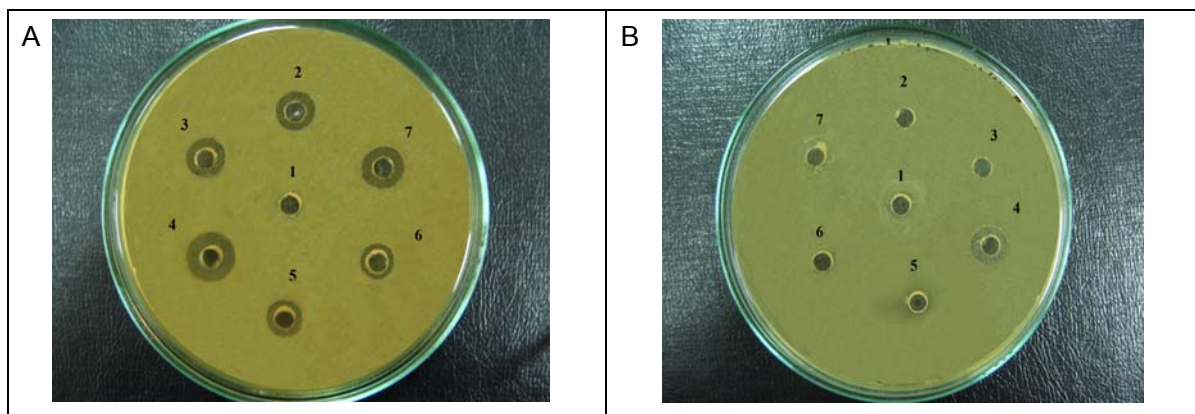


3.4 ผลของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสมสารสกัดอินูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค

3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อโดยวิธี Agar well diffusion method

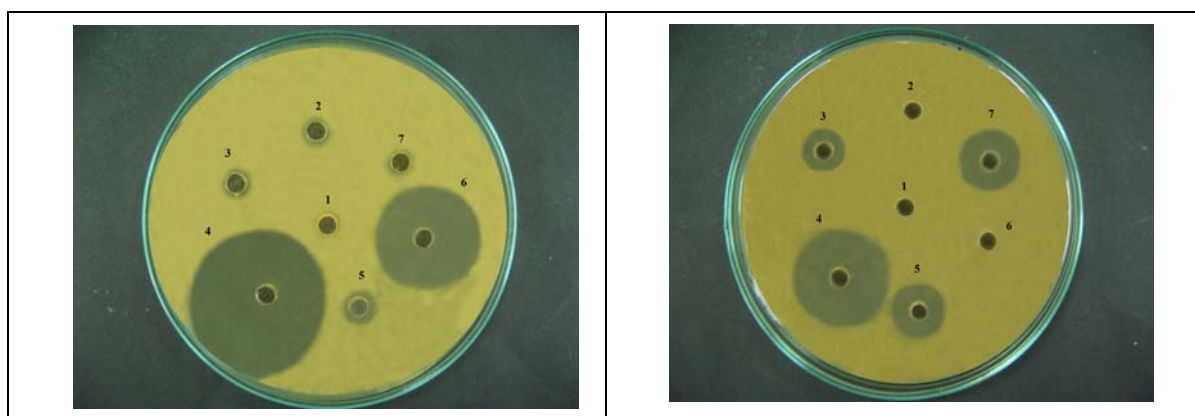
จากการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสม 2% ของสารสกัดหยาบพืช 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ โดยวิธี Agar well diffusion (รูปที่ 15) พบว่า เมื่อพิจารณาจากวงใส สารสกัดหยาบจากแก่นตะวันมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ในการต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (วงใสขนาด 13 มม.) ส่วนอินูลินมาตรฐานที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบของหอมหัวใหญ่ สามสิบ และฝรั่งโดยมีขนาดของวงใสเฉลี่ยเท่ากับ 10.67, 10.67, 10.33 และ 10.00 มม. ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบของมันแกวมียาขนาดวงใสเท่ากับ 8.33 มม. เมื่อเปรียบเทียบกับวงใสของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปราศจากการเติมสารสกัดพืชใดๆ ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ แต่ในส่วน of เชื้อ *Bifidobacterium longum* กลับพบว่า มีเพียงสารสกัดหยาบจากแก่นตะวันเท่านั้นที่มีฤทธิ์เสริมการต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดี (วงใสขนาด 10.67 มม.)

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสม 2% ของสารสกัดหยาบพืช 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ โดยวิธี Agar well diffusion (รูปที่ 16) พบว่า เมื่อพิจารณาจากวงใส สารสกัดหยาบจากมันแกวมียาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (วงใสขนาด 33.33 มม.) ส่วนสารสกัดหยาบของหอมหัวใหญ่มีขนาดวงใสเท่ากับ 28.67 มม. ส่วนอินูลินมาตรฐานที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบของแก่นตะวัน สามสิบ และฝรั่งโดยมีขนาดของวงใสเฉลี่ยเท่ากับ 8.00, 8.33, 8.00 และ 9.33 มม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวงใสของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปราศจากการเติมสารสกัดพืชใดๆ ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ แต่ในส่วน of เชื้อ *Bifidobacterium longum* กลับพบว่า มีเพียงสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่และอินูลินมาตรฐานเท่านั้นที่ไม่มีฤทธิ์เสริมการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในขณะที่สารสกัดหยาบจากสามสิบ ฝรั่ง แก่นตะวัน และมันแกวมียาฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยมีขนาดของวงใสเฉลี่ยเท่ากับ 13.00, 19.67, 20.00 และ 25.33 มม. ตามลำดับ



รูปที่ 15 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (A) และ *Bifidobacterium longum* (B) ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสม 2% ของอินนูลินมาตรฐานและสารสกัดหยาบพีช 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ โดยวิธี Agar well diffusion

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| 1- อาหารเลี้ยงเชื้อ (control) | 5- ฝรั่ง |
| 2- อินนูลินมาตรฐาน | 6- มันแกว |
| 3- สามสิบ | 7- หอมหัวใหญ่ |
| 4- แก่นตะวัน | |



รูปที่ 16 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (A) และ *Bifidobacterium longum* (B) ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสม 2% ของอินนูลินมาตรฐานและสารสกัดหยาบพีช 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ โดยวิธี Agar well diffusion

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| 1- อาหารเลี้ยงเชื้อ (control) | 5- ฝรั่ง |
| 2- อินนูลินมาตรฐาน | 6- มันแกว |
| 3- สามสิบ | 7- หอมหัวใหญ่ |
| 4- แก่นตะวัน | |

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Microtiter plate assay

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 และเชื้อ *B. longum* ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบพืช 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดอินูลิน มาตรฐาน พบว่า การเติม 2% ของสารสกัดหยาบจากพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ATCC 15917 มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 40, และ 80 ไมโครลิตร (ตารางที่ 17) เช่นเดียวกับการเติม 2% ของสารสกัดอินูลินมาตรฐาน ก็ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างไปจากพืชทดสอบเช่นกัน เมื่อพิจารณาจากปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่เหลืออยู่หลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า มีปริมาณเชื้อ *E. coli* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่มีเพียงน้ำเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ที่ไม่มีการเติมสารสกัดใดๆ (รูปที่ 17)

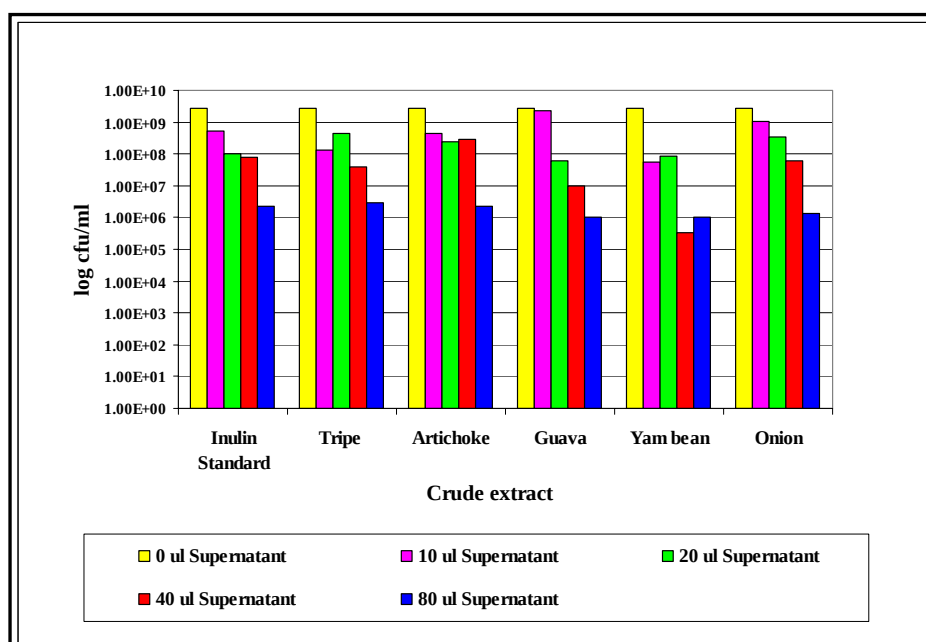
ในส่วนของเชื้อ *B. longum* เมื่อพิจารณาการสนับสนุนการต้านเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ของสารสกัดหยาบจากพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด พบว่า พืชทดสอบ 4 ชนิด คือ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง และหอมหัวใหญ่ มีฤทธิ์สนับสนุนเชื้อ *B. longum* ในการต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ทุกปริมาตรของสารสกัด คือ 10, 20, 40, และ 80 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่มีเพียงน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. longum* ที่ไม่มีการเติมสารสกัดใดๆ (ตารางที่ 18) ในขณะที่มันแกวนั้นไม่พบผลการสนับสนุนเชื้อ *B. longum* ในการต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* เช่นเดียวกับอินูลินมาตรฐาน (รูปที่ 18)

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 และเชื้อ *B. longum* ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบพืช 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดอินูลิน มาตรฐาน พบว่า การเติม 2% ของสารสกัดหยาบจากพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *L. plantarum* ATCC 15917 มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่ปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 40, และ 80 ไมโครลิตร (ตารางที่ 19) เช่นเดียวกับการเติม 2% ของสารสกัดอินูลินมาตรฐาน ก็ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างไปจากพืชทดสอบเช่นกัน เมื่อพิจารณาจากปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่เหลืออยู่หลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับน้ำเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่มีเพียงน้ำเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ที่ไม่มีการเติมสารสกัดใดๆ (รูปที่ 19)

ในส่วนของเชื้อ *B. longum* เมื่อพิจารณาการสนับสนุนการต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ของสารสกัดหยาบจากพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด พบว่า สารสกัดพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง และหอมหัวใหญ่ มีผลต่อเชื้อ *B. longum* ในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* น้อยมากเช่นเดียวกับการเติมสารสกัดอินูลิน (ตารางที่ 20) และต้องใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *B. longum* ในปริมาณสูงจึงจะเห็นผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. aureus* (รูปที่ 20)

ตารางที่ 17ฤทธิ์การต้านเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด

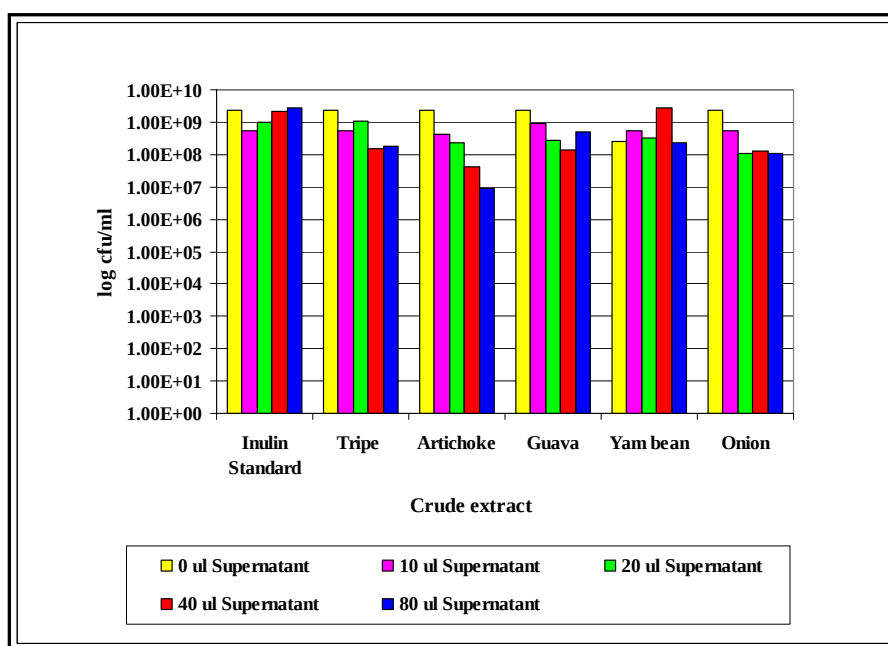
Crude extract	ปริมาณเชื้อ <i>E. coli</i> ที่เหลืออยู่หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชม. (cfu/ml)				
	0 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	80 μ l
อินูลินมาตรฐาน	2.847×10^9	5.13×10^8	1.05×10^8	8.10×10^7	2.17×10^6
สามสิบ (Tripe)	2.847×10^9	1.33×10^8	4.56×10^8	4.00×10^7	2.89×10^6
แก่นตะวัน (Artichoke)	2.847×10^9	4.44×10^8	2.48×10^8	2.95×10^8	2.27×10^6
ฝรั่ง (Guava)	2.847×10^9	2.25×10^9	5.87×10^7	9.63×10^6	1.05×10^6
มันแกว (Yam bean)	2.847×10^9	5.57×10^7	8.47×10^7	3.43×10^5	1.07×10^6
หัวหอม (Onion)	2.847×10^9	1.06×10^9	3.48×10^8	6.07×10^7	1.31×10^6



รูปที่ 17 ฤทธิ์การต้านเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด

ตารางที่ 18ฤทธิ์การต้านเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *B. longum* ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด

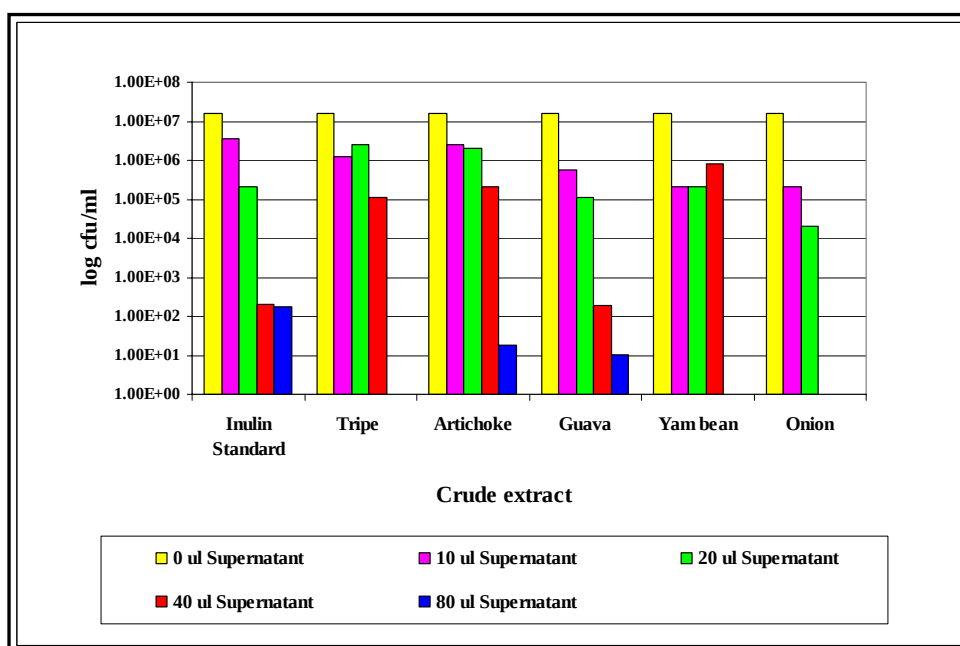
Crude extract	ปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ที่เหลืออยู่หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชม. (cfu/ml)				
	0 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	80 μ l
อินนูลินมาตรฐาน	2.35×10^9	5.30×10^8	9.93×10^8	2.22×10^9	2.81×10^9
สามสิบ (Tripe)	2.35×10^9	5.27×10^8	1.06×10^9	1.52×10^8	1.72×10^8
แก่นตะวัน (Artichoke)	2.35×10^9	4.20×10^8	2.40×10^8	4.07×10^7	9.20×10^6
ฝรั่ง (Guava)	2.35×10^9	9.47×10^8	2.84×10^8	1.37×10^8	5.0×10^8
มันแกว (Yam bean)	2.53×10^8	5.23×10^8	3.22×10^8	2.79×10^9	2.35×10^8
หัวหอม (Onion)	2.35×10^9	5.40×10^8	1.06×10^8	1.24×10^8	1.11×10^8



รูปที่ 18 ฤทธิ์การต้านเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *B. longum* ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด

ตารางที่ 19ฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัด
หยาบของพืช 5 ชนิด

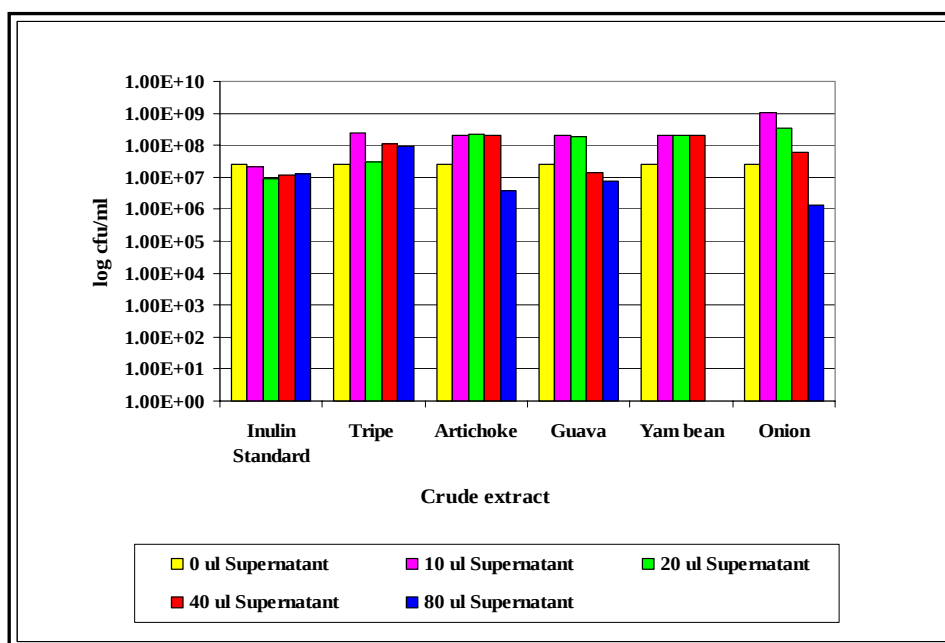
Crude extract	ปริมาณเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่เหลืออยู่หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชม. (cfu/ml)				
	0 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	80 μ l
Inulin Standard	1.60×10^7	3.63×10^6	2.04×10^5	1.99×10^2	1.73×10^2
Tripe	1.60×10^7	1.27×10^6	2.48×10^6	1.08×10^5	<10
Artichoke	1.60×10^7	2.55×10^6	2.07×10^6	2.03×10^5	18.00
Guava	1.60×10^7	5.61×10^5	1.10×10^5	1.83×10^2	10.33
Yam bean	1.60×10^7	2.10×10^5	2.03×10^5	8.26×10^5	<10
Onion	1.60×10^7	2.03×10^5	2.03×10^4	<10	<10



รูปที่ 19 ฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 15917 ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบ
ของพืช 5 ชนิด

ตารางที่ 20ฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อ *B. longum* ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด

Crude extract	ปริมาณเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่เหลืออยู่หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชม. (cfu/ml)				
	0 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	80 μ l
Inulin Standard	2.56×10^7	2.12×10^7	9.13×10^6	1.17×10^7	1.33×10^7
Tripe	2.56×10^7	2.49×10^8	2.99×10^7	1.12×10^8	9.70×10^7
Artichoke	2.56×10^7	2.01×10^8	2.19×10^8	1.99×10^8	3.66×10^6
Guava	2.56×10^7	2.01×10^8	1.84×10^8	1.36×10^7	7.57×10^7
Yam bean	2.56×10^7	2.08×10^8	1.95×10^8	1.95×10^8	<10
Onion	2.56×10^7	1.06×10^9	3.47×10^8	6.07×10^7	1.31×10^6



รูปที่ 20 ฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อ *B. longum* ที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบของพืช 5 ชนิด

3.5 ผลการศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินนูลิน และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดที่เหมาะสมจากรากสามสิบ

จากผลการทดลอง 3.1-3.4 ดังกล่าวจะเห็นได้ว่าพืชที่มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาต่อในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อเป็นทางเลือกในอุตสาหกรรมต่อไปคือ ได้แก่ รากสามสิบ ทั้งนี้พืชชนิดนี้มีปริมาณอินนูลินที่สูง และให้ผลต่อการเจริญของเชื้อ probiotics ที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับ control โดยผลการเจริญที่เพิ่มขึ้นของเชื้อมีลักษณะคงที่ และเมื่อให้ร่วมกับเชื้อ probiotics ยังมีผลช่วยด้านการเจริญของเชื้อก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* ได้ จึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาต่อในขั้นตอนการศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินนูลิน

3.5.1 ผลของอัตราส่วนน้ำต่อปริมาณพืชที่นำมาสกัด

จากการทดลองศึกษาผลของอัตราส่วนของน้ำต่อปริมาณพืชที่นำมาสกัดพบว่า ถ้าใช้อัตราส่วนพืชต่อน้ำในสัดส่วน 2:1 จะให้ค่า %yield ของอินนูลินสูงที่สุด โดยคำนวณได้ 18.83% ขณะที่ถ้าใช้สัดส่วน 1:2 จะให้ค่าน้อยที่สุด เพียง 0.34% (ตารางที่ 21 รูปที่ 37)

ตารางที่ 21 ปริมาณอินนูลินหลังการใช้อัตราส่วนน้ำต่างๆ

Sample: Water (ratio)	Average Peak Area ^a	R1 (mg/ml)	Average Peak Area ^b	R2 (mg/ml)	P (mg/ml)	% yield Inulin
S:W (1:1)	40057072.00	13.3559	38887439.33	12.9660	10.001	3.90
S:W (1:2)	36330035.00	12.1135	36226727.33	12.0791	10.000	0.34
S:W (1:3)	38066846.67	12.6925	35762778.67	11.9245	10.001	7.68
S:W (2:1)	37799901.67	12.6035	32148533.00	10.7197	10.002	18.83

3.5.2 ผลของอุลตราซาวด์ในการช่วยสกัด (Ultrasound-assisted extraction)

จากการทดลองเปรียบเทียบการใช้อุลตราซาวด์ช่วยในการสกัด พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการ sonicate พืชเพื่อให้ได้ปริมาณ %yield ของอินนูลินสูงที่สุด คือ 15 นาที ทั้งนี้ให้ผลเพิ่ม %yield ถึง 24.49% และเมื่อเปรียบเทียบกับ control พบว่าการใช้อุลตราซาวด์เพิ่มปริมาณการสกัดอินนูลิน ดีกว่ากลุ่ม control (ตารางที่ 22 รูปที่ 38)

ตารางที่ 22 ปริมาณอินนูลินหลังการใช้อุลตราซาวด์ในการช่วยสกัด

Sonicate (min)	Average Peak Area ^a	R1 (mg/ml)	Average Peak Area ^b	R2 (mg/ml)	P (mg/ml)	% yield Inulin
0	40057072.00	13.3559	38887439.33	12.9660	10.001	3.90
15	37944426.00	12.6517	30597982.67	10.2029	10.001	24.49
30	34950353.67	11.6537	28513659.00	9.5081	10.002	21.45
45	32807062.67	10.9392	28570313.67	9.5270	10.003	14.12
60	31754831.00	10.5885	28317724.00	9.4428	10.001	11.46

3.5.3 ผลของวัสดุกรอง

จากผลการทดลองพบว่าการใช้วัสดุกรองชนิดต่างๆ เพิ่มเติมจากลำลีทำให้ปริมาณอินนูลินน้อยลงโดยการกรองผ่าน celite มีผลให้ปริมาณอินนูลินน้อยลงมากที่สุด (ตารางที่ 23 รูปที่ 39) ขณะที่การกรองผ่านผงคาร์บอน แม้ปริมาณอินนูลินน้อยกว่าการกรองผ่านลำลีแต่ลักษณะสารสกัดที่ได้จะไม่มีสีและใสกว่า

ตารางที่ 23 ปริมาณอินนูลินหลังการใช้วัสดุกรองต่างๆ

วัสดุกรอง	Average Peak Area ^a	R1 (mg/ml)	Average Peak Area ^b	R2 (mg/ml)	P (mg/ml)	% yield Inulin
ลำลี (control)	40057072.00	13.3559	38887439.33	12.9660	10.001	3.90
กระดาษกรอง	34942818.33	11.6511	34636347.00	11.5490	10.002	1.02
Celite	28033950.33	9.3482	27790512.70	9.2670	10.000	0.81
คาร์บอน	33326389.00	11.1123	32457389.70	10.8227	10.001	2.90

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาวิธีการตรวจสอบสารอินนูลินในเบื้องต้นที่มีอยู่ในพืช

จากการคัดกรองพืชสมุนไพร 17 ชนิดในเบื้องต้นเพื่อหาพืชที่มีอินนูลิน โดยใช้วิธีการย้อมเซลล์พืชด้วย α -naphthol in ethanol และ sulphuric acid แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าพืชที่ให้ผลึกสีแดงอมม่วงของอินนูลิน มีทั้งหมด 13 ชนิด ได้แก่ แก่นตะวัน กระเทียม หอมใหญ่ หอมแดง มันฝรั่ง หัวกล้วยหอม มันแกว เม็ดขนุน กระฉับ ฝรั่ง สามสิบ และกระทือ นอกจากนี้ได้ใช้เทคนิค TLC ช่วยในการตรวจวัดอินนูลินในพืชเบื้องต้นโดยใช้ sulfuric acid เป็น spraying reagent เพื่อตรวจหาน้ำตาลฟรุกโตสในสารสกัดพืชก่อนและหลังทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส พบว่าผลตรวจสอบมีเพียงสารสกัดจากรากสามสิบและหัวแก่นตะวันที่ให้ผลเด่นชัด ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณอินนูลินที่มีอยู่มากกว่าสารสกัดจากพืชอื่นๆ อย่างไรก็ตามทั้งเทคนิคการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบด้วย TLC นับว่าเป็นวิธีที่สะดวกง่าย ในการตรวจสอบอินนูลินเบื้องต้นในพืช

2. การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากพืช

ในการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เลือกวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลินในพืชโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาการเกิดสีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลินทั้งหมดโดยหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและปริมาณ reducing sugar ซึ่งพบว่าสารสกัดจากหัวให้ % yield ของอินนูลินมากที่สุดคือ 5.59% ขณะที่สารสกัดจากหัวเผือกให้ปริมาณน้อยที่สุดประมาณ 0.03% ส่วนสารสกัดจากรากสามสิบให้ปริมาณอินนูลินที่สูงเช่นเดียวกันคือ 4.23% ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากแก่นตะวันที่ให้ค่าอยู่ที่ 3.40% และเมื่อเปรียบเทียบกับกรวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินนูลินเนสก่อนคำนวณหาปริมาณอินนูลินที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืช พบว่ารากสามสิบให้ปริมาณอินนูลินมากที่สุด 5.50% ซึ่งให้ปริมาณมากกว่าอินนูลินในแก่นตะวันที่วิเคราะห์ได้ 4.89% นอกจากนี้พืชชนิดอื่นๆ ที่ให้ปริมาณอินนูลินที่สูง ได้แก่ กล้วย กระฉับ มันฝรั่ง หอมแดง หัวหอม ส่วนสาคุให้ปริมาณอินนูลินน้อยที่สุดเพียง 0.98% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ทั้งสองวิธีพบว่าผลของปริมาณอินนูลินในพืชบางชนิดไม่ตรงกัน เช่นในส่วนของเม็ดขนุน สาคุและหัว ผลการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีให้ปริมาณอินนูลินที่สูงขณะที่การวิเคราะห์ด้วย HPLC ให้ปริมาณอินนูลินที่ต่ำมาก ส่วนสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ ให้ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ผลที่ได้ อาจเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีโดยการหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณน้ำตาล reducing sugar ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ทำได้รวดเร็ว แต่อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากความจำเพาะน้อยกว่าวิธี HPLC ซึ่งมีความจำเพาะและแม่นยำมากกว่า

3. การศึกษาผลของสารสกัดอินนูลินต่อการเจริญของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli*

จากการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ probiotics พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ และเมื่อให้อินนูลินที่ความเข้มข้น 1-2% จะทำให้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC14917 และ *Lactobacillus plantarum* No.4 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เชื้อ probiotics ที่นำมาทดลองจะเจริญได้ดีตามลำดับคือ glucose, dextrose, lactose และอินนูลิน ดังนั้นเมื่อทดลองโดยเตรียมอาหารเพาะเชื้อเองโดยให้อินนูลินมาตรฐานเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทำให้เชื้อมีการเจริญดีขึ้น และเมื่อนำสารสกัดอินนูลินจากสมุนไพรชนิดต่างๆ มาทดสอบ โดยใช้สารสกัดในปริมาณ 0, 1, 2 และ 4% จะเห็นว่าสารสกัดจากรากสามสิบแสดงผลเพิ่มการเจริญของเชื้อ probiotics ทั้ง *Lactobacilli* และ *Bifidobacterium* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ปริมาณสารสกัดที่ 1% จะให้ผลดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีพืชอื่นๆ ที่ให้ผลที่ดีต่อการเจริญของเชื้อ probiotics ทั้งสองชนิด เช่น แก่นตะวัน ฝรั่ง กระเทียม หัวหอม หอมแดง โดยส่วนใหญ่ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4% จะให้ผลดีที่สุด ส่วนพืช เช่น มันมือเสือ กระเจี๊ยบ และมันแกว ให้ผลเพิ่มการเจริญของเชื้อ probiotic เฉพาะเชื้อ *Bifidobacterium* แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* นอกจากนี้การเติมสารสกัดจากพืช ได้แก่ มันฝรั่ง กลอย กัลย เม็ดขนุน หัว และเผือก มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli* แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium*

4. การศึกษาผลของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสมสารสกัดอินนูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดหยาบจากพืชทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ สามสิบ แก่นตะวัน ฝรั่ง มันแกว และหอมหัวใหญ่ พบว่า จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดจากแก่นตะวันให้ผลที่ดีที่สุด และสารสกัดจากมันแกวให้ขนาดวงใส่น้อยที่สุด ขณะที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microtiter plate assay พบว่า สารสกัดจากพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิดมีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของ *E. coli* อย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของเชื้อ *B. longum* พบว่ามีเพียงสารสกัดจากแก่นตะวันเท่านั้นที่ให้วงใสในการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microtiter plate assay พบว่าพืชทดสอบทั้งหมดให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของ *E. coli* ยกเว้นสารสกัดจากมันแกว

สำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคอีกชนิดคือ *S. aureus* ของเชื้อ *L. plantarum* พบว่า จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดจากมันแกวให้ผลที่ดีที่สุด ขณะที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microtiter plate assay พบว่า สารสกัดจากพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิดมีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของ *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในส่วน of เชื้อ *B. longum* สาร

สกัดจากสามสิบ ฝรั่ง แก่นตะวัน และมันแกว มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion แต่พืชทดสอบทั้ง 5 ชนิดไม่แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญในการต้านเชื้อเมื่อทดสอบด้วยวิธี Microtiter plate assay

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่านอกจากแก่นตะวันซึ่งปัจจุบันใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการสกัดอินนูลิน ยังมีพืชที่มีศักยภาพในการนำมาสกัดอินนูลินอีกหลายชนิด เช่น สามสิบ ฝรั่ง มันแกว หัวหอม ซึ่งในงานวิจัยได้เลือกรากสามสิบสำหรับนำมาศึกษาต่อในขั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อเป็นทางเลือกในอุตสาหกรรม ทั้งนี้จากการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าพืชชนิดนี้มีปริมาณอินนูลินที่สูง และให้ผลต่อการเจริญของเชื้อ probiotics ที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับ control โดยผลการเจริญที่เพิ่มขึ้นของเชื้อยังมีลักษณะคงที่ นอกจากนี้เมื่อผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ probiotics *L. plantarum* และ *B. longum* ยังมีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* อีกด้วย

5. การศึกษาเทคนิคการเตรียมสารสกัดอินนูลิน และสภาวะที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดที่เหมาะสมจากรากสามสิบ

จากการทดลองสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดอินนูลินจากรากสามสิบ พบว่า การใช้อัตราส่วนของพืชต่อน้ำในปริมาณต่างๆ มีผลต่อการสกัดอินนูลิน โดยอัตราส่วนของพืชต่อน้ำที่สัดส่วน 2:1 ให้ปริมาณ % yield อินนูลินมากที่สุดถึง 18.83% และเมื่อใช้อุลตราซาวด์ช่วยในการสกัดพบว่า เวลาที่เหมาะสมที่สุดในการ sonicate คือ 15 นาที และจากการทดลองเมื่อใช้วัสดุกรองชนิดต่างๆ ช่วยในการกรองสิ่งปนเปื้อนและสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน พบว่า การใช้เพียงลำลีในการกรองแยกให้ % yield อินนูลินมากที่สุด ขณะที่การใช้ผงคาร์บอนแม้ปริมาณอินนูลินจะต่ำกว่าการใช้ลำลีแต่ลักษณะของสารสกัดที่ได้จะใสไม่มีสี ซึ่งอาจเป็นข้อได้เปรียบในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Wolfgang K. J., Hilda P. W., D. Bernard A., Catherine M. W. 1992. Zinsser Microbiology 20th edition. *Appleton&Lange, Noewalk, Connecticut.* 1294 p.
2. Kaur, N., and Gupta, A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27: 703-714.
3. Van Loo, J. Hermans, J. Inulin products with improved nutritional properties. European Patent Application, EP. 1125507A1, 2000.
4. Kathy R. N. 1999. Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 1402S-1406S.
5. Alles M. S., Hautvast J. G., Nagengast F. M., Hartemink R., Van Laere K. M., Jansen J. B. 1996. Fate of fructo-oligosaccharides in the human intestine. *Br. J. Nutr.* 76(2): 211-221.
6. Pierre F., Perrin P., Champ M., *et.al.* 1997. Short-chain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min Mice. *Cancer Res.* 57: 225-228.
7. Anthony J. B., Ian R. R. 2004. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research.* Xxx : xxx-xxx.
8. Maria B., Elzbieta B., Anna M. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Int.* 35: 125-131.
9. Yorum B., Bernard F. E., Laurence D'Agay-Abensour, *et.al.* 1997. Administration of Transgalacto –oligosacchrides Increase Fecal Bifidobacteria and Modifies Colonic Fermentation Metabolism in Healthy Humans. *J. Nutr.* 127: 444-448.
10. Michael A. E. 2004. Prebiotic/probiotic additives and there impaction poultry health and performance [online] Available:
http://www.inform.umd.edu/MNC/2004_summaries/Elliot.pdf
11. ศุภวันจักรี พลมีศักดิ์, สมชัย จันทรสว่าง. 2545. ผลการใช้จุลินทรีย์และโอลิโกแซคคาไรด์จากพืช เจริญชาเล็ม อาติไซค์ ในอาหารสุกรรุ่น-ขุน เพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร. การประชุมวิชาการ สมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมผลิตสัตว์. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 265.
12. เฉลิมขวัญ คำคำและมัลลิกา ชมนาวัง. คุณรู้จัก Prebiotics แล้วหรือยัง. Food Journal.

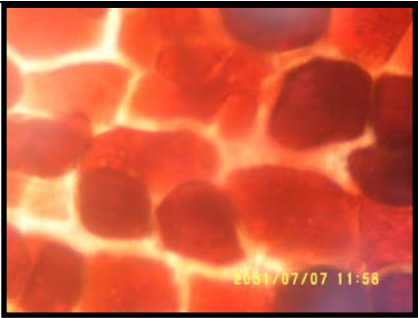
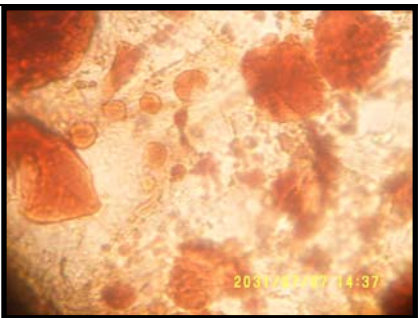
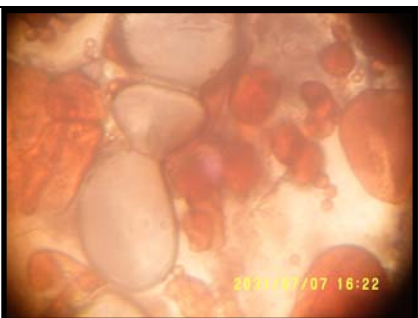
2005 (35) 96-102.

13. Dysseler P. Hoffem D. 1995. Inulin, an alternative dietary fibre. Properties and quantitative analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49 : 145-52.

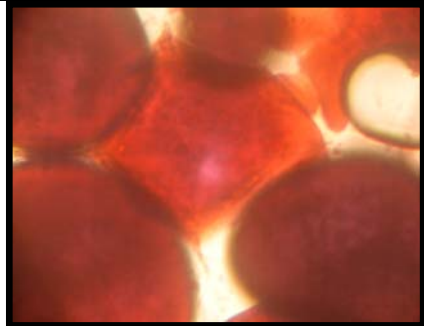
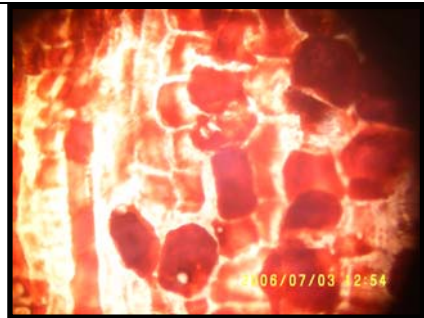
ภาคผนวก

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ
ตลอดโครงการ

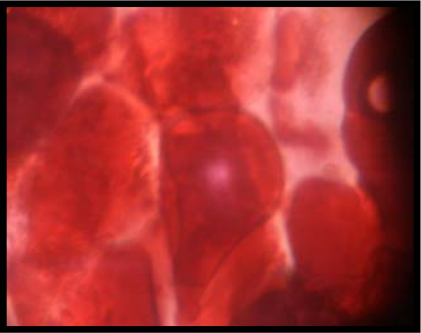
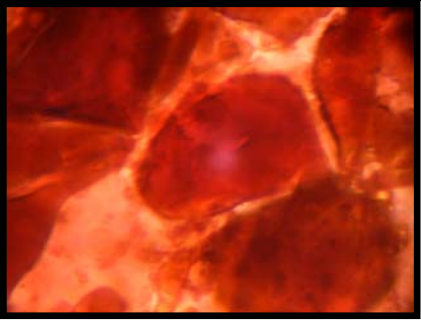
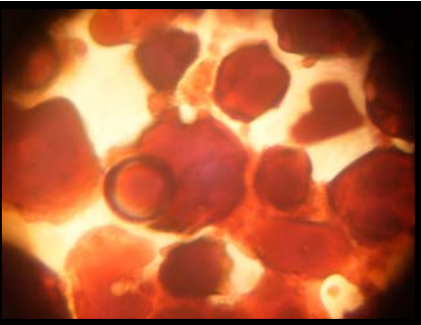
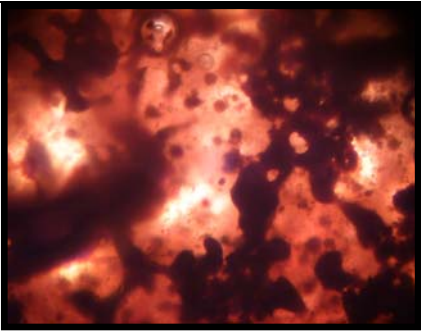
วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ผลงานที่ได้รับ (output)	ผลสำเร็จ
1. เพื่อคัดกรองหาพืชสมุนไพรในประเทศที่มีศักยภาพในการสกัดสารอินนูลิน	1. พัฒนาวิธีการตรวจสอบเบื้องต้น 2. เก็บตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ และทำการคัดกรอง	ได้วิธีคัดกรองในเบื้องต้นเพื่อหาพืชที่มีอินนูลิน โดยใช้วิธีการตรวจลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์และการใช้ TLC ในการตรวจสอบสารสกัดพืชในเบื้องต้น และได้ตัวอย่างพืชที่จะนำมาศึกษาพัฒนาต่อไป	100%
2. พัฒนาวิธีวิเคราะห์และการสกัด	1. การเตรียมและหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดจากพืช 2. พัฒนาวิธีวิเคราะห์และประเมินปริมาณอินนูลินในพืช	ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในพืช โดยการใช้เทคนิค HPLC และ ปฏิบัติการเกิดสี และสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อเพิ่มปริมาณอินนูลินในพืช	100%
3. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินจากพืชที่เลือกในแง่การเป็นสารพรีไบโอติก	1. ทดสอบผลของสารสกัดอินนูลินต่อการเจริญของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i> 2. ทดสอบผลของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสมสารสกัดอินนูลินต่อแบคทีเรียก่อโรค	ได้ผลการทดสอบสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อ <i>Bifidobacteria</i> และ <i>Lactobacilli</i> นอกจากนี้ยังได้ผลการทดสอบสารสกัดอินนูลินต่อเชื้อก่อโรค	100%
4. ประเมิน สรุปผลการวิจัย		จากข้อมูลที่ได้จากการวิจัยทำให้สามารถประเมินศักยภาพของพืชชนิดต่างๆ ในแง่การเป็นพรีไบโอติก และสามารถหาพืชที่มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาพัฒนาต่อไป	100%

แก่นตะวัน <i>Hilanthus tuberosus</i>		
กล้วย <i>Musa sapientum</i>		
มันแกว <i>Ipomoea batatas</i>		
หอมหัวใหญ่ <i>Allium cepa</i> L. cv group cepa		

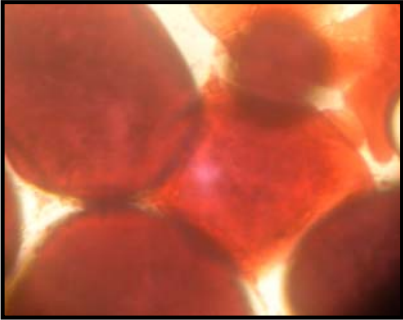
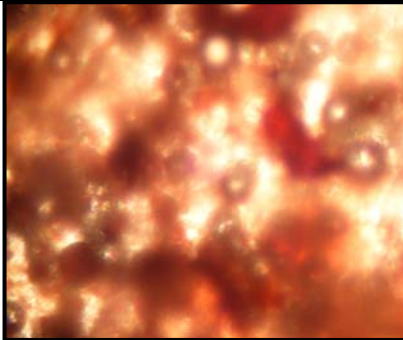
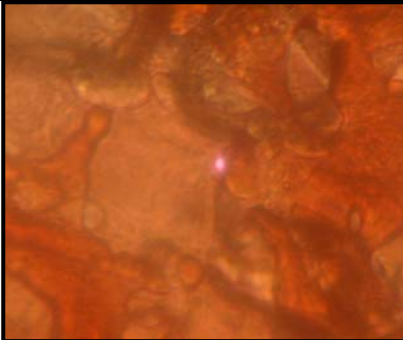
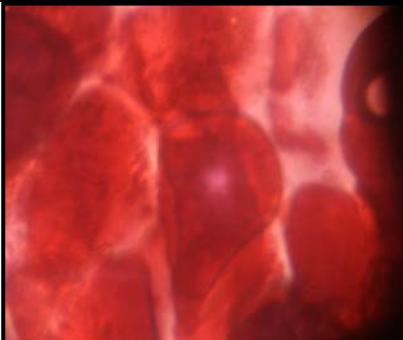
รูปที่ 21 เซลล์พืชหลังจากย้อมด้วย naphthol และกรดซัลฟูริก

กระเจี๊ยบ <i>Trapa bicornis</i>	
มันฝรั่ง <i>Solanum tuberosum</i>	
แห้ว <i>Cyperus tuberosus</i>	
หอมแดง <i>Allium cepa</i> L. cv group aggregatum	

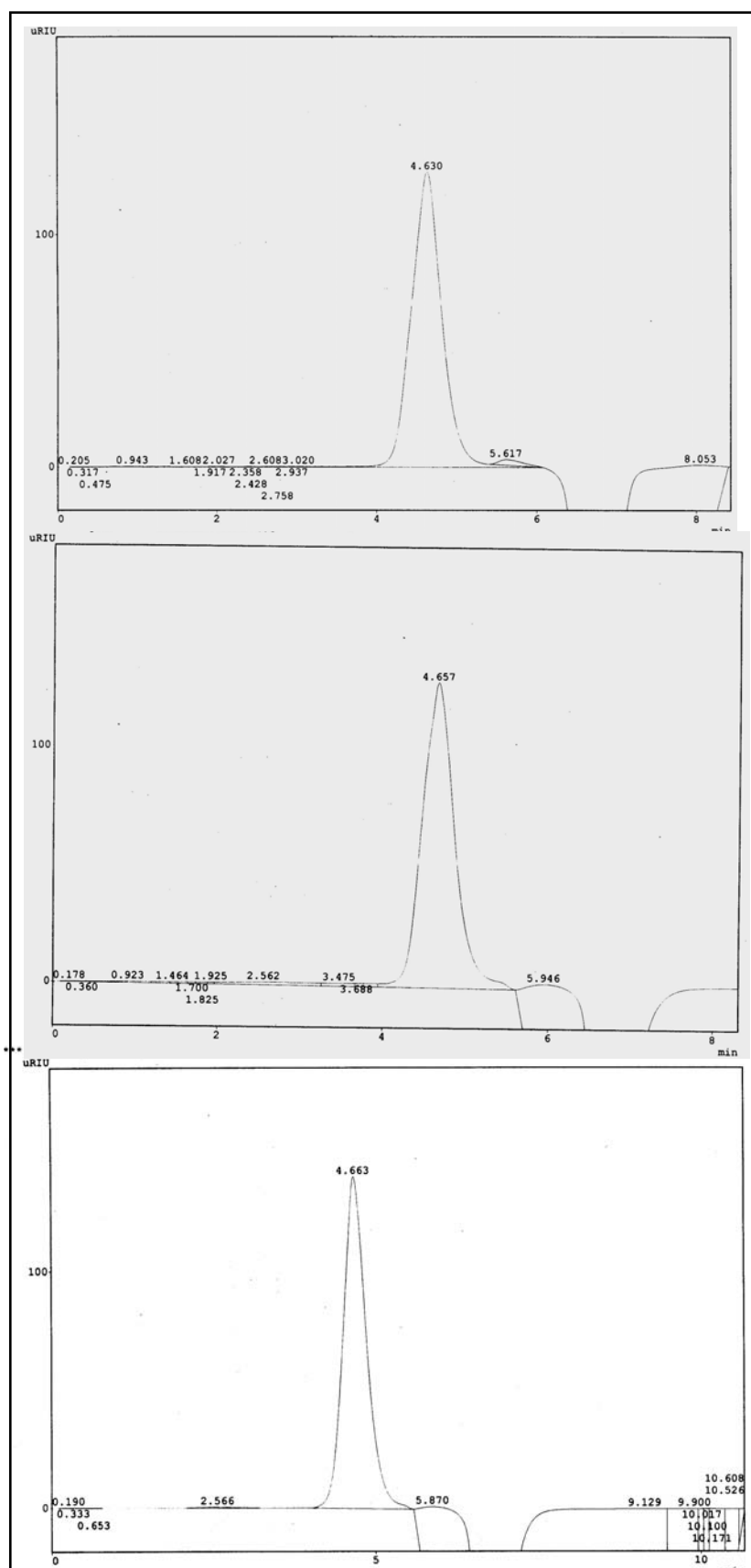
รูปที่ 21 (ต่อ) เซลล์พืชหลังจากย้อมด้วย naphthol และกรดซัลฟูริก

กระเทียม <i>Allium sativum</i>	
ฝรั่ง <i>Psidium guajava</i>	
ขมิ้น <i>Artocarpus heterophyllus</i>	
เผือก <i>Colocasia esculenta</i>	

รูปที่ 21 (ต่อ) เซลล์พืชหลังจากย้อมด้วย naphthol และกรดซัลฟูริก

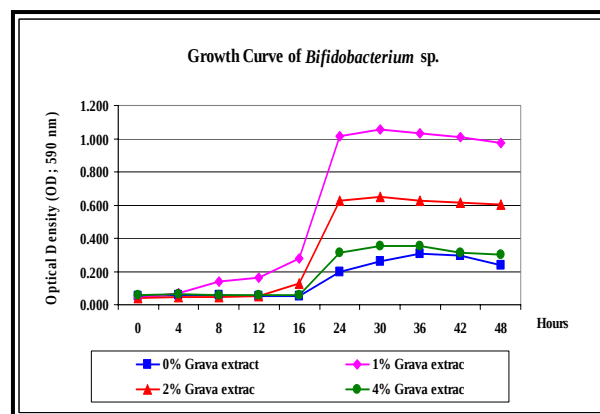
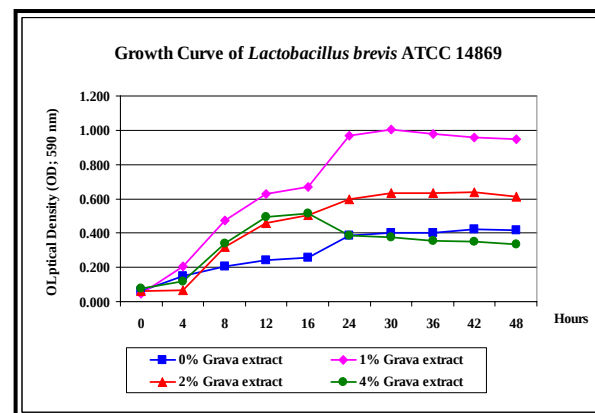
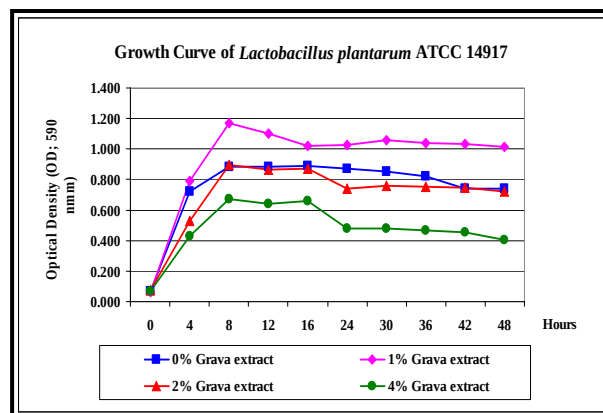
สามสิบ <i>Asparagus racemosus</i>	
กลอย <i>Dioscorea hispida</i>	
สาคร <i>Maranta arundinacea</i>	
กระเทียม <i>Zingiber amaricans</i>	

รูปที่ 21 (ต่อ) เซลล์พืชหลังจากย้อมด้วย naphthol และกรดซัลฟูริก

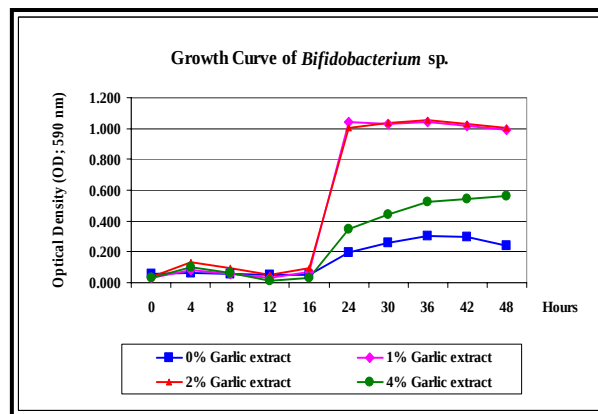
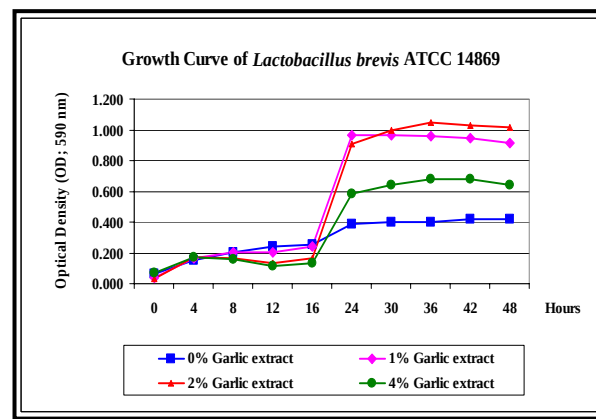
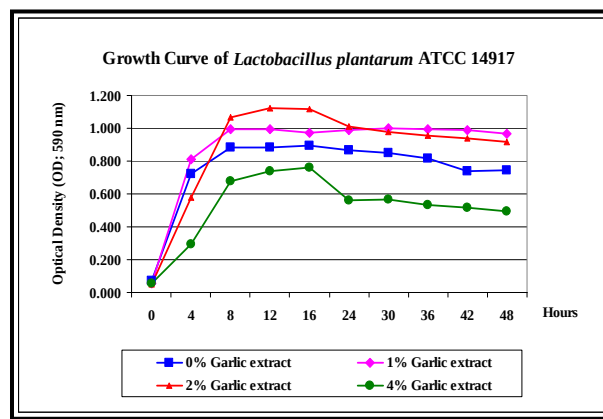


รูปที่ 22 โครมาโตแกรมของสารสกัดสามสิบแสดงถึง Repeatability ของระบบ

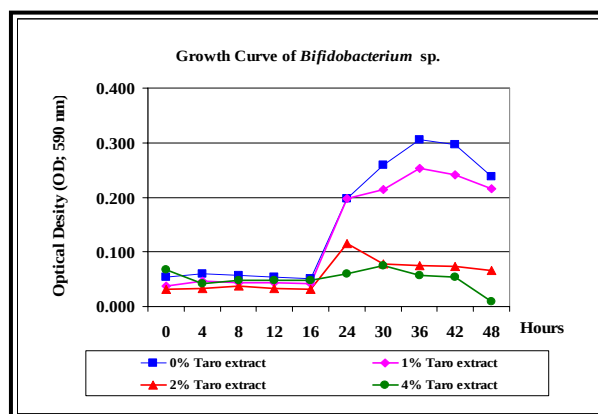
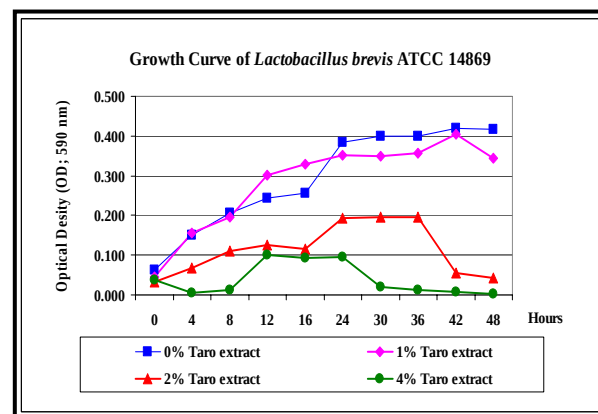
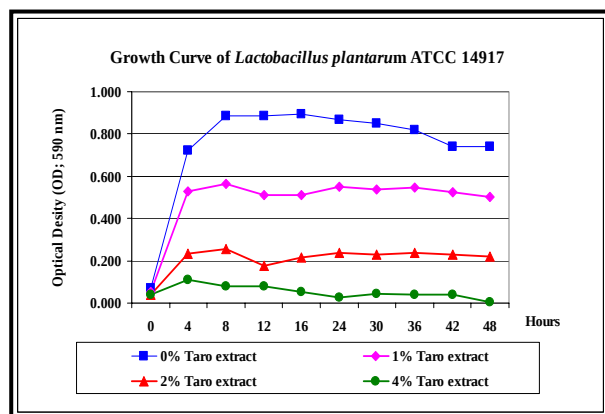
รูปที่ 23 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดฝรั่ง



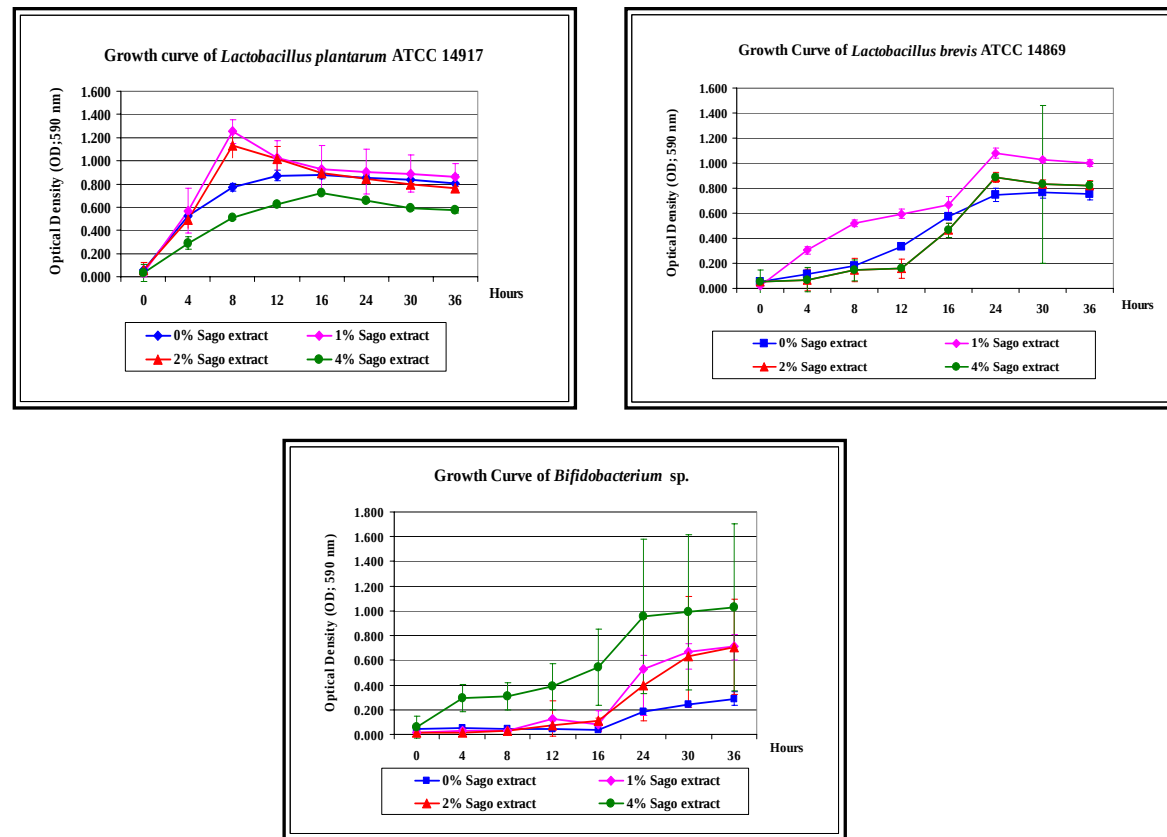
รูปที่ 24 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกระเทียม



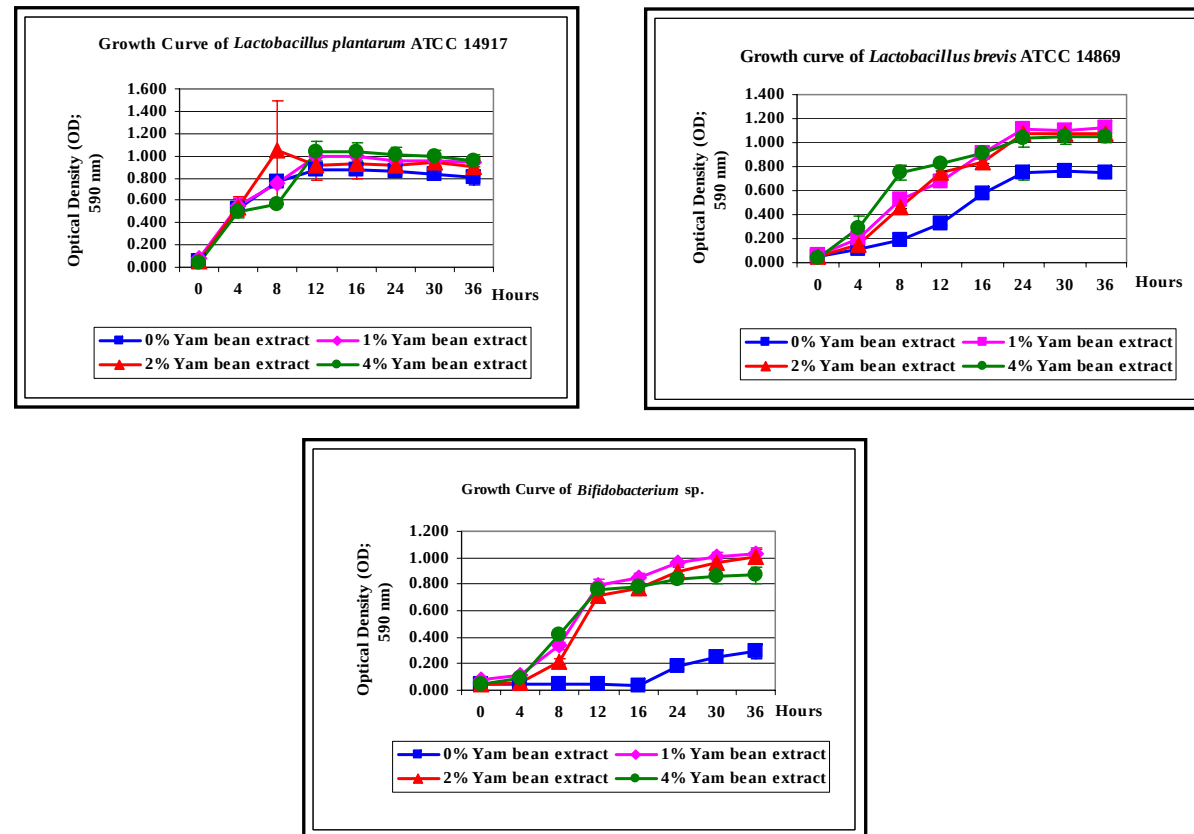
รูปที่ 25 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดเผือก



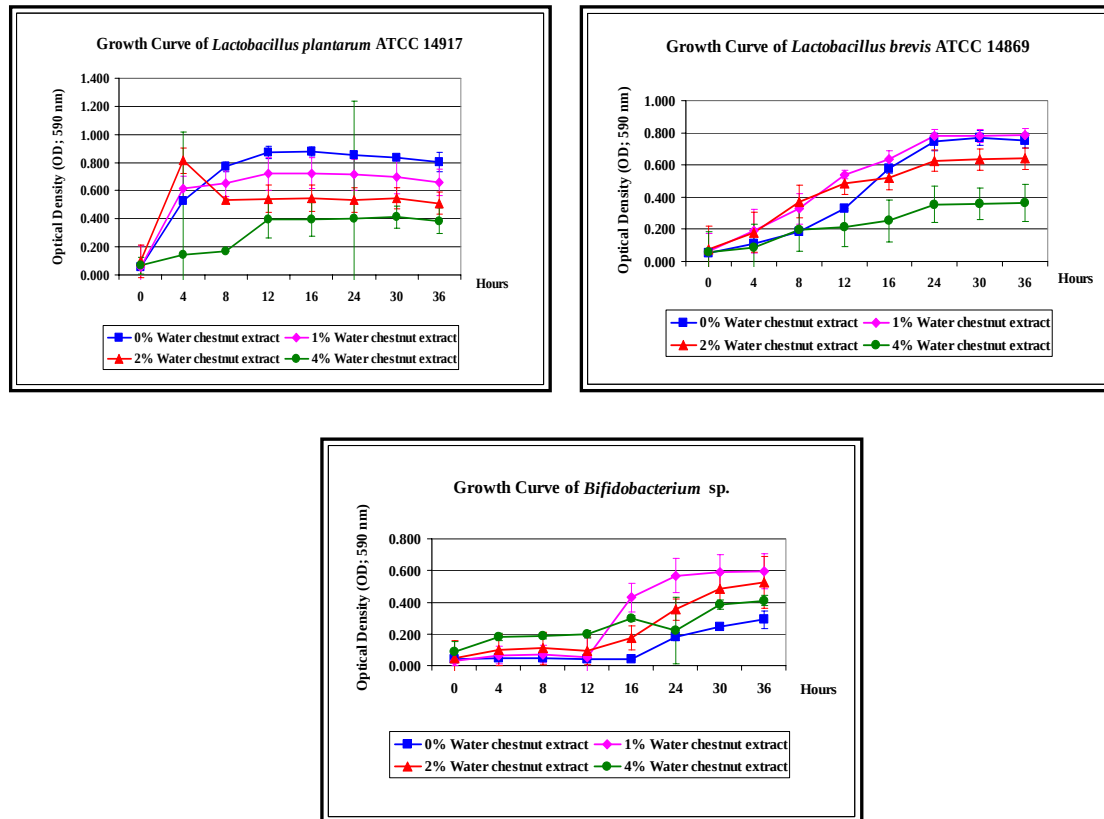
รูปที่ 26 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดสาหร่าย



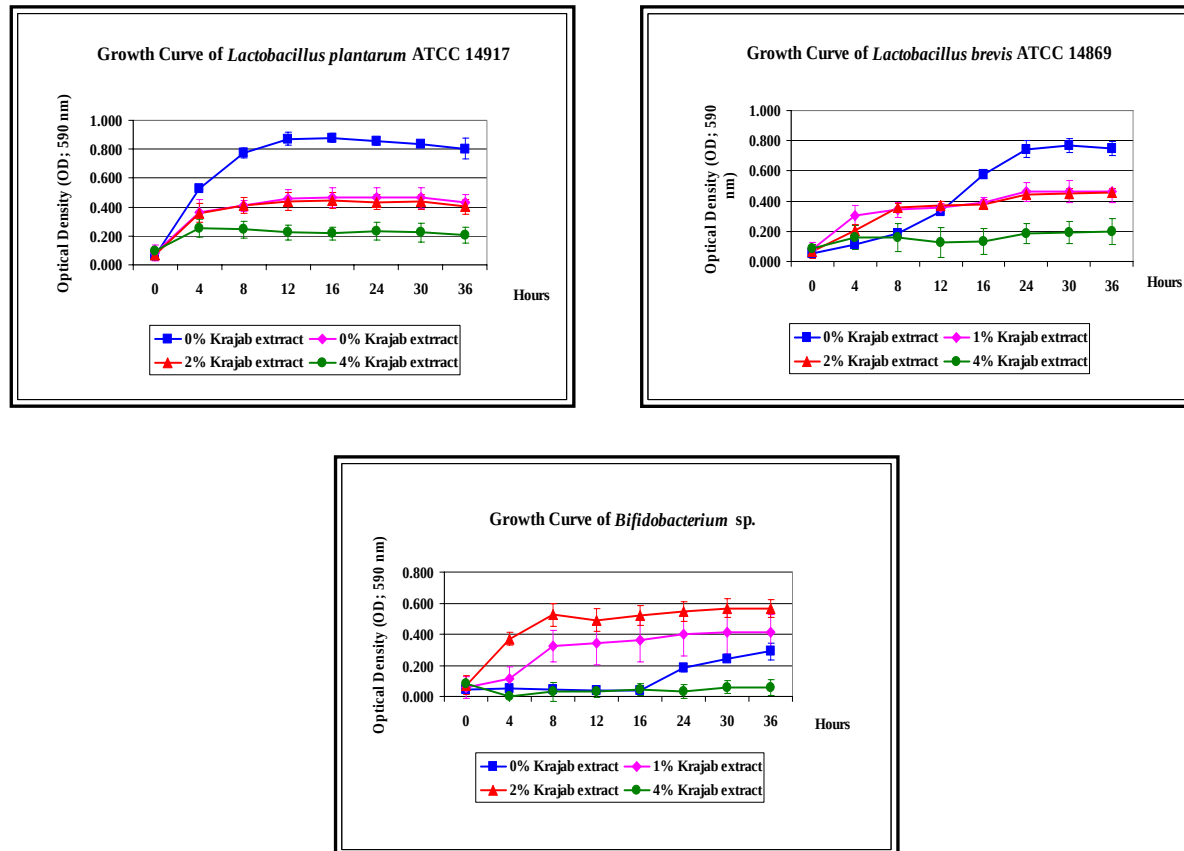
รูปที่ 27 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดมันแกว



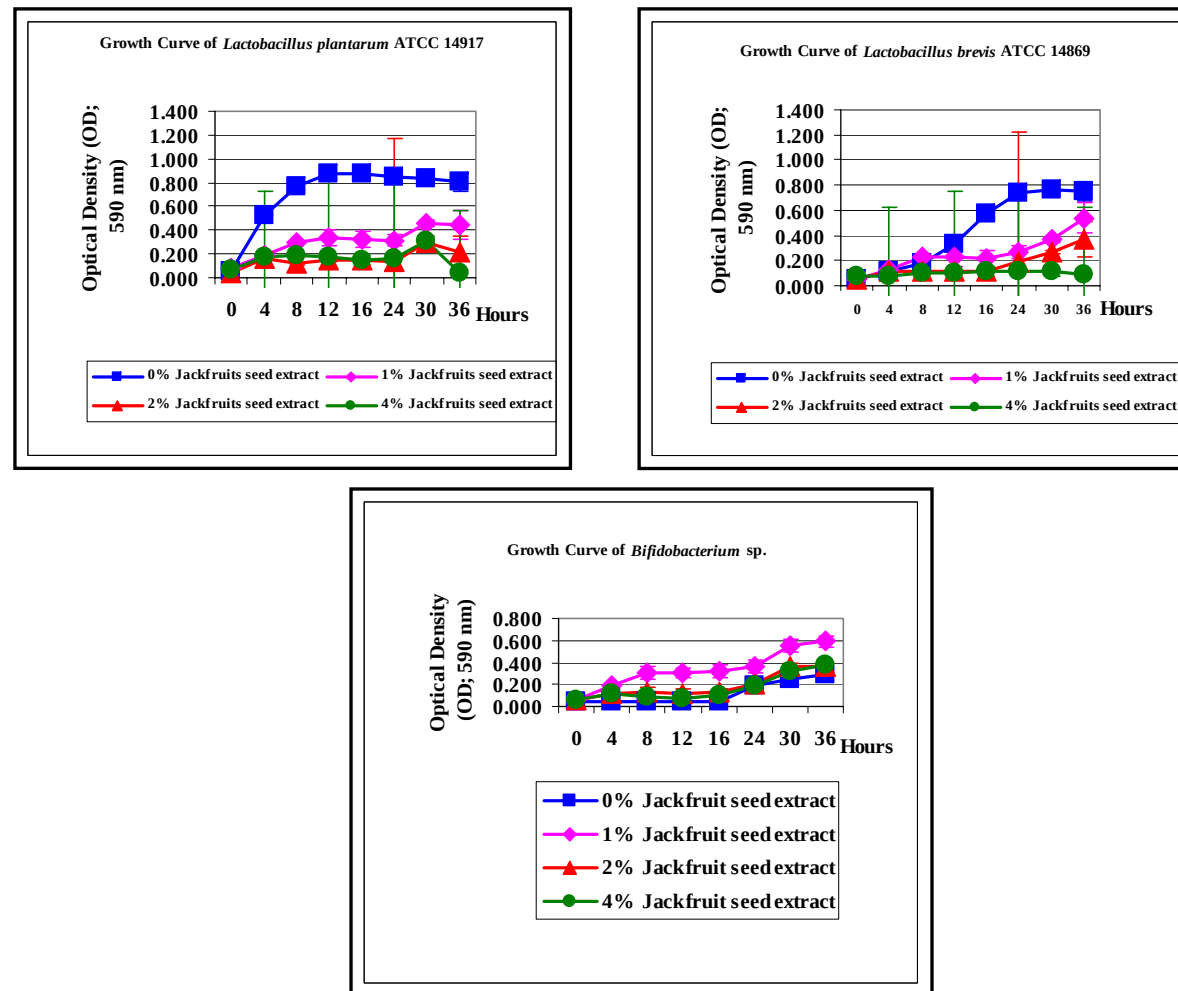
รูปที่ 28 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดหัว



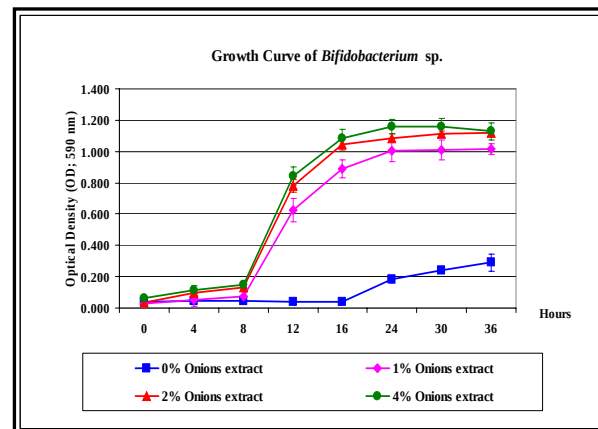
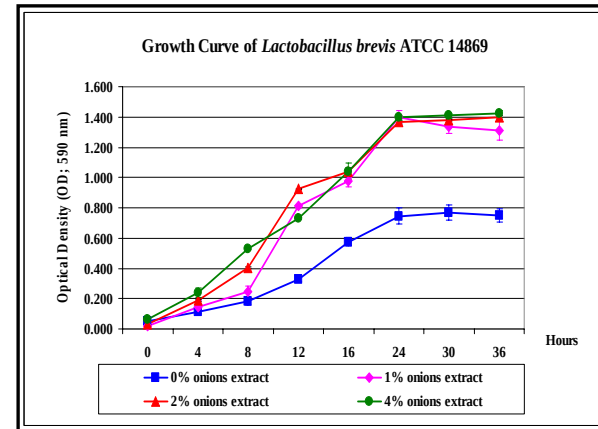
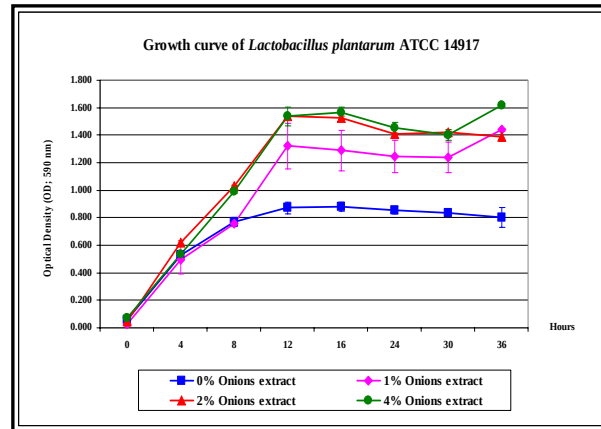
รูปที่ 29 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกระเจี๊ยบ



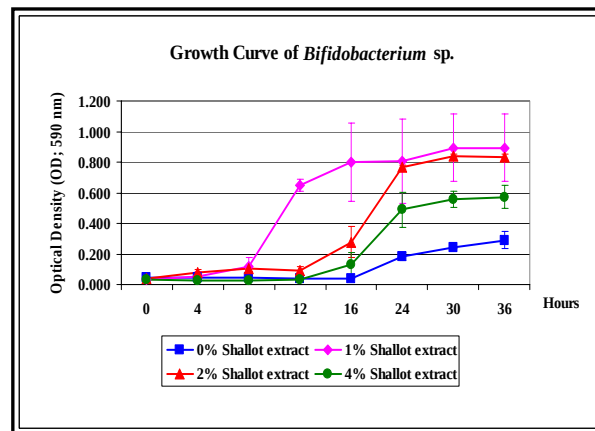
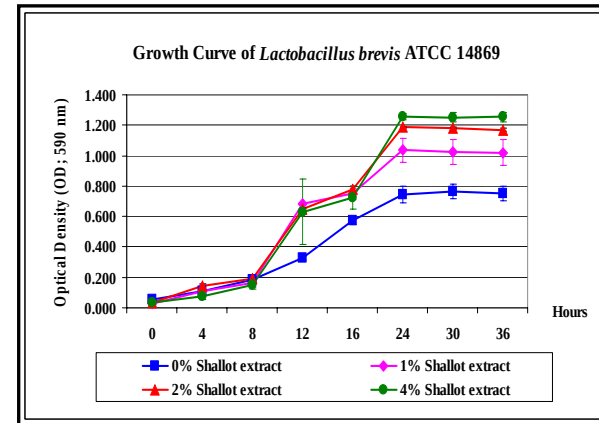
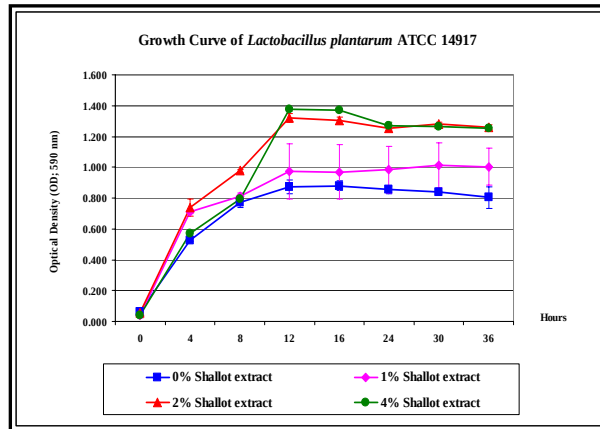
รูปที่ 30 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดขนุน



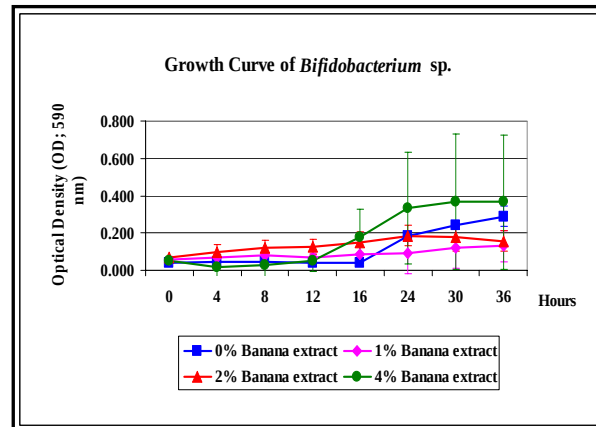
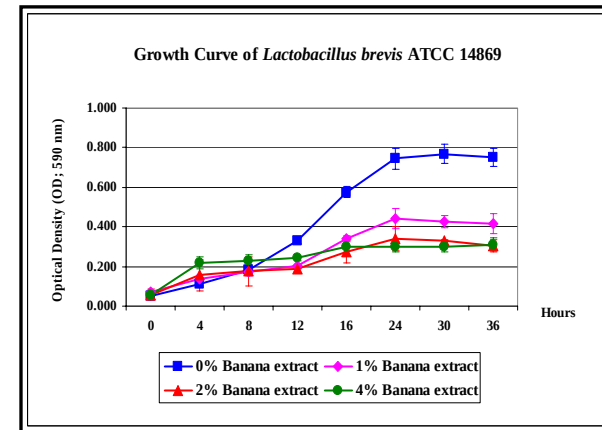
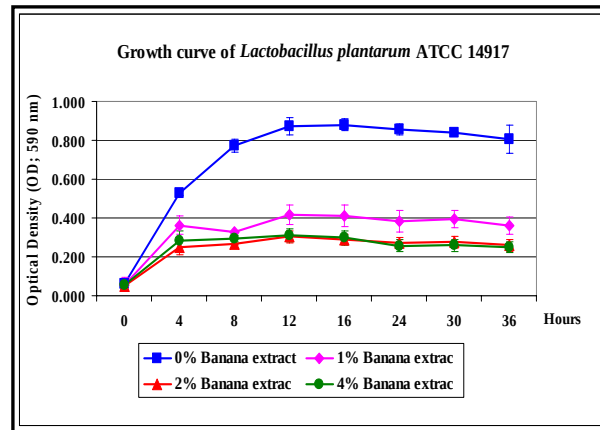
รูปที่ 31 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดหอมหัวใหญ่



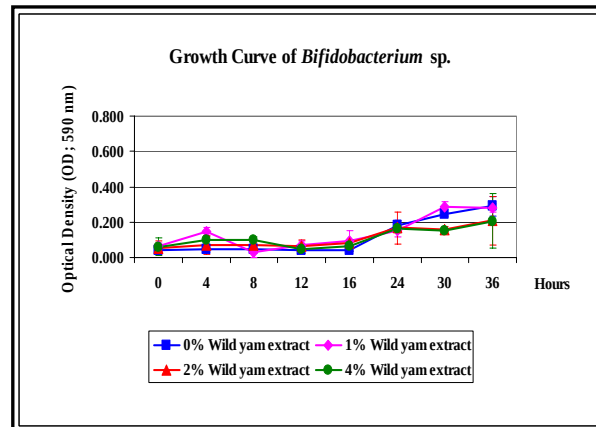
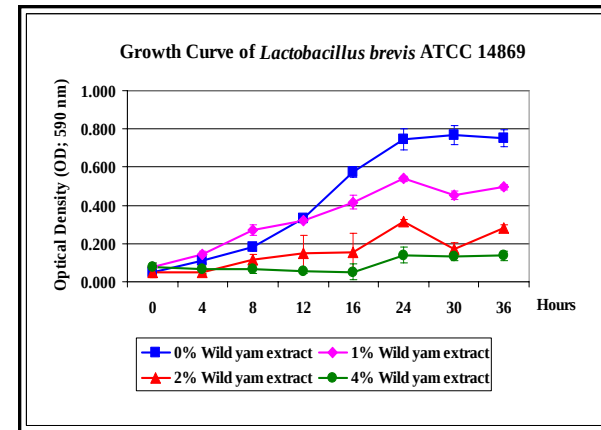
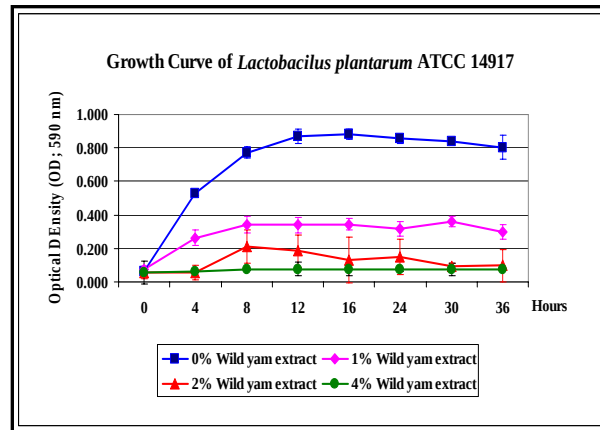
รูปที่ 32 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดหอมแดง



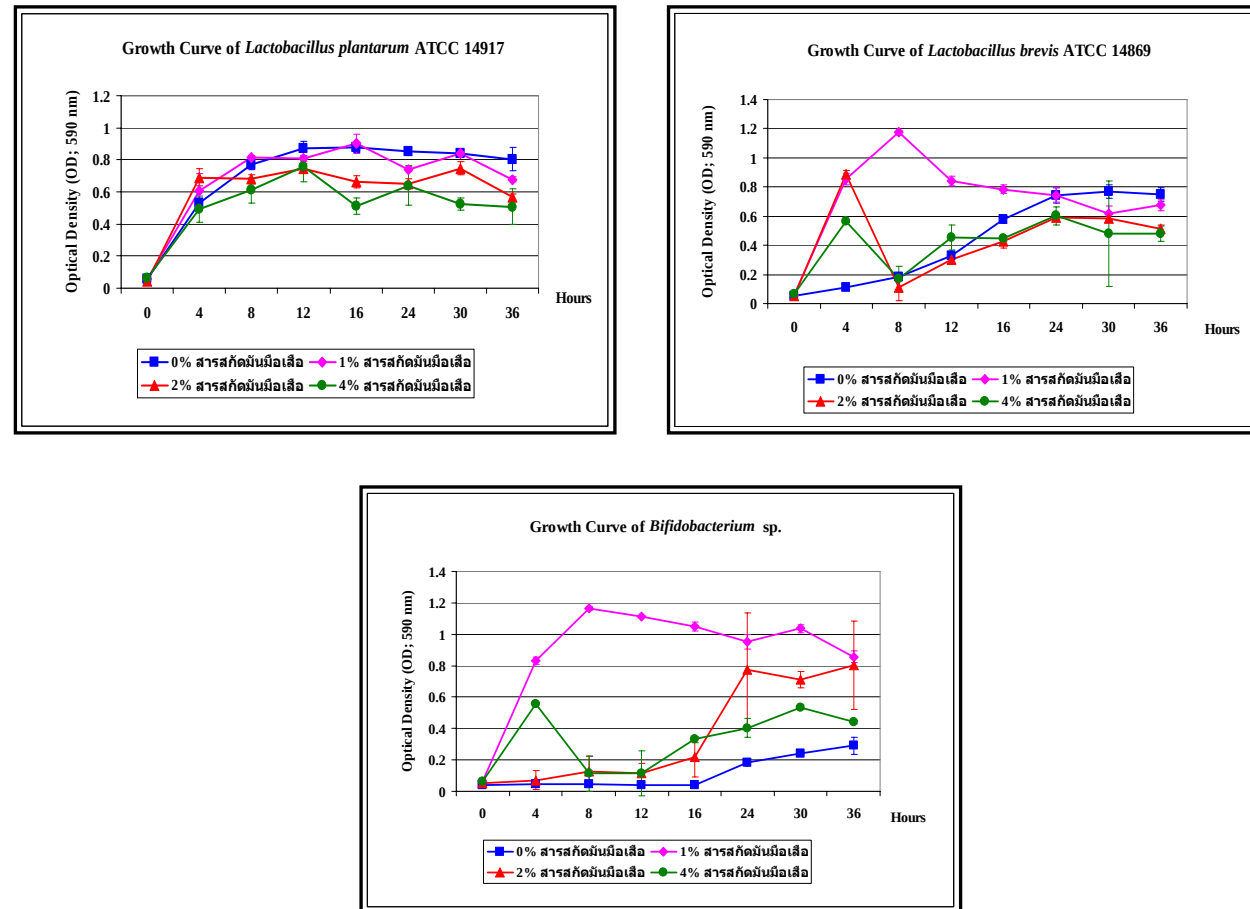
รูปที่ 33 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกล้วย



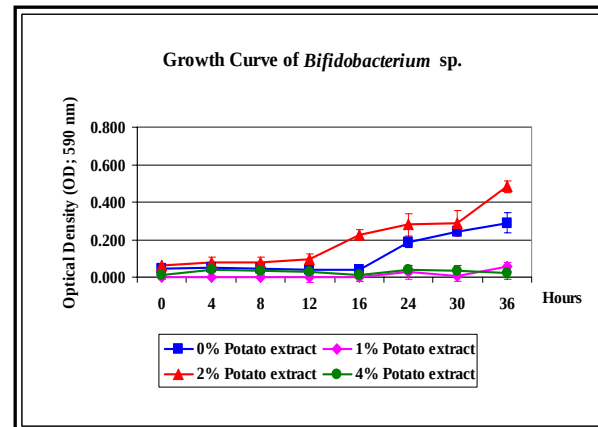
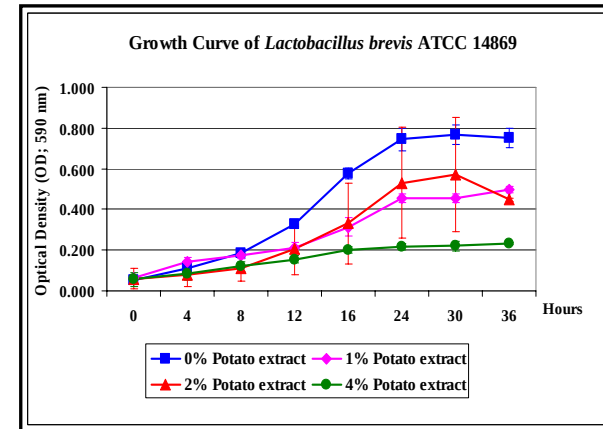
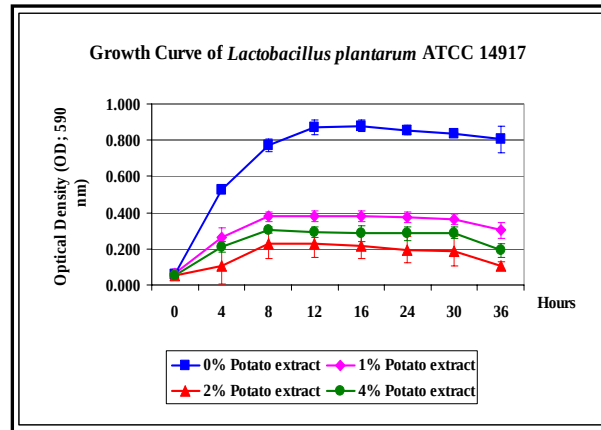
รูปที่ 34 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดกลอย

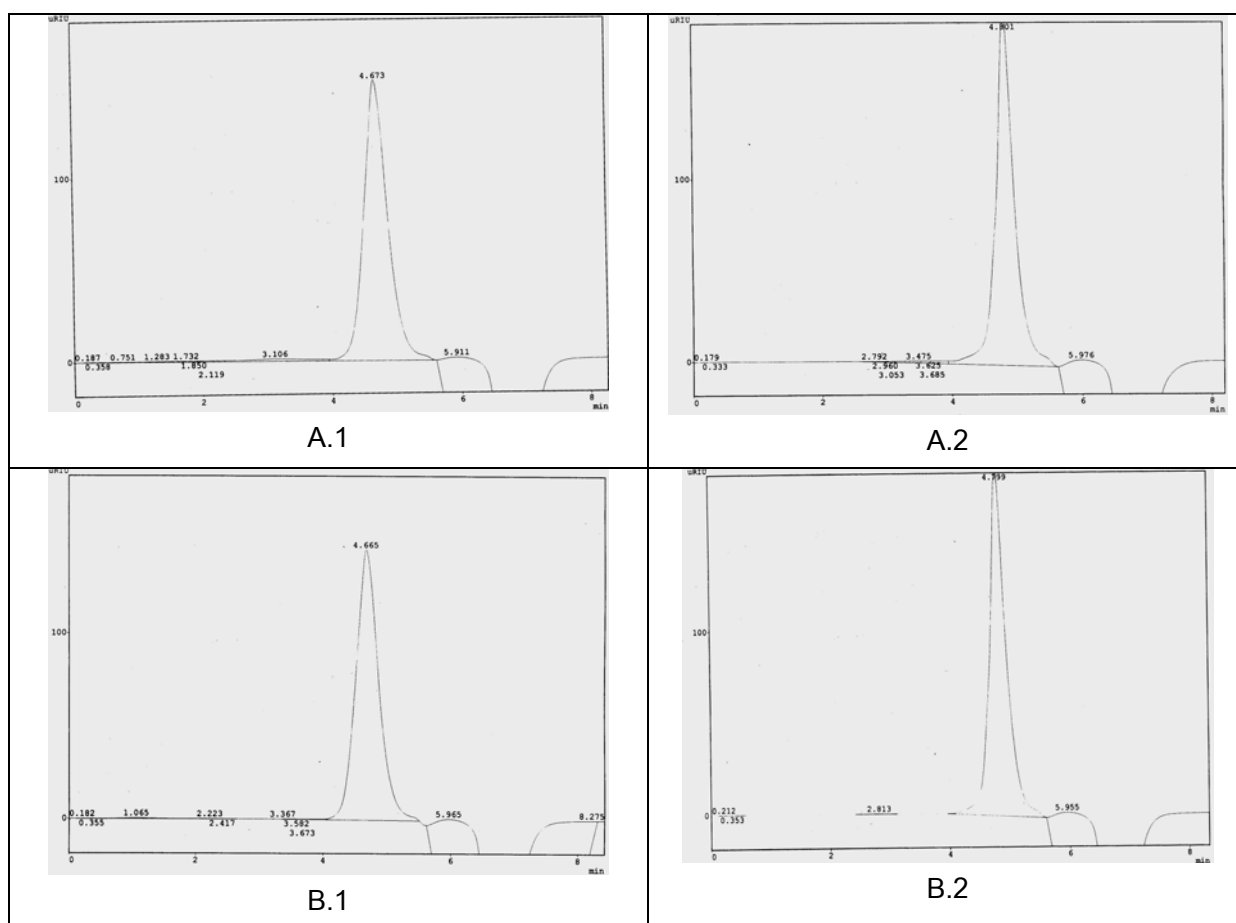


รูปที่ 35 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดมันมือเสือ



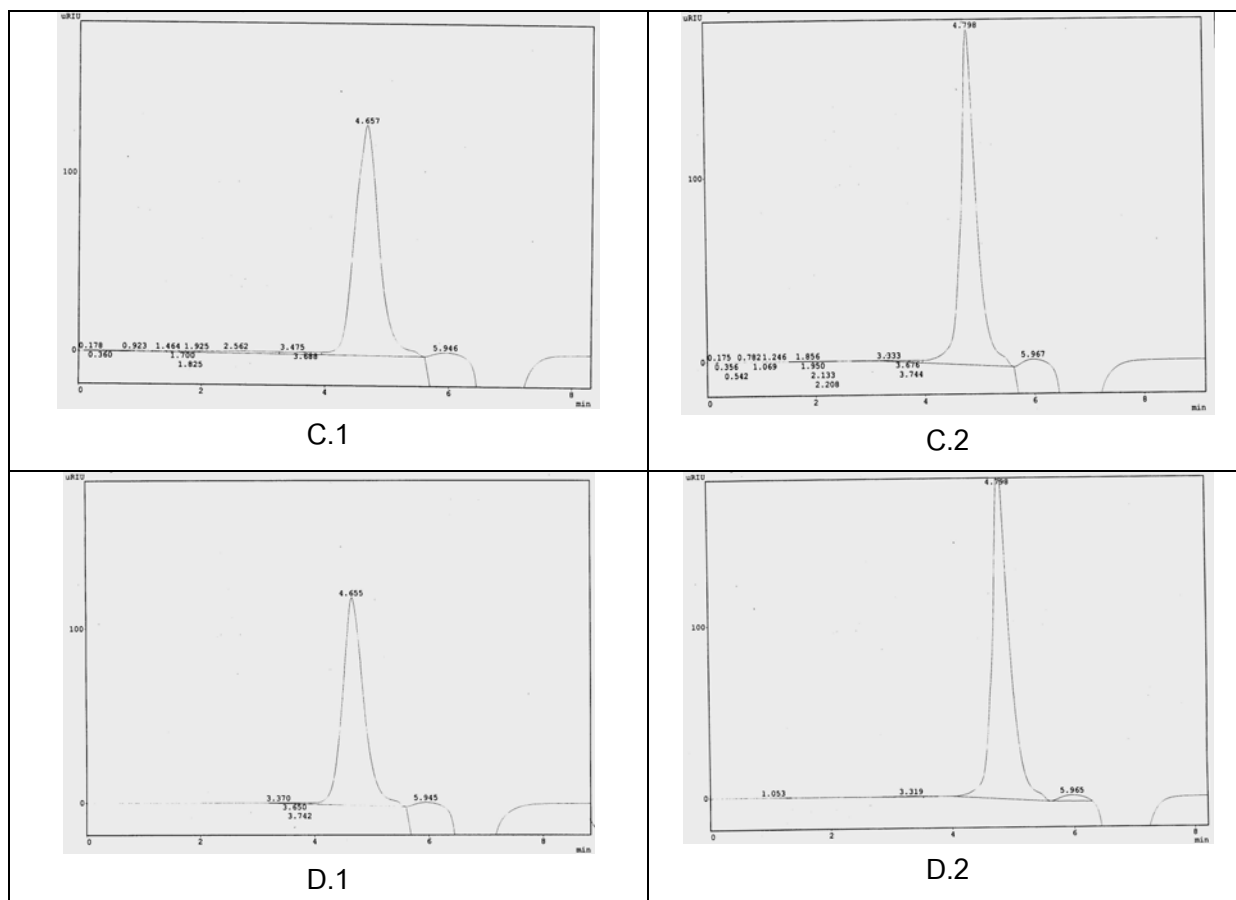
รูปที่ 36 ผลการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองโดยผสมสารสกัดมันฝรั่ง





รูปที่ 37 โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุคโตสของสารสกัดสามสิบที่อัตราส่วนน้ำต่างๆ ก่อน (1) และหลัง (2) ไฮโดรไลส์ด้วยอินนูลินเนส

- | | |
|------------------|-------------------|
| A- พืชต่อน้ำ 1:1 | B - พืชต่อน้ำ 1:2 |
| C- พืชต่อน้ำ 1:3 | D - พืชต่อน้ำ 2:1 |



รูปที่ 37 (ต่อ) โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุกโตสของสารสกัดสามสิบที่อัตราส่วนน้ำต่างๆ ก่อน (1) และ หลัง (2)

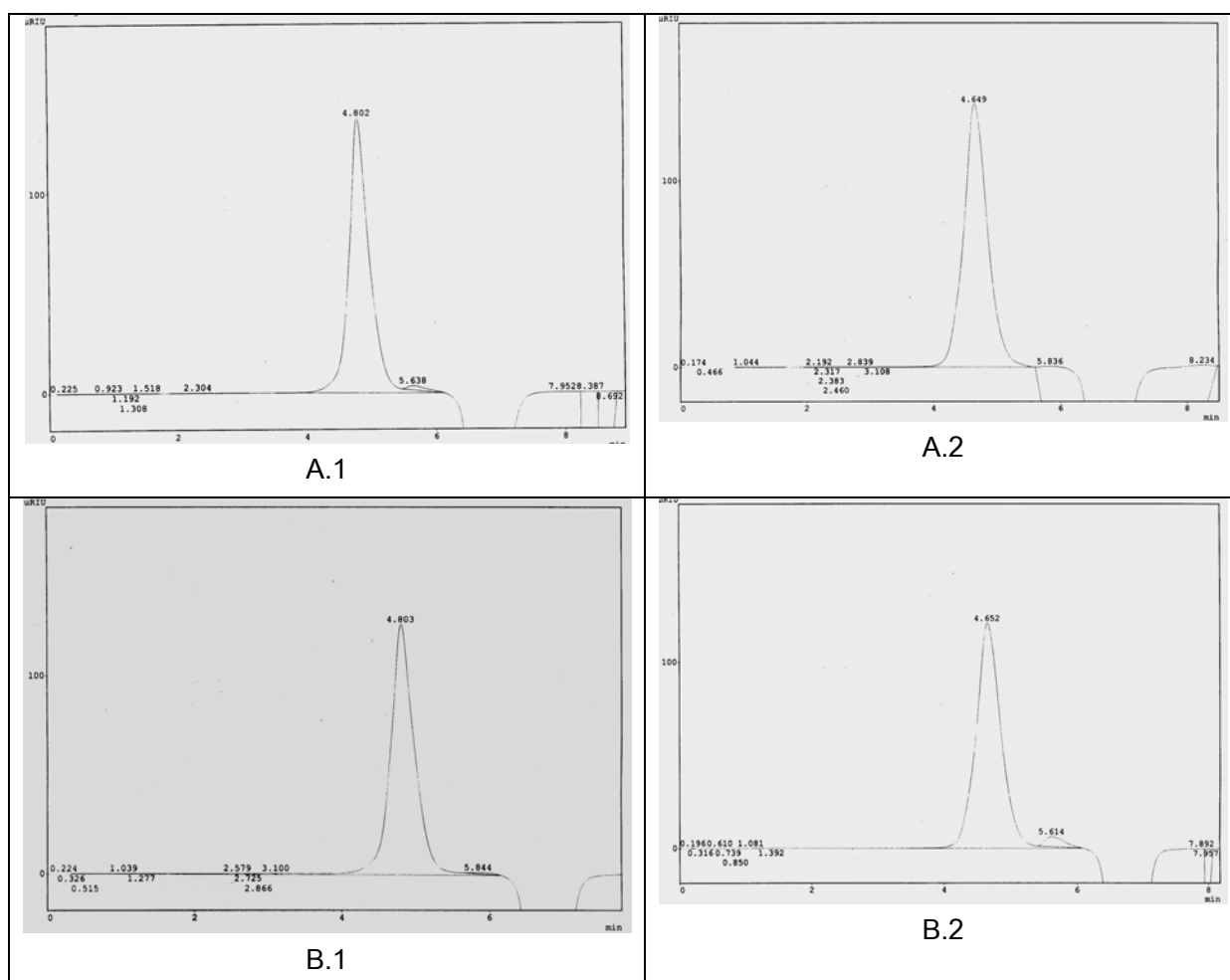
ไฮโดรไลสด้วยอินนูลินเนส

A- พืชต่อน้ำ 1:1

B - พืชต่อน้ำ 1:2

C- พืชต่อน้ำ 1:3

D - พืชต่อน้ำ 2:1



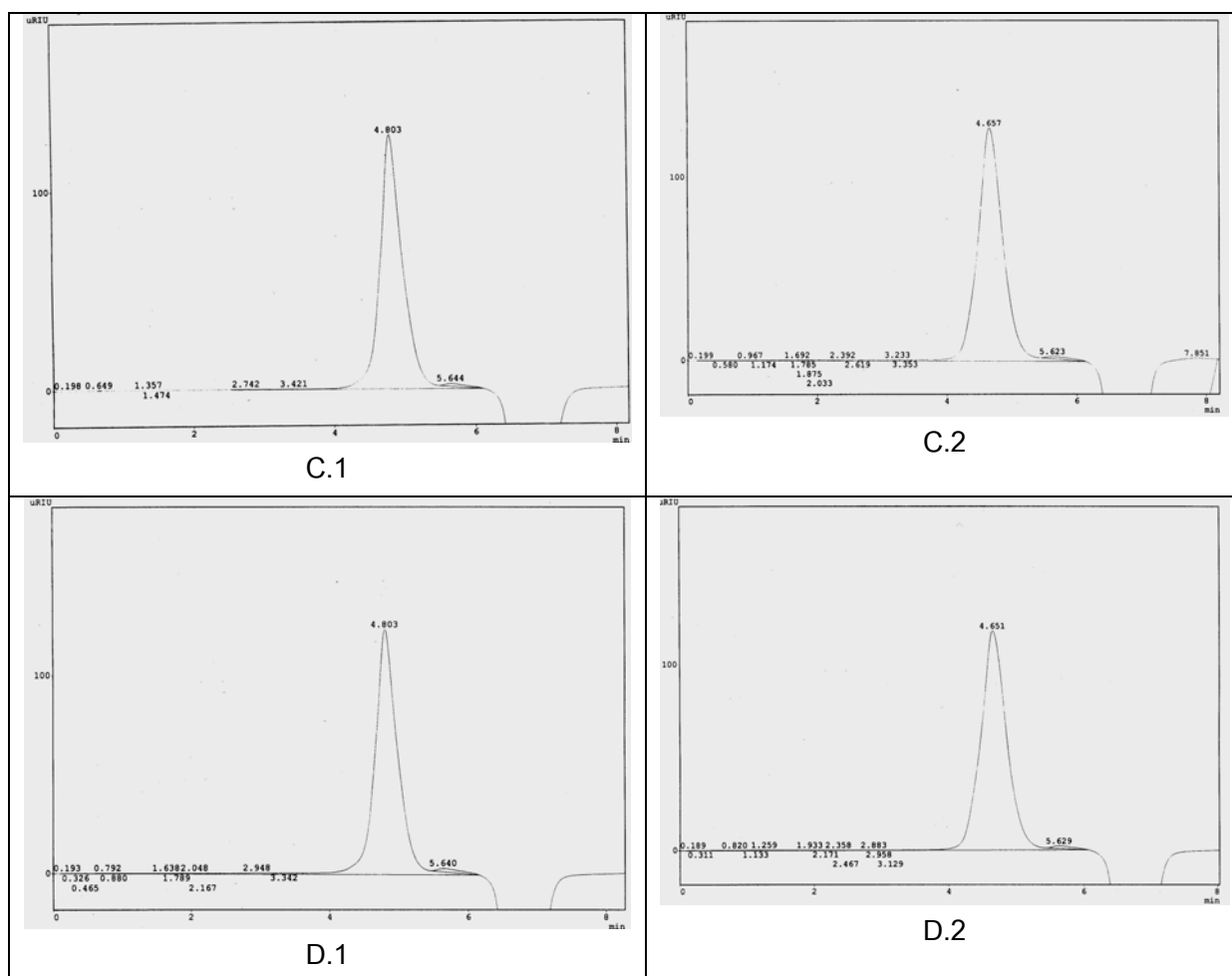
รูปที่ 38 โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุคโตสของสารสกัดสามสิบที่ sonicate ระยะเวลาต่างๆ ก่อน (1) และ หลัง (2) ไฮโดรไลส์ด้วยอินนูลินเนส

A- sonicate 15 min

B - sonicate 30 min

C- sonicate 45 min

D - sonicate 60 min



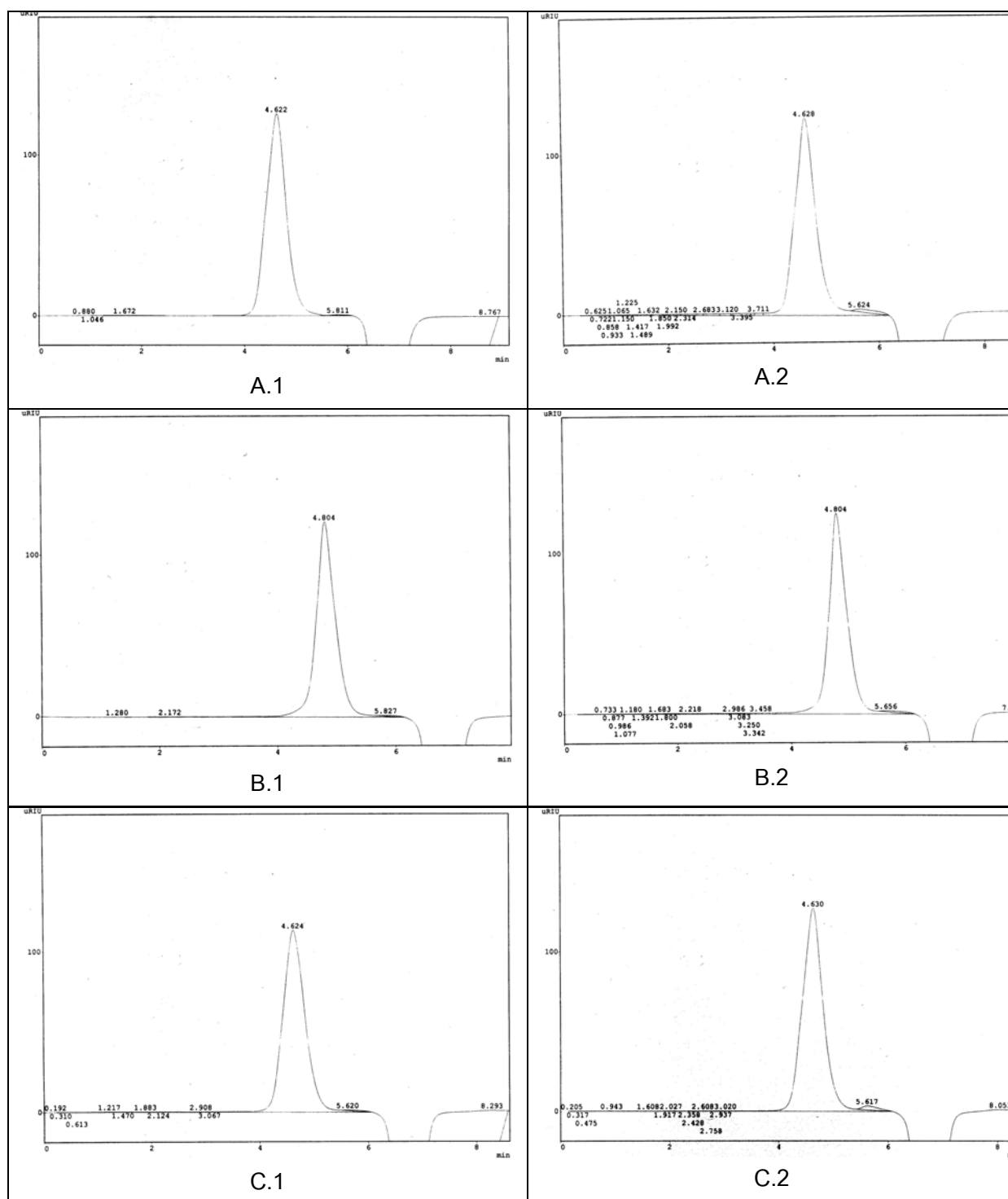
รูปที่ 38 (ต่อ) โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุกโตสของสารสกัดสามสิบที่ sonicate ระยะเวลาต่างๆ ก่อน (1) และหลัง (2) ไฮโดรไลสด้วยอินนูลินเนส

A- sonicate 15 min

B - sonicate 30 min

C- sonicate 45 min

D - sonicate 60 min



รูปที่ 39 โครมาโตแกรมน้ำตาลฟรุกโตสของสารสกัดสามสิบผ่านวัสดุกรองต่างๆ ก่อน (1) และหลัง (2) ไฮโดรไลส์ด้วยอินนูลินเนส

A- กระดาษกรอง

B - celite

C- คาร์บอน