



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ปริมาณและทดสอบประสิทธิภาพในการเป็น พรีไบโอติกส์ของอินูลินในผลไม้ไทย

โดย ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง และคณะ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กันยายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ปริมาณและทดสอบประสิทธิภาพในการเป็น ฟรีไบโอติกส์ของอินูลินในผลไม้ไทย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัน

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร. วิภา หนูผลการ

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นายจรัส นัยเนื่องทรัพย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อ	iv
Abstract	v
สารบัญรูปภาพ	vi
สารบัญตาราง	vii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	
2.1 การเตรียมและสกัดเนื้อผลไม้	9
2.2 การวิเคราะห์ปริมาณอินูลินในเนื้อผลไม้	12
2.3 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อการเจริญของ <i>Lactobacillus sp.</i>	15
2.4 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ใน <i>Lactobacillus sp.</i>	16
ต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค	
2.5 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการค้า	18
2.6 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อเชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการค้า	19

ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค

บทที่ 3 ผลงานวิจัยที่ได้รับ

3.1 การเตรียมและสกัดเนื้อผลไม้ 20

3.2 การศึกษาเบื้องต้นโดยการตรวจสอบสารอินลินที่มีอยู่ในผลไม้ 23

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอินลินที่สกัดได้จากเนื้อผลไม้โดยวิธี HPLC 29

3.4 ผลของสารสกัดหยาบจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อ 31

การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus sp.*

3.5 ผลของสารสกัดหยาบจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อ 40

การเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์

เสริมอาหาร

3.6 ผลของสารสกัดอินลินจากเนื้อผลไม้ต่อ *Lactobacillus sp.* และ 43

Bifidobacterium spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในด้าน

ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค

บทที่ 4 สรุปผลและวิจารณ์ 54

เอกสารอ้างอิง 56

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถดำเนินการลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือ และสนับสนุนจากผู้ร่วมงานทุกท่าน และหน่วยงานต่างๆ ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทุนวิจัย อันเป็นจุดเริ่มต้นให้โครงการนี้เกิดขึ้นได้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร. นันทวัน บุญยะประภัสร์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำทางวิชาการมาโดยตลอด นอกจากนี้ ขอขอบคุณคุณคุณกัลยาณี สุวิทวัส สถาบันอินทรีจันทร์สถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปากช่อง นครราชสีมา ที่ให้คำแนะนำและเป็นธุระจัดหากล้วยพันธุ์ต่างๆ รวมทั้งบุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในทุกๆ ด้าน ผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้เกี่ยวข้อง และเป็นข้อมูลเบื้องต้นอันจะก่อให้เกิดการพัฒนาต่อไป

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive summary)

ถึงแม้กระแสความนิยมการบริโภคผลไม้ไทยจะมีมากทั้งในและต่างประเทศ แต่มูลค่าของผลไม้ไทยในตลาดกลับไม่ได้เพิ่มสูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากการประท้วงของกลุ่มเกษตรกรและปัญหาผลผลิตล้นตลาด รวมถึง ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาระดับประเทศ โครงการวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นการศึกษาคุณประโยชน์ของผลไม้ไทยที่นอกเหนือจากเรื่องรสชาติ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลไม้ และสนับสนุนให้เกิดกระแสบริโภคเพิ่มขึ้น เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ และเป็นการส่งเสริมการส่งออกผลไม้ไทย อีกทั้งช่วยกระตุ้นการเพาะปลูกของเกษตรกรอีกด้วย โครงการนี้ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกส์ (prebiotics) ซึ่งก็คือ สารหรือองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร มีข้อดีคือช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตอย่างจำเพาะต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร พรีไบโอติกส์บางชนิดสามารถจับจำเพาะกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* และ *E. coli* ซึ่งต่อมาจะถูกกำจัดออกจากระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้พรีไบโอติกส์บางชนิดยังสามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* โดยการเป็นแหล่งอาหารให้กับเชื้อ ทำให้ลำไส้เกิดความสมดุลและยังช่วยเพิ่มการนำสารอาหารไปใช้ด้วย งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกผลไม้ที่มีในประเทศเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอินูลิน และทำการเตรียมสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การเป็นพรีไบโอติกส์ ผลไม้ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ พุทราพันธุ์นมสด มะพร้าวพันธุ์สูง มะพร้าวน้ำหอม น้อยหน่าหนัง ทุเรียนหมอนทอง ทุเรียนชะนี มะม่วงเขียวเสวย ละมุดพันธุ์มะกอก ผีอก นอกจากนี้ยังมีกล้วยพันธุ์ต่างๆ เช่น กล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า กล้วยหักมุก กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยพันธุ์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทยอีกกว่า 14 ชนิด จากการคัดกรองเบื้องต้นพบว่า ผลไม้ที่คัดเลือกมาส่วนใหญ่พบอินูลินในผล แต่ไม่พบอินูลินในเปลือกเลย โดยเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินที่มีอยู่ในสารสกัดผลไม้ พบว่ากล้วยน้ำว้าให้ปริมาณอินูลินสูงสุดถึงร้อยละ 12.23 ส่วนกล้วยเขียว กล้วยหักมุกเขียว และกล้วยน้ำ มีปริมาณอินูลินประมาณร้อยละ 7.69, 7.59 และ 6.11 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลไม้ชนิดอื่นๆ ที่ให้ปริมาณอินูลินสูงได้แก่ มะพร้าวพันธุ์สูงและน้ำหอม ละมุดพันธุ์มะกอก ทุเรียนหมอนทองและชะนี ส่วนกล้วยไข่ทองเงย กล้วยไข่ ชุ่มแพ กล้วยนางพญา กล้วยน้ำว้า กล้วยหอม กล้วยหักมุกทอง กล้วยเล็บมือนางที่มีผล กล้วยไข่ กล้วยลังกา กล้วยหักมุก ให้ปริมาณอินูลินปานกลาง ส่วนพุทราพันธุ์นมสด กล้วยหิน กล้วยเล็บมือนางและเทพรมีอินูลินอยู่ในปริมาณต่ำ และวิเคราะห์ไม่พบอินูลินเลยในเปลือก สำหรับพันธุ์กล้วยที่นิยมบริโภคในประเทศนั้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กล้วยน้ำว้ามีปริมาณอินูลินสูงสุดประมาณร้อยละ 4.07 ส่วนกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยหักมุก และกล้วยเล็บมือนางมีปริมาณอินูลินลดลงตามลำดับ

เมื่อศึกษาในด้านประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ พบว่า กล้วยพันธุ์ต่างๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกล้วยหอมและกล้วยเล็บมือนางที่มีผลลดการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* ณ ชั่วโมงที่ 16 ส่วนมะพร้าวแก่พันธุ์สูงและมะพร้าวอ่อนน้ำหอมสามารถคงปริมาณเชื้อได้กว่า 40 ชั่วโมงโดยมีแบบแผนการเพิ่มจำนวนของเชื้อใกล้เคียงกับการเติมสารอินูลินมาตรฐานเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้นพบว่า การให้สารสกัดอินูลินจากผลไม้ที่คัดเลือกมาให้ผลดีใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่มีการเติมสารอินูลินมาตรฐาน

ในส่วนการศึกษาศักยภาพในการต้านเชื้อนั้น เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินูลินจากผลไม้ต่อเชื้อ *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* พร้อมกับการเติมสารสกัดกล้วยน้ำว้ามีอนางให้ผลยับยั้งเชื้อทั้งหมดได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับการเติมสารสกัดชนิดอื่นๆ โดยสรุป หากพิจารณาถึงผลไม้ที่มีศักยภาพที่น่าศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในผล และการสกัดแยกอินูลินบริสุทธิ์เพื่อจะพัฒนาต่อเป็นพรีไบโอติกส์นั้น พบว่า กล้วยน้ำว้ามีอนาง มะพร้าวพันธุ์สูง และพันธุ์น้ำหอม มีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณอินูลินสูง ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกส์ รวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

บทคัดย่อ

ปัจจุบันความสนใจที่มีต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตมีมากขึ้น การศึกษาวิจัยถึงคุณประโยชน์ของผลผลิตจากธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผัก ผลไม้ ซึ่งมีราคาไม่แพง และมีจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายในท้องตลาด จึงเป็นเพิ่มมูลค่าและการส่งเสริมการบริโภคผัก ผลไม้ให้มากยิ่งขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาคัดเลือกผลไม้ที่มีในประเทศเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอินูลิน และทำการเตรียมสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การเป็นพรีไบโอติกส์ ผลการทดลองพบว่าผลไม้ที่คัดเลือกมา คือ พุทราพันธุ์นมสด มะพร้าวพันธุ์สูง มะพร้าวน้ำหอม น้อยหน่าหนึ่ง ทูเรียนหมอนทอง ทูเรียนชะนี มะม่วงเขียวเสวย ละมุดพันธุ์มะกอก มีอินูลินอยู่ในผลและเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินูลินด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography พบว่ามีปริมาณอินูลินอยู่ร้อยละ 1.45 ถึง 5.78 โดยมะพร้าวแก่พันธุ์สูงให้ปริมาณอินูลินสูงสุด ส่วนพุทราพันธุ์นมสดมีปริมาณอินูลินต่ำที่สุด และไม่พบอินูลินในเผือกเลย สำหรับกล้วยพันธุ์ต่างๆ อีก 18 ชนิดที่ได้ทำการศึกษา พบว่า กล้วยน้ำว้ามีปริมาณอินูลินสูงสุดถึงร้อยละ 12.23 ส่วนกล้วยเขียว กล้วยหักมุกเขียว และกล้วยน้ำว้า มีปริมาณอินูลินประมาณร้อยละ 7.69, 7.59 และ 6.11 ตามลำดับ โดยกล้วยเทพรสพบว่ามีปริมาณอินูลินต่ำที่สุดประมาณร้อยละ 0.92 สำหรับพันธุ์กล้วยที่นิยมบริโภคในประเทศนั้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กล้วยน้ำว้ามีปริมาณอินูลินสูงสุดประมาณร้อยละ 4.07 ส่วนกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยหักมุก และกล้วยเล็บมือนาง มีปริมาณอินูลินลดลงตามลำดับ

เมื่อศึกษาในด้านประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ พบว่า กล้วยพันธุ์ต่างๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกล้วยหอม และกล้วยเล็บมือนางที่มีผลลดการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* ณ ชั่วโมงที่ 16 ส่วนมะพร้าวแก่พันธุ์สูงและมะพร้าวอ่อนน้ำหอมสามารถคงปริมาณเชื้อได้กว่า 40 ชั่วโมงโดยมีแบบแผนการเพิ่มจำนวนของเชื้อใกล้เคียงกับการเติมสารอินูลินมาตรฐานเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้น พบว่าการให้สารสกัดอินูลินจากผลไม้ที่คัดเลือกมาให้ผลดีใกล้เคียงกับการเติมอินูลิน ในส่วนการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อก่อโรคนั้น เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินูลินจากผลไม้ต่อ *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง *L. plantarum* พร้อมกับการเติมสารสกัดกล้วยน้ำว้ามีผลยับยั้งเชื้อทั้งหมดได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับการเติมสารสกัดชนิดอื่นๆ และเมื่อทำการทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay พบว่า การเติมสารสกัดมะพร้าวอ่อน มะพร้าวแก่ ละมุด กล้วยสา กล้วยน้ำว้ามีผล และกล้วยเล็บมือนางในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* หรือ *Bifidobacterium spp.* ให้ผลไม่แตกต่างจากการเติมสารอินูลินมาตรฐานโดยตรง

โดยสรุป หากพิจารณาถึงผลไม้ที่มีศักยภาพที่น่าศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในผล และการสกัดแยกอินูลินบริสุทธิ์เพื่อจะพัฒนาต่อเป็นพรีไบโอติกส์นั้น พบว่า กล้วยน้ำว้ามีผลสูงและพันธุ์น้ำหอมมีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณอินูลินสูง ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกส์ รวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

ABSTRACT

Increasing concern on human health and quality of life comes into spotlight nowadays. Study on health benefits of natural products especially vegetables and fruits which are commonly available and inexpensive would urge the value and consumption rate of natural products. This study was aimed to investigate the inulin content in Thai fruits and determined their probiotic properties. The results showed that jujube (Nom sod), native coconut, aromatic coconut, sugar apple (Nung), durian (Mon thong), durian (Cha Nee), mango (Khiao sawoei), and sapodilla (Ma kok) contained some inulin about 1.45-5.78% as determined by high performance liquid chromatography. Native coconuts yielded the highest inulin content while jujubes (Nom Sod) contained very low level of inulin. There was no inulin content in taro. Additionally, a variety of 18 banana strains were also investigated and the results showed that banana (Nuew mue nang) gave the highest inulin content at 12.28%. Moreover, banana (Keaw), (Huk muk keaw), (Nam) had 7.69%, 7.59%, and 6.11% inulin content, respectively. Banana (Tep pha rod) contained the lowest amount of inulin at 0.92%. When compared among popularly consumed banana strains, the highest inulin containing banana was Nam wa which had about 4.07% inulin content. Banana (Hom), (Kai), (Huk muk), and (Leb mue nang) contained lesser amount of inulin, respectively.

There were no significant difference in the efficiency of promoting the growth of probiotics among various strains of banana with the exception of banana (Hom) and (Leb mue nang) that showed reduction of *Lactobacillus plantarum* growth after 16 hour. Native coconut and aromatic coconut could promote the growth of *L. plantarum* more than 40 hours and gave the same growth pattern as using the inulin standard as a carbon source. Ability of crude inulin extracts of selected Thai fruits could promote the growth of *Bifidobacteria* spp. isolated from a probiotic product similar to the control group added the inulin standard. Antibacterial activity of probiotics was also determined. The data demonstrated that *L. plantarum* supernatant collected after adding crude inulin extract of banana (Nuew mue nang) gave the best action against *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. Broth microdilution assay revealed that adding crude inulin extracts of native coconut, aromatic coconut, sapodilla (Ma kok), banana (Sa), banana (Nuew mue nang), banana (Leb Chang Kud) in *L. plantarum* and *Bifidobacterium* spp. culture resulted in antibacterial activity as using the standard inulin.

In conclusion, banana (Nuew mue nang), native coconut, and aromatic coconut are potential fruits that can exhibit probiotic properties. They contain high inulin content, promote the growth of probiotic strains, and enhance antibacterial activity of probiotics. Future studies for sugar composition and purification of inulin are needed for development of these fruits as probiotic products.

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอินูลิน	3
รูปที่ 2 การหมักภายในลำไส้	5
รูปที่ 3 การกระจายตัวของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับหลังได้รับอาหารปกติ และได้รับอินูลินเสริม	7
รูปที่ 4 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและ α -naphthol เกิดเป็น สารประกอบสีม่วงแดง	12
รูปที่ 5 ลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ผสมเชื้อโพรไบโอติกส์	18
รูปที่ 6 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% กลูโคส และ 1% อินูลินเป็นแหล่งคาร์บอน	32
รูปที่ 7 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยหอม และ กล้วยเล็บมือนาง เป็นแหล่งคาร์บอน	33
รูปที่ 8 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยเล็บช้างกุด กล้วยเขียว กล้วยเทพรส กล้วยไข่ และ กล้วยไข่ชุบแพ เป็นแหล่งคาร์บอน	34
รูปที่ 9 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยเล็บมือนาง (มีขนที่ผล) กล้วยไข่ทองเงย กล้วยน้ำ กล้วยน้ำว้า กล้วยลังกา และกล้วยสา เป็นแหล่งคาร์บอน	35
รูปที่ 10 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจาก กล้วยหักมุก กล้วยหักมุกเขียว กล้วยหิน กล้วยนางพญา กล้วยน้ำมือนาง และ กล้วยหักมุกทอง	36
รูปที่ 11 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากน้อยหน่า และพุทราหมสด	37
รูปที่ 12 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากมะม่วงเขียวเสวย ละมุด ทุเรียนชะนี และ ทุเรียนหมอนทอง	38
รูปที่ 13 กราฟแสดงการเจริญของ <i>L. plantarum</i> ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากมะพร้าวอ่อน และมะพร้าวแก่	39
รูปที่ 14 กราฟแสดงการเจริญของ <i>Bifidobacterium spp.</i> ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% กลูโคส อินูลิน สารสกัดจากกล้วยเล็บช้างกุด กล้วยน้ำมือนาง กล้วยสา และละมุด	41
รูปที่ 15 กราฟแสดงการเจริญของ <i>Bifidobacterium spp.</i> ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจาก มะพร้าวอ่อน และมะพร้าวแก่	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	4
ตารางที่ 2	6
ตารางที่ 3	10
ตารางที่ 4	13
ตารางที่ 5	14
ตารางที่ 6	21
ตารางที่ 7	22
ตารางที่ 8	23
ตารางที่ 9	26
ตารางที่ 10	30
ตารางที่ 11	30
ตารางที่ 12	44
ตารางที่ 13	46
ตารางที่ 14	47
ตารางที่ 15	48
ตารางที่ 16	49
ตารางที่ 17	50
ตารางที่ 18	52
ตารางที่ 19	52
ตารางที่ 20	53

ตารางที่ 21	ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ <i>E. coli</i> ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก <i>Bifidobacterium spp.</i> ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยวิธี broth microdilution assay
-------------	---

53

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันความสนใจที่มีต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตมีมากขึ้น การศึกษาวิจัยถึงคุณประโยชน์ของผลผลิตจากธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผัก ผลไม้ ซึ่งมีราคาไม่แพง และมีจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายในท้องตลาด จึงเป็นการส่งเสริมการบริโภคผัก ผลไม้ให้มากยิ่งขึ้น มีรายงานวิจัยกล่าวถึง 프리ไบโอติกส์ (prebiotics) ซึ่งก็คือ สารหรือองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร มีข้อดีคือช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตอย่างจำเพาะต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร 프리ไบโอติกส์บางชนิดมีตำแหน่งจับจำเพาะสำหรับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* และ *E. coli* ซึ่งต่อมาจะถูกกำจัดออกจากระบบทางเดินอาหารไปกับอุจจาระ ในขณะที่ฟรีไบโอติกส์ชนิดอื่นๆ ก็กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* โดยการเป็นแหล่งอาหารให้กับเชื้อ ทำให้ลำไส้เกิดความสมดุล และยังช่วยเพิ่มการนำสารอาหารไปใช้ด้วย ตัวอย่างของฟรีไบโอติกส์ เช่น อินูลิน (Inulin) ซึ่งเป็นสาร polysaccharides ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น Chicory root เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม กล้วย เป็นต้น

จะเห็นได้ว่า อินูลินมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้ ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาคัดเลือกผลไม้ที่มีในประเทศเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอินูลิน และทำการเตรียมสารสกัดหยาบอินูลินจากเนื้อผลไม้ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การเป็นฟรีไบโอติกส์อีกด้วย ซึ่งเป็นการช่วยส่งเสริมคุณค่าของผลไม้ไทย ผลการวิจัยจากโครงการนี้จะนำไปสู่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในทางวิชาการ ส่งผลสนับสนุนการบริโภคผลไม้ไทยเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ และเป็นการส่งเสริมการส่งออกผลไม้ไทย อีกทั้งช่วยกระตุ้นการเพาะปลูกของเกษตรกรอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิเคราะห์ปริมาณอินูลินในเนื้อผลไม้ไทย
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกส์ของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้
3. เพื่อศึกษาผลของของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฟรีไบโอติกส์ (prebiotics) ซึ่งก็คือ สารหรือองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร มีข้อดีคือช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตอย่างจำเพาะต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร สารที่สามารถจัดเป็นฟรีไบโอติกส์ได้นั้นจะต้องมีลักษณะอย่างน้อย 3 ประการ คือ สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซับในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก สารนั้นจะต้องจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้และการหมักของสารนั้น ควรมีการกระตุ้นที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ ซึ่งสามารถแบ่งประเภทของฟรีไบโอติกส์ ได้ดังนี้

1. Alcohol sugar

เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีดัชนีการสลายโพลีเมอร์ (degree of polymerization) เพียง 1-2 ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น maltitol, sorbitol, isomalt, xylitol เป็นต้น ในบางครั้งจะเรียก alcohol sugar ว่า POLYOLS สามารถเป็นสารให้ความหวานได้ โดยมีความหวานประมาณ 3 ใน 4 หรือครึ่งหนึ่งของน้ำตาลทั่วไปและยังดูดซับได้ช้าในลำไส้เล็กเมื่อเทียบกับน้ำตาล จึงทำให้ระดับ น้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ด้วย

2. Resistant starch

เป็น polysaccharides ซึ่งจะไม่ถูกดูดซับในลำไส้เล็ก ประกอบด้วย amylose และ amylopectin พืชส่วนใหญ่จะมี amylose ประมาณร้อยละ 20-25

3. Non-starch polysaccharides (NSP)

เป็นสารที่ได้รับจากพืช เช่น pectin, cellulose, hemicellulose, guar และ xylan

4. Inulin

เป็นสาร polysaccharides ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น Chicory root เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม กล้วย เป็นต้น

5. Sugar and Oligosaccharides

สำหรับพรีไบโอติกส์ในกลุ่มนี้ จัดเป็น short-chain polysaccharide ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ถึง 20 หน่วย ตัวอย่างเช่น raffinose, stachyose, fructo-oligosaccharides (FOS) ซึ่งจัดเป็น non-digestible oligosaccharide นอกจากนี้ยังมี lactose, lactulose, galacto-oligosaccharide (GOS), soybean oligosaccharide, lactosucrose, isomalto-oligosaccharide, gluco-oligosaccharides, xylo-oligosaccharides และ palatinose ที่สามารถจัดเป็น prebiotics ได้ด้วย

6. Mucin glycoproteins

ถูกสร้างโดย goblet cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในลำไส้

7. Related mucopolysaccharides

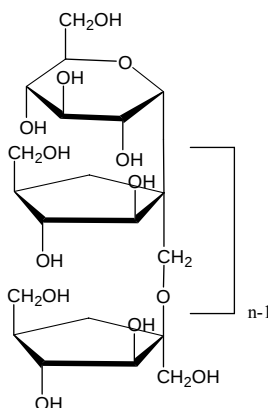
ตัวอย่างเช่น chondroitin sulphate, heparin, pancreatic และ bacterial secretions ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้

8. Protein and peptides

สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหาร การหลั่งของตับอ่อน หรือสร้างโดยแบคทีเรีย แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรต

สำหรับงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงปริมาณและคุณสมบัติของอินูลินในผลไม้ไทย ซึ่งอินูลินนั้นจัดเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่พืชเก็บสะสมอยู่ในรูปของ fructan-type carbohydrate โมเลกุลของอินูลินประกอบด้วย fructosyl unit ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า (2,1) ซึ่งอาจจะปรากฏ side chain ซึ่งเป็น fructosyl unit

ในบางตำแหน่งโดยเชื่อมด้วยพันธะเบต้า (2,6) ดังรูปที่ 1 อินูลินที่มาจากพืชส่วนใหญ่ตรงปลายสายยาวมักปรากฏส่วนของ glucosyl unit ดังนั้นสูตรโมเลกุลทั่วไปของอินูลินจึงแสดงด้วย GF_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) ซึ่งตัวเลขของ n+1 จะแสดงถึงค่าของ degree of polymerization (DP) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงจำนวนของ saccharide unit ทั้งหมดในโมเลกุลของอินูลิน ค่า DP จะบอกถึงคุณสมบัติในการละลาย การดูดซึมของอินูลิน และโดยทั่วไปแล้วอินูลินที่ได้จากพืช มักจะมีค่า DP ในช่วง 2 ถึง 100 ขณะที่อินูลินที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดมีค่า DP ในช่วงสูงถึง 115,000 สำหรับค่า DP ของพืชที่มีช่วงกว้างนั้นเพราะมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของพืช การปลูกและการเก็บเกี่ยว รวมทั้งขั้นตอนการสกัดสาร อินูลินที่มีค่า DP น้อยกว่า 10 จะเรียกว่าเป็นพวกริโบโอลิโกแซคคาไรด์ (inulo-oligosaccharide) หรือ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) หรือบางครั้งจัดให้อยู่ในประเภท short-chain polysaccharide สำหรับอินูลินที่ใช้ทางอุตสาหกรรมได้มาจากพืช ซึ่งส่วนใหญ่แล้วสกัดจากรากของต้นชิโครี แต่มีบ้างที่ได้จากส่วนหัวของต้นเจอร์ซาลีมอาร์ตชีค (*Helianthus tuberosus*) หรือมาจากส่วนหัวของต้น blue agave ชื่อทางการค้า เช่น Raffiline[®] และ Fibruline[®] ค่า DP ของอินูลินจากต้นชิโครีเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 10 ขณะที่ของเจอร์ซาลีมอาร์ตชีคอยู่ประมาณ 6



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอินูลิน

แหล่งของอินูลิน

อินูลินมีรายงานการวิจัยว่าพบในพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่มักอยู่ในวงศ์ Asteraceae, Graminae, Compositae เช่น dahlia (*Dahlia variabilis*), jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), chicory (*Cichorium intybus*), dandelion (*Taraxacum officinale*) นอกจากนี้ยังพบได้ใน หัวหอม, กระเทียม, กลัวย, ข้าวสาลี, ข้าวไรย์, ข้าวบาเลย์ โดยแต่ละชนิดจะมีปริมาณของอินูลินและโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) ซึ่งได้จากการย่อย (hydrolyse) อินูลิน แตกต่างกันไปดังตัวอย่างในตารางที่ 1

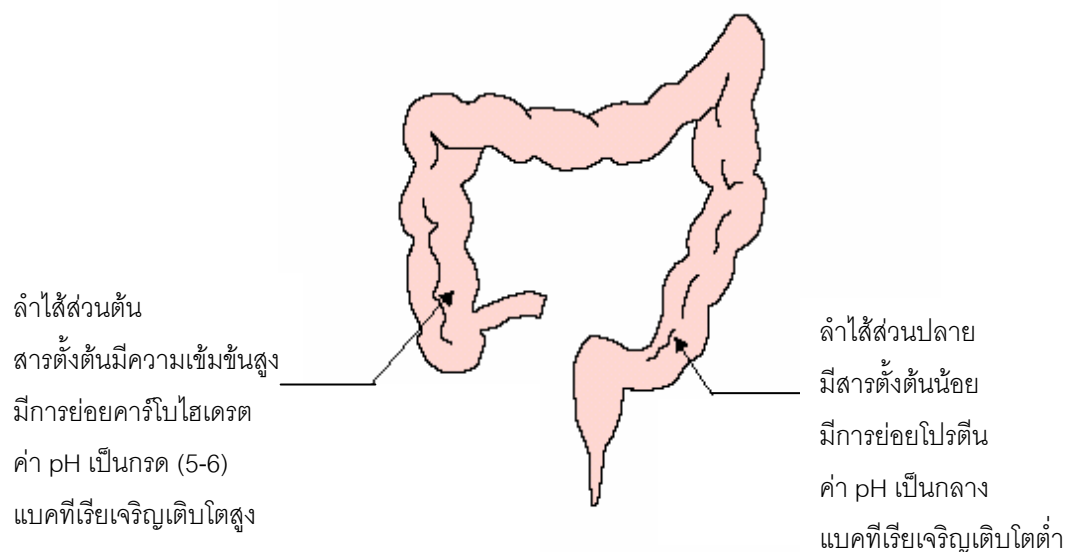
ตารางที่ 1 ปริมาณ Inulin และ Oligofructose ในอาหารชนิดต่าง ๆ

	ปริมาณ Inulin (%)	ปริมาณ Oligofructose (%)
หัวหอม (Onion)	2 - 6	2 - 6
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
อาร์ติโชค (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

การย่อยสลายของพรีไบโอติกส์ในร่างกาย

พรีไบโอติกส์จะถูกย่อยสลายในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ตัวเอง โดยในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น จะมีการย่อยมากกว่าส่วนปลาย เนื่องจากมีความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูง และมีค่า pH ต่ำเพียงประมาณ 5-6 ทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วด้วย แต่ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายนั้นมีปริมาณสารตั้งต้นน้อย มีค่า pH เป็นกลาง และมีการเจริญของแบคทีเรียต่ำ ดังรูปที่ 2

โดยทั่วไปลำไส้ใหญ่ของคนปกติจะมีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 20-60 กรัม และมีโปรตีน 5-20 กรัม ต่อวัน ดังนั้นการย่อยสลายสาร (โดยไม่ใช้อากาศ) จึงแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การย่อยคาร์โบไฮเดรต (saccharolytic) ซึ่งจะเกิดในลำไส้ใหญ่ส่วนต้นและเกิดบางส่วนในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย และการย่อยโปรตีน (proteolytic) ซึ่งจะเกิดในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ผลสุดท้ายที่ได้จากการย่อยคาร์โบไฮเดรตคือ short-chain fatty acid (SCFAs) ได้แก่ acetate, propionate และ butyrate ซึ่งอาจมีการ metabolize ต่อไปเพื่อสร้างพลังงานให้กับ host ส่วนการย่อยโปรตีนนั้น จะได้ phenolic compounds, amines และ ammonia



รูปที่ 2 การหมักภายในลำไส้

จุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหาร

จุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของคนเรานั้นพบว่ามีมากถึง 300-500 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยมีจำนวนมากกว่าเซลล์ในร่างกายถึง 10 เท่า ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียไม่มากนัก อาจมีประมาณ 10^3 ตัวต่อมิลลิเมตร เพราะแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกฆ่าโดยกรดและเอนไซม์จากกระเพาะอาหารและลำไส้ แต่ในลำไส้เล็กส่วนกลางส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรีย *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Actinomycetes* และยีสต์โดยเฉพาะ *Candida albicans* เพียงปริมาณเล็กน้อย แต่จะพบมากในลำไส้เล็กส่วนปลาย ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่กลับตรงข้ามกับในลำไส้เล็ก นั่นคือ ในลำไส้ใหญ่จะมีเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก เมื่อเทียบกับน้ำหนักอุจจาระจะพบว่ามีแบคทีเรียปะปนอยู่ถึงร้อยละ 20 หรือคิดเป็น 10^{11} เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักเปียก ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียพวก obligate anaerobes ซึ่งมีมากกว่า facultative organism ในอัตราส่วน 1000 : 1 จุลินทรีย์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, Coliforms, aerobic และ anaerobic Streptococci, *Clostridium* และ ยีสต์ (ตารางที่ 2) โดยเฉพาะ *Bacteriodes* และ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็น obligate anaerobe พบว่ามีมากกว่าร้อยละ 90 นอกจากนี้ยังพบว่า microflora ในลำไส้ใหญ่พวก *Enterococci*, *Enterobacterium* และ *Bacteriodes* ยังสามารถทนต่อเกลือและเอนไซม์จากตับอ่อนได้ด้วย

สำหรับลำไส้ของเด็กแรกเกิด โดยส่วนใหญ่จะปราศจากเชื้อ แต่จะเริ่มมีเชื้อปะปนมาหลังจากคลอดแล้ว 24 ชั่วโมง อุจจาระของเด็กที่ได้รับน้ำนมแม่นั้นจะอ่อน และมีสีน้ำตาลอ่อนและพบเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus bifidus* เป็นส่วนใหญ่ แต่เด็กที่ไม่ได้รับ น้ำนมแม่จะมีอุจจาระแข็ง สีน้ำตาลเข้มและจะพบเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*, Coliforms, Enterococci, Anaerobic Bacilli และ Clostridial species ด้วย

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของร่างกาย

ตำแหน่งของร่างกาย	ชนิดของจุลินทรีย์
ผิวหนัง	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , Yeasts
เยื่อบุตา	<i>S. epidermidis</i>
จมูก และโพรงจมูก	<i>S. epidermidis</i> , non group A streptococci, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Treponema</i> , <i>Lactobacillus</i> , Yeasts
ทางเดินอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ช่องคลอดและทางเดินปัสสาวะ	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Actinomycetes</i> , Yeasts <i>Bacteriodes</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Corynebacterium</i> , alpha and nonhemolytic streptococci, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacterioides</i> , <i>Fusobacterium</i>
เลือดและไขสันหลัง	Sterile
เนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะ มดลูกและท่อไข่ หูชั้นกลาง ต่อมไชนัส	Sterile

ประโยชน์ของอินูลิน

สำหรับประโยชน์ของอินูลินนั้น ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้อินูลินเพื่อเป็นสารให้พลังงานต่ำ (low-calorie) ใช้ผสมบางส่วนหรือทดแทนน้ำตาล เนื่องจากอินูลินให้แคลอรีต่ำและความหวานน้อย นอกจากนี้อินูลินยังไม่ถูกดูดซึมจึงไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด จึงมีการนำมาใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ และอาจนำมาผลิตเป็นสารอาหารลดความอ้วนได้อีกด้วย รวมทั้งอาจใช้เพื่อทดแทนไขมันเนื่องจากอินูลินสามารถขึ้นรูปเจลเมื่อผสมกับน้ำได้ โดยให้เนื้อที่คงตัว เนียน และเป็นลักษณะครีม ให้รสชาติที่ดีอีกด้วย นอกจากนี้อินูลินยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเป็นอาหารเส้นใยได้ (dietary fiber) โดยทำให้ระบบขับถ่ายดีขึ้น นอกจากนี้ ยังมีผลในการลดโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์เมื่อเทียบกับการขาดอินูลินมีรายงานการทดลองในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง มีการจดสิทธิบัตรหลายฉบับเกี่ยวกับการการใช้

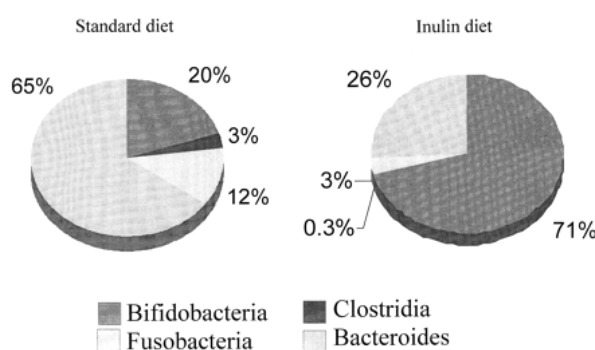
ประโยชน์จากอินูลินในอาหาร เช่น ในการทำชีสโคโคแลต ในเครื่องดื่ม รวมทั้งการผสมอินูลินเพื่อเพิ่มรสชาติในเครื่องปรุง

จากรายงานการวิจัยพบว่า อินูลินมีประโยชน์ในแง่การดูดซึมแร่ธาตุ มีผลช่วยลดไขมันในเลือด โดยมีการรายงานการให้สารสกัดจากชิโครีและอินูลินกับหนูเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชิโครีและหนูที่ได้รับอินูลิน มีปริมาณ HDL เพิ่มขึ้นและมีปริมาณ LDL ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ หนูกลุ่มที่ได้รับอินูลินในสัดส่วนร้อยละ 5 ยังมีน้ำหนักกระพุ้งลำไส้ใหญ่ (cecal) มากกว่ากลุ่มควบคุม และหนูทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัด chicory และในสัดส่วนร้อยละ 5 ยังมีปริมาณกรด propionic สูงกว่าด้วย

นอกจากนี้แล้ว ยังมีรายงานการวิจัยที่ยืนยันว่าอินูลินมีผลทางด้าน bifidogenic effect หรือโปรไบโอติกส์ กล่าวคือ อินูลินสามารถกระตุ้นการเจริญและเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ได้ เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ขณะเดียวกันก็มีผลลดจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ที่ก่อโรคได้ เช่น *Clostridia*, *Bacteroides* และ *Fusobacteria* อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3)

นอกจากนี้เนื่องจาก fructo-oligosaccharide (FOS) และอินูลินจะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและในลำไส้เล็กของมนุษย์ เพราะมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า (2,1) แต่เอนไซม์ที่ใช้อยู่ในมนุษย์ เช่น sucrase, maltase-isomaltase และ alpha-glucosidase นั้น มีความจำเพาะสำหรับ α -glycosidic linkage อย่างไรก็ตาม FOS และอินูลิน จะถูกหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ให้กลายเป็น short chain fatty acid (SCFA) ซึ่ง SCFA ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ pH ลดลง มีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ pathogenic bacteria นอกจากนี้ butyrate ที่เกิดขึ้นจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต หยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และช่วยเพิ่มการตายตามธรรมชาติของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งคุณสมบัติทั้ง 3 นี้อาจมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งได้ และยังพบว่า FOS และอินูลินช่วยให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมในลำไส้ใหญ่ ทำให้มีการดูดซึมแร่ธาตุได้ดีขึ้นและยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นให้กับ epithelial cell ในลำไส้ด้วย อีกทั้งความเข้มข้นของแคลเซียมในลำไส้ที่สูงขึ้น จะช่วยให้เกิด insoluble bile หรือเกลือของกรดไขมัน ซึ่งจะช่วยลดอันตรายจากผลของ bile หรือกรดไขมันที่มีต่อเซลล์ในลำไส้ใหญ่ (colonocytes) ได้ และความเข้มข้นของ cation ที่สูงขึ้นในลำไส้ใหญ่นี้ อาจช่วยควบคุมอัตราการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ (cell turnover) ได้ด้วย นอกจากนี้อินูลินยังอาจช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อีกด้วย

Bifidus Stimulation
In vivo study results



รูปที่ 3 การกระจายตัวของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบหลังได้รับอาหารปกติและได้รับอินูลินเสริม

สำหรับประโยชน์ของพรีไบโอติกส์นั้น พบว่าช่วยลดความเป็นพิษต่อยีน (antigenotoxicity) โดยเมื่อมีการนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการบ่มเชื้อโปรไบโอติกส์ร่วมกับพรีไบโอติกส์มาเลี้ยงเซลล์มะเร็ง HT29 (human adenocarcinoma cells) มีผลทำให้เซลล์นี้มีความต้านทานมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ FOS, inulin, Raftiline, Raftilose และ Actilight จะได้ผลดีที่สุด และได้ผลเล็กน้อยเมื่อใช้ galacto-oligosaccharide และ maltodextrin

Bielecka และคณะได้รายงานการให้ oligosaccharides ผสมในอาหารและให้แบคทีเรีย *Bifidobacterium* (probiotics) ที่มีชีวิตแก่หนูเป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูกลุ่มที่ให้เชื้อโปรไบโอติกส์มีปริมาณ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น 18 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 30 สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่ คือ *B.longum* และ *B.animalis* ส่วนหนูที่ให้พรีไบโอติกส์พบว่าปริมาณ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น 1.6 log cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะ *B. longum* แต่เมื่อให้ทั้งพรีไบโอติกส์และโปรไบโอติกส์ (synbiotic) รวมกันกลับมีการเพิ่มขึ้นของ *Bifidobacterium* 1.4 log cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Bouhnik และคณะ ได้รายงานผลของการให้ transgalacto-oligosaccharide กับอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีจำนวน 8 คน เป็นเวลา 21 วัน โดยให้วันละ 10 กรัม พบว่าผู้เข้าร่วมการทดลองทั้งหมดมีไฮโดรเจนออกมากับลมหายใจลดลง และมี *Bifidobacterium* ในอุจจาระลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ยังเพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากการทดลองดังกล่าวแล้ว ยังมีการทดลองเกี่ยวกับพรีไบโอติกส์เพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ด้วย เนื่องจากการลดใช้ยาปฏิชีวนะมีความสำคัญมากในการจัดการอุตสาหกรรมสัตว์ปีกจากฟาร์มมาสู่การผลิตในโรงงาน พบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตถึงร้อยละ 13.7 ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นตัวกระตุ้นนี้ อาจกระตุ้นให้เกิดจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่ดื้อต่อยาต้าน ๗ ได้ อีกทั้งโรคที่เกี่ยวกับลำไส้ (enteric disease) ก็ยังเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีก คือจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตต่ำ มีการตายเพิ่มขึ้น และมีการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ จึงได้มีการศึกษาการนำพรีไบโอติกส์และโปรไบโอติกส์มาใช้มากขึ้น เพื่อช่วยปรับสภาวะภายในลำไส้ โดยพบว่าการใช้พรีไบโอติกส์หรือโปรไบโอติกส์อย่างใดอย่างหนึ่ง จะช่วยให้ลักษณะต่างๆ ของสัตว์ปีกดีขึ้น โดยปราศจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

สำหรับการใช้พรีไบโอติกส์ในประเทศไทยนั้น ได้มีการทดลองใช้ fructo-oligosaccharide จากजूฐาเลียม อาติโชค ผสมในอาหารให้สุกร เพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร โดยเปรียบเทียบระหว่างสุกรที่ได้รับ fructo-oligosaccharide กับสุกรที่ได้รับอีเอ็มผสมน้ำดื่มพบว่า 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 จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำสารสกัดอินูลินมาใช้ประโยชน์ต่างๆ ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาคัดเลือกผลไม้ที่มีในประเทศไทยเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอินูลิน และทำการเตรียมสารสกัดหยาบบินูลินจากเนื้อผลไม้ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การเป็นพรีไบโอติกส์อีกด้วย ซึ่งเป็นการช่วยส่งเสริมการรับประทานผลไม้ไทยอย่างมีคุณค่า ผลการวิจัยจากโครงการนี้จะนำไปสู่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในทางวิชาการ ส่งผลสนับสนุนการบริโภคผลไม้ไทยเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ และเป็นการส่งเสริมการส่งออกผลไม้ไทย อีกทั้งช่วยกระตุ้นการเพาะปลูกของเกษตรกรอีกด้วย

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมและสกัดเนื้อผลไม้

ผลไม้ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ พุทราณมสด มะพร้าวพันธุ์สูง ซึ่งใช้ผลแก่สำหรับคั้นกะทิและพันธุ์เตี้ยซึ่งใช้ผลอ่อนที่เรียกว่า มะพร้าวน้ำหอม น้อยหน้าหนัง ทุเรียนหมอนทอง ทุเรียนชะนี มะม่วงเขียวเสวย ละมุดพันธุ์มะกอก มะเฟือง เฝือก กล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า กล้วยหักมุก กล้วยเล็บมือนาง และกล้วยพันธุ์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทย ดังตารางที่ 3 สำหรับกล้วยพันธุ์ต่างๆ ชื่อจากสถาบันอินทรีจินทรสถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ส่วนผลไม้ชนิดอื่นๆ ได้จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร

จากนั้นนำพืชแต่ละชนิดมาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัด และบดให้ละเอียด ทำการสกัดอินูลินด้วยน้ำร้อน โดยใช้สัดส่วนพืชต่อน้ำร้อนในอัตราส่วน 1:1 โดยแช่ผงพืชในน้ำอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และต้มต่อจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองผ่านผ้าสีเพื่อแยกสิ่งสกปรกออก นำส่วนสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการ lyophilization ชั่งน้ำหนัก คำนวณ % yield ของสารสกัดที่ได้

ตารางที่ 3 ลักษณะภายนอกของกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ

พันธุ์กล้วย	ลักษณะ (เครือ)	ลักษณะ (หวี)
กล้วยน้ำ		
กล้วยหักมุกทอง		
กล้วยนางพญา		
กล้วยเล็บช้างกุด		
กล้วยเทพรส		
กล้วยนิ้วมือนาง		
กล้วยเล็บมือนาง (มีขนที่ผล)		

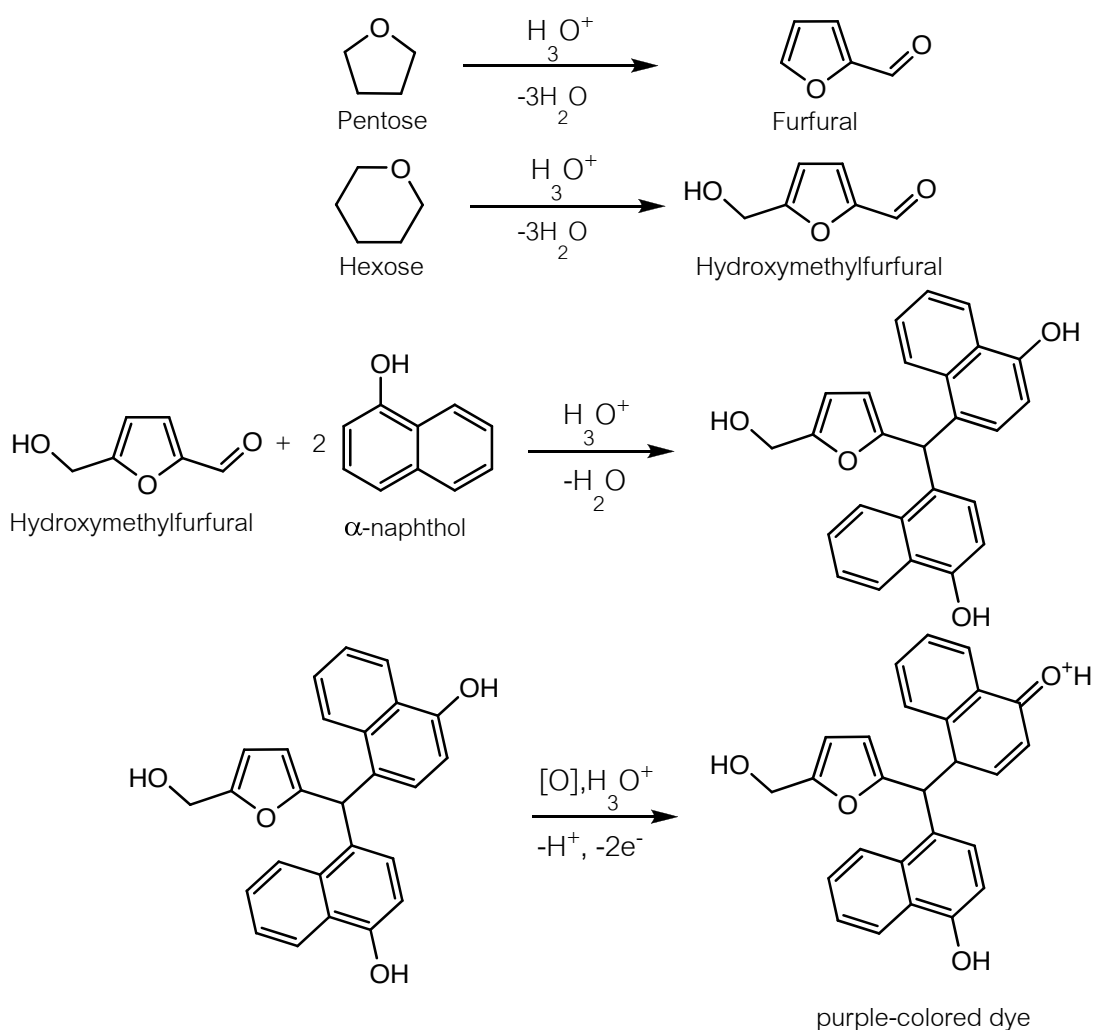
ตารางที่ 1(ต่อ) ลักษณะภายนอกของกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ

พันธุ์กล้วย	ลักษณะ (เครือ)	ลักษณะ (หวี)
กล้วยหิน		
กล้วยหักมุกเขียว		
กล้วยเขียว		
กล้วยลังกา		
กล้วยไข่ชุมแพ		
กล้วยไข่ทองแดง		
กล้วยสา		

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณอินูลินในเนื้อผลไม้

2.2.1 การวิเคราะห์เบื้องต้นโดย Histochemical detection of cell content method

นำเนื้อเยื่อผลไม้ที่คัดเลือกมาทำการทดสอบด้วย α -naphthol ที่เตรียมในสารละลายเอทานอล (10 % w/v) หลังจากนั้นให้หยด sulfuric acid ตาม โดยกรดเข้มข้นจะดึงน้ำออกจากน้ำตาลเพนโตส (pentose) และน้ำตาลเฮกโซส (hexose) กลายเป็น furfural และ hydroxymethyl furfural ตามสมการ จากนั้นอนุพันธ์ furfural จะทำปฏิกิริยากับ α -naphthol ได้สารสีม่วงแดง (รูปที่ 4) ซึ่งหากว่าเซลล์นั้นมีอินูลินอยู่จะทำให้เกิดผลึกสีม่วงอมแดงขึ้นภายในเนื้อเยื่อและจางหายไปอย่างรวดเร็ว โดยสามารถเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 4 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและ α -naphthol เกิดเป็นสารประกอบสีม่วงแดง

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินที่สกัดได้จากเนื้อผลไม้โดยวิธีการวัดปริมาณ carbohydrate

2.2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ Total carbohydrate โดยวิธี Phenol sulfuric acid assay

ทำการวิเคราะห์ปริมาณอินูลินในพืชสมุนไพรที่เลือก โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่อ้างอิงจาก Lingyun, W., et al. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79; 1087-1093 ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณอินูลินโดยหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณ reducing sugar

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม standard curve โดยใช้อินูลิน 1 mg/ml เป็นสารละลายมาตรฐานในหลอดทดลองขนาด 10 ml ดังตาราง จากนั้นเติม 5% phenol ใน 0.1 M HCl ปริมาตร 0.5 ml และ conc. sulfuric acid ปริมาตร 2.5 ml ดังตารางที่ 4
2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm
3. สำหรับสารสกัดจากพืชสามารถทำการวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลรวมทั้งหมดได้ดังนี้ คือ เติม 1% สารละลายตัวอย่างในปริมาตร 2.5 μ l และเติมน้ำให้ได้ 0.5 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 10 ml หลังจากนั้นเติม 5% phenol ใน 0.1 M HCl ปริมาตร 0.5 ml และ conc. sulfuric acid ปริมาตร 2.5 ml ตามลำดับ เมื่อสารละลายทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นโดยสมบูรณ์แล้ว สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลืองอมส้ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm
4. คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดจากพืชโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 4 การเตรียมสารสำหรับทำกราฟมาตรฐานของอินูลิน

Tube	Source of standard	Standard volume (μ l)	Diluent volume (μ l)	Final concentration (μ g)
1	Inulin 1 mg/ml	100	900	50
2	Inulin 1 mg/ml	80	920	40
3	Inulin 1 mg/ml	60	940	30
4*	Tube 1	500	500	25
5	Tube 2	500	500	20
6*	Tube 3	500	500	15
7	Tube 5	500	500	10
8*	Tube 7	500	500	5
9	-	-	500	0

*ดูดสารทิ้ง 500 μ l

2.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric assay

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม calibration curve ด้วย sugar standard ในที่นี้ใช้ 1 mg/ml fructose ในน้ำกลั่น เป็น standard ทำการ aliquot ให้ได้ในช่วง 0.2-2.4 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 10 ml จากนั้นเติม DNS reagent ปริมาตร 3 ml ดังตารางที่ 5
2. นำหลอดทดลองที่เติมสารละลายครบแล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90-100°C เป็นเวลา 5-15 นาทีจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง
3. เติม 40% potassium sodium tartrate solution (Rochelle salt) ปริมาตร 1 ml เพื่อให้สีคงตัว
4. นำหลอดทั้งหมดไปแช่ในน้ำให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 575 nm

ตารางที่ 5 การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar

หลอดทดลอง	Fructose (ml)	น้ำกลั่น (ml)	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

5. สำหรับสารสกัดจากพืชเติมสารต่างๆ ตามปริมาณดังตารางดังนี้

หลอดทดลอง	1% Sample (ml)	น้ำกลั่น (ml)	DNS reagent (ml)
Unknown	0.1	2.9	3.0

จากนั้นทำตามขั้นตอนการทดลองตามข้อ 2-4

6. คำนวณปริมาณ reducing sugar ของสารสกัดจากพืช
7. คำนวณหาปริมาณอินูลินในสารสกัดเนื้อผลไม้ดังกล่าว

$$\begin{aligned}\text{Inulin content} &= \text{Total carbohydrate} - \text{Reducing sugar} \\ \text{Inulin extraction yield (\%)} &= (\text{Inulin content} \times \text{volume of extraction liquid} \\ &\quad \text{or mass of extract powder}) \times 100\end{aligned}$$

2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินที่สกัดได้จากเห็ดผลไม้โดยวิธี HPLC

ทำการวิเคราะห์ปริมาณอินูลินด้วยวิธี HPLC โดยใช้หลักการวัดปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสเปรียบเทียบกับก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินูลินเนส โดยสภาวะในการวิเคราะห์มีดังนี้

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

Mobile Phase: Acetonitrile:Water (25:75)

Flow rate: 0.5 ml/min

Detector: Refractive index

2.2.3.1 การเตรียม Calibration curve

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

2.2.3.2 การเตรียมสารสกัดพืช

เตรียมสารสกัดจากพืชให้มีความเข้มข้น 10% w/v นำไปกรองผ่านเมมเบรน 0.45 μ m ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.3 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเห็ดผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อการเจริญของ *Lactobacillus* sp.

ในการศึกษาผลของสารสกัดอินูลินจากเห็ดผลไม้ต่อเชื้อ *Lactobacillus* sp. ทำได้โดยการผสมสารสกัดอินูลินจากเห็ดผลไม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในการทดลองนี้จะใช้ MRS broth ที่ปราศจากน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง pH 6.5 $\pm$ 0.2 จากนั้นทำการเพาะเชื้อแต่ละชนิด และทำการเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง เพื่อทำการนับจำนวนเชื้อโดยวิธี plate count ผลที่ได้จะนำมาเทียบกับปริมาณเชื้อที่ได้จากการผสมสารละลายกลูโคสลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเองในปริมาณที่เท่ากับสารสกัดเห็ดจากเห็ดผลไม้

เชื้อทดสอบ : *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 1 ลิตร

Peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Polysorbate 80	1	g
Sodium acetate	5	g

Ammonium citrate	2	g
K ₂ HPO ₄	2	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.05	g

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชม.
2. ใส่สารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดผลไม้ร้อยละ 1 โดยมี glucose และ inulin ในความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสารควบคุม
3. นำเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเองโดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นร้อยละ 0.1 ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุก 8 ชั่วโมงมาทำการนับจำนวนเชื้อโดยวิธี total plate count

2.4 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ใน *Lactobacillus sp.* ต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งทำการเติมสารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 โดยมีอินูลินมาตรฐานเป็นสารควบคุม จากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี Disc diffusion และ Microtiter plate assay

2.4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น (Concentrated supernatant)

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 ใน MRS broth นำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน
2. นำเชื้อตั้งต้นที่ได้ทำการเพาะข้ามคืนมาแล้วใส่ลงใน MRS broth (commercial) ที่เติมสารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 ซึ่งมี inulin ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ MRS broth เป็นสารควบคุม โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นร้อยละ 0.1 ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ ความเร็ว 12,000xg 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ
4. นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปเพิ่มความเข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า จากความเข้มข้นตั้งต้นด้วยเครื่อง speed vacuum เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่ 4°C

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Disc diffusion

เชื้อทดสอบ : *Escherichia coli* ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Salmonella typhimurium ATCC 13311
Staphylococcus aureus ATCC 25923

เชื้อควบคุม : *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อมาปรับความขุ่นให้ได้ $OD_{600} = 0.1$ จากนั้นนำไป swab บน TSA และ MRS agar plate
3. นำน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นมาใส่ลงบน blank paper disc โดยใช้ปริมาณน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่น disc ที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นวางลงบน plate ที่ได้ทำการ swab เชื้อไว้แล้ว
4. นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
5. วัด clear zone และบันทึกผล

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Microtiter plate assay

เชื้อทดสอบ : *Escherichia coli* ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Salmonella typhimurium ATCC 13311
Staphylococcus aureus ATCC 25923

เชื้อควบคุม : *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อมาปรับความขุ่นให้ได้ $OD_{600} = 0.1$
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 100 μ l จนครบ 12 หลุม จากนั้นใส่น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นใส่ลงในหลุมแรก 100 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง จากนั้นดูดสารที่ผสมเรียบร้อยแล้ว 100 μ l สู้หลุมต่อไป (two fold dilution) จนถึงหลุมที่ 7 จะดูดทิ้ง 100 μ l หลุมที่ 8 ไม่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น (การทดลองควบคุม) ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มอีก 80 μ l ต่อจากนั้นใส่เชื้อที่ได้ปรับความขุ่นแล้วในทุกหลุม หลุมละ 20 μ l ทำเช่นเดียวกันในทุกเชื้อ ส่วนเชื้อ *L. plantarum* ใช้ MRS broth แทน TSB
4. นำ microtiter plate ไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
5. สังเกตและบันทึกผล

2.5 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการค้า

ในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้ต่อผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ผสมเชื้อโปรไบโอติกส์ ทำได้โดยการผสมสารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในการทดลองนี้จะใช้ MRS broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง pH 6.5 ± 0.2 จากนั้นทำการเพาะเชื้อแต่ละชนิด และ ทำการเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง เพื่อทำการนับจำนวนเชื้อโดยวิธี plate count ผลที่ได้จะนำมาเทียบกับปริมาณเชื้อที่ได้จากการผสมสารละลายอินูลินลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เท่ากับสารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้

เชื้อทดสอบ : เชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการค้า

ขั้นตอนการทดลอง

1. เลี้ยงเชื้อใน MRS broth (Difco) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่อับอากาศโดยการเทพาราฟินเหลวบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลาข้ามคืน
2. ใส่สารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Difco) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดผลไม้อยู่ที่ 1 % โดยมี 1% inulin เป็นสารควบคุม
3. นำเชื้อที่ได้ทำการเพาะข้ามคืนมาแล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.1% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเทพาราฟินเหลวปิดทับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดสภาวะอับอากาศ
4. ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุก 8 ชั่วโมงมาทำการนับจำนวนเชื้อโดยวิธี plate count

หมายเหตุ :

- ในการเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการค้าที่เป็นเชื้อในกลุ่ม *Bifidobacterium* sp. เนื่องจากเชื้อนี้เจริญในสภาวะที่อับอากาศเท่านั้น ดังนั้นในขั้นตอนการทดลองจึงต้องทำการเลี้ยงในสภาวะอับอากาศทุกขั้นตอน
- ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ผสมเชื้อโปรไบโอติกส์ ประกอบไปด้วยเชื้อ
 - O *Bifidobacterium bifidum*
 - O *Bifidobacterium longum*
 - O *Bifidobacterium infantis*
 - O *Bifidobacterium lactis*



รูปที่ 5 ลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ผสมเชื้อโปรไบโอติกส์

2.6 การทดสอบผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อเชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการบำบัดประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ probiotic products ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งทำการเติมสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% โดยมีอินูลินมาตรฐานเป็นสารควบคุม จากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี Disc diffusion และ Microtiter plate assay

2.6.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ probiotic products ใน MRS broth นำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน ภายใต้สภาวะอับอากาศ
2. นำเชื้อตั้งต้นที่ได้ทำการเพาะข้ามคืนมาแล้วใส่ลงใน MRS broth ที่เติมสารสกัดหยาบของเนื้อผลไม้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ซึ่งมี 1% inulin และ MRS broth เป็นสารควบคุม โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.1% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะอับอากาศ
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ ความเร็ว 12,000xg 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ
4. นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปเพิ่มความเข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า จากความเข้มข้นตั้งต้นด้วยเครื่อง speed vacuum เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่ 4°C

2.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Disc diffusion

เชื้อทดสอบ : *Escherichia coli* ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Salmonella typhimurium ATCC 13311
Staphylococcus aureus ATCC 25923

เชื้อควบคุม : เชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการบำบัด

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) probiotic products ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อมาปรับความขุ่นให้ได้ OD₆₀₀ = 0.1 จากนั้นนำไป swab บน TSA และ MRS agar plate
3. นำน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นมาใส่ลงบน blank paper disc โดยใช้ปริมาณน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 20 µl จากนั้นนำ แผ่น disc ที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นวางลงบน plate ที่ได้ทำการ swab เชื้อไว้แล้ว
4. นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
5. วัด clear zone และบันทึกผล

2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อโดยวิธี Microtiter plate assay

เชื้อทดสอบ : *Escherichia coli* ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Salmonella typhimurium ATCC 13311

Staphylococcus aureus ATCC 25923

เชื้อควบคุม : เชื้อโปรไบโอติกส์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จำหน่ายเพื่อการค้า

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) probiotic products ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อมาปรับความขุ่นให้ได้ $OD_{600} = 0.1$
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 100 μ l จนครบ 8 หลุม จากนั้นใส่น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นใส่ลงในหลุมแรก 100 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง จากนั้นดูดสารที่ผสมเรียบร้อยแล้ว 100 μ l สู้หลุมต่อไป (two fold dilution) จนถึงหลุมที่ 7 จะดูดทิ้ง 100 μ l หลุมที่ 8 ไม่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้น (การทดลองควบคุม) ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มอีก 80 μ l ต่อจากนั้นใส่เชื้อที่ได้ปรับความขุ่นแล้วในทุกหลุม หลุมละ 20 μ l ทำเช่นเดียวกันในทุกเชื้อ ส่วนเชื้อ probiotic products ใช้ MRS broth แทน TSB
4. นำ microtiter plate ไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
5. สังเกตและบันทึกผล

บทที่ 3

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

3.1 การเตรียมและสกัดเนื้อผลไม้

เมื่อทำการคัดเลือกและสกัดเนื้อผลไม้แต่ละชนิดแล้ว ผลจากการสกัดพืชแต่ละชนิดด้วยน้ำร้อน พบว่า มะพร้าวพันธุ์สูงให้ปริมาณของสารสกัดมากที่สุด คือ 27.42% w/w ส่วนทุเรียนชะนีให้ปริมาณสารสกัดต่ำที่สุด คือ 3.28% w/w (ตารางที่ 6) สำหรับกล้วยพันธุ์ต่างๆ พบว่า กล้วยน้ำว้ามีอนางให้ปริมาณของสารสกัดมากที่สุด ประมาณ 18.99% w/w และกล้วยหักมุกทองให้ปริมาณสารสกัดต่ำที่สุด คือ 3.73% w/w (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารสกัดหยาบผลไม้แต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ

ตัวอย่างที่	ชื่อผลไม้	% (w/w) yield สารสกัดหยาบ
1	มะพร้าวแก่พันธุ์สูง	27.42
2	ทุเรียนหมอนทอง	14.39
3	ละมุดพันธุ์มะกอก	12.79
4	มะพร้าวน้ำหอมอ่อน	9.20
5	เผือก	7.01
6	น้อยหน่าหนัง	6.28
7	พุทราหมสด	6.06
8	มะม่วงเขียวเสวย	3.99
9	ทุเรียนชะนี	3.28

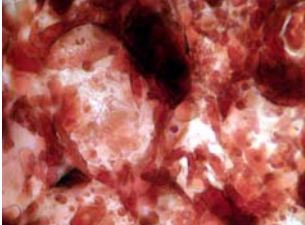
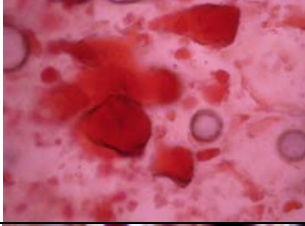
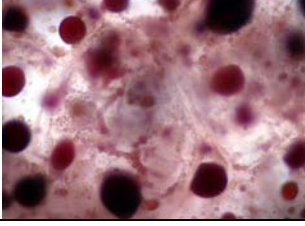
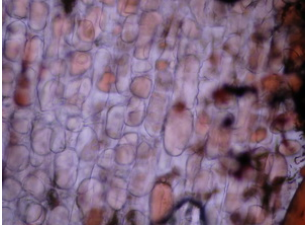
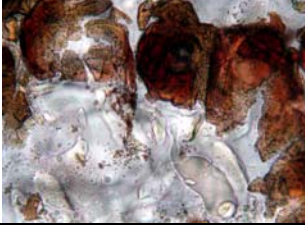
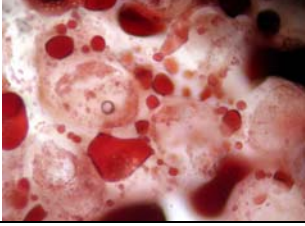
ตารางที่ 7 ปริมาณของสารสกัดหยาบกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ

ตัวอย่างที่	ชื่อผลไม้	% (w/w) yield สารสกัดหยาบ
1	กล้วยน้ำว้ามือนาง	18.99
2	กล้วยเล็บมือนาง	15.17
3	กล้วยไข่ทองเงย	14.91
4	กล้วยเทพรส	13.93
5	กล้วยเขียว	11.78
6	กล้วยลังกา	10.61
7	กล้วยนางพญา	10.53
8	กล้วยหอม	10.19
9	กล้วยหิน	10.03
10	กล้วยไข่ชุมแพ	9.30
11	กล้วยเล็บมือ มีขนที่ผล	9.04
12	กล้วยเล็บช้างกุด	7.78
13	กล้วยหักมุกเขียว	7.15
14	กล้วยไข่	6.95
15	กล้วยน้ำว้า	5.90
16	กล้วยหักมุก	5.87
17	กล้วยน้ำ	4.62
18	กล้วยหักมุกทอง	3.73

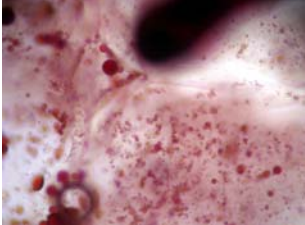
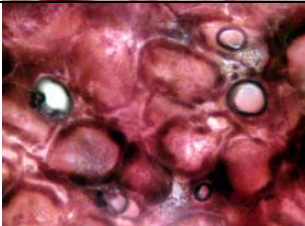
3.2 การศึกษาเบื้องต้นโดยการตรวจสอบสารอินูลินที่มีอยู่ในผลไม้

จากศึกษาตรวจสอบสารอินูลินเบื้องต้นโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้ในการคัดกรองผลไม้ต่างๆ โดยนำเซลล์ผลไม้สดมาย้อมด้วย 10% α -Naphthol (w/v) ในเอทานอลและกรดซัลฟูริกเข้มข้น หากผลไม้มีอินูลินสะสมอยู่จะปรากฏผลึกสีแดงอมม่วง ซึ่งสีที่ปรากฏนี้เป็นสีของผลึกอินูลินแต่จะไม่คงที่และสลายไปอย่างรวดเร็ว จึงต้องทำการสังเกตและบันทึกผลทันที ซึ่งเมื่อทำการทดสอบนี้ร่วมกับ การหาปริมาณอินูลินที่สกัดได้จากเนื้อผลไม้โดยวิธีการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต พบว่า ผลไม้ที่คัดเลือกมา คือ ทุเรียน หมอนทอง ชะนี มะม่วงเขียวเสวย ละมุดพันธุ์มะกอก มะพร้าวพันธุ์สูงและเตี้ย น้อยหน่าหนัง มะเฟือง พุทรา นมสด มีแนวโน้มที่จะมีอินูลินในเนื้อผลไม้ แต่ไม่พบอินูลินในเปลือก (ตารางที่ 8) ส่วนในกล้วยนั้นจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบอินูลินในทุกสายพันธุ์ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจสอบสารอินูลินที่มีอยู่ในผลไม้เบื้องต้น

ผลไม้	ขั้นตอนตัวอย่างย้อมด้วย 10% α -naphthol และ Conc. Sulfuric acid	Total carbohydrate (mg/ml) ①	Reducing sugar (mg/ml) ②	Inulin content (mg/ml) ①-②	Inulin extraction yield (%)
1. ทุเรียน หมอนทอง		9.945	2.138	7.807	2.375
2. ทุเรียน ชะนี		10.764	3.855	6.908	2.052
3. มะม่วง เขียวเสวย		10.611	4.820	5.792	1.724
4. ละมุด มะกอก	N/A	7.848	4.749	3.099	1.115
5. มะพร้าว แก่พันธุ์สูง		3.086	0.263	2.822	0.981
6. มะพร้าว น้ำหอม อ่อน		4.516	2.424	2.092	0.987
7. น้อยหน่า หนัง		11.488	9.626	1.862	0.481
8. มะเฟือง	N/A	8.932	7.350	1.582	0.554

ตารางที่ 8 (ต่อ) ผลการตรวจสอบสารอิ눌ินที่มีอยู่ในผลไม้เบื้องต้น

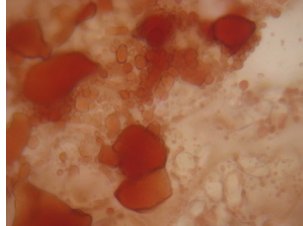
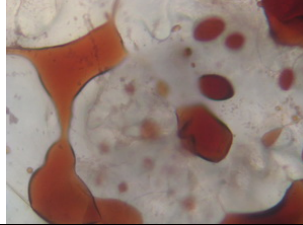
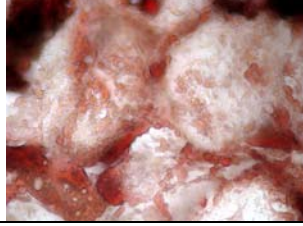
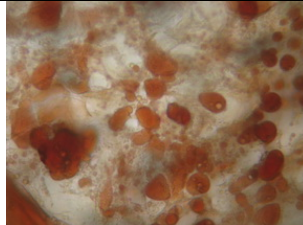
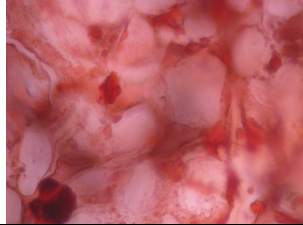
ผลไม้	ชิ้นตัวอย่างย่อยด้วย 10% α -naphthol และ Conc. Sulfuric acid	Total carbohydrate (mg/ml) ①	Reducing sugar (mg/ml) ②	Inulin content (mg/ml) ①-②	Inulin extraction yield (%)
9. พุทราหนมสด		9.951	9.407	0.544	0.034
10. เผือก		9.864	Less than 2 mg/ml	-	ND

N/A = not available

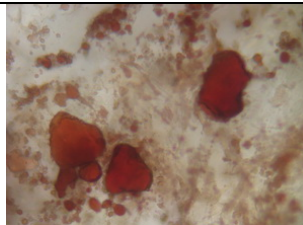
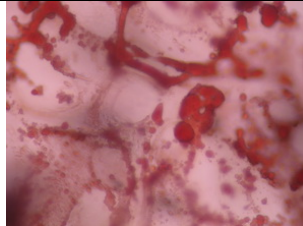
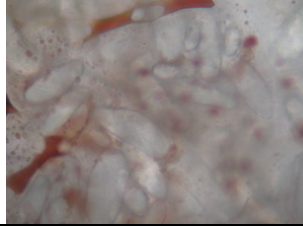
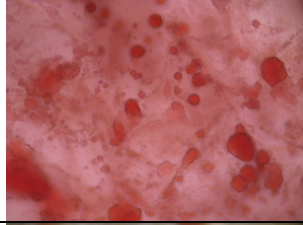
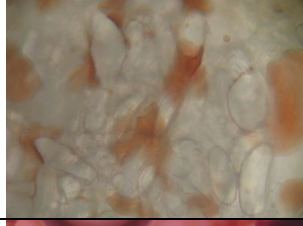
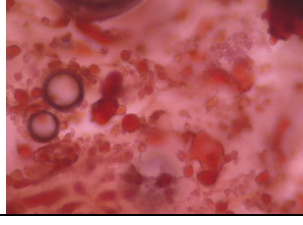
ND = not detected

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

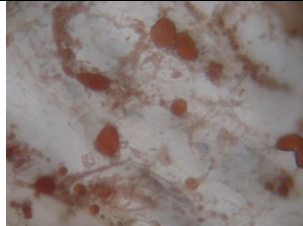
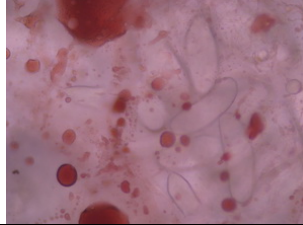
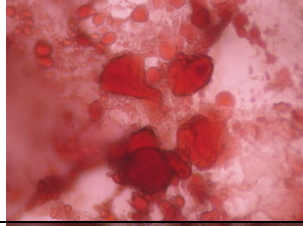
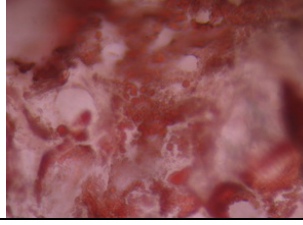
ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบสารอินูลินที่มีอยู่ในกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ เบื้องต้น

ผลไม้	ขั้นตอนอย่างย่อด้วย 10% α -naphthol และ Conc. Sulfuric acid	Total carbohydrate (mg/ml) ①	Reducing sugar (mg/ml) ②	Inulin content (mg/ml) ①-②	Inulin extraction yield (%)
1. กล้วยหอม	N/A	11.011	3.855	7.156	2.111
2. กล้วยเล็บมือนาง (มีขนที่ผล)		9.181	2.476	6.705	1.690
3. กล้วยเขียว		8.800	2.437	6.363	1.619
4. กล้วยเล็บมือนาง		8.790	2.622	6.168	1.913
5. กล้วยไข่	N/A	10.135	4.707	5.429	1.644
6. กล้วยไข่ทองแดง		7.086	2.270	4.816	1.294
7. กล้วยน้ำว้า	N/A	11.602	8.511	3.091	0.845
8. กล้วยเทพรส		9.562	6.851	2.711	0.860

ตารางที่ 9 (ต่อ) ผลการตรวจสอบสารอินูลินที่มีอยู่ในกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ เบื้องต้น

ผลไม้	ชิ้นตัวอย่างย้อมด้วย 10% α -naphthol และ Conc. Sulfuric acid	Total carbohydrate (mg/ml) ①	Reducing sugar (mg/ml) ②	Inulin content (mg/ml) ①-②	Inulin extraction yield (%)
9. กล้วยลังกา		9.562	6.984	2.578	0.820
10. กล้วยหักมุก		8.038	6.348	1.690	0.677
11. กล้วยหักมุก เขียว		7.848	6.048	1.800	0.725
12. กล้วยน้ำ		7.243	9.295	0.948	0.517
13. กล้วยหิน		8.038	7.130	0.908	0.443
14. กล้วยนิ้วมือ นาง		7.243	6.389	0.854	0.487

ตารางที่ 9 (ต่อ) ผลการตรวจสอบสารอินูลินที่มีอยู่ในกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ เบื้องต้น

ผลไม้	ชิ้นตัวอย่างย้อมด้วย 10% α -naphthol และ Conc. Sulfuric acid	Total carbohydrate (mg/ml) ①	Reducing sugar (mg/ml) ②	Inulin content (mg/ml) ①-②	Inulin extraction yield (%)
15. กล้วยไข่ชุมแพ		6.705	5.852	0.852	0.534
16. กล้วยหักมุกทอง		7.606	6.802	0.804	0.429
17. กล้วยนางพญา		7.787	6.983	0.804	0.408
18. กล้วยเล็บช้างกุด		7.424	6.789	0.635	0.396

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินที่สกัดได้จากเนื้อผลไม้โดยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินในผลไม้แต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC พบว่า มะพร้าวแก่ พันธุ์สูง ให้ปริมาณอินูลินมากที่สุด คือ ร้อยละ 5.78 ส่วนผลไม้อื่นที่ให้ปริมาณอินูลินสูง ได้แก่ ละมุดพันธุ์ มะกอก ทุเรียนหมอนทองและชะนี มะม่วงเขียวเสวย และน้อยหน่าหนัง ส่วนพุทราขนมนั้นพบได้น้อย ส่วนเผือกนั้นตรวจไม่พบอินูลินเลย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับวิธีการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ตารางที่ 7)

สำหรับกล้วยพันธุ์ต่างๆนั้น จากการตรวจสอบกล้วยพันธุ์ต่างๆ พบว่า กล้วยนิ้วมือนางมีปริมาณอินูลินมากที่สุด ประมาณร้อยละ 12.23 (ตารางที่ 8) ส่วนกล้วยที่มีปริมาณอินูลินปานกลาง ได้แก่ กล้วยเขียว กล้วยหักมุกเขียว กล้วยน้ำ กล้วยเล็บช้างกุด กล้วยไข่ทองเงย กล้วยไข่ชุมแพ กล้วยนางพญา กล้วยน้ำว้า กล้วยหอม กล้วยหักมุกทอง กล้วยเล็บมือมีขนที่ผล กล้วยไข่ กล้วยลังกา กล้วยหักมุก มีอินูลินอยู่ประมาณร้อยละ 2.22-7.62 ส่วนกล้วยหิน กล้วยเล็บมือนางและเทพรสมีปริมาณอินูลินอยู่ในปริมาณต่ำ หากพิจารณาถึงพันธุ์กล้วยที่นิยมบริโภคในประเทศ จะเห็นได้ว่า กล้วยน้ำว้ามีปริมาณอินูลินสูงสุดประมาณร้อยละ 4.07 ส่วนกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยหักมุก และกล้วยเล็บมือนาง มีปริมาณอินูลินลดลงตามลำดับ

ตารางที่ 10 ปริมาณอินูลินในผลไม้แต่ละชนิดทดสอบโดย HPLC

ตัวอย่างที่	ชื่อผลไม้	% inulin
1	มะพร้าวแก่พันธุ์สูง	5.78
2	ละมุดมะกอก	5.38
3	ทุเรียนหมอนทอง	5.30
4	ทุเรียนชะนี	5.05
5	มะพร้าวอ่อนพันธุ์น้ำหอม	4.69
6	มะม่วงเขียวเสวย	4.28
7	น้อยหน่าหนัง	4.25
8	พุทราหนามสด	1.45
9	เผือก	ND

ND = not detected

ตารางที่ 11 ปริมาณอินูลินในกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ ทดสอบโดย HPLC

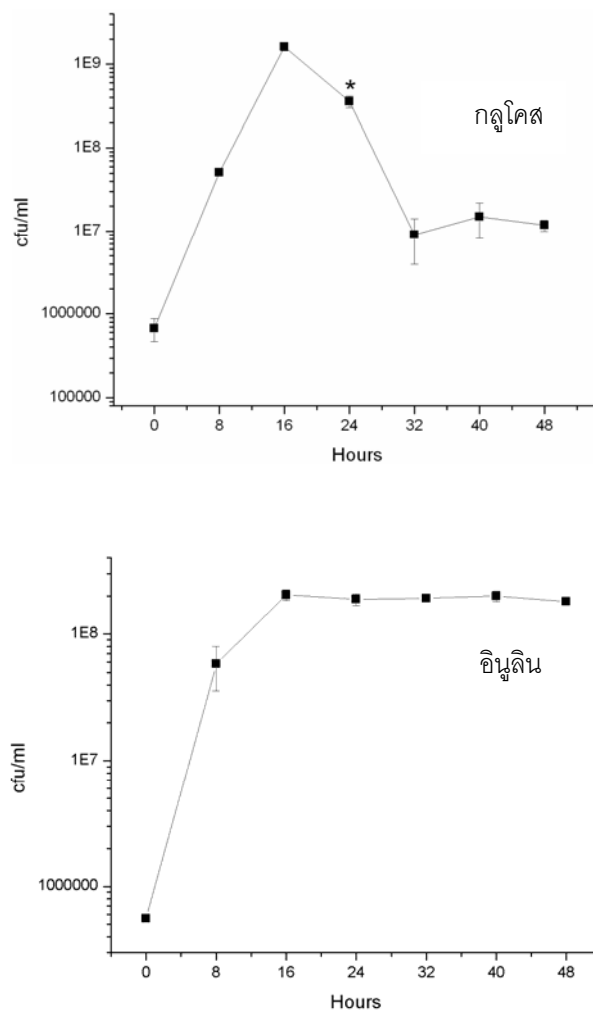
ตัวอย่างที่	ชื่อผลไม้	% inulin
1	กล้วยน้ำว้ามีอนาง	12.23
2	กล้วยเขียว	7.62
3	กล้วยหักมุกเขียว	7.59
4	กล้วยน้ำว้า	6.11
5	กล้วยเล็บช้างกุด	5.20
6	กล้วยไข่ทองเงย	4.50
7	กล้วยไข่ชุมแพ	4.22
8	กล้วยนางพญา	4.20
9	กล้วยน้ำว้า	4.07
10	กล้วยหอม	3.80
11	กล้วยหักมุกทอง	3.71
12	กล้วยเล็บมือ (มีขนที่ผล)	3.42
13	กล้วยไข่	3.23
14	กล้วยลังกา	2.35
15	กล้วยหักมุก	2.22
16	กล้วยหิน	1.90
17	กล้วยเล็บมีอนาง	1.56
18	กล้วยเทพรส	0.92

3.4 ผลของสารสกัดหยาบจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อการ เจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.

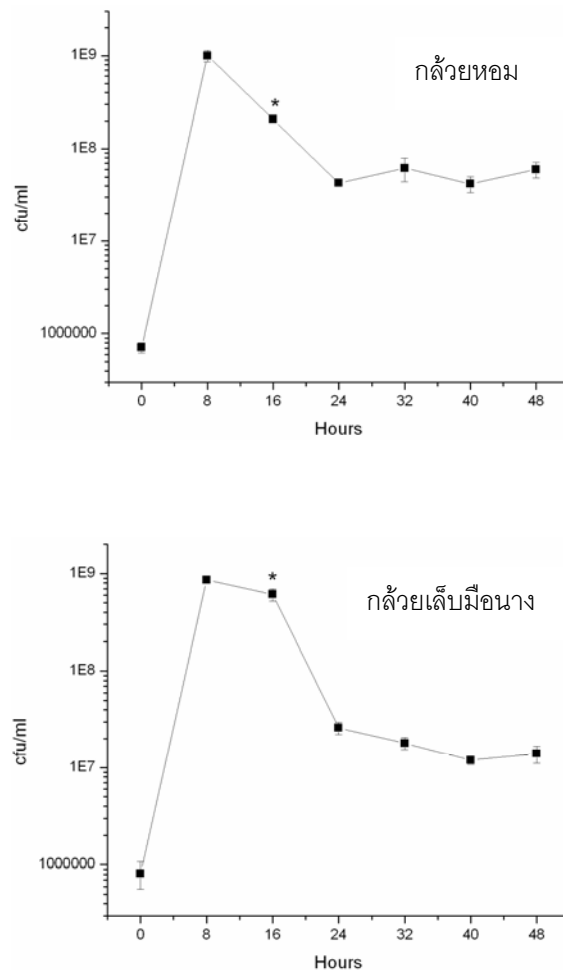
ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. โดยจะทำการเติมสารสกัดผลไม้ในอัตราส่วนร้อยละ 1 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเชื้อ โดยมีกลูโคสและอินูลินเป็นสารควบคุม (รูปที่ 6) พบว่าจากจำนวนตัวอย่างผลไม้ทั้งหมด เมื่อเชื้อเจริญจนได้ปริมาณสูงสุดและเริ่มมีการลดลงของปริมาณเชื้อนั้น สามารถจำแนกรูปแบบของการลดลงของปริมาณเชื้ออย่างมีนัยสำคัญได้ 4 ช่วงเวลา ดังนี้

1. ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจาก 16 ชั่วโมง ได้แก่ กล้วยหอม และ กล้วยเล็บมือนาง (รูปที่ 7)
2. ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจาก 24 ชั่วโมง ได้แก่ กล้วยเล็บข้างกุด กล้วยเขียว กล้วยเทพรส กล้วยไข่ กล้วยไข่ชุมแพ กล้วยเล็บมือนาง (มีขนที่ผล) กล้วยไข่ทองเงย กล้วยน้ำ กล้วยน้ำว่า กล้วยลังกา กล้วยสา กล้วยหักมุก กล้วยหักมุกเขียว กล้วยหิน กล้วยนางพญา กล้วยนิ้วมือนาง กล้วยหักมุกทอง น้อยหน้า และ พุทราณมสด (รูปที่ 8-11)
3. ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจาก 32 ชั่วโมง ได้แก่ มะม่วงเขียวเสวย ละมุดทุเรียนชะนี และ ทุเรียนหมอนทอง (รูปที่ 12)
4. ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจาก 40 ชั่วโมง ได้แก่ มะพร้าวอ่อน และ มะพร้าวแก่ (รูปที่ 13)

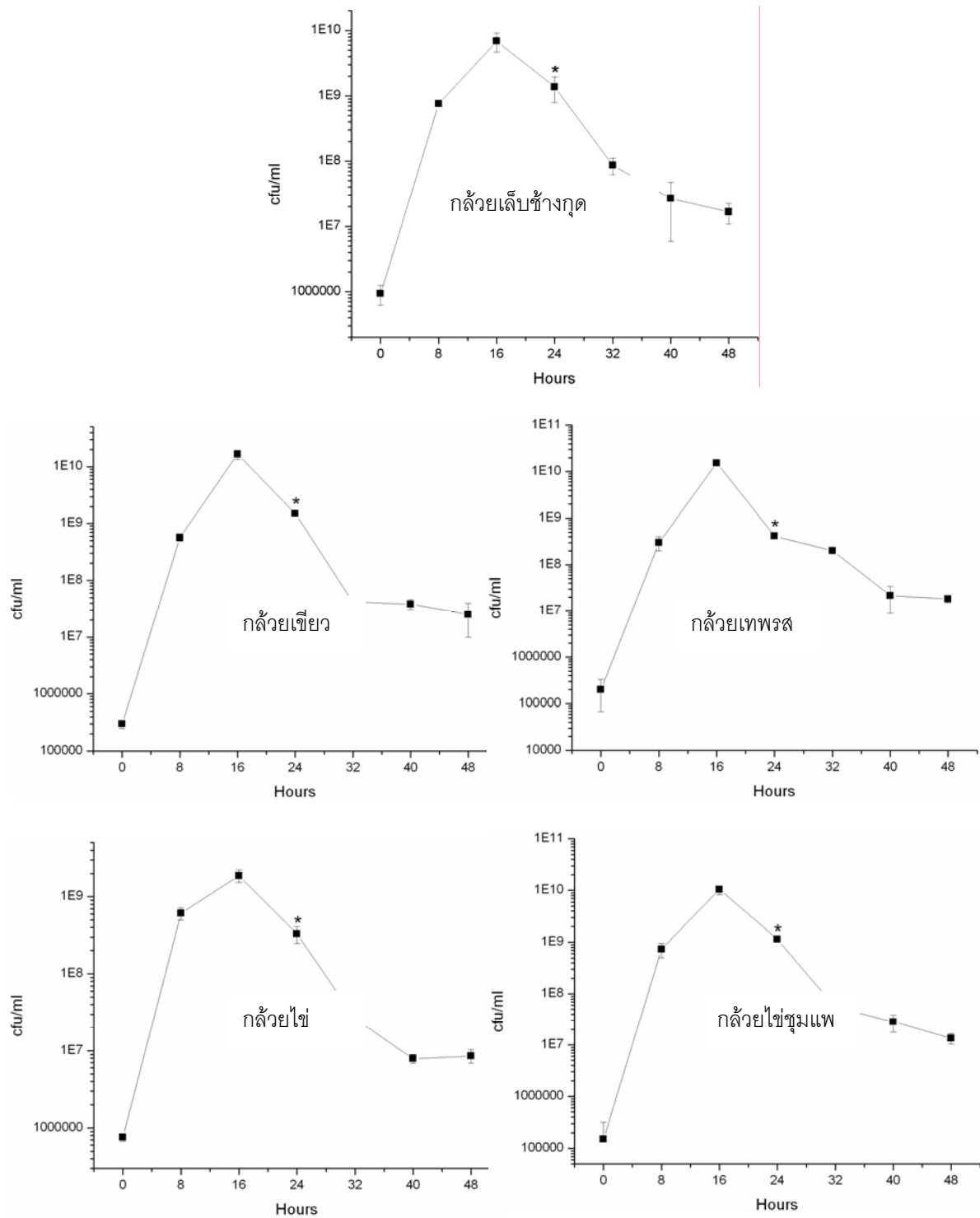
จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อจะเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงและไม่พบการลดลงของเชื้อหลังชั่วโมงที่ 32 ส่วนกลุ่มควบคุมที่ใช้อินูลินเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *L. plantarum* เจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16 และหลังจากนั้นปริมาณเชื้อค่อนข้างคงที่ตลอดการศึกษาที่ 48 ชั่วโมง



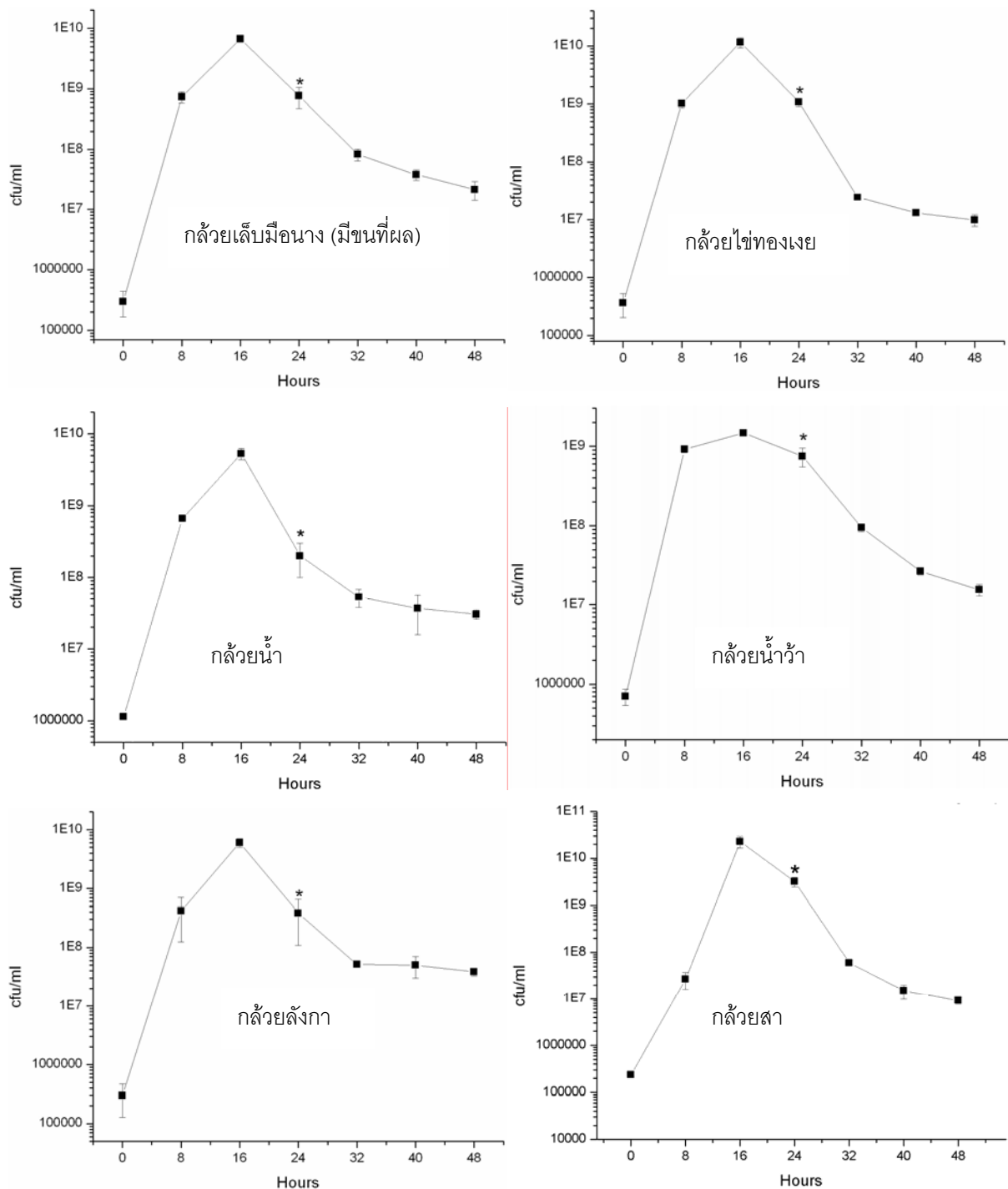
รูปที่ 6: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% กลูโคส และ 1% อินูลินเป็นแหล่งคาร์บอน (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



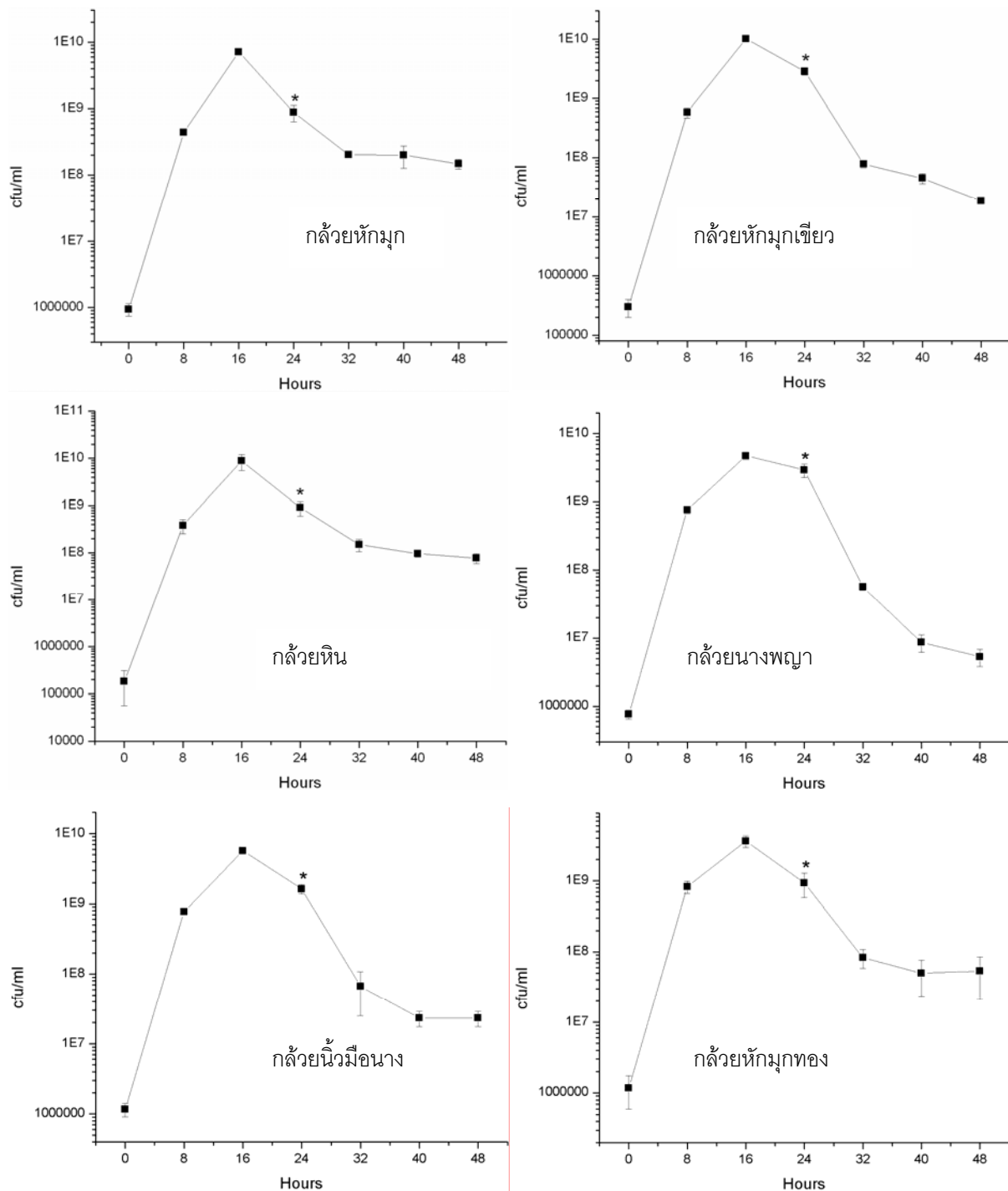
รูปที่ 7: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยหอม และ กล้วยเล็บมือนาง เป็นแหล่งคาร์บอน (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



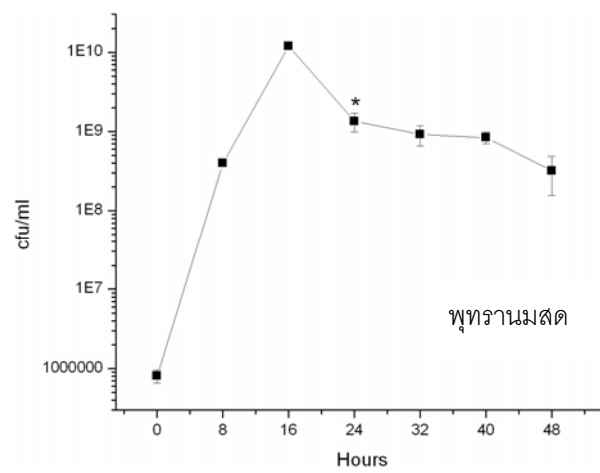
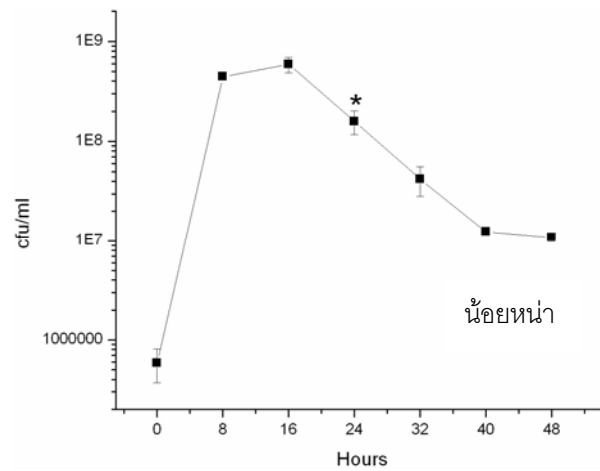
รูปที่ 8: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยเล็บช้างกุด กล้วยเขียว กล้วยเทพรส กล้วยไข่ และ กล้วยไข่ชุมแพ เป็นแหล่งคาร์บอน (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



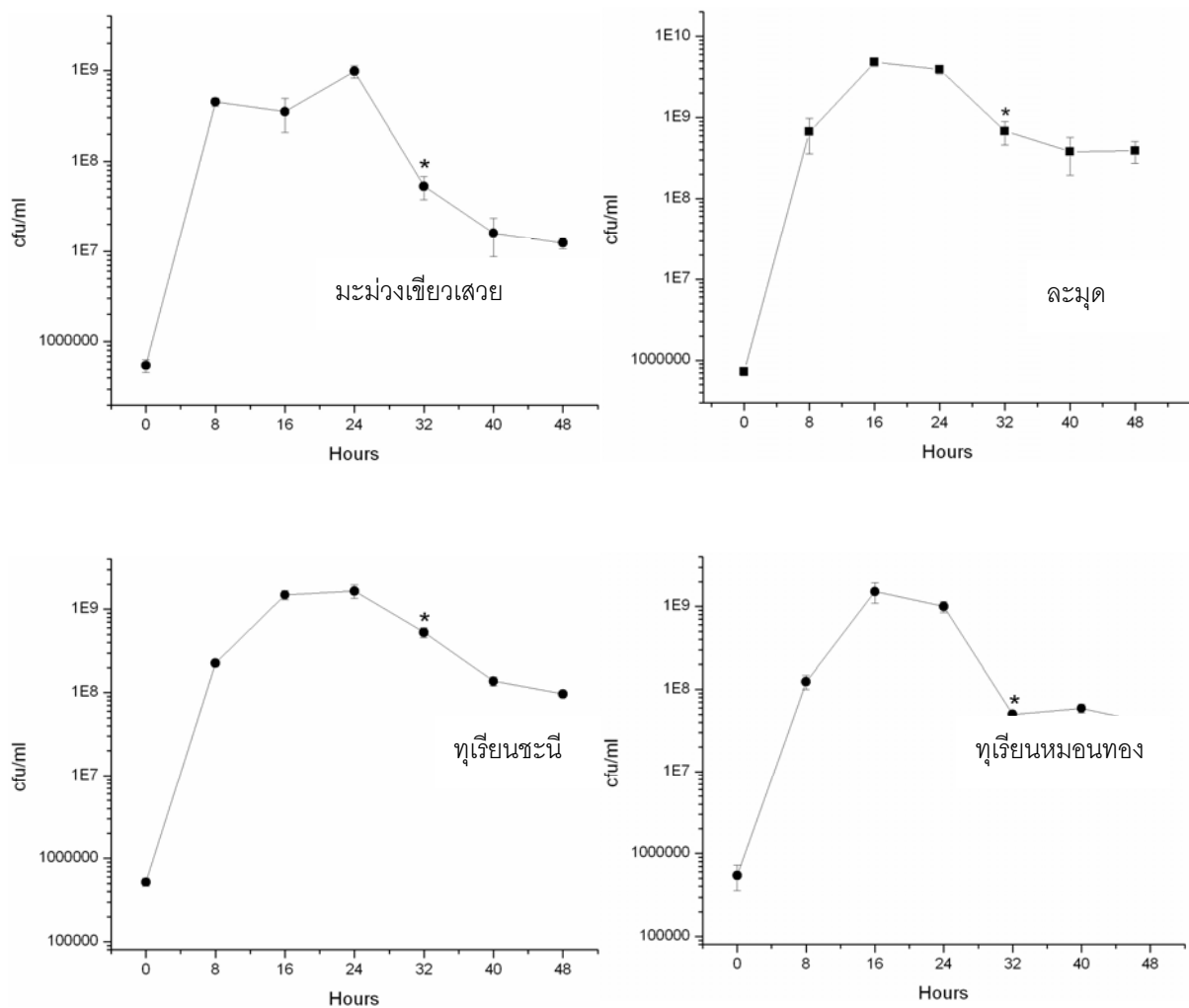
รูปที่ 9: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยเล็บมือนาง (มีขนที่ผล) กล้วยไข่ทองเงย กล้วยน้ำ กล้วยน้ำว้า กล้วยลังกา และกล้วยสา เป็นแหล่งคาร์บอน (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



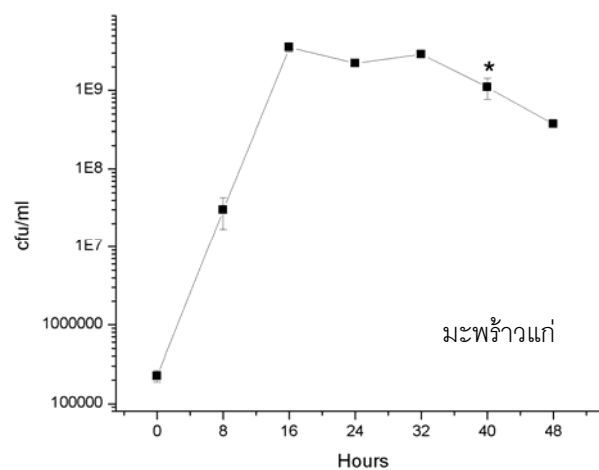
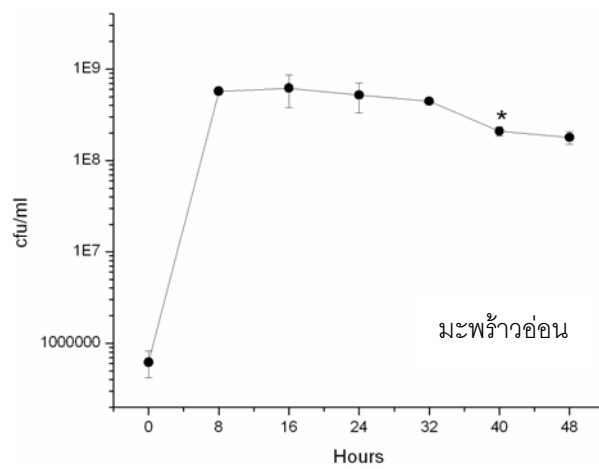
รูปที่ 10: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากกล้วยหักมุก กล้วยหักมุกเขียว กล้วยหิน กล้วยนางพญา กล้วยนิ้วมือนาง และ กล้วยหักมุกทอง (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



รูปที่ 11: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจาก
 น้อยหน้า และพุทราหนมสด
 (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



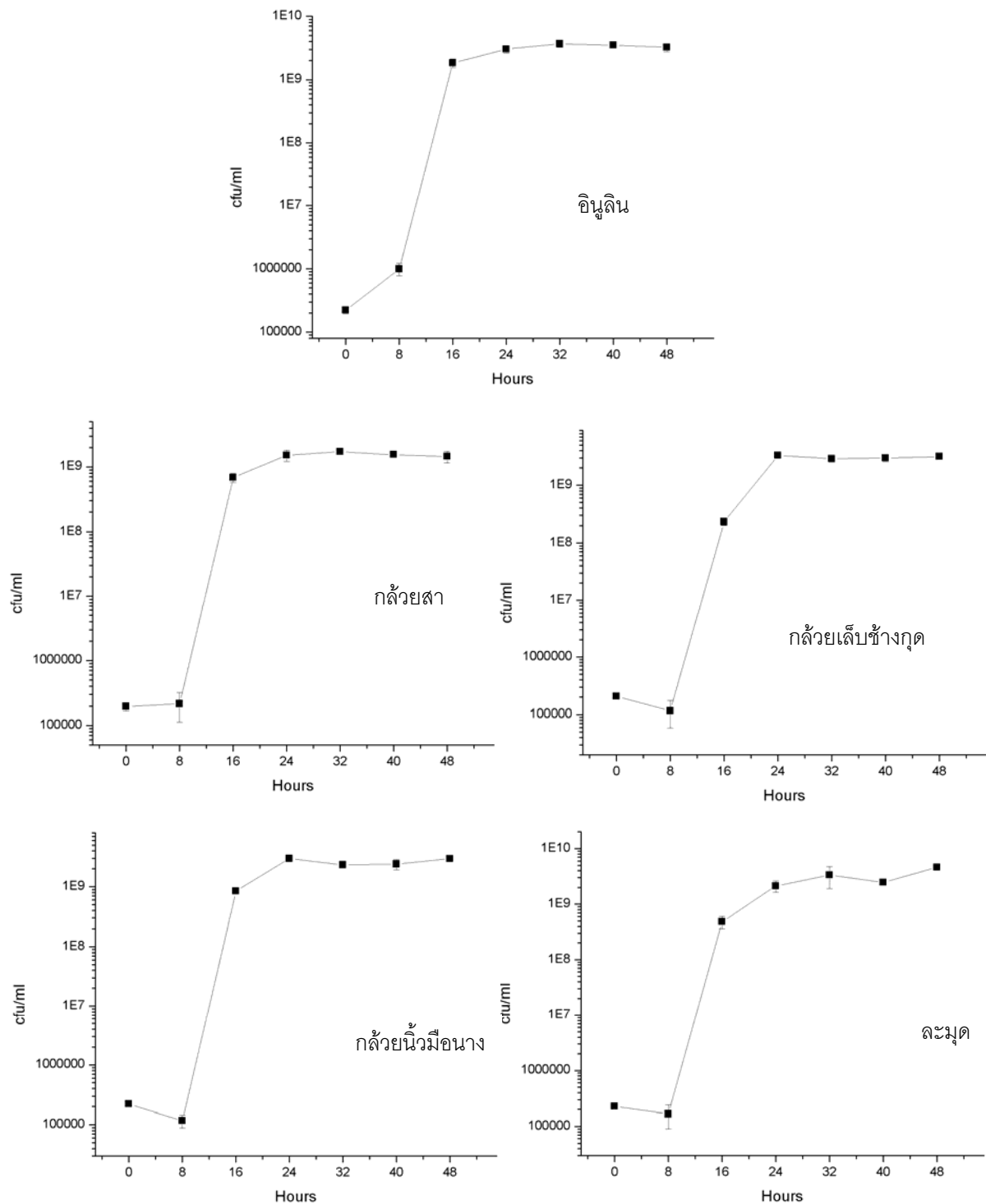
รูปที่ 12: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจาก มะม่วงเขียวเสวย ละมุด ทูเรียนชะนี และ ทูเรียนหมอนทอง (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)



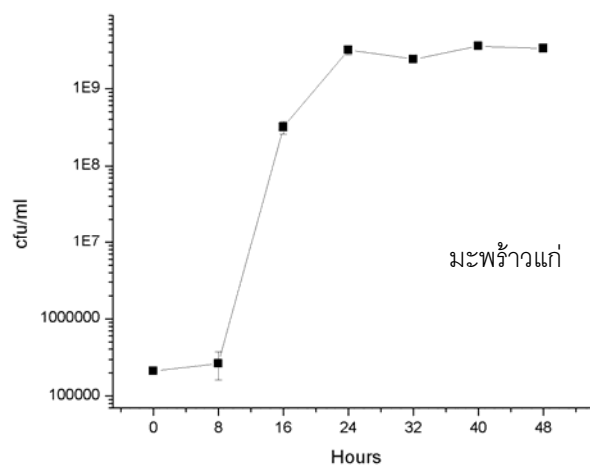
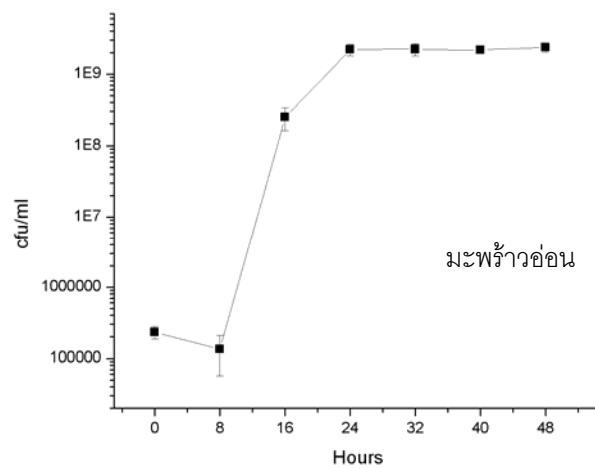
รูปที่ 13: กราฟแสดงการเจริญของ *L. plantarum* ATCC14917 ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจากมะพร้าวอ่อน และมะพร้าวแก่ (เครื่องหมาย * แสดงค่าการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ)

3.5 ผลของสารสกัดหยาบจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อต่อการเจริญ เติบโตของ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเนื้อผลไม้ต่อการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยจะทำการเติมสารสกัดผลไม้ 1% ลงใน MRS broth เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมสำหรับการเจริญของเชื้อ โดยมีอินูลินเป็นสารควบคุม (รูปที่ 14-15) พบว่าจากจำนวนตัวอย่างผลไม้ที่เลือกมาใช้ทดสอบนั้นในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมงนั้นยังไม่พบการลดลงของปริมาณเชื้อ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟ จะเห็นว่าแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium spp.* ใกล้เคียงกับการใช้อินูลินมาตรฐานเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 14: กราฟแสดงการเจริญของ *Bifidobacterium* spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% กลูโคส อินูลิน สารสกัดจากกัลล้วยเล็บช้างกุด กัลล้วยนิ้วมือนาง กัลล้วยสา และละมุด



รูปที่ 15: กราฟแสดงการเจริญของ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในอาหาร MRS ที่ใส่ 1% สารสกัดจาก มะพร้าวอ่อน และมะพร้าวแก่

3.6 ผลของสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้ต่อ *Lactobacillus sp.* และ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในด้านประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค

การทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเติมสารสกัดอินูลินจากเนื้อผลไม้โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไปทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 5 เท่า จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อด้วยวิธี disc diffusion และ microtiter plate assay

3.6.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อด้วยวิธี disc diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sp.* พร้อมกับการเติมสารสกัดกล้วยน้ำว้ามีนางมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น (ตารางที่ 12) ส่วนประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้นไม่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Lactobacillus sp.* โดยวิธี disc diffusion

สารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)			
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
อินูลิน	6.83	7	ND	7
มะพร้าวอ่อน	6.83	7	ND	7
มะพร้าวแก่	6.83	7	ND	7.5
ละมุด	6.83	7	ND	7.5
กล้วยสา	7.67	6.5	ND	7
กล้วยเล็บช้างกุด	7.67	6.5	6.67	7
กล้วยนิ้วมือนาง	7.67	8	8	8.17
กล้วยน้ำว้า	6.5	6.67	ND	6.5
กล้วยหอม	6.5	6.83	ND	6.5
กล้วยไข่	6.5	6.5	ND	6.5
กล้วยเล็บมือนาง	6.5	6.5	ND	6.5
Blank	ND	ND	ND	ND

ND = not detected

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อด้วยวิธี broth microdilution assay

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี broth microdilution assay จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พร้อมกับการเติมสารสกัดผลไม้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ พบว่า ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่า ทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น ยกเว้นในอาหารที่เติมสารสกัดกล้วยเล็บมือนางที่ระดับการเจือจาง 1/2 เท่านั้นมีประสิทธิภาพยับยั้งโดยสมบูรณ์ ส่วนที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเล็กน้อย (ตารางที่ 13) ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น ยกเว้นในอาหารที่เติมสารสกัดกล้วยนิ้วมือนางนั้นจากการทดสอบพบว่า ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่านั้นมีประสิทธิภาพยับยั้งโดยสมบูรณ์ ส่วนที่ระดับการเจือจาง 1/8 เท่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเล็กน้อย (ตารางที่ 14) ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น (ตารางที่ 15) ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น (ตารางที่ 16) ส่วนประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *Lactobacillus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมนั้นมีค่า MIC สูงที่สุดอยู่ที่ระดับการเจือจาง 1 เท่า (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Lactobacillus sp.*
โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	-	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยน้ำว้า	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยหอม	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยไข่	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บมือนาง	-	-	+/-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส่, +/- = กึ่งใส่ กึ่งชุน, + = ชุน

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. Typhimurium* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก
Lactobacillus sp. โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	-	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+/-	+	+	+	+
กล้วยน้ำว้า	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยหอม	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยไข่	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส่, +/- = กึ่งใส่ กึ่งชุน, + = ชุน

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Lactobacillus* sp. โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	-	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยน้ำว้า	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยหอม	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยไข่	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส่, +/- = กึ่งใส กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Lactobacillus sp.* โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	-	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยน้ำว้า	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยหอม	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยไข่	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส่, +/- = กึ่งใส กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *Lactobacillus sp.* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก
Lactobacillus sp. โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	+	+	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	+	+	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	+	+	+	+	+	+	+
ละมุด	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยน้ำว้า	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยหอม	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยไข่	-	+	+	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บมือนาง	-	+	+	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส่, +/- = กึ่งใส่ กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี broth microdilution assay จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้โดยการเลี้ยง *Bifidobacterium* spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พร้อมกับการเติมสารสกัดผลไม้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ ดังนี้ ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเติมสารควบคุมและสารสกัดละมุด ค่า MIC เท่ากับ 1/2 เท่าในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเติมสารสกัดมะพร้าวอ่อน มะพร้าวแก่ กล้วยสา และกล้วยเล็บช่างกุด ส่วนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเติมสารสกัดกล้วยนิ้วมือนางนั้นที่ระดับการเจือจาง 1/2 เท่าพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยสมบูรณ์ ในขณะที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเล็กน้อย (ตารางที่ 18) ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น (ตารางที่ 19) ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น (ตารางที่ 20) ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ระดับการเจือจาง 1/4 เท่าทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากสารควบคุมและสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น ยกเว้นน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากมะพร้าวอ่อน มะพร้าวแก่ กล้วยสา และ กล้วยเล็บช่างกุดมีค่า MIC ที่ระดับการเจือจางเท่ากับ 1/2 เท่า (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Bifidobacterium* spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	+	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	+	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	+	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	+	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	+/-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส, +/- = กึ่งใส กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. Typhimurium* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Bifidobacterium* spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	-	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส, +/- = กึ่งใส กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 20 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก

Bifidobacterium spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยวิธี broth microdilution

assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	-	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส, +/- = กึ่งใส กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 21 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* ของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นจาก *Bifidobacterium spp.*

ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยวิธี broth microdilution assay

การเจือจาง สารสกัด	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Blank
อินูลิน	-	-	-	+	+	+	+	+
มะพร้าวอ่อน	-	-	+	+	+	+	+	+
มะพร้าวแก่	-	-	+	+	+	+	+	+
ละมุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยสา	-	-	+	+	+	+	+	+
กล้วยเล็บช้างกุด	-	-	-	+	+	+	+	+
กล้วยนิ้วมือนาง	-	-	-	+	+	+	+	+
Blank	+	+	+	+	+	+	+	+

- = ใส, +/- = กึ่งใส กึ่งขุ่น, + = ขุ่น

หมายเหตุ: ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในภาวะปัจจุบัน มีความสนใจการใช้ประโยชน์จากอาหารให้ทำหน้าที่พิเศษที่ส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค นอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการตามปกติมากยิ่งขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาคัดเลือกผลไม้ที่มีในประเทศเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอินูลิน และนำมาทดสอบฤทธิ์การเป็นพรีไบโอติกส์ ซึ่งจากการคัดกรองเบื้องต้นเพื่อหาผลไม้ที่มีอินูลิน โดยใช้วิธีการย้อมเซลล์พืชด้วยแอลฟาแนพทอลในเอธานอลและกรดซัลฟูริกแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ร่วมกับการวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินในพืช โดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาการเกิดสี เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณอินูลินทั้งหมดโดยหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและปริมาณ reducing sugar พบว่า ผลไม้ที่คัดเลือกมา คือ ทุเรียนหมอนทองและชะนี มะม่วงเขียวเสวย ละมุดพันธุ์มะกอก มะพร้าวพันธุ์สูงและน้ำหอม น้อยหน่าหนัง มะเฟือง พุทราณมสด มีอินูลินอยู่ในผล แต่ไม่พบอินูลินในเปลือกเลย และเมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณอินูลินด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสก่อนและหลังไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์อินูลินเนส แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณอินูลินที่มีอยู่ในสารสกัดผลไม้ พบว่ากล้วยน้ำว้ามีอินูลินสูงที่สุดถึงร้อยละ 12.23 ส่วนกล้วยเขียว กล้วยหักมุกเขียว และกล้วยน้ำ มีปริมาณอินูลินประมาณร้อยละ 7.69, 7.59 และ 6.11 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลไม้ชนิดอื่นๆ ที่ให้ปริมาณอินูลินที่สูง ได้แก่ มะพร้าวพันธุ์สูงและน้ำหอม ละมุดพันธุ์มะกอก ทุเรียนหมอนทองและชะนี ส่วนกล้วยไข่ทองเงย กล้วยไข่ชุมแพ กล้วยนางพญา กล้วยน้ำว้า กล้วยหอม กล้วยหักมุกทอง กล้วยเล็บมือนางที่ผล กล้วยไข่ กล้วยลังกา กล้วยหักมุก ให้ปริมาณอินูลินปานกลาง ส่วนพุทราณมสด กล้วยหิน กล้วยเล็บมือนางและเพชรสมิอินูลินอยู่ในปริมาณต่ำ และไม่พบอินูลินเลยในเปลือก สำหรับพันธุ์กล้วยที่นิยมบริโภคในประเทศนั้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า กล้วยน้ำว้ามีปริมาณอินูลินสูงสุดประมาณร้อยละ 4.07 ส่วนกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยหักมุก และกล้วยเล็บมือนางมีปริมาณอินูลินลดลงตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีวิเคราะห์โดยวิธีการวัดปริมาณ carbohydrate และ HPLC พบว่าผลของปริมาณอินูลินที่ไม่สอดคล้องกัน โดยผลการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีให้ปริมาณอินูลินที่ต่ำในขณะที่การวิเคราะห์ด้วย HPLC ให้ปริมาณอินูลินที่สูงกว่า ทั้งนี้ผลที่ได้อาจเนื่องมาจากการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี โดยการหาผลต่างระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดกับปริมาณน้ำตาล reducing sugar ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ทำได้รวดเร็ว แต่อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากความจำเพาะน้อยกว่าวิธี HPLC ซึ่งมีความจำเพาะและแม่นยำมากกว่า อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายที่ใช้คัดเลือกผลไม้ที่มีอินูลินเบื้องต้นได้

เมื่อศึกษาในด้านประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ พบว่า กล้วยพันธุ์ต่างๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกล้วยหอม และกล้วยเล็บมือนางที่มีผลลดการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ณ ชั่วโมงที่ 16 ส่วนมะพร้าวแก่พันธุ์สูงและมะพร้าวอ่อนน้ำหอมสามารถคงปริมาณเชื้อได้กว่า 40 ชั่วโมงโดยมีแบบแผนการเพิ่มจำนวนของเชื้อใกล้เคียงกับการเติมอินูลินเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium spp.* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้น พบว่าการให้สารสกัดอินูลินจากผลไม้ที่คัดเลือกมาให้ผลดีใกล้เคียงกับการเติมอินูลิน

ในส่วนการศึกษาศักยภาพในการต้านเชื้อนั้น เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอินูลินจากผลไม้ต่อเชื้อ *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sp.* พร้อมกับการเติมสารสกัดกล้วยน้ำว้ามีผลยับยั้งเชื้อทั้งหมดได้ดีที่สุดเมื่อเทียบ

กับการเติมสารสกัดชนิดอื่นๆ และเมื่อทำการทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay พบว่า การเติมสารสกัดมะพร้าวอ่อน มะพร้าวแก่ ละมุด กล้วยสา กล้วยนิ้วมือนางและกล้วยเล็บช้างกุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sp.* หรือ *Bifidobacterium spp.* ให้ผลไม่แตกต่างจากการเติมอินูลินโดยตรง ผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากการใช้สารสกัดยับยั้งอินูลินจากผลไม้ที่คัดเลือกนั้นมีคาร์โบไฮเดรทอันประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดอื่นๆ ปนอยู่ด้วยซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และหากยังเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแล้ว จุลินทรีย์มีแนวโน้มจะใช้น้ำตาลประเภทนี้ก่อนน้ำตาลชนิดอื่นๆ

โดยสรุป หากพิจารณาถึงผลไม้ที่มีศักยภาพที่น่าศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในผล และการสกัดแยกอินูลินบริสุทธิ์เพื่อจะพัฒนาต่อเป็นพรีไบโอติกส์นั้น พบว่า กล้วยนิ้วมือนาง มะพร้าวพันธุ์สูงและพันธุ์น้ำหอม มีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณอินูลินสูง ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกส์ รวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- เฉลิมขวัญ คำคำและมัลลิกา ชมนาวัง. คุณรู้จัก Prebiotics แล้วหรือยัง. *Food Journal*. 2005 (35) 96-102.
- Bielecka M. , Biedrzycka E., Majkowska A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International* 35 : 125–131.
- Bouhnik Y., Flourie B., Laurence D'Agay-Abensour, Pochart P., Gramet G., Durand M. et.al. 1997. Administration of Transgalacto–oligosaccharides Increase Fecal Bifidobacteria and Modifies Colonic Fermentation Metabolism in Healthy Humans. *Journal of Nutrition*.127 : 444-448.
- Gibson G.R., Beaty E.R., Wang X.. and Cummings J.H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108 : 975-982.
- Kaur N. and Gupta A.K. 2002. Application of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*. 27(7): 703-714.
- Kim M. and Shin H.K.. 1998. The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentration and fecal lipid excretion in rats. *Journal of Nutrition*. 128: 1731-1736.
- Lee M.S., *LC/MS applications in drug development*, ed. N.M.M.N. Dominic M. Desiderio. 2002, New York: A John Wiley and Sons, Inc.
- Nuñez O., E.n.M., Galceran M.T. 2005. LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(7): 683-703.
- Moore N., Chao C., Yang L-P., Storm H., Oliva-Hemker M., Saavedra J.M. 2003. Effect of fructo-oligosaccharide-supplement infant cereal: a double blind, randomized trial. *British Journal of Nutrition*. 90(3): 581-588.