รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

ผลของผลิตภัณฑ์นมหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

Effects of Fermented Dairy Milk Products Using Probiotic Lactic Acid Bacteria Starters on Antiproliferation of Colon Cancer Cells

โดย

มงคล ถิรบุญยานนท์ และคณะ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2556

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-54-47/55-50

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์นมหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

Effects of Fermented Dairy Milk Products Using Probiotic Lactic Acid Bacteria Starters on Antiproliferation of Colon Cancer Cells

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554 - 2555

จำนวน 647,300 บาท

หัวหน้าโครงการ นายมงคล ธิรบุญยานนท์

ผู้ร่วมโครงการ นางเพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร

นางวิจิตรา แดงปรก

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31 มีนาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์นมหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ได้ดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2554 – 2555 ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการวิจัย	25
วิจารณ์ผลการวิจัย	40
สรุปผลการวิจัย	45
เอกสารอ้างอิง	47

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์	26-27
ตารางที่ 2	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเกิด hydrophobicity กับสารไฮโดรคาร์บอน	29
ตารางที่ 3	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	29
ตารางที่ 4	การต้านต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก	30
ตารางที่ 5	ประสิทธิภาพการผลิตกรดไขมันสายสั้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก	32
ตารางที่ 6	เวลาและการเปลี่ยนแปลง pH ในกระบวนการหมักโปรไบโอติกโยเกิร์ต	33
ตารางที่ 7	ปริมาณของ *S. thermophilus* TISTR 458 ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกโยเกิร์ต	34
ตารางที่ 8	ปริมาณของ *L. bulgaricus* TISTR 895 ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกโยเกิร์ต	34
ตารางที่ 9	ปริมาณของแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกโยเกิร์ต	35
ตารางที่ 10	การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในกระบวนการเก็บรักษาโปรไบโอติกโยเกิร์ต	36
ตารางที่ 11	ปริมาณกรดแลคติกในกระบวนการเก็บรักษาโปรไบโอติกโยเกิร์ต	37
ตารางที่ 12	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกโยเกิร์ต (วันที่ 1)	37
ตารางที่ 13	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกโยเกิร์ต (วันที่ 28)	38
ตารางที่ 14	คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกโยเกิร์ต	39

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้	6
ภาพที่ 2	ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ที่จำแนกตามระบบที่แตกต่างกัน	8

ผลของผลิตภัณฑ์นมหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

Effects of Fermented Dairy Milk Products Using Probiotic Lactic Acid Bacteria Starters on Antiproliferation of Colon Cancer Cells

มงคล ธิรบุญยานนท์[1] เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร[1] และวิจิตรา แดงปรก[2]

Mongkol Thirabunyanon[1], Penrat Hongwittayakorn[1] and Wichittra Daengprok[2]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

[2]คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักโดยการหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในงานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อผลิตโยเกิร์ตให้มีอรรถประโยชน์ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบหมัก จำนวน 31 ตัวอย่าง พบว่าสามารถเก็บรวบรวมแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะรูปร่างแบบท่อนหรือแบบกลมได้ จำนวน 284 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดไปทดสอบคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก อาทิ คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์ การทนต่อสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี การไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และคุณสมบัติการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 8 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดี ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยวิธีการแบบ MTT พบว่ามีแบคทีเรียโปรไบโอติกเพียง 4 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีประมาณ 11 – 25% โดยมีกลไกมาจากการผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด acetic, propionic และ butyric ของแบคทีเรียโปรไบโอติก เมื่อนำแบคทีเรียโปรไบโอติกมาจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA และทำการตั้งชื่อแบคทีเรียโปรไบโอติกได้โดยดังนี้ *Enterococcus faecium* FM20, *Lactobacillus plantarum* PM1-23, *Lactobacillus plantarum* PM2-13 และ *Lactobacillus zeae* PM11-5 เมื่อนำแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 ไปหมักผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต พบว่าเวลาที่ใช้ในการหมักโยเกิร์ตเท่ากับ 8 ชั่วโมง 40 นาที โดยใช้เวลาหมักเท่ากับกลุ่มควบคุมที่หมักด้วย *Streptococcus thermophillus* TISTR 458 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 895 อัตราการ

รอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพบว่ามีมากกว่า 10^8 CFU/ml ตลอดช่วงเวลาในการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีมากกว่ากลุ่มควบคุม 1.17 และ 1.47 เท่า ตามลำดับ

แบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปหมักผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อเพิ่มอรรถประโยชน์ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ดี

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก ป้องกันและรักษาโรค โปรไบโอติก มะเร็งลำไส้ โยเกิร์ต

Abstract

The aim of this study was to evaluate an activity of yogurt fermented with probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks as starter culture on protection and/or biotherapy of colon cancer. A total of 284 isolates of Gram-positive rod or cocci bacteria were collected from naturally fermented dairy milks of 31 samples. Of only 8 isolates had bacterial probiotic criteria including activity against 8 foodborne pathogens, tolerances in the human gastrointestinal tract such as pH 2.5 and 0.3% bile salt, high activity to adhere to intestinal epithelial cells and no blood hemolysis. There are only 4 isolates from these probiotic bacteria that had an antiproliferation of colon cancer cells by using MTT assay as the rates of 11 – 25%. Comparison of 16S rRNA sequences of these 4 bacterial probiotic isolates showed that they are genera of *Enterococcus faecium* FM20, *Lactobacillus plantarum* PM1-23, *Lactobacillus plantarum* PM2-13 and *Lactobacillus zeae* PM11-5. Production of probiotic yogurt using *L. plantarum* PM2-13 or *L. zeae* PM11-5 as starter culture showed that the survival rates of both probiotics are higher than 10^8 CFU/ml in the stored process of 28 d. Properties and qualities of the probiotic yogurt including pH, total lactic acid, protein, total solid, ash and fat are not significant different which compared to the control group. As well as, the sensory scores of probiotic yogurt are also did not differ to that of control group. Potential of both probiotic yogurts inducing antiproliferation of colon cancer cells as higher than that of control group.

This study suggested that these probiotic yogurts could be applied for prophylactic and/or biotherapy of colon cancer.

Key words : Lactic acid bacteria, Protection and biotherapy, Probiotic, Colon cancer, Yogurt

คำนำ

ปัญหาสุขภาพและการเจ็บไข้ได้ป่วยของประชากรในประเทศไทยเรานั้น มีสาเหตุหลักๆ มาจากการบริโภคอาหารที่ขาดหลักโภชนาการ โดยจะเห็นได้ว่าในแต่ละปีจะพบอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตของประชากรในอันดับต้นๆ นั้นมาจากโรคมะเร็งและโรคที่เกี่ยวกับหัวใจหรือเส้นเลือดสมองผิดปกติ ซึ่งโรคดังกล่าวล้วนมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้บริโภค จากปัจจัยเหล่านี้ทำให้ในแต่ละปีนั้น ประเทศไทยของเราต้องจัดสรรงบประมาณจำนวนมากเพื่อดูแลคนไข้ที่เจ็บป่วยจากโรคเหล่านี้เช่นเดียวกันกับคนไข้ที่จำเป็นจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาที่สูงมาก ด้วยเหตุที่ยาและวัสดุภัณฑ์ที่จำเป็นนั้นมีราคาที่แพง และบางส่วนต้องนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้น ปัจจุบันนั้นหลายๆ ภาคส่วนของรัฐรวมถึงภาคเอกชนได้ตระหนักถึงความสำคัญของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ โดยเน้นถึงอรรถประโยชน์ในการป้องกันโรคภัยไข้เจ็บเหล่านี้ด้วย นมหมัก (fermented milk) เป็นผลิตภัณฑ์จากน้ำนมที่ผ่านการหมักนมด้วยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria, LAB) ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะมีอยู่ 2 รูปแบบคือ นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต ในปัจจุบันนักวิจัยกำลังพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักให้มีอรรถประโยชน์มากที่สุด นมหมักที่หมักด้วยหัวเชื้อหรือการเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกก็เป็นวิธีการพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักที่นักวิจัยได้ให้ความสำคัญในอันดับต้นๆ (Maragkoudakis *et al*., 2006)

แบคทีเรียโปรไบโอติก (probiotic bacteria) หมายถึงอาหารเสริมที่เป็นแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตและเมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกายแล้วจะช่วยให้ร่างกายผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดีขึ้น (Salminen *et al*., 1998) นอกจากนั้นยังช่วยในการป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ บทบาทหรือการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในการป้องกันโรคมะเร็งนั้นกำลังได้รับความสนใจสำหรับหน่วยงานวิจัยในหลายประเทศ ทั้งนี้มีการศึกษาถึงผลของโปรไบโอติกต่อการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด อย่างเช่น มะเร็งลำไส้ (colon cancer) มะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) และมะเร็งตับ (liver cancer) เป็นต้น (Kim *et al*., 2007) ถึงแม้บทบาทของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการป้องกันหรือรักษามะเร็งลำไส้จะมีการศึกษาในต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการในการคัดเลือกเพื่อให้ได้แบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติต้านโรคมะเร็งลำไส้นั้นยังไม่มีรูปแบบและหรือวิธีการที่เด่นชัด ทั้งที่เรื่องดังกล่าวมีประโยชน์ต่อประชากรของประเทศไทยอย่างสูง ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยพยายามศึกษาโดยการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ นอกจากนั้นจะนำหัวเชื้อหมักดังกล่าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีประสิทธิภาพในการป้องกัน และบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ ทั้งนี้หากผลการวิจัยเป็นไปตามความคาดหวัง ผู้วิจัยสามารถนำแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อของผลิตภัณฑ์นมหมักในเชิงพานิชย์ที่มีราคาถูก รวมทั้งยังเป็นการลดการนำเข้ายาที่มีราคาแพงจากต่างประเทศและสามารถทำให้ประชาชนมีสุขภาพแข็งแรงปลอดภัยจากการติดเชื้อก่อโรคที่จะทำให้เกิดโรคชนิดต่างๆ หรือป้องกันโรคมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะโรคมะเร็งลำไส้ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักด้วยหัวเชื้อหมักที่มีประสิทธิภาพที่ดี ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติก

2. เพื่อเพิ่มอรรถประโยชน์ของนมหมักในเชิงสุขภาพและการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ต่อผู้บริโภค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักเพื่อเพิ่มอรรถประโยชน์ในรูปแบบอาหารเพื่อสุขภาพในครั้งนี้ ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมาได้จะต้องมีความสามารถในการป้องกันหรือบำบัดรักษาโรคได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงสุขภาพของประชากรของคนไทยเรานั้น ที่นับวันจะยิ่งมีอัตราการเสี่ยงต่อสารพัดโรคที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารขาดหลักโภชนาการ อาทิ โรคมะเร็งลำไส้ ซึ่งโรคดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดการสูญเสียต่อชีวิตและเพิ่มค่าใช้จ่ายในการดูแลสุขภาพที่สูงมาก ดังนั้นกระบวนการพัฒนานมหมักและการคัดเลือกหัวเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์นมหมักที่ได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่สามารถป้องกัน และบำบัดโรคด้วยค่าใช้จ่ายที่มีราคาถูกและปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยลดการนำเข้ายาและผลิตภัณฑ์รักษาโรคที่มีราคาแพงจากต่างประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

การตรวจเอกสาร

โรคมะเร็ง (Cancer)

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อที่ผิดปกติหรือโรคมะเร็ง โดยปกติแล้วถ้าโรคมะเร็งเกิดขึ้นที่อวัยวะใดในร่างกายก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้นๆ เช่น โรคมะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2555) ในประเทศไทยของเราพบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นมากกว่าในอดีตอย่างเห็นได้ชัด จากรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (Hospital – Based Cancer Registry) ปี 2554 พบว่ามีผู้ป่วยใหม่มารับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 25,476 คน (ภัทรวินท์และรังสิยา, 2554) โดยข้อมูลดังกล่าวนี้จะไม่รวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งที่ทำการรักษาในสถานที่อื่นๆ หรือเสียชีวิตโดยไม่รับการรักษาเลย ซึ่งหากรวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งทั้งหมดที่รวมทั้งผู้ป่วยเก่าและผู้ป่วยใหม่แล้ว ในประเทศไทยของเราจะมีผู้ป่วยเป็นมะเร็งจำนวนมาก ดังนั้นจึงส่งผลให้โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุด ซึ่งมีอัตราสูงกว่าสาเหตุมาจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจมาประมาณ 5 - 6 ปีที่ผ่านมาแล้ว

โรคมะเร็งที่พบมากในประเทศไทยในปัจจุบันนี้ จะพบโรคมะเร็งในผู้ชายเป็นอันดับ 1, 2 และ 3 ก็คือ โรคมะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็งตับตามลำดับ ในขณะที่โรคมะเร็งที่พบมากในผู้หญิงเป็นอันดับ 1, 2 และ 3 ก็คือ โรคมะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ตามลำดับ (ภัทรวินท์และรังสิยา, 2554) จากข้อมูลดังกล่าวนี้จะพบว่าโรคมะเร็งลำไส้นั้นจะพบมากเป็นอันดับต้นๆ ทั้งในผู้ชายและผู้หญิง และเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรแถบยุโรปแล้ว โรคมะเร็งลำไส้ก็พบมากและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน โดยเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 3 ในผู้ชายที่พบรองจาก โรคมะเร็งอัณฑะและมะเร็งปอด ในขณะที่พบเป็นมากอันดับที่ 2 รองจากมะเร็งเต้านมในผู้หญิง (McCann *et al*., 2007)

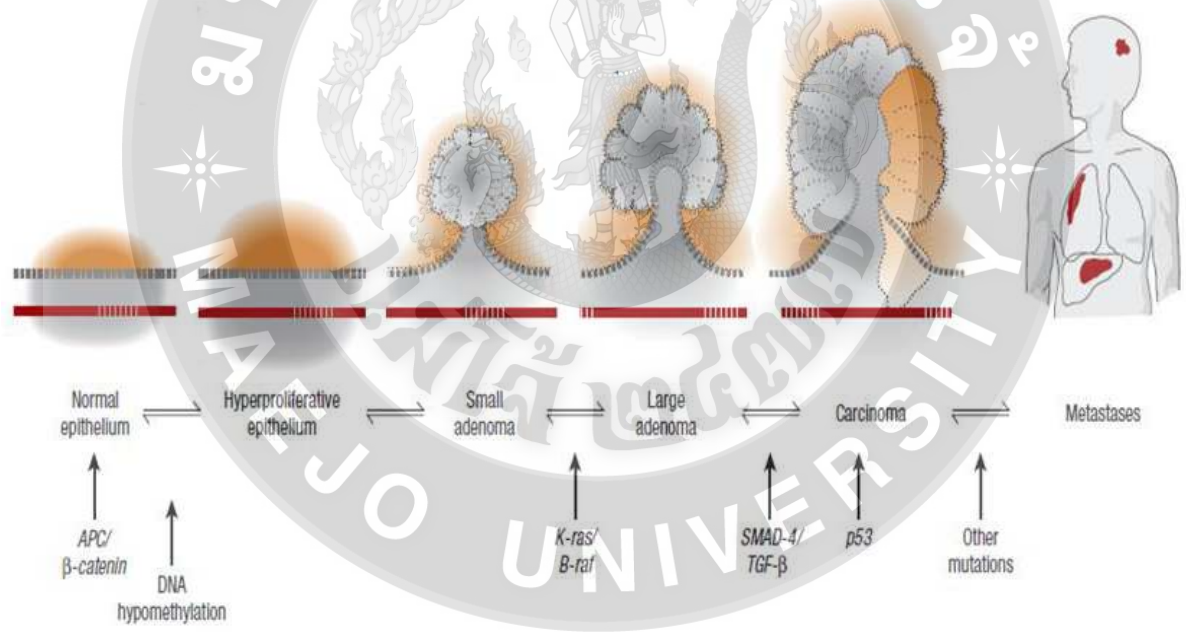
โรคมะเร็งลำไส้ (Colon cancer)

โรคมะเร็งลำไส้ (Colon cancer) มีสาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงมาจากหลายๆ ปัจจัย (multifactors) แต่โดยรวมแล้วจะมีปัจจัยหลักๆ มาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางด้านพันธุกรรม ซึ่งสาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมนั้นจะเกิดจากการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกต้องตามหลักโภชนาการ กล่าวคือมะเร็งลำไส้จะพบมากในผู้ที่บริโภคอาหารที่มีไขมันมาก การบริโภคเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อล้วนๆ แต่บริโภคอาหารที่มีเส้นใยอาหารต่ำ (Commane *et al*., 2005) นอกจากนั้นโรคมะเร็งลำไส้จะพบได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะ

ลำไส้อักเสบเรื้อรัง ดังเช่น Chronic ulcerative colitis และ Crohn's disease (Gordon, 1999) ปัจจัยอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ ดังเช่น การสูบบุหรี่ คนอ้วน และบุคคลที่ไม่ออกกำลังกาย เป็นต้น

ปัจจัยจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม อาทิ มีพ่อ แม่ พี่และน้องเป็นโรคมะเร็งลำไส้ ซึ่งโดยปกติแล้วมีมะเร็งลำไส้บางชนิดสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ เช่น Familial adenomatous polyposis (FAP) ที่เกิดจากความผิดปกติของยีน Adenomatous polyposis coli (APC) ซึ่งก่อให้เกิดลักษณะที่สำคัญก็คือ การมีติ่งเนื้องอกที่ลำไส้ใหญ่ (adenomatous polyp) จำนวน 100 อันหรือมีมากกว่านี้ นอกจากนี้ยังมีมะเร็งลำไส้อีกชนิดหนึ่งที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ก็คือ hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) หรือ Lynch syndrome จะมีลักษณะที่สำคัญกล่าวคือผู้ป่วยจะมีติ่งเนื้องอกจำนวนไม่มากนัก แต่ทั้งนี้จะมีอัตราเร่งของการพัฒนาจากติ่งเนื้องอกไปเป็นมะเร็งลำไส้โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 ปี (Muyphuag, 2010)

กลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้มีกระบวนการหลายขั้นตอน (รูปที่ 1) โดยส่วนใหญ่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับขั้น ซึ่งเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงของมิวโคซา (mucosa)



รูปที่ 1 กลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ที่เกิดจากความผิดปกติของยีน เช่น การกลายพันธุ์ของยีน APC การมีความผิดปกติใน β-catenin การมีความผิดปกติของ K-ras หรือ B-raf oncogene และการทำหน้าที่ของยีน P53 ผิดปกติ โดยการเปลี่ยนแปลงจะมีผลต่อมิวโคซาปกติกลายไปเป็นมะเร็งในขั้นตอนสุดท้าย

ที่มา : Medina *et al*., 2008.

กลายไปเป็นติ่งเนื้องอก และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งจะเรียกรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับขั้นตอนนี้ว่า Adenoma-carcinoma sequence หรือ Polyp-cancer sequence โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติไปเป็นมะเร็งนั้น จะเริ่มตั้งแต่การมีกระบวนการสะสมการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือมีความผิดปกติของยีน เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน APC การมีความผิดปกติใน β-catenin การมีความผิดปกติของ K-ras หรือ B-raf oncogene และมีการทำหน้าที่ผิดปกติในยีน P53 เป็นต้น (Medina *et al*., 2008; Muyphuag, 2010)

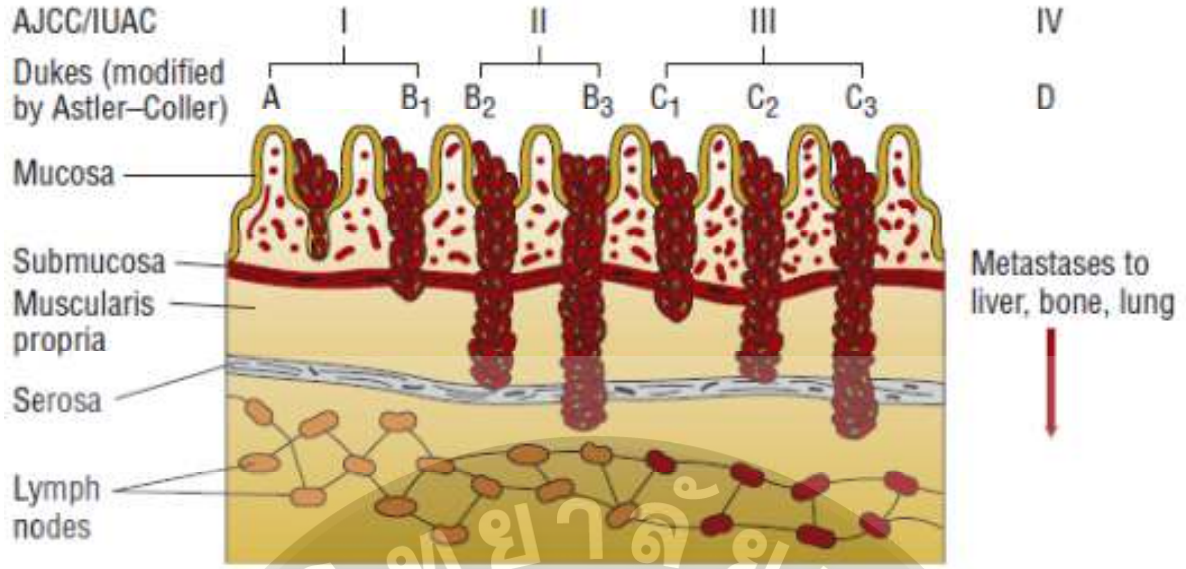
ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ (รูปที่ 2) สามารถจำแนกได้หลายรูปแบบ โดยที่รูปแบบการจำแนกระยะของโรคที่เป็นที่นิยม เช่น Duke's classification (1932), Modified Astler Coller (1974) และ AJCC/IUAC (1997) แต่ทั้งนี้โดยรวมๆ แล้วการจำแนกในแต่ละระบบนั้นก็จะมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งการจำแนกระยะของโรคนั้นก็เพื่อให้ทราบว่าโรคนั้นอยู่ในช่วงใด หรือเหมาะสำหรับการรักษาด้วยวิธีใดที่เหมาะสมที่สุด เป็นต้น ตัวอย่างการจำแนกระยะของมะเร็งลำไส้แบบ Duke's classification ซึ่งมี 4 ระยะดังนี้ (รูปที่ 2)

Duke's classification

Duke A มะเร็งยังอยู่ในชั้นผนังลำไส้
Duke B มะเร็งออกนอกผนังลำไส้
Duke C มะเร็งกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes)
Duke D มะเร็งกระจายไปยังช่องท้อง ตับ กระดูก และปอด เป็นต้น

การจัดจำแนกตามระบบ AJCC/IUAC จำแนกได้ 4 ขั้นตอน คือ I, II, III, และ IV ในขณะที่การจัดจำแนกตามระบบ Astler Coller ก็แบ่งออกเป็น 4 ระยะเหมือนกัน แต่ทั้งนี้จะมีการจำแนกระยะที่เป็นระยะปลีกย่อยลงไปอีก เช่น A, B1, B2, B3, C1, C2, C3 และ D (Medina *et al*., 2008) (รูปที่ 2)

ปัจจุบันมีการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ด้วยวิธีที่ได้มาตรฐาน อาทิ การผ่าตัด การใช้เคมีหรือยาบำบัด และการฉายรังสี เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวไม่สามารถที่จะฆ่าเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมดและยังมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดรักษาโรคที่สูงมาก รวมทั้งอาจเกิดอาการแพ้ยาบำบัดหรือเกิดผลข้างเคียงขึ้น เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาวิธีการป้องกัน และหรือการบำบัดรักษามะเร็งลำไส้จากแบคทีเรียโปรไบโอติกซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรานั้น ก็จะเป็นวิธีการหรือรูปแบบใหม่ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งที่กำลังมีการศึกษาวิจัย ดังนั้นจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยกันอย่างจริงจัง ทั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อลดอัตราการเกิดโรคและหรือลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งในที่สุด



รูปที่ 2 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ที่มีการจัดจำแนกตามระบบที่แตกต่างกัน เช่น AJCC/IUAC, Astler Coller และ Duke's classification

ที่มา : Medina *et al*., 2008.

แบคทีเรียโปรไบโอติก (Probiotic bacteria)

แบคทีเรียโปรไบโอติก หมายถึงแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตและเมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกายแล้วจะช่วยให้ร่างกายผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดี (Salminen *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกก็เป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกัน และบำบัดรักษาการติดเชื้อของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Millette *et al*., 2008; Spinler *et al*., 2008) โดยปกติแล้วแหล่งของแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้นจะมีส่วนสำคัญและส่วนสัมพันธ์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละแหล่งที่มาก็จะมีคุณลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป แต่โดยทั่วไปแล้วหากเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่นำไปประยุกต์ในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคในระบบทางเดินอาหารนั้น ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีแหล่งกำเนิด หรือคัดแยกมาจากแบคทีเรียเฉพาะถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เราเอง (Millette *et al*., 2008; Pridmore *et al*., 2008; Verdenelli *et al*., 2009; Gaudana *et al*., 2010) อย่างไรก็ตามก็มีแบคทีเรียโปรไบโอติกบางส่วน หรือบางชนิดที่คัดเลือกมาจากผลิตภัณฑ์อาหารที่มนุษย์เรารับประทาน (Fayol-Messaoudi *et al*., 2007; Chiu *et al*., 2008; Yuksekdag and Aslim, 2010) ทั้งนี้เพื่อนำแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้มาผลิตหรือเสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีวัตถุประสงค์ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคได้เพิ่มเติมอีกทางหนึ่งด้วย

กลุ่มของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีการประยุกต์ใช้เป็นจำนวนมากนั้น ก็คือกลุ่มของ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียโปรไบโอติกในกลุ่มอื่น เช่น *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นต้น (Sorokulova *et al*., 2008; Wescombe *et al*., 2009) ปัจจุบันรูปแบบของการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกนั้นมีหลายรูปแบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่รูปแบบในการเตรียมแบคทีเรียโปรไบโอติกให้เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ อาทิ รูปแบบแคปซูล แบบเม็ด แบบน้ำ หรือแบบที่เสริมในอาหารสุขภาพ (functional foods) เช่น ในนมเปรี้ยวและหรือโยเกิร์ต เป็นต้น

คุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น การมีคุณลักษณะไม่เป็นเชื้อก่อโรค มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค มีความสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เราได้ และมีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ได้ (Fuller, 1989; Salminen *et al*., 1998) และเมื่อได้แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดีที่มีคุณสมบัติทั่วๆ ไปแล้ว ก็จะทดสอบการมีคุณสมบัติเฉพาะเพิ่มเติม เช่น คุณสมบัติในการต้านโรคมะเร็ง เป็นต้น การนำแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดีที่ผ่านการคัดเลือกดังกล่าวนี้มาทำการผลิตหรือเสริมในผลิตภัณฑ์นมหมัก ทั้งนี้เพราะว่าหากผลิตในรูปของผลิตภัณฑ์นมหมักนั้นจะสะดวกในการนำไปบริโภค ผลิตได้ง่าย ราคาถูก อีกทั้งนมหมักไม่ว่าจะเป็นนมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ตนั้น ก็เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประชาชนทั่วไปนิยมรับประทานกันเป็นประจำ ซึ่งผู้วิจัยคาดหวังว่าผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตด้วยกระบวนการดังกล่าวนี้ จะเป็นแนวทางหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1. ตัวอย่างน้ำนมดิบ

1.1.1. น้ำนมดิบ จำนวน 31 ตัวอย่าง จากฟาร์มโคนมที่มีแหล่งที่มาแตกต่างกัน

1.2. เซลล์สายพันธุ์ของเซลล์มะเร็งลำไส้

1.2.1. เซลล์ Caco-2 (ATCC, USA)

1.3. แบคทีเรียก่อโรคที่นำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ

1.3.1. *Salmonella* Typhimurium TISTR 292

1.3.2. *Staphylococcus aureus* TISTR 118

1.3.3. *Salmonella* Enteritidis DMST 15676

1.3.4. *Escherichia coli* TISTR 780

1.3.5. *Bacillus cereus* TISTR 121

1.3.6. *Listeria monocytogenes* DMST 1783

1.3.7. *Vibrio cholera* DMST 2873

1.3.8. *Helicobacter pyroli* DMST 20165

1.4. อาหารและสารเสริมในสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

1.4.1. Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; GibcoTM, USA)

1.4.2. Fetal calf serum (Hyclone, USA)

1.4.3. Non-essential amino acid (Hyclone, USA)

1.4.4. Penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml and 10,000 µg/ml) (Hyclone, USA)

1.5. อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

1.5.1. อาหารแข็งสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (MRS) (Criterion, USA)

1.5.2. อาหารเหลวสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (Criterion, USA)

1.5.3. อาหารแข็งสูตร Brain heart infusion (BHI) (Scharlau, Spain)

1.5.4. อาหารกึ่งเหลวสูตร Brain heart infusion (Scharlau, Spain)

1.5.5. อาหารเหลวสูตร Brain heart infusion (Scharlau, Spain)

1.5.6. อาหารแข็งสูตร Blood agar (Sigma, Germany)

1.5.7 อาหารแข็งสูตร LP-MRS agar

1.5.8 อาหารแข็งสูตร ST agar

1.6. สารเคมี ไพรเมอร์ เอนไซม์และชุดยาปฏิชีวนะ

1.6.1. Glycerol (Merk, Germany)

1.6.2. Hydrochloric acid (Merk, Germany)

1.6.3. Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Merk, Germany)

1.6.4. Sodium hydroxide (Merk, Germany)

1.6.5. Sodium chloride (NaCl) (Merk, Germany)

1.6.6. Sodium bicarbonate (NaH_2CO_3) (Merk, Germany)

1.6.7. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) (Ajax Finechem, Austraria)

1.6.8. Emulsion oil (Merk, Germany)

1.6.9. Bile salt (Sigma, USA)

1.6.10. Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA)

1.6.11. Trysin EDTA (Hyclone, USA)

1.6.12. Absolute ethanol (Merk, Germany)

1.6.13. Triton-X 100 (Merk, Germany)

1.6.14. Barium chloride (Ajax Finechem, Austraria)

1.6.15. Sulfuric acid (Ajax Finechem, Austraria)

1.6.16. MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2*H* tetrazoliumbromide (Sigma, USA)

1.6.17. DMSO (Sigma, USA)

1.6.18. Diethyl ether (Merk, Germany)

1.6.19. Dichloromethane (Merk, Germany)

1.6.20. Acetic acid (Merk, Germany)

1.6.21. Butyric acid (Merk, Germany)

1.6.22. Propionic acid (Merk, Germany)

1.6.23. ชุดย้อมแกรม (Gram's strain set) (Bio-Medical Laboratory, Thailand)

1.6.24. ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Mobio DNA extraction kit)

(Genomic DNA minikit blood/cell)

1.6.25. Master mix (Fermentas, USA)

1.6.26. Primer (Operon, Germany)

- 27F (forward primer) 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′
- 520R (reverse primer) 5′-ACCGCGGCKGCTGGC-3′
- 1522R (reverse primer) 5′-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3′

1.6.27. ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (TaKaRa SUPREC™-PCR, Japan)

(RBC Bioscience, Taiwan)

1.6.28. Loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)

1.6.29. O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)

1.6.30. เอนไซม์ RNase (Nippon Gene, Japan)

1.6.31. ผงวุ้นอะกาโรส

1.6.32. ชุดยาปฏิชีวนะ (แผ่นยาปฏิชีวนะ) (Oxoid, England)

1.7. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.7.1. ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Menmert, Germany)

1.7.2. ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ, Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)

1.7.3. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator, ยี่ห้อ Forma Scientific, รุ่น 3111, USA)

1.7.4. ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115 (E2), USA)

1.7.5. ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240 (E2), USA)

1.7.6. ตู้เขี่ยเชื้อ (Horizontal type larminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3)

1.7.7. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)

1.7.8. ตู้ฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)

1.7.9. สเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ (ยี่ห้อ Thermo Sciencetronic รุ่น Genesys5, USA)

1.7.2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifugation, Hettich, รุ่น 320R, Germany)

1.7.3. เครื่องเขย่า (Shaker)

1.7.4. เครื่องพีซีอาร์ (PCR Sprint Thermal Cycler, ยี่ห้อ Thermal hybrid รุ่น Sprint)

1.7.5. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Digital Balance, ยี่ห้อ OHAUS)

1.7.14. กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope, ยี่ห้อ Olympus รุ่น UM 500

1.7.15. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope, Olympus, ULWCD 0.30)

1.7.16. พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)

1.7.17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, ยี่ห้อ Julabo Labortechink GMBH รุ่น TW12)

1.7.18. ถังไนโตรเจนเหลว (TAYLOR-WHARTON, XT-20, USA)

1.7.19. ไมโครปิเปต ปรับปริมาตรได้ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิลิตร

1.7.20. Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)

1.7.21. ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

1.7.22. ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.7.23. Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร

1.7.24. ฮีโมไซโตรมิเตอร์ (Haemocytometer)

1.7.25. Gas chromatography Mass chromatography (GC, Agilent, รุ่น 6890) (MS, Agilent, รุ่น 5973)

1.7.26. ชุดวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl

- เครื่องย่อย (block digestor) (Buchi, รุ่น CH9230, Switzerland)
- ชุดกำจัดไอกรด (scrubber) (Buchi, รุ่น B414, Switzerland)
- ชุดเครื่องกลั่น (distilling unit) (Foss, รุ่น Kjeltec 2200, Denmark)

1.7.27. เตาเผาเถ้า (Muffle furnace) (Carbolite, รุ่น CFW, 1200, UK)

1.8. ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์

1.8.1. ฟาร์จเลี้ยงเซลล์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.8.2. ถาดหลุม 24 หลุม

1.8.3. ถาดหลุม 96 หลุม

1.9. เครื่องแก้วและภาชนะหมักโยเกิร์ต

1.9.1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

1.9.2. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร

1.9.3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

1.9.4. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.9.5. ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.9.6. ถ้วยพลาสติกที่มีฝาปิดสำหรับหมักโยเกิร์ต

2. วิธีการวิจัย

2.1. การคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติก

2.1.1. การคัดแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบหมัก

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมโคจากฟาร์มโคนม โดยได้รวบรวมตัวอย่างน้ำนมจำนวน 31 ตัวอย่าง จากฟาร์มโคนมที่มีสถานที่แตกต่างกัน โดยการเก็บน้ำนมในภาชนะที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำน้ำนมมาหมักตามธรรมชาติ ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไร้อากาศ จากนั้นนำนมที่หมักตามธรรมชาติดังกล่าวนี้มา 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางในน้ำเกลือ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็นลำดับขั้น (serial dilution) แล้วนำ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง MRS agar บ่ม 48 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจะทำการเลือกสุ่มเอาลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยคัดเลือกตัวอย่างละ 5-10 โคโลนี นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีด (streak) บนอาหารแข็ง MRS agar จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการย้อมสีของแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมแกรมและศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อคัดเลือกเอาเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแบบท่อนหรือแบบกลม จากการคัดแยกเชื้อในขั้นตอนนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 284 ไอโซเลต และทำการเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้ในกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบขั้นต่อไป

2.1.2. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

โดยการนำแบคทีเรียทั้ง 284 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้มาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อก่อโรค 8 ชนิด ดังนี้ *Helicobacter pylori* DMST 20165, *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella* Enteritidis DMST 15676, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus cereus* TISTR 121, *Listeria monocytogenes* DMST 1783 และ *Vibrio cholera* DMST 5655 โดยใช้วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคแบบ spot on lawn การเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคจะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศ ยกเว้น *H. pylori* DMST 20165 และ *V. cholera* DMST 5655 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไร้อากาศ ในขณะที่แบคทีเรียทดสอบจะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

ขั้นตอนในการทดสอบจะเริ่มจากเตรียมอาหารแข็งสูตร MRS ในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นจะทำการดูดเอาแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาหยดบนอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไร้อากาศ เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเป็นโคโลนีขึ้นมา จากนั้นทำการเทเชื้อก่อโรคที่ได้ผสมเชื้อก่อโรคในอัตราส่วน 0.05 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว BHI (0.75 เปอร์เซ็นต์ agar) รอให้อาหารแข็งแล้วจึงนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำ

การบันทึกวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคจะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.1.3. ศึกษาการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี

การทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีนั้น เป็นการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ทดสอบว่าจะมีความสามมารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารหรือไม่ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารนั้นมีทั้งสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี ซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารตายลงได้ โดยการทดสอบการทนต่อกรดนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Pennacchia *et al*. (2004) โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทีมีพีเอช 2.5 ที่ปรับค่าพีเอชด้วย HCl 5 N ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 3 ชั่วโมง แล้วหาจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่ 0 และ 3 ชั่วโมง โดยวิธีเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง MRS agar การศึกษาการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

สำหรับการทดสอบการทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดีนั้น จะทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีการของ Gilliland *et al*. (1984) และ Pennacchia *et al*. (2004) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร เติมในอาหาร MRS broth ที่มีการเติมเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นหาจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่ 0 และ 24 ชั่วโมง โดยวิธีเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง MRS agar การศึกษาการทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.1.4. ศึกษากิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

โดยการนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบความเป็นพิษ การศึกษาการสลายเม็ดเลือดแดงจะทำการทดสอบโดยการนำแบคทีเรียทดสอบมาขีดลงบนอาหาร Columbia blood agar (Sigma) ที่มีการเติมเลือดมนุษย์ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสรอบๆ รอยขีด ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะมีหลายลักษณะ อาทิเช่น แบบ β- hemolysis เป็นบริเวณใสรอบโคโลนี การเกิด α - hemolysis เป็นบริเวณสีเขียวรอบโคโลนี การเกิด γ - hemolysis ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี คือไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การทดสอบการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดงจะทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

2.1.5. การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ โดยวิธี hydrophobicity

โดยศึกษาความสามารถของแบคทีเรียทดสอบในการยึดเกาะกับสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นการจำลองการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ โดยวิธีการศึกษาแบบ hydrophobicity จะดัดแปลงจากวิธีการ

ของ Savage (1992) โดยการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ก้นหลอด ทำการล้างแบคทีเรียด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการเจือจางแบคทีเรียด้วย PBS โดยการนำไปวัดค่าความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าอยู่ระหว่าง 0.800 A – 1.00 A ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เมื่อเจือจางแบคทีเรียเสร็จเรียบร้อยแล้ว จะนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใส่ในหลอดทดลอง 3 มิลลิลิตร จากนั้นจะทำการเติมสารละลายไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดโดยแยกหลอดออกจากกันในปริมาตรหลอดละ 60 ไมโครมิลลิลิตร โดยไฮโดรคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ Xylene, Toluene และ Hexadecane จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเท่าเดิม ทำการบันทึกค่าดูดกลืนแสง การคำนวณค่า hydrophobicity จะทำการคำนวณ ตามสูตรดังนี้

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = [(A_{OD600} - B_{OD600})/ A_{OD600} \times 100]$$

หมายเหตุ A คือ ค่าดูดกลืนแสงก่อนเติมสารไฮโดรคาร์บอน

B คือ ค่าดูดกลืนแสงหลังเติมสารไฮโดรคาร์บอน

2.2. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

2.2.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) ที่มี fetal calf serum 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการ inactivated ที่ 56°C นาน 30 นาที โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ (penicillin - streptomycin) และ non-essential amino acid (Hyclone) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีสัดส่วนของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์เพิ่มจำนวนและอยู่ในสภาวะเติบโตเต็มที่ จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วยวิธีการที่ใช้เอนไซม์ trypsin-EDTA ย่อยเซลล์ให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ ทำการเติมลงในถาดหลุมขนาด 96 หลุม เพื่อทำการทดสอบขั้นตอนต่อไป

2.2.2. การเตรียมสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียโปรไบโอติก

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเอาแบคทีเรียออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยทำการนำเอาอาหารที่มีแบคทีเรียที่เจริญอยู่มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใสที่มีสารเมตาบอไลท์ (supernatant) ของแบคทีเรียออกมา นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัว

กรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ที่มีขนาดรูกรองประมาณ 0.2 ไมโครเมตร นำส่วนใสหรือน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไปเก็บในหลอดเก็บขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.2.3. การทดสอบอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในครั้งนี้จะศึกษาด้วยวิธี MTT assay โดยทำการทดลองตามวิธีของ Thirabunyanon *et al*. (2009) โดยเริ่มต้นจากการเตรียมเซลล์มะเร็งโดยการเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม CM ของแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้จากข้างต้น ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยกลุ่มควบคุมจะใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MRS ที่ผ่านการกรอง filter membrane แล้ว จากนั้นนำเซลล์มะเร็งไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวัดอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยใช้วิธี MTT assay โดยเริ่มจากการล้างเซลล์มะเร็งที่มีการบ่มร่วมกับ CM ของแบคทีเรีย ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO ในปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan ทิ้งไว้นาน 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้กลุ่มควบคุมคือ MRS ให้คิดการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง = (sample O.D /control O.D) x 100

หมายเหตุ sample O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง
control O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

2.3. ศึกษากิจกรรมการต้านต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี disc diffusion โดยการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MRS broth บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเกลี่ยทาเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร MRS agar นำ antibiotic dish วางบนอาหารที่เกลี่ยทาเชื้อที่ต้องการ

ทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบ antibiotic dish กลุ่มของยาปฏิชีวนะที่ใช้ดังเช่น chloramphenicol (30 μg), ampicillin (10 μg), erythromycin (15 μg), tetramycin (30 μg) และ kanamycin (30 μg) เป็นต้น (ตารางที่ 4) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.4. การจัดจำแนกแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

แบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบและมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก จะนำไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการเทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียออก และนำเฉพาะเซลล์แบคทีเรียมาสกัด genomic DNA จากนั้นจะเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ คือ 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) และ 1522R (5′-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3′)

การเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA จะมีส่วนประกอบดังนี้ MasterMix 25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 27F ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์ 4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 1522R ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์ 4 ไมโครลิตร น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 12 ไมโครลิตร และตัวอย่างของ genomic DNA 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ทำการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง PCR (Sprint Thermal Cycler) โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สุดท้าย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บ PCR product ออกจากเครื่อง PCR โดยนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

การศึกษาขนาดของ DNA โดยการนำผล PCR product 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำมาตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟรีซีสผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แล้วนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) แล้วนำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วย UV illumination จากนั้นทำการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด RBC Real Genomics™ DNA/RNA Purification ทำการหาลำดับเบสของยีนในส่วน 16S rRNA โดยบริษัท First Base Laboratories Company ประเทศมาเลเซีย โดยการนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information; NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

2.5. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผลิตกรดไขมันสายสั้น

การวิเคราะห์ปริมาณการผลิตกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid, SCFA) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก การวิเคราะห์โดยการดัดแปลงจากวิธีการของ Hussain *et al*. (2009) โดยมีวิธีการเริ่มจากการ

เลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารเหลวสูตร MRS ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 *g* เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำที่เลี้ยงเซลล์ (supernatant) 10 มิลลิลิตร ของแต่ละตัวอย่างมาเติมด้วยโซเดียมคลอไรด์ 4 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดไดเอททิลอีเทอร์ (diethyl ether) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 *g* เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ 1 มิลลิลิตรของของเหลวในชั้นไดเอททิลอีเทอร์เก็บไว้ในหลอด screw-cap flask เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้นต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่แบคทีเรียโปรไบโอติกผลิตได้ จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph; CG (Agilent 6890 series) detector คือ Mass spectrometer; MS (Agilent 5973 series, Palo Alto, CA, USA) โดยใช้ AT-WAX column ยาว 30 เมตร x กว้าง 0.25 มิลลิเมตร x หนา 0.25 ไมโครเมตร (Alltech associates, Deerfield, IL, USA) ขั้นตอนการวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้นโดยการนำสารที่สกัดมาระเหยที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารไดคลอโรมีเทน (CH_2C_{12}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารสกัดดังกล่าวมา 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยไดคลอโรมีเทน 970 ไมโครลิตร กรดอะซิติก 10 ไมโครลิตร กรดบิวทีริก 10 ไมโครลิตร และกรดโพรพิโอนิก 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารสกัดนี้ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์ GC-MS ด้วย split mode ในอัตรา 20 ต่อ 1 โดยสภาวะในการวิเคราะห์กรดไขมันมีดังนี้ อุณหภูมิ oven เริ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ไว้นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้น 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส โดยมีก๊าซฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราการไหลเป็น 36 เซนติเมตรต่อวินาที และค่า Electron Ionization (EI) ให้พลังงานแก่อิเลคตรอน คือ 70 อิเลคตรอนโวล์ (eV) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างใช้เวลารวมทั้งหมด 27.67 นาที จากนั้นนำผลที่ได้จากการฉีดตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นที่แบคทีเรียโปรไบโอติกผลิตได้

2.6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก

โดยการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตให้มีอรรถประโยชน์ในการป้องกันและหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ ทั้งนี้โดยการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยมีกระบวนการผลิตดังนี้

2.6.1. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมักโยเกิร์ตและการเตรียมแบคทีเรียโปรไบโอติก

การผลิตโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกในครั้งนี้จะผลิตโดยการใช้หัวเชื้อโยเกิร์ต 2 ชนิด คือ *Streptococcus thermophillus* TISTR 458 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 895 (*L. bulgaricus*) ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติกที่เลือกใช้ในการทดลองครั้งนี้ มี 2 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum* PM2-13 และ *Lactobacillus zeae* PM11-5 โดยคัดเลือกมาจากการที่แบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดี

การเตรียมหัวเชื้อโยเกิร์ตและแบคทีเรียโปรไบโอติกจะเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 *g* หลังจากนั้นทำการทำการล้างเซลล์แบคทีเรีย 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และนำไปปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับ McFarland No. 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 3 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 *g* แล้วทำการกระจายเซลล์แบคทีเรียใน skim milk ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.6.2. การเตรียมน้ำนมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต

การผลิตโยเกิร์ตในงานวิจัยโดยการใช้นม UHT ชนิดขาดมันเนยที่มีขายในท้องตลาด โดยนำนมมาวัดของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง hand refractometer จากนั้นทำการเติม skim milk และน้ำตาลทรายขาว 7 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดให้มีค่าเท่ากับ 16 °Brix ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นนำนมที่เตรียมไว้ไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นลงทันทีโดยย้ายนมที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วไปใส่ในอ่างน้ำเย็น

2.6.3. การหมักโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติก

การหมักและผลิตโยเกิร์ตในการวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก *L. plantarum* PM2-13 และกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก *L. zeae* PM11-5 ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยกลุ่มควบคุมจะเติมหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต คือ *S. thermophillus* TISTR 458 และ *L. bulgaricus* TISTR 895 ชนิดละ 4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกจะเติมหัวเชื้อหมักชนิดละ 2 เปอร์เซ็นต์ และเสริมด้วยโปรไบโอติก 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Hemsworth *et al*. (2011)

กระบวนการหมักและผลิตโยเกิร์ตในงานวิจัยครั้งนี้ จะเริ่มจากการนำนมที่ผ่านการปรับค่าความแข็งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว มาอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อหมักหรือเติมด้วยโปรไบโอติกตามสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ที่กำหนดไว้ จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทำการวัดค่า pH ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนกว่าค่า pH ลดลงจนถึงค่า pH 4.6 หลังจากนั้นจะทำการเก็บรักษาโยเกิร์ตไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาคุณสมบัติหรือคุณภาพด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจะทำการศึกษาในช่วงเวลาที่ทำการเก็บรักษาโยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน

2.7. คุณสมบัติของโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติก

คุณสมบัติหรือคุณภาพของโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกในการวิจัยครั้งนี้ มีการวิเคราะห์คุณสมบัติหรือคุณภาพหลายๆ ประการ ทั้งนี้เพื่อเป็นการประเมินว่าในกลุ่มของโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกนั้น จะมีคุณสมบัติหรือคุณภาพแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้เสริมโปรไบโอติกอย่างไรบ้าง หรือยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้บ้างหรือไม่ ซึ่งคุณสมบัติหรือคุณภาพของโยเกิร์ตที่มีการวิเคราะห์มีดังต่อไปนี้

2.7.1. ปริมาณของหัวเชื้อหมักและแบคทีเรียโปรไบโอติกในโยเกิร์ต

โยเกิร์ตที่เสริมและไม่ได้เสริมโปรไบโอติกจะนำมานับปริมาณของหัวเชื้อหมัก นอกจากนั้นในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกก็จะทำการนับแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เสริมลงไปด้วย ซึ่งโดยการตรวจนับแต่ละช่วงเวลาของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต วิธีการตรวจนับโดยการนำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมา 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดยนำมา 100 ไมโครลิตร เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่เหมาะสมสำหรับหัวเชื้อแต่ละชนิดหรือแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยวิธีการ spread plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอาหารจำเพาะของแบคทีเรียและวิธีการตรวจนับแบคทีเรียแต่ละชนิดมีหลักการดังนี้

(1). ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตรวจนับด้วยอาหาร MRS agar

(2). ปริมาณ *L. bulgaricus* TISTR 895 โดยทำการตรวจนับ *S. thermophillus* TISTR 458 และแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เสริมในโยเกิร์ตด้วยอาหาร LP-MRS agar (Vinderola and Reinheimer, 2000) จากนั้นนำค่าแบคทีเรียทั้งหมดลบด้วยแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร LP-MRS agar จะได้ปริมาณเฉพาะ *L. bulgaricus* TISTR 895 เท่านั้น

(3). ปริมาณ *S. thermophillus* TISTR 458 โดยทำการตรวจนับเฉพาะ *S. thermophillus* TISTR 458 ในอาหาร ST-MRS agar (Dave and Shah, 1997)

(4). ปริมาณแบคทีเรียโปรไบโอติก ตรวจนับโดยคำนวณจากค่าแบคทีเรียทั้งหมดลบด้วยแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร LP-MRS agar และแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร ST-MRS agar จะได้ปริมาณเฉพาะแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เสริมในผลิตภัณฑ์เท่านั้น

2.7.2. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

การวัดค่าความเป็นกรดด่างของผลิภัณฑ์โยเกิร์ต ทำการวัดด้วยเครื่อง pH meter ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา คือ วันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน

2.7.3. ปริมาณกรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์ของกรดแลคติก)

การไตเตรทเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของกรดทั้งหมด โดยการนำโยเกิร์ตมาไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 0.1 M โดยใช้ฟีนอล์พธาลีนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์ (AOAC, 2000)

2.7.4. ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยการนำโยเกิร์ตมาชั่งน้ำหนัก และวิเคราะห์ตามวิธีการของ Kjeldahl โดยการนำโยเกิร์ตไปย่อยด้วยเครื่องย่อย แล้วนำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน และนำไปไตเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 N (AOAC, 2007)

2.7.5. ปริมาณของแข็งทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยการนำตัวอย่างโยเกิร์ตมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้ตัวอย่างเย็นลง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AOAC, 2007)

2.7.6. ปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าโดยการนำโยเกิร์ตมาใส่ถ้วยครูซิเบิลและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจะนำตัวอย่างนี้ไปใส่ในโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นลงแล้วก็ทำการชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AOAC, 2007)

2.7.7. ปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีการใช้กรวยแยกไขมัน แล้วนำไขมันไปใส่ถ้วยครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้ตัวอย่างเย็นลง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AOAC, 2007)

2.7.8. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

เป็นกระบวนการทดสอบการยอมรับในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้จากการเสริมโปรไบโอติก โดยใช้วิธีการ 9-point hedonic scale ซึ่งผู้ทำการวิจัยทำการสุ่มติดฉลากรหัสของโยเกิร์ตก่อนการให้ผู้ชิมได้ทดลองชิม คุณลักษณะที่สำคัญของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ให้ผู้ชิมทำการประเมินก็คือ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยกำหนดให้คะแนนตั้งแต่ 1-9 คะแนน จากระดับ 1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด จนถึงระดับ 9 คือ ชอบมากที่สุด

2.8. การศึกษาประสิทธิภาพของโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ประสิทธิภาพหรือผลของโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ จะมีวิธีการทดสอบเป็นลำดับดังนี้

2.8.1. การเตรียมส่วนใส (supernatant) จากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

วิธีการเตรียมโดยการนำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 13,000 *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนใสมากรองต่อด้วย syringe filter membrane ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร และ 0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ และนำส่วนใสที่ได้มาทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Fiander *et al*., 2005)

2.8.2. การทดสอบอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

การศึกษาผลของโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยทำการศึกษาด้วยวิธี MTT ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการศึกษาของ Thirabunyanon *et al*. (2009) โดยเริ่มต้นศึกษาจากการเตรียมเซลล์มะเร็งโดยการเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมส่วนใสของโยเกิร์ตที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยกลุ่มควบคุมจะเป็นส่วนใสของโยเกิร์ตที่ไม่ได้เสริมโปรไบโอติก จากนั้นนำเซลล์มะเร็งลำไส้ไปบ่มต่อในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การล้างเซลล์มะเร็งที่มีการบ่มร่วมกับส่วนใสของโยเกิร์ต จะล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO ในปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นก็เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan ทิ้งไว้นาน 5 นาที และทำการวัดค่าโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมให้มีค่าการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง = (sample O.D /control O.D) x 100

หมายเหตุ sample O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

control O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

2.9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้จากการวิจัยในงานวิจัยครั้งนี้ จะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17.0) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้

รูปแบบการคัดเลือกและศึกษาจะเป็นแบบมีขั้นตอน กล่าวคือจะเริ่มจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีจำนวนมาก และทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ดีที่สุดเพื่อศึกษาตามลำดับขั้นจนถึงขั้นตอนสุดท้ายก็คือ ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ จากนั้นทำการศึกษาหากลไกในการทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งขั้นตอนการศึกษามีเป็นขั้นตอนดังนี้

1.1. แบคทีเรียและลักษณะรูปร่างสัณฐานของแบคทีเรีย

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากการหมักน้ำนมดิบ 31 ตัวอย่าง แล้วทำการเก็บรวมรวมแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีลักษณะของโคโลนีที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้สามารถเก็บรวมรวบแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมดจำนวน 284 ไอโซเลต และเมื่อทำการย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่างสัณฐานของแบคทีเรียกรดแลคติกแล้ว พบว่าแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดเป็นแกรมบวกมีลักษณะรูปร่างเป็นแบบท่อนหรือกลม ซึ่งจะนำแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากขั้นตอนนี้ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.2. ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

ผลจากการนำแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้จำนวน 284 ไอโซเลต มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่สำคัญ 8 สายพันธุ์ คือ *Helicobacter pyroli, Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio cholera* ผลที่ได้พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี ซึ่งได้แก่ไอโซเลต FM16, FM18, FM20, FM21, PM1-6, PM1-11, PM1-15, PM1-23, PM2-1, PM2-9, PM2-10, PM2-13, PM2-14, PM5, PM6-10, PM11-5 และ PM15-6 (ตารางที่ 1)

1.3. ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการทนในสภาวะกรดและเกลือน้ำดี

ความสามารถการทนอยู่ได้ในสภาวะระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าทั้ง 17 ไอโซเลต มีความสามารถทนอยู่ได้ในแบบจำลองในกระเพาะอาหารได้ดี กล่าวคือมีความสามารถในการทนต่อกรดที่พีเอช 2.5 ได้ดี ทั้งนี้โดยพบว่าแบคทีเรียหลายไอโซเลตสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าก่อนที่ทำการทดสอบกับพีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งไอโซเลตเหล่านี้ได้แก่ FM16, PM1-6, PM1-15, PM2-9, PM2-13 และ PM6-10 โดยที่ไอโซเลต PM2-13 มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 107.7 เปอร์เซ็นต์ โดยมี

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากนมหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์ (Mean ± SD, n = 3)

แบคทีเรียกรดแลคติก	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	Helicobacter pylori	*Escherichia coli*	*Salmonella* Typhimurium	*Salmonella* Enteritidis
FM16	19 ± 1	12 ± 2	17 ± 1	11 ± 1
FM18	19 ± 1	13 ± 1	12 ± 0	13 ± 1
FM20	19 ± 2	13 ± 1	12 ± 1	13 ± 1
FM21	19 ± 2	11 ± 1	21 ± 2	15 ± 2
PM1-6	21 ± 2	14 ± 1	23 ± 2	15 ± 2
PM1-11	23 ± 1	15 ± 1	13 ± 4	11 ± 2
PM1-15	20 ± 3	14 ± 0	16 ± 3	18 ± 2
PM1-23	21 ± 1	16 ± 2	15 ± 3	16 ± 2
PM2-1	31 ± 1	15 ± 2	16 ± 4	15 ± 4
PM2-9	25 ± 3	18 ± 1	14 ± 1	16 ± 1
PM2-10	18 ± 2	17 ± 3	19 ± 3	18 ± 5
PM2-13	21 ± 2	13 ± 1	15 ± 3	11 ± 3
PM2-14	23 ± 1	21 ± 2	9 ± 3	13 ± 2
PM5	20 ± 3	14 ± 1	18 ± 0	15 ± 1
PM6-10	21 ± 1	12 ± 2	18 ± 0	14 ± 1
PM11-5	17 ± 2	13 ± 3	16 ± 1	16 ± 2
PM15-6	21 ± 1	15 ± 1	16 ± 1	13 ± 1

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากนมหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์ (Mean ± SD, n = 3) (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติก	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	Staphylococcus aureus	*Bacillus cereus*	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio cholerae*
FM16	19 ± 1	9 ± 1	13 ± 1	11 ± 1
FM18	19 ± 1	14 ± 0	12 ± 0	15 ± 1
FM20	16 ± 1	11 ± 1	12 ± 0	13 ± 2
FM21	17 ± 5	11 ± 2	11 ± 1	11 ± 1
PM1-6	18 ± 1	15 ± 1	19 ± 1	20 ± 2
PM1-11	11 ± 3	18 ± 1	16 ± 3	13 ± 2
PM1-15	19 ± 1	15 ± 2	16 ± 2	17 ± 2
PM1-23	15 ± 6	12 ± 2	16 ± 3	21 ± 3
PM2-1	18 ± 5	15 ± 1	14 ± 1	15 ± 3
PM2-9	14 ± 1	12 ± 1	14 ± 2	18 ± 2
PM2-10	20 ± 1	17 ± 1	14 ± 0	16 ± 2
PM2-13	19 ± 1	17 ± 1	15 ± 5	17 ± 1
PM2-14	14 ± 1	14 ± 1	13 ± 2	14 ± 2
PM5	17 ± 1	13 ± 1	15 ± 1	15 ± 2
PM6-10	21 ± 2	13 ± 1	14 ± 0	15 ± 2
PM11-5	22 ± 4	11 ± 1	12 ± 1	11 ± 1
PM15-6	21 ± 2	12 ± 2	13 ± 1	11 ± 1

จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจากก่อนทดสอบที่ 7.11 (log) โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นปีน 7.65 (log) โคโลนีต่อมิลลิลิตร ความสามารถทนอยู่ได้ในแบบจำลองที่บริเวณลำไส้เล็ก คือทดสอบต่อการทนในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้จากการนำแบคทีเรียทั้ง 17 ไอโซเลต มาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่ามีเพียงไอโซเลต PM11-5 เท่านั้นที่มีอัตราการรอดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าก่อนการทดสอบ คือเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 6.65 (log) โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นปีน 6.98 (log) โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือมีอัตรารอดชีวิตเป็น 105 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลตอื่นๆ มีอัตราการลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนและหลังทดสอบกับเกลือน้ำดี และโดยรวมพบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนเพียง 11 ไอโซเลต ที่ทนในสภาวะเกลือน้ำดีได้ดี โดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต ดังกล่าวได้แก่ ไอโซเลต FM16, FM18, FM20, FM21, PM1-6, PM1-11, PM1-15, PM1-23, PM2-9, PM2-13 และ PM11-5

1.4. ความเป็นพิษของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

การทดสอบความเป็นอันตรายของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ โดยทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ซึ่งหากมีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ก็แสดงว่าแบคทีเรียไอโซเลตนั้นสามารถเป็นอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์เราได้ ผลจากการนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารได้ดีมาทดสอบ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต คือไอโซเลต FM16, FM18, FM20, FM21, PM1-6, PM1-11, PM1-15, PM1-23, PM2-9, PM2-13 และ PM11-5 ให้ผลทดสอบแบบแกมมา (γ - hemolysis) คือไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีหรือไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

1.5. การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ โดยวิธี hydrophobicity

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ โดยวิธี hydrophobicity ซึ่งทำการทดสอบกับสารไฮโดรคาร์บอน 3 ชนิด คือ Hexadecane, Toluene และ Xylene ผลที่ได้พบว่าจากแบคทีเรียที่ทดสอบ 11 ไอโซเลตนั้น มีเพียงแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต คือ FM20, PM1-6, PM1-11, PM1-15, PM1-23, PM2-9, PM2-13 และ PM11-5 ที่มีประสิทธิภาพเกิด hydrophobic กับไฮโดรคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งจะมีค่า hydrophobic แตกต่างกันออกไป แต่ทั้งนี้จะมีเพียง 3 ไอโซเลต คือ PM1-15, PM1-23 และ PM11-5 ที่ให้ค่า hydrophobicity กับไฮโดรคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด มากกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

1.6. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต FM20, PM1-6, PM1-11, PM1-15, PM1-23, PM2-9, PM2-13 และ PM11-5 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ผลการทดลองที่ได้พบว่ามีเพียง 4 ไอโซเลตเท่านั้น คือไอโซเลต FM20, PM1-23, PM2-13 และ PM11-5 ที่มี

ความสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต PM2-13 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้สูงที่สุด คือ 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลต FM20, PM1-23 และ PM11-5 ก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้อยู่ในช่วง 11-13 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเกิด hydrophobicity กับสารไฮโดรคาร์บอน (Mean ± SD, n = 3)

แบคทีเรียกรดแลคติก	Hydrophobicity (%)		
	Hexadecane	Toluene	Xylene
FM20	4.4 ± 1.2	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.5
PM1-6	21.3 ± 0.3	24.1 ± 1.4	20.9 ± 2.3
PM1-11	6.9 ± 1.0	3.4 ± 3.4	5.0 ± 2.4
PM1-15	57.4 ± 0.4	46.6 ± 2.1	49.4 ± 5.7
PM1-23	61.6 ± 3.0	65.5 ± 3.8	53.5 ± 4.9
PM2-9	46.7 ± 2.8	42.9 ± 2.6	35.6 ± 2.4
PM2-13	33.3 ± 7.5	22.9 ± 2.5	13.8 ± 2.7
PM11-5	45.4 ± 1.2	64.8 ± 5.8	56.1 ± 6.6

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Mean ± SD, n = 5)

แบคทีเรียกรดแลคติก	Antiproliferation (%)
FM20	11 ± 2
PM1-23	13 ± 1
PM2-13	25 ± 4
PM11-5	11 ± 4

1.7. ประสิทธิภาพการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต คือไอโซเลต FM20, PM1-23, PM2-13 และ PM11-5 ผลการทดสอบที่ได้พบว่าทุกไอโซเลตสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (resistant) ชนิด Kanamycin, Nalidixic acid, Penicillin และ Streptomycin นอกจากนั้นยังพบว่าทุกไอโซเลตยังไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) ต่อยา Chloramphenicol ในขณะที่แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานหรือมีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin, Bacitracin, Cephalothin, Erythromycin, Gentamycin, Penicillin, Tetracycline และ Vancomycin แตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (μg)	ไอโซเลต			
		FM20	PM1-23	PM2-13	PM11-5
Broad spectrum					
Chloramphenicol	30	S	S	S	S
Tetracycline	30	S	R	S	S
Gram-positive spectrum					
Bacitracin	10	R	S	S	S
Erythromycin	15	S	MS	S	S
Vancomycin	30	S	R	R	R
Gram-negative spectrum					
Nalidixic acid	30	R	R	R	R
Aminoglycoside					
Gentamycin	10	R	S	S	S
Kanamycin	30	R	R	R	R
Streptomycin	10	R	R	R	R
β—Lactams					
Ampicillin	10	S	R	S	S
Cephalothin	30	R	R	R	S
Penicillin	10	R	R	R	R

หมายเหตุ : R (ต้านทานยาปฏิชีวนะ), S (ไวต่อยาปฏิชีวนะ) และ MS (ไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง)

1.8. การจัดจำแนกแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

ผลจากการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ 4 ไอโซเลต คือไอโซเลต FM20, PM1-23, PM2-13 และ PM11-5 ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดี ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียเหล่านี้มาจำแนกชนิดโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูลใน GenBank

ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียพบว่าไอโซเลต FM20 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* 100 เปอร์เซ็นต์ (accession no : HQ293030.1) ไอโซเลต PM1-23 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* 99.9 เปอร์เซ็นต์ (accession no : GU372710.1) ไอโซเลต PM2-13 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* 100 เปอร์เซ็นต์ (accession no : JN573606.1) และไอโซเลต PM11-5 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus zeae* 99.6 เปอร์เซ็นต์ (accession no: AB362765.1)

การจัดเรียกชื่อใหม่ของแบคทีเรียที่จัดจำแนกชนิดได้ โดยมีการจัดเรียกชื่อใหม่ดังนี้ ไอโซเลต FM20 มีการจัดเรียกชื่อใหม่ว่า *Enterococcus faecium* FM20 ไอโซเลต PM1-23 มีการจัดเรียกชื่อใหม่ว่า *Lactobacillus plantarum* PM1-23 ไอโซเลต PM2-13 มีการจัดเรียกชื่อใหม่ว่า *Lactobacillus plantarum* PM2-13 และไอโซเลต PM11-5 มีการจัดเรียกชื่อใหม่ว่า *Lactobacillus zeae* PM11-5

1.9. แบคทีเรียโปรไบโอติกสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

การพิจารณาคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกสำหรับการนำไปหมัก หรือเสริมในกระบวนการหมักนมหมัก (โยเกิร์ต) เนื่องจากการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ มีแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ดี 4 ชนิด คือ *E. faecium* FM20, *L. plantarum* PM1-23, *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ซึ่งคณะผู้วิจัยจะนำเอาแบคทีเรียโปรไบโอติกเพียง 2 ชนิด ไปศึกษาการหมักหรือหมักเสริมในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเท่านั้น โดยคณะผู้วิจัยจะคัดเลือกโดยพิจารณาจาก 2 ปัจจัยดังนี้ คือ อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่นิยมหมักในโยเกิร์ต

ผลจากการพิจารณาตามปัจจัยดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิด *L. plantarum* PM2-13 ด้วยสาเหตุที่มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากที่สุด คือ 25 เปอร์เซ็นต์ และชนิด *L. zeae* PM11-5 ด้วยเหตุผลมาจากการที่มีการใช้แบคทีเรียชนิดนี้มาทำการหมักและหรือหมักเสริมในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

1.10. ความสามารถของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผลิตกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid)

การผลิตกรดไขมันสายสั้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการผลิตกรดไขมันสายสั้นทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ acetic, propionic และ butyric โดยที่ *L. plantarum* PM2-13 ผลิตกรดไขมันสายพันธุ์อยู่ในช่วง 1.5 – 2.8 ppm ในขณะที่ *L. zeae* PM11-5 มีอัตราการผลิตกรดไขมันสายสั้นน้อยกว่า *L. plantarum* PM2-13 เล็กน้อย โดยผลิตอยู่ในช่วง 1.3-1.9 ppm (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการผลิตกรดไขมันสายสั้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก (Mean ± SD, n = 3)

แบคทีเรียโปรไบโอติก	Short chain fatty acids (ppm)		
	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
Lactobacillus plantarum PM2-13	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1
Lactobacillus zeae PM11-5	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.6	1.3 ± 0.3

2. การผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก และการศึกษาประสิทธิภาพของโยเกิร์ตในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

การนำแบคทีเรียโปรไบโอติกมาประยุกต์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกมาหมักหรือหมักเสริมในการผลิตโยเกิร์ต จากนั้นทำการศึกษาคุณภาพหรือคุณสมบัติของแบคทีเรียโยเกิร์ตเพื่อให้มีความเหมาะสมสำหรับผู้บริโภค ในขั้นตอนสุดท้ายมีการศึกษาประสิทธิภาพของโยเกิร์ตต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ซึ่งผลของการหมักหรือการหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีดังต่อไปนี้

2.1. ระยะเวลาในการหมักผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

ผลจากการนำแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 ชนิด คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 มาทำการหมักหรือหมักเสริมในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต และทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำการหมักด้วยหัวเชื้อหมักเท่านั้น คือหัวเชื้อหมักชนิด *S. thermophillus* TISTR 458 และ *L. bulgaricus* TISTR 895 ระยะเวลาที่ทำการหมักทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มโปรไบโอติกนั้น ใช้เวลาในการหมักไม่แตกต่างกัน คือใช้เวลาในการหมัก 8 ชั่วโมง และ 40 นาที โดยที่ pH ของโยเกิร์ตค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระยะเวลาในการหมักและการลดลงของค่า pH ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตที่มีการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง : นาที)	pH		
	Control	*L. plantarum* PM2-13	*L. zeae* PM11-5
0	6.50	6.50	6.50
2	6.34	6.42	6.34
4	6.04	6.11	5.98
6	5.45	5.47	5.35
8	4.81	4.75	4.62
8 : 40	4.60	4.56	4.53

2.2. ปริมาณของหัวเชื้อหมักและแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

ปริมาณของหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตในช่วงเวลาการเก็บรักษาโยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน ในกลุ่มควบคุม พบว่าปริมาณของ *S. thermophilus* TISTR 458 มีปริมาณลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 3-4 คือเริ่มต้นที่ 6.93×10^8 CFU/ml และมีจำนวนลดลงเหลือ 6.08×10^7 และ 2.33×10^7 CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 จะมีจำนวน *S. thermophilus* TISTR 458 ลดลงเล็กน้อย อาทิ เริ่มต้นที่ 6.62×10^8 และ 6.10×10^8 CFU/ml ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 เหลือจำนวน 2.33×10^8 และ 1.38×10^8 CFU/ml ของกลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิด *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จำนวนของ *L. bulgaricus* TISTR 895 ในช่วงเวลาการเก็บรักษาโยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วย *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 มีปริมาณของ *L. bulgaricus* TISTR 895 ลดลงค่อนข้างมากใกล้เคียงกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 โดยที่ในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวน *L. bulgaricus* TISTR 895 เหลืออยู่ปริมาณ 2.41×10^7, 5.55×10^7 และ 2.97×10^7 CFU/ml ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิด *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ปริมาณของ *S. thermophilus* TISTR 458 (CFU/ml) ในช่วงระยะเวลา 28 วัน ของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	*S. thermophilus* TISTR 458 (CFU/ml)				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
Control	6.93×10^8	6.34×10^8	$1.23\ 10^9$	6.08×10^7	2.33×10^7
L. plantarum PM2-13	6.62×10^8	7.27×10^8	6.50×10^8	1.67×10^8	2.33×10^8
L. zeae PM11-5	6.10×10^8	8.80×10^8	5.13×10^8	2.22×10^8	1.38×10^8

ตารางที่ 8 ปริมาณของ *L. bulgaricus* TISTR 895 (CFU/ml) ในช่วงระยะเวลา 28 วัน ของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	*L. bulgaricus* TISTR 895 (CFU/ml)				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
Control	1.94×10^9	4.04×10^9	3.33×10^7	1.19×10^7	2.41×10^7
L. plantarum PM2-13	4.71×10^9	2.00×10^7	2.30×10^8	3.68×10^8	5.55×10^7
L. zeae PM11-5	1.73×10^8	6.03×10^8	2.50×10^8	6.53×10^8	2.97×10^7

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วย *L. plantarum* PM2-13 แล้วทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตดังกล่าวเป็นเวลา 28 วัน ผลจากการตรวจนับแบคทีเรียโปรไบโอติกดังกล่าวในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพบว่าจำนวนของ *L. plantarum* PM2-13 ยังคงมีเหลือปริมาณจำนวนมากตลอดอายุการเก็บรักษา ซึ่งปริมาณจำนวนดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติก ที่สามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคได้ดี โดยปริมาณของ *L. plantarum* PM2-13 ที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 คือจำนวน 5.35×10^8 และ 4.06×10^8 CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

กลุ่มผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วย *L. zeae* PM11-5 และทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตดังกล่าวเป็นเวลา 28 วัน โดยจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตดังกล่าวมีปริมาณในวันที่ 1 เป็นจำนวน 1.82×10^9 CFU/ml ในขณะที่สัปดาห์ที่ 2-4 ปริมาณของแบคทีเรียโปรไบโอติกลดลงเล็กน้อย ซึ่งปริมาณจำนวนที่เหลือจำนวนมากตลอดอายุการเก็บรักษาดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคได้ดี โดยปริมาณของ *L. zeae* PM11-5 ที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 คือจำนวน 1.44×10^8 และ 1.54×10^8 CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ปริมาณของแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติก (CFU/ml) ในช่วงระยะเวลา 28 วัน ของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	แบคทีเรียโปรไบโอติก (CFU/ml)				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
Control	-	-	-	-	-
L. plantarum PM2-13	3.60×10^9	9.42×10^8	8.60×10^8	5.35×10^8	4.06×10^8
L. zeae PM11-5	1.82×10^9	4.10×10^8	8.93×10^8	1.44×10^8	1.54×10^8

2.3. การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในทุกกลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ต่างก็มีค่าการเปลี่ยนแปลงของ pH น้อยมาก อาทิ ในกลุ่มควบคุม วันที่ 1 จะมีค่า pH เท่ากับ 4.25 แต่เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน ค่า pH ก็เพิ่มขึ้นเล็กน้อยมีค่าเท่ากับ pH 4.4 (ตารางที่ 10)

กลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ก็มีค่าการเปลี่ยนแปลง pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเช่นเดียวกันกับกลุ่มควบคุม เช่น ในวันที่ 1 ค่า pH เท่ากับ 4.41 และ 4.44 แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น pH 4.47 และ 4.48 ในกลุ่ม *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงค่าของ pH ในกระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	pH				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
Control	4.25	4.26	4.32	4.46	4.40
L. plantarum PM2-13	4.41	4.2	4.31	4.38	4.47
L. zeae PM11-5	4.44	4.26	4.32	4.46	4.48

2.4. ปริมาณกรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์) ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาการ

ความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักด้วยหัวเชื้อหมัก คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ต่างก็มีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 ของช่วงเวลาที่ทำการเก็บรักษา

กลุ่มควบคุม กลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 มีค่าความเป็นกรดในสัปดาห์แรกเท่ากับ 0.96, 0.90 และ 0.87 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 1.17, 1.05 และ 1.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

2.5. คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยการวิเคราะห์โภชนะของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ เช่น โปรตีน ของแข็ง เถ้า และไขมัน ทั้งในวันที่ 1 (ตารางที่ 12) และวันที่ 28 (ตารางที่ 13) ของโยเกิร์ต พบว่าคุณค่าทางโภชนาการ คือ โปรตีน ของแข็ง เถ้า และไขมัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

คุณค่าทางโภชนาการในวันที่ 1 โดยพบว่าโปรตีนมีค่าอยู่ในช่วง 3.26 – 3.39 เปอร์เซ็นต์ ของแข็งอยู่ในช่วง 17.76 – 19.01 เปอร์เซ็นต์ เถ้าอยู่ในช่วง 0.82-0.85 เปอร์เซ็นต์ และไขมันอยู่ในช่วง 1.57 – 1.81 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

คุณค่าทางโภชนาการในวันที่ 28 โดยพบว่าโปรตีนมีค่าอยู่ในช่วง 3.29 – 3.56 เปอร์เซ็นต์ ของแข็งอยู่ในช่วง 18.57 – 19.23 เปอร์เซ็นต์ เถ้าอยู่ในช่วง 0.71-0.81 เปอร์เซ็นต์ และไขมันอยู่ในช่วง 1.82 – 1.85 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 11 ค่าความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในช่วงกระบวนการเก็บรักษา

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	ค่าความเป็นกรด (เปอร์เซ็นต์)				
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
Control	0.96	1.02	1.08	1.17	1.17
L. plantarum PM2-13	0.9	0.99	0.96	1.02	1.05
L. zeae PM11-5	0.87	0.96	1.05	1.02	1.11

ตารางที่ 12 คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (วันที่ 1) ที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Mean ± SD, n = 3)

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	คุณค่าทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)			
	โปรตีน	ของแข็ง	เถ้า	ไขมัน
Control	3.39 ± 0.03^{a}	19.01 ± 0.19^{a}	0.82 ± 0.02^{a}	1.75 ± 0.36^{a}
L. plantarum PM2-13	3.51 ± 0.53^{a}	17.76 ± 0.92^{a}	0.84 ± 0.05^{a}	1.57 ± 0.02^{a}
L. zeae PM11-5	3.35 ± 0.22^{a}	18.74 ± 0.09^{a}	0.85 ± 0.06^{a}	1.81 ± 0.22^{a}

ตารางที่ 13 คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (วันที่ 28) ที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Mean ± SD, n = 3)

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	คุณค่าทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)			
	โปรตีน	ของแข็ง	เถ้า	ไขมัน
Control	3.69 ± 0.18^{a}	19.23 ± 0.08^{a}	0.81 ± 0.02^{a}	1.85 ± 0.11^{a}
L. plantarum PM2-13	3.30 ± 0.12^{a}	18.57 ± 0.10^{a}	0.71 ± 0.13^{a}	1.88 ± 0.15^{a}
L. zeae PM11-5	3.56 ± 0.14^{a}	18.74 ± 0.31^{a}	0.08 ± 0.01^{a}	1.82 ± 0.05^{a}

2.6. การยอมรับและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

การยอมรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตไปให้ผู้บริโภคจำนวน 71 คน ได้ชิมและให้คะแนนตามคุณลักษณะต่างๆ ที่เป็นข้อบ่งชี้คุณภาพของโยเกิร์ต และทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่หมักโดยหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสตามคุณลักษณะของโยเกิร์ตที่ประกอบด้วย ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ผลที่ได้พบว่าโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกมีคะแนนความชอบตามคุณลักษณะที่ดีของโยเกิร์ตไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 14)

คะแนนการยอมรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกจากผู้บริโภค โดยพบว่าได้คะแนนในทุกคุณลักษณะที่ดีของโยเกิร์ตมากกว่า 6 คะแนน จากคะแนนเต็ม 9 คะแนน หรืออยู่ในระดับคะแนนค่อนข้างชอบ โดยเฉพาะคะแนนความชอบโดยรวมในกลุ่มที่หมัก หรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดทั้ง *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ก็ได้คะแนนจากผู้บริโภคเป็นคะแนน 6.76 และ 6.72 คะแนนตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Mean ± SD, n = 71)

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต					
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
Control	6.55 ± 1.31[a]	6.79 ± 1.25[a]	6.49 ± 1.26[a]	6.73 ± 1.58[a]	6.10 ± 1.4[a]	6.72 ± 1.29[a]
L. plantarum PM2-1	6.54 ± 1.32[a]	6.73 ± 1.29[a]	6.62 ± 1.41[a]	6.38 ± 1.67[a]	6.24 ± 1.45[a]	6.76 ± 1.29[a]
L. zeae PM11-5	6.54 ± 1.46[a]	6.82 ± 1.31[a]	6.51 ± 1.53[a]	6.59 ± 1.91[a]	6.31 ± 1.51[a]	6.72 ± 1.44[a]

2.7. ประสิทธิภาพของโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยโยเกิร์ตที่เสริม และไม่ได้เสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกในครั้งนี้ ผลการทดลองที่ได้พบว่าในโยเกิร์ตที่เสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่เสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* PM2-13 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่ากลุ่มควบคุม 1.17 เท่า ในขณะที่กลุ่มที่เสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. zeae* PM11-5 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่ากลุ่มควบคุม 1.47 เท่า

วิจารณ์ผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้นั้น ปัจจุบันกำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง (Thirabunyanon and Hongwittayakorn, 2013) ทั้งนี้เนื่องจากสามารถพัฒนารูปแบบและประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในการป้องกันและรักษาโรคได้หลากหลายรูปแบบ เช่น แบบเม็ดยา แบบผสมน้ำ หรือแบบอาหารฟังก์ชัน (functional food) ในอาหารหลายๆ ชนิด เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และเนย เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีหลายๆ ปัจจัยที่จะทำให้การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในการป้องกัน และหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้เป็นผลสำเร็จที่ดี ดังเช่น สายพันธุ์เฉพาะของแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับอาหารฟังก์ชัน คุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการต้านโรคมะเร็งลำไส้ และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพหรือคุณสมบัติของอาหารฟังก์ชันเมื่อมีการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายหลักในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันในกลุ่ม โยเกิร์ต ทั้งนี้เพื่อให้โยเกิร์ตที่ผลิตได้นี้มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ ซึ่งในปัจจุบันสาเหตุการตายเป็นลำดับหนึ่งก็มีสาเหตุมาจากโรคมะเร็ง และชนิดของมะเร็งที่พบมากและเป็นสาเหตุลำดับต้นๆ ที่ทำให้เสียชีวิตทั้งในผู้ชายและผู้หญิงก็คือโรคมะเร็งลำไส้ (ภัทรวินท์และรังสิยา, 2554) โรคมะเร็งลำไส้มีสาเหตุเกิดจากพฤติกรรมการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกหลักโภชนาการ อาทิ การรับประทานอาหารประเภทไขมันสูง และหรือมีการรับประทานอาหารที่มีกากใยน้อย เป็นต้น (Commane *et al*., 2005) การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การผ่าตัด การฉายรังสี และการใช้ยารักษาหรือเคมีบำบัด เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายที่สูง และไม่สามารถฆ่าหรือทำลายเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมด ดังนั้นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ก็คือ การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปแบบต่างๆ เช่น อาหารฟังก์ชันในกลุ่มโยเกิร์ต เป็นต้น

การศึกษาประสิทธิภาพของโยเกิร์ตต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ โดยเริ่มจากการเก็บรวมรวบแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบหมัก 31 ตัวอย่าง ซึ่งรวบรวมแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 284 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวจะถูกนำไปคัดเลือกคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก และนำไปหมักและหรือหมักเสริมผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของโยเกิร์ตในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในขั้นตอนสุดท้าย ผลจากการนำแบคทีเรียกรดแลคติก 284 ไอโซเลต ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 17 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ได้ดี ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อก่อโรคดังกล่าวนี้จะมีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์หลายๆ ชนิดที่เป็นอันตราย ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ β-glucuronidase, nitroreductase, azoreductase, 7-α-dehydroxylase และ cholesterol dehydrogenase เป็นต้น ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้เป็นสาเหตุทำก่อให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ได้ นอกจากนั้นเชื้อก่อโรค *E. coli* และ *H. pylori* ก็เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิด

โรคมะเร็งลำไส้ได้เช่นเดียวกัน (Shmuely *et al*., 2001; Travaglione *et al*., 2008) ดังนั้นการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคจากแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติกเหล่านี้นั้น อาจจะมีส่วนในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ในระยะเริ่มต้นได้

คุณสมบัติที่ดีของแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้น จะต้องทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ จากการทดสอบการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารพบว่ามีเพียงแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ไอโซเลต ที่มีความสามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารที่มีทั้งปัจจัยทั้งจากการเป็นกรดและจากสภาวะที่มีเกลือน้ำดี โดยปกติแล้วการที่แบคทีเรียโปรไบโอติกจะออกฤทธิ์ได้นั้นจะต้องอยู่รอดในสภาวะระบบทางเดินอาหารก่อน จากนั้นแบคทีเรียโปรไบโอติกก็สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและทำหน้าที่ตามกลไกต่างๆ ต่อไปได้ ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรียโปรไบโอติกหลายๆ ชนิดที่สามารถทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร อาทิ *L. fermentum* ACA-DC 179 (Zoumpopoulou *et al*., 2008), *L. rhamnosus* IMC 501, *L. paracasei* 502 (Verdenelli *et al*., 2009) และ *L. plantarum* CS23 (Gaudana *et al*., 2010)

ความปลอดภัยของแบคทีเรียโปรไบโอติกก็เป็นข้อสำคัญอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องทำการพิจารณา ผลการทดลองที่ได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดได้ ซึ่งผลดังกล่าวแสดงแบคทีเรียดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่ไม่เป็นพิษ (Maragkoudakis *et al*., 2009) ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำไปคัดเลือกเพื่อเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกในขั้นตอนต่อไป

กลไกหนึ่งที่สำคัญของแบคทีเรียโปรไบโอติกก็คือ การยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญเพราะการยึดเกาะของแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้น จะทำให้เชื้อก่อโรคไม่มีพื้นที่ในการยึดเกาะ ดังนั้นเชื้อก่อโรคก็จะถูกขับออกนอกร่างกายผ่านระบบทางเดินอาหารจึงไม่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนั้นเมื่อแบคทีเรียโปรไบโอติกยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้แล้วก็สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ และแบคทีเรียโปรไบโอติกดังกล่าวก็จะแสดงบทบาทหน้าที่ของตัวเองได้อย่างเต็มที่ จากการทดลองครั้งนี้มีแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต ที่สามารถยึดเกาะกับไฮโดรคาร์บอนได้ดี ซึ่งการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยที่ได้ใช้วิธีการดังกล่าวในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติก (Savage, 1992; Vinderola and Reinheimer, 2003)

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยการทดสอบแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 8 ไอโซเลต ผลที่ได้พบว่ามีเพียงแบคทีเรียโปรไบโอติกเพียง 4 สายพันธุ์ คือ *E. faecium* FM20, *L. plantarum* PM1-23, *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดี ผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ewaschuk *et al*. (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลคติก VSL3 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *E. faecium* RM11 และ *L. fermentum* RM28 ซึ่งคัดเลือกมาจากนมหมักก็สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีเช่นเดียวกัน (Thirabunyanon *et al*., 2009)

แบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวไปศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ และนำไปหมักหรือหมักเสริมในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตต่อไป กลไกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นชนิด acetic, butyric และ propionic ทั้งนี้มีรายงานถึงกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตจากแบคทีเรียก็เป็นกลไกหนึ่งที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Jan *et al*., 2002) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thirabunyanon and Hongwittayakorn (2013) ที่พบว่ากรดไขมันสายสั้นที่ผลิตจากแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* FP3, *L. salivarius* FP25 และ *L. salivarius* FP35 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยที่อัตราการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้จะมีอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกันกับปริมาณของกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตจากแบคทีเรียโปรไบโอติกในระดับที่สูงด้วย

การเพิ่มอรรถประโยชน์ของอาหารให้มีคุณสมบัติที่ดีหรืออาหารฟังก์ชันนั้น เป็นแนวคิดหนึ่งที่ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถผลิตโยเกิร์ตเสริมโปรไบโอติกที่มีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้เวลาในการหมักโยเกิร์ตไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกเลย นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้ก็มีแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในจำนวนที่สามารถป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ กล่าวคือโยเกิร์ตที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดทั้ง *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 แล้วทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน และเมื่อนำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกแล้วก็พบว่ามีจำนวนไม่น้อยกว่า 10^8 CFU/ml ซึ่งเป็นจำนวนที่แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถออกฤทธิ์ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคได้ดี (Williams, 2010, Thirabunyanon, 2011)

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เช่น การเปลี่ยนระดับ pH และปริมาณกรดทั้งหมดของโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้น เป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงคุณภาพหรือคุณสมบัติของโยเกิร์ตที่ผลิตได้ กล่าวคือโยเกิร์ตหรือนมเปรี้ยวที่ดีจะต้องมีรสออกค่อนข้างเปรี้ยว ซึ่งการทดลองครั้งนี้สามารถวัดปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดในช่วงกระบวนการเก็บรักษาโยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน โดยได้ค่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลอง คืออยู่ในช่วง 1.05 – 1.17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกรดแลคติกดังกล่าวนี้เกิดจากการสร้างและหลั่งกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้หมักโยเกิร์ตในครั้งนี้ นอกจากนั้นปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทุกๆ สัปดาห์ ทั้งนี้ก็มีสาเหตุมาจากการสะสมกรดแลคติกที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่สามารถรอดชีวิตได้ตลอดอายุการเก็บรักษา และแบคทีเรียดังกล่าวก็สามารถสร้างและหลั่งกรดแลคติกออกมาสะสมอยู่ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตได้ กระบวนการหมักโยเกิร์ตจะเริ่มต้นการหมักนมที่ pH 6.5 โดยใช้เวลาหมัก 8 ชั่วโมง 40 นาที จะมีได้ค่า pH ประมาณ 4.6 ซึ่งเป็นระดับ pH ที่นมหมักดังกล่าวจะกลายเป็นโยเกิร์ต และเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

28 วัน แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยังมีชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตก็จะสร้างและหลั่งกรดแลคติกออกมา ซึ่งส่งผลให้ระดับ pH ในโยเกิร์ตลดลงเล็กน้อยในช่วงอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Maragkoudakis *et al*. (2006) ที่พบว่าหลังจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นเวลา 14 วัน จะมีค่า pH ลดลงเล็กน้อย

คุณสมบัติหรือคุณค่าทางโภชนาการของโยเกิร์ตที่หมัก หรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยปกติแล้วการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้น จะเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ถ้ามีการเปลี่ยนในลักษณะที่ไม่ดีเท่ากับกลุ่มควบคุมแล้ว การศึกษารูปแบบใดๆ เกี่ยวกับโยเกิร์ต เช่น การเติมสารเสริมใดๆ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต หรือการเสริมหัวเชื้อหมักบางชนิดในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เป็นต้น ก็จะไม่เป็นที่ยอมรับในการศึกษาครั้งนั้นๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกหลายประการ ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้จากการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้น มีคุณลักษณะที่ดีไม่ด้อยไปกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ใช้หัวเชื้อหมักปกติสำหรับการผลิตโยเกิร์ต การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในงานวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน การวิเคราะห์ปริมาณของแข็ง การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า และการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ซึ่งผลที่ได้พบว่าคุณค่าทางโภชนาการเหล่านี้มีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกและกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสามารถสรุปและบ่งชี้ได้ว่าการผลิตโยเกิร์ตด้วยการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเลย เช่นเดียวกันกับการหมักโยเกิร์ตด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้น ก็ไม่ทำให้คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโยเกิร์ตเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมเลย (Maragkoudakis *et al*., 2006) รูปแบบการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกเหล่านี้ไปหมักหรือหมักเสริมในการผลิตโยเกิร์ตนั้น จะเป็นแนวทางที่เหมาะสมเพื่อนำแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตให้กับผู้บริโภคโดยตรง ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ในที่สุด

การทดสอบทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยปกติแล้วการศึกษาการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้นั้น จะเป็นตัวบ่งชี้หรือดัชนีบ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตดังกล่าวนี้ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากหรือน้อยเท่าใด แต่โดยทั่วไปแล้วหากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตขึ้นมาได้นั้น ได้คะแนนไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ผลิตจากหัวเชื้อหมักปกติ การแปรผลของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้นี้ถือว่ามีคุณลักษณะหรือมีรสชาติที่ดีเทียบเท่ากับการผลิตด้วยหัวเชื้อหมักปกติ หรือมีความหมายอีกด้านหนึ่งว่าการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้นไม่มีผลต่อคุณลักษณะหรือรสชาติในด้านลบเลย ดังนั้นถือว่าการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามถ้าหากได้คะแนนทางประสาทสัมผัสดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแล้ว ก็แสดงว่าการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก

สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีคุณลักษณะหรือรสชาติดีกว่ากลุ่มที่หมักด้วยหัวเชื้อหมักปกติ ซึ่งจะถือว่าการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในครั้งนี้ก็ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกัน

การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตด้วยการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 ในครั้งนี้นั้น การยอมรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกจากผู้ทดสอบพบว่าได้คะแนนในทุกคุณลักษณะที่ดีของโยเกิร์ตมากกว่า 6 คะแนน จากคะแนนเต็ม 9 คะแนน หรืออยู่ในระดับคะแนนค่อนข้างชอบ ทั้งนี้โดยคะแนนที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเลย ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จได้ด้วยดี สอดคล้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยการใช้หัวเชื้อหมักและหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037 ที่พบว่าโยเกิร์ตดังกล่าวได้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ดี (Maragkoudakis *et al*., 2006) นอกจากนั้นการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. paracasei* ssp. *paracasei* ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตก็ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสเลย (Pimentel *et al*., 2013)

การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในรูปแบบอาหารฟังก์ชัน โดยเพิ่มอรรถประโยชน์ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตสำหรับการบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ในการวิจัยครั้งนี้ โดยสรุปและแปรผลการวิจัยที่ได้พบว่าโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ ซึ่งสามารถแปรผลได้ว่าผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกดังกล่าวนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ โดยผลจากการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับนักวิจัยหลายๆ ท่านที่ได้รายงานถึงการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากโยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก ดังเช่นประยุกต์ใช้สำหรับผู้ป่วยโรคเอดส์ (Hemsworth *et al*., 2011) หรือเพื่อป้องกันและรักษาบำบัดโรคมะเร็งลำไส้ (Balansky *et al*., 1999; Kumar *et al*., 2010) เป็นต้น

การวิจัยครั้งนี้เป็นวิธีการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อเพิ่มอรรถประโยชน์ในการป้องกัน และหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกมาจากน้ำนมหมักและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ดี 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 สามารถนำไปหมักหรือหมักเสริมในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อการประยุกต์ใช้ในการป้องกัน และหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ โดยกลไกของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้มาจากความสามารถในการผลิตกรดไขมันสายสั้นในกลุ่ม acetic, propionic และ butyric

สรุปผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบหมัก จำนวน 31 ตัวอย่าง พบว่าสามารถเก็บรวบรวมแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะรูปร่างแบบท่อนหรือแบบกลมได้ จำนวน 284 ไอโซเลต

2. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 284 ไอโซเลต อาทิ คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 8 ชนิด การทนต่อสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี การไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และคุณสมบัติการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 8 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดี

3. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธีการแบบ MTT พบว่ามีแบคทีเรียโปรไบโอติกเพียง 4 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีประมาณ 11 – 25%

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยการเปรียบเทียบลำดับ 16S rRNA กับฐานข้อมูล GenBank ผลจากการตรวจสอบสายพันธุ์และทำการตั้งชื่อแบคทีเรียโปรไบโอติก ทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนี้ *Enterococcus faecium* FM20, *Lactobacillus plantarum* PM1-23, *Lactobacillus plantarum* PM2-13 และ *Lactobacillus zeae* PM11-5

5. การศึกษากลไกของแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดี 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 และ *L. zeae* PM11-5 สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นในกลุ่ม acetic, propionic และ butyric

6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยการหมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 พบว่าเวลาที่ใช้ในการหมักโยเกิร์ตเท่ากับ 8 ชั่วโมง 40 นาที โดยใช้เวลาหมักเท่ากับกลุ่มควบคุมที่หมักด้วย *Streptococcus thermophillus* TISTR 458 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 895

7. ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ สูงกว่า 10^8 CFU/ml ตลอดช่วงเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน

8. คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 พบว่าค่า pH อยู่ในช่วง 4.41-4.48 ในขณะที่ปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.87-1.11 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างช่วงเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน โดยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

9. คุณสมบัติทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 พบว่ามีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ 3.35-3.56 เปอร์เซ็นต์ ของแข็ง 17.76-18.74 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 0.71-0.85 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 1.57-1.88 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างช่วงเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน โดยคุณสมบัติทางโภชนาการไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

10. คะแนนการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 พบว่าลักษณะปรากฏ สีกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม มีคะแนนมากกว่า 6 จากคะแนนเต็ม 9 คะแนน โดยคะแนนการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

11. ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักหรือหมักเสริมด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PM2-13 หรือ *L. zeae* PM11-5 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีมากกว่ากลุ่มควบคุม 1.17 และ 1.47 เท่า ตามลำดับ

ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อเพิ่มอรรถประโยชน์ในการป้องกัน และหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ดี โดยผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้ไม่มีผลทางด้านลบต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และความชอบของผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

ภัทรวินฑ์ อัตตะสาระ และ รังสิยา บัวส้ม. 2554. **รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล** (Hospital-Based Cancer Registry). สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ฉบับที่ 26. 60 น.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2555. **ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคมะเร็ง.** สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. *http://www.nci.go.th/Knowledge/index_general.html* [15 กันยายน 2555]

AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC international. AOAC Intl: Virginia.

AOAC. 2007. Official methods of analysis of AOAC international. AOAC Intl: Maryland.

Balansky, R., B. Gyosheva, G. Ganchev, Z. Mircheva, S. Minkova and G. Georgiev. 1999. Inhibitory effects of freeze-dried milk fermented by selected *Lactobacillus bulgaricus* strains on carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats and by diethylnitrosamine in hamsters. **Cancer Lett.** 147 (1-2): 125-137.

Ewaschuk, J.B., J.W. Walker, H. Diaz and Madsen K.L. 2006. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. **J. Nutr.** 136 (6): 1483-1487.

Chiu, H.H., C.C. Tsai, H.Y. Hsih and H.Y. Tsen. 2008. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice. **J. Appl. Microbiol.** 104 (2): 605-612.

Commane, D., R. Hughes, C, Shortt and I. Rowland. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutat. Res.** 591 (1-2): 276-289.

Dave, R.I. and N.P. Shah. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **Int. Dairy J.** 7: 31-41.

Fayol-Messaoudi, D., M.H. Coconnier-Polter, V.L. Moal, F. Atassi, C.N. Berger and A.L. Servin. 2007. The *Lactobacillus plantarum* strain ACA-DC287 isolated from a Greek cheese demonstrates antagonistic activity in vitro and in vivo against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Appl. Microbiol.** 2007 103 (3): 657-665.

Fiander, A., S. Bradley, P.C. Johnson-Green and J. M. Green-Johnson. 2005. Effects of lactic acid bacteria and fermented milks on eicosanoid production by intestinal epithelial cells**. J. Food Sci.** 70 (2): M81-M86.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 66 (5): 365-378.

Gaudana, S.B., A.S. Dhanani and T. Bagchi. 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. **Br. J. Nutr.** 103 (11): 1620-1628.

Gilliland, S.E., T.E. Staley and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lact. Acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **J. Dairy Sci.** 67 (12): 3045-3051.

Gordon, P.H. 1999. Malignant neoplasms of the colon. *In*: Nivatvongs, S., P.H. Gordon (eds.) **Principles and practice of surgery for the colon, rectum and anus.** Quality Medical Publishing Inc: Missouri. pp. 575-718.

Hemsworth, J. H. Sharareh and R. Gregor. 2011. The development of micronutrient supplemented probiotic yogurt for people living with HIV: Laboratory testing and sensory evaluation. **Inn. Food Sci. Emerg. Technol.** 12 (1): 79-84.

Hussain, M.A., D.A. Rouch and M. L. Britz. 2009. Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. **Int. Dairy J.** 19: 12–21.

Jan, G., A.S. Belzacq, D. Haouzi , A. Rouault , D. Métivier, G. Kroemer and C. Brenner. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. **Cell Death Differ.** 9 (2): 179-88.

Kim, J.E., J.Y. Kim, K.W. Lee and H.J. Lee. 2007. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria. **J. Microbiol Biotechnol.** 17 (8): 1227-1235.

Kumar, A. N.K. Singh and P.R. Sinha. 2010. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd. **Mol. Biol. Rep.** 37 (3): 1373-1376.

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

Maragkoudakis, P.A., K.C. Mountzouris, D. Psyrras, S. Cremonese, J. Fischer, M.D. Cantor and E. Tsakalidou. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis.* **Int. J. Food Microbiol.** 130 (1-2): 219-226.

McCann, M.J., C.I.R. Gill, G.O' Brien, J.R. Rao, W.C. McRoberts, P. Hughes, R. McEntee and I.R. Rowland. 2007. Anti – cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. **Food chem. toxicol.** 45 (7): 1224-1230.

Medina, P.J., W. Sun and L.E. Davis. 2008. Colorectal Cancer. *In*: DiPiro, J.T., R.L. Talbert, G.C. Yee, G.R. Matzke, B.G. Wells and L.M. Posey (eds.) **Pharmacotherapy : A Pathophysiologic Approach.** The McGraw-Hill Companies: New York. pp. 2175-2206.

Millette, M., C. Dupont, F. Shareck, M.T. Ruiz, D. Archambault and M. Lacroix. 2007. Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. **J. Appl. Microbiol.** 104 (1): 269-275.

Muyphuag, B. 2010. Colon and rectal cancer. J. Med. Health Sci. 17 (1): 29-42.

Pennacchia, C., D. Ercolini, G. Blaiotta, O. Pepe, G. Mauriello and F. Villani. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Sci.** 67: 309-317.

Pimentel, T.C., A.G. Cruz and S.H. Prudencio. 2013. Short communication: Influence of long-chain inulin and *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* on the sensory profile and acceptance of a traditional yogurt. **J. Dairy Sci.** doi: 10.3168/jds.2013-6695.

Pridmore, R.D., A.C. Pittet, F. Praplan and C. Cavadini. 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. **FEMS Microbiol. Lett.** 2008 283 (2): 210-215.

Thirabunyanon, M., P. Boonprasom and P. Niamsup. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. **Biotechnol. Lett.** 31 (4): 571-576.

Thirabunyanon, M. 2011. Biotherapy for and protection against gastrointestinal pathogenic infections via action of probiotic bacteria. **Maejo Int. J. Sci. Technol.** 5 (1): 108-128.

Thirabunyanon, M and P. Hongwittayakorn. 2013. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 169 (2): 511-525.

Travaglione, S., A. Fabbri and C. Fiorentini. 2008. The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: A risk factor for human cancer development?. **Infect. Agent. Cancer.** 3: 4.

Salminen, S., C. Bouley, M.C. Boutron-Ruault, J.H Cummings, A. Franck and G.R. Gibson. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.** 1: S147-S171.

Savage, D.C. 1992. Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (6): 1992-1995.

Shmuely, H., D. Passaro, A. Figer, Y. Niv, S. Pitlik, Z. Samra, R. Koren and J. Yahav. 2001. Relationship between Helicobacter pylori CagA status and colorectal cancer. **Am. J. Gastroenterol.** 96 (12): 3406-3410.

Sorokulova, I.B., I.V. Pinchuk, M. Denayrolles, I.G. Osipova, J.M. Huang, S.M. Cutting and M.C. Urdaci. 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. **Dig. Dis. Sci.** 53 (4): 954-963.

Spinler, J.K., M. Taweechotipatr, C.L. Rognerud, C.N. Ou, S. Tumwasorn and J. Versalovic. 2008. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe.** 14 (3): 166-171.

Verdenelli, M.C., F. Ghelfi, S. Silvi, C. Orpianesi, C. Cecchini and A Cresci. 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. **Eur. J. Nutr.** 48 (6): 355-363.

Vinderola, C.G. and J.A. Reinheimer. 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **Int. Dairy J.** 10 (4): 271-275.

Vinderola, C.G. and J.A. Reinheimer. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Res. Int.** 36 (9-10): 895-904.

Williams, N.T. 2010. Probiotics. **Am. J. Health Syst. Pharm.** 67 (6): 449-458.

Wescombe, P.A., N.C. Heng, J.P. Burton, C.N. Chilcott and J.R. Tagg. 2009. Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. **Future Microbiol.** 4 (7): 819-835.

Yuksekdag, Z. and B. Aslim. 2010. Assessment of potential probiotic- and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk). **J. Microbiol. Biotechnol.** 20 (1): 161-168.

Zoumpopoulou, G., B. Foligne, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot and E. Tsakalidou. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. **Int. J. Food Microbiol.** 121 (1): 18-26.