การศึกษาการสร้างสปอร์และคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Bacillus coagulans*

Spore forming and Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans*

ฐิตวันต์ แสนประเสริฐ

ตรีสุคนธ์ คงประดิษฐ์

ปริยากร สอนประเทศ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การศึกษาการสร้างสปอร์และคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Bacillus coagulans*

Spore forming and Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans*

จัดทำโดย

ฐิตวันต์ แสนประเสริฐ รหัสนักศึกษา 59080072

ตรีสุคนธ์ คงประดิษฐ์ รหัสนักศึกษา 59080080

ปริยากร สอนประเทศ รหัสนักศึกษา 59080091

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

....9...../.....สิงหาคม...../.....2563.....

(รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาสร้างสปอร์และคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Bacillus coagulans*
ชื่อนักศึกษา	ฐิตวันต์ แสนประเสริฐ รหัสนักศึกษา 59080072 ตรีสุคนธ์ คงประดิษฐ์ รหัสนักศึกษา 59080080 ปริยากร สอนประเทศ รหัสนักศึกษา 59080091
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK 25 โดยนำเชื้อ *Bacillus coagulans* ทั้งสองสายพันธุ์ศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงด้วยเทคนิคการ spot บน sheep blood agar ในเบื้องต้น พบว่า *B. coagulans* ATCC 7050 เป็นโพรไบโอติกที่มีความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์ ในขณะที่สายพันธุ์ MPK 25 ไม่ปลอดภัยเนื่องจากมีการสร้างฮีโมไลซินที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดโซนใสขนาดมากกว่า 5 มิลลิเมตรบน sheep blood agar จึงนำ *B. coagulans* ATCC 7050 มาศึกษาต่อในด้านการสร้างสปอร์ โดยเปรียบเทียบการสร้างสปอร์ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2x Schaeffer's-glucose (2x SG) เปรียบเทียบกับ Trypticase soy agar (TSA) ในขวดแบนด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่า *B. coagulans* ATCC 7050 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 2x Schaeffer's-glucose (2x SG) ให้ปริมาณสปอร์สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง (95.03 %) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) ให้ปริมาณสปอร์สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง (94.87 %) ต่อมาจึงศึกษาการรอดชีวิตภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์ โดยใช้เชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 เปรียบเทียบกับเชื้อ เมื่อได้สปอร์ของสายพันธุ์ดังกล่าวแล้ว จึงศึกษาคุณสมบัติด้านการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์โดยใช้สปอร์ของ *B. coagulans* ATCC 7050 เปรียบเทียบกับสปอร์ของ *B. coagulans* BC30 ซึ่งเป็นสายพันธ์ทางการค้า ซึ่งทดสอบในสภาวะทางเดินอาหารจำลองเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธ์สามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลองได้ และอัตราการรอดชีวิตของ *B. coagulans* BC30 สูงกว่า *B. coagulans* ATCC 7050 อยู่ที่ 97.39 % และ 87.20 % ตามลำดับ จากการศึกษานี้พบว่า *B. coagulans* ATCC 7050 มีคุณสมบัติและมีแนวโน้มที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในทางการค้าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Spore forming and Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans*
Student name	Thitawan Saenprasert Student ID 59080072 Treesukon Kongpradit Student ID 59080080 Pariyakorn Sonprathes Student ID 59080091
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2020
Advisor	Asssoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

This research is to study the probiotic properties and, consequently, spore production of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and MPK 25. Both strains were firstly investigated the hemolysin production using spot technique on sheep blood agar. The results showed that *B. coagulans* ATCC 7050 is safe for human use as probiotic, while stain MPK 25 was unsafe for human use, due to the hight hemolysin production more than 5 mm. clear zone on sheep blood agar. Further study was to investigate the spore production of *B. coagulans* ATCC 7050 on the spore production medium using 2x Schaeffer's-glucose (2XSG) compared to Trypticase soy agar (TSA) in a flat bottle and incubated at 37 ℃ for 72, 96, 120 hours. It was found that *B. coagulans* ATCC 7050 gave the hightest spore number at 96 hours (95.03 %) of incubation, while the culture on TSA medium gave the hightest at 72 hours (94.87 %). After selected spore on the 2XSG medium. The survival properties of spore *B. coagulans* ATCC 7050 was later study in a simulated human digestive system compared to the commercial probiotic stains *B. coagulans* BC30. It was revealed that both stains could servive after 8 hours in human simulated digestive system. Survivability rates of *B. coagulans* BC30 inform the higher percentage than *B. coagulans* ATCC 7050 with 97.39 % and 87.20 % respectively. From this study we conclude that *B. coagulans* ATCC 7050 can be use as probiotic for commercial product.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่องการสร้างสปอร์และคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Bacillus coagulans* สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้ศึกษาวิจัยขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาและขอขอบพระคุณผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ และดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้โอกาสในการเรียน ให้ความดูแลเอาใจใส่ในการให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ความรู้ทั้งแนวคิดภาคทฤษฎีและการปฏิบัติอีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขข้อบกพร่องส่วนต่างๆตลอดมาทตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการในการสอบปัญหานี้และขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตรรวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกเรื่องสถานที่ในการดำเนินงาน

ขอขอบคุณสำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการอำนวยความสะดวกเรื่องสถานที่ในการค้นหาข้อมูล คู่มือและแนวทางการทำปัญหาพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวที่คอยส่งเสริมสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษนี้ ขอขอบคุณเพื่อนคณะอุตสาหกรรมเกษตร คณะศิลปะศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือมาโดยตลอดจนปัญหาพิเศษนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ฐิตวันต์ แสนประเสริฐ

ตรีสุคนธ์ คงประดิษฐ์

ปริยากร สอนประเทศ

3 เมษายน 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... VI

สารบัญภาพ..... VII

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 โพรไบโอติก..... 3

2.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก..... 4

2.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติก..... 5

2.4 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก..... 6

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก..... 7

2.6 เชื้อสายพันธุ์บาซิลลัส..... 8

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans*..... 9

2.8 ระบบทางเดินอาหาร..... 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 15

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี..... 15

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ..... 16

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง..... 17

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 20

4.1 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ.....

B. coagulans ATCC 7050 และ MPK 25..... 20

4.2 ผลการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050.....

บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium..... 21

4.3 ผลการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30.....

และสายพันธุ์ ATCC 7050 ในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง..... 24

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 27

บรรณานุกรม..... 28

ภาคผนวก..... 31

ภาคผนวก ก..... 32

ภาคผนวก ข..... 34

ภาคผนวก ค..... 36

ประวัติผู้เขียน..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก..... 4

4.1 ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050.....
จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium..... 22

4.2 เปรียบเทียบราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) และ.....
2x SG medium ต่อปริมาตร 300 มิลลิลิตร..... 23

4.3 ปริมาณของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050.....
ที่รอดชีวิตในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง..... 24

ก.1 อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus coagulans*.....
(pH 7.3±0.2 ที่ 25°C)..... 32

ก.2 อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus coagulans*.....
(pH 7.3±0.2 ที่ 25°C)..... 32

ก.3 อาหาร2x SG medium สำหรับการเลี้ยงสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus coagulans*.....
(pH 7.0±0.2 ที่ 25°C) ส่วนที่ 1..... 33

ก.3.1 สารเคมีอาหาร2x SG medium สำหรับการเลี้ยงสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus coagulans*.....
(pH 7.0±0.2 ที่ 25°C) ส่วนที่ 2..... 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กลไกการทำงานของโพรไบโอติกในร่างการมนุษย์	7
2.2	*Bacillus coagulans*	9
2.3	Spore of *Bacillus sp.*	9
2.4	กระเพาะอาหาร	10
2.5	ลำไส้เล็ก	12
2.6	การบีบตัวของลำไส้เล็ก	12
2.7	ลำไส้ใหญ่	13
4.1	การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ B. coagulans ATCC 7050 และ MPK25 บนอาหาร Blood agar โดยมี *B. coagulans* BC30 เป็นตัวควบคุม	20
4.2	ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 จากการเพาะเลี้ยง บนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium	21
4.3	อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 ในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง	25
ค.1	ผลการทดสอบการสร้างสปอร์ *B. coagulans* ATCC7050 ในอาหาร TSA	36
ค.2	ผลการทดสอบการสร้างสปอร์ *B. coagulans* ATCC7050 ในอาหาร 2x SG	37
ค.3	ลักษณะของสปอร์ *B. coagulans* ATCC 7050 ในอาหาร 2x SG	37
ค.4	ตัวอย่างการทดสอบสภาวะระบบย่อยอาหารจำลองของเชื้อ *B. coagulans* BC30 และ ATCC 7050 ที่pH2 ในอาหาร 2x SG ชั่วโมงที่ 8	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาพิเศษ

ปัจจุบันโพรไบโอติกได้รับความสนใจในด้านวิทยาศาสตร์และในเชิงพาณิชย์อย่างกว้างขวาง โพรไบโอติกถูกใช้ในการใช้เป็นอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพ จากงานวิจัยพบว่าตลาดของผลิตภัณฑ์ประเภทโพรไบโอติกได้รับความนิยมทั่วโลกและสูงสุดในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก อีกทั้งยังมีแนวโน้มการขยายตัวอย่างมากในตลาดและมีมูลค่าประมาณ 48.38 พันล้านเหรียญสหรัฐทั่วโลกในปีค.ศ. 2018 และคาดว่าจะเติบโตและมีมูลค่ามากถึง 76.85พันล้านเหรียญสหรัฐในปีค.ศ. 2024 (เว็บไซต์ http://www.MordorIntelligence.com, 2019) โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตขนาดเล็กที่เมื่อถูกจัดการหรือถูกทำให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางด้านสุขภาพต่อโฮสต์ที่โพรไบโอติกอาศัยอยู่ (FAO/WHO 2006; Fuller 1989) โพรไบโอติกมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ อย่างหลากหลายในเซลล์โฮสต์ เช่น การรักษาเสถียรภาพในระบบทางเดินอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ในเซลล์โฮสต์ที่โพรไบโอติกอาศัยอยู่ รวมไปถึงการดูดซึมและสารอาหาร ยับยั้งการเกิดเอนไซม์ที่ก่อมะเร็ง มีผลต่อระบบภูมคุ้มกัน เป็นต้น (Cutting, 2011 และ Elshaghabee และคณะ, 2017) จึงทำให้ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาและพัฒนาโพรไบโอติกอย่างมากมาย

B. coagulans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างกรดแลคติก และผลิตสปอร์ได้ซึ่งเรียกว่า เอ็นโดสปอร์ (endospores) สามารถต้านทานต่ออุณหภูมิสูงและความเป็นกรด เจริญได้ดีในลำไส้เล็ก และมีการผลิตเอ็นไซม์และ L (+) ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *B. coagulans* จะสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Majeed และคณะ, 2016) ซึ่ง *B. coagulans* เป็นหนึ่งในโปรไบโอติกที่มีแนวโน้มว่ามีการสร้างสปอร์มากที่สุด ในปัจจุบันมีการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมทั่วโลก (FDA, 2015) และได้รับการตรวจสอบว่าดีต่อระบบย่อยอาหารและระบบภูมิคุ้มกัน

ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาการสร้างสปอร์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. coagulans* โดยการเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK 25 รวมถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสปอร์ และการทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของ *B. coagulans* สายพันธุ์ทางการค้า BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 เพื่อพัฒนาสู่ระดับการผลิตในระดับนำร่องและระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans*

1.2.2 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ *B. coagulans* จะสามารถผลิตสปอร์ให้ได้ปริมาณที่มากที่สุดในระหว่างการเพาะเลี้ยง

1.2.3 เพื่อศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อ *B. coagulans* ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเป็นโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมแทนเชื้อทางการค้าที่มีต้นทุนสูง

1.2.4 เพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* ที่ทนต่อทางเดินอาหารจำลองที่มีสภาวะที่แตกต่างกัน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรียโพรไบโอติกที่นำมาศึกษาและได้ข้อสรุปว่าอาหารชนิดใดเหมาสมต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในแง่ของต้นทุนและปริมาณสปอร์ที่ได้

1.3.2 ทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สามารถสร้างสปอร์ได้สูงสุด

1.3.3 ทราบถึงความสามารถในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในสภาวะระบบทางเดินทางอาหารจำลองและสร้างประโยชน์ให้กับร่างกายของมนุษย์ได้

1.3.4 สามารถเลือกชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการพัฒนาในอนาคตได้และคาดหวังว่าเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 จะสามารถทดแทนสายพันธ์ทางการค้า ในการเป็นโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมเพื่อลดต้นทุนในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก มาจากภาษกรีกโบราณ หมายถึง สำหรับชีวิต ดังนั้นจุลินทรีย์โพรไบโอติกหมายถึง เชื้อจุลินทรีย์เดี่ยว หรือผสมที่มีชีวิต และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้กับคนหรือสัตว์จะเกิดประโยชน์ต่อผู้ที่ได้รับ โดยจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์เจ้าถิ่น (host) และช่วยให้ร่างกายเกิดความสมดุล (ไชยวัฒน์, 2553)

2.1.1 นิยามและความหมายของโพรไบโอติก (ไชยวัฒน์, 2553)

พ.ศ. 2517 ปาร์คเกอร์ ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติก คือ สิ่งมีชีวิตและสารใดๆที่สามารถกระตุ้นให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยสารนั้นรวมไปถึงสารกลุ่มยาปฏิชีวนะด้วย

พ.ศ. 2532 ฟูลเลอร์ ได้ปรับปรุงนิยามของโพรไบโอติกว่า คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตและดำรงชีวิตอยู่ในรูปของวัตถุหรือสารเติมแต่ง (feed supplement) ซึ่งเมื่อสิ่งมีชีวิตบริโภคเข้าไปจะได้รับประโยชน์ โดยจะทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้

พ.ศ. 2535 ฮาเวนาร์และคณะ ให้ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น โดยได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า เป็นเชื้อจุลินทรีย์เดี่ยวหรือผสมที่มีชีวิต และเมื่อนำมาใช้กับสัตว์หรือคนจะเกิดประโยชน์ต่อผู้ที่ได้รับโพรไบโอติกนั้น โดยช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์เจ้าถิ่น (host)

พ.ศ. 2551 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ประเทศไทย ได้กำหนดแนวทางและหลักเกณฑ์การประเมินประสิทธิผลต่อสุขภาพ ความปลอดภัยและการการอ้างทางสุขภาพของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารขึ้น ซึ่งอย.ได้ให้คำนิยามของโพรไบโอติกว่า โพรไบโอติกหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอหรือเหมาะสมจะทำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ

จุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต และเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และด้วยความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปัจจุบันมีการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ผลิตโพรไบโอติกโดยใช้หลักทางพันธุวิศวกรรม มาพัฒนาเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ผลิตโพรไบโอติกที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหารเสริมจนไปถึงอาหารประเภทต่าง ๆ จะมีความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ในธรรมชาติและมีการตรวจสอบด้านความปลอดภัยในการรับประทานซึ่งจุลินทรีย์ที่ผลิตโพรไบโอติกก็มีหลายประเภททั้งแบคทีเรียและยีสต์ดังที่แสดงในตารางที่ 2.1 เช่น *Lactobacillus, Bifidobacteria, Saccharomyces Boulardii , Streptococcus Thermophilus* ซึ่งโพรไบโอติกนั้นสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ที่มีรสเปรี้ยวเช่น นมเปรี้ยว กิมจิ โย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิร์ต และในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเช่น มิโซะหรือเต้าเจี้ยวญี่ปุ่น เทมเป้ ซอสถั่วเหลืองเกาหลีหมักพื้นบ้าน ขนมปังเปรี้ยว กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดองเป็นต้น

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

Lactobacilli	Bifidobacteria	*Other LAB*	*Non-LAB*
Lb. acidophilus	*Bif. breve*	*Enteroccus faecium*	*Bacillus cereus*
Lb. casei	*Bif. longum* ssp. *infantis*	*Enteroccus faecalis*	*Bacillus coagulans*
Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus*	*Bif. longum* ssp. *longum*	*Lactococcus lactis*	*Clostridium butyricum*
Lb. johnsonii	*Bif. adolescentis*	*Streptococcus thermophilus*	*Escherichia coli*
Lb. reuterii	*Bif. animalis* ssp. *lactis*		*Propionibacterium freudenreichii*
Lb. rhamnosus	*Bif. bifidum*		*Saccharomyces boulardii*
Lb. salivarius			
Lb. paracasei			
Lb. fermentum			
Lb. plantarum			
Lb. crispatus			

ที่มา : Salminen และคณะ (2016)

2.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (ไชยวัฒน์, 2553)

โพรไบโอติกมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันเมื่อร่างกายเสียสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ชนิดดีและชนิดที่เป็นอันตราย ทำให้ระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายทำงานไม่เป็นไปตามปกติ และเชื้อโรคสามารถก่อพิษในขณะที่อยู่ในร่างกายได้ง่าย จึงเกิดอาการแพ้และระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอลงจนเกิดความผิดปกติ เช่น ท้องเสีย ติดเชื้อที่ผิวหนังหรือในช่องคลอด การรับประทานโพรไบโอติกจึงช่วยลดโอกาสการเกิดโรคหรือความผิดปกติได้ และจุลินทรีย์ที่สามารถเป็นโพรไบโอติกได้นั้นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือส่วนของจุลินทรีย์ที่อาจเป็นได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา หรือยีสต์ โดยเฉพาะเมื่อนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ในมนุษย์ ต้องคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่สามารถเกิดขึ้นได้นกเหนือจากประโยชน์ของโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว

ดังนั้นการจะนำจุลินทรีย์ชนิดใดมาเป็นโพรไบโอติกสำหรับมนุษย์จะต้องมีการศึกษาและทดสอบในทางวิทยาศาสตร์เพื่อทราบข้อมูลทั้งในเรื่องคุณสมบัติ ประสิทธิผลต่อสุขภาพและความปลอดภัย หรือได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ เช่น องค์การอนามัยโลก ที่จะให้การรับรองว่าจุลินทรีย์ใดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally regarded as safe หรือ GRAS) ซึ่งได้มีการศึกษาและนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิต มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รับรองถึงความปลอดภัยในการนำมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติพื้นฐานที่ดีของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องสามารถทำให้เกิดความสมดุลต่อสุขภาพที่ดีของโฮสต์ที่โพรไบโอติกอาศัยอยู่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยการทำให้เกิดความสมดุลของโพรไบโอติกนั้นมีหลากหลายด้านเช่น สามารถผลิตสารยับยั้งจุลชีพ สารยับยั้งสารก่อมะเร็ง ทั้งโพรไบโอติกยังได้รับการยอมรับถึงความสามารถในการช่วยลดอาการแพ้ได้ดีเท่ากับโรคที่เกี่ยวเนื่องกับการติดเชื้อและอักเสบอีกด้วย นอกจากนี้ยัง สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่รองรับจุลินทรีย์นั้น และยังคงมีคุณสมบัติเฉพาะของโพรไบโอติก ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีดังต่อไปนี้ (สุรัตน์, 2556)

2.2.1 ความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอด (Survival ability) ในกระเพาะอาหารที่มีพีเอชต่ำประมาณ 4.4-5.0 และเจริญเติบโตได้ในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.15 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ (Adhesion)

2.2.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลชีพ (antimicrobial spectrum)

2.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

ประโยชน์ของโพรไบโอติกสามารถสรุปได้ดังนี้

2.3.1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ด้วยกลไกหลายชนิด เช่นสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยยึดเกาะบริเวณเยื่อบุผนังทางเดินอาหารได้ และแย่งพื้นที่การเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค สร้างสารปฏิชีวนะ เป็นต้น (Guarner, 1998)

2.3.2 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยเนื่องจากเป็นที่ยอมรับ และผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีความปลอดภัย ไม่ทำให้เกิดโรค และไม่เป็นพิษ (Guarner, 1998)

2.3.3 มีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพ เช่น แบคเทอริโอซิน กรดแลคติก และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโทษได้ และสารที่สร้างขึ้นสามารถเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะการติดเชื้อภายในลำไส้ได้ (Guarner, 1998)

2.3.4 สามารถส่งเสริมภาวะโภชนาการของผู้บริโภคได้ คือ มีการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นและนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น วิตามินบี 12 ที่ทำให้การเจริญเติบโตของผู้บริโภคดีขึ้น เนื่องจากวิตามินบี 12 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน และการสร้างโปรตีน (Gross, 2004)

2.3.5 สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานในร่างกายผู้บริโภค (Grosso, 2004)

2.3.6ช่วยขจัดสารพิษ (detoxification) และมลภาวะต่าง ๆ จากร่างกาย เช่น แอมีน (amine) และก๊าซแอมโมเนีย (ammonia) เป็นต้น เนื่องจากโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นแอมาย และก๊าซแอมโมเนีย โดยการเพิ่มกิจกรรมเมทาบอลิซึม (metabolism activity) ของเชื้อ *Escherichia coli* (ธารารัตน์, 2542)

2.3.7 สามารถลดระดับคอเลสเทอรอล และไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในระดับปกติ

2.3.8 ช่วยบำบัดภาวะเบื่ออาหาร ภาวะเครียด (ธารารัตน์, 2542)

2.3.9 ช่วยในการทำงานของไตและตับให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.10 สามารถส่งเสริมระบบการไหลเวียนของเลือดให้ดียิ่งขึ้น (Guarner, 1998)

2.3.11 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) และเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทำให้ร่างกายได้รับเอนไซม์มากขึ้น จึงสามารถช่วยย่อยน้ำตาลในนมทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมดีขึ้น ส่งผลลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งในลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ

2.3.12 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด

2.3.13 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ และไม่เกิดการแพ้

2.3.14 จุลินทรีย์มีบทบาทมากในระบบย่อยอาหาร ระบบขับถ่าย และระบบภูมิต้านทาน โดยจะเข้าไปอาศัยอยู่ในลำไส้ตั้งแต่เกิด ในลำไส้ควรมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มากกว่าจุลินทรีย์ให้โทษ ในอัตราส่วนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่ให้โทษ เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 15 เปอร์เซ็นต์ (ธารารัตน์, 2542)

2.4 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก (ไชยวัฒน์,2553)

โดยทั่วไปแล้วโพรไบโอติกจะเพิ่มจำนวนในเซลล์โฮสต์และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพได้ก็ต่อเมื่อโพรไบโอติกผ่านระบบทางเดินอาหารเข้าสู่ลำไส้แล้ว ดังนั้นกลไกการทำงานโพรไบโอติกจะมุ่งเน้นไปที่การอธิบายเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมและอาหารที่มนุษย์บริโภค การใช้สารปฏิชีวนะและความเครียด สิ่งเหล่านี้จะมีผลให้จุลินทรีย์ในลำไส้เกิดความเสียสมดุล เกิดแบคทีเรียก่อโรคที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถอธิบายกลไกการทำงานเพื่อลดอาการดังกล่าวได้ดังนี้

2.4.1 สร้างกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดแลคติกซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดโรค

2.4.2 สร้างสารบางชนิดที่ออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่เรียกว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

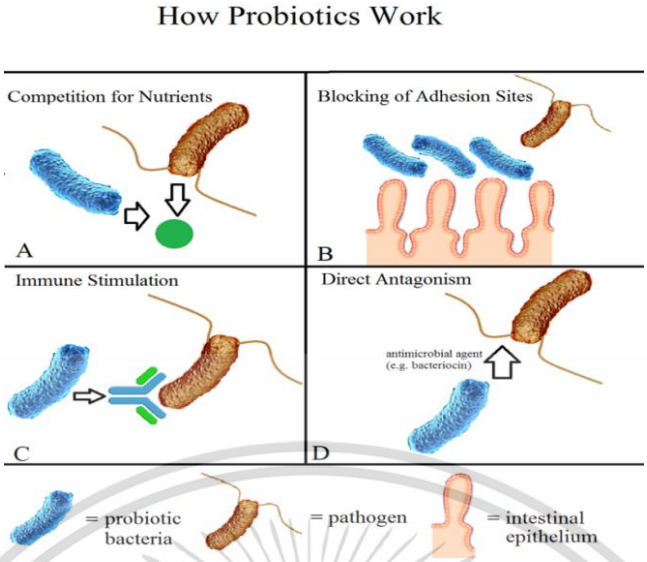
2.4.3 เจริญในลำไส้และแผ่กระจาย ยึดเกาะกับผนังของลำไส้ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคเจริญ

2.4.4 กระตุ้นให้ร่างกายสร้างสารแอนติบอดี้ ทำหน้าที่ต้านทานสิ่งแปลกปลอมที่เป็นแอนติเจนเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย

2.4.5 สร้างสารที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายคนและสัตว์

2.4.6 กระตุ้นให้เกิดเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซท์หรือแมคโคฟาจ ทำให้เกิดการทำลายเชื้อโรค (ภาพที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 กลไกการทำงานของโพรไบโอติกในร่างการมนุษย์

ที่มา : https://www.cindynunnery.com

2.5 ปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

เพื่อให้โพรไบโอติกสามารถสร้างประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ได้ ต้องมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่น้อยกว่า 10^6 cfu/หน่วยบริโภค (Lee และ Salminen, 1996) ดังนั้นการรอดชีวิตของโพรไบโอติกจึงเป็นเรื่องที่สำคัญอย่างมาก โดยการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

2.5.1 ความเป็นกรด - ด่าง (pH)

ในช่วงความเป็นกรด - ด่างที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการรอดชีวิต ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์โพรไบโอติกแตกต่างกัน เพราะเชื้อแต่ละสายพันธุ์ทนความเป็นกรด แตกต่างกัน Haและคณะ (2003) พบว่า *L. casei* KH-1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด - ด่าง 5.5 และหยุดการเจริญเติบโตที่ความเป็นกรด - ด่างต่ำกว่า 3.0 ในขณะที่ Kullen และ Klaenhammer (1999) พบว่า *L. acidophilus* สามารถเจริญเติบได้ดีที่ความเป็นกรด - ด่างต่ำกว่า 3.5 การที่โพรไบโอติกมีความสามารถในการเจริญเติบโตที่ความเป็นกรด - ด่างแตกต่างกัน นั้นเนื่องมาจากชนิดของเอนไซม์ที่ใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมแตกต่างกัน

2.5.2 ปริมาณออกซิเจน

โพรไบโอติกเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้ออกซิเจน (Anaerobic organism) หรือเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อออกซิเจนได้เล็กน้อย (Facultative organism) ในการดำรงชีวิตได้ ปริมาณออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากออกซิเจนที่เข้าสู่เซลล์ของโพรไบโอติกจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ คือ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นสารพิษต่อเซลล์ โดยโพรไบโอติกไม่สามารถกำจัดสารพิษ เหล่านี้ออกจากเซลล์ได้ทำให้มีจำนวนลดลง

2.5.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก เพราะเชื้อแต่ละสปีชีส์จะเจริญได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยทั่วไปอุณหภูมิในช่วง 10-45 ℃ ไม่มีผลเสียต่อโพรไบโอติก เนื่องจากโพรไบโอติกส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Mesophile ซึ่งเจริญได้ดีในอุณหภูมิ ช่วงนี้ โดยอุณหภูมิที่สูงเกิน 45 ℃ จะกระตุ้นกิจกรรมของโพรไบโอติกซึ่งอาจก่อให้เกิดการสะสม ของสารที่เป็นพิษซึ่งทำให้จุลินทรีย์ตายที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ น้ำที่อยู่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์เปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็ง ทำให้ผนังเซลล์เกิดการบาดเจ็บ เยื่อหุ้มของเซลล์ฉีกขาด และหยุดกิจกรรมของเซลล์ (Gill, 2008)แต่จุลินทรีย์จะมีกลไกภายในร่างกาย ซึ่งจะสามารถดึงน้ำ ออกจากตัวมันเองได้ อย่างรวดเร็วทำให้ลดจำนวนผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้

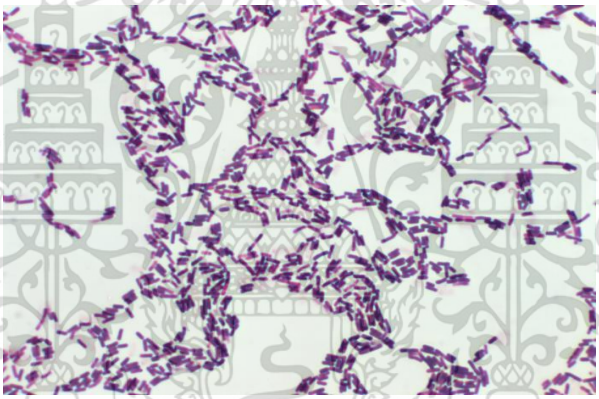
2.6 เชื้อสายพันธุ์บาซิลลัส (*Bacillus* species)

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างเป็นท่อน (ภาพที่ 2.2) อยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* ซึ่งเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดก็ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (anaerobic bacteria) เชื้อบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง 30-45 ºC สร้างเอนโดสปอร์หรือ spore forming bacteria (ภาพที่ 2.3) สปอร์ของเชื้อบาซิลลัสจะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี เชื้อบาซิลลัสเป็น proteolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโนได้ และเป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็น ดังนั้นเชื่อแบคทีเรียสายพันธุ์บาซิลลัสจึงมีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.2 *Bacillus coagulans*

ที่มา : https://www.wisegeek.com (2019)



ภาพที่ 2.3 Spore of *Bacillus sp.*

ที่มา : http://www.wikipedia.com (2019)

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans*

อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) หมายถึงอาหารซึ่งมีส่วนประกอบของสารอาหารที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน มีความต้องการสารอาหารตลอดจนสภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารแตกต่างกัน ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปควรมีคุณสมบัติดังนี้ (นิรนาม, 2560)

2.7.1 มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์

2.7.2 มีความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรี

2.7.3 ปราศจากสารพิษที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.4 ปราศจากสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

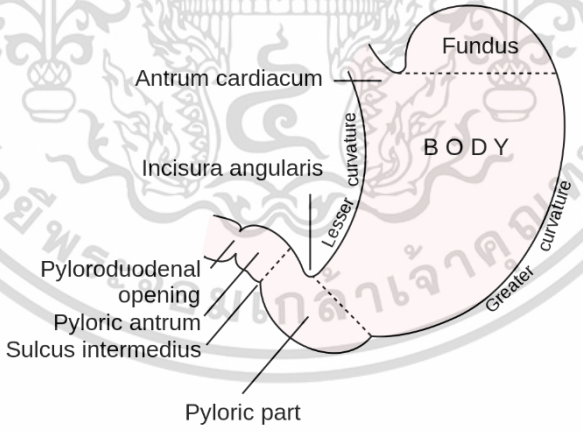
อาหารเลี้ยงเชื้อที่รู้จักทั่วไปสำหรับจุลินทรีย์คือ nutrient broths (อาหารเหลว) หรือ LB medium (Lysogeny Broth) อาหารเหลวถูกทำให้เป็นอาหารแข็งด้วยการเติมวุ้นแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) แล้วปล่อยให้แข็ง แล้วจึงนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ แบคทีเรียจึงเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง

ซึ่งอาหารที่ใช้สำหรับเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *B. coagulans* จะใช้อาหาร TSA หรือ Trypticase soy agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ที่ประกอบด้วยเคซีนและถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ อาศัยเดกซ์โตสเป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมคลอไรด์รักษาแรงดันออสโมติก และไดโพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ (นิรนาม, 2563) และอาหารอีกชนิดที่ใช้คืออาหาร 2X SG เป็นอาหารสำหรับการเจริญของสปอร์

2.8 ระบบทางเดินอาหาร

2.8.1 กระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหารตั้งอยู่ใต้กระบังลม มีรูปร่างคล้ายกับตัวเจ (ภาพที่ 2.4) ใช้สำหรับกักเก็บอาหารชั่วคราว มีความสามารถในการบีบรัดตัว คลุกเคล้าอาหาร ทำให้อาหารผสมกับกรดเกลือ (hydrochloric acid หรือ HCL) และน้ำย่อยต่าง ๆ เมื่อเกิดการคลุกเคล้าและเกิดการผสมกับน้ำย่อยต่าง ๆ และจะได้ไคม์ (chyme) ซึ่งมีลักษณะข้นหนืด (นิรนาม, 2563)



ภาพที่ 2.4 กระเพาะอาหาร

ที่มา : http://www.catpick.com (2020)

กระเพาะอาหารแบ่งได้เป็น 4ส่วน คือ ส่วน Cardia เป็นส่วนบนที่ติดกับหลอดอาหารบริเวณ z-line เป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวจาก stratified squamous ส่วน Fundus เป็นส่วนต่อจากส่วน Cardia มีลักษณะโป่งนูนไปทางด้านบน ส่วน Body เป็นส่วนหลักของกระเพาะอาหารและส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pyrorus เป็นส่วนล่างสุดต่อกับลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (duodenum) และมีตัวกั้น ทำให้อาหารถูกกักเก็บไว้ในกระเพาะอาหารได้ (Brunicardi และคณะ, 2010)

กระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะอาหารแบ่งได้เป็น 3 ระยะดังนี้ (นิรนาม, 2561)

2.8.1.1 Cephalic Phase เป็นส่วนของการกระตุ้น ทั้งการกระตุ้นจากความคิด การมองเห็นอาหาร การได้กลิ่นอาหารซึ่งการเกิดการกระตุ้นจะทำให้มีการส่งสัญญาณประสาทผ่านระบบประสาทพาราซิมพาเธติก (parasympathetic) ผ่านเส้นประสาทวากัส (vagus nerve) ลงมากระตุ้น gastric glands

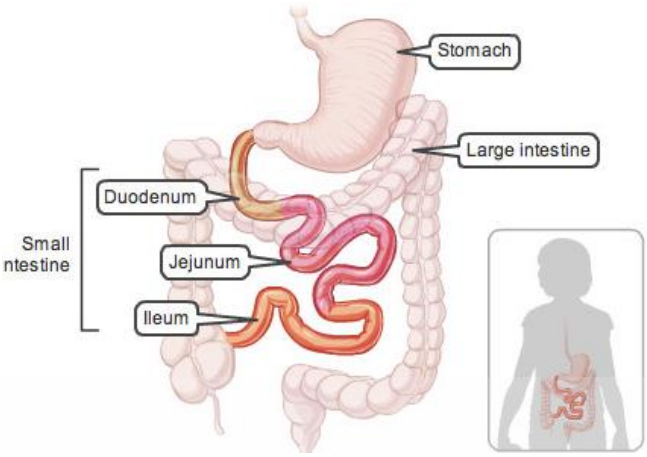
2.8.1.2 Gastric Phase เมื่ออาหารลงมาที่กระเพาะอาหาร จะทำให้ผนังกระเพาะอาหารยืดตัวกระตุ้น stretch receptors สารอาหาร เปปไทด์ (peptides) กรดอะมิโน (amino acids) รวมถึง pH ที่เพิ่มขึ้น จะกระตุ้นการหลั่ง gastrin จาก G cells ซึ่งจะไปกระตุ้นการหลั่งกรดและน้ำย่อยต่อไป

2.8.1.3 Intestinal Phase เมื่อไคม์ (chyme) ผ่านกระเพาะอาหารไปสู่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (duodenum) ความเป็นกรด รวมถึงอาหารที่ผ่านการย่อยแล้ว จะกระตุ้นให้มีการหลั่งกรดที่กระเพาะอาหารมากยิ่งขึ้นแต่หลังจากนั้นการกระตุ้นที่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม จะยับยั้งกระบวนการหลั่งกรดและการย่อยในกระเพาะอาหาร

2.8.2 ลำไส้เล็ก

ลำไส้เล็กเป็นส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหาร เป็นอวัยวะในระบบย่อยอาหารที่ยาวที่สุด มีความยาวโดยเฉลี่ย 3 ถึง 5 เมตร ประกอบด้วย 3ส่วน (รูปที่ 2.5) คือ ดูโอดินัม (duodenum) เป็นส่วนที่สั้นที่สุดมียาวประมาณ 20 ถึง 25 เซนติเมตร มีรูปร่างคล้ายตัวซี (C) และอยู่ติดกับกระเพาะอาหาร และมีรูเปิดของ hepatopancreatic duct หรือ ampulla of Vatar เป็นท่อรวมของ pancreatic duct และ common bile duct ซึ่งเป็นทางออกของน้ำย่อยจากตับอ่อนและน้ำดีที่สร้างมาจากตับ มีต่อมสร้างสารเมือกที่มีความเป็นด่าง เพื่อลดความเป็นกรดของไคม์ที่ส่งมาจากกรเพาะอาหาร ต่อมาเป็นส่วนเจจูนัม (jejunum) ในส่วนนี้จะมีการย่อยและการดูดซึมอาหารเกิดขึ้น และมีความยาวประมาณ 2.5 เมตร ส่วนสุดท้ายเรียกว่า ไอเลียม (ileum) เป็นสำไส้เล็กส่วนปลายที่มีความประมาณ 3.5 เมตร ซึ่งวิตามินบี12 (Drake และคณะ, 2005)

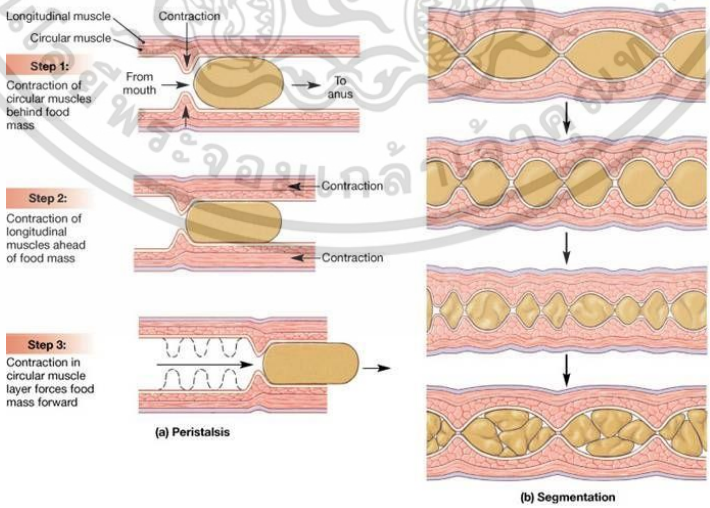
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 ลำไส้เล็ก

ที่มา : http://www.aboutkidshealth.ca (2020)

เมื่อมีอาหารอยู่ในลำไส้เล็กจะเป็นสิ่งเร้าในการกระตุ้นให้ลำไส้เล็กเกิดการยืดและมีการบีบตัวเกิดขึ้น ซึ่งการบีบตัวในลำไส้เล็กเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะดังภาพที่2.6 คือ การบีบตัวแบบ segmentation และการบีบตัวแบบ peristalsis ซึ่งจะทำให้ลำไส้เล็กมีลักษณะเป็นปล้องเกิดขึ้น (Pocock และ Richards, 2009) การบีบตัวของลำไส้เล็กนี้เกิดจากกล้ามเนื้อวงแหวนของลำไส้เล็กเกิดการหดและคลายตัวสลับที่กันไปมา การหดตัวแต่ละครั้งเกิดขึ้นโดยใช้เวลาประมาณ 3-8วินาที ซึ่งการหดและคลายตัวในลักษณะนี้จะทำให้อาหารถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และทำให้ชิ้นอาหารนั้นเคลื่อนที่ไปมาและเกิดการคลุกเคล้ากับน้ำย่อยได้ (Kent และ Van de Graaff, 2009)



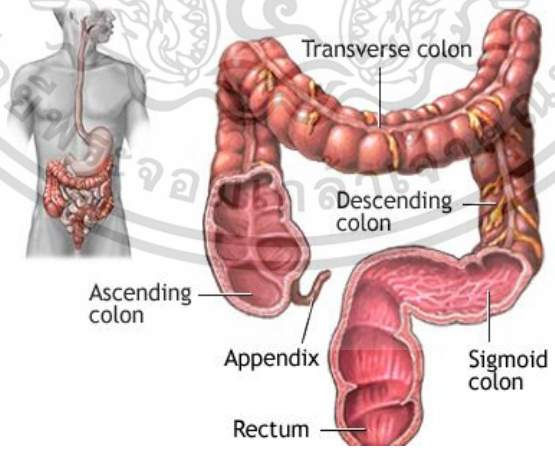
ภาพที่ 2.6 การบีบตัวของลำไส้เล็ก

ที่มา : https://pinterest.com (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 ลำไส้ใหญ่

ลำไส้ใหญ่มีขนาดความยาวประมาณ 1.5 เมตร เป็นส่วนที่ต่อจากลำไส้เล็กส่วนปลายซึ่งจะอยู่ในตำแหน่งที่ต่ำกว่าตับไปจนถึงกระดูกเชิงกรานและทวารหนัก (ภาพที่ 2.7) มีความสามาถในการจุอาหารได้ 1 ถึง 2 ลิตรลำไส้ใหญ่ทำหน้าที่ดูดซึมน้ำและสารละลายบางชนิดกลับไปยังระบบกระแสเลือดในร่างกาย และมีความสามารถในการกักเก็บกากอาหารที่ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ โดยเป็นกากอาหารจำพวกของเหลวกึ่งแข็งที่ไม่ถูกย่อย สำไส้ใหญ่แบ่งได้เป็น 4 ส่วน คือ ซีกัม (cecum) เป็นส่วนที่ต่อจากไอเลียมมีลักษณะเป็นถุงตันปลาย มีความยาว5 ถึง7 เมตร ไส้ติ่ง (vermiform appendix) ซึ่งยาวประมาณ 5 ถึง 20 เซนติเมตร และพบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่ภายในเป็นจำนวนมาก โคลอน (colon) เป็นลำไส้ใหญ่ต่อมาจากส่วนซีกัม รอบ ๆ โคลอนมีไขมัน (pericolic fat) ซึ่งมีลักษณะเป็นติ่ง (appendices epiploicae) และเรคตัม (rectum) เป็นส่วนสุดท้ายของลำไส้ใหญ่ ยาว 12 ถึง 15 เซนติเมตร เป็นบริเวณกักเก็บอุจจาระที่รอการขับถ่าย อีกทั้งในสำไส้ใหญ่ยังประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Eubacterium* , *Lactobacillus* , *Bacteroides* sp. , *Enterbacteriaceae* , *Bifidobacterium* sp. เป็นต้น (Eckburg และคณะ, 2005) ในลำไส้ใหญ่มีการบีบตัวเช่นเดียวกับลำไส้เล็ก ในเวลาที่รับประทานอาหารลำไส้ใหญ่จะมีการบีบตัวที่เร็วและแรง หลังจากกินอาหารแล้วลำไส้ใหญ่จะบีบตัวมากขึ้นและยังคงบีบตัวต่อไปอีกมากกว่า 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากในการรับประทานอาหารทำให้กระเพาะอาหารเกิดการขยายตัวและเส้นใยประสาทที่เชื่อมต่อกับระบบประสาทในลำไส้ใหญ่จะไปกระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่เกิดการบีบตัวที่เพิ่มขึ้น และเมื่อมีอาหารอยู่ในลำไส้เล็กด้วย ระบบประสาทในลำไส้ก็จะกระตุ้นลำไส้ใหญ่ให้เกิดการบีบตัวควบคู่กันไปด้วย จึงทำให้ลำไส้ใหญ่เกิดการบีบตัวที่แรงขึ้นหลังจากรับประทานอาหาร (Pocock และ Richard, 2009)



ภาพที่ 2.7 ลำไส้ใหญ่

ที่มา : https://medlineplus.gov (2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำดี (Bile) สร้างจากตับแล้วถูกนำไปเก็บไว้ที่ ถุงน้ำดี ไม่ถือว่าเป็นเอนไซม์ เพราะจะเปลี่ยนสภาพไปจากเดิม เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลงแล้ว มีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ เกลือน้ำดี (Bile Salt) มีหน้าที่ทำให้ไขมันแตกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ที่เรียกว่า อีมัลชั่น จากนั้นถูกไลเปสย่อยให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล รงควัตถุน้ำดี (Bile Pigment) เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบิน โดยตับเป็นแหล่งทำลายและกำจัดฮีโมโกลบินออกจากเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่หมดอายุ โดยเก็บรวบรวมเข้าไว้เป็นรงควัตถุในน้ำดีคือ บิริรูบิน จึงทำให้น้ำดีมีสีเหลืองหรือเขียวอ่อน และจะถูกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาลโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ โคเรสเตอรอล (Cholesterol) ถ้าหากพบมากจะทำให้เกิดนิ่วในถุงน้ำดี เกิดการอุดตันที่ท่อน้ำดี เกิดโรคดีซ่าน มีผลทำให้การย่อยอาหารประเภทไขมันบกพร่อง (นิรนาม, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ MPK 25 สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 ได้รับความอนุเคราะห์มาจากบริษัท น้ำตาลมิตรผล ภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ โดยอยู่ในรูป glycerol stock

3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารเคมี	ผู้ผลิต
Tryptic Soy Broth	(Difco, USA)
Agar	(Difco, USA)
Bile extract porcine	(Sigma-Aldrich, USA)
Calcium nitrate	(KemAus, Australia)
Di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous	(KemAus, Australia)
Glucose	(Himedia, India)
Hydrochloric acid	(Carlo Erba Reagent, Italy)
Iron (II) sulfate ($FeSO_4$)	(KemAus, Australia)
Manganese (II) chloride tetrahydrate ($MnCl_2$) • H_2O	(Sigma-Aldrich, USA)
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$ • $7H_2O$)	(KemAus, Australia)
Nutrient broth	(Himedia, India)
Pancreatin	(Sigma-Aldrich, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pepsin for porcine gastric mucosa	(Sigma-Aldrich, USA)
Phytone peptone	(Difco, USA)
Potassium chloride	(KemAus, Australia)
Tryticase peptone (Tryptone)	(Himedia, India)
Sodium chloride	(Ajax Finechem, Australia)
Sodium dihydrogen phosphate	(Carlo, Italy)
Crystal violet	
Iodine	
Safranin O	
น้ำกลั่น (Distilled water)	

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 กระบอกตวงขนาด 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.2 กระบอกฉีดยาขนาด 3 และ 10 มิลลิลิตร

3.2.3 กระติกน้ำแข็ง

3.2.4 ขวดแบนขนาด 180 มิลลิลิตร

3.2.5 ขวดดูแรนขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.2.6 จานเพาะเชื้อพลาสติก

3.2.7 ชุดกรอง

3.2.8 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.10 ตู้ลามินา่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.11 incubator shaker

3.2.12 ทิปขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร

3.2.13 แท่งแก้วคนสาร

3.2.14 บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.15 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.2.16 ฟลาสก์ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

3.2.17 ไมโครปิเปต

3.2.18 หลอดทดลองขนาด 16x100 มิลลิเมตร พร้อมฝา

3.2.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.3 ขั้นตอนวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมจุลินทรีย์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK 25 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเชื้อที่บ่มครบเวลาแล้วเลี้ยงในอาหาร TSB อีกครั้งเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน ส่วนสายพันธุ์ทางการค้า BC30 จะใช้ในรูปผงสปอร์แบบแห้ง

3.3.2 การทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดง

ทำการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยง *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK 25 บนอาหาร Blood agar ที่ผสมเลือดแกะ 5% และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ ATCC 1062 เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลการสลายเม็ดเลือดแดงเป็นบวก และ *B. coagulans* BC30 เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลลบ การตรวจสอบการสลายเม็ดเลือดแดงทำได้โดยสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ β-hemolysis เกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย α-hemolysis เกิดสีเขียวบริเวณรอบโคโลนีของแบคทีเรีย และ γ-hemolysis ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบนอาหาร blood agar (Lee และคณะ, 2017)

3.3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำเร็จ ผสมน้ำในอัตราส่วน TSA 12 กรัม ต่อ น้ำ 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการฆ่าเครื่องด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ภายหลังการฆ่าเชื้อ แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในขวดแบนให้มีปริมาตรขวดละ 30 มิลลิตร จากนั้นนอนพักขวดแบนไว้จนกว่าอาหารจะแข็งตัว

3.3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 2x SG

ชั่งอาหาร nutrient broth (NB) 4.8 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.6 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.15 กรัม วุ้น (Agar) 5.1 กรัม ต่อน้ำทั้งหมด 300 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 7.0 ทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที หลังการฆ่าเชื้อให้ผสม 1M แคลเซียมไนเตรท ($Ca(NO_3)_2$) 0.3 มิลลิลิตร, 0.1M แมกนีเซียมคลอไรด์ เตตระไฮเดรท ($MnCl_2 \cdot H_2O$) 0.3 มิลลิลิตร, 1mM เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 0.3 มิลลิลิตรและ 5% กลูโคส (Glucose) ที่กรองผ่าน filter sterilized 0.6 มิลลิลิตร ลงในอาหารส่วนแรกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำในตู้ลามิน่า หลังจากการผสมอาหารแล้วให้แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในขวดแบนปริมาตรขวดละ 30 มิลลิลิตร จากนั้นนอนพักขวดแบนไว้จนกว่าอาหารจะแข็งตัว (Leighton และ Doi, 1971)

3.3.4 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK 25

นำเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK 25 ที่มีอายุ 18-20 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และอาหาร 2x SG ในขวดแบนที่เตรียมไว้ โดยปิเปตเชื้อลงในขวดแบนปริมาตรขวดละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกลิ้งเชื้อบนอาหาร TSA และอาหาร 2xvSG ให้ทั่วพื้นที่บนผิวหน้าอาหารจนกว่าเชื้อจะแห้ง แล้วทำการบ่มเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 และ MPK ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้ตรวจสอบการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยใช้สารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ล้างบนผิวหน้าอาหารในขวดแบนแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่1 ให้ตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการทำ serial dilution และส่วนที่ 2 ให้นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตรวจสอบการสร้างสปอร์ หลังจากนั้นให้ทำ serial dilution และใช้เทคนิคการ spread plate ในการตรวจนับปริมาณเชื้อทั้ง 2 ส่วน หลังจากการทำ spread plate ทั้งในส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 แล้วให้นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจนับโคโลนีของเชื้อในหน่วย CFU/mL

3.3.5 การศึกษาสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.1 การเตรียมจุลินทรีย์โพรไบโอติก

เชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และอาหาร 2x SG ในขวดแบนและล้างเซลล์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารด้วย สารละลาย 0.85% NaCl มิลลิลิตรต่อ 1 ขวดแบน

สปอร์เชื้อ *B. coagulans* สายพันทางการค้า BC 30 แบบแห้ง ชั่งน้ำหนัก 2 กรัม ต่อสารละลาย 0.85% NaCl 18 มิลลิลิตร

3.3.5.2 สภาวะกระเพาะอาหารจำลอง

เตรียม 0.1M กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ภายหลังการฆ่าเชื้อให้ผสมด้วยเปปซิน (Pepsin for porcine gastric mucos) 1.2 กรัม หลังจากการผสมแบ่งเป็นฟลาสก์ย่อย 3 ฟลาสก์ โดยมีปริมาตรในแต่ละฟลาสก์เป็น 33 มิลลิลิตร ในแต่ละฟลาสก์จะมีอัตราส่วนดังนี้ เชื้อ *B. coagulans* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายเปปซิน 33 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้เป็น 5 และ 2 ด้วย 6M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ 6M กรดไฮโดรคลอริก (HCl) หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 80 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 1 และ 2 ด้วยวิธีการทำ serial dilution และใช้เทคนิคการ spread plate หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Buriti และคณะ, 2010)

3.3.5.3 สภาวะลำไส้เล็กจำลอง

เตรียมสารละลาย 0.02M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) สำหรับใช้เป็นตัวทำละลาย โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.593 กรัม และ โซเดียมฟอสเฟตไดเบซิดแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4) 0.23 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เตรียมสารละลายเกลือน้ำดี (Bile salt) 0.85 กรัม ใน 0.02M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร และสารละลาย Pancreatin 0.5 กรัมใน 0.02M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร ให้ทำการทดลองต่อจากสภาวะกระเพาะอาหารจำลองโดยเติมสารละลายเกลือน้ำดี (Bile salt) ลงในฟลาสก์เดิมทั้ง 3 ฟลาสก์ ปริมาตรฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Pancreatin ลงในฟลาสก์ทั้ง 3 ฟลาสก์ ปริมาตรฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชให้เป็น 7.5 ด้วย 6M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วนำเข้าเครื่อง incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 80 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 1, 2, 3 และ 6 ด้วยวิธีการทำ serial dilution และใช้เทคนิคการ spread plate หลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Buriti และคณะ, 2010)

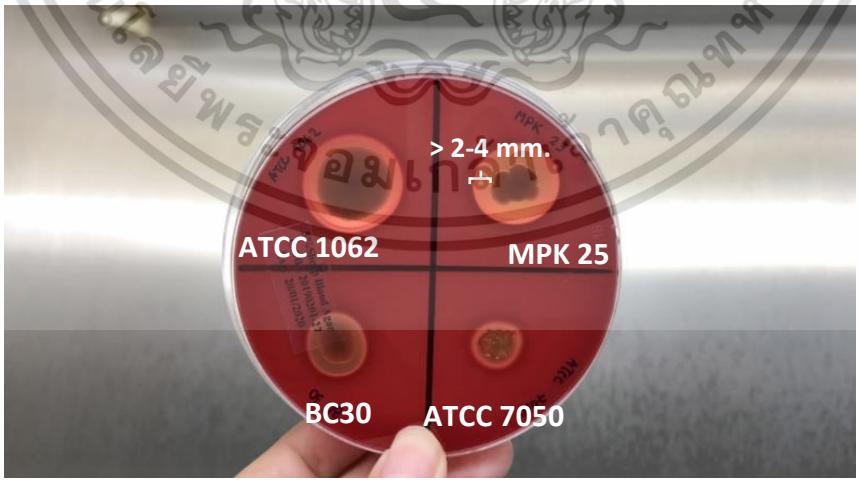
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *B. coagulans* สายพันธ์ ATCC 7050 และสายพันธ์ MPK 25 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ภายในขวดแบน หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อและเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสปอร์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium และคุณสมบัติบางประการในการเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 ในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง และการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. coagulans* BC30 ซึ่งเป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่ใช้ในทางการค้า

4.1 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 และ MPK 25

จากการศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยนำมาทดสอบบนอาหาร 5% sheep blood agar สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) ผลดังภาพที่ 4.1 พบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 จัดอยู่ในกลุ่ม α-hemolysis เช่นเดียวกับ *B. coagulans* BC30 ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลลบ และเชื้อ *B. coagulans* MPK 25 จะสังเกตเห็น clear zone เป็นวงกว้าง จัดอยู่ในกลุ่ม β-hemolysis ซึ่งมีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีขนาดของ clear zone มากกว่า *B. cereus* ATCC 1062 ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวก



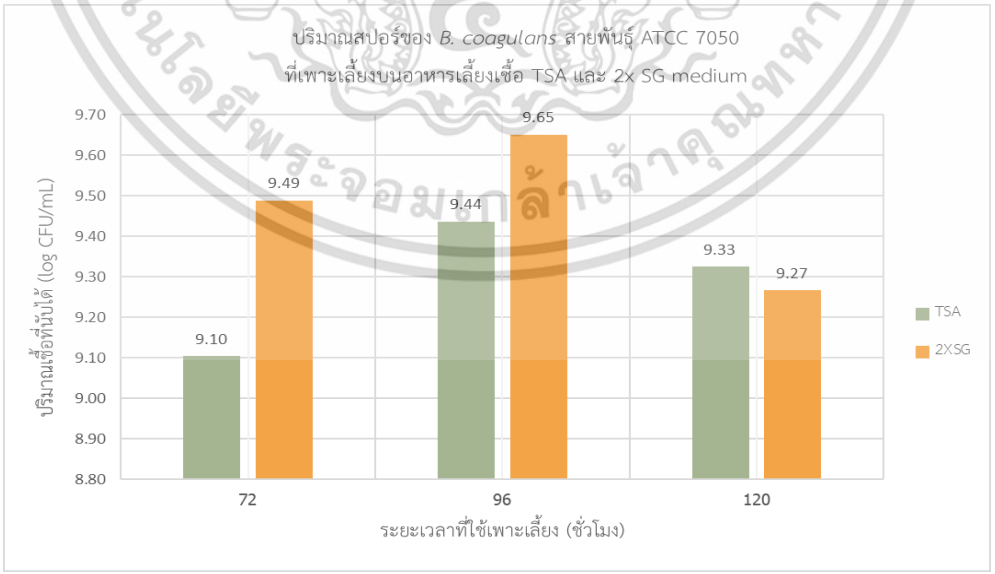
ภาพที่ 4.1 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 และ MPK 25 บนอาหาร blood agar โดยมี *B. cereus* ATCC 1062 และ *B. coagulans* BC30 เป็นตัวควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเชื้อ *B. coagulans* MPK 25 เกิดบริเวณใส มากกว่า 4 มิลลิเมตร บ่งชี้ว่าไม่มีคุณสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์ อ้างอิงจากรายงานการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งให้ผลบวก เนื่องจากสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (strong β-hemolysis) เกิดบริเวณใสเป็นวงกว้าง 2-4 มิลลิเมตร (Bacteriological Analytical Manual, 2019) ผู้ทดลองจึงได้คัดเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ MPK 25 ออกและทำการศึกษา *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 ต่อในด้านการสร้างสปอร์ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

4.2 ผลการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) และ 2xSG medium

จากการทดลองหาปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 ด้วยการเพาะเลี้ยงในขวดแบนบนอาหาร 2x SG medium โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าปริมาณสปอร์เฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 ในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ที่ 9.65 log CFU/mL รองลงมาคือชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 9.49 log CFU/mL และชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 9.27 log CFU/mL ตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร TSA ด้วยระยะเวลาที่เท่ากัน พบว่า ปริมาณสปอร์เฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งของเชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 ในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณสปอร์เฉลี่ย 9.44 log CFU/mL ซึ่งเป็นปริมาณที่มากที่สุด แต่ยังให้ปริมาณน้อยกว่าสปอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร 2x SG medium ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium

Medium	Time (hr.)	control/ heat	CFU/mL	Spore efficiency (%)
TSA	72	control	1.91×10^{9}	94.87
		heat	6.39×10^{8}	
	96	control	3.71×10^{9}	93.96
		heat	9.80×10^{8}	
	120	control	2.68×10^{9}	92.80
		heat	5.61×10^{8}	
2x SG medium	72	control	4.00×10^{9}	93.37
		heat	9.24×10^{8}	
	96	control	6.63×10^{9}	95.03
		heat	2.16×10^{9}	
	120	control	2.32×10^{9}	92.59
		heat	4.69×10^{8}	

ตารางที่ 4.1 จากการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิดที่แตกต่างกัน มีการควบคุมระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 บนอาหาร 2x SG medium ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพสูงสุด อยู่ที่ 95.03 %

โดยทั่วไปเชื้อตระกูล *Bacillus* จะสามารถสร้างสปอร์ได้เป็นปกติบนอาหารหลากหลายชนิด แต่การใช้อาหารเชิงซ้อน (complex media) เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ 2x SG medium ในการเพาะเลี้ยงจะให้ประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ของเชื้อที่ดีกว่า (Granger และคณะ, 2011) เนื่องจากในอาหาร 2x SG medium มีแคลเซียม (Ca^{2+}) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และแมงกานีส (Mn^{2+}) เป็นส่วนประกอบ โดยแร่ธาตุเหล่านี้เป็นองค์ประกอบและพบมากในชั้น core ของสปอร์ มีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรและการทนความร้อน (Slepecky และ Foster, 1959) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลการเติม Mn^{2+} ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการสร้างสปอร์ พบว่าการเติม Mn^{2+} ทำให้สปอร์มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น (Atrih และ Foster, 2001) ดังนั้นเพื่อประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรม จึงได้มีการเปรียบเทียบต้นทุนที่ใช้ประกอบอาหารระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด ดังตารางรางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium ต่อปริมาตร 300 มิลลิลิตร

ชนิดอาหาร	ส่วนประกอบ	ราคาต่อหน่วย (บาท/500 กรัม)	ปริมาณที่ใช้ (กรัม)	ราคาต่อหน่วยที่ใช้ (บาท)
TSA	อาหารสำเร็จ (Difco)	1,764	12	42.34
ราคารวม (บาท)	42.34			
2x SG medium	Nutrient broth (Himedia)	1,216	4.8	11.67
	Agar (Himedia)	2,592	5.1	26.44
	KCl (KenAus)	560	0.6	0.34
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	780	0.15	0.23
	$Ca(NO_3)_2$ (Kemaus)	700	1.64	2.30
	Glucose (Himedia)	640	5	6.4
	$MnCl_2 \cdot H_2O$	1,100	0.144	0.52
	$FeSO_4$	-	0.0015	-
ราคารวม (บาท)	47.90			

*หมายเหตุ KCl (KenAus) เป็นราคาต่อ 1,000 กรัม

ในการศึกษาการสร้างสปอร์ด้วยการเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด คือ Trypticase soy agar (TSA) และ 2x SG medium นอกจากจะศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์แล้ว ยังมีการเปรียบเทียบด้านต้นทุนการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดโดยจะใช้ข้อมูลราคาของวันที่ 4 พฤศจิกายน 2562 และเป็นราคาต่อปริมาตร 300 มิลลิลิตร สำหรับอาหาร TSA ที่ใช้เป็นอาหารสำเร็จราคาต่อหน่วยที่ใช้อยู่ที่ 42.34 บาท และอาหาร 2x SG medium เป็นอาหารเชิงซ้อน (complex media) ที่มีขั้นตอนในการเตรียมมากว่า มีราคารวมต่อหน่วยที่ใช้เท่ากับ 47.90 บาท ดังนั้นในการนำมาใช้เชิงอุตสาหกรรม และต้องการประหยัดต้นทุนรวมถึงเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถใช้อาหาร TSA ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ได้ เนื่องจากประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ไม่แตกต่างจากอาหาร 2x SG medium มากนัก และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้ได้สปอร์ที่น้อยกว่าอาหาร 2x SG medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 ในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง

ศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลองของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 ในรูปเซลล์อิสระ โดยเพาะเลี้ยงจากอาหาร 2xSG เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ให้ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงสุดจากการศึกษาข้างต้น การทดลองนี้จะแบ่งระบบทางเดินอาหารออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ ช่วงกระเพาะอาหาร และช่วงลำไส้เล็ก เก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 จุด โดยในชั่วโมงที่ 1-2 จะเป็นช่วงของกระเพาะอาหารที่ควบคุมความเป็นกรด-เบสให้มีค่าที่ pH 2 และ pH 5 ส่วนชั่วโมงที่ 3, 4, 5 และ 8 จะเป็นช่วงของลำไส้เล็ก ผลการทดลองจะแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 ที่รอดชีวิตในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง

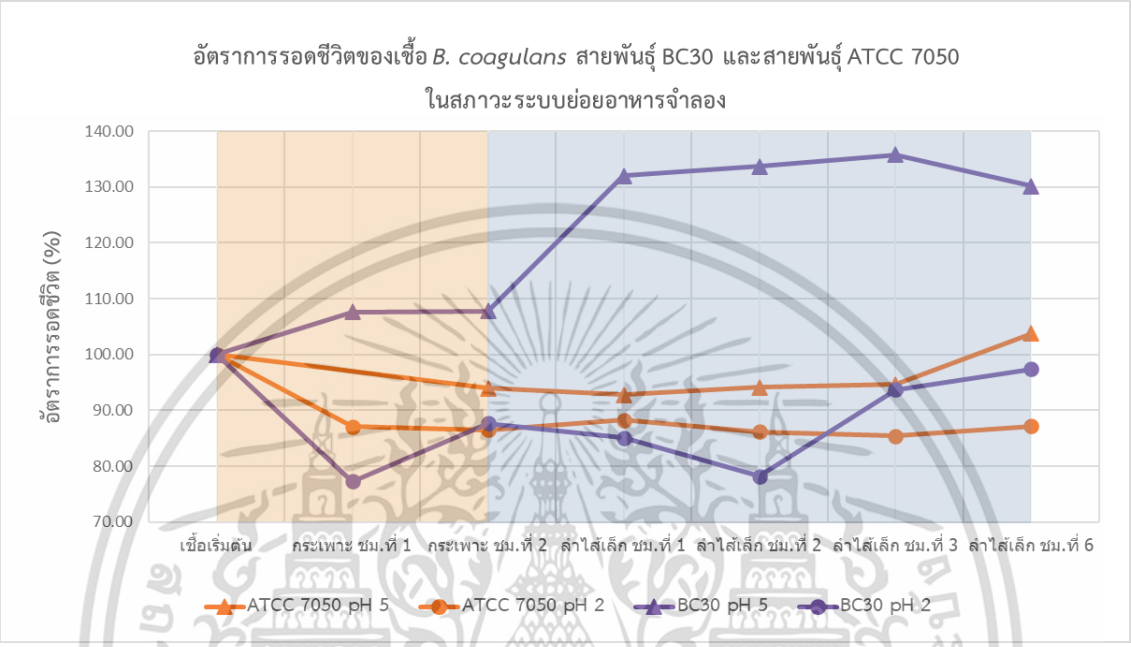
เชื้อที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/mL)						
	เชื้อเริ่มต้น	กระเพาะ		ลำไส้เล็ก			
		ชม.ที่ 1	ชม.ที่ 2	ชม.ที่ 1	ชม.ที่ 2	ชม.ที่ 3	ชม.ที่ 6
BC30 pH 2	8.01	6.19	7.03	6.82	6.26	7.51	7.80
BC30 pH 5	6.98	7.51	7.53	9.21	9.33	9.47	9.09
ATCC 7050 pH2	9.21	8.03	7.97	8.13	7.94	7.87	8.03
ATCC 7050 pH 5	8.69	TNTC	8.17	8.07	8.18	8.23	9.02

จากตารางที่ 4.3 พบว่าเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 สามารถรอดชีวิตในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลองได้สูงถึง 7.80 และ 8.03 log CFU/mL ตามลำดับ

จากผลการทดลองเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และ ATCC 7050 มีแนวโน้มว่าจะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ และมีปริมาณสูงเพียงพอที่จะเกิดผลดีต่อสุขภาพ คือไม่ต่ำกว่า 10^6 cfu/หน่วยบริโภค (Lee และ Salmine, 1995) และการศึกษาทางสรีรวิทยาของมนุษย์พบว่าอาหารที่มนุษย์รับประทานเข้าไปจะอยู่ในระบบทางเดินอาหาร 6-8 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* ที่ทำการศึกษานี้ สามารถอยู่ได้ถึง 8 ชั่วโมง ในระบบย่อยอาหารจำลอง ซึ่งในช่วงกระเพาะอาหารมี pH 2-5 มีสภาวะกรดที่รุนแรง มีผลทำลายเซลล์จึงมีจำนวนเซลล์เหลือรอดในปริมาณน้อยกว่าช่วงลำไส้เล็กที่มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.5-8 ซึ่งเหมาะแก่การเจริญของเชื้อมากกว่า จากตารางที่ 4.3 ในช่วงลำไส้เล็กชั่วโมงที่6 จึงมีจำนวนเซลล์ทั้งที่รอดชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นได้ 10^7 ถึง 10^9 CFU/mL โดยจากการทดสอบในสภาวะจำลองนี้ เชื้อ *B. coagulans* ทั้งสองสายพันธุ์ มีอัตราการรอดชีวิตเป็นไปตามภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 ในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง

จากกราฟในภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. coagulans* ทั้งสองสายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดได้ตลอดการทดลองในสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง โดยมีแนวโน้มการรอดชีวิตไปในทิศทางเดียวกัน คือ ในช่วงของกระเพาะอาหารที่มีการควบคุมความเป็นกรด-เบสนั้นเซลล์จะลดจำนวนลง แต่เมื่อเปลี่ยนเข้าสู่สภาวะลำไส้เล็กที่มีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ pH 7 เชื้อทั้งสองชนิดจะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย เมื่อคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกแล้ว จากสภาวะกระเพาะอาหารที่ pH 2 ซึ่งเป็นสภาวะในช่วงลำไส้เล็กชั่วโมงที่ 6 จะมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 อยู่ที่ 97.39 % และ 87.20 % ตามลำดับ

ในงานวิจัยของ Shinde และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตและความต้านทานของสปอร์แบคทีเรียโพรไบโอติก *B. coagulans* สายพันธุ์ MTCC 5856 ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง พบว่าในช่วงท้ายของสภาวะลำไส้จำลองเชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ MTCC 5856 มีอัตราการรอดอยู่ที่ 92.4% เปรียบเทียบกับ *L. acidophilus* ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 87.6% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ในการเป็นเชื้อตระกูล *B. coagulans* และให้อัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกับเชื้อ *L. acidophilus* ซึ่งเป็นโพรไบโอติกทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุที่เป็นไปได้จากการสูญเสียจำนวนเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อผ่านสภาวะระบบย่อยอาหารจำลอง อาจเกิดจากการกระตุ้นของกรด ทำให้เกิดการงอกของสปอร์ และเซลล์อิสระถูกทำลายด้วยความเป็นกรดจากสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง และตามด้วยเกลือน้ำดีจากสภาวะลำไส้จำลอง (Duc และคณะ ,2004; Hyronimus และคณะ, 2000). แต่จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. coagulans* ทั้งสองสายพันธุ์ ก็ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตสูง อาจเป็นผลมาจากการที่เชื้อ *B. coagulans* มี spore coat ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน ช่วยปกป้องสปอร์จากความเป็นกรดของน้ำย่อยและเกลือน้ำดีได้ (Maathuis และคณะ, 2009) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเชื้อ *B. coagulans* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ สายพันธุ์ BC30 และสายพันธุ์ ATCC 7050 มีคุณสมบัติการอยู่รอดในร่างกายมนุษย์ โดยทนต่อกรดในกระเพาะ และทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ของมนุษย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

5.1.1 เชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาต่อในการนำมาใช้ทดแทนโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมมากกว่า สายพันธุ์ MPK 25 ในด้านการมีคุณสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์

5.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2x SG และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง นั้นเหมาะสมในการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อ เชื้อ *B. coagulans* ATCC 7050 มากที่สุด

5.1.3 เชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 มีความทนต่อสภาวะในระบบย่อยอาหารจำลอง โดยมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 87.20 % ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า เชื้อ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 มีศักยภาพในการอยู่รอดภายในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ซึ่งเป็นหนึ่งในคุณสมบัติของโพรไบโอติก

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาคุณสมบัติบางประการในการเป็นโพรไบโอติกของ *B. coagulans* สายพันธุ์ ATCC 7050 เท่านั้น ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการยึดเกาะที่เยื่อบุลำไส้ กิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรค และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2553). สุขภาพดีด้วยโปรไบโอติก. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ไทยเอฟเฟคท์ สตูดิโอ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ม.ป.ป. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. ขอนแก่น: ขอนแก่นการพิมพ์

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์. ปีที่ 6 ฉบับที่ 53, 357-360.

นิรนาม. (2560). คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com. 4 กรกฎาคม 2563.

นิรนาม. (2561). กระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.ngthai.com. 19 มีนาคม 2563.

นิรนาม. (2561). กระบวนการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://fat.surin.rmuti.ac.th. 19 มีนาคม 2563.

นิรนาม. (2563). อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com. 19 มีนาคม 2563.

สุรัตน์ วังพิกุล. (2556). ผลของข้าวกล้องงอกต่อการเจริญและการผลิตกรดของจุลินทรีย์โพรไบโอติก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

Atrih, A., and Foster, S.J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. J.Appl. Bacteriol. 91:1-9.

Brunicardi, F. Charles, A., Dana, K. (2010). Schwartz's principles of surgery (9th ed.). New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division. ISBN 978-0071547703.

Buriti, F.C., Castro, I.A. and Saad, S. (2010). Viability of Lactobacillus acidophilus in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. International Journal of Food Microbiology. 137(2-3): 121-129.

Cutting, S.M. (2011). *Bacillus* probiotics. Food Microbiol 28:214-220.

Densing, J.M. (2019). *Bacillus coagulans*. [Online]. Available: https://www.wisegeek.com. 23 December 2019

Drake, L., Vogl, W., Tibbitts, A., Mitchell, W.H., and Richardson, P. (2005). Gray's anatomy for students. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone. p. 271-273. ISBN 978-0-8089-2306-0.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., and Cutting, S.M. (2004). Characterization of Bacillus probiotics available for human use. Applied and Environmental Microbiology, 70(4), 2161–2171. https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., and Dethlefsen, L., (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Journal of Science 308:1635-1638.

Elshaghabee, F.M.F, Rokana, N., Gulhane, R.D., Shama C., and Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential.

probiotics: status, concerns, and future perspectives. Front Microbial 8:1490.

FAO/WHO (2006) Probiotics in food. Health and nutritional properties and guideline for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85.

FDA (2015). GRAS Notification for Bacillus coagulans spore preparation (LactoSpore®) (GRAS Notice No. 601). Retrieved from US: https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM476927.pdf.

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

Gill, H., Prasad, J., (2008). Probiotics, immunomodulation and health benefits. Adv Exp Med Biol 606:423–454

Granger, A. C., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Daly, M. J., and Setlow, P. (2011). Effectsof Mn and Fe levels on Bacillus subtilis spore resistance and effects of Mn^{2+}, other divalent cations, orthophosphate, and dipicolinic acid on protein resistance to ionizing radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, *77*(1), 32-40.

Guarner, F., and Schaafsma, G.J., (1998). Probiotics. Int. J. Food Microbiol. 39: 237–238.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A.H., and Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61(2), 193–197. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00366-4.

Kent, M. and Van de Graaff. (2000). Human anatomy. Wn. C. Brown Communication. pp. 609-621.

Lee, S., Lee, J., Jin, Y.I., Jeong, J.C., Chang, Y.H., Lee, Y., Jeong, Y. and Kim, M. (2017). Probiotic characteristics of Bacillusstrains isolated from Korean traditional soy sauce. LWT -Food Science and Technology,79, 518-524.

Lee, Y. K., and Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. Trends Food Science And Technology. 6: 241-245.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Leighton, T. J., & Doi, R. H. (1971). The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in Bacillus subtilis. *Journal of Biological Chemistry*, 246(10), 3189-3195

Maathuis, A., Keller, D., and Farmer, S. (2009). Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of Bacillus coagulans in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. Beneficial Microbes, 1(1), 31–36. https://doi.org/10.3920/BM2009.0009.

Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., and Ali, F. (2016). Evaluation of the stability of Bacillus coagulans MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. International Journal of Food Science & Technology, 51(4), 894–901. https://doi.org/10.1111/ijfs.13044.

Mordor intelligence. (2019). Probiotics Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 -2024). [Online]. เข้าถึงได้จาก: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/probiotics-market. 23December2019.

Pocock, Gillian (2009). Human Physiology (Third ed.). Oxford University Press. p. 382. ISBN 978-0-19-856878-0.

Salminen, S. Kneifel, W., and Ouwehand, AC. Application of Probiotics in Daily Products: Established and Potential Benefits. 2nd Edition, 2011, 412-419.

Slepecky, R.A., and Foster, J.W. (1959). Alteration in metal content of spores of Bacillus megaterium and the effect on some spore properties. J. Bacteriol. 78:117-123.

Shinde, T., Vemuri, R., Shastri, M.D., Perera, A.P., Tristram, S., Stanley, R., and Eri, R. (2019).Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitrofunctional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation.journal of Functional Foods 52 , January 2019

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, (2001); updated 2019, Chapter 14 “Bacillus cereus”. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 22 พฤษภาคม 2563]. เข้าถึงได้ที่ https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)

ตารางที่ ก.1 อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* (pH 7.3±0.2 ที่ 25°C)

Component	Concentration (g/L)
Tryticase peptone (tryptone)	15 g
NaCl	5 g
Phytone peptone	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml

ที่มา : Atlas and Park (2004)

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

ตารางที่ ก.2 อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* (pH 7.3±0.2 ที่ 25°C)

Component	Concentration (g/L)
Tryticase peptone (tryptone)	15 g
NaCl	5 g
Phytone peptone	5 g
Glucose	2.5 g
K_2HPO_4	2.5
Distilled water	1000 ml

ที่มา : Atlas and Park (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 2xSG medium

ตารางที่ ก.3 อาหาร 2x SG medium สำหรับการเลี้ยงสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* (pH 7.0±0.2 ที่ 25°C) ส่วนที่ 1

Component	Concentration (g/L)
Difco Nutrient broth	16 g
KCl	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
Agar	17 g
Distilled water	1000 ml

ที่มา : Leighton and Doi (1971)

หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสแล้ว พักไว้ให้ได้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและเติมสารเคมีอาหาร2x SG medium ส่วนที่2 ดังตารางที่ก.3.1

ตารางที่ ก.3.1 สารเคมีอาหาร 2x SG medium สำหรับการเลี้ยงสปอร์แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* (pH 7.0±0.2 ที่ 25°C) ส่วนที่ 2

Component	Concentration
1M $Ca(NO_3)_2$	1 ml
0.1M $MnCl_2 \cdot H_2O$	1 ml
1mM $FeSO_4$	1 ml
Glucose 50%(w/v), filter sterilized	2 ml

ที่มา : Leighton and Doi (1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมสารเคมี

ข.1 Phosphate-buffered saline (PBS)

1. Sodium chloride 2.307 กรัม
2. Disodium phosphate 0.216 กรัม
3. Potassium dihydrogen phosphate 0.21 กรัม
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร
5. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.2 Simulated gastric fluid (SGF)

1. เตรียมกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 37% 2.49 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
4. ชั่งเปปซิน 1.2 กรัม
5. นำไปละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอลที่ฆ่าเชื้อเตรียมไว้

ข.3 Phosphate buffer (PB) 0.2 โมลาร์

1. ชั่ง Sodium dihydrogen phosphate 0.0593 กรัม
2. ชั่ง Sodium phosphate dibasic anhydrous 0.23 กรัม
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
4. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.4 Simulated intestinal fluid (SIF)

1. ชั่ง bile salt 0.85 กรัม ละลายใน Phosphate buffer 0.02 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร
2. ชั่ง pancreatin 0.5 กรัม ละลายใน Phosphate buffer 0.02 โมลาร์ 50 มิลลิลิตร

ข.5 HCl 0.1 นอร์มอล (ปรับพีเอช)

1. ปิเปตกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 37 % 0.83 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 NaOH 6 นอร์มอล (ปรับพีเอช)

1. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 24 กรัม
2. เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.6 NaOH 0.5 นอร์มอล (ปรับพีเอช)

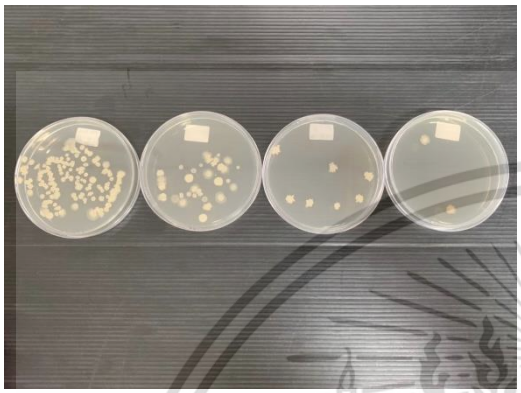
1. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม
2. เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

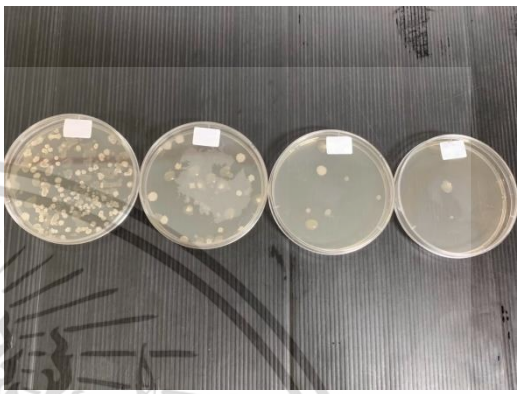
ภาคผนวก ค

รูปผลการทดลอง

ค.1 ผลการทดสอบการสร้างสปอร์ *Bacillus coagulans* ATCC7050 ในอาหาร TSA



ภาพที่ ค.1.1 ตัวอย่างชั่วโมงที่72

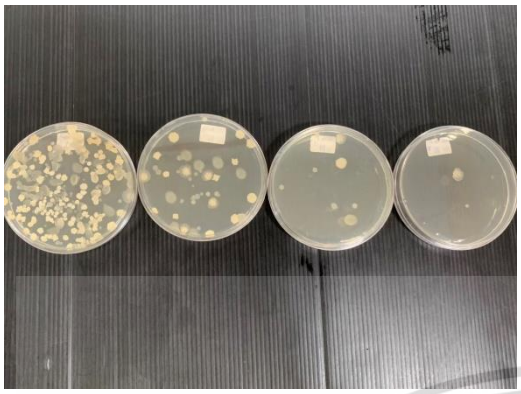


ภาพที่ ค.1.2 ตัวอย่างชั่วโมงที่96

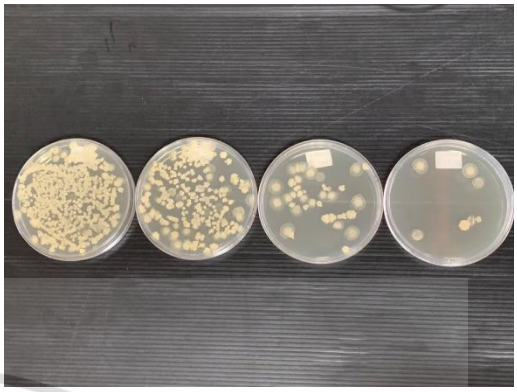
ภาพที่ ค.1.3 ตัวอย่างชั่วโมงที่120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

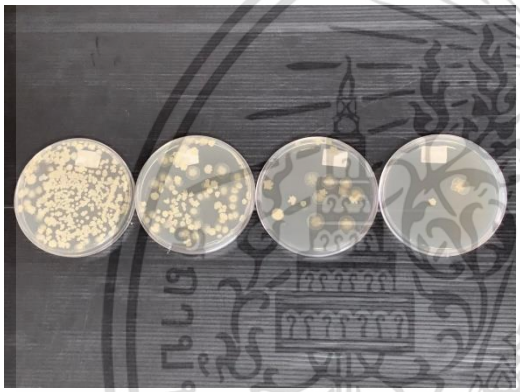
ค.2 ผลการทดสอบการสร้างสปอร์ *Bacillus coagulans* ATCC 7050 ในอาหาร 2x SG



ภาพที่ ค.2.1 ตัวอย่างชั่วโมงที่72

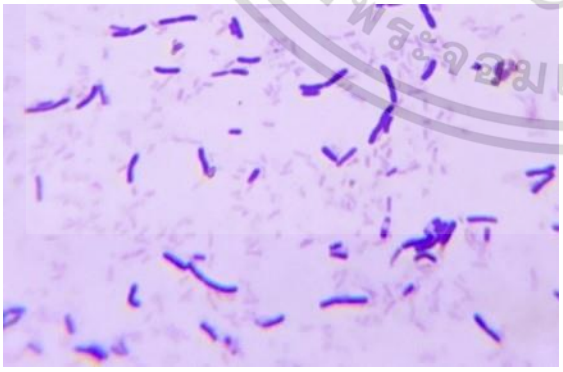


ภาพที่ ค.2.2 ตัวอย่างชั่วโมงที่96

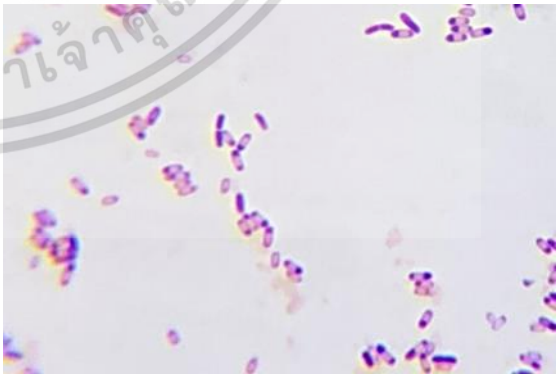


ภาพที่ ค.2.3 ตัวอย่างชั่วโมงที่120

ค.3 ลักษณะของสปอร์ *Bacillus coagulans* ATCC 7050 ในอาหาร 2x SG

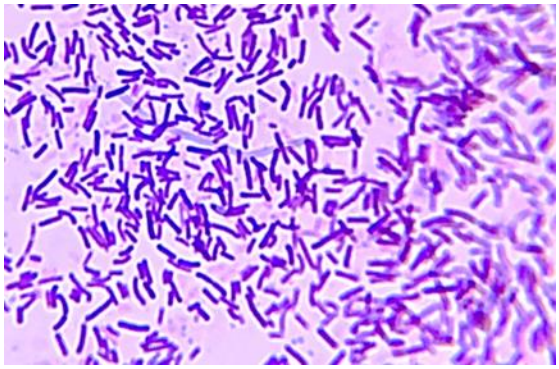


ภาพที่ ค.3.1 เซลล์จากตัวอย่าง ชั่วโมงที่72

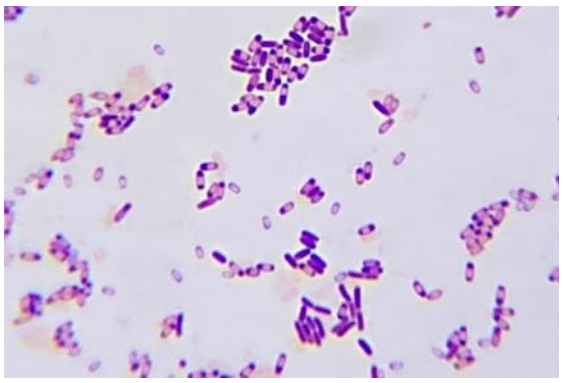


ภาพที่ ค.3.2 สปอร์จากตัวอย่าง ชั่วโมงที่72

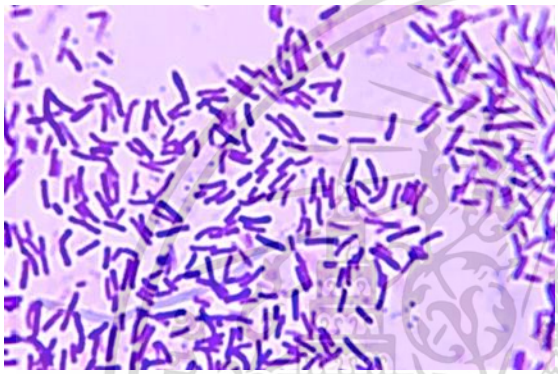
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



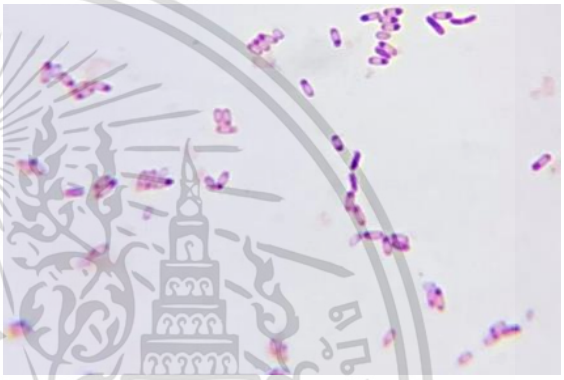
ภาพที่ ค.3.3 เซลล์จากตัวอย่าง ชั่วโมงที่96



ภาพที่ ค.3.4 สปอร์จากตัวอย่าง ชั่วโมงที่96



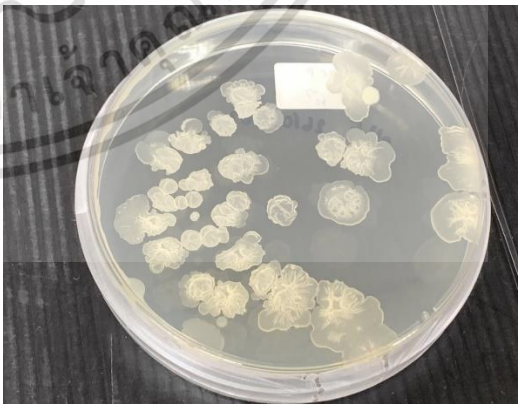
ภาพที่ ค.3.5 เซลล์จากตัวอย่าง ชั่วโมงที่120



ภาพที่ ค.3.6 สปอร์จากตัวอย่าง ชั่วโมงที่120

ค.4 ตัวอย่างการทดสอบสภาวะระบบย่อยอาหารจำลองของเชื้อ *Bacillus coagulans* BC30 และ ATCC 7050 ที่ pH2 ในอาหาร 2x SG ชั่วโมงที่ 8

ภาพที่ ค.4.1 ตัวอย่าง *B. coagulans* BC30 ชั่วโมงที่8



ภาพที่ ค.4.1 ตัวอย่าง *B. coagulans* ATCC7050 ชั่วโมงที่8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ฐิตวันต์ แสนประเสริฐ
วัน เดือน ปีเกิด	24 พฤษภาคม 2541
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี ปีกาศึกษา 2562 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	มัธยมศึกษาตอนปลาย ปีการศึกษา 2558 โรงเรียนลาซาล บางนา
	มัธยมศึกษาตอนต้น ปีการศึกษา 2555 โรงเรียนลาซาล บางนา
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	กรกฎาคม 2562 - สิงหาคม 2562 ห้างหุ้นส่วนจำกัด คิคโคเคน ตำแหน่ง แผนกการควบคุมคุณภาพการผลิต (นักศึกษาฝึกงาน)

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ตรีสุคนธ์ คงประดิษฐ์
วัน เดือน ปีเกิด	9 มีนาคม 2541
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี ปีกาศึกษา 2562 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	มัธยมศึกษาตอนปลาย ปีการศึกษา 2558 โรงเรียนหอวัง ปทุมธานี
	มัธยมศึกษาตอนต้น ปีการศึกษา 2555 โรงเรียนหอวัง ปทุมธานี
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	มิถุนายม 2562 บริษัท เฮสโกโซลูชั่น จำกัด ตำแหน่ง แผนกวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ (นักศึกษาฝึกงาน)

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ปริยากร สอนประเทศ
วัน เดือน ปีเกิด	26 มิถุนายน 2540
ประวัติการศึกษา	โรงเรียนบางพลีพัฒนศึกษาลัย ปี 2543-2551
	โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ ปี 2552-2558
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี 2559-2563
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	กรกฎาคม 2562 - สิงหาคม 2562 ห้างหุ้นส่วนจำกัด คิคโคเคน ตำแหน่ง แผนกการควบคุมคุณภาพการผลิตและแผนกผลิตอาหาร (นักศึกษาฝึกงาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้