

ผลของน้ำย่อยเทียมต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์

Streptococcus thermophilus ในเม็ดเจลชีวภาพ[†]

Effect of artificial gastric juice on survival of lactic acid bacteria strain

Streptococcus thermophilus in biobeads gel

ณัฐวุฒิ มีศิลป์^{1*}, ปฐวีกันต์ ไวยเนตร¹, กฤษณะพงษ์ กุลกานนท์¹

Nutthawut Meesilp^{1*}, Pattaveekan Vaiyanet¹, Kitsanapong Kulkanon¹

¹ สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีราชภัฏนครราชสีมา

¹ Department of Applied Biology, Faculty of Science and Liberal Art, Rajamangala University of Technology Isan, Thailand

*Corresponding author. E-mail: nutthawuth.ms@gmail.com

บทคัดย่อ

แบคทีเรียโปรไบโอติก (Probiotic bacteria) สายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายและสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดสาเหตุจากการท้องร่วง โดยแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่ไม่ถูกห่อหุ้มและห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารอัลจิเนต (Alginate) แล้วเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถตรวจพบกิจกรรมของสารคล้ายแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรีย *S. thermophilus* ได้ทั้ง 2 รูปแบบ ซึ่งสามารถผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* สูงสุดเป็นระยะเวลา 28 วัน ดังนั้น จึงนำกระบวนการดังกล่าวมาพัฒนาเป็นเม็ดเจลชีวภาพประกอบด้วยน้ำเวย์และลิมตะกอนนมที่ได้หลังจากการหมักนมด้วยแบคทีเรีย *S. thermophilus* น้ำเวย์และสารละลายลิมตะกอนนมที่นำมาพัฒนาเป็นเม็ดเจลชีวภาพมีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.0-2.0 มิลลิเมตร เมื่อนำมาทดสอบความเสถียรในน้ำย่อยเทียมของกระเพาะอาหารมีค่าความเป็นกรดรุนแรง (pH 2.0) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดของเม็ดเจลชีวภาพตลอดระหว่างที่ถูกทดสอบและมีปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus* สูงสุด 6.4 log cfu/mL หลังจากทดสอบเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งตรวจสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง de Man Rogosa and Sharpe (MRS) นอกจากนี้เม็ดเจลชีวภาพยังประกอบด้วยโปรตีนจากนมและแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์โดยมีโครงสร้างของอัลจิเนตช่วยป้องกันการถูกทำลายด้วยน้ำย่อยของกระเพาะอาหาร

คำสำคัญ: *Streptococcus thermophilus*, แบคทีเรียกรดแลคติก, การห่อหุ้มเซลล์, เม็ดเจลชีวภาพ, น้ำย่อยกระเพาะอาหาร

ABSTRACT

Probiotic bacteria strain *Streptococcus thermophilus* is classified as lactic acid bacteria. This strain is beneficial to human health and it can produce bacteriocin substances to inhibit growth of several pathogenic bacteria causing diarrhea symptoms. Non-encapsulated cell and encapsulated cell of *S. thermophilus* with alginate was investigated for stability during storage for 28 days at 4 °C. *S. thermophilus* with and without cell encapsulation were similarly detected in the activity of bacteriocin-like substance to inhibit growth of photogenic bacteria strains *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* up to 28 days. Thus, the processes of encapsulation were developed as biobead gel containing whey and milk curd solution from fermented milk with *S. thermophilus*. Biobeads gel exhibited a circular shape containing the average diameters as 1.0-2.0 mm. They were investigated the stability in strong acid (pH 2.0) of artificial gastric juice for 4 hours at 37 °C. Size of biobeads did not decrease during test. *S. thermophilus* population in biobeads gel was detected on de Man Rogosa and Sharpe (MRS) medium by exhibiting the highest bacteria amount as 6.4 log cfu/mL at 4 hours after experiment. This biobead gel contained milk protein and the benefit lactic acid bacteria strain *S. thermophilus* with a structure of alginate encapsulation protecting them survive from gastric juice destroying.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, Lactic acid bacteria, Cell encapsulation, Biobeads gel, Gastric juice

1. บทนำ

แบคทีเรียโปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์สายพันธุ์ *S. thermophilus* จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตส (Lactose) ในน้ำนมชนิดต่างๆ เกิดเป็นกรดแลคติก (Lactic acid) และมีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ เช่น *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆ [1, 2] โดยมีกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกบางชนิดในลำไส้จะช่วย

ย่อยสลายคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) และไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในเลือด ยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ รวมทั้งสามารถสังเคราะห์วิตามินต่างๆ เช่น วิตามิน บี 1, บี 2, บี 6, บี 12, ไบโอติน (Biotin, vitamin H), กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) และ กรดโฟลิก (Folic acid) เป็นต้น [2]

แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารหลายชนิดเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วงด้วยการสร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) เช่น *Vibrio cholerae* และ *Escherichia coli* เป็นต้น ซึ่งสารพิษ

เหล่านี้จะกระตุ้นส่วนของเยื่อเมือกลำไส้ (Mucosal cells) ให้มีการเปลี่ยนแปลงของ Adenosine monophosphate (AMP) ทำให้กระบวนการหลั่งของเหลวภายในเซลล์ลำไส้มีความผิดปกติเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถบุกรุกเข้าไปยังภายในเซลล์ของลำไส้ (Intestinal mucosa) เช่น *Shigella* และ *Campylobacter* เป็นต้น โดยที่เชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนและทำลายเซลล์เยื่อเมือกลำไส้ให้เกิดความเสียหายซึ่งทำให้มีเลือดปนออกมาพร้อมกับอุจจาระ กลุ่มแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่น (Microflora) จะอาศัยอยู่ในส่วนของลำไส้ของมนุษย์ (Human gastrointestinal tract) ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มที่เจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) พบในส่วนทางเดินอาหารส่วนบน เช่น กระเพาะ ลำไส้ส่วนเล็กส่วนต่าง ๆ ได้แก่ Duodenum, Jejunum และ Ileum จะมีแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ปริมาณ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร [3] และในบางครั้งแบคทีเรียประจำถิ่นเหล่านี้สามารถเกิดเป็นเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรค (Opportunistic infection) เมื่อร่างกายของมนุษย์มีความผิดปกติหรืออ่อนแอ

การบริโภคแบคทีเรียโพรไบโอติกทั่วไปจะอยู่ในรูปแบบผงใช้ชงดื่ม ซึ่งจะผ่านกรรมวิธีการทำให้เป็นผงแห้งด้วยอุณหภูมิที่ต่ำมาก (Freeze dry) ถึง -80°C ระหว่างกระบวนการผลิตด้วยอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์แบคทีเรียอย่างมากและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่างเกิดขึ้นอย่างชัดเจน จำเป็นต้องมีการเติมสารปรุงแต่งอื่น ๆ เพื่อช่วยรักษาปริมาณและคุณสมบัติของแบคทีเรียคงไว้ แต่ด้วยสถานะที่เป็นกรดรุนแรงของกระเพาะอาหารสามารถ

ทำลายแบคทีเรียในรูปแบบผงที่รับประทานเข้าไปในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ได้ [4]

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียด้วยวัตถุดิบที่สามารถรับประทานได้ เช่น สารอัลจิเนต (Alginate) ซึ่งสกัดได้จากสาหร่ายจะช่วยให้เกิดโครงสร้างห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตรอดและคงสมบัติต่าง ๆ ไว้เมื่อพบกับภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น กรดรุนแรงของกระเพาะอาหารซึ่งอาจจะทำให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านี้ถูกทำลายจนหมดและลดโอกาสเดินทางไปยังส่วนต่างๆ ของลำไส้ในบริเวณที่แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารสามารถก่อโรคด้วยกลไกต่าง ๆ

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบระยะเวลาที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *S. thermophilus* ยังคงมีประสิทธิภาพในการสร้างสารแบคทีริโอซินระหว่างเก็บที่อุณหภูมิต่ำและผลน้อยยเทียมของกระเพาะอาหารต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารอัลจิเนต นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาให้เป็นเม็ดเจลชีวภาพประกอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. thermophilus* และเพิ่มคุณค่าทางอาหารจากนํ้านมหมักด้วย

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย *S. thermophilus*

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เลือกใช้ในการทดลองได้ผ่านการทดสอบก่อนหน้านี้ พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารคล้ายแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-like substance) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและเจริญได้ดีในนํ้านม [1] โดยนำแบคทีเรียที่แยกเป็นโคลนเดี่ยว ๆ จากอาหารแข็ง MRS (ส่วนประกอบของอาหารต่อนํ้าปริมาตร 1.0 ลิตร; Proteose peptone 10.00 กรัม; Beef extract 10.00

กรัม; Yeast extract 5.00 กรัม; Dextrose 20.00 กรัม; Polysorbate 80 1.00 กรัม; Ammonium citrate 2.00 กรัม; Sodium acetate 5.00 กรัม; Magnesium sulphate 0.10 กรัม; Manganese sulphate 0.05 กรัม; Dipotassium phosphate 2.00 กรัม; Calcium carbonate ร้อยละ 0.10; Agar 15.00 กรัม) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่นแยกเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ทำเป็นกล้าเชื้อ (Inoculum) ในการทดลองต่อไป

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ในการสร้างสารคล้ายแบคทีเรียโอซิน

นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ทำเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 cfu/mL แล้วเติมกล้าเชื้อปริมาณร้อยละ 10 (v/v) ลงสารละลายอัลจินตร้อยละ 4 (w/v) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 3 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง [5] ซึ่งจะได้ลักษณะเป็นเม็ดเจล (Beads) ทั้งไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 7 วัน มาตรวจสอบการสร้างสารคล้ายแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยทำให้เม็ดเจลแตกละเอียดและเติมน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ผสมให้เป็นสารละลายทดสอบประสิทธิภาพของสารคล้ายแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion [6]

2.3 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก *S. thermophilus* ในน้ำย่อยกระเพาะอาหารเทียม

2.3.1 การผลิตนํ้านมหมัก

นำเซลล์แบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่เตรียมไว้ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 cfu/mL ปริมาตรร้อยละ 10 (v/v) เติมนลงในนํ้านมพลาสมาเจอร์ไรส์และผสมให้เข้ากัน นำบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำนํ้านมหมักที่เกิดลิมตะกอนนํ้านม (Curd) มาแยกนํ้าเวย์ออกด้วยการกรองที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะได้ส่วนของนํ้าเวย์และลิมตะกอนของนํ้านมซึ่งนำมาทำเป็นสารละลายเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3.2 การห่อหุ้มแบคทีเรียกรดแลคติก *S. thermophilus* ด้วยนํ้าเวย์และสารละลายลิมตะกอนนํ้านม

นำนํ้าเวย์และสารละลายลิมตะกอนนํ้านมมาตรวจสอบปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus* เริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS และปรับค่าความเข้มข้นแบคทีเรียในสารละลายให้มีปริมาณ 10^8 cfu/mL จากนั้นเติมสารอัลจินตปริมาณร้อยละ 4 (w/v) ที่ปลอดเชื้อ ผสมสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำปฏิกิริยาในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ปลอดเชื้อความเข้มข้น ร้อยละ 3 (w/v) ทั้งไว้เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเม็ดเจลที่สมบูรณ์ ล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อีกครั้งก่อนนำเม็ดเจลไปทดสอบขั้นตอนต่อไป

2.3.3 การเตรียมสารละลายนํ้าย่อยเทียมกระเพาะอาหาร

เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้มีความเข้มข้น 0.03 M และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.084 M ผสมให้เข้ากันแล้วตรวจสอบค่ากรด-ด่าง และปรับค่าให้เท่ากับ 2.0 โดยสารละลายนี้มีลักษณะคล้ายนํ้าย่อยจากกระเพาะอาหารของมนุษย์แต่ไม่มีส่วนประกอบของเอนไซม์ 2 ชนิดคือ

ทริปซิน (Trypsin) และ เพปซิน (Pepsin) [7] จากนั้นทำ
สารละลายให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งด้วยไอน้ำความดันสูง
(Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อ
ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3.4 การทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรีย
S. thermophilus ในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร

เติมสารละลายน้ำย่อยเทียมกระเพาะ
อาหารปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ลง
ให้ท่วมเม็ดเจลปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร (10-15 เม็ด) ซึ่งใน
แต่ละเม็ดเจลจะมีปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus*
เริ่มต้นเฉลี่ย 10^7 cfu/mL จากนั้นนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C
แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 120, 180, และ 240
นาที วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus* บน
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS

2.3.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย
S. thermophilus

นำเม็ดเจลแบคทีเรียแต่ละสูตรปริมาตร
1.0 มิลลิลิตร (3-4 เม็ด) จากแต่ละช่วงเวลามาล้างด้วย
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วตีปั่นให้ละเอียดเป็นเวลา 10 นาที
และทำเป็นสารละลายด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ
ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ตรวจนับปริมาณ
แบคทีเรีย *S. thermophilus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
MRS หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
รายงานผลในหน่วย log cfu/mL

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้
มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS ด้วยวิธีการ
ทดสอบ Duncan

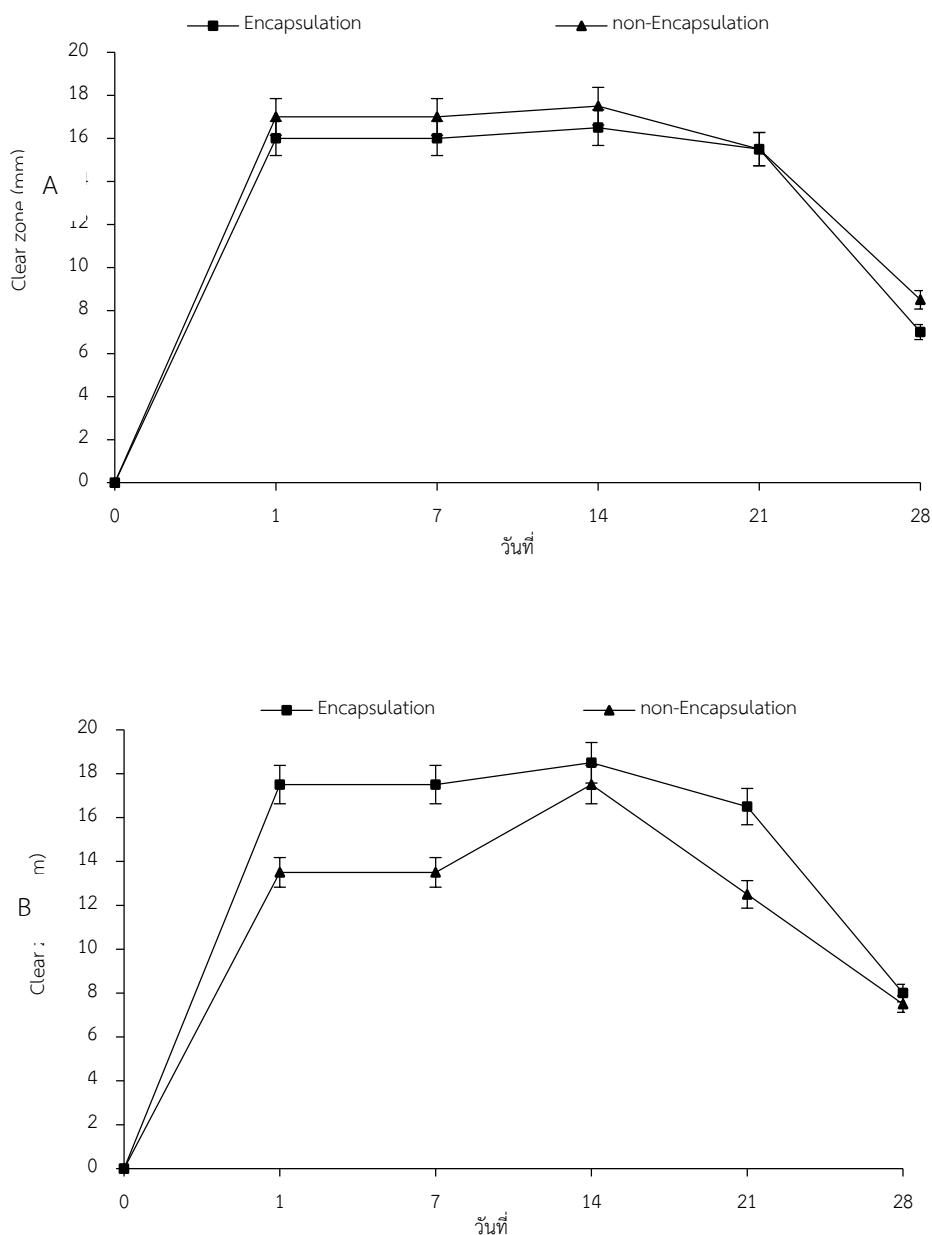
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 ความสามารถของแบคทีเรีย
S. thermophilus ในการสร้างสารคล้ายแบคทีเรียโอซิน

การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์
ได้แก่ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* พบว่า
แบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่ถูกห่อหุ้มและไม่ถูก
ห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารอัลจินเตซึ่งเก็บไว้เป็นระยะเวลา
สูงสุด 28 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 4 °C ยังพบความสามารถ
ในการสร้างสารคล้ายแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรีย
ก่อโรคแกรมลบ *P. aeruginosa* และแบคทีเรียแกรม
บวก *S. aureus* ไม่แตกต่างกันตั้งแต่วันที่ 1-21 วัน
โดยพบกิจกรรมของสารสูงสุดเมื่อเก็บรักษาแบคทีเรีย
S. thermophilus ทั้ง 2 รูปแบบเป็นเวลา 14 วัน
ที่อุณหภูมิ 4 °C และกิจกรรมของสารเริ่มลดลงในวันที่
21 ของการเก็บรักษาแบคทีเรีย *S. thermophilus*
แต่ในวันที่ 28 มีกิจกรรมของสารในการยับยั้ง
แบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่
1A) ในขณะที่ประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย
ก่อโรคสายพันธุ์ *P. aeruginosa* (ภาพที่ 1B) เมื่อใช้
เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มให้เป็นเม็ดเจลมีกิจกรรมยับยั้ง
แบคทีเรียก่อโรค *P. aeruginosa* สูงกว่าการใช้เซลล์
แบคทีเรียปกติ แต่ในวันที่ 14 ของการทดลองพบ
กิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างจาก
เซลล์ *S. thermophilus* มีค่าใกล้เคียงกัน และยังคง
มีกิจกรรมของสารเมื่อเก็บเป็นระยะเวลาสูงสุด
28 วันเช่นเดียวกัน แบคทีเรีย *S. thermophilus* จะ
สร้างสารแบคทีเรียโอซินชนิด Thermophilin ที่เป็น
เปปไทด์ (Peptide) ถูกควบคุมการสร้างด้วยยีน
Bacteriocin-like peptide (*blp* gene) ซึ่งออกฤทธิ์
ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อย่างกว้าง (Broad
spectrum) การสร้างสารแบคทีเรียโอซินขึ้นกับ
สารอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงซึ่งปัจจัยสำคัญ
ในการควบคุมการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้
ได้แก่ แหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน ค่าความเป็น
กรด-ด่าง ฟอสเฟต และความเข้มข้นของไอออน แต่

อย่างไรก็ตามแหล่งของคาร์บอนโดยเฉพาะน้ำตาล
กลูโคสและแลคโตสเป็นปัจจัยหลักที่ส่งเสริม

การเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย
สายพันธุ์นี้ [8]



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่ถูกห่อหุ้ม (Encapsulation) และไม่ห่อหุ้มเซลล์ (non- Encapsulation) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ในการสร้างสารคล้ายแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* (A) และ *P. aeruginosa* (B)

3.2 ความเสถียรและความคงทนของเม็ดเจลชีวภาพ

การห่อหุ้มแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *S. thermophilus* ด้วยสารอัลจินตที่ได้จากสาหร่าย แล้วทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคลอไรด์สามารถเกิดโครงสร้างลักษณะทรงกลมเป็นเม็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเริ่มต้นเฉลี่ย 2.0 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) ซึ่งภายในเม็ดเจลประกอบด้วยโปรตีนที่มาจาก นํ้านมหรือนํ้าเวย์ เมื่อถูกห่อหุ้มสารละลายนํ้าย่อยเทียมกระเพาะอาหารที่เตรียมให้มีความเป็นกรดรุนแรง (pH 2.0) ยังคงมีขนาดของเม็ดเจลเฉลี่ยไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทิ้งไว้เป็นระยะเวลาสูงสุดถึง 4 ชั่วโมง โดยปกติอาหารต่างๆ หลังจากรับประทานจะอยู่ในส่วนของกระเพาะนาน 3-4 ชั่วโมง ก่อนจะ

เดินทางต่อไปยังส่วนของลำไส้ [9] อัลจินตที่ใช้เป็นสารประกอบในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลสายยาว (Polysaccharides) ที่เป็นชนิดแอล-กลูคูโรเนต (L-guluronate) และ ดี-แมนนูโรเนต (D-mannuronate) ช่วยให้สามารถทนต่อภาวะที่เป็นกรดและยังเป็นโครงสร้างภายนอกที่ช่วยปกป้องแบคทีเรียไม่ให้ถูกทำลายจากภาวะไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี [10] สำหรับการห่อหุ้มแบคทีเรีย *S. thermophilus* สามารถใช้วัตถุดิบต่าง ๆ จากธรรมชาติได้หลากหลายชนิดซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เช่น วุ้น (Agar) คาร์ราจีแนน (Carrageenan) เจลไรท์ (Gelrite) และอัลจินต (Alginate) เป็นต้น [11]

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยขนาดของเม็ดเจลชีวภาพในสารละลายกรดเกลือ (นํ้าย่อย) ระยะเวลาต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 °C

การทดลอง	ขนาดเม็ดเจลชีวภาพ (มิลลิเมตร)					
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
เม็ดเจLNํ้านมหมัก	2.0±0.01	1.9±0.05	2.0±0.01	2.0±0.01	1.8±0.07	2.0±0.01
เม็ดเจLNํ้าเวย์	2.0±0.01	2.0±0.01	1.8±0.01	2.0±0.001	2.0±0.01	1.9±0.04

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3 การรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในนํ้าย่อยเทียมกระเพาะอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *S. thermophilus* จัดเป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นบางชนิดเพื่อใช้ในการเจริญ (Fastidious) ซึ่งในนํ้านมประกอบด้วยสารอาหารประเภทโปรตีนต่าง ๆ ในปริมาณสูง [12] เม็ดเจLNํ้านมหมักและนํ้าเวย์มีปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus* เริ่มต้นเฉลี่ยในแต่ละเม็ดเจลเท่ากับ 7.0 log cfu/mL และมีปริมาณเชื้อเท่ากับ

ในช่วงเวลาที่ 0 ของการทดสอบในนํ้าย่อยเทียมกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดเท่ากับ 2.0 เมื่อนำมาทดสอบเป็นระยะเวลานานขึ้นแบคทีเรียในเม็ดเจลเริ่มมีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ แบบคงที่ตั้งแต่ 1-2 ชั่วโมง และมีปริมาณแบคทีเรียคงที่ในช่วงเวลาที่ 3-4 ของการทดสอบ โดยพบปริมาณแบคทีเรียต่ำสุด 6.4 log cfu/mL ที่ 4 ชั่วโมงของการทดสอบเม็ดเจลในนํ้าย่อยเทียมกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 2) แบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปที่ไม่มีโครงสร้างภายนอกช่วยปกป้องเซลล์สามารถทนทานต่อค่าความเป็นกรด

ได้ต่ำสุดเท่ากับ 3.5 แต่เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ในระยะเวลานี้สั้น ๆ โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีค่าเป็นกรดต่ำกว่า 1.5-2.0 พบว่ามีการลดลงอย่างรวดเร็วของปริมาณประชากรแบคทีเรีย เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidases) ที่ถูกผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, และ *L. acidophilus* เป็นสารที่สำคัญทำหน้าที่ช่วยให้แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เป็นกรดได้มาก [13] นอกจากนี้กลไกการสร้างเอนไซม์สำคัญแล้วยังพบสมบัติของแบคทีเรีย *S. thermophilus* มีความสามารถสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide) ที่เป็น Heteropolysaccharide ได้แก่ Galactose, Glucose และ Galactosamine ช่วยให้เกิดความหนืดและคงตัวของน้ำนมหมักซึ่งสมบัติเหล่านี้ของแบคทีเรียเป็นอีกทางเลือกใช้ทดแทนสารต่าง ๆ ที่เติมเพื่อให้เกิดความคงตัวของผลิตภัณฑ์น้ำนมหมัก เช่น Pectin, Alginate, และ Carrageenan เป็นต้น [14] การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยสารอัลจิเนต ซึ่งใช้กัลล่าเชื้อเริ่มต้นในรูปแบบสารละลายลิมตะกอนน้ำนมหมักหรือน้ำเวย์สามารถช่วยปกป้องตัวเซลล์แบคทีเรียให้รอดจากการทำลายด้วยกรดน้ำย่อยเข้มข้นได้ นอกจากนี้ น้ำนมหมักและน้ำเวย์ยังมีสารอาหารประเภทต่าง ๆ และไขมันบางชนิด เช่น Lipoprotein ที่ช่วยปกป้องอีกชั้นจากการถูกทำลายเซลล์ด้วยสารที่เป็นกรด การบริโภคแบคทีเรียโปรไบโอติกหรือแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในรูปแบบผง กรดเกลือหรือน้ำย่อยสามารถทำลายคุณสมบัติบางประการและลดปริมาณแบคทีเรียลงได้

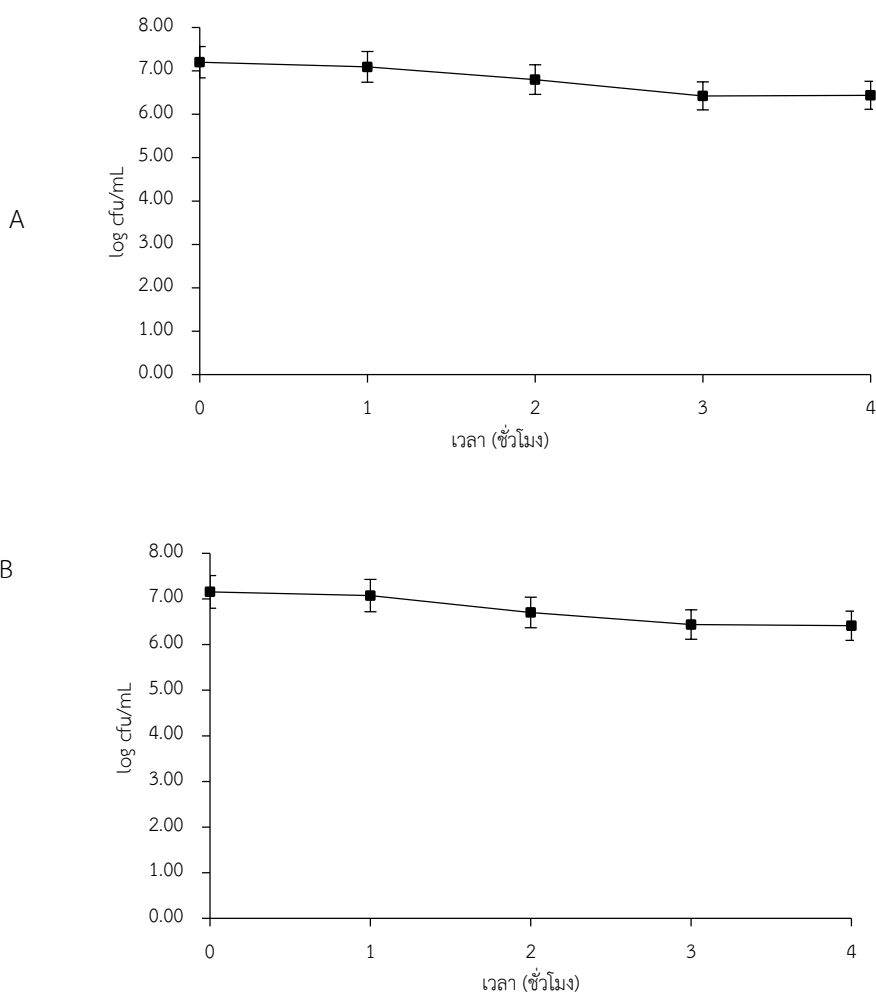
จำนวนมาก รวมทั้งในเม็ดเจลชีวภาพยังประกอบด้วยน้ำนมที่มีโปรตีนปริมาณเฉลี่ย 8 กรัม/240 มิลลิลิตร [15]

โดยทั่วไปหลังจากรับประทานอาหารจะมีการย่อยทางกายภาพด้วยการบดเคี้ยวจากฟันซึ่งจะได้ขนาดของอาหารแข็งที่ผ่านกระบวนการนี้น้อยกว่า 1.0-2.0 มิลลิเมตร [9] หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการย่อยทางเคมีอีกครั้งอยู่ในส่วนของกระเพาะเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วอาหารที่ถูกย่อยบางส่วนจากกระเพาะจะเดินทางไปยังลำไส้เล็กที่มีค่าเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-7.5 ในบริเวณลำไส้เล็กจะเกิดการดูดซึมน้ำและสารอาหาร โดยเกิดกระบวนการย่อยสารขนาดโมเลกุลใหญ่ด้วยการทำปฏิกิริยาของสารและเอนไซม์ ได้แก่ Pancreatic juice, น้ำดี (Bile), และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) ซึ่งใช้เวลา 2.0-5.0 ชั่วโมง ก่อนเดินทางต่อไปยังส่วนลำไส้ใหญ่ที่มีค่ากรดต่าง 5.0-7.0 โดยจะเกิดการหมักของจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งมีการดูดซึมน้ำกลับเข้าสู่ร่างกายส่วนใหญ่จะใช้เวลา 12-24 ชั่วโมง [16] ถ้าหากแบคทีเรียก่อโรคต่าง ๆ สามารถรอดพ้นการทำลายจากกลไกของร่างกาย เช่น น้ำย่อยเอนไซม์ต่าง ๆ จากกระเพาะมายังส่วนลำไส้จะส่งผลให้บริเวณลำไส้เล็กได้รับสารพิษและถูกทำลายเยื่อเมือกของผิวลำไส้ส่งผลให้เสียคุณสมบัติการดูดซึมน้ำเป็นสาเหตุการเกิดอาการท้องร่วงได้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารคล้ายแบคทีเรียโอซิน ที่ถูกสร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ *S. thermophilus* ปริมาณสูงในเม็ดเจลชีวภาพซึ่งสามารถลดการเจริญและจำนวนของประชากรของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ [1]

4. สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *S. thermophilus* มีความสามารถในการสร้างสารคล้ายแบคทีเรียอินทรีย์แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* การนำแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่มีสมบัติดังกล่าวซึ่งพบในสารละลายลิมตะกอนนํ้ามนํ้าเวย์ที่ได้หลังจากการหมักนํ้านมมาห่อหุ้มด้วยสารอัลจิเนตเกิดเป็น

เม็ดเจลชีวภาพช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ไม่ให้ถูกทำลายด้วยน้ำย่อยกระเพาะอาหารที่มีค่าความเป็นกรดรุนแรง (pH 2.0) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายจำนวนมากโดยเฉพาะโปรตีนต่าง ๆ จากนํ้านม ซึ่งสามารถใช้บริโภคเพื่อลดการเกิดอาการท้องร่วงจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาอาการดังกล่าว



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในเม็ดเจลชีวภาพสารละลายลิมตะกอนนํ้านม (A) และนํ้าเวย์ (B) ในนํ้าย่อยเทียมกระเพาะอาหาร (pH 2.0) ระยะเวลาต่างๆ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสาขา
ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี นครราชสีมา

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] ณัฐวุฒิ มีศิลป์, ณัฐวุฒิ สร้อยพิมาย, วรพงษ์
ครูสอนดี และคณะ. ประสิทธิภาพของ
แบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus*
thermophilus ในการผลิตสารละลาย
แบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ
แบคทีเรียก่อโรค. วารสารวิจัย มทร.กรุงเทพ.
2561; 12(2):80-91.
- [2] Sharma R, Bhaskar B, Sanodiya BS, et al.
Probiotic efficacy and potential of
Streptococcus thermophilus modulating
human health: A synoptic review. IOSR J
Pharm Biol Sci. 2014; 9(3):52-8.
- [3] Gorbach SL. Microbiology of the
gastrointestinal tract. In: Baron S, editor.
SourceMedical Microbiology. 4th edition.
Galveston (TX): University of Texas
Medical Branch at Galveston; 1996.
- [4] Kim M, Nam DG, Kim SB, et al.
Enhancement of viability, acid, and bile
tolerance and accelerated stability in
lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with
protective agents. Food Sci Nutr. 2018;
6(7):1-10.
- [5] Sheu TY, Marshall RT, Heymann H.
Improving survival of culture bacteria in
frozen desserts by microentrapment. J
Dairy Sci. 1993;76:1902-07.
- [6] Ivanova I, Miteva V, Stefanova TS, et al.
Characterization of a bacteriocin
produced by *S. thermophilus* 81. Int J
Food Microbiol. 1998; 42:147-58.
- [7] Stefaniak AB, Virji MA, Harvey CJ, et al.
Influence of artificial gastric juice
composition on bio-accessibility of
cobalt- and tungsten-containing
powders. Int J Hyg Environ Health. 2010;
213:107-15.
- [8] Renye JA, Somkuti GA, Garabal JI, et al.
Bacteriocin production by *Streptococcus*
thermophilus in complex growth media.
2016; 38(11):1947-54.
- [9] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties
and biomedical applications. Prog Polym
Sci. 2012; 37(1):106-26.
- [10] Kong F, Singh RP. Disintegration of solid
foods in human stomach. J Food Sci.
2008; 7:67-80.
- [11] Sturino JM, Klaenhammer TR.
Bacteriophage defense systems and
strategies for lactic acid bacteria. Adv
Appl Microbiol. 2004; 56:331-78.
- [12] Yujian W, Xiaojuan Y, Hongyu L, et al.
Immobilization of *Acidithiobacillus*
ferrooxidans with complex of PVA and
sodium alginate. Polym Degrad Stab.
2006; 91:2408-14.
- [13] Shah NP, Jelen P. Survival of lactic acid
bacteria and their lactases under acidic
conditions. J Food Sci. 2006; 55(2):506-9.

- [14] Zhang H, Ren W, Guo Q, et al. Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333. Food Hydrocoll. 2018; 81:220-8.
- [15] Massey LK. Effect of changing milk and yogurt consumption on human nutrient intake and serum lipoproteins. J Dairy Sci. 1984; 67:255-62.
- [16] Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends. Biotechnol. 2012; 30(11):591-600.