

นิพนธ์ฉบับ

คุณสมบัติป้องกันการเสียสมดุลของจำนวนประชากรเชื้อจุลินทรีย์ โดยสารสกัดจากรำข้าวเก่าและข้าวฮางอก

พัชรวิรัช พรสวัสดิ์กุลเดช^{*๑}, สุกัญญา ศรีจำปา^{**๑},
พัชรภรณ์ ทิพย์วัฒน์^{***}, แคทรียา สุทธานุช^{****}

บทคัดย่อ

- บทนำ:** สภาวะขาดความสมดุลของแบคทีเรียชนิดที่มีประโยชน์และชนิดก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (dysbiosis) ในระยะยาวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพที่รุนแรงและอันตรายแก่สุขภาพ เช่น ภาวะท้องเสียหรือท้องร่วง อาหารเป็นพิษ บิด เป็นต้น ที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลากหลายชนิด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ประโยชน์สารสกัดรำข้าวหมักสำหรับปรับภาวะไม่สมดุลของแบคทีเรียชนิดที่มีประโยชน์และชนิดก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (dysbiosis)
- วิธีการศึกษา:** โดยศึกษาผลของสารรำข้าวหมักที่เตรียมจากรำข้าวเก่า (H7_F) และรำข้าวฮางอก (G13_F) ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดดี (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*: LAB) และเชื้อก่อโรคที่พบในลำไส้ (*Escherichia coli*; *E. coli*) ด้วยวิธี broth dilution technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเต็มสูตร (MRS1) และแบบครึ่งสูตร (MRS2) และวิธี flow cytometry
- ผลการศึกษา:** พบว่า H7_F และ G13_F มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ LAB โดยเห็นผลชัดเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS2 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้แตกต่างกัน โดย H7_F แสดงการยับยั้งที่สูงกว่า ที่ความเข้มข้น ๓.๑๒๕ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ LAB ได้ด้วย ส่วนสารสกัด G13_F พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* อย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น ๕๐ และ ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดรำข้าวหมักจากรำข้าวเก่าและข้าวฮางอก น่าจะมีผลมาจากการที่เชื้อ LAB สร้างกรดธรรมชาติ เช่น กรดแลกติก ในระหว่างการหมักข้าว
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดรำข้าวหมักในการปรับสมดุลปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งข้อมูลนี้จะสนับสนุนพัฒนาสารสกัดรำข้าวหมักให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไป
- คำสำคัญ:** พรีไบโอติก, รำข้าว, รำข้าวหมัก, เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก, เชื้อแบคทีเรียเอสเชอริเชีย โคไล

วันที่รับบทความ: ๒๐ กันยายน ๒๕๕๙

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๑ พฤษภาคม ๒๕๖๐

* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ศึกษาศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

^๑ ผู้ประพันธ์หลัก

ผู้ติดต่อ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แคทรียา สุทธานุช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ๔๐๐๐๒ อีเมล cattariq@hotmail.com

บทนำ

ระบบทางเดินอาหารเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ เริ่มต้นจากปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ ทั้งนี้ในระบบทางเดินอาหารมีเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) อยู่ในแต่ละส่วน^๑ ซึ่งปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีผลต่อสมดุลในระบบทางเดินอาหารของแต่ละบุคคล ฉะนั้น การควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารจึงมีความสำคัญยิ่งในการรักษาสมดุลสุขภาพของมนุษย์^๒ ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการรักษาสมดุลและการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นคือ สารอาหารที่ร่างกายมนุษย์ได้รับ^๓ การเสียสมดุลของปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดมีประโยชน์และชนิดก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (dysbiosis) ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหรือความผิดปกติในระบบทางเดินอาหารต่างๆ เช่น ภาวะท้องเสียหรือท้องร่วง อาหารเป็นพิษ บิด เป็นต้น ที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลากหลายชนิด และนำไปสู่การเป็นมะเร็งลำไส้ได้อีกด้วย^๔ รวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ซึ่งในสภาวะปกติจะพบในลำไส้มนุษย์ และไม่ทำให้เกิดโรค ทั้งนี้เป็นเพราะกลไกโดยธรรมชาติที่สามารถป้องกันการติดเชื้อนี้โดยการทำงานของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น แต่เมื่อเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นมีปริมาณที่ลดลง จะทำให้เกิดสภาวะเสียสมดุล ทำให้เยื่อเมือก (mucus) ลดลง และส่งผลให้เชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยอาศัยพิลไล (pili) ได้มากขึ้น จนเกิดการบุกรุกและตั้งรกรากของเชื้อ *E. coli* เพื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในลำไส้เล็ก และยังผลิตเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) จนทำให้เกิดอาการท้องร่วงจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร อาจมีการพัฒนาเป็นโรคท้องร่วงรุนแรงและเข้าสู่กระแสเลือดได้^๕ ดังนั้นการรักษาภาวะสมดุลของปริมาณเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร จึงมีส่วนสำคัญต่อสุขภาพที่ดี ซึ่งจะช่วยป้องกันความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร

อาหารส่งเสริมสุขภาพ กลุ่มผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก (probiotic) เป็นทางเลือกหนึ่งที่พัฒนาโดยนำแบคทีเรียชนิดดีที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมาใช้ เพื่อมาช่วยปรับสมดุลของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร โดยเชื้อที่ได้รับการยอมรับนำมาใช้สำหรับโพรไบโอติก ได้แก่ เชื้อแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*) ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารประเภทหมักดอง นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต^๖ นอกจากนี้ปัจจุบันได้มีการนำพรีไบโอติก (prebiotic) มาเป็นตัวเสริมประสิทธิภาพและกระตุ้นการทำงานของโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารบริเวณลำไส้ใหญ่ การทำงานที่มีประสิทธิภาพของโพรไบโอติกจะทำให้มีการสร้างกรดแลกติก

กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีคุณสมบัติทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยตรงหรือกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายเชื้อก่อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้^๗ ทั้งนี้ พรีไบโอติกมีคุณสมบัติเป็นกลุ่มเส้นใยอาหาร (dietary fibers) เหมือนกับที่พบได้ในอาหารประเภทผักและผลไม้ เช่น สับปะรด กัญชง กระเทียม หอมหัวใหญ่ เป็นต้น

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นอาหารที่มีคุณค่าทั้งในแง่ของโภชนาการและเชิงวัฒนธรรม เป็นอาหารหลักสำหรับประเทศในแถบทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทย ข้าวเป็นพืชที่ได้รับการยอมรับในวงกว้าง มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีสารอาหารสำคัญที่มีผลในการส่งเสริมสุขภาพหลากหลายชนิด เช่น วิตามิน เกลือแร่ ไขมัน โปรตีน เส้นใยอาหาร แคลเซียม แมงกานีส ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม เป็นต้น และข้าวหลากหลายสายพันธุ์ส่งผลให้มีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพมีความแตกต่างกันออกไป แปรผันตามปัจจัยของลักษณะภูมิประเทศและภูมิภาค โดยพบว่ามีการศึกษาถึงประโยชน์ของข้าวและสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของข้าว โดยเฉพาะส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด ที่จะพบมากในส่วนรำข้าว และข้าวกล้อง ว่ามีคุณสมบัติต่อสุขภาพหลายประการ เช่น ลดไขมันในเลือด ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง^๘ และลดการเกิดโรคเรื้อรังชนิดไม่ติดต่อ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าข้าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella sp.* ในระบบทางเดินอาหารได้^๙ โดยการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ น่าจะเกี่ยวข้องกับสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในข้าว โดยพบในส่วนรำข้าวในสัดส่วนที่สูง^{๑๐} เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สารแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ในสารแกมมา-อะมิโนบิวทิริกแอซิด (gamma-aminobutyric acid; GABA) ซึ่งพบมากในข้าวกล้อง และสารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ในข้าวกล้องที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) นอกจากนี้พบว่าสามารถป้องกันโรคหัวใจและไขมันในหลอดเลือดสูง^{๑๑}

ข้าวสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดตามภูมิปัญญาท้องถิ่นเป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกแบบไทย ดังที่รู้จักกันทั่วไปว่า ข้าวหมาก ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้ประโยชน์เทคโนโลยีชีวภาพในการแปรรูปข้าวโดยการหมัก ซึ่งในกระบวนการหมักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารอาหารและองค์ประกอบทางเคมีในวัตถุดิบ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ นอกจากการหมักเมล็ดข้าวแล้ว ยังมีการนำรำข้าวมาหมัก เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติและเพิ่มมูลค่าอีกด้วย โดยพบว่า การหมักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยมีรายงานว่ารำข้าวที่ผ่านการหมักมีสารอาหารเพิ่มขึ้นมากกว่ารำข้าวที่ไม่ผ่านการหมัก^{๑๒} อย่างไรก็ตาม ในการ

ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดที่เกิดจากข้าวหมักยังมีไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของสารสกัดข้าวหมัก โดยทำการศึกษาผลของสารสกัดข้าวหมักที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียตัวแทนของกลุ่มก่อโรค และกลุ่มโพรไบโอติก เพื่ออธิบายถึงศักยภาพและความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ สำหรับส่งเสริมการปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร และนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

วิธีการศึกษา

๑. การเตรียมสกัดข้าวหมัก

การเตรียมข้าวหมัก ใช้ส่วนรำอ่อนของข้าวแต่ละชนิด ได้แก่ รำอ่อนของข้าวเจ้าหมัก (H7) และรำอ่อนของข้าวฮางอก (G13) โดยหมักรำอ่อนของข้าวด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัส (lactic acid bacteria; LAB) ในการหมักเริ่มด้วยการทำพาสเจอร์ไรส์ ข้าวหมักในน้ำที่ทำการปราศจากเชื้ออัตราน้ำต่อข้าว ๒:๑ เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นทำให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำเชื้อ LAB ที่ความหนาแน่น 2.5×10^8 cfu/mL ต่อรำอ่อน ๑ กิโลกรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันหมักที่อุณหภูมิ 37 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง เพื่อให้ได้รำอ่อนของข้าวเจ้าหมัก (H7_F) และรำอ่อนของข้าวฮางอกหมัก (G13_F) จากนั้นเตรียมสารสกัดโดยการแยกเอาสารละลายของเหลวที่ได้จากการหมักด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman® No.1) และปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว ๓,๕๐๐ รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที นำส่วนใสที่ได้จากการสารสกัด (filtrate) ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) และเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท ที่บ่งแสดงที่อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส

๒. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* เลี้ยงใน De Man Rogosa-Sharpe (MRS) broth สภาวะไร้ออกซิเจน และเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เลี้ยงใน tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นเท่ากับมาตรฐาน 0.5 McFarland (ความหนาแน่นเชื้อ 10^8 cfu/mL)

๓. การหาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย LAB โดยวิธี broth dilution technique

การหาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเต็มสูตร (MRS1; MRS ๕๕.๑๕ กรัม ในน้ำกลั่น ๑ ลิตร) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวครึ่งสูตร (MRS2; MRS ๒๗.๕๗๕ กรัม ในน้ำกลั่น ๑ ลิตร) ในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้น (optical

density; OD) ของเชื้อ LAB โดยเติมเชื้อ LAB 2×10^4 cfu/mL ในกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มทดลองที่ผสมสารสกัด H7_F และ G13_F ที่ขนาดความเข้มข้น ๑.๖, ๓.๑๒๕, ๖.๒๕, ๑๒.๕, ๒๕, ๕๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน และวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร

๔. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี well diffusion agar

เจาะหลุม Muller Hilton Agar (MHA) ด้วย cork-borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๖ มิลลิเมตร แล้วลากหรือขีด (streak) เชื้อ *E. coli* ลงบนผิวหน้าของ MHA ให้ทั่ว โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อที่จุ่มเชื้อปรับความเข้มข้นไว้แล้ว บิดหมาด จากนั้นเติมส่วนใสของ MRS broth ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ LAB (supernatant) ลงในหลุม ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร และใช้ MRS broth เป็นตัวควบคุม (negative control) และใช้ยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) ๕ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นยามาตรฐาน (positive control) โดยทดสอบตัวอย่าง ๓ ซ้ำ แล้วนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ตรวจวัดผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนียซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm) และแปลผลการยับยั้งเทียบกับ negative control

๕. การทดสอบการสร้างกรดแลกติกของเชื้อ LAB ที่แยกได้จากข้าวหมัก

การทดสอบการสร้างกรดแลกติกของเชื้อ LAB ที่แยกได้จากข้าวหมัก H7_F และ G13_F เทียบกับเชื้อ LAB ตั้งต้น เพื่อให้ทราบว่าในกระบวนการหมักข้าวส่งผลต่อการผลิตกรดของเชื้อ LAB หรือไม่ ซึ่งทดสอบโดยใช้โบโรโมครีซอลเพอร์เพิล อะการ์ (Bromocresol purple (BCP) agar) เป็นตัวบ่งชี้สภาวะกรดได้ การแยกเชื้อ LAB จากข้าวหมักซึ่งทำได้โดยการลากหรือขีด (streak) เชื้อ LAB ลงบน MRS agar แล้วแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ LAB นั้น เพื่อแต่ละลงบน BCP agar นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ในกรณีที่เชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกของ BCP agar จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ จึงทำการวัดขนาดโซนสีเหลืองที่เกิดขึ้น

๖. การตรวจวิเคราะห์การมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยเทคนิค flow cytometry

เตรียมสารสกัดสำหรับการทดสอบในรูปสารละลายโดยวิธี 2-fold-dilution โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นตัวทำละลาย เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด ๑.๖, ๓.๑๒๕, ๖.๒๕,

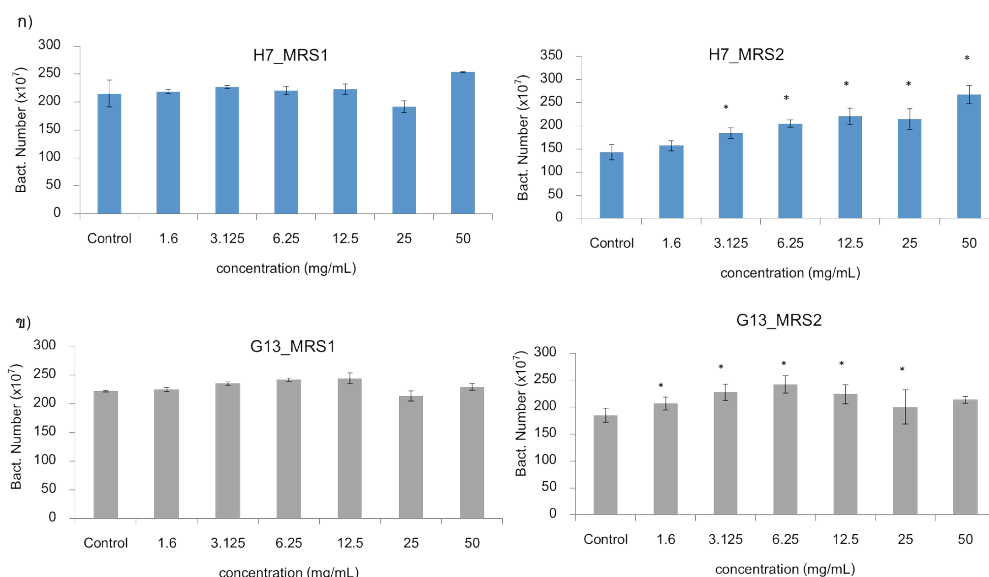
๑๒.๕, ๒๕, ๕๐, ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายของตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ผสมกับเชื้อ *E. coli* โดยจำนวนเชื้อ 2×10^4 cfu/mL ในอัตราส่วน ๑:๑ แล้วนำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง โดยทำการศึกษาร่วมกับการเชื้อ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (ที่ไม่มีสารสกัด) เมื่อครบเวลา ๒๔ ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) โดยเครื่องจะรายงานผลเป็นจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิต คือแบคทีเรียที่ติดสีไทอะโซลออเรนจ์ (thiazole orange) และจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ตาย คือ แบคทีเรียที่ติดสี propidium iodide ที่เป็นผลมาจากสารสกัดรำข้าวหมักที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อเชื้อ โดยแต่ละตัวอย่างทำการศึกษา ๓ ซ้ำ แล้วทำการคำนวณค่า %viability เทียบกับกลุ่มควบคุม (%viability = จำนวนเชื้อที่มีชีวิตในกลุ่มตัวอย่าง $\times$ ๑๐๐ / จำนวนเชื้อที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุม)

ผลการศึกษา

๑. การเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี broth dilution technique

ในการศึกษาเริ่มต้น เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดรำข้าวหมักต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

LAB ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเต็มสูตร (MRS1) และครึ่งสูตร (MRS2) ที่มีส่วนผสมของสารสกัดรำข้าวหมักของข้าวเก่า (H7_F) และสารสกัดรำข้าวหมักของข้าวฮางอก (G13_F) ที่ค่าความเข้มข้นที่ ๑.๖, ๓.๑๒๕, ๖.๒๕, ๑๒.๕, ๒๕, ๕๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาบ่มเพาะเชื้อ LAB ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ใช้เป็นอาหารควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารสกัด) จากผลการศึกษา พบว่าเชื้อ LAB มีชีวิตและเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งแบบ MRS1 และ MRS2 ที่มีสารสกัด H7_F หรือ G13_F เป็นส่วนประกอบ โดยในการศึกษาโดยใช้สูตรอาหารแบบ MRS2 พบว่ารำข้าวหมักทั้งสองชนิด มีคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณเชื้อ LAB ในทุกความเข้มข้น และมีลักษณะการเพิ่มจำนวนของเชื้อตามความเข้มข้นของสาร (dose dependence) ในสารสกัด H7_F (รูปที่ ๑) ขณะที่การศึกษาโดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ MRS1 สามารถควบคุมการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ แต่ไม่สามารถแสดงผลของสารสกัดรำข้าวหมักต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อ LAB ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นผลการศึกษาชี้ให้เห็นความสามารถของสารสกัดรำข้าวหมัก H7_F และ G13_F ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และมีชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยการศึกษาในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อแบบครึ่งสูตร MRS2 แสดงผลได้ชัดเจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเต็มสูตร MRS1



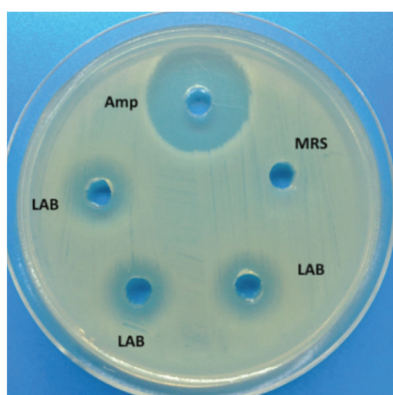
รูปที่ ๑ ปริมาณเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ที่เจริญและคงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเต็มสูตร (MRS1) และครึ่งสูตร (MRS2) ณ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด H7_F (ก) และ G13_F (ข) การเจริญของเชื้อ LAB มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มควบคุม (เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน MRS ไม่มีสารสกัดรำข้าวหมัก; control) โดยเห็นได้ชัดเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS2 และแสดงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < ๐.๐๕)(*)

๒. ผลของการเจริญเติบโตของ LAB ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ด้วยกลไกการผลิตรกตก

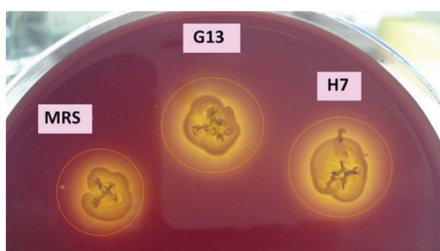
การทดสอบผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี well diffusion agar เพื่อทดสอบความสามารถในการต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค *E. coli* ของเชื้อ LAB โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ LAB เติบเรียบร้อยแล้วมาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* พบว่า อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ (รูปที่ ๒ ก) โดยทำให้วงใส (inhibition zone) ขนาด 10 ± 1 มิลลิเมตร ในขณะที่กลุ่มควบคุม (MRS broth) ไม่พบวงใส

การยับยั้งการเจริญดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเชื้อ LAB ผลิตสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ออกมาใน

อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกลไกหนึ่งของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นของ LAB น่าจะมาจากการที่เชื้อ LAB สร้างกรดธรรมชาติ เช่น กรดแลกติก ซึ่งในการศึกษานี้ได้พิสูจน์คุณสมบัติของ LAB ที่เจริญเติบโตในสารสกัดข้าวหมักของข้าวทั้ง ๒ ชนิด ซึ่งพบการสร้างกรดแลกติกของเชื้อ LAB ที่แยกได้จากข้าวหมักของข้าวเก่าและข้าวฮางอกหมักมาทดสอบใน BCP agar พบว่าบริเวณรอบเชื้อ LAB ที่ผ่านการหมักเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองซึ่งเป็นแสดงถึงสภาวะความเป็นกรด (รูปที่ ๒ ข) จึงทำให้ทราบว่าข้าวหมักของข้าวทั้ง ๒ ชนิดมีคุณสมบัติสามารถส่งเสริมการสร้างกรดแลกติกของ LAB เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ LAB ที่เลี้ยงใน MRS broth ที่ไม่มีสารสกัดข้าวหมัก



ก. Well diffusion agar



ข. Bromocresol purple agar

วงใส (เส้นผ่านศูนย์กลาง; มิลลิเมตร)	
Amp	๒๐
MRS	ไม่พบ
LAB	๘

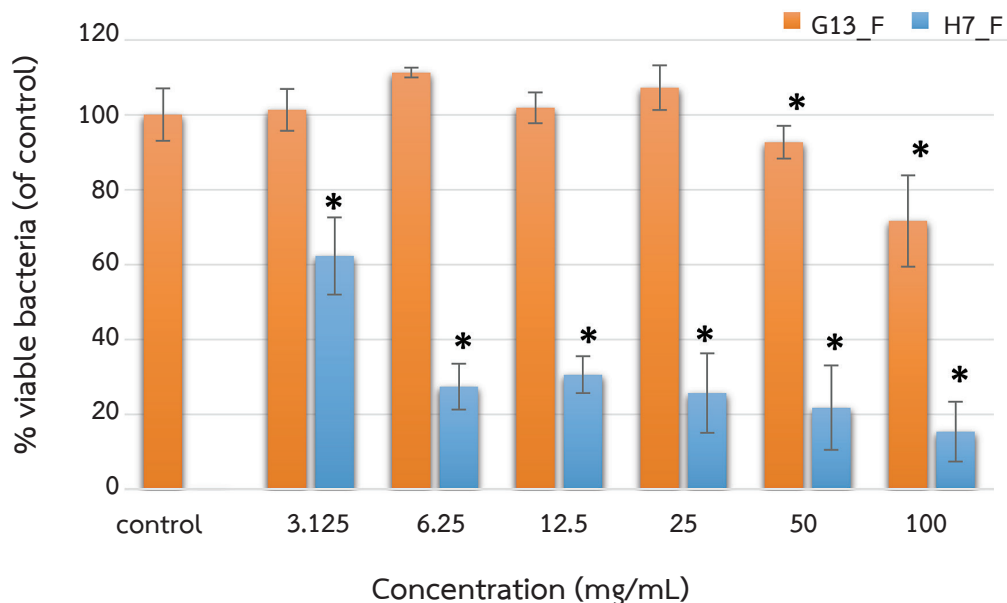
การเปลี่ยนแปลง จากสีแดง → สีเหลือง	
MRS	+
H7	++
G13	++

รูปที่ ๒ ก) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Well diffusion agar ของ MRS broth ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ LAB (MRS: MRS ที่ปราศจากเชื้อ, LAB: MRS broth ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ LAB, Amp: ampicillin ๕ ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)
 ข) การทดสอบการสร้างกรดแลกติกของเชื้อ LAB ด้วย Bromocresol purple agar (BCP agar) เป็นตัวบ่งชี้สภาวะกรดที่ถูกผลิตโดยเชื้อ LAB (MRS: เชื้อ LAB ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, H7_F: เชื้อ LAB ที่ได้จากข้าวหมักของข้าวเก่า, G13_F: เชื้อ LAB ที่ได้จากข้าวหมักของข้าวฮางอก) เมื่อ ๐ = ไม่เปลี่ยนสี; + = เปลี่ยนสีน้อย; ++ = เปลี่ยนสีมาก

๓. การวิเคราะห์ปริมาณของสารสกัดการร่ำข้าวหมักต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ด้วยเทคนิค flow cytometry

การตรวจวัดผลของสารสกัดการร่ำข้าวที่ผ่านการหมัก การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* ด้วยเครื่อง flow cytometer โดยนำสารสกัดการร่ำข้าวของข้าวเก่าที่หมัก (H7_F) และสารสกัดการร่ำข้าวของข้าวฮางอกที่หมัก (G13_F) ที่ความเข้มข้น ๓.๑๒๕, ๖.๒๕, ๑๒.๕, ๒๕, ๕๐, ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับเชื้อ *E. coli* โดยกลุ่มควบคุม คือ *E. coli* ใน MRS broth ที่ไม่เติมสารสกัด พบว่าสารสกัด H7_F สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น

และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ที่ความเข้มข้น ๓.๑๒๕ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่เฉลี่ยร้อยละ 62.17 ± 10.35 ของกลุ่มควบคุม ส่วนสารสกัด G13_F พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น ๕๐ และ ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่เฉลี่ยร้อยละ 51.63 ± 4.35 และ 71.63 ± 12.23 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ และจากผลการทดลองทำให้เห็นว่าสารสกัดการร่ำข้าวเก่า (H7_F) มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้สูงกว่าสารสกัดการร่ำข้าวฮางอก (G13_F)



รูปที่ ๓ ร้อยละของเชื้อ *E. coli* ที่มีชีวิตอยู่ที่ความเข้มข้น ๓.๑๒๕, ๖.๒๕, ๑๒.๕, ๒๕, ๕๐, ๑๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัด H7_F และ G13_F เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน tryptic soy broth ไม่มีสารสกัดการร่ำข้าวหมัก; control) (* $p\text{-value} < 0.05$)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

ข้าวเก่าและข้าวฮางอก เป็นข้าวที่มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยเฉพาะระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของข้าว ซึ่งข้าวเก่า มีสีของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นกลุ่มของฟลาโวนอยด์มีประโยชน์ต่อร่างกายในการช่วยปรับสมดุลในระบบลำไส้ โดยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค^{๑๑} ส่วนข้าวฮางอก เป็นข้าวเปลือกที่

ผ่านการแช่น้ำเพื่อให้รากงอก ซึ่งเป็นส่วนที่สะสมปริมาณสารอาหารที่โดดเด่น คือ กรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (gamma-aminobutyric acid; GABA) ซึ่งมีรายงานประโยชน์ของข้าวฮางอกต่อร่างกาย ได้แก่ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคมะเร็งและป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ อย่างไรก็ตามการศึกษามูลของข้าวต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมีค่อนข้างจำกัด

วิธีการเตรียมสารสกัดจากรำข้าวที่ได้จากการหมัก ซึ่งเป็นภูมิปัญญาในการถนอมและรักษาคุณค่าโภชนาการของอาหารไว้ ทำให้สามารถเก็บอาหารไว้ได้นานขึ้น รวมถึงในกระบวนการหมักทำให้มีการเปลี่ยนทางชีวเคมีของสารอาหารและองค์ประกอบทางเคมี ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสารอาหารให้มีขนาดเล็กลงทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้ในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์^{๑๖} เช่น การผลิตน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กรดจากธรรมชาติ และรักษาสารฟีนอลิกไว้ ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์ต่อร่างกาย^{๑๗} และทำให้สารอาหาร GABA มีปริมาณมากขึ้น^{๑๘} และเมื่อนำมาทำเป็นรำข้าวหมัก จะทำให้สามารถรักษาคุณค่าโภชนาการไว้ได้ อย่างไรก็ตามรายงานเกี่ยวกับผลต่อเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากรำข้าวมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งผลการศึกษา^{๑๙} จะเป็นหลักฐานที่ช่วยอธิบายความสามารถและผลของสารสกัดจากรำข้าวที่เตรียมได้ด้วยวิธีหมัก ว่ามีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ได้อย่างไร โดยพบว่าสารสกัดรำข้าวหมักมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก แต่ยับยั้งเชื้อ *E. coli* แบบอ่อนๆ โดยอาจจะเกี่ยวกับการผลิตสารอาหารโมเลกุลขนาดเล็กขึ้นในกระบวนการหมัก เช่น กรดแลกติก และสารอื่นๆ ได้แก่ เปปไทด์ น้ำตาล และสารแบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าเชื้อ LAB มีความสามารถในการผลิตสารประกอบชนิดอื่นอีกด้วย เช่น ไดอะซีทิล (diacetyl) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคทีเรียโอซิน หรือแบคทีเรียซิดัลโปรตีน (bactericidal proteins)^{๒๐} ซึ่งผลจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าในเชื้อ LAB สามารถสร้างกรดแลกติกในกระบวนการหมักรำข้าว และน่าจะส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli* จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงโอกาสในการนำไปใช้เพื่อปรับสมดุลของเชื้อในลำไส้ได้อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเชิงลึกในสัตว์ทดลอง เพื่อบอกถึงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดรำข้าวหมัก

จากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลของสารสกัดที่ได้จากการหมักรำข้าวเก่า (H7_F) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (pathogens) อย่างเช่นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการหมักรำข้าวฮางอก (G13_F) โดยคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่พบในรำข้าวเก่า ข้อสันนิษฐานดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากรายงานการวิจัยก่อนหน้า ซึ่งรายงานโดย Parker และคณะ (ปี ค.ศ. ๒๐๑๔) โดยพบผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในผลไม้ที่มีสารแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบ^{๒๑}

จากผลการศึกษาในสารสกัดจากรำฮางอก G13_F พบว่าส่งผลต่อการเจริญของเชื้อทำนองเดียวกันกับสารสกัดรำข้าวเก่า โดยมีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ตามความเข้มข้นสารสกัดเพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* อยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญ^{๒๒} และสารสกัดรำข้าวฮางอกหมัก (G13_F) มีฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ตามความเข้มข้นสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (dose dependent manner) ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับค่าความเป็นกรดต่างของสารสกัดรำข้าวฮางอกหมัก ที่อาจจะเพิ่มความเป็นกรดและเกิดสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ^{๒๖}

จากการศึกษานี้ ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดรำข้าวมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตและการมีชีวิตอยู่ของโพรไบโอติก *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ซึ่งน่าจะมีผลมาจากปริมาณสารอาหารที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดรำข้าวทั้งสองชนิด ข้าวเก่าหมัก (H7_F) และข้าวฮางอกหมัก (G13_F) ซึ่งมีรายงานไว้ว่า ในรำข้าว มีสารอาหารหลักที่เป็นองค์ประกอบได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ ๓๔ - ๖๒) โปรตีน (ร้อยละ ๑๑.๓ - ๑๔.๙) และไขมัน (ร้อยละ ๑๕.๐ - ๑๙.๗)^{๒๓} โดยมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าองค์ประกอบชนิดอื่นซึ่งเป็นสารอาหารที่เชื้อ LAB สามารถเปลี่ยนแปลงให้เกิดการผลิตกรดแลกติกในกระบวนการหมักได้ ด้วยปฏิกิริยา คาร์โบไฮเดรตเมทาบอลิซึมและลิพิดเมทาบอลิซึม ดังจะไปเพิ่มความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อและ pH ที่เหมาะสมจึงส่งเสริมต่อการเจริญของเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis*^{๒๖}

นอกจากนี้ในการพิสูจน์คุณสมบัติของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดดี จึงทำการทดสอบส่วนผสมรำข้าวอ่อนหมักในสองสูตร ได้แก่ MRS1 เป็นสูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แบบเต็มสูตรรวมกับการเติมสารสกัดจากรำข้าวอ่อนหมัก และ MRS2 เป็นสูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แบบครึ่งสูตรรวมกับการเติมสารสกัดจากรำข้าวอ่อนหมัก ซึ่งพบว่า MRS2 มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ได้ดีกว่า MRS1 และพบการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้ใน MRS2 ของ H7_F (H7_MRS2) ในลักษณะแปรผันตามขนาดของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และมีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อสูงกว่า G13_F ในอาหารสูตรเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ ๑ จากความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจากรำข้าวหมักสองชนิด ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างกันของสารสำคัญในข้าว โดยมีรายงานองค์ประกอบทางเคมีของข้าวที่น่าจะนำไปสู่การศึกษาวิจัย

เชิงลึกและการอธิบายผลต่อการเจริญของเชื้อ LAB ที่ชัดเจนมากขึ้นในอนาคต ดังได้มีรายงานว่าข้าวฮางอก จะมีสาร GABA เส้นใยอาหาร วิตามินอี แมกนีเซียม โพแทสเซียม สังกะสี สารแกมมาโอริซานอล (γ -oryzanol) และเอนไซม์โปรลิลเอนโดเพปติเดส (prolyl endopeptidase; PE) ในปริมาณสูง^{๓๔} ขณะที่ข้าวกล้องมีวิตามินอี ชนิดโทโคเฟอร์รอล (tocopherols) และโทโคไตรอีนอล (tocotrienol) แกมมาโอริซานอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid)^{๓๕} จากการศึกษาของ Macek และคณะ รายงานว่าการหมักข้าวทำให้มีกรดอะมิโนซึ่งสารประกอบเคมีพื้นฐานปริมาณที่สูงขึ้น เช่น กรดอะมิโน เซอรีน (serine) ทรีโอนีน (threonine) และไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต^{๓๖} และอาจจะมีผลถึงส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของคณะนักวิจัย (ไม่แสดงผล) ซึ่งพบว่าสารสกัดข้าวหมักที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีนสูง (มากกว่าสารสกัดข้าวที่สกัดได้ด้วยน้ำและเอทานอล) และพบว่าสารสกัดข้าวหมักส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าข้าวหมัก (H7_F) มีปริมาณไขมันเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นสารอาหารอีกชนิดหนึ่งสำหรับการเจริญของเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ดังผลการศึกษาพบว่าสารสกัดข้าวหมัก (H7_F) ส่งผลให้อัตราการเจริญของเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ที่สูงกว่า G13_F

นอกจากนี้ ในการเจริญเติบโตของเชื้อ LAB ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก เนื่องจาก LAB เป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อลำไส้และระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีส่วนในการควบคุมเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร^{๓๗} จากการทดสอบเบื้องต้นครั้งนี้ พบฤทธิ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ LAB สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อตัวอย่างของเชื้อก่อโรคที่มีความสามารถทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ แสดงให้เห็นว่า LAB ที่เจริญเติบโตขึ้นสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยสอดคล้องกับงานของ Gilliland และคณะ ที่พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *Clostridium perfringens*) และแกรมลบ (*E. coli* และ *S. typhimurium*) โดยเชื้อกลุ่ม LAB^{๓๘} ที่เกิดจากคุณสมบัติของเชื้อในการผลิตกรดแลกติก ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli*^{๓๙} โดยเชื้อที่ใช้ในการศึกษามีคุณสมบัติการสร้างกรดแลกติกและยังมีแนวโน้มการสร้างกรดแลกติกในปริมาณที่เพิ่มขึ้นหลังจากเชื้อ

ผ่านกระบวนการหมักข้าวทั้งสองชนิด นอกจากนี้เชื้อ LAB ยังมีความสามารถในการผลิตสารประกอบชนิดอื่นอีกด้วย เช่น ไดอะซีทิล ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียโอซิน หรือแบคทีเรียซิดัล โปรตีน^{๔๐} ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

และในการศึกษานี้ ใช้ส่วนรำอ่อนเพื่อมาเตรียมสารสกัดข้าวหมัก ซึ่งส่วนรำอ่อนเป็นส่วนผลิตผลพลอยได้ (by-products) ที่เป็นแหล่งรวมของสารอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเส้นใยที่ละลายน้ำ (water soluble fiber) ในปริมาณสูง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าทำให้ได้สารสกัดข้าวหมักที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกและใช้ปรับสมดุลของเชื้อได้ โดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียชนิดดี *L. delbrueckii* subsp. *lactis* และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยที่สารสกัดข้าวหมักของข้าวกล้อง (H7_F) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ซึ่งอาจมีผลจากความเป็นกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักด้วยเชื้อ LAB และส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ อนุพันธ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids derivatives) เช่น สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ยึดเกาะบริเวณผนังลำไส้ (epithelial cell)^{๔๑} ในส่วนของข้าวฮางอกเมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วมีสารประกอบบางชนิดเพิ่มขึ้น^{๔๒} ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย LAB จึงทำให้ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* แบบอ่อนๆ

ดังนั้น การศึกษานี้ได้ชี้ให้เห็นคุณสมบัติของข้าวหมักที่ถูกนำมาหมักด้วยวิธีภูมิปัญญาไทยจากกระบวนการผลิตข้าวหมักโดยการใช้อุณหภูมิในการหมัก ซึ่งสารสกัดที่ได้จากการหมักทั้งข้าวกล้อง (H7_F) และข้าวฮางอก (G13_F) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการมีชีวิตของ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* และเสริมการผลิตกรดธรรมชาติ อาทิเช่น กรดแลกติก (lactic acid) ทำให้ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป นอกจากนี้ สารสกัดข้าวหมักมีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อ *E. coli* อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบในสารสกัดจากรำหมักของข้าวกล้อง (H7_F) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ ๓.๑๒๕ มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ LAB ได้อีกด้วย

จากข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดรำอ่อนของข้าวที่เกิดจากการหมัก อาจสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นพรีไบโอติกเพื่อเสริมสร้างสมดุลจุลินทรีย์ในกระเพาะและลำไส้ และเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากข้าว เพื่อปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหารได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) คณะเภสัชศาสตร์ และคณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

๑. Vyas U, Ranganathan N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:1-16.
๒. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 2009;15:1546-58.
๓. Tannock GW, Savage DC. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1974;9:591-8.
๔. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 2015;26:261-91.
๕. ไชยสุต ไชยวัฒน์. โพรไบโอติกจุลินทรีย์ทางเลือกสุขภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก. กระทรวงสาธารณสุข; ๒๕๕๖. หน้า ๕๔-๘๓.
๖. Foligné B, Daniel C, Pot B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:284-92.
๗. Cicero AFG, Gaddi A. Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phyther Res* 2001;15:277-89.
๘. Kumar A, Henderson A, Forster GM, Goodyear AW, Weir TL, Leach JE, et al. Dietary rice bran promotes resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonization in mice. *BMC Microbiol* 2012;12:71.
๙. Moongngarm A, Saetung N. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem* 2010;122:782-8.
๑๐. Sompong R, Siebenhandl-Ehn S, Linsberger-Martin G, Berghofer E. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chem* 2011;124:132-40.
๑๑. Parkar SG, Redgate EL, McGhie TK, Hurst RD. In vitro studies of modulation of pathogenic and probiotic bacterial proliferation and adhesion to intestinal cells by blackcurrant juices. *J Funct Foods* 2014;8:35-44.
๑๒. Camilli A, Bassler LB. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006;311:1113-6.
๑๓. Ghosh K, Maity C, Adak A, Halder SK, Jana A, Das A, et al. Ethnic preparation of haria, a rice-based fermented beverage, in the province of lateritic West Bengal, India. *Ethno Bot Res* 2014;12:39-49.
๑๔. Mezaini A, Chihib NE, Dilmi BA, Nedjar AN, Hornez JP. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. *J Environ Public Health* 2009;678:495-501.
๑๕. Small P, Blankenorn D, Welty D, Zinser E, Slonczewski LJ. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *J Bacteriol* 1994;176:1729-37.
๑๖. Rault A, Bouix M, Beal C. Cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CFL1 is influenced by the physiological state during fermentation. *Int Dairy J* 2010;20:792-9.
๑๗. Babu D. Short technical communication evaluation of brown rice and germinated brown rice as an alternative substrate for probiotic food formulation using *Lactobacillus* spp. isolated from goat milk. *Internation Food Research Journal* 2013;20:2967-71.
๑๘. Latifah SY, Armania N, Tze TH, Azhar Y, Nordiana AH, Norazalina S, et al. Germinated brown rice (GBR) reduces the incidence of aberrant crypt foci with the involvement of beta-catenin and COX-2 in azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr J* 2010;9:16.

๑๘. Parrado J, Miramontes E, Jover M, Gutierrez JF, Collantes de Terán L, Bautista J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chem* 2006;98:742-8.
๑๙. Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, et al. The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:697-707.
๒๐. Gilliland SE, Speck ML. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J Food Prot* 1977;40:820-3.

Abstract

Dysbiosis preventing property of rice bran extract from glutinous black rice and germinated brown rice
Patcharavirun Pornsawadkhundech^{*1}, Sukanya Srijampa^{**1}, Patcharaporn Tippiyawat^{***},
Khaetthareeya Sutthanut^{****}

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

** Biomedical Sciences, Graduate School, Khon Kaen University

*** Division of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

**** Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

¹ Co-first authorship

Corresponding author: Assist. Prof. Khaetthareeya Sutthanut, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University Muang, Khon Kaen 40002 E-mail: cattariq@hotmail.com

Introduction: Dysbiosis is an intestinal disorder caused from imbalance populations of microbes species between health beneficial macrobiotics and pathogenic macrobiotics. The chronic persistence of this could lead to various gastrointestinal pathology related to infections such as diarrhea, food poisoning, dysentery. Therefore, the purpose of this research was to investigate the feasibility in using of fermented rice bran extracts for prevention and treatment of dysbiosis.

Method: The effects of fermented rice bran (FRB) obtained from black rice (H7_F) and germinated brown rice (G13_F) on growth of intestinal probiotic (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*; LAB) and pathogenic representative bacteria (*Escherichia coli*; *E. coli*) were determined using broth dilution technique using complete formula (MRS1) and half formula nutrient broth (MRS2) and flow cytometry.

Result: The results showed prebiotic properties of both H7_F and G13_F as found of growth promoting effect to LAB that obviously demonstrated in MRS2. In contrast, inhibition of *E. coli* growth of both H7_F and G13_F was differently detected, in which, H7_F showed stronger inhibitory effect with significant concentration at 3.125 mg/mL. In contrast, G13_F exhibited inhibition on *E. coli* growth with significance at concentration of 50 and 100 mg/mL. This growth inhibitory effects found in both H7_F and G13_F was related to producing of lactic acid, a natural acid, by LAB in fermentation process.

Discussion and Conclusion: The overall results indicated the potential of FRB extract in applications for dysbiosis prevention and treatment. This data has supported FRB to be further developed as health promoting product.

Key words: Prebiotics, Rice bran, Fermented rice bran, Lactic acid bacteria, *Escherichia coli*