



การศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตจาก
จุลินทรีย์ *BACILLUS SIAMENSIS* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง

ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

การศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอดีทในรูปของดีแวนที่ผลิตจาก
จุลินทรีย์ *BACILLUS SIAMENSIS* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง



ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

A STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF PREBIOTIC (LEVAN)-PRODUCING
BACILLUS SIAMENSIS AND SKIN-AFFECTING CONDITIONS FOR POTENTIAL
APPLICATION IN COSMETICS.



NATTHIWUT TRAIOSOT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF ENGINEERING
IN BIOENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
BURAPHA UNIVERSITY

2021

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ฌัฐวุฒิ ไตรโอสถ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

จิตรล ไลน์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ่มเอียด)

ศษญญา นสาริภทวถ์กร ประธาน

(ดร.ศรีัญญา เหล่าวิทยางค์กูร)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อนัน

(ดร.สันติ โพธิ์ศรี)

จิตรล ไลน์ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ่มเอียด)

อนัน กรรมการ

(ดร.สันติ โพธิ์ศรี)

อนัน กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ญาณิสา ละอองอุทัย)

อนัน

คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณยศ คุรุกิจโกศล)

วันที่ ๑๕ เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๔

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย
บูรพา

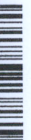
อนัน

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.นุจรี ไชยมงคล)

วันที่ ๒๑ เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๔

3411930078



BUU iThesis 61910023 thesis / recv: 27052564 11:22:18 / seq: 11

61910023: สาขาวิชา: วิศวกรรมชีวภาพ; วศ.ม. (วิศวกรรมชีวภาพ)

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ, ความเป็นพิษระดับเซลล์, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, ลิแวน, ลิแวนไฮโดรไลเซต, ความสามารถในการละลายน้ำและน้ำมัน, ความสามารถในการอุ้มน้ำ

ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ : การศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *BACILLUS SIAMENSIS* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง. (A STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF PREBIOTIC (LEVAN)-PRODUCING *BACILLUS SIAMENSIS* AND SKIN-AFFECTING CONDITIONS FOR POTENTIAL APPLICATION IN COSMETICS.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิทวัส แจ่มเอี่ยม, สันติ โพธิ์ศรี ปี พ.ศ. 2564.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ลิแวนไฮโดรไลเซตสามารถยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงสุดที่ 31.35% และ 69.65% ที่ความเข้มข้น 250 และ 125 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ อีกทั้งการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (NHDF) แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5 ถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ซึ่งให้เห็นว่าลิแวนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 15.62 ถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ไม่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีผลต่อการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) อีกทั้งยังมีการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ได้ด้วย จากนั้นทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด (A549) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) ผลการทดลองพบว่า สารลิแวนจาก *Bacillus siamensis* มีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด โดยสามารถยับยั้งได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* มีค่าความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และค่าความสามารถการละลายในน้ำมัน (OSI) เท่ากับ $95.93 \pm 10.75\%$ และ $98.84 \pm 303.07\%$ ตามลำดับ มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) ที่ $182.71 \pm 202.27\%$ ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลิแวนสามารถกักเก็บน้ำและละลายในตัวทำละลายได้ดี

61910023: MAJOR: BIOENGINEERING; M.Eng. (BIOENGINEERING)

KEYWORDS: Antioxidant Cytotoxicity Anti-inflammatory Anticancer Levan Levan-hydrolysate Water and Oil solubility index Water-holding capacity

NATTHIWUT TRAIOSOT : A STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF PREBIOTIC (LEVAN)-PRODUCING *BACILLUS SIAMENSIS* AND SKIN-AFFECTING CONDITIONS FOR POTENTIAL APPLICATION IN COSMETICS.. ADVISORY COMMITTEE: WITAWAT JANGIAM, Ph.D., SANTI PHOSRI, Ph.D. 2021.

The objective of this study was to investigate the biological properties of levan from *Bacillus siamensis* and levan hydrolysate. The antioxidant activity of levan hydrolysate by DPPH and ABTS radical scavenging showed the highest inhibitory percentages were 31.35% and 68.95% at concentrations of 250 $\mu\text{g/mL}$ and 125 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The levan from *Bacillus siamensis* on Human keratinocyte (HaCaT) and Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) showed it to be non-cytotoxic in concentrations ranging from 62.5 to 1000 $\mu\text{g/mL}$. The anti-inflammatory activity of levan hydrolysate was measured by the nitric oxide production from LPS-stimulated RAW264.7 cells and cell viability. The levan hydrolysate at a concentration of 15.62 to 1,000 $\mu\text{g/mL}$ did not show anti-inflammatory activity but NO production was significantly increased in treated cells. Moreover, the levan hydrolysate at the same concentration had no cytotoxicity on RAW264.7 cells, as well as increased cell proliferation. The *in vitro* anticancer activity of levans against four different cancer cell lines, including lung carcinoma (A549), hepatocellular carcinoma (HepG2), colorectal carcinoma (HCT116) and cervix adenocarcinoma (HeLa) was measured. Levan from *Bacillus siamensis* showed the highest anticancer activity against four different cancer cell lines at a concentration of 2,000 $\mu\text{g/mL}$. In addition, the results of the water solubility index (WSI) and oil solubility index (OSI) were $95.93 \pm 10.75\%$ and $98.84 \pm 303.07\%$, respectively. After in addition, the water holding capacity (WHC) was $182.71 \pm 202.27\%$, which indicates that levan retains water and dissolves well in the solvent.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ แจ่มเยี่ยม (อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์), อาจารย์ ดร.สันติ โพธิ์ศรี และ อาจารย์ ดร.อุทัยพร ไก่แก้ว (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์) ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน พร้อมทั้งสนับสนุนและช่วยเหลือในทุกๆด้าน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิและคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบ แก้ไข และวิจารณ์ผลงาน ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า และคุณวสุรี จิตติวร ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแก่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย

ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ฅ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ค
บทที่ 1	2
บทนำ.....	2
ที่มาและความสำคัญ	2
วัตถุประสงค์.....	8
สมมติฐานของการศึกษา.....	8
ขอบเขตการศึกษา.....	8
ตัวแปร	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	15
แผนการดำเนินงาน	17
บทที่ 2	19
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs).....	19
ฟรุคแทน (Fructans)	21
ระบบนิเวศของผิว.....	29
คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของผิว	31

ปัจจัยที่มีความเฉพาะเจาะจงกับโฮสต์ (Host factors).....	31
ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม (Environmental factors)	31
การจำแนกลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิว (Molecular analysis of skin microbiota)	32
การปรับระบบภูมิคุ้มกันบนผิวหนัง (Modulation by the cutaneous immune system)	32
การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวน.....	33
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	45
บทที่ 3	57
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	57
สารเคมีและอาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์.....	57
อุปกรณ์และเครื่องแก้ว.....	58
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	60
วิธีการทดลอง	61
บทที่ 4	71
ผลและอภิปรายผลการทดลอง.....	71
การศึกษาลักษณะของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต	71
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง Human keratinocyte (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal human dermal fibroblasts (NHDF) ของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ <i>Bacillus siamensis</i> ด้วยวิธี MTT assay.....	77
การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)	83
การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวน โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง (Anticancer activity).....	87
การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และการทดสอบความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) ของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวน.....	98

บทที่ 5	101
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	101
สรุปผลการทดลอง.....	101
ข้อเสนอแนะ	103
บรรณานุกรม.....	104
ประวัติย่อของผู้วิจัย	114



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของสารฟรีไบโอติก.....	2
ตารางที่ 2 DPPH radical scavenging activity.....	9
ตารางที่ 3 ABTS radical scavenging activity.....	9
ตารางที่ 4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay).....	10
ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (Determination of nitric oxide (NO) production).....	10
ตารางที่ 6 ผลของลิแวนไฮโครไลเซตต่อความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage RAW264.7).....	11
ตารางที่ 7 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (Lung carcinoma, A549)....	11
ตารางที่ 8 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2).....	12
ตารางที่ 9 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116).....	12
ตารางที่ 10 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix adenocarcinoma, HeLa).....	13
ตารางที่ 11 การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index).....	13
ตารางที่ 12 การทดสอบความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index).....	14
ตารางที่ 13 การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity).....	14
ตารางที่ 14 แผนการดำเนินงาน.....	17
ตารางที่ 15 แสดงแหล่งกำเนิดของสารอนุมูลอิสระ.....	37
ตารางที่ 16 ความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) ของสารฟรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวน.....	98

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ป้างัยภายนอกและป้างัยภายในที่ทำปฏิกิริยากับลักษณะทางกายภาพและการทำงานของชุดป้องกันผิวหนังผ่านผลกระทบทั้งโฮสต์ของเซลล์และกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนัง (Krutmann, 2012; Patra, Wagner, Arulampalam, & Wolf, 2019).....	6
ภาพที่ 2 การใช้น้ำสารฟรีไบโอติกมาใช้ประโยชน์ที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Krutmann, 2012)	6
ภาพที่ 3 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปอนุพันธ์กันเป็นสายแบบ $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose: A) 1-kestose (GF2), B) nystose (GF3), C) 1-b-fructofuranosyl nystose (GF4) (Y. W. Han & Watson, 1992)	19
ภาพที่ 4 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์กันเป็นสายแบบ $\beta(2\rightarrow6)$ fructosyl-fructose..	20
ภาพที่ 5 A. โครงสร้างลิแวนแบบเส้นตรง B. โครงสร้างลิแวนแบบเส้นตรงและกิ่ง	21
ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตเอนไซม์ลิแวนจากเซลล์จุลินทรีย์ (Srikanth et al., 2015)	23
ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาของเอนไซม์เอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อสังเคราะห์สารลิแวน	24
ภาพที่ 8 โครงสร้าง 1-Kestose (Porrás-Domínguez, Rodríguez-Alegria, Ávila-Fernández, Montiel-Salgado, & López-Munguía, 2017).....	25
ภาพที่ 9 โมเดลการเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization บน active site ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส: G (กลูโครส), F (ฟรุคโตส) และ LEV (ลิแวนซูเครส) (Ozimek, Kralj, van der Maarel, & Dijkhuizen, 2006)	28
ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงภาพตัดขวางผิวหนัง กลุ่มจุลินทรีย์ และองค์ประกอบของผิว	30
ภาพที่ 11 ป้างัยที่มีผลกระทบต่อกลุ่มจุลินทรีย์บนผิว (Grice & Segre, 2011)	30
ภาพที่ 12 กลไกการทำงานของสารละลาย MTT เมื่อถูก Reduced ด้วย Mitochondrial reductase จะทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี Formazan	34
ภาพที่ 13 โครงสร้างและส่วนประกอบของผิวหนัง	35
ภาพที่ 14 การทำงานของเอนไซม์ Lipoxxygenase ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน	39

ภาพที่ 15 สมการการเกิดปฏิกิริยาหลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ	43
ภาพที่ 16 แผนการดำเนินงานการศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ <i>Bacillus siamensis</i>	60
ภาพที่ 17 การแยกสารโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC (Thin-layer Chromatography) โดยใช้อะซิโตนไไตร์/น้ำ (85 : 15 โดยปริมาตร) เป็นระบบเฟสเคลื่อนที่ ช่องที่ 1 ซูโครส (S) ช่องที่ 2 กลูโคส (G) ช่องที่ 3 ฟรุกโตส (F) ช่องที่ 4 สารลิแวน (Lev) ช่องที่ 5 ลิแวนไฮโดรไลเซต (Lev-HS).....	71
ภาพที่ 18 กราฟแสดงผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวน	74
ภาพที่ 19 กราฟแสดงผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวน ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P < 0.05, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว.....	76
ภาพที่ 20 A) ลักษณะของเซลล์ผิวหนัง Human keratinocyte (HaCaT) และ B) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal human dermal fibroblasts (NHDF).....	77
ภาพที่ 21 กราฟแสดงผลการทดสอบสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนแต่ละชนิดด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์ผิวหนังด้านบน Human keratinocyte (HaCaT) A) ลิแวนมาตรฐานจาก <i>Erwinia herbicola</i> , B) ลิแวนจาก <i>Chrysanthemum</i> และ C) ลิแวนจาก <i>Bacillus siamensis</i> ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P < 0.05, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test.....	79
ภาพที่ 22 กราฟแสดงผลการทดสอบสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนแต่ละชนิดด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal human dermal fibroblasts (NHDF) A) ลิแวนมาตรฐานจาก <i>Erwinia herbicola</i> , B) ลิแวนจาก <i>Chrysanthemum</i> และ C) ลิแวนจาก <i>Bacillus siamensis</i> ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	81

- ภาพที่ 23 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูปแบบ mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ84
- ภาพที่ 24 กราฟแสดงผลการทดสอบสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวนไฮโดรไลเซตด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage RAW264.7) ข้อมูลแสดงในรูปแบบ mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึง86
- ภาพที่ 25 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (Lung carcinoma, A549) ของสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ D) ลิแวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูปแบบ mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test89
- ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2) ของสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ92
- ภาพที่ 27 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116) ของสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ95
- ภาพที่ 28 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix adenocarcinoma, HeLa) ของสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ97
- ภาพที่ 29 แผนภาพสรุปผลการศึกษาคูสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง102

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

กลุ่มอุตสาหกรรมสุขภาพและการแพทย์ (Bio-Based Industry for Health and Wellness) เป็นหนึ่งในกลุ่มอุตสาหกรรมฐานชีวภาพ ซึ่งเป็นกลุ่มอุตสาหกรรมที่อยู่ใน New S-Curve เป็นกลุ่มอุตสาหกรรมแห่งอนาคตของประเทศไทยที่มีรากฐานที่แข็งแกร่งอยู่ในระดับหนึ่ง แต่จำเป็นต้องต่อยอดให้มีการวิจัย และพัฒนาเทคโนโลยี นวัตกรรมเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและสามารถแข่งขันได้ในเวทีโลก ซึ่งในปัจจุบันโลกมีการแข่งขันกันมากยิ่งขึ้น ทางด้านเศรษฐกิจและทางด้านอุตสาหกรรม ประเทศไทยมีอัตราการเติบโตทางเศรษฐกิจอยู่ที่ร้อยละ 7 ถึง 8 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ จะก้าวสู่ความเป็นประเทศอุตสาหกรรมใหม่ เช่นเดียวกับประเทศเกาหลีใต้ ไต้หวัน ฮังกง และ สิงคโปร์ เพื่อเป็นกลไกช่วยในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจใหม่ให้มีการขยายตัวมากยิ่งขึ้น โดยจะมุ่งเน้นการใช้องค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นวัตกรรมและความคิด สร้างสรรค์ ซึ่งเป็นระบบเศรษฐกิจที่เน้นการสร้างมูลค่า (Value-Based Economy) เพื่อช่วยผลักดัน ให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหารระดับพรีเมียม สร้างความมั่นคงจาก ความหลากหลายทางชีวภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะช่วยส่งเสริมขีดความสามารถ ในการแข่งขันและต่อยอดจากอุตสาหกรรมเดิมเพื่อยกระดับอุตสาหกรรมให้ดียิ่งขึ้นสู่การ พัฒนาที่ยั่งยืน เฉกเช่น กลุ่มอุตสาหกรรมสุขภาพและอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น

ในปัจจุบันที่ผู้บริโภคเริ่มหันมาให้ความสำคัญกับสุขภาพตามวิถีธรรมชาติและบำบัด อากาโรคต่าง ๆ ด้วยพืชพรรณสมุนไพรทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ ปลอดภัยและมี การผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมีแนวโน้มเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องสำอาง จากธรรมชาติ และผลิตภัณฑ์เวชสำอางธรรมชาติ อย่างเช่น กลุ่มผลิตภัณฑ์บำรุงผิวพรรณที่มี 프리ไบโอติก (Prebiotic) เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนี้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของสารพรีไบโอติก

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง	สรรพคุณ	อ้างอิง
Aleavia prebiotic acne repair	ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหน้าสำหรับผิวที่เป็นสิวง่าย มีส่วนผสมสารพรีไบโอติก เป็นอาหารเสริมให้แก่ผิว และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่จุลินทรีย์ เพื่อสร้างความสมดุลให้แก่ผิว และฟื้นฟูเซลล์ผิว และรอยแผลเป็นที่เกิดจากสิว	Aleavia (2019)
Algenist ALIVE Prebiotic balancing mask	ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยบำรุงรักษาสมดุลสภาพผิวหน้าและช่วยกำจัดสิ่งสกปรกโดยมีส่วนผสมสารพรีไบโอติกจากสาหร่าย	Algenist (2019)
Elemis superfood facial wash	ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหน้าที่ช่วยเติมอาหารให้แก่ผิว ซึ่งมีส่วนผสมเป็นสารพรีไบโอติกที่ช่วยทำให้ผิวเปล่งประกาย	Elemis (2019)
Honestly pHresh	ผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นกายที่มีส่วนผสมจาก Essential oil, พรีไบโอติก และวิตามิน อี เพื่อช่วยระงับกลิ่นกายและช่วยปรับค่า pH ของผิว ให้ผิวมีความเรียบเนียนมากยิ่งขึ้น	Honestly pHresh (2019)
La Roche-Posay Toleriane double repair face moisturizer	ผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้าปราศจากน้ำมัน และช่วยให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวในขณะที่ผิวกำลังได้รับการฟื้นฟูซึ่งมีส่วนผสมหลักเป็นสารพรีไบโอติก	La Roche-Posay (2019)

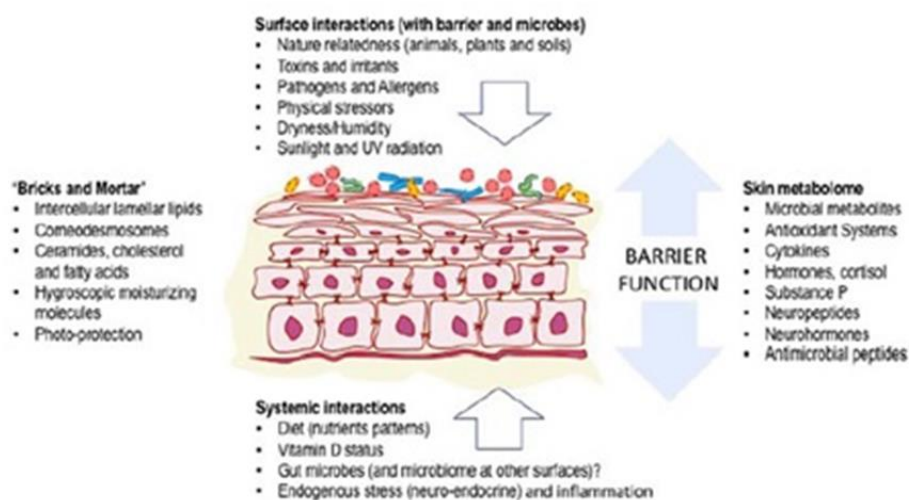
ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง	สรรพคุณ	อ้างอิง
Murad prebiotic 4-in-1 multicleanser	ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหน้าแบบเจล-ออยล์ ที่มีส่วนผสมเป็นสารพรีไบโอติก สามารถใช้ทำความสะอาด ช่วยให้ผิวชุ่มชื้นบำรุงผิว และลบเครื่องสำอางทั้งหมดในขั้นตอนเดียว	Murad (2019)
Marie veronique Pre+Probiotic daily mist	ผลิตภัณฑ์สเปรย์ที่ช่วยบำรุงผิวหน้า หลังการทำความสะอาดผิว เพื่อช่วยให้ผิวมีความชุ่มชื้น ซึมซาบไว และผิวดูเปล่งประกาย โดยมีส่วนผสมของโพรไบโอติก และสารพรีไบโอติกที่เป็นสูตรกรรมสิทธิ์ เช่น Galactooligosaccharides เป็นต้น	Marie Veronique (2019)
Perfect cleanser nutritive cleansing & Nourishig balm	ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหน้าอุดมไปด้วยวิตามินที่ช่วยเสริมความเยาว์วัย แร่ธาตุ สารพรีไบโอติก กรดไขมันจำเป็น เพื่อทำความสะอาดอย่างล้ำลึก ฟีนฟูระดับความชุ่มเพื่อให้ผิวรู้สึกสะอาดและอ่อนนุ่ม เหมาะสำหรับทุกสภาพผิวโดยเฉพาะผิวแห้งฮอร์โมน หรือ ผิวผู้ใหญ่	Oskia London (2019)

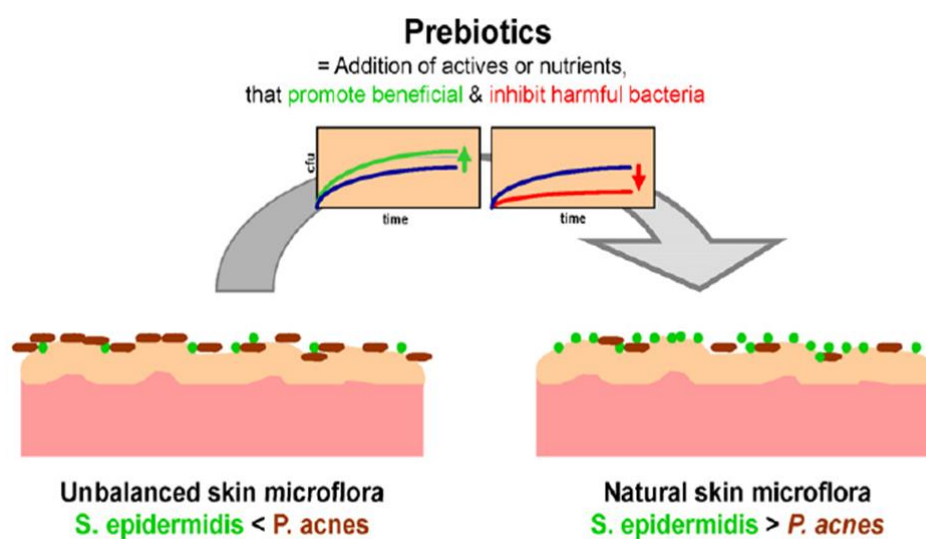
สารพรีไบโอติกจัดเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งจะส่งผลดีต่อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่โดยจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและกิจกรรมบางอย่างของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ ส่งผลให้ร่างกายได้รับคุณประโยชน์ที่ดี และยังสามารถนำไปใช้เพื่อปรับแต่งองค์ประกอบของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิว โดยบนผิวหนังมนุษย์ปกติจะประกอบด้วย กลุ่มจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่อาศัยอยู่บนผิว (Fredricks, 2001)

ส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์แกรมบวก (Gram-positive species) (Gao, Tseng, Strober, Pei, & Blaser, 2008; Krutmann, 2012) ซึ่งจะมีทั้งกลุ่มจุลินทรีย์แบบถิ่นที่อยู่และกลุ่มจุลินทรีย์แบบชั่วคราว กลุ่มจุลินทรีย์แบบถิ่นที่อยู่หรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ดีจะเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถขยายพันธุ์ได้ตลอดเวลา ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์ *Propionibacteria* (*P. acnes*, *P. avidum* และ *P. granulosum*), *Staphylococci Coagulase-negative Staphylococcus* (*Staphylococcus epidermidis*), *Micrococci*, *Corynebacteria* และ *Acinetobacter* นอกจากนี้ยังมี *Malassezia* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของยีสต์อาศัยอยู่ด้วยเช่นกัน สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์แบบชั่วคราวหรือกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรค จะถูกนิยามว่าเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์บนผิวหนังที่มีความสามารถเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลยสำหรับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ในสภาพแวดล้อมบนผิวหนังกลุ่มจุลินทรีย์แบบชั่วคราวหรือกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคน้อยที่สุด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และสายพันธุ์ *Bacillus* ต่าง ๆ (Grice et al., 2008) กลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวจะมีการขยายพันธุ์เต็มบริเวณช่องว่างของผิวหนังที่อาจเป็นอาณานิคมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและทำให้เกิดการติดเชื้อไม่ว่าที่ผิวหนังหรือการถ่ายโอนไปยังส่วนต่าง ๆ และบริเวณอื่น ๆ นอกจากนี้ถ้าหากผิวสามารถเป็นอาณานิคมของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยจุลินทรีย์ก่อโรคจะทำการสร้างเยื่อเมือกขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคสามารถแพร่กระจายตัวได้มากยิ่งขึ้น อาจส่งผลทำให้จำนวนของกลุ่มจุลินทรีย์แบบถิ่นที่อยู่หรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ลดลงจำนวนลง (Gao et al., 2008; Krutmann, 2012) และอาจส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นได้ โดยกลไกการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันนั้นจะถูกจุลินทรีย์บนผิวหนังกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นจุลินทรีย์บนผิวหนังจึงถูกเคลือบด้วยอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งจะมาจากการหลั่งของต่อมเหงื่อ (Eccrine gland) ได้ผิวหนัง (Bojar & Holland, 2004; Gao et al., 2008; Handfield, Kwok, & MacLeod, 2018; Okada, Konishi, Ito, Nagura, & Asai, 1988) นอกจากนี้ยังมีรายงานจำนวนมากได้อธิบายเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายและจะทำงานโดยการตอบสนองแบบอาศัยเซลล์ตลอดเล็กรอบข้าง เพื่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่ผิวหนัง (Ashbee, 1994) การศึกษาเหล่านี้ไม่ได้อธิบายอย่างชัดเจนว่า การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนั้นเกิดขึ้นผ่านผิวหนังหรือบริเวณอื่นที่มีจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันหรือจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องอาศัยอยู่ ความเป็นไปได้แรก คือ การสังเกตว่า ความผิดปกติของผิว ต่อมไขมันอักเสบ (Seborrheic dermatitis) และรังแค เป็นต้น ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และระบบภูมิคุ้มกัน โดยกำเนิดของผิวหนัง มีส่วนเกี่ยวข้องกันอย่างชัดเจนในการควบคุมจำนวนของจุลินทรีย์บนผิวหนัง (Bojar & Holland, 2004; Gao et al., 2008; Kesavan, Holland, & Ingham,

2000) ดังนั้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกันถูกระงับ โดยกลุ่มของจุลินทรีย์ เซลล์ผิวหนังกำพวด (Epidermal keratinocytes) ซึ่งเป็น 1 ใน 4 เซลล์หลักของผิวหนังกำพวดมีความสามารถในการผลิต Beta-defensins ซึ่งจะถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่รู้จักกันดี เช่น Cathelicidin hCAP-18 และโดยการผลิตเปปไทด์ด้านจุลินทรีย์ที่จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น องค์ประกอบของจุลินทรีย์บนผิวหนังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างและปัจจัยหนึ่ง คือ ความสมดุลของแบคทีเรียที่ถูกรบกวนได้ง่าย (ภาพที่ 1) ตัวอย่างที่เด่นชัด คือ ผิวหนังของผู้ป่วยที่เป็นสิว ซึ่งเกิดจากปริมาณของจุลินทรีย์ *P. acnes* ที่มากเกินไป ทำให้ส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์อื่น ๆ เช่น *S. epidermidis* ซึ่งถือเป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ปกป้องผิวของมนุษย์จากการติดเชื้อและการทำลายจากสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ดังนั้น สารพรีไบโอติก (Prebiotic) จึงเป็นส่วนที่สำคัญที่จะช่วยปรับสมดุลองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในผิวหนังได้ โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. acnes* และก็ช่วยทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น (Bojar & Holland, 2004) (ภาพที่ 2) ดังนั้น การศึกษาล่าสุดแสดงให้เห็นถึงการพัฒนาที่ประสบความสำเร็จของเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของสารพรีไบโอติกเพื่อปรับสมดุลองค์ประกอบของจุลินทรีย์บนผิวหนังช่วยจำกัดหรือลดการเจริญเติบโตของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ก่อโรคและช่วยรักษาหรือกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ซึ่งจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของสารพรีไบโอติกมีความโดดเด่นเหนือกว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทอื่น ๆ (Krutmann, 2012)



ภาพที่ 1 ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายในที่ทำปฏิกริยากับลักษณะทางกายภาพและการทำงานของ ชุดป้องกันผิวหนัง-ผ่านผลกระทบทั้ง โฮสต์ของเซลล์และกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนัง (Krutmann, 2012; Patra, Wagner, Arulampalam, & Wolf, 2019)



ภาพที่ 2 การใช้น้ำสารพรีไบโอติกมาใช้ประโยชน์ที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Krutmann, 2012)

กลุ่มสารพรีไบโอติกอาจเป็นสารจำพวกเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide) เช่น Fructooligosaccharides (FOSs), galactooligosaccharide (GOSs), Xylooligosaccharides (XOSs), Inulin, และ Polyfructose เป็นต้น (Elaheh, Ali, Elnaz, & Ladan, 2016; Srikanth, Reddy, Siddartha, Ramaiah, & Uppuluri, 2015)

Galactooligosaccharide (GOSs) มีโครงสร้างโมเลกุลแบบ β -galactosidase ต่อกันด้วย พันธะ Glycosidic linkages ประกอบด้วย กลูโคสต่อกับกาแลคโตส Gal_n-Glc โดยที่ n บ่งบอก ระดับของพอลิเมอร์ไรเซชัน (DP) และโดยทั่วไปแล้วจะเป็น 1-5 (Gosling, Stevens, Barber, Kentish, & Gras, 2010)

Dextrans จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง เป็นโฮโมโพลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีโครงสร้าง ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ α - (1,6) เชื่อมโยงในโซ่หลักที่มีระดับ α -ที่หลากหลย (1,2), α - (1,3), หรือ α - (1,4) การเชื่อมโยงแบบแยกสาขาขึ้นอยู่กับความจำเพาะ ของ Dextranucrase (Yildiz & Karatas, 2018)

Fructans หรือที่รู้จักกันในชื่อ Fructo-oligosaccharides (FOSs) หรือ Oligofructose จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งซึ่งมีขนาดโมเลกุลขนาดกลาง โดยการแบ่งกลุ่มฟรุคแทน (Fructan) จะถูกจำแนกประเภทออกเป็น 2 ประเภท คือ 1) อินูลิน (Inulin) มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยฟรุคโตสต่อกันเป็นสายยาว ซึ่งอาจมีกลูโคสเชื่อมต่อที่ปลายสายด้วยพันธะ $\beta(2\rightarrow1)$ linkages (Anwar et al., 2012) และ 2) ลีแวน (Levan) โดยจะมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลฟรุคโทสเชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะ $\beta(2\rightarrow6)$ linkages กับ $\beta(2\rightarrow1)$ linkages ในสายหลักและโซ่กิ่งตามลำดับ เป็น คาร์โบไฮเดรตประเภทโฮโมโพลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่ง ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลฟรุคโตสต่อกัน เป็นสายหลักที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดรวมไปถึงพืชบางชนิดที่ไม่มีการสร้าง คาร์โบไฮเดรต แต่เก็บไว้ในโครงสร้างของมัน (Lorenzoni, Aydos, Klein, Rodrigues, & Hertz, 2014; Srikanth et al., 2015) ซึ่งเรียกว่า สารลีแวนชนิด ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Levan type Fructooligosaccharides: L-FOSs) เป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) ชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Oner, Hernandez, & Combie, 2016)

จากงานวิจัยหัวข้อ การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิต สารพรีไบโอติกในรูปของลีแวนจากถั่วเหลืองหมัก ก่อนหน้านี้ทำให้เราสามารถผลิต สารพรีไบโอติกในรูปของลีแวนได้ในปริมาณมาก จึงได้ส่งผลต่อเนื่องมาในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลีแวนที่ผลิตจาก จุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง โดยระบบพารามิเตอร์ ของการทดสอบ เช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT) และ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Anticancer activity) การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง

สมมติฐานของการศึกษา

จากกระบวนการผลิตสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ การต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ การต้านเซลล์มะเร็ง ความสามารถในการละลายน้ำและในน้ำมัน ความสามารถในการอุ้มน้ำ เป็นต้น ซึ่งคาดว่าจะต้องการหาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่เหมาะสม เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง

ขอบเขตการศึกษา

เพื่อศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่เหมาะสมจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH assay และ ABTS radical scavenging activity นอกจากนี้ยังมีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง และการทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ต่อเซลล์ผิวหนัง Human keratinocyte (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal human dermal fibroblasts (NHDF) โดยวิธี MTT และทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) ความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) รวมถึงความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity)

ตัวแปร

1. ศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis*

1.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* และลิแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ตารางที่ 2 DPPH radical scavenging activity

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ปริมาณของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	ค่าการดูดกลืนแสง: 517 nm
Levan <i>Chrysanthemum</i>		อุณหภูมิ: 37 °C
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 30 นาที
Positive control		

ตารางที่ 3 ABTS radical scavenging activity

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ปริมาณของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS	ค่าการดูดกลืนแสง: 734 nm
Levan <i>Chrysanthemum</i>		อุณหภูมิ: 37 °C
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 40 นาที
Positive control		

1.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลีแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

ตารางที่ 4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ความหนาแน่นของเซลล์:
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ HaCaT และ NHDF	1×10^4 cells/well และ 5×10^3 cells/well, CO ₂ : 5%
Levan <i>Chrysanthemum</i>		อุณหภูมิ: 37 °C
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 24 ชั่วโมง
Positive control		

1.3 การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลีแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (Determination of nitric oxide (NO) production)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ค่าการดูดกลืนแสง: 540 nm
Positive control	ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO)	อุณหภูมิ: 37 °C
Levan hydrolysate		เวลา: 10 นาที

ตารางที่ 6 ผลของลีเวนไฮโดรไลเซตต่อความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ
(Macrophage RAW264.7)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ความหนาแน่นของเซลล์:
Positive control	ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ แมคโครฟาจ RAW264.7	9×10^4 cells/well, CO ₂ : 5%
Levan hydrolysate		อุณหภูมิ: 37 °C เวลา: 24 ชั่วโมง

1.4 การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลีเวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง (Anticancer activity)

ตารางที่ 7 ผลของลีเวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (Lung carcinoma, A549)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ความหนาแน่นของเซลล์:
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง ปอด (Lung carcinoma, A549)	1×10^4 cells/well อุณหภูมิ: 37 °C
Levan <i>Chrysanthemum</i>		CO ₂ : 5%
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ความหนาแน่นของเซลล์:
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2)	1×10^4 cells/well อุณหภูมิ: 37 °C CO ₂ : 5% เวลา: 24 ชั่วโมง
Levan <i>Chrysanthemum</i>		
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		

ตารางที่ 9 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ความหนาแน่นของเซลล์:
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116)	1×10^4 cells/well อุณหภูมิ: 37 °C CO ₂ : 5% เวลา: 24 ชั่วโมง
Levan <i>Chrysanthemum</i>		
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		

ตารางที่ 10 ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก
(Human cervix adenocarcinoma, HeLa)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		ความหนาแน่นของเซลล์:
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix adenocarcinoma, HeLa)	1×10^4 cells/well อุณหภูมิ: 37 °C
Levan <i>Chrysanthemum</i>		CO ₂ : 5%
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 24 ชั่วโมง

1.5 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis*

ตารางที่ 11 การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (WSI%)	ความเร็วรอบ: 4500 rpm อุณหภูมิ: 105 °C
Levan <i>Chrysanthemum</i>		เวลา: 4 ชั่วโมง
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		
Positive control		

ตารางที่ 12 การทดสอบความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ค่าความสามารถในการละลายในน้ำมัน (OSI%)	ความเร็วรอบ: 4500 rpm
Levan <i>Chrysanthemum</i>		อุณหภูมิ: 232 °C
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 5 ชั่วโมง
Positive control		

1.6 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity)

ตารางที่ 13 การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity)

ตัวแปรต้น	ตัวแปรตาม	ตัวแปรควบคุม
Negative control		
Standard levan <i>Erwinia herbicola</i>	ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC%)	ความเร็วรอบ: 4500 rpm
Levan <i>Chrysanthemum</i>		อุณหภูมิ: 40 °C
Levan <i>Bacillus siamensis</i>		เวลา: 40 นาที
Positive control		

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถรู้และเข้าใจถึงคุณสมบัติทางกายภาพและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลิเวินที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เปรียบเทียบกับลิเวินจากแหล่งต่าง ๆ
2. ผลการทดสอบสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด



แผนการดำเนินงาน

แผนการดำเนินงานประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แผนการดำเนินงาน

ลำดับ	กิจกรรม	ปี 2562			ปี 2563			ปี 2564				
		ต.ค. - ธ.ค.	ม.ค. - มี.ค.	เม.ย. - มิ.ย.	ก.ค. - ก.ย.	ต.ค. - ธ.ค.	ม.ค. - พ.ค.	เม.ย. - มิ.ย.	ก.ค. - ก.ย.	ต.ค. - ธ.ค.	ม.ค. - พ.ค.	
1	ศึกษาค้นคว้าหาข้อมูล	x	x	x								
2	ศึกษาและเตรียมแผนงาน		x	x								
3	ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์			x	x	x						
4	ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ			x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ									x	x	x

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับ	กิจกรรม	ปี 2562			ปี 2563			ปี 2564	
		ต.ค. - ธ.ค.	ม.ค.- มี.ค.	เม.ย.- มิ.ย.	ก.ค. - ก.ย.	ต.ค. - ธ.ค.	ม.ค. - พ.ค.		
6	ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง		X	X	X	X	X	X	X
7	ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ โดยทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ			X	X	X	X	X	X
8	ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ โดยทดสอบความสามารถในการละลายในน้ำมัน			X	X	X	X	X	X
9	ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ โดยทดสอบความสามารถในการอู่มน้ำ			X	X	X	X	X	X
10	วิเคราะห์ผลการทดลอง				X	X	X	X	X
11	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง					X	X	X	X
12	นำเสนอผลงาน							X	X

บทที่ 2

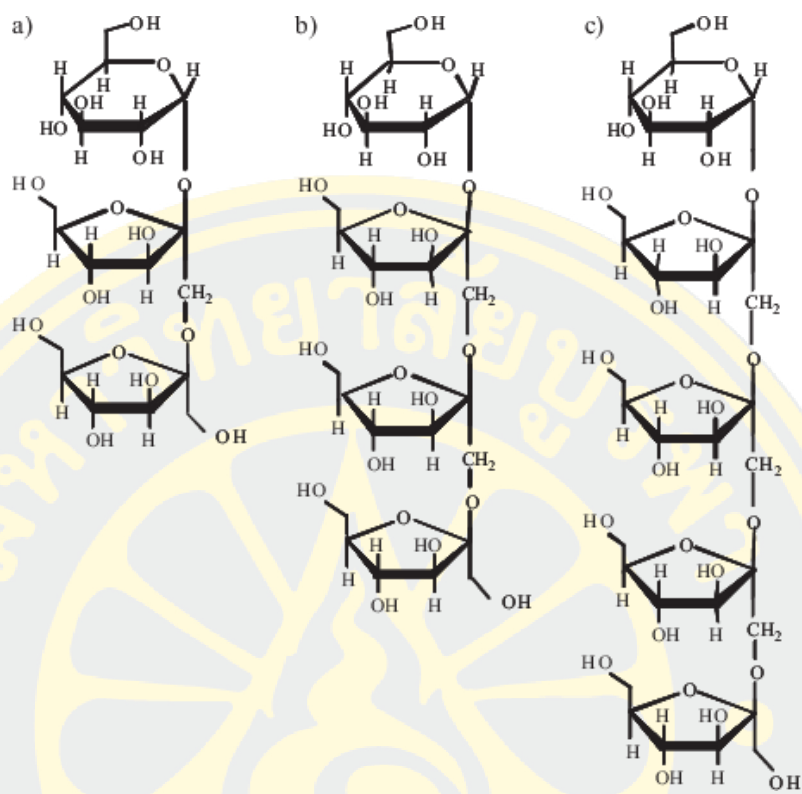
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs)

ฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ บางครั้งก็เรียก โอลิโกฟรุกโทสหรือ โอลิโกฟรุกแทน เป็นชื่อเรียกของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งโมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เกิดจากเอนไซม์ fructosyl-transferase ทำหน้าที่เชื่อมพันธะไกลโคไซด์ระหว่างน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับน้ำตาลฟรุกโตส น้อยกว่า 10 โมเลกุล โดยในรูปแบบของอินูลิน นิโออินูลิน ลีแวน นิโอลีแวน (Shoaib et al., 2016) โครงสร้างของอินูลินมีมอนอเมอร์เป็นฟรุกโตสต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose แต่จะมีขนาดของสายโมเลกุลที่เล็ก ซึ่ง FOSs ในรูปแบบของอินูลินสามารถจำแนกออกได้เป็น 1-kestose (GF2), nystose (GF3) และ 1F-fructosylnystose (GF4) (Srikanth et al., 2015) ดังภาพที่ 3 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปอินูลินต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose: A) 1-kestose (GF2), B) nystose (GF3), C) 1-b-fructofuranosyl nystose (GF4)

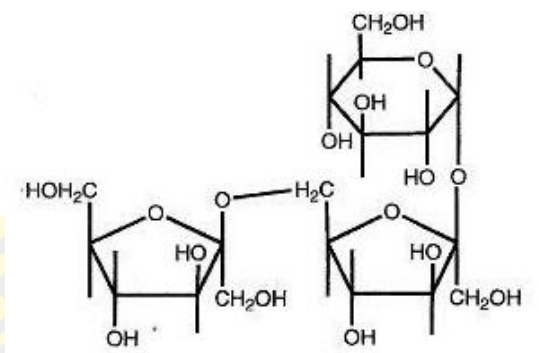
โดยที่กลุ่มอินูลินมีการต่อกันแบบ $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose linkages อินูลินสามารถพบได้ในพืชมากกว่า 3,000 ชนิด อินูลินเป็นสารพรีไบโอติก ที่สามารถสังเคราะห์ได้จากซูโครส ใช้กันอย่างแพร่หลายในอาหารแปรรูปของไขมัน โดยให้พลังงานเพียง 25% ถึง 30% เมื่อเทียบกับคาร์โบไฮเดรต หรือใช้ทดแทนน้ำตาลโดยให้ความหวาน 10% ของซูโครสและละลายในน้ำได้ดี ใช้ในอาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักเนื่องจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่ถูกย่อยที่ลำไส้ใหญ่โดยเชื้อแบคทีเรีย (Shoaib et al., 2016)

โดยที่ FOSs ในรูปแบบของสารลีแวนนั้นจะมีโครงสร้าง $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose ซึ่งจะมีโครงสร้างไตรแซ็กคาไรด์หรือเรียกว่า 6-kestose นั้นเป็นโมเลกุลที่เล็กที่สุด หรืออาจจะมีการต่อกับโมเลกุลกลูโคสหรือซูโครสจะได้เป็นโครงสร้าง neo-nystose หรือ neo-kestose หรืออาจมีการต่อผสมระหว่างสายแบบ $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose และ $\beta(2\rightarrow6)$ fructosyl-fructose โมเลกุลที่เล็กที่สุดเรียกว่า ไบฟูโครส (Bifurcose) ดังภาพที่ 4 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2\rightarrow6)$ fructosyl-fructose (Lorenzoni et al., 2014)

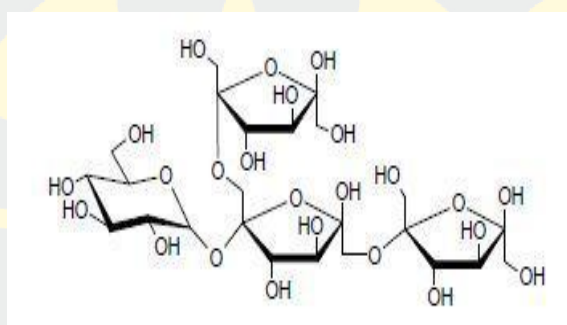


ภาพที่ 3 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปอนุลินต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2 \rightarrow 1)$ fructosyl-fructose: A) 1-kestose (GF2), B) nystose (GF3), C) 1-b-fructofuranosyl nystose (GF4) (Y. W. Han & Watson, 1992)

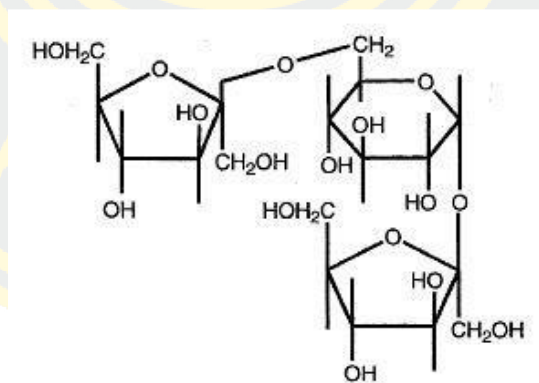
โดยลิเวินสามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasserii*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius* ฯลฯ (Srikanth et al., 2015) มีคุณสมบัติทางการแพทย์ที่สำคัญ เช่น สารต่อต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันมะเร็ง และสารต่อต้านโรคอ้วน และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเสริม และยา (Yildiz & Karatas, 2018)



6-ketose



Bifurcose



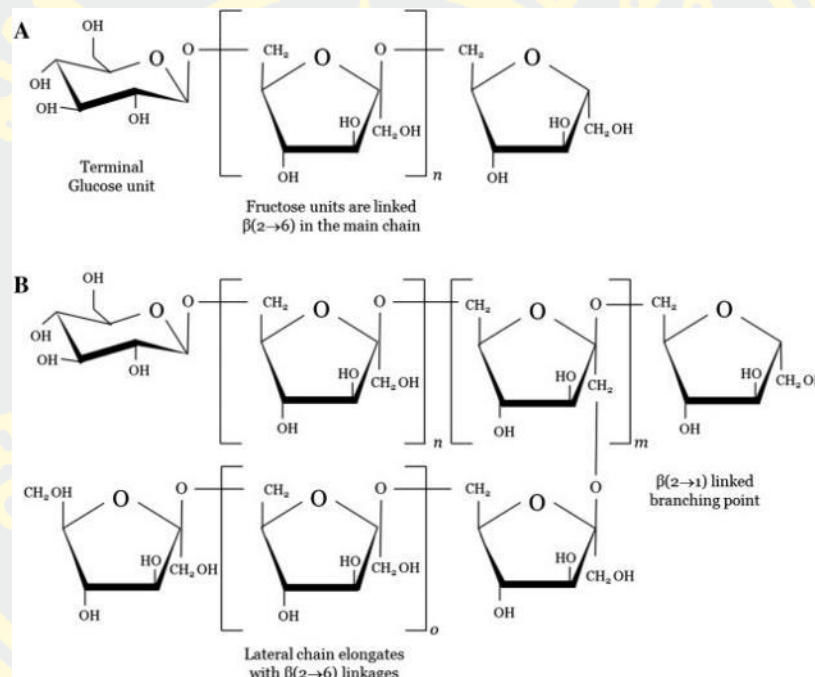
Neo-ketose

ภาพที่ 4 โมเลกุลของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อกันเป็นสายแบบ $\beta(2 \rightarrow 6)$ fructosyl-fructose

ฟรุกแทน (Fructans)

1. ลีแวน (Levan)

ลีแวน (Levan) เป็นชนิดของฟรุกแทนที่มีโมเลกุลของน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิด มาเชื่อมต่อกันแบบ $\beta(2\rightarrow6)$ linkages ซึ่งเป็นสายตรงของน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) กับ $\beta(2\rightarrow1)$ linkages โഴ่กิ่ง ตั้งแต่ 10 ถึง 60 โมเลกุล โดยมีน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นสายเริ่มต้น (Oner et al., 2016; Porras-Domínguez et al., 2014) ดังภาพที่ 5 A. โครงสร้างลีแวนแบบเส้นตรง B. โครงสร้างลีแวนแบบเส้นตรงและกิ่ง



ภาพที่ 5 A. โครงสร้างลีแวนแบบเส้นตรง B. โครงสร้างลีแวนแบบเส้นตรงและกิ่ง (Srikanth et al., 2015)

2. กระบวนการสร้างลีแวน

เอนไซม์ลีแวนซูเครส ทำหน้าที่เป็นตัวขนย้ายสารออกมาภายนอกเซลล์ และมีกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) น้ำตาลซูโครส (Sucrose) เป็นน้ำตาลกลูโคสและ

น้ำฟรุกโตส โดยที่น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลจะต่อกับน้ำตาลฟรุกโตสจะรวมเป็นสายโพลิเมอร์แบบ $\beta(2 \rightarrow 1)$ linkages (Esawy et al., 2013; Porrás-Dominguez, Avila-Fernandez, Miranda-Molina, Rodriguez-Alegria, & Munguia, 2015) ดังภาพที่ 6 กระบวนการการสร้างลิแวนของเอนไซม์ ลิแวนซูเครส

สามารถแบ่งขั้นตอนการสังเคราะห์ลิแวนจากซูโครส ได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์เอนไซม์ลิแวนซูเครส เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์

ขั้นตอนที่ 2 เอนไซม์ลิแวนซูเครส สะสมภายในเซลล์ ส่งมายังช่องว่างระหว่างเซลล์ ที่เรียกว่า Periplasmic space และส่งออกมาอยู่นอกเซลล์

ขั้นตอนที่ 3 เกิดกระบวนการของเอนไซม์ลิแวนซูเครส ที่เรียกว่า Signal peptide จะมีการสังเคราะห์โปรตีนออกมาพร้อมกระบวนการ

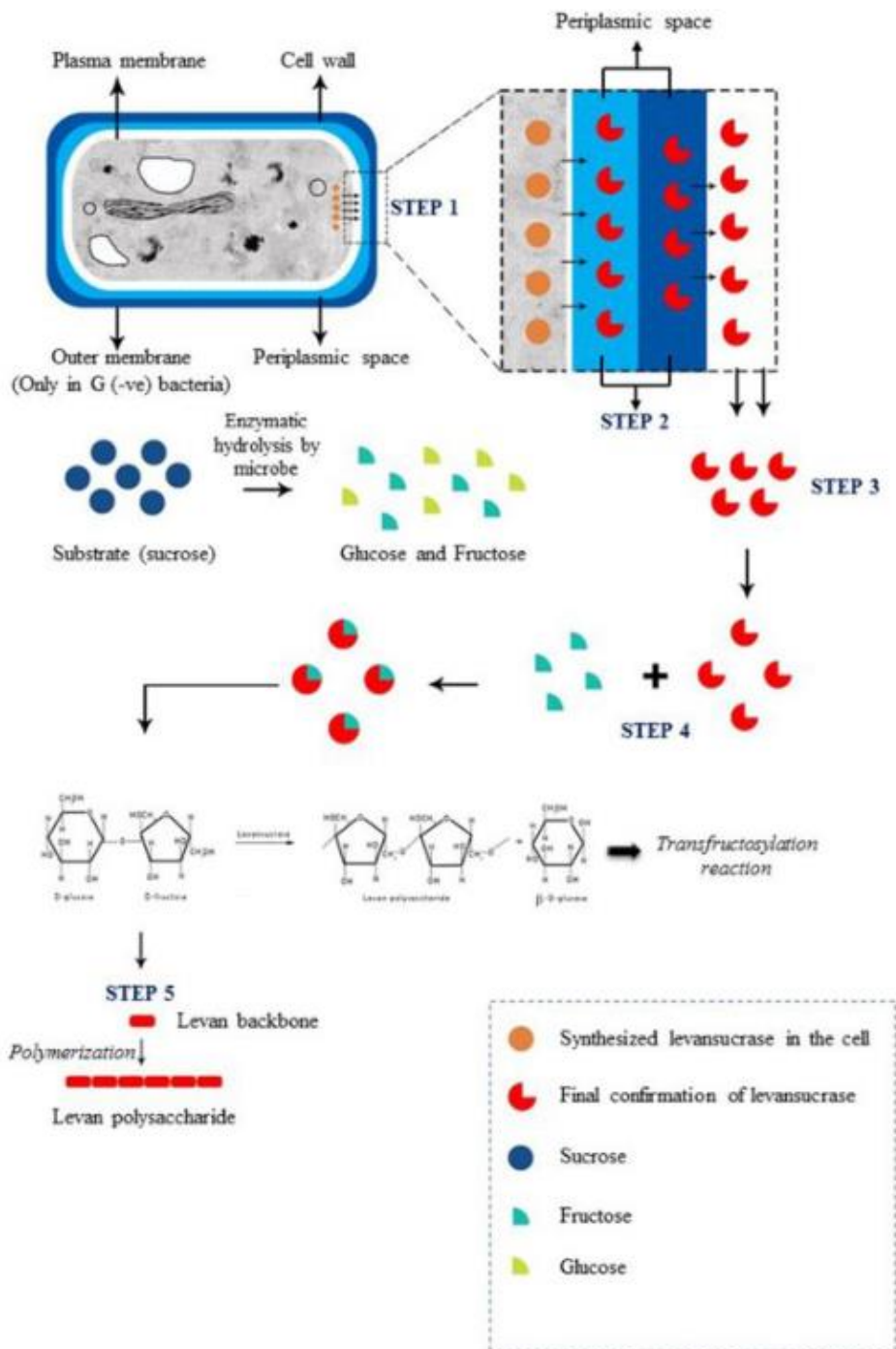
ขั้นตอนที่ 4 เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยจุลินทรีย์ ทำให้น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็น โมเลกุลคู่เปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรุกโตสที่มีโมเลกุลเดี่ยว เกิดการรวมกันระหว่างเอนไซม์ลิแวน ซูเครส กลูโคส และฟรุกโตส

ขั้นตอนที่ 5 เกิดปฏิกิริยา Transfructosylation เอนไซม์ลิแวนซูเครสจะจับตัวกับกลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับฟรุกโตสเป็นสายโพลิเมอร์ ที่เรียกว่า ลิแวน (Srikanth et al., 2015) ดังภาพที่ 6 กระบวนการการผลิตเอนไซม์ลิแวนจากเซลล์จุลินทรีย์

3. เอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอร์เรส (Fructosyl transferase: FTase)

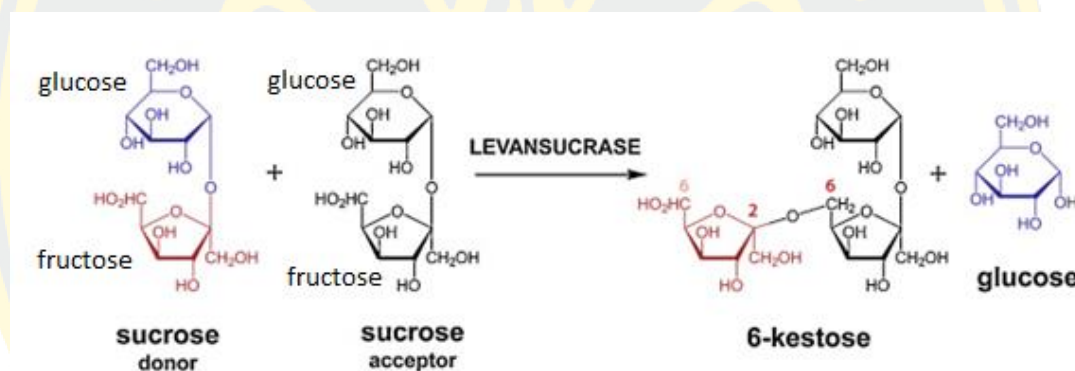
เอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอร์เรสถูกจัดกลุ่มใน Glycoside hydrolase 68 (GH68) (Cantarel et al., 2009) สามารถสังเคราะห์ FOSs ได้ โดยมีกลไกเกิดปฏิกิริยา 2 ลักษณะ คือ 1) ทำหน้าที่ในการย่อยซูโครสเปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรุกโตส (hydrolysis) และ 2) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สาร FOSs (Transfructosylation)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย เอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) สังเคราะห์ สารลิแวนและเอนไซม์อินูโลซูเครส สังเคราะห์สารอินูลิน (Anwar et al., 2012; Ni et al., 2019)



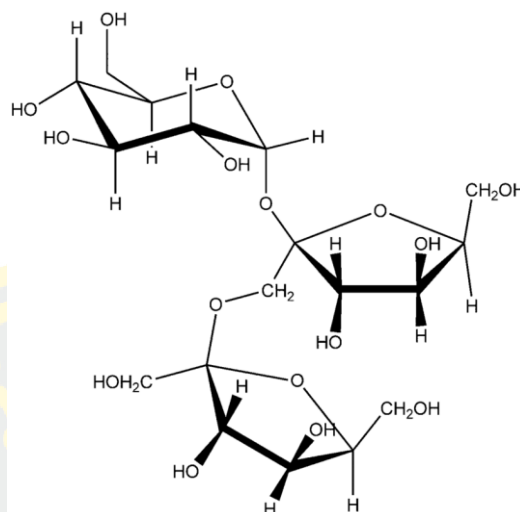
ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตเอนไซม์ลีแวนจากเซลล์จุลินทรีย์ (Srikanth et al., 2015)

3.1 เอนไซม์ลิแวนซูเครส (Levansucrase) เอนไซม์ลิแวนซูเครสจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอร์เรสมีลักษณะการสังเคราะห์ $\beta(2\rightarrow6)$ โอลิโกฟรุกแทน โดยเอนไซม์ลิแวนซูเครสจะทำหน้าที่ 2 ปฏิกริยา คือ 1) นำโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวรับ สร้างพันธะกับโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวให้เรียกว่า ทรานฟรุกโทซิเลชั่น และ 2) แยกโมเลกุลกลูโคสตัวให้ออกจากฟรุกโตสตัวให้เรียกว่า ไฮโดรไลซิส (Oner et al., 2016) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 6-kestose ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในปฏิกริยา Polymerization เพื่อเพิ่มความยาวของสายพอลิเมอร์ $\beta(2\rightarrow6)$ โอลิโกฟรุกแทน ดังภาพที่ 7 ปฏิกริยาของเอนไซม์เอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อสังเคราะห์สารลิแวนสามารถพบได้ทั้งพืช (*Agropyron cristatum*, *Dactylis glomerata* และ *Poa secunda*) (Srikanth, et al., 2015) แบคทีเรียและเชื้อรา (*Acetobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* and *Zymomonas*) (Oner et al., 2016)



ภาพที่ 7 ปฏิกริยาของเอนไซม์เอนไซม์ลิแวนซูเครสเพื่อสังเคราะห์สารลิแวน

3.2 เอนไซม์อินูโลซูเครส (Inulosucrase) เอนไซม์อินูโลซูเครสอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานส์เฟอร์เรส แต่มีลักษณะการสังเคราะห์ $\beta(2\rightarrow1)$ โอลิโกฟรุกแทน ที่เรียกว่า อินูลิน โดยเอนไซม์อินูโลซูเครส จะทำหน้าที่ 2 ปฏิกริยา เช่นเดียวกับเอนไซม์ลิแวนซูเครส คือ 1) นำโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวรับ สร้างพันธะกับโมเลกุลฟรุกโตสที่เป็นตัวให้เรียกว่า ทรานฟรุกโทซิเลชั่น และ 2) แยกโมเลกุลกลูโคสตัวให้ออกจากฟรุกโตสตัวให้เรียกว่า ไฮโดรไลซิส แต่โครงสร้างเริ่มต้นนั้น จะเป็น 1-Kestose แสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในปฏิกริยา Polymerization เพื่อเพิ่มความยาวของสายพอลิเมอร์ $\beta(2\rightarrow1)$ โอลิโกฟรุกแทน (Lammens et al., 2009; Liu, Yu, Zhang, Jiang, & Mu, 2017)



ภาพที่ 8 โครงสร้าง 1-Kestose (Porrás-Domínguez, Rodríguez-Alegria, Ávila-Fernández, Montiel-Salgado, & López-Munguía, 2017)

สามารถพบได้ในแบคทีเรียและเชื้อราบางกลุ่ม และมีความจำเพาะกว่าเอนไซม์ลีแวนซูเครส (*Streptococcus mutans* JC2, *Streptococcus mutans* GS-5, *Leuconostoc citreum* CW2, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, *Lactobacillus gasseri* DSM 20604, *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, *Bacillus sp.*217C-11, *Weissella confusa* MBFCNC-2 (1) และ *Lactobacillus reuteri* 12) (Ni et al., 2019)

4. ปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชั่นและไฮโดรไลซิส

ความสัมพันธ์ของปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชั่นและไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ลีแวนซูเครสและเอนไซม์อินูลูโลซูเครส จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เอื้อต่อการเกิดปฏิกริยาหนึ่งและยับยั้งการเกิดปฏิกริยาหนึ่ง เช่น ความเข้มข้นของซูโครส, pH, อุณหภูมิ และไอออนของโลหะ (Lammens et al., 2009; Liu et al., 2017; Lorenzoni et al., 2014)

4.1 ความเข้มข้นของซูโครส ผลความเข้มข้นของซูโครสกับเอนไซม์ลีแวนซูโครสที่มาจาก *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่า ความเข้มข้นซูโครสต่ำจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิส มากกว่าปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชั่น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นกลับเอื้อต่อการเกิดปฏิกริยาทรานฟรุกโทซิเลชั่นมากกว่าการเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิส ในทำนองเดียวกับเอนไซม์อินูลูโลซูเครสที่สร้างจาก *Lactobacillus gasseri* DSM 20604

4.2 ค่า pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* พบว่า การเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นมากกว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในช่วง pH 5.5, pH มากกว่า 5.5 และ pH น้อยกว่า 5.5 จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่า ทรานฟรุกโทซิลเลชั่น ส่วนเอนไซม์อินูโลซูเครสจะเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นมากที่สุด ในสภาวะที่เป็นกรด ในสภาวะที่เป็นกลางและเบสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่น

4.3 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งในการเกิดปฏิกิริยาเคมี หากอุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นซึ่งแปรผันตรง แต่เอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน ดังนั้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะถูกยับยั้งได้ อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญมากอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* พบว่า ในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นน้อยกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่จะเกิดสูงกว่าในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ 57 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมี้อัตราสูง แต่มีงานวิจัยพบว่า *Zymomonas mobilis* สร้างเอนไซม์ลิแวนซูเครสเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นมากกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นน้อยกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในทำนองเดียวกันเอนไซม์อินูโลซูเครสที่ถูกสร้างจาก *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นมากกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ถึง 35 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ถึง 70 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นน้อยกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

4.4 ไอออนของโลหะ ทำหน้าที่ Co-factor ในการทำงานของเอนไซม์และไอออนบางชนิดอาจจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย ในกรณีเอนไซม์ลิแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* พบว่า Mn^{2+} 2.5 mM การเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นเพิ่มขึ้น 100% และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 75% (Liu et al., 2017) เอนไซม์อินูลินซูเครสที่สร้างจาก *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 พบว่า Mn^{2+} เพิ่มเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิลเลชั่นและปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น 157% (Ni et al., 2018)

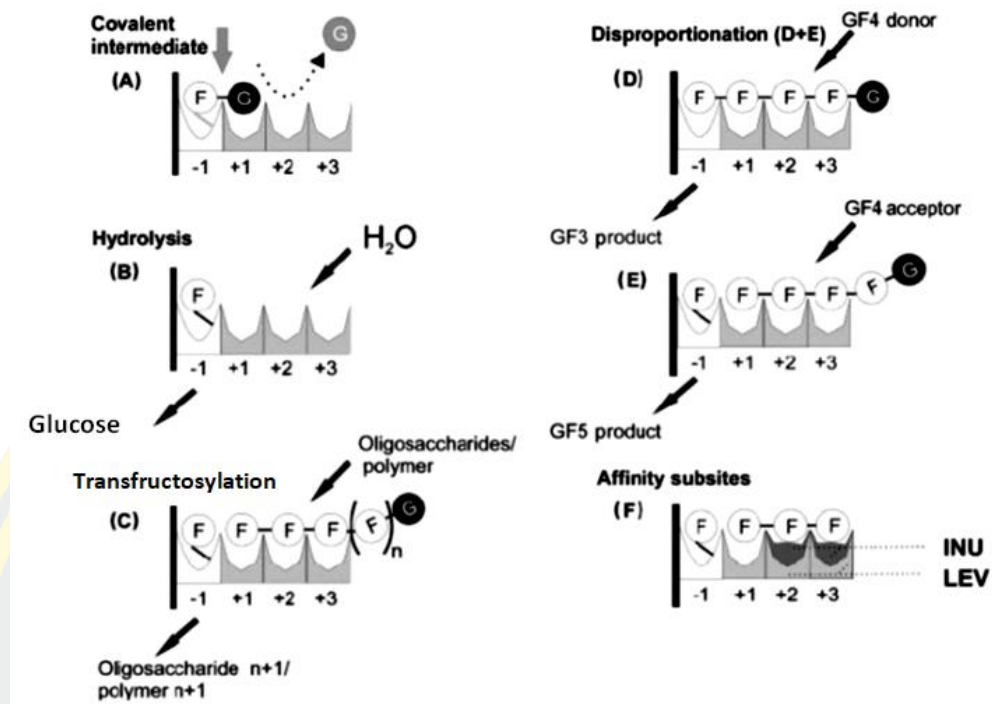
5. การเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization

เอนไซม์ลิแวนซูเครสสามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง ลิแวน และฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs) แต่การเกิดปฏิกิริยาที่จะให้ผลิตภัณฑ์นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมากในอัตราส่วน

พอลิเมอร์ (ดีแวน) กับฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs) ที่สังเคราะห์ขึ้นอยู่กับเอนไซม์และสถานะของปฏิกิริยา โดยเสนอแบบจำลอง "Processive กับ Non-processive" สำหรับการทำงานของดีแวนซูเครส ในการสร้างพันธะของโมเลกุลน้ำตาลเพื่ออธิบายถึงการเกิดปฏิกิริยาต่อ Polymerization และ Oligomerization โดยเอนไซม์จะมี subsite ดังนี้ -1 subsite จะสร้างพันธะกับโมเลกุลฟรุกโตส และ +1 subsite สามารถรองรับน้ำตาลกลูโคส (ทั้งน้ำตาลซูโครสและราฟิโนส) และฟรุกโตส (ซูโครสที่มีผลต่อการเป็นตัวรับ (Acceptor))

ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชัน เมื่อซูโครสมาที่ Active site โมเลกุลฟรุกโตสจะอยู่ที่ -1 subsite ส่วนโมเลกุลกลูโคส +1 subsite จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากนั้นโมเลกุลของซูโครสตัวใหม่จะเข้าสู่ active site ที่ +1 subsite และ +2 subsite จะมีการเกิดปฏิกิริยาทรานฟรุกโทซิเลชันเป็นสารฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs) ในลักษณะ GF_2 หากถ้าซูโครสตัวใหม่ เข้าสู่ active site ที่ +2 subsite และ +3 subsite หรืออาจจะเพิ่มมากขึ้น จะทำให้เกิดสายพอลิเมอร์ ในกรณีที่ active site มีประสิทธิภาพในการจับกับฟรุกโตสต่ำ และสายพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้นนั้นจะหลุดออกมาพร้อมกับโมเลกุลซูโครส เรียกกระบวนการนี้ว่า Non-processive หรือ Oligomerization

ส่วนกรณีที่ Active site มีประสิทธิภาพในการจับกับฟรุกโตสสูง จะทำให้สายพอลิเมอร์ที่เพิ่มขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เรียกกระบวนการนี้ว่า Processive หรือ Polymerization ไม่เพียงเท่านั้นความสำคัญของน้ำตาลตัวรับและน้ำตาลตัวให้ จะจำเพาะเจาะจงกับ active site ของเอนไซม์ดีแวนซูเครส ณ ตำแหน่งที่ -1 subsite จะจับกับโมเลกุลของฟรุกโตส จากซูโครสที่เป็นตัวให้และ +1 subsite จะจับทั้งตัวให้และตัวรับ ในกรณีที่ความเข้มข้นซูโครสต่ำ ทำให้เอนไซม์ดีแวนซูเครสสามารถนำน้ำตาล ฟรุกโตสต่างโมเลกุลมาผลิตเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ ดังภาพที่ 9 โมเดลการเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization บน active site ของเอนไซม์ดีแวนซูเครส: G (กลูโคส) F (ฟรุกโตส) และ LEV (ดีแวนซูเครส)



ภาพที่ 9 โมเดลการเกิดปฏิกิริยา Oligomerization และ Polymerization บน active site ของเอนไซม์ ลีแวนซูเครส: G (กลูโคส), F (ฟรุคโตส) และ LEV (ลีแวนซูเครส) (Ozimek, Kralj, van der Maarel, & Dijkhuizen, 2006)

เอนไซม์ลีแวนซูเครสที่สังเคราะห์จากกลุ่มของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน จะทำให้ การทำงานของเอนไซม์แตกต่างกันอีกด้วย ทั้งในเรื่องของรูปแบบ โครงสร้างและขนาดของ สายพอลิเมอร์ (Degree of polymerization) เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* สังเคราะห์เอนไซม์ลีแวนซูเครส จะผลิตสารลีแวนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าการผลิตฟรุคโท โอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs) แสดงให้เห็นว่า การทำงานของเอนไซม์จะเป็นแบบ Processive แต่ในทางกลับกัน *Zymomonas mobilis* และ *Lactobacillus sanfranciscensis* จะสังเคราะห์ เอนไซม์ลีแวนซูเครสที่ผลิตสารฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs) มากกว่าสารลีแวน (Porras-Dominguez et al., 2015)

6. ประโยชน์ของสารลีแวน

6.1 ด้านสุขภาพ

6.1.1 ทำเป็นแผ่นฟิล์ม ใช้ในการรักษาบาดแผลพุพอง

6.1.2 ป้องกันการระคายเคือง ต่อต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ (Huang, 2019; Srikanth et al., 2015)

6.1.3 การลดน้ำหนัก และช่วยลดคอเลสเตอรอล

6.1.4 ทดสอบการระคายเคืองของผิวหนังและตา

6.1.5 ผสมกับผลิตภัณฑ์เพิ่มความกระจ่างของผิว

6.1.6 สารพรีไบโอติก (Prebiotics) ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อย และไม่ถูกดูดซึมได้ในระบบทางเดินอาหาร ทั้งกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่จะถูกย่อยด้วยแบคทีเรียในบริเวณลำไส้ใหญ่ โดยจะกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Probiotic) (Tian & Karboune, 2012)

6.2 ด้านเศรษฐกิจ

6.2.1 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ลิเวินสามารถสร้างภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำสามารถทนต่ออุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นได้ (Srikanth et al., 2015)

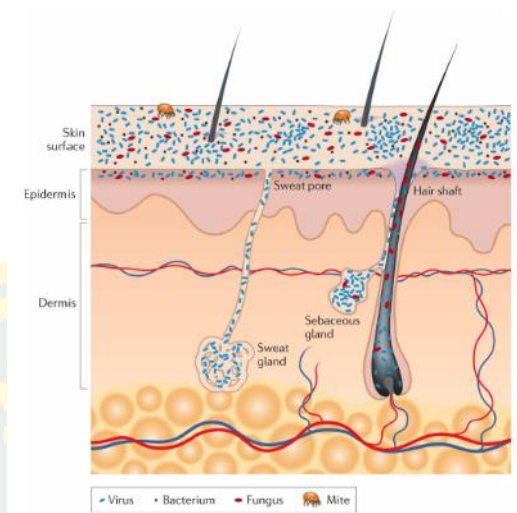
6.2.2 ทดแทนไขมันในกระบวนการทำโยเกิร์ต

6.2.3 เพิ่มการอายุการเก็บรักษาขนมปัง

6.2.4 นำมาเป็นฟิล์มบรรจุอาหาร (Vijayendra & Shamala, 2014)

ระบบนิเวศของผิว

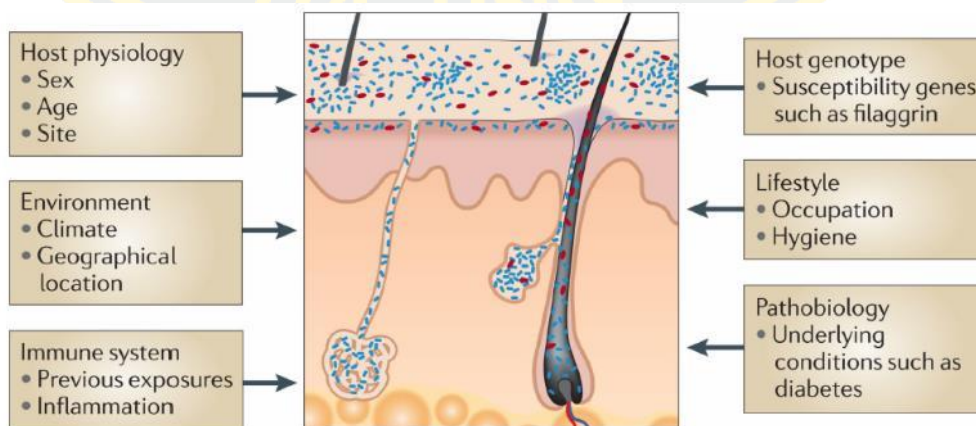
ผิวหนังเป็นระบบนิเวศที่ประกอบด้วย พื้นที่ 1.8 ตารางเมตร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของกลุ่มจุลินทรีย์หลากหลายชนิด บทบาทหลักที่สำคัญของผิวหนัง คือ ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันปกป้องร่างกายของเราจากการถูกทำร้ายจากสิ่งมีชีวิตหรือสารพิษ ผิวหนังยังเป็นส่วนต่อประสานกับสภาพแวดล้อมภายนอกและเป็นเช่นนี้ โดยการสะสมของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย รวมถึงแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และไร (ภาพที่ 10) (Byrd, Belkaid, & Segre, 2018)



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงภาพตัดขวางผิวหนัง กลุ่มจุลินทรีย์ และองค์ประกอบของผิว

(Grice & Segre, 2011)

ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่เป็นอันตรายและในบางกรณีมีหน้าที่สำคัญ คือ ช่วยป้องกันการบุกรุกโดยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหรือเป็นอันตรายมากขึ้น จุลินทรีย์เหล่านี้อาจมีบทบาทช่วยกระตุ้น T-cells ที่ผิวหนังเพื่อตอบสนองต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค นักจุลชีววิทยา นักวิทยาศาสตร์ด้านภูมิคุ้มกัน และแพทย์ผิวหนังได้ร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์ทางด้านจีโนมเพื่อพัฒนาลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Grice & Segre, 2011) โดยได้ทำการศึกษาปัจจัยทางด้านต่าง ๆ ดังนี้ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกลุ่มจุลินทรีย์บนผิว (Grice & Segre, 2011)

คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของผิวหนัง

คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของผิวหนังจะเป็นตัวกำหนดกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่ซ้ำกัน เพื่อให้ปรับเข้ากับบริเวณผิวหนังที่กลุ่มจุลินทรีย์นั้น ๆ อาศัยอยู่ โดยทั่วไปลักษณะของผิวหนังจะมีอุณหภูมิเย็น มีสภาพเป็นกรด และแห้ง แต่ละแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์จะมีความแตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับความหนาของผิวหนัง รอยพับ ความหนาแน่นของรูขุมขน และต่อม (Nakatsuji & Gallo, 2019)

1. ผิวหนังชั้นนอกและอวัยวะ รวมถึงต่อมเหงื่อ (eccrine และ apocrine) ต่อมไขมันและรูขุมขนมีแนวโน้มที่จะเกี่ยวข้องกับกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะถิ่น (Chiller, Selkin, & Murakawa, 2001)

2. ลักษณะของผิวหนัง พื้นที่ผิวหนังที่แตกต่างกันจะมีความแตกต่างในลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ผิวหนัง และกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ต่างกัน ไป เช่น ขาหนีบ รักแร้ และนิ้วเท้า โดยบริเวณพื้นที่ผิวหนังเหล่านี้จะมีอุณหภูมิและความชื้นที่สูงขึ้น ซึ่งกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ในสภาพชื้น เช่น แบคทีเรียแกรมลบ Bacilli, Coryneforms และ S. aureus เป็นต้น (Chiller et al., 2001)

ปัจจัยที่มีความเฉพาะเจาะจงกับโฮสต์ (Host factors)

ปัจจัยที่มีความเฉพาะเจาะจงกับโฮสต์ เช่น อายุ บริเวณที่อาศัย และเพศมีส่วนทำให้เกิดความแปรปรวนในกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนัง โดยเฉพาะ อายุ มีผลเป็นอย่างมากต่อสภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์บนผิวหนังและมีผลต่อการสร้างจุลินทรีย์ขนาดเล็ก (Fredricks, 2001)

ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม (Environmental factors)

ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เฉพาะเจาะจงสำหรับบุคคล เช่น อาชีพ การเลือกเสื้อผ้า และการใช้ยาปฏิชีวนะ จะส่งผลการปรับสภาพผิวหนังต่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวหนัง ผลของการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ ได้รับการตรวจสอบโดยใช้วิธีทางด้านโมเลกุล และ เครื่องสำอาง สบู่ ผลิตภัณฑ์ที่ถูกสุขอนามัย และมอยส์เจอร์ไรเซอร์ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนังเช่นกัน (Elias, 2007)

การจำแนกลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิว (Molecular analysis of skin microbiota)

วิธีการจำแนกลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์ทางด้านจีโนม เป็นการจำแนกลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิว ซึ่งแสดงถึงให้เห็นความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่มากกว่าวิธีการจำแนกทั่วไป วิธีการจำแนกลักษณะของกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนึ่งโดยใช้เทคนิค 16S ribosomal RNA metagenomic sequencing สามารถจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์บนผิวหนึ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Actinobacteria
2. Firmicutes
3. Bacteroidetes
4. Proteobacteria

ไฟลาร์ที่โดดเด่นทั้ง 4 กลุ่ม นี้ยังประกอบไปด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวเยื่อเมือกด้านใน (ทางเดินอาหารและช่องปาก) ตามสัดส่วนที่ความแตกต่างกันอย่างมากมาย ในขณะที่กลุ่ม Actinobacteria มีมากบนผิวหนึ่ง ส่วนกลุ่มของ Firmicutes และ Bacteroidetes มีมากในระบบทางเดินอาหาร ลักษณะทั่วไปของกลุ่มจุลินทรีย์ลำไส้และกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนึ่ง ดูเหมือนว่าจะมีความหลากหลายที่ต่ำในระดับไฟลัม แต่มีความหลากหลายที่สูงในระดับสปีชีส์ (Elizabeth A. Grice, 2008; Fredricks, 2001)

บริเวณผิวที่มีความหลากหลายมากที่สุด คือ บริเวณที่แห้ง โดยจะมีกลุ่มของ Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes และ Bacteroidetes เหล่านี้อาศัยอยู่ ซึ่งบริเวณเหล่านี้ประกอบด้วย ปลายแขน สะโพก และส่วนต่าง ๆ ของมือ ซึ่งพบคุณสมบัติที่น่าแปลกของกลุ่มจุลินทรีย์ ในบริเวณเหล่านี้ คือ จะมีการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์แกรมลบ ไม่เพียงแต่จะคอยปนเปื้อนจากระบบทางเดินอาหารเท่านั้น แต่จุลินทรีย์เหล่านี้ยังลুক้ำอาณาบริเวณของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิว บริเวณผิวที่น่าสนใจเหล่านี้ยังมีความหลากหลายทางสายวิวัฒนาการมากกว่าช่องว่างหรือช่องปากของบุคคลเดียวกัน (Nakatsuji & Gallo, 2019)

การปรับระบบภูมิคุ้มกันบนผิวหนึ่ง (Modulation by the cutaneous immune system)

ผิวหนึ่ง นอกจากจะเป็นสิ่งที่จะช่วยปกป้องจากสภาพแวดล้อมภายนอกแล้ว ผิวหนึ่งยังช่วยเป็นปราการปกป้องของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนึ่งมีความสำคัญในการป้องกันการกระทบกระทั่ง การติดเชื้อ และยังช่วยปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวหนึ่ง Keratinocytes จะทำการสุ่มคัดเลือกรวมของกลุ่มของจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องเพื่อตั้งเป็นอาณานิคมบนผิว โดยผ่านตัวรับรู้รูปแบบ (PRR) เช่น Toll-like receptors (TLRs)

Mannose receptors และตัวรับแบบ NOD ตัวรับรู้เหล่านี้รับรู้รูปแบบโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อโรค (PAMPs) รวมถึง Flagellin และกรดนิวคลีอิก รวมถึง lipopolysaccharide จากแบคทีเรียแกรมลบ Mannan และ Zymosan จากผนังเซลล์ของเชื้อรา Peptidoglycan และ Lipoteichoic acid จากแบคทีเรียแกรมบวก การกระตุ้นของ Keratinocyte ชนิด PRRs โดย PAMPs จะเริ่มต้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยทันที ส่งผลให้เกิดการหลั่งของยาต้านจุลินทรีย์เปปไทด์ (AMPs) ไซโตไคน์และ Chemokines นอกเหนือจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ปรับตัวแล้ว AMPs ยังฆ่าแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัสที่ห่อหุ้มโดยตรง ดังนั้น Keratinocytes เซลล์ภูมิคุ้มกัน จุลินทรีย์ที่ถูกปรับโดย AMPs, Cytokines, Chemokines และเปปไทด์ของจุลินทรีย์ (Microbial peptides) ซึ่งจะมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันอย่างต่อเนื่อง (Elias, 2007; Krutmann, 2012; Okada et al., 1988)

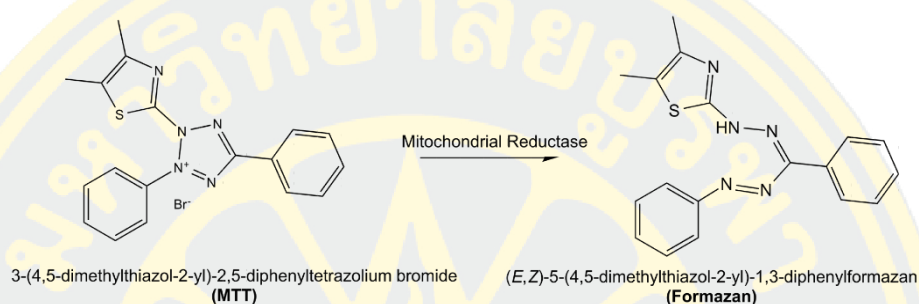
แม้จะมีการสัมผัสกับจุลินทรีย์จำนวนมากอย่างต่อเนื่อง แต่ผิวหนังสามารถแยกแยะระหว่างจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นอันตรายและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่เป็นอันตราย กลไกของการเลือกปฏิบัตินี้ยังไม่ชัดเจน แต่อาจเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำของความทนทานต่อภูมิคุ้มกัน TLRs อาจถูกทำให้อ่อนแอลงโดยการสัมผัสจุลินทรีย์ที่มีอยู่บนผิวเป็นเวลานาน โดยผ่านการแสดงออกของ TLR ที่ลดลงบนผิวของเซลล์หรือโดยการกระตุ้น TLR pathway เป็นตัวยับยั้ง Interleukin-1 receptor-related kinase 3 (IRAK3; IRAK-M) หรือที่เรียกว่า Cytokine signalling 1 (SOCS1) ความจำเพาะอาจทำได้ด้วยการรับรู้ร่วมกันของ PAMPs โดยตัวรับแบบ PRR (Grice & Segre, 2011; Handfield et al., 2018; Jappe, Ingham, Henwood, & Holland, 2002)

การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวน

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Cytotoxicity assay)

การตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ทำได้หลายวิธีโดยแต่ละวิธีจะใช้การวัดจากลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันทางชีววิทยาของเซลล์ (Cell biology) เช่น ความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรน (Membrane integrity) หน้าที่ของเซลล์เมมเบรน (Membrane function) ผลิตภัณฑ์ที่ปล่อยออกมาหลังจากโดนทำลายหรือตาย (Product released by cell damage or death) เมตาบอลิซึมของเซลล์ (Metabolic functions) ประสิทธิภาพของเอนไซม์ (Enzyme activity) การศึกษาประสิทธิภาพสารที่มีลักษณะเฉพาะต่อการรอดชีวิตของเซลล์ (Clonogenic survival) เป็นต้น โดยตัวอย่างการตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงมีด้วยกันหลายวิธี แต่สำหรับวิธีที่จะใช้นี้ เป็นวิธีที่เรียกว่า MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium) เป็นปฏิกิริยา MTT reduction วัดการเกิดสารที่ให้สีจากการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีของเซลล์ โดยการวัดสภาวะ Reduction environment (Mitochondrial reductase) ของ Mitochondria ในเซลล์ เมื่อ MTT ถูก Reduced ด้วย Mitochondrial reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี formazan (ภาพที่ 12) โดยสีจะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorption) ที่ 570 นาโนเมตร ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้น



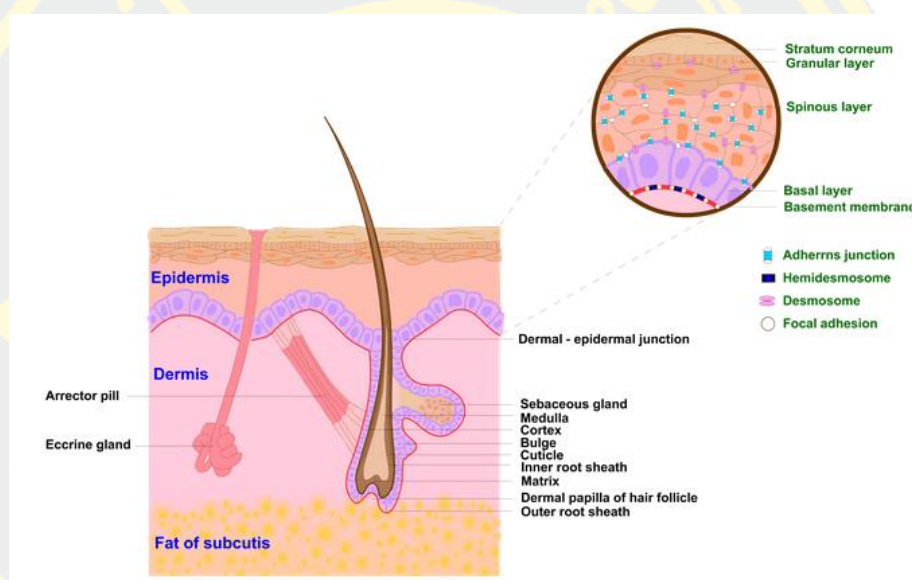
ภาพที่ 12 กลไกการทำงานของสารละลาย MTT เมื่อถูก Reduced ด้วย Mitochondrial reductase จะทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี Formazan

ข้อดี: สำหรับการวิเคราะห์ใน 96-well array โดยใช้ Automatic plate readers สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างและรวดเร็ว

ข้อจำกัด: อาจมีบางเซลล์ที่ยังการแสดงของ MTT reduction ซึ่งจะส่งผลทำให้ได้ค่าต่ำจะไม่สัมพันธ์กับ Cell viability

หนังกำพร้า (Epidermis) เป็นชั้นนอกสุดของผิวหนัง มีความหนาประมาณ 0.05-0.1 มิลลิเมตร Keratinocytes เป็นเซลล์หลักของหนังกำพร้าแบ่งเป็นชั้นต่าง ๆ ตามรูปร่างและส่วนประกอบในเซลล์จัดเป็น Stratified squamous epithelium เรียงจากชั้นในไปนอกสุด ตามลำดับ (ภาพที่ 13) ได้แก่ Stratum basale หรือ Stratum germinativum เป็นชั้นล่างสุด ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยม (Cuboidal cell) 1 แถว ในชั้นนี้พบมี Keratinocyte ที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ของผิวหนัง ซึ่งสามารถแบ่งตัวและสร้างเป็น Keratinocyte ตัวใหม่ได้ Stratum spinosum เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ Keratinocytes ซ้อนกัน รูปร่างเป็นหนาม (Spinous/prickle cell) Stratum granulosum ประกอบด้วย เซลล์ Keratinocytes ซ้อนกัน 3-5 ชั้น ลักษณะเด่น คือ มีเม็ด Granule ภายในเซลล์ ซึ่งเม็ด Granule ดังกล่าวคือ Keratohyaline granules ทำหน้าที่ ช่วยสร้าง Keratin stratum corneum หรือผิวหนังชั้นขี้ไคล (Keratin) เป็นชั้นนอกสุดของ

หนังกำพร้าประกอบด้วย เซลล์ Keratinocyte ที่ไม่มีนิวเคลียส เรียกว่า Corneocytes ตัวเซลล์จะแบน มีไขมันมาเคลือบระหว่างเซลล์ สำหรับชั้น Stratum lucidum เป็นเพียงช่องว่างระหว่างชั้น Stratum granulosum และ Stratum corneum โดยจะพบแค่ผิวหนังบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า บางครั้งเรียกรวมผิวหนังชั้น Stratum basale และ Stratum spinosum ว่าเป็น Stratum malpighii การแบ่งตัวและเจริญของ Keratinocytes จากชั้น Stratum basale ไปถึงชั้น Stratum corneum ใช้เวลา 2 สัปดาห์ และชั้น Stratum corneum ใช้เวลาดอกหลุดอีก 2 สัปดาห์ ทำให้ระยะเวลารวมของผิวหนัง ชั้นกำพร้าจากชั้นล่างสุดเจริญไปจนเป็นชั้นที่ไคลแล้วลอกหลุดใช้เวลารวม 4 สัปดาห์



ภาพที่ 13 โครงสร้างและส่วนประกอบของผิวหนัง

หนังแท้ (Dermis) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเซลล์ และส่วนที่ไม่ใช่เซลล์ (Extracellular matrix) โดยเซลล์ที่สำคัญในหนังแท้ คือ Fibroblasts ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างเส้นใยโปรตีน ที่สำคัญคือ Collagen (80-85%) และ elastic fibers (2-4%) และสร้างสารเรียกว่า Ground substance ซึ่งเป็นสารพวก Polysaccharides

ในชั้นหนังแท้มีเส้นเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยงจำนวนมาก นอกจากนี้ ยังมีรยางค์ของผิวหนัง (Skin appendages) ได้แก่ หน่วยของเส้นขน (Pilosebaceous unit) ซึ่งประกอบด้วย เส้นขน (Hair follicle) ต่อมไขมัน (Sebaceous gland) ต่อมเหงื่อชนิด Apocrine (Apocrine sweat gland) และกล้ามเนื้อเรียบ (Arrector pili muscle) รยางค์ของผิวหนังยังพบต่อมเหงื่อชนิด Eccrine

(Eccrine sweat gland) ซึ่งมีหน้าที่ผลิตเหงื่อ และเล็บ (Nail) ซึ่งมีโครงสร้างและส่วนประกอบที่มีชื่อเฉพาะ

2. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity assays)

2.1 สารอนุมูลอิสระ เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล จึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ ใกล้เคียง จึงทำให้ตัวเองมีความเสถียรมากยิ่งขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบถ้วนกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในระบบของสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบ ๆ บริเวณนั้น เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหายที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคไขข้ออักเสบ โรคสมองเสื่อม (Alzheimer) เป็นต้น (Huang, 2019)

2.2 แหล่งกำเนิดของสารอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนแรีดคิเคิล (O_2^-), เปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^{2-}) และซิงเกิ้ลทอกซิเจน (1O_2) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวมาก ผลิตจากโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) โดยการได้รับอิเล็กตรอนหรือจัดเรียงตัวใหม่ของอิเล็กตรอนสปิน (Electron spin) อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH) เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความไวมากที่สุด เกิดจากกระบวนการ Dismutation ของเปอร์ออกไซด์ เร่งโดยเหล็กไอออน (Fe^{2+}) ไฮโปคลอไรท์ไอออน (OCI) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความไวมากเช่นกันและเหมือนกับสารอนุมูลอิสระอื่นที่กล่าวมาแล้ว เม็ดเลือดขาวเป็นแหล่งผลิตของอนุมูลอิสระดังกล่าว สร้างขึ้นมาเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่บุกรุก (Invading microorganisms) เข้ามาในสิ่งมีชีวิต

ตารางที่ 15 แสดงแหล่งกำเนิดของสารอนุมูลอิสระ

แหล่งกำเนิด

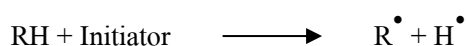
1. การแตกหักของโมเลกุลน้ำ (homolytic scission) โดยรังสี (ionizing radiation)
2. การรั่วไหลของอิเล็กตรอนจากเมมเบรนและปฏิกิริยารีดักชันของโมเลกุลออกซิเจน
3. วัฏจักรของไซโตโครมออกซิเดส
4. การกระตุ้นของ CYP2E1
5. ปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนในเนื้อเยื่อโดย Fe^{2+}/Fe^{3+} และโลหะหนักชนิดอื่น ๆ
6. การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในขบวนการอักเสบ
7. วัฏจักรรีดักชันของควิโนน
8. ขบวนการสังเคราะห์โปรสตาแกลนดิน

2.3 สาเหตุการเกิดสารอนุมูลอิสระ

2.3.1 ปฏิกิริยาในร่างกาย

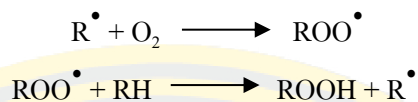
2.3.1.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto-oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

2.3.1.1.1 ระยะเหนี่ยวนำ (Initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสง และอนุมูลเป็นตัวเร่ง ดังสมการ

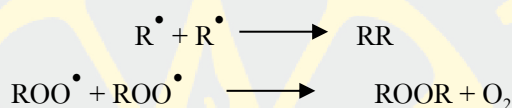


2.3.1.1.2 ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (Peroxy radical) ซึ่งทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide) และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็น

ตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ดังสมการ

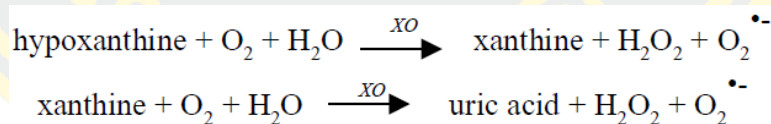


2.3.1.1.3 ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกันในรูปแบบต่าง ๆ ดังสมการ

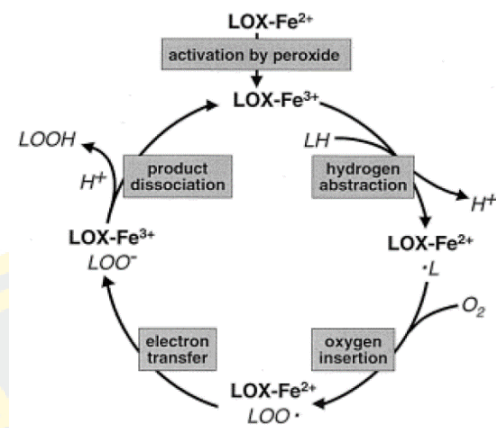


2.3.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง เป็นการทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

2.3.1.2.1 เอนไซม์ Xanthine oxidase (XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (Purine) โดยจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Hypoxanthine เป็น Xanthine และ Xanthine เป็น Uric acid พร้อมกับการขนถ่ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^\bullet) ดังสมการ

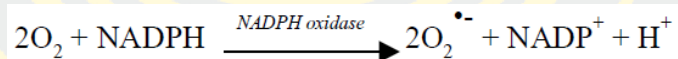


2.3.1.2.2 เอนไซม์ Lipoyxygenase (LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid) โมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ซึ่งทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็น Hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไปได้ (Kesavan et al., 2000) ดังภาพที่ 14

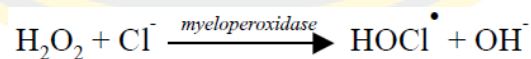


ภาพที่ 14 การทำงานของเอนไซม์ Lipoygenase ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน

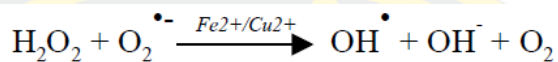
2.3.1.3 กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว เป็นขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ NADPH oxidase ที่อยู่บนเยื่อชั้นนอก (Outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ



นอกจากนี้ในเม็ดสี (granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ myeloperoxidase ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอไรต์ (hypochlorus, $HOCl^{\cdot}$) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลินทรีย์ได้ดังสมการนี้



2.3.1.4 โลหะทรานซิชัน (Transition metal) โลหะทรานซิชัน 2 ชนิด คือ เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\bullet) จากซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction) ดังสมการ



2.3.2 ปัจจัยภายนอก

2.3.2.1 ยารักษาโรค ยาบางชนิดสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลินทรีย์และต้านมะเร็ง เช่น Bleomycin, Antracyclines และ Methotrexate เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมออกซิเดชัน (Pro-oxidation)

2.3.2.2 รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray) รังสีแกมมา (γ -ray) เป็นต้น อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายถอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นต่อไป (Secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้น ได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น

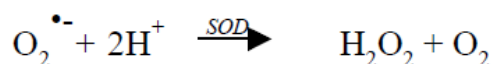
2.3.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ ในคาร์บอนไดออกไซด์มีส่วนประกอบของ Nitric oxide (NO), Nitrogen dioxide (NO_2) และ Peroxynitrite (ONOO^-) และสารมลพิษ ได้แก่ Sulfur dioxide (SO_2) และ Carbontetrachloride (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P-450 hydroxylase ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว

2.3.2.4 โอโซน โอโซนไม่ได้จัดเป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรง ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสงยูวี

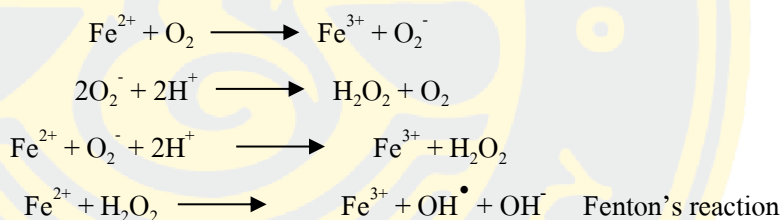
2.4 อนุมูลอิสระแรงสูงที่สำคัญของร่างกาย ได้แก่

2.4.1 อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ภายในเซลล์ทั่วไป ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำภายในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) อนุมูลอิสระจะไม่เข้าทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์โดยตรง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมี เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ช่วยเร่งในปฏิกิริยา Fenton จะได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\bullet) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความว่องไวสูง นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตยังสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

จากซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet -}$) ได้โดยตรงจากปฏิกิริยา Dismutation ของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ดังสมการ



2.4.2 อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\bullet}) เป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงที่มีความว่องไวสูงสุด สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นอนุมูลนี้จึงเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลชนิดอื่น ๆ อนุมูลไฮดรอกซิลสร้างขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีโลหะทรานซิชันอยู่ในระบบ โดยเหล็ก (Fe^{2+}) จะทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\bullet}) และไฮดรอกไซด์ไอออน (Hydroxide ion, OH^-) ในปฏิกิริยา Fenton ดังสมการ



2.4.3 อนุมูลไนตริกออกไซด์ (NO^{\bullet}) เป็นอนุมูลอิสระขนาดเล็กที่เป็นพิษกับเซลล์ปอด สามารถรวมตัวกับโลหะทรานซิชัน หรือโปรตีนที่มีโลหะชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ (Metalloprotein) ได้ อนุมูลไนตริกออกไซด์สามารถเข้าจับกับฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ได้เร็วกว่าโมเลกุลออกซิเจน จนอาจเกิดการขัดขวางกระบวนการขนส่งก๊าซออกซิเจน นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว เกิดเป็นอนุมูล Peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) ที่มีความว่องไวสูง ในสภาวะที่มีออกซิเจน NO^{\bullet} จะถูกออกซิไดซ์เป็น NO_2 ซึ่งเป็นสารพิษสามารถทำลายเซลล์ของถุงลม (Alveoli) และผนังหลอดเลือด (Vascular endothelium) ภายในปอดได้

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในที่นี้รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์สารต้าน

อนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น Amino acid, Ascorbic acid, Carotenoids, Flavonoids, Tannins, Tocopherols เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

2.5.1 Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาถูกโอโซนของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันนอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) เช่น Alkyl gallate, BHA, BHT, TBHQ และอื่น ๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2.5.2 Oxygen scavenger สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามิน ซี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

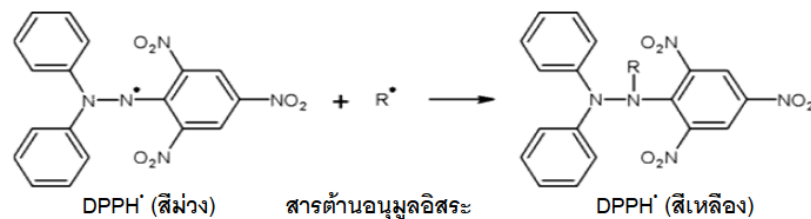
2.5.3 Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ Dilauryl thiopropionate และ Thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ Lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2.5.4 Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งแบ่งเป็น Primary antioxidant enzyme และ Auxiliary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

2.5.5 Chelating agent หรือ sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก และ กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเสถียร

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity determination) วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยวิธีที่ถูกนำมาใช้จะเป็นวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ซึ่งจะประกอบไปด้วยวิธีดังนี้

2.6.1 วิธี DPPH radical scavenging activity โดยอนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัวมีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยใช้เครื่องสเปกโตรวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไปโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 สมการการเกิดปฏิกิริยาหลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ

ข้อดี: ง่ายต่อการใช้เครื่องมือที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้น สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

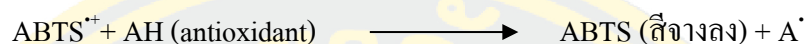
ข้อจำกัด: อนุมูล DPPH[•] มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกการจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH[•] ที่แสดงจะเห็นว่า อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วงและหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาจับอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริงทั้ง ๆ ที่สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการจับอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH[•] จางลงได้อีกด้วย

2.6.2 วิธี ABTS radical scavenging activity เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอปิตีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติ จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดั่งสมการ) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

ข้อดี: ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง

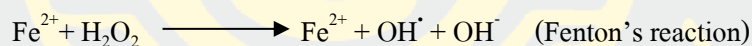
ข้อเสีย: ABTS^{•+} ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ ตัวอย่างที่ได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ได้แก่ การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโหราพา การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนของ

เมล็ดมะม่วง (*Mangifera indica* L) มากกว่าใบอ่อน ใบแก่ และเปลือกของผลดิบ และพบว่าส่วนสกัดจากใบผักช้ำเลือด (*Cesalpinia mimosoides* Lamk) มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนของยอดอ่อน ใบดอก และลำต้น อีกทั้งได้มีการตรวจพบต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากโคไมรู๊ล้ม ผักคราดหัวแหวน หญ้าตดหมา เหียง กะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่า เพกา และมะระจีน

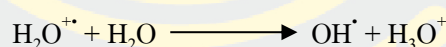
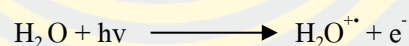


2.6.3 วิธี Hydroxyl radical scavenging activity Hydroxyl radical (OH^{\cdot}) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไวสามารถจับอนุมูลสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายโดยการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่อย่างต่อเนื่อง (Jeremy P.E. Spencer & David T. Dexter, 1994) สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง OH^{\cdot} radical โดย 2 กลไก ได้แก่

2.6.3.1 ปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ได้ OH^{\cdot} แต่ในร่างกายนั้นเป็นไปได้ว่าเกิดจากเหล็ก Fe^{2+} ที่ทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ได้ OH^{\cdot} โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton's reaction ดังสมการ



2.6.3.2 การแตกตัวของน้ำเนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ



ความสามารถในการยับยั้ง OH^{\cdot} radical ของสารตัวอย่างต้องทำการสังเคราะห์ Hydroxyl radical (OH^{\cdot}) จากน้ำตาล deoxyribose โดยปฏิกิริยา Fenton reaction model system เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และ Trichloroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพูเมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง OH^{\cdot} radical ลงไปจะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร หลังจากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

(Hydroxyl scavenging effect %)

2.6.4 วิธี Nitric oxide radical scavenging assay

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา Nitric oxide radical scavenging สามารถตรวจวัดปริมาณได้โดยอาศัยการเกิดสีของปฏิกิริยา Griess reaction โดย Sulfanilamide จะทำปฏิกิริยา

ไดอะโซเนียมไทเทชั่นกับไอออนไนไตรท์ในสารละลายกรด กลายเป็น Diazonium salt จากนั้นเกิดปฏิกิริยารวมตัวกับ N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine·2HCl ได้สารประกอบ Azo dye สีแดงม่วง ส่วนไอออนไนเตรทจะต้องถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็นไอออนไนไตรท์ก่อน โดยใช้ Zinc หรือ Cadmium ก่อนเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว โดยความเข้มข้นของสารประกอบ Azo dye ที่เปลี่ยนแปลงไปจะแปรผันตรงกับปริมาณของไนไตรท์และไนเตรทที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Merasanud et al., 2017)

2.6.5 ตรวจสอบการยับยั้งลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic peroxidation assay) Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาถูกออกซิไดซ์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นและการสิ้นสุดปฏิกิริยาปฏิกิริยาถูกออกซิไดซ์เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นและอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับลิปิด และทำให้เกิดอนุมูลลิปิด (L[•] หรือ R[•])

วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัดทดสอบโดยใช้ดัชนีอนุมูลลิปิดทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก ในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกได้เป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ลงไปจะทำให้สารสีจางลง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 532-535 นาโนเมตร และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition)

ข้อดี: วิธีการนี้ คือ ทำการศึกษาง่ายสะดวกไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง

ข้อจำกัด: ต้องใช้สิ่งมีชีวิตในการทำการทดลองทำให้ลดความนิยมลง

3. การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) เป็นการศึกษาการวัดคุณภาพ โดยการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายของสาร และองค์ประกอบทางเคมี โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธีการของ AOAC

4. การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity) เป็นการศึกษาการวัดคุณภาพ โดยการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายของสาร และองค์ประกอบทางเคมี โดยวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธีการของ AOAC

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การค้นพบสารฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

Han (1990) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่สร้าง Levan คล้ายกับ Dextran มักเป็นผลิตภัณฑ์ที่

ไม่พึงประสงค์จากกระบวนการของน้ำตาลที่ได้จากผลไม้ เพราะมันเพิ่มความหนืดของการบวนการผลิตสุรา Lippmann ตั้งชื่อว่า "levulan" ส่วน Greig-Smith พบว่า *Bacillus* นำซูโครสไปผลิต Fructans และตั้งชื่อว่า "Levan" คล้ายกับ "Dextran" คำว่า Levulan หมายถึง บางส่วนย่อยสลายเศษลิแวนการรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับลิแวนทำให้เกิดความสับสนเนื่องจากศัพท์สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ไม่เป็นทำให้ไม่เพียงพออธิบาย ลิแวนอีกทั้งไม่เคยมีการใช้ในอุตสาหกรรมที่กว้างขวาง (Microbial levan) (Youn W. Han, 1990)

Bekers et al. (2002) พบว่า *Zymomonas mobilis* เลี้ยงในอาหารที่ส่วนประกอบของซูโครส และนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และตกตะกอนด้วยเอทานอล ทำการวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบของ Fructooligosaccharide (FOSs) ดังนี้ 1-Kestose 6-kestose, Neokestose และ Nystose เป็นเส้นใหญ่ที่ละลายน้ำได้ เป็นพรีไบโอติก และ ช่วยลดคอเลสเตอรอล (Bekers et al., 2003)

Ben Ammar et.al. (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติการทนความร้อนของลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. ที่พบได้ในดิน (Ben Ammar et al., 2002)

Shieh et al. (2009) ได้ทำการหมักถั่วเหลือง โดยใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ผสมกับน้ำตาลความเข้มข้น 5% และ L-glutamate ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น Poly(γ -glutamic acid) และลิแวน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นจาก 5% เป็น 20% พบว่า มีการสร้างลิแวนมากขึ้น (Shieh, Phan Thi, & Shih, 2009)

2. กระบวนการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

2.1 กระบวนการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืช

เอกภพ ลินงาน (2555) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแก่นตะวัน เพื่อให้ได้ปริมาณฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณที่สูงโดยใช้รูปแบบวิธีการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องและ 90 องศาเซลเซียส และการสกัดด้วยเอทานอล 80% ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่ารูปแบบของสารที่พบในสารสกัดมีความคล้ายคลึงกันในทุกสามสถานะของการสกัด โดยการสกัดด้วยน้ำทั้ง 2 อุณหภูมิได้ให้สัดส่วนของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล 80% ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (สินงาม, 2555)

Benkeblia (2013) ได้มีการศึกษาการวิเคราะห์ของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์และฟรุกแทนเพื่อหาปริมาณฟรุกโตสในพืชและพืชเศรษฐกิจ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์สาร

โครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), Liquid chromatography, Gas chromatograph (Benkeblia, 2013)

2.2 กระบวนการผลิตฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์

Lorenzoni et al. (2014) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ Fructooligosaccharides ด้วยเอนไซม์ β -fructofuranosidase โดยใช้จุลินทรีย์ Viscozyme ตรึงบนเม็ดโกลโตซาน พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม จากการทำซ้ำ 50 ครั้ง ทำให้ได้ค่า yield เฉลี่ยเท่ากับ 55% (Lorenzoni et al., 2014)

Wu et al. (2013) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของลิแวนของ *Bacillus subtilis* natto ใน Batch และ Fed-batch culture ในถังหมัก การผลิตลิแวนใน Batch และ Fed-batch culture ของ *Bacillus subtilis* (Natto) ในการหมัก เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีซูโครส (250 กรัม/ลิตร) ที่ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที จะทำให้มีประสิทธิภาพและผลผลิตลิแวนที่สูง (61 g/L at 24 h ; 3.4 g/L/h) น้ำตาลซูโครสช่วยเพิ่มการผลิตลิแวนเป็น 100 กรัม/ลิตร (เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า) นี่เป็นครั้งแรกที่ได้รับการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ในถังหมักและมีลิแวนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ได้รับรายงาน ผลผลิตและน้ำหนักโมเลกุลของลิแวนขึ้นอยู่กับเกิดการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม ความเข้มข้นของซูโครสเป็นปัจจัยที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของลิแวนที่สังเคราะห์ ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างลิแวนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันสำหรับการใช้งานที่ต่างกัน (Wu, Chou, & Shih, 2013)

Nascimento et al (2016) ได้ทำการสังเคราะห์ สารฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ β -fructofuranosidase โดยใช้รา *Penicillium* พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่า pH 5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสม จากการทดลองในถังหมักเป็นระยะเวลา 68.7 ชั่วโมง ได้สารฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 58.7 กรัม (Nascimento, Nobre, Cavalcanti, Teixeira, & Porto, 2016)

3. ประโยชน์ลิแวน

3.1 ด้านสุขภาพ

Sedgwick et al. (1984) ได้ศึกษาผลของลิแวน ต่อการเกิดโรคเชื้อหุ้มปอดอักเสบที่เกิดจาก Carrageenan และ Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals exudate ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกิดจากเชื้อหุ้มปอดและปริมาณสารที่หลั่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Sedgwick, 1984)

C. Kim et al. (2006) ได้ศึกษาการทำเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของลิแวน โดยมีซูโครสเป็นสารตั้งต้นและจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น *Rahnella aquatilis*, *Zymomonas mobilis* และ

Pseudomonas aurantiaca ลิเวิน ผ่านกระบวนการสกัดและทำให้การบริสุทธิ์เพื่อทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนัง พบว่า จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว (C. Kim, Han, 2006)

Cristina Sturzoiu (2011) ได้ศึกษาการวิเคราะห์เนื้อเยื่อ MMPs ของหนุขาวที่เกิดแผลพุพองที่บริเวณผิวหนัง โดยใช้เกลือควบคู่กับลิเวินในการรักษาแผลเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า สามารถป้องกันการติดเชื้อของแผลและช่วยในการสร้างเนื้อขึ้นมาใหม่อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ลิเวินจึงเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาบาดแผล (Cristina Sturzoiu, 2011)

Srikanth et al. (2015) ได้ศึกษาการผลิตลิเวินโดยใช้แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* NCIM 2526 และน้ำตาลซูโครสหมักในถังปฏิกรณ์แบบถังเดี่ยว เพื่อใช้ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบ และมีการศึกษาในการเพิ่มประสิทธิภาพของลิเวิน (Srikanth et al., 2015)

Chen et al. (2016) ได้ศึกษาการบวกรวมกันของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์ และศึกษาประโยชน์ของฟรุกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์และกลไกการทำงานต่าง ๆ เช่น การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การปรับปรุงระบบทางเดินอาหาร การป้องกันมะเร็งในลำไส้ใหญ่และทวารหนัก การจัดการน้ำหนักและความผิดปกติของโรคอ้วน การปรับปรุงความสามารถในการใช้ประโยชน์และการดูดซึมแร่ธาตุ เป็นต้น (Chen, Li, & Chen, 2016)

3.2 ด้านอาหาร

Belghith et al. (2012) ได้ศึกษาผลการเลี้ยงของหนุ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ อาหารปกติ อาหารที่มีลิเวิน อาหารไขมันสูง และอาหารที่มีไขมันสูงผสมลิเวิน โดยอาหารที่มีไขมันสูงจะผสมลิเวิน 5% เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า หนุที่กินอาหารที่มีไขมันสูงผสมลิเวินมีปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคหลอดเลือดตีบ (Belghith, Dahech, Belghith, & Mejdoub, 2012)

Srikanth et al. (2015) ได้ศึกษากระบวนการผลิตของลิเวินซูเครส โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นลิเวิน และผ่านกระบวนการวิเคราะห์สารผสม Nuclearmagnetic resonance (NMR) เพื่อหาโมเลกุลโครงสร้างของสาร และมีการศึกษาการประยุกต์ใช้ลิเวินในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อุตสาหกรรม และยา (Srikanth et al., 2015)

4. งานวิจัยด้านการผลิตลิเวินและกระบวนการทำให้สารบริสุทธิ์

Watson (1992) พบว่า *Bacillus polymyxa* (NRRL-18475) ผลิตฟรุกแทนชนิดลิเวิน (β -2-6 โอลิโกฟรุกแทน) โดยมี น้ำตาลซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาลเป็นซับสเตรทหมักแบบ การหมักแบบเปียก (Submerged Fermentation, SmF) โดยสามารถสังเคราะห์ลิเวินได้ 46% ของน้ำตาลซูโครสเพื่อแต่ผลผลิตของลิเวินจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาลหัวผักกาดมีค่าน้อยกว่า

สารละลายซูโครส น้ำอ้อยและกากน้ำตาลหัวผักกาดสามารถทำให้เป็นสารตั้งต้นได้ดี กระบวนการทำให้ลิแวนบริสุทธิ์นั้น ให้กระบวนการตกตะกอนลิแวนด้วยเอทานอลหรือไอโซโพรพานอล อะซิโตน และเมทานอลยังสามารถใช้ได้ในการตกตะกอน อัตราส่วนของเอทานอลต่ออาหารเลี้ยง จุลินทรีย์คือ 1.2 : 1 ทำซ้ำเพื่อทำให้สารลิแวนบริสุทธิ์ขึ้น จากนั้นการ Dialysis หรือ Ultrafiltration และทำ Freeze dry ลิแวนจะอยู่ในรูปผงสีขาว (Watson, 1992)

Jang et al. (2000) พบว่า *Zymomonas mobilis* ผลิตสารลิแวนได้ในน้ำตาลซูโครส โดยทดสอบการหมักเป็น 3 แบบ ได้แก่ เซลล์อิสระ การตรึงเอนไซม์ และการ Toluene-permeabilized whole cell และใช้กระบวนการ HPLC ในกระบวนการวิเคราะห์ปริมาณของลิแวนการหมักแบบ เซลล์อิสระจะให้โมเลกุล ($>6 \times 10^6$) ขนาดใหญ่กว่าการหมัก 2 แบบ คือ การตรึงเอนไซม์ และการ Toluene-permeabilized whole cell แต่ให้ Yield สูงถึง 70-80% (Jang et al., 2001)

Ben Ammar et al. (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติการทนความร้อนของลิแวน ซูเครสจากเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus sp.* ที่พบได้ในดิน การทำให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ โดยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ DEAE-Cellulose และการกรองด้วยเจลโครมาโทกราฟี โดยพบว่าอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่ลิแวนซูเครสสามารถทนความร้อน ได้ (Ben Ammar et al., 2002)

Yuoh Ku et al. (2003) ได้ศึกษาการตกตะกอนของอินูลินและ โอลิโกกลูโคส โดยใช้ตัว ทำละลายเอทานอล (Ethanol) โพรพานอล (Propanol) อะซิโตน (Acetone) และอะซิโตนไนไตร์ (Acetonitrile) โดยตัวทำละลายผสมกับส่วนใสในอัตราส่วน (v/v) 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1 และ 4 : 1 พบว่า การวิเคราะห์สารโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เอทานอลใน อัตราส่วน 4 : 1 ดีที่สุด (Yuoh Ku, 2003)

Shih, Yu, Shieh, & Hsieh (2005) พบว่า *Bacillus subtilis* ผลิตสารลิแวนได้ 40–50 mg/mL ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20% (w/w) ในสภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 21 ชั่วโมง นำมาแยกเซลล์และตกตะกอนลิแวนด้วยเอทานอล 4 เท่า ที่อุณหภูมิต่ำ ปั่นเหวี่ยงนำส่วนที่ไม่ละลายแยกด้วยการ Dialysis ผ่าน Membrane ขนาด 10 kDa ทำการวิเคราะห์ Gel Permeation Chromatography เพื่อศึกษา Molecular weight (Shih, Yu, Shieh, & Hsieh, 2005)

Poli et al. (2009) พบว่า *Halomonas sp.* AAD6 (JCM 15723) สามารถผลิตสาร

โพลีแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณที่สูง หมักในสภาวะ 2 ได้แก่ แบบกะ และแบบต่อเนื่อง โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นและได้ปริมาณลิแวน 1.073 g/L และ 1.844 g/L วิเคราะห์โครงสร้างด้วยกระบวนการ NMR โครงสร้างของโมเลกุล β -2,6 โอลิโกฟรุกแทน โดยกระบวนการสกัดได้แยกเซลล์และนำส่วนใสตกตะกอนด้วยสารละลาย Alcoholic ที่ -18°C ปั่นเหวี่ยง และนำตะกอนที่อยู่ด้านล่างไปละลายด้วยน้ำร้อน และเข้าสู่กระบวนการ จากนั้นการ Dialysis หรือ Ultrafiltration และทำ Freeze dry (Poli et al., 2009)

Sanches Lopes et al. (2016) พบว่าสามารถสกัด Fructooligosaccharides (FOSs) ได้จากหัวและใบของ *Stevia rebaudiana* บดหัวและใบอย่างละ 100 g ให้ละเอียดและนำมาสกัดด้วยเฮกเซน 1,000 mL นาน 4 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสผสมกับเอทานอลในปริมาณ 3 เท่าโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงนำส่วนที่ตกตะกอนละลายน้ำ 200 ml ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเกิดตะกอนและนำไปปั่นเหวี่ยง และทำ Freeze dry เพื่อให้เป็นผงและนำไปศึกษาโครงสร้างพบว่า เป็นสาร Fructooligosaccharides (FOSs) (Sanches Lopes et al., 2016)

Dahech, Belghith, Belghith, & Mejdoub (2012) ได้ศึกษากระบวนการวิเคราะห์สารโดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) โดยการหยดสารลงบน ซิลิกาเจล จี 60 (silica gel G-60) ซึ่งใช้ตัวพา (mobile phase) ได้แก่ คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วนปริมาตร 6 : 7 : 1 และใช้กรดซัลฟิวริกและเอทานอลในอัตราส่วนปริมาตร 10 : 90 เพื่อหยุดการเคลื่อนที่ของสารบนซิลิกาเจล (Dahech, Belghith, Belghith, & Mejdoub, 2012)

Porras-domínguez et al. (2014) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นลิแวนที่ต่อกันแบบ $\beta(2\rightarrow1)$ fructosyl-fructose โดยใช้น้ำตาลซูโครสและลิแวนซูเครส พบว่าลิแวนซูเครสจาก *Bacillus subtilis* มี %yields เท่ากับ 97 (Porras-Domínguez et al., 2014)

Liu et al.(2017) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ลิแวน โดยใช้ซูโครสและเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ชนิด *Brenneria goodwinii* พบว่าที่ปริมาณซูโครส 50% (w/v) ค่า pH 6.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไฮโดรไลซิสของซูโครส และกระบวนการ Transfructosylation โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากกระบวนการทำให้สารบริสุทธิ์จะได้ปริมาณลิแวน 185 กรัมต่อลิตร (Liu et al., 2017)

Nobre et al. (2016) ได้ทำการศึกษานาเทคนิคสำหรับการผลิตของฟรุกโทโอลิโก

แซ็กคาไรด์ให้มีปริมาณที่สูงโดยการกำจัดโมเลกุลของแซ็กคาไรด์ขนาดเล็กโดยใช้ Co-culture หรือกระบวนการหมักต่อเนื่องกับยีสต์ Fructooligosaccharides (FOSs) ที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครสอาจถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatography แบบต่อเนื่อง (Simulated moving Bed: SMB) เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของ SMB ให้มีความบริสุทธิ์ และได้มีการหาค่าประกอบของน้ำหมักที่เหมาะสมในเกลือและน้ำตาล น้ำหมักที่ได้จะมีปริมาณเกลือลดลงโดยใช้จุลินทรีย์ *Aureobasidium pullulans* ทั้งหมดให้ผลเป็น 0.63 ± 0.03 กรัมของ FOSs ต่อกรัมของซูโครสเริ่มต้น นอกจากนี้ยังมีวิธีการบำบัดด้วยจุลินทรีย์เพื่อลดจำนวนโมเลกุลแซ็กคาไรด์ขนาดเล็กให้น้อยลง ส่วนวิธีที่สองได้มีการเพาะเลี้ยง *Aureobasidium pullulans* ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* และการหมักแบบสองขั้นตอนซึ่ง FOSs ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกโดย *Aureobasidium pullulans* และต่อมาเพื่อลดจำนวนโมเลกุลแซ็กคาไรด์ขนาดเล็กโดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* กระบวนการหมักในขั้นตอนสองขั้นตอน พบว่า มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ Co-culture อย่างเดียว FOSs ได้จะมีความบริสุทธิ์ $81.6 \pm 0.8\%$ (w/w) ตามน้ำหนักแห้ง หลังจากการหมักครั้งที่สองกับ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้ปริมาณซูโครสลดลงจากร้อยละ 13.5 เป็นร้อยละ 5.4 ในน้ำตาลทั้งหมดซึ่งแสดงให้เห็นว่า FOS ที่ได้จาก Culture broth จะมีประสิทธิภาพมากกว่าการแยกโดย SMB (Nobre et al., 2016)

ณัฐพงศ์ ทาคำ และนภาพรณธ์ ปิยะวรรณรัตน์ (2559) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากถั่วเหลืองหมัก ด้วยวิธีการ

1. ทำการเจือจางสารแบบ serial dilution จากถั่วเหลืองหมัก
2. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จากถั่วเหลืองหมัก ในอาหารแข็งสูตรที่ 1

(Differentiate agar media) ที่มีน้ำตาลซูโครสสูง โดยพิจารณาจากการสร้างเมือกของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิแวนจากน้ำตาลซูโครสได้ และนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรที่ 2

(Selective agar media) ที่มีปริมาณซูโครสน้อย สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นโคโลนี ได้ 9 ชนิด

3. หาประสิทธิภาพการย่อยน้ำตาลซูโครสของจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ 5 ชนิด

4. ในอาหารเหลวสูตร 1 ด้วยวิธี DNS เพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิส

5. ศึกษาพฤติกรรมของการย่อยน้ำตาลกลูโคส พบว่าที่ชั่วโมงที่ 12 จุลินทรีย์ชนิด B-5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสูงสุด และ B-1, B-6, B-2, B-4 ตามลำดับ

6. ศึกษาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ด้วยวิธีการ Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่า ที่ 0 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ยังไม่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และทรานฟรุกโทซิลเลชั่น ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสาร โพลีแซ็กคาไรด์ (ณัฐพงศ์ ทาคำ, 2559)

ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ และฐิตชนันท์ สายเครือคำ (2560) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารฟิโบริโอติกในรูปของลิแวนจากถั่วเหลืองหมัก ด้วยวิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากจุลินทรีย์ B-5 และ B-6 จากการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลิแวน การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ B-5 และ B-6 ด้วยเทคนิค 16SrRNA และทำการศึกษาโครงสร้างของสารลิแวนด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ FTIR spectroscopy, ^1H และ ^{13}C NMR spectroscopy (ณัฐวุฒิ ไตรโอสถ, 2560)

5. งานวิจัยด้านกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนัง

Jean Krutmann et al. (2012) ได้กล่าวถึงการศึกษาของกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวหนังของมนุษย์และให้ความสำคัญเกี่ยวกับการศึกษาที่มีอยู่ในปัจจุบันในการใช้ฟิโบริโอติกและโพรไบโอติกทางด้านคลินิกโรคผิวหนังและทางด้านเครื่องสำอาง (Krutmann, 2012)

Marisa Chattman Nielsen and Sunny C. Jianga (2019) ได้ทำการศึกษาโดยการสำรวจความสัมพันธ์ระหว่างการสัมผัสกับน้ำทะเล และกลุ่มจุลินทรีย์บนผิวหนังของมนุษย์ เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผิวหนังโดยใช้การ Swabs จากผู้เข้าร่วม โดยจะเก็บตัวอย่างจากบริเวณน่องขา ก่อนและหลังพวกเขาว่ายน้ำในทะเล เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง และจากการวิเคราะห์จีโนม แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์บนผิวหนังมีความแตกต่างกันระหว่างบุคคลก่อนว่ายน้ำ และหลังจากการว่ายน้ำ สรุปได้ว่า งานวิจัยนี้ให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของจุลินทรีย์บนผิวหนังของมนุษย์กับสิ่งแวดล้อม (Nielsen & Jiang, 2019)

Elizabeth A. Grice and Julia A. Segre (2011) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับระบบนิเวศของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวหนังของมนุษย์ ปัจจัยที่ส่งผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวหนังของมนุษย์ และทำการจำแนกประเภทของกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านั้นออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ (Grice & Segre, 2011)

6. งานวิจัยด้านการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

Jiradej Manosroi et al. (2014) ได้ทำการศึกษาการสกัดฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOSs) จาก *Coix lachryma-jobi* Linn (Job's tears) โดยการสกัดด้วยน้ำร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารสกัดผงแห้งได้รับการทดสอบปริมาณของ FOSs ประกอบด้วย 1-kestose (GF2) nystose (GF3) และ 1-β-Dfructofuranosylnystose (GF4) โดยใช้เครื่อง HPLC แบบ RI ปริมาณของ FOSs ทั้งหมดที่สกัดได้ คือ $24.98 \pm 7.48\%$ (g/100 g crude extract) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงการต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ FOSs โดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับวิตามินซี (0.97 เท่าของวิตามินซี) โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation เล็กน้อย สารสกัด ดังกล่าว ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง ผลลัพธ์เหล่านี้ไม่เพียงแต่ยืนยันแหล่งที่มาของ FOSs จาก Job's tears เท่านั้น แต่ยังสามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารหรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อีกด้วย (Manosroi, Khositsuntiwong, & Manosroi, 2014)

Shi et al. (2012) ได้ทำการศึกษากาหมักในสถานะของแข็งโดยนำกากถั่วเหลือง (SCR) กลับมาใช้ใหม่เป็นสารตั้งต้นที่เป็นของแข็ง ได้ผลิตโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยจุลินทรีย์ *Flammulina velutipes* (F. velutipes) ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสมคือ 74.5% ของความชื้น 9.69 ของขนาดหัวเชื้อและอัตราส่วน 30.27 ของ C/N โดยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง 59.15 mg/g ของโพลีแซ็กคาไรด์ถูกสกัดจากการหมัก SCR โดยการสกัดด้วยอัลตราโซนิก สภาวะของสารสกัดที่เหมาะสม คือ 30 นาที 80 องศาเซลเซียส 150 W และ 20 ของอัตราส่วนน้ำต่อของแข็ง และได้โพลีแซ็กคาไรด์ 106.74 mg/g นอกจากนี้ยังมีการประเมินสารต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมภูมิคุ้มกันของโพลีแซ็กคาไรด์ ผลการวิจัยพบว่าโพลีแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลของ DPPH ที่รุนแรง กิจกรรมของ SOD การกระตุ้นการขยายตัวของมาโครฟาจ การผลิตไนตริกออกไซด์ ฟาโกไซโตซิส และการป้องกันความเสียหายของ Doxorubicin (Shi, Yang, Guan, Zhang, & Zhang, 2012)

Rapala Srikanth et al. (2015) ได้ทำการศึกษากาหมักต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านการอักเสบของลิแวนที่ผลิตจาก *Acetobacter xylinum* NCIM2526 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ การศึกษานี้มุ่งเน้นไปที่การเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตลิแวน โดยใช้ปัจจัยหนึ่งในเวลาที่ตามมา ด้วยวิธีการทางสถิติการออกแบบวัสดุคอมโพสิต (CCD) กับตัวแปรที่เลือก ผลผลิตของลิแวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจาก 0.54 เป็น 13.25 g/L พร้อมกับตัวแปรที่เหมาะสมที่สุด (Srikanth et al., 2015)

Inturri et al. (2017) ได้ทำการศึกษากาหมักวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีและชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์จากจุลินทรีย์ *Bifidobacterium longum* W11 *Bifidobacterium longum* W11 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ซับซ้อนผสมกับส่วนประกอบหลักที่ประกอบด้วย กลูโคส และกาแลคโตส การวิเคราะห์โครงสร้างอย่างละเอียดถูกระบุหน่วยการทำซ้ำสองหน่วยที่แตกต่างกัน

กัน เป็นเชิงเส้นเดี่ยว [$\rightarrow 6$]- β -Galp-(1 \rightarrow 3)- α -Galp-(1 \rightarrow) และอีกหนึ่งหน่วยที่มีกระดูกสันหลังเดียวกันซึ่ง β -Galp หน่วย 5 ถูกแทนที่ด้วยหน่วย β -Glcp ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความไม่เป็นพิษของ EPS W11 ทั้งหมด รวมทั้งลักษณะการทำงานบางประการของสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต เช่น การทดสอบในหลอดทดลองต่อความต้านทานของสภาวะทางเดินอาหารและการยึดเกาะของโคโคไซต์ (Inturri et al., 2017)

Domzat-Kedzia และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาตัวแปรของกระบวนการหมักและปัจจัยของลิแวนที่มีผลต่อการนำไปใช้ในเครื่องสำอาง โดยพบว่า ลิแวนไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่เป็นพิษต่อเลือด ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 1 mg/ml ยิ่งไปกว่านั้น ลิแวนยังแสดงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของน้ำมันกับน้ำ และการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (Domzal-Kedzia et al., 2019a)

7. งานวิจัยด้านการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ

Xu Yajima (2006) ได้ทำการศึกษา ลิแวนจาก *B. subtilis* (natto) ทำให้เกิดการผลิต TNF- α และ IL-12 p40 ใน macrophages และการแสดงออกของ TLR4 อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นด้วยมาโครฟาจโดยสารลิแวน (Xu Yajima, 2006)

Park et al. (2008) ได้ทำการศึกษา ลิแวนจาก *Z. mobilis* ยังกระตุ้นให้เกิดการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์มาโครฟาจที่สามารถเป็นตัวกลางต่อความเป็นพิษต่อเซลล์นี้เองได้ (Park et al., 2008)

Peng Zhang et al. (2019) ได้ทำการศึกษา ลักษณะของ โพลีแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ (RPEPS-30) ที่สกัดจากการหมักด้วย *Rhodospseudomonas palustris* ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่า RPEPS-30 เป็น α -mannan ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46.82 kDa ซึ่งมีกระดูกสันหลังประกอบด้วย 1, 2-linked และ 1, 4-linked mannose ที่เชื่อมโยงโดยโซ่ด้านข้างประกอบด้วย 1 \rightarrow 6 ที่เชื่อมโยงและ 1 \rightarrow 2,6 ที่เชื่อมโยงในส่วน mannose residues และแทนที่ O-6 การทดสอบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง พบว่า RPEPS-30 ช่วยเพิ่มความสามารถของฟาโกไซติก ไม่มีการปลดปล่อยและการแสดงออกของ mRNA ของไซโตไคน์ในมาโครฟาจ นอกจากนี้ RPEPS-30 ยังแสดงให้เห็นถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของลำไส้ที่มีประโยชน์ เช่น *Lactobacillus reuteri*, *Bacteroides thetaiotaomicron* และ *Akkermansia muciniphila* การค้นพบเหล่านี้อาจช่วยให้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกทางโมเลกุลกับคุณสมบัติของโปรไบโอติกของ *Rhodospseudomonas palustris* ซึ่งโพลีแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ RPEPS-30 จะกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของโฮสต์และสนับสนุนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เฉพาะในลำไส้ (Peng Zhang, 2019)

Aramsangtienchai et al. (2020) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่แตกต่างกันของลิแวนจาก *T. sakaeratensis* ได้รับการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 โดยการทดสอบ MTT เซลล์ได้รับการทดสอบด้วยความเข้มข้นของลิแวนที่ 31.25 ถึง 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงหาเปอร์เซ็นต์ของการมีชีวิตของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบ ซึ่งระดับความมีชีวิตของเซลล์ในการทดสอบด้วยลิแวนและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยลิแวนจึงไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 (Aramsangtienchai, Kongmon, Pechroj, & Srisook, 2020)

8. งานวิจัยด้านการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง

Kazak Sarilmiser and Toksoy Oner (2014) ได้ทำการศึกษาลิแวนจากจุลินทรีย์ *Halomonas smyrnensis* AAD6^T มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในปริมาณสูงสุด (1,000 g/mL) ลิแวนที่ไม่ได้รับการคัดแปลงมีฤทธิ์ต้านต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (AGS) สูงสุด ในขณะที่ไม่มีผลต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด (A549) โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิแวนที่มีหมู่อัลดีไฮด์จะมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูงกว่าลิแวนที่ไม่ได้คัดแปลงต่อเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างของลิแวนออกซิเดชัน (OL) แสดงฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มากกว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (AGS) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) การเพิ่มระดับออกซิเดชันทำให้ฤทธิ์การต้านมะเร็งเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการนำหมู่ฟังก์ชันอัลดีไฮด์ คัดแปลงทางเคมีเข้าสู่โมเลกุลของลิแวนสามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านมะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ (Kazak Sarilmiser & Toksoy Oner, 2014)

Yoon, Yoo, Cha, & Gyu Lee (2004) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างกิ่งของลิแวนที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านเนื้องอกด้วยลิแวนจาก *M. laevaniformans* ที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 200 ถึง 1,000 g/mL และกิจกรรมการยับยั้งที่แข็งแกร่งที่สุด แสดงให้เห็น ในปริมาณสูงสุด (1,000 g/mL) ของลิแวนเมื่อระดับโครงสร้างการแตกแขนงลดลง กิจกรรมต่อการต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1) จะลดลง ในขณะที่เดียวกันกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1) เนื่องจากระดับการแตกแขนงของกิ่งลดลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโครงสร้างทางเคมีของลิแวนมีบทบาทสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และโครงสร้างกิ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเป็นอย่างมาก (Yoon, Yoo, Cha, & Gyu Lee, 2004)

Abdel-Fattah, Gamal-Eldeen, Helmy, & Esawy (2012) ได้ทำการศึกษาผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของลิแวนจาก *B. subtilis* ด้วยน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันและรูปแบบของ

เซลล์ต่อฤทธิ์การต้านมะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด histiocytic มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว lymphoblastic พบว่า น้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้นและรูปแบบของเซลล์ ส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตที่โดดเด่นที่ความเข้มข้น 100 g/mL ลิเวินเซลล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าแสดงให้เห็นถึงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่แตกต่างกันตามลำดับต่อไปนี้ HepG2> HeLa> HCT-116> lymphoblastic leukemia 1301> MCF-7 (Abdel-Fattah, Gamal-Eldeen, Helmy, & Esawy, 2012)



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Acetic acid
2. Agar
3. Ammonium iron (II) sulfate hexahydrate
4. 25 µg/ml amphotericin B.
5. Chloroform
6. DPPH reagent
7. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
8. Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)
9. Distilled water
10. Deionized water
11. Ethanol 95%
12. EDTA
13. Fibroblast (NHDF)
14. 10% fetal bovine serum (FBS)
15. Hydrochloric acid
16. L-ascorbic acid (Sigma, Chemical Co, USA)
17. Magnesium sulfate (MgSO_4)
18. MTT solution
19. Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) (Sigma-Aldrich, Chemical Co, USA)
20. 100 unit/mL penicillin G sodium
21. Potassium tartate
22. Phosphate buffer saline (PBS)
23. Sodium nitrate (NaNO_3)

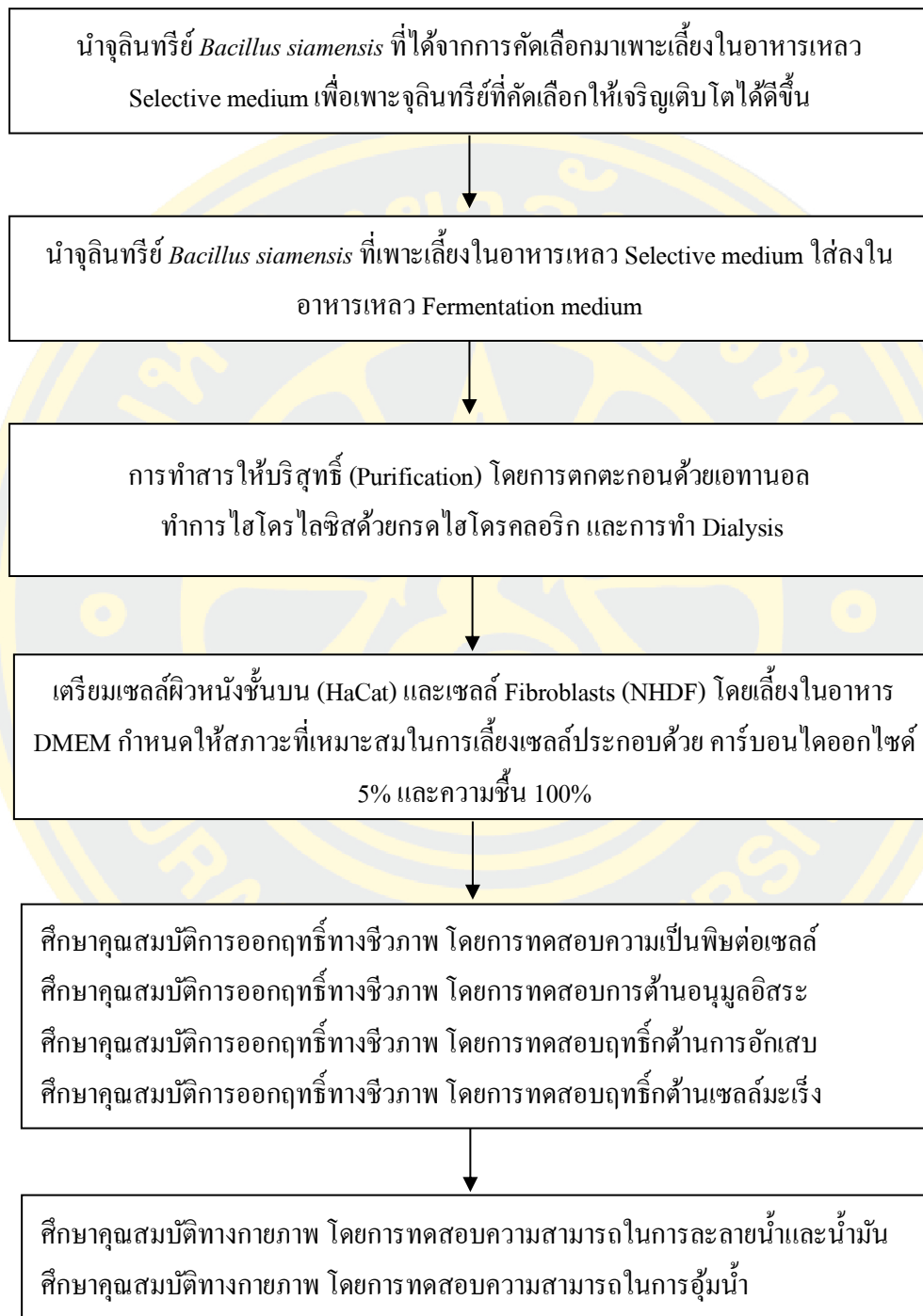
24. Sodium hydroxide (NaOH)
25. Sodium nitroprusside (SNP) (Sigma-Aldrich, Chemical Co, USA)
26. Sodium chloride (NaCl)
27. Sodium hydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
28. 100 mg/mL streptomycin sulfate
29. Sulfuric acid
30. Sulfanilamide (Sigma-Aldrich, Chemical Co, USA)
31. Sucrose
32. Tryptone
33. 10 mM Tris-HCL buffer pH 7.4
34. Trypsin
35. Virgin coconut oil
36. Yeast Extract
37. อาหารแข็งเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1
38. อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 1
39. อาหารเหลวเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรที่ 2
40. เซลล์ผิวหนังชั้นบนของมนุษย์ (HaCaT)
41. เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 (Macrophage RAW264.7)
42. เซลล์มะเร็งปอด (A549)
43. เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)
44. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116)
45. เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa)
46. อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium)
47. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. เครื่อง pH meter
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
6. เครื่องเขย่า (Incubator shaker)
7. Hot plate
8. ไมโครปิเปต (Micropipette)
9. ปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
10. ปีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
11. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
12. ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร
13. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
14. ขวด Suction (Suction flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
15. หลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร
16. Appendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
17. แท่งแก้วคนสาร
18. จานอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบพลาสติก
19. เข็มเขี่ยจุลินทรีย์ (Loop)
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. 96-well plate
22. เครื่อง UV-Spectrophotometer
23. เพลตแก้ว
24. ตู้สำหรับเลี้ยงเซลล์ (ควบคุมสภาวะ)
25. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์

วิธีการดำเนินงานวิจัย



ภาพที่ 16 แผนการดำเนินงานการศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของดีแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis*

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต

1.1 การไฮโดรไลซิสลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ด้วยวิธี Acid hydrolysis

1.1.1 เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 N และเตรียมสารละลายตัวอย่างลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* หลังจากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 N ลงในสารละลายลิแวน เพื่อปรับค่า pH เท่ากับ 2.5 นำไปต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นลดอุณหภูมิของสารละลายลิแวนโดยการนำสารละลายลิแวนไปแช่ในน้ำแข็ง เพื่อเป็นการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริก (de Paula, Pinheiro, Lopes, & Calazans, 2008)

1.1.2. เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ และนำสารละลายลิแวนที่ลดอุณหภูมิแล้วมาปรับค่า pH เท่ากับ 7 โดยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ลงไปในสารละลายลิแวน เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการสะเทิน และกำจัดสารคลอไรด์ที่เกิดขึ้นในสารละลายลิแวน โดยการนำสารละลายลิแวนมาทำ Dialysis ด้วย Dialysis bag ขนาด 12 kDa แช่ในน้ำ DI (Deionized water) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 24 ชั่วโมง

1.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC (Thin-layer Chromatography) เพื่อตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้อะซิโตนไทร์ : น้ำ (85 : 15 โดยปริมาตร) เป็นระบบเฟสเคลื่อนที่ และระเหยเฟสเคลื่อนที่ภายใต้การไหลของอากาศอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นฉีดพ่นส่วนผสมของกรดซัลฟิวริก (5%, v/v) และเอทานอล ที่ประกอบด้วย 1-naphthol (0.5%, w/v) อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Ezzat et al., 2020)

2. การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* และลิแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity assays)

2.1 DPPH radical scavenging activity

2.1.1 เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH reagent โดยชั่ง DPPH 0.8 มิลลิกรัม หลังจากนั้นเติมเอทานอล (Ethanol analytical grade) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวง แล้วนำมาผสมกับสาร DPPH reagent ในหลอดทดลอง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.1.2 นำลิแวนและอนุพันธ์ย่อยของลิแวนมาละลายในน้ำ DI (Deionized water) เป็นสารละลายลิแวนประกอบด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125, และ 250 $\mu\text{g/mL}$ หลังจากนั้นนำสารละลายลิแวนที่ประกอบด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ (3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125, และ 250 $\mu\text{g/mL}$) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย 0.1 mM DPPH reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มในที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2.1.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader นำมาสร้างเป็นกราฟเพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยกำหนดให้ สารละลาย DPPH reagent กับน้ำ DI (Deionized water) เป็นชุดควบคุมแบบลบกลุ่ม 1 (Negative control 1) สารละลาย DPPH reagent กับเอทานอล (Ethanol) เป็นชุดควบคุมแบบลบกลุ่ม 2 (Negative control 2) สารละลายลิแวนกับน้ำ DI (Deionized water) เป็นชุดตัวอย่าง และวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นชุดควบคุมแบบบวก (Positive control) เพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging effect %) สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

A517 sample: A_1 คือ ชุดตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร

A517 control: A_0 คือ ชุดควบคุมค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร

2.2 ABTS.+ radical scavenging activity

2.2.1 เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS⁺ reagent โดยชั่ง ABTS⁺ 18 มิลลิกรัม และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ชั่ง โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 3.3 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้น เติมน้ำ DI (Deionized water) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย ABTS⁺ reagent ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ในอัตราส่วน 1 : 1 และนำไปบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2.2 เตรียมสารละลาย Phosphate buffer saline (1X PBS), pH 7.4 ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 4 กรัม ไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.58 กรัม, โพแทสเซียมไคโซโครเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 กรัม, และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 กรัม หลังจากนั้นเติมน้ำ DI (Deionized water) ปริมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แล้วปรับปริมาตรสารละลาย Phosphate buffer saline ในขวดปรับปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.2.3 นำสารละลาย ABTS⁺ reagent กับ สารละลาย Phosphate buffer saline (1X PBS), pH 7.4 ที่เตรียมไว้มาผสมกันในอัตราส่วน 1 : 9 เพื่อทำการเจือจางสารละลาย ABTS⁺ reagent หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ให้ได้ค่าประมาณ 0.7 (SD ± 0.02) แล้วจึงนำไปใช้ในการทดสอบ

2.2.4 นำลิแวนและอนุพันธ์ย่อยของลิแวนมาละลายในน้ำ DI (Deionized water) เป็นสารละลายลิแวน ประกอบด้วย ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125, และ 250 µg/mL หลังจากนั้นนำสารละลายลิแวนที่ประกอบด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ (3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125, และ 250 µg/mL) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย ABTS⁺ reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มในที่มืด และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader นำมาสร้างเป็นกราฟเพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยกำหนดให้ สารละลาย ABTS⁺ reagent กับ สารละลาย Phosphate buffer saline เป็นชุดควบคุมแบบลบกลุ่ม 1 (Negative control 1) สารละลาย ABTS⁺ reagent กับน้ำ DI (Deionized water) เป็นชุดควบคุมแบบลบกลุ่ม 2 (Negative control 2) สารละลายลิแวนกับสารละลาย Phosphate buffer saline เป็นชุดตัวอย่าง และวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก (Positive control)

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังชั้นบนของมนุษย์ Human keratinocyte cells line (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ Human dermal fibroblast cell line (NHDF) เลี้ยงเซลล์ HaCaT และ NHDF ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 25 µg/mL amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการ sub-cultured ทุก ๆ 4-5 วัน

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ Mouse macrophage cells line (RAW264.7) เลี้ยงเซลล์ RAW264.7 ในอาหาร RPMI 1640 มี ส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 25 µg/mL amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและทำการ sub-cultured

ทุก ๆ 3-4 วัน

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด (A549), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เลี้ยงเซลล์ A549, Hep G2, HCT116 และ HeLa ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 25 µg/mL amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการ sub-cultured ทุก ๆ 3-4 วัน

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง Human keratinocyte (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) ของสารสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ด้วยวิธี MTT assay

4.1 เตรียมเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Human fibroblasts, NHDF) และอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) โดยนำเซลล์มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม สำหรับเซลล์ HaCaT ส่วนเซลล์ NHDF มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2 หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายลิแวนความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 25 µg/mL amphotericin B) จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/mL จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4 เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) จากนั้นเติม 100% DMSO ปริมาณ 150 µL/well เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้

เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader

4.5 คำนวณค่า cell viability ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากกระเทียมที่ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated control) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ DMEM มีค่า cell viability เท่ากับ 100% โดยคำนวณได้จากสมการ

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{A570}_{\text{sample}}}{\text{A570}_{\text{control}}} \times 100\%$$

A570_{sample} คือ ชุดตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสง 570 นาโนเมตร

A570_{control} คือ ชุดควบคุมค่าการดูดกลืนแสง 570 นาโนเมตร

5. การศึกษาความเข้มข้นของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

5.1 เตรียมเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW264.7 มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 9×10^4 cells/well ใน CO₂ incubator ที่มี CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.2 เตรียมสารละลายลิแวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยในแต่ละ well จะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 100 ng/mL เพื่อกระตุ้นการสร้างสาร NO จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3 ตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO) ที่สร้างขึ้นจากเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS ทำการตรวจวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาผสมกับ Griess reagent (2% sulfanilamide in 4% phosphoric acid และ 0.2% naphthylethylenediamide) ในอัตราส่วน 1 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader

5.4 หลังจากนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัด NO แล้ว เซลล์ที่อยู่ใน 96 well plates จะทำการทดสอบความเป็นพิษต่อโดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาณ 150 μ L/well จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.5 จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) และเติม 100% DMSO ปริมาณ 150 μ L/well เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader

5.6 คำนวณค่า cell viability ของเซลล์ที่ได้รับสารลิแวนที่ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ LPS (LPS treated alone) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ LPS มีค่า cell viability เท่ากับ 100%

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer activity) ของสารฟิโรไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยวิธี MTT assay

ศึกษาความเป็นพิษของสารลิแวนต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) โดยวิธี MTT assay

6.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง A549, HepG2, HCT116 และ Hela ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin และ 100 μ g/mL streptomycin จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการ sub-cultured ทุก ๆ 3 วัน

6.2 นำเซลล์มะเร็งมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6.3 หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเตรียมสารละลายลิแวนประกอบด้วย ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 μ g/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin และ 25 μ g/mL amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.4 จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/mL จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.5 เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) จากนั้นเติม 100% DMSO ปริมาณ 150 μ L/well เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader

6.6 คำนวณค่า cell viability ของเซลล์ที่ได้รับสารลิแวนที่ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated control) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ DMEM มีค่า cell viability เท่ากับ 100% ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

7. การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) นำสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* มาชั่ง 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ DI 5 มิลลิลิตร แล้วกวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ต่อมานำตัวอย่างสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใส (Supernatant) เทลงบนเฟลตแก้ว แล้วนำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ส่วนที่เป็นน้ำหนักของแข็งแห้งจากส่วนใส (Anderson, 1970) จากนั้นนำไปคำนวณเทียบกับตัวอย่างลิแวนแห้ง เพื่อหาค่าความสามารถในการละลายน้ำ (WSI %) สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (WSI \%)} = \frac{D_{\text{solid in supernatant}}}{D_{\text{levan}}} \times 100\%$$

Dry weight of solids in supernatant: D_{ss} คือ น้ำหนักของแข็งแห้งจากส่วนใส

Dry weight of levan sample: D_{levan} คือ น้ำหนักของตัวอย่างลิแวนแห้ง

ดัชนีความสามารถในการละลายน้ำมัน (OSI) ของสารลิแวนถูกกำหนดโดยใช้วิธีการของ Alfredo, Gabriel, Luis, & David (2009) และมีการดัดแปลงบางประการ (Alfredo, Gabriel, Luis, & David, 2009) นำสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* มาชั่ง 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 5 มิลลิลิตร และกวนเป็นเวลา 40 นาที

ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้เนื้อสารผสมกันอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสลงในจานแก้ว และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 232 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำหนักของแข็งที่แห้ง (Carpiné, Dagostin, de Andrade, Bertan, & Mafra, 2016) จากนั้นนำไปคำนวณเทียบกับตัวอย่างลิแวนแห้ง เพื่อหาค่าความสามารถในการละลายในน้ำมัน (OSI %) สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ค่าความสามารถในการละลายในน้ำมัน (OSI \%)} = D_{\text{oil in supernatant}} / D_{\text{levan}} \times 100\%$$

Dry weight of oil in supernatant: D_{os} คือ น้ำหนักของแข็งแห้งจากส่วนใสในน้ำมัน

Dry weight of levan sample: D_{levan} คือ น้ำหนักของตัวอย่างลิแวนแห้ง

8. การศึกษาความเข้มข้นของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* โดยการทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity)

นำสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* มาชั่ง 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ DI 10 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนใสและตะกอน แล้วทำการแยกส่วนใสออกจากตะกอน ต่อมานำตะกอนเทลงบนกระดาษกรอง (Fang Feng, 2018) เพื่อแยกน้ำที่เหลือออกจากตะกอน แล้วทำการบันทึกผล เพื่อนำไปคำนวณหาค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC %) สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC \%)} = T_s / T_d \times 100\%$$

Total sample weight after water absorption: T_s คือ น้ำหนักของตัวอย่างทั้งหมดหลังจากแยกน้ำออก

Total dry sample weight: T_d คือ น้ำหนักแห้งทั้งหมดของตัวอย่างลิแวนแห้ง

9. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard deviation; SD) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่าง ๆ และ

กลุ่มควบคุมโดยใช้ One way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย สถิติ Duncan พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)

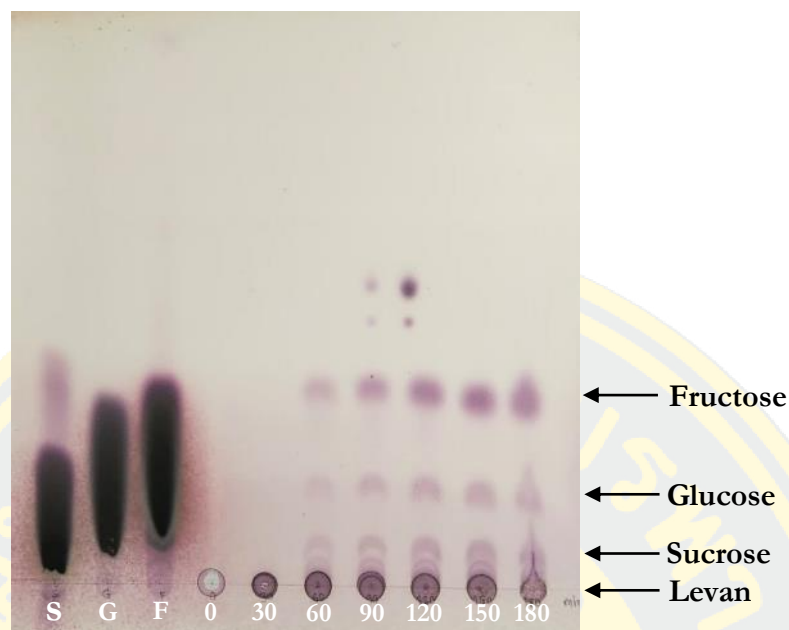


บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต

การวิเคราะห์สารลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกถูกนำมาทดสอบเพื่อตรวจหาชนิดและองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี TLC (Thin-layer Chromatography) โดยใช้ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส เป็นสารมาตรฐาน และลิแวนไฮโดรไลเซต ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครลิตร ผลลัพธ์เหล่านี้ดังภาพที่ 17 ซึ่งเป็นกระบวนการของปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล สังเกตได้จากจุดที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC พบว่า ลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เกิดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสขึ้นกับกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสจะเริ่มตั้งแต่ 60 ถึง 180 นาที จึงจะสามารถเห็นองค์ประกอบของโมโนแซ็กคาไรด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากลิแวน *Bacillus siamensis* ได้ ดังนั้นในส่วนของกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันของการสร้างกลูโคส ฟรุกโตส และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นพอลิเมอร์ของฟรุกโตสซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้จากการแยกสารโดยใช้อะซิโตนไนโตร : น้ำ (85 : 15 โดยปริมาตร) เป็นระบบเฟสเคลื่อนที่ และฉีดพ่นส่วนผสมของกรดซัลฟิวริก (5%, v/v) และเอทานอล ที่ประกอบด้วย 1-naphthol (0.5%, w/v) เพื่อตรวจหาสารในกลุ่มโพลีแซ็กคาไรด์ (Mena-Arizmendi et al., 2011; Yokota, Kondo, Nakagawa, Kojima, & Tomita, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Jehan A.S. Salman et al (2019) มีรายงานว่า การวิเคราะห์สารลิแวนจากจุลินทรีย์ *L. mesenteroides ssp. cremoris* ด้วยวิธี TLC เพื่อหาส่วนประกอบของโมโนแซ็กคาไรด์ ค่า R_f ของฟรุกโตสมีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ ลิแวนไฮโดรไลเซต ค่า R_f ของลิแวนเท่ากับ 0.42 ในขณะที่ค่า R_f ของซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส เท่ากับ 0.32, 0.42 และ 0.37 ตามลำดับ ผลลัพธ์นี้บ่งชี้ว่า ลิแวนจาก *L. mesenteroides ssp. Cremoris* ประกอบด้วยฟรุกโตสเพียงอย่างเดียว (Jehan A.S. Salman, 2019) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยของ Katsuichi Saito et al (2000) พบว่า การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ของปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิส มีการปลดปล่อยโมโนแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้ถูกระบุว่า ประกอบด้วยฟรุกโตสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากผลการวิจัยดังกล่าวได้รับการยืนยันว่าฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้ถูกย่อยสลายให้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สั้นกว่าโดยการปลดปล่อยฟรุกโตสออกจากหัวฟรุกโตซิล (Saito, Kondo, Kojima, Yokota, & Tomita, 2000)



ภาพที่ 17 การแยกสารโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC (Thin-layer Chromatography) โดยใช้อะซิโตนในไตร์น้ำ (85 : 15 โดยปริมาตร) เป็นระบบเฟสเคลื่อนที่ ช่องที่ 1 ซูโครส (S) ช่องที่ 2 กลูโคส (G) ช่องที่ 3 ฟรุคโตส (F) ช่องที่ 4 สารลิแวน (Lev) ช่องที่ 5 ลิแวนไฮโดรไลเซต (Lev-HS)

การศึกษาความเข้มข้นของสารฟิโอบิโอดีทในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* และลิแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

1. DPPH radical scavenging activity

ผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของสารลิแวน ที่ 3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125 และ 250 $\mu\text{g/mL}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (%) (ภาพที่ 18)

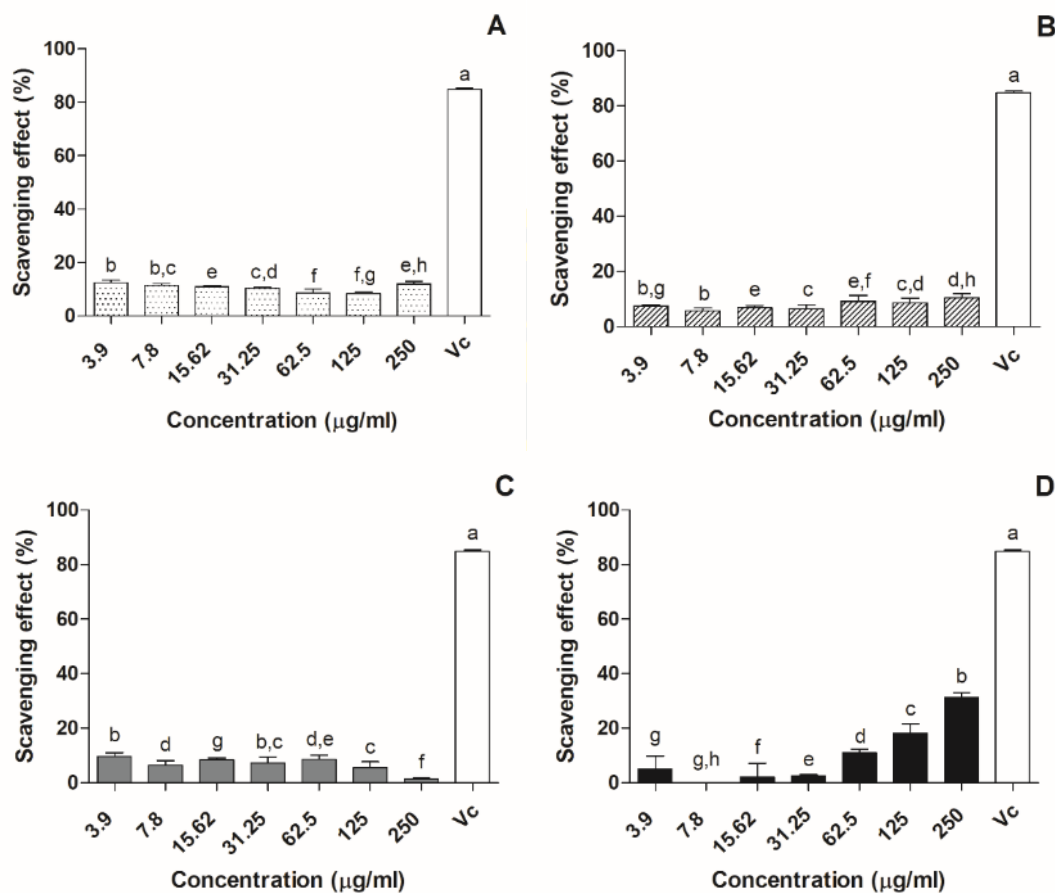
สำหรับแบบจำลองของการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการประเมินกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (Yuan, Bone, & Carrington, 2005) ในการทดสอบ DPPH สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดอนุมูล DPPH ที่เสถียร (สีม่วง) ให้อยู่ในรูปแบบที่ไม่รุนแรง DPPH-H (สีเหลือง) (Jun Liu, 2010) ผลการวิจัย พบว่า ลิแวนมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน กรดแอสคอร์บิกซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

มาตรฐานแสดงฤทธิ์ประมาณ 84% ที่ 100 µg/mL (w/v) ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Mohammad Al-Halbosiy, 2018)

จากผลการทดลองดังภาพที่ 18 พบว่า สารประกอบลิแวนแต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยสามารถสังเกตจากสัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* (3.9, 15.62, 31.25, 62.5, 125 และ 250 µg/mL) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดคือ 4.85%, 2.06%, 2.43%, 10.94%, 18.16% และ 31.35% ตามลำดับ (ภาพที่ 18D) ซึ่งผลการทดสอบของลิแวนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้น 7.8 µg/mL ซึ่งให้เห็นว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับสารลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และลิแวนจาก *Bacillus siamensis* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ออนุมูล DPPH ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับลิแวนไฮโดรไลเซต (ภาพที่ 18A-C) ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของลิแวนลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และลิแวนจาก *Bacillus siamensis* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่สำหรับลิแวนไฮโดรไลเซตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งมีความสัมพันธ์กับจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (S. J. Kim & Chung, 2016) ตามลักษณะโครงสร้างลำดับโมเลกุลของโพลีแซ็กคาไรด์ ดังนั้นกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของโพลีแซ็กคาไรด์ โดยการลดจำนวนอิเล็กตรอนและโปรตอนได้โดยตรงจะขึ้นอยู่กับไฮดรอกซิลที่แยกได้ ซึ่งพบในลิแวนไฮโดรไลเซตจึงทำให้สามารถลดประจุพันธะคู่ของ N = N ใน DPPH ได้ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน ดังนั้นผลการทดลองการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของลิแวน แสดงให้เห็นว่า ลิแวนไฮโดรไลเซต มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณของไฮดรอกซิลที่แยกได้ ในการศึกษาที่กลุ่มควบคุมเชิงบวก กรดแอสคอร์บิก จะให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพสูงสุดคือ 84.80% ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu et al (2016) พบว่า โพลีแซ็กคาไรด์จาก *Amanita caesarea* ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ 37.09% และ 89.74% ที่ 6 mg/mL ซึ่งให้เห็นว่าค่า IC₅₀ ในการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ 1.69 mg/mL มีผลเป็นอย่างมากต่อการกำจัดอนุมูล DPPH โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นสูง เมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก

(Zhu et al., 2016) นอกจากนี้ผลการวิจัยของ Min Shi et al (2012) แสดงให้เห็นว่า ผลการกำจัดอนุมูล DPPH ของโพลีแซ็กคาไรด์จาก *F. velutipes* เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นประมาณ 90% ที่ 2.5 mg/mL ของความเข้มข้น โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 418.31 g/mL เมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (293.23 g/mL) และผลลัพท์เหล่านี้บ่งชี้ถึงน้ำตาลที่เป็นกรด (กรดกาแลคทูโรนิก และกรดกลูคูโรนิก) และจำนวนของกลุ่มไฮดรอกซิลที่มีอยู่ของโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นกรดซึ่งมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Shi et al., 2012)



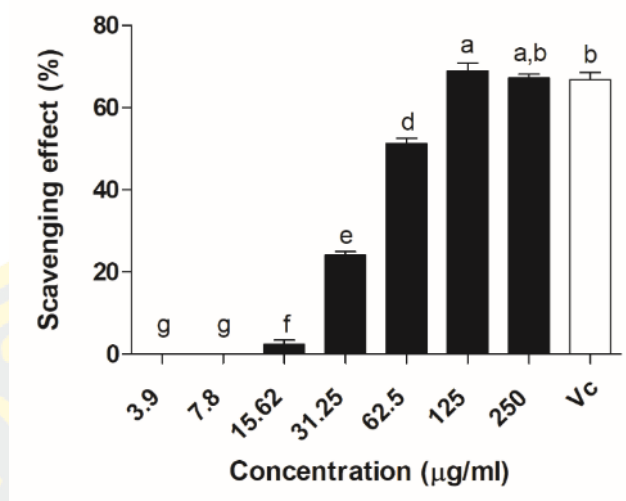


ภาพที่ 18 กราฟแสดงผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารฟีนอลิโอดีในรูปของลิแวนแต่ละชนิดด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ D) ลิแวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

2. ABTS.+radical scavenging activity

ผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของสารลิแวน ที่ 3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125 และ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในการทดสอบด้วยวิธี ABTS⁺ radical scavenging activity (%) (Benso et al., 2016) (ภาพที่ 19)

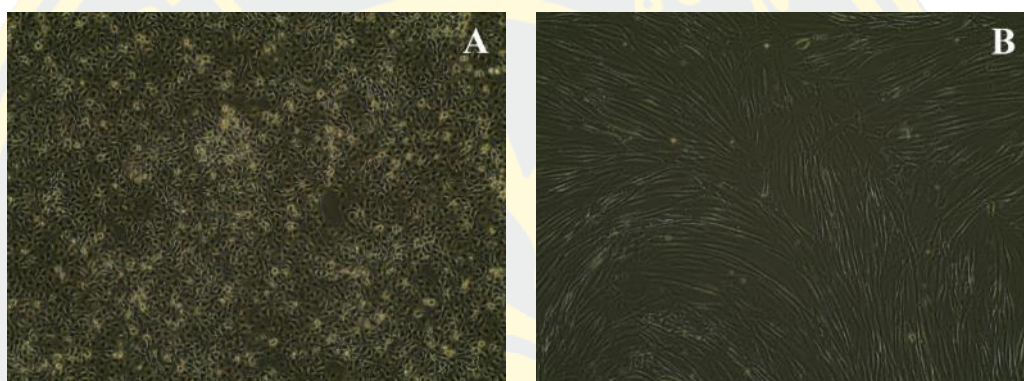
จากภาพที่ 19 กราฟแสดงผลการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity แสดงให้เห็น ความสามารถในการยับยั้งของสารลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) สารลิแวนจาก *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และสารลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ไม่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ไม่แสดงข้อมูล) สำหรับลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ที่ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด 69.65% เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (การควบคุมเชิงบวก) พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระคือ 68% ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ดังนั้น ศักยภาพกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารลิแวนแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ตั้งแต่ 3.9 ถึง 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ชนิดของสารลิแวนที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาร ABTS ได้ดีที่สุด คือ สารลิแวนไฮโดรไลเซต เมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (การควบคุมเชิงบวก) ซึ่งจะมีศักยภาพในการยับยั้งสูง ในขณะที่มีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ye Yuan et al (2017) พบว่า โพลีแซ็กคาไรด์จาก *Russula griseocarnosa* มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS สูงสุดคือ 71% (Ye Yuan, 2017) นอกจากนี้มีผลการศึกษาของ Li et al (2019) ได้รายงานไว้ว่า สารสกัด โอลิโกแซ็กคาไรด์จากมัลเบอร์รี่ (EMOS-1a) ที่ความเข้มข้น 100-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด EMOS-1a คือ 0.620 ± 0.0088 ถึง 5.8420 ± 0.1155 ซึ่งมีค่าเทียบเท่า Trolox-equivalent แต่มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (Li et al., 2019)



ภาพที่ 19 กราฟแสดงผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารฟีนอลิกในรูปของทีแอนด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติ และอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง **Human keratinocyte (HaCaT)** และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ **Normal human dermal fibroblasts (NHDF)** ของสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวนจากจุลินทรีย์ ***Bacillus siamensis*** ด้วยวิธี **MTT assay**

ลักษณะของจำนวนเซลล์เซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF) เริ่มต้น ที่เลี้ยงในงานหลุม 96 หลุม มีจำนวนเซลล์ 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม และ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม เนื่องจากเซลล์เจริญได้พอเหมาะกับพื้นที่ในหลุมและไม่พบเซลล์ตาย

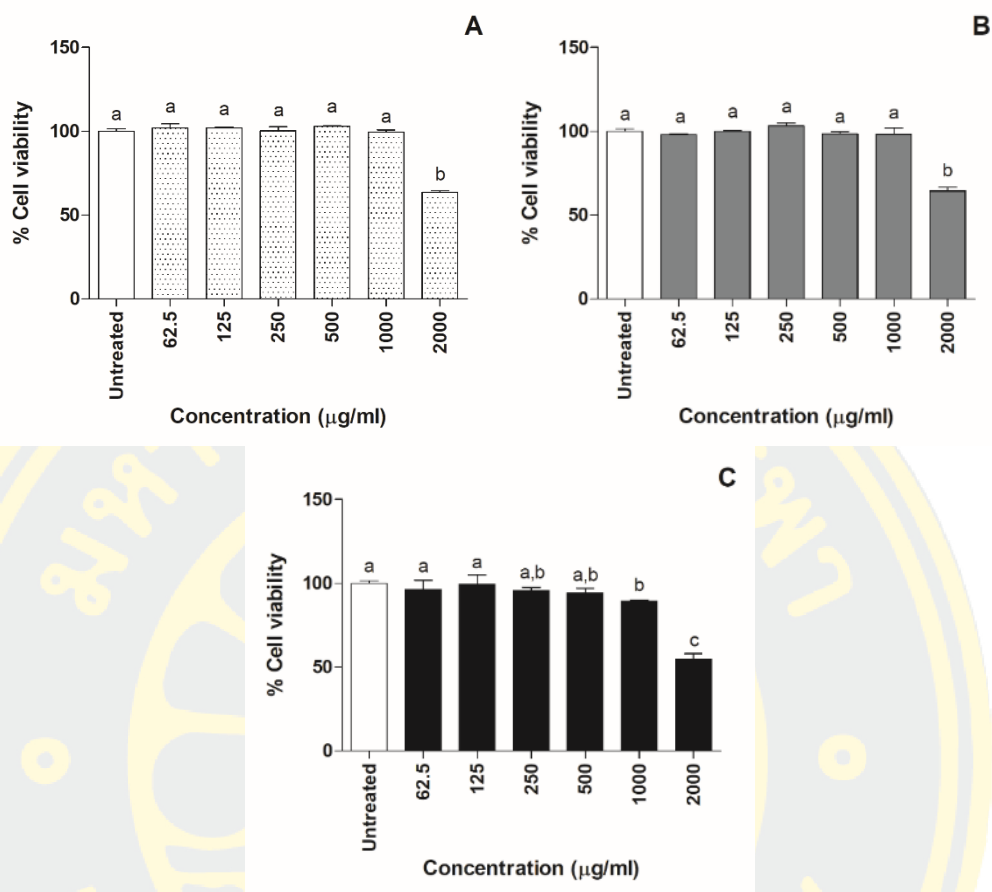


ภาพที่ 20 A) ลักษณะของเซลล์ผิวหนัง Human keratinocyte (HaCaT) และ B) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal human dermal fibroblasts (NHDF)

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT)

จากผลทดลองการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT) ของสารลิแวนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ จากการวัดค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธีทดสอบ MTT พบว่า ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) คือ 101.99%, 102.12%, 100.15%, 102.96%, และ 99.50% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงคือ 63.73% เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 98%, 99.96%, 103.30%, 98.38% และ 98.23% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น

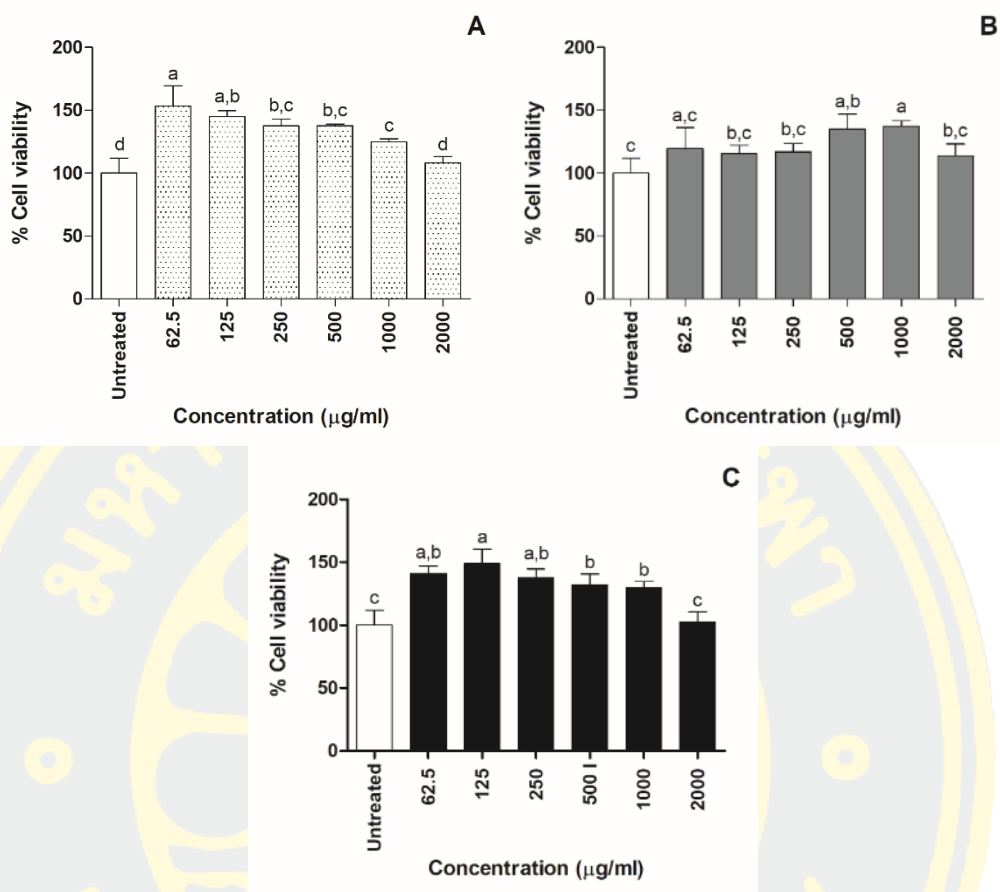
62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จะลดลงถึง 64.39% เมื่อถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และการตรวจสอบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยลิแวน *Bacillus siamensis* พบว่า ที่ความเข้มข้น 62.5-500 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับ 96.17%, 99.33%, 95.60% และ 94.36% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย (89.32%) ส่วนความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มาก ทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง คือ 54.69% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated) (ภาพที่ 21) บ่งชี้ว่าที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ แสดงให้เห็นถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือมีความเป็นพิษน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบ (Untreated) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Niziol-Lukaszewska et al (2018) พบว่า สารสกัดจากใบของ Jerusalem artichoke ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g/mL}$ ช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) ให้มากขึ้น แต่เมื่อปริมาณความเข้มข้นสูงขึ้น จำนวนเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) ที่มีชีวิตจะลดลงถึง 28% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกันสารสกัดจากลำต้นของ Jerusalem artichoke ที่ความเข้มข้น 25-250 $\mu\text{g/mL}$ จะช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) ได้มากกว่าส่วนของใบ และเมื่อปริมาณความเข้มข้นสูงขึ้น จำนวนเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) ที่มีชีวิตจะลดลงเช่นเดียวกัน (Niziol-Lukaszewska, Furman-Toczek, & Zagorska-Dziok, 2018) นอกจากนี้กรณีศึกษาของ Do et al (2021) ได้รายงานว่า Partially purified exopolysaccharides (ppEPS) จาก *Physarum polycephalum* ที่ความเข้มข้น 500-1,000 $\mu\text{g/mL}$ มีปริมาณเซลล์ BAEC ที่มีชีวิตลดลงถึง 74.44% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Do, Lai, Stephenson, & Tran, 2021)



ภาพที่ 21 กราฟแสดงผลการทดสอบสารฟิโอบิโอดีทในรูปของลิแวนแต่ละชนิดด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์ผิวหนังด้านบน Human keratinocyte (HaCaT) A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* และ C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF)

จากผลการทดลองการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF) ของสารลิแวนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยวิธีทดสอบ MTT แสดงให้เห็นว่า ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) คือ 153.44%, 145.07%, 137.80%, 137.64% และ 125.10% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย (108.30%) ในกรณีเดียวกันเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 119.58%, 115.65%, 117.04%, 134.93%, 137.25% และ 113.95% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 62.5-2,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และการตรวจสอบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จากลิแวน *Bacillus siamensis* พบว่า ที่ความเข้มข้น 62.5-1000 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ 141%, 149.04%, 137.75%, 132% และ 129.65% ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเท่ากับ 102.66% แต่ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated) (ภาพที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Niziol-Lukaszewska et al. (2018) พบว่า สารสกัดจากใบของ Jerusalem artichoke ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แต่เมื่อปริมาณความเข้มข้นสูงขึ้น จำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีชีวิตจะลดลงถึง 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกัน สารสกัดจากลำต้นของ Jerusalem artichoke ที่ความเข้มข้น 25-500 $\mu\text{g/mL}$ จะช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้มากกว่าส่วนของใบ (Niziol-Lukaszewska et al., 2018) นอกจากนี้รายงานการวิจัยของ Pagolu Navya et al. (2017) มีรายงานว่า โพลีแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีเขียว *Codium tomentosum* ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 100-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ คือ 147.09%, 199.46%, 209.86%, 213% และ 215.01% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้มากยิ่งขึ้น เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (Pagolu Navya, 2017)



ภาพที่ 22 กราฟแสดงผลการทดสอบสารฟิโอบิโอดีทในรูปของลิแวนแต่ละชนิดด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Normal human dermal fibroblasts (NHDF) A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* และ C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

จากการประเมินความเป็นพิษของเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF) ในหลอดทดลองเพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบหลายชนิด (Damour et al., 1992; Jong Kwon Lee, 2000; Soltan-Dallal, Validi, Douraghi, Fallah-Mehrabadi, & Lormohammadi, 2017) ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงเลือกใช้เซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF) เป็นต้นแบบในการทดลองโดยการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์จากการวัดค่ากิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ (Cellular metabolic activity) ซึ่งผลลัพธ์จากการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ โดยการวัดปริมาณเซลล์ด้วยวิธีทดสอบ MTT แสดงให้เห็นว่า สารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ไม่เป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte, HaCaT) เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5 ถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Normal human dermal fibroblasts, NHDF) แต่กลับเพิ่มปริมาณการแบ่งเซลล์ (Cell proliferation) ซึ่งร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ใกล้เคียงกับ 100% ซึ่งบ่งชี้ว่า สารลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ตามปกติ และเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ขึ้นไป เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับผลการวิจัยที่รายงานโดย K.H. Kim et al (2005) บ่งชี้ว่า ลิแวนจาก *Z. mobilis* ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (K. H. Kim et al., 2005) การค้นพบนี้ยังเปรียบเทียบได้กับการทดลองที่ดำเนินการโดย Dos Santos et al. (Leandro Freire dos Santos, 2013) ในรังไข่ของหนูแฮมสเตอร์จีน (CHO-K1) และ Domzal-Kang et al. (Domzal-Kedzia et al., 2019b) ในเซลล์ไลน์ลิแวนไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ป่มด้วยโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 80 ถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ของ เอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ ในการศึกษา การทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยการวัดปริมาณเซลล์ ด้วยวิธีทดสอบ MTT พบว่า ไม่มีการตายของเซลล์เกิดขึ้น หลังจากการพักตัวของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารลิแวน และไม่สามารถระบุ LD50 ได้

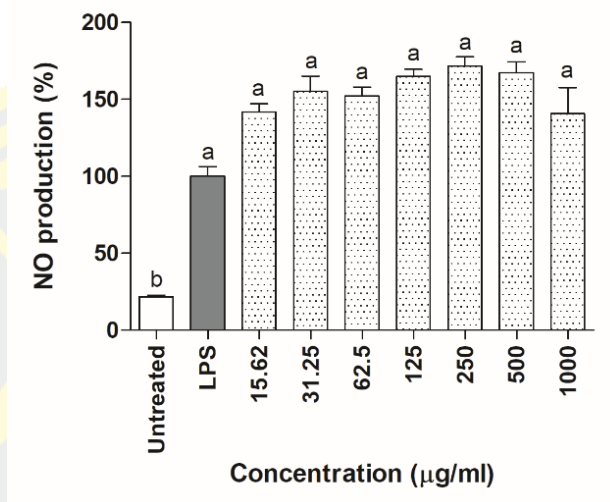
การศึกษาความเข้มข้นของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

1. การวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (Determination of nitric oxide (NO) production)

พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งนำไปสู่การผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) และการปล่อยไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (Schepetkin et al., 2008)

จากผลการทดลองการวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่มีความเข้มข้นของลิแวนไฮโดรไลเซต ตั้งแต่ 15.62 ถึง 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แสดงให้เห็นว่า ลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ช่วยกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) โดยผ่านกลไกการจับกับตัวรับ TLR4 และส่งสัญญาณไปยัง MAPKs เพื่อกระตุ้น Transcription factors ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ให้สูงขึ้น (Abdel-Fattah et al., 2012) (ดังภาพที่ 23) ความเข้มข้นของไนไตรต์ที่ตรวจพบโดยปฏิกิริยาของ Griess reagent จึงบ่งชี้ถึงปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO) ที่เกิดขึ้น โดยมีรายงานว่าไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อกลไกการป้องกันต่อระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (Anti-microbial) และฤทธิ์การต้านเนื้องอก (Anti-tumor) แม้ว่าการผลิตไนตริกออกไซด์มากเกินไปจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบและโรคแพ้ภูมิตัวเอง (Ibiza & Serrador, 2008) ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่า ลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* อาจช่วยปรับภูมิคุ้มกัน โดยการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งบ่งบอกถึงศักยภาพในการใช้งานการป้องกันโรค โดยสอดคล้องกับกรณีศึกษาของ Xu et al.(2006) รายงานว่าลิแวนจาก *B. subtilis* (natto) ทำให้เกิดการผลิต TNF- α และ IL-12 p40 ใน macrophages และการแสดงออกของ TLR4 อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นด้วยแมคโครฟาจโดยสารลิแวน (Xu Yajima, 2006) ยิ่งไปกว่านั้น ลิแวนจาก *Z. mobilis* ยังกระตุ้นให้เกิดการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจที่สามารถเป็นตัวกลางต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้องอกได้ (Park et al., 2008) และนอกจากนี้ Osman Taylan et al. (2019) ได้ทำการศึกษาสารลิแวนชนิดอีกโซโพลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* พบว่า ลิแวนจากจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* ช่วยเหนี่ยวนำระดับการผลิต IL-4 ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สูงกว่าที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และนอกจากนี้การกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ในการต้านการอักเสบโดยลิแวน อาจเป็นหน้าที่สำคัญสำหรับลิแวนจากจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides*

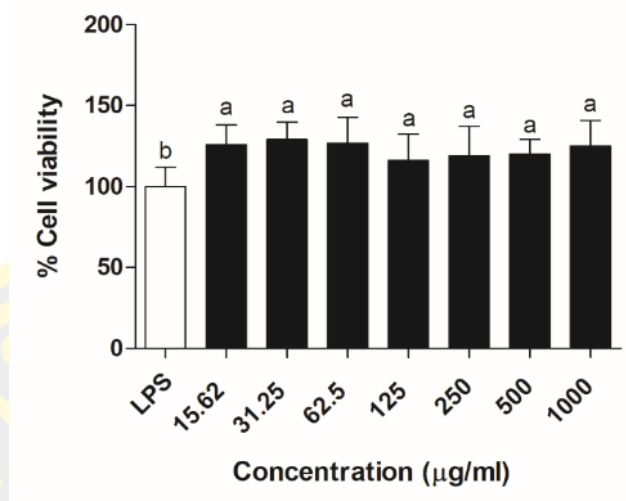
นอกเหนือจากการเพิ่มระดับของ IL-4 คือการตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งอีกด้วย (Smiley & Grusby, 1998; Taylan, Yilmaz, & Dertli, 2019)



ภาพที่ 23 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารพรีไบโอติกในรูปแบบของลิแวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

2. ผลของลิแวนไฮโดรไลเซตต่อความมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage RAW264.7)

จากผลการทดลองความเข้มข้นที่แตกต่างกันของลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ได้ถูกประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) โดยการทดสอบด้วยวิธี MTT assay เซลล์แมคโครฟาจได้รับการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 15.62 ถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทดสอบ ดังภาพที่ 24 ระดับความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจในการทดสอบกับลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* และกลุ่มควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจด้วยลิแวนไฮโดรไลเซตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) (Cell proliferation) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Aramsangtienchai et al. (2020) มีรายงานว่า ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของลิแวนจาก *T. sakaeratis* ที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วยวิธี MTT assay ความเข้มข้นของลิแวนที่ 31.25 ถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ในการทดสอบด้วยลิแวนและกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยลิแวนจาก *T. sakaeratis* จึงไม่ส่งผลต่อการทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 (Aramsangtienchai et al., 2020) นอกจากนี้มีกรณีศึกษาวิจัยของ Peng Zhang et al. (2019) แสดงให้เห็นว่า ผลการทดสอบ MTT ของโพลีแซ็กคาไรด์จาก *Rhodopseudomonas palustris* (RPEPS-30) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ที่ความเข้มข้นต่ำ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพียงเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูง และช่วยเพิ่มกิจกรรม phagocytic ของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ได้เป็นอย่างดี (Peng Zhang, 2019)



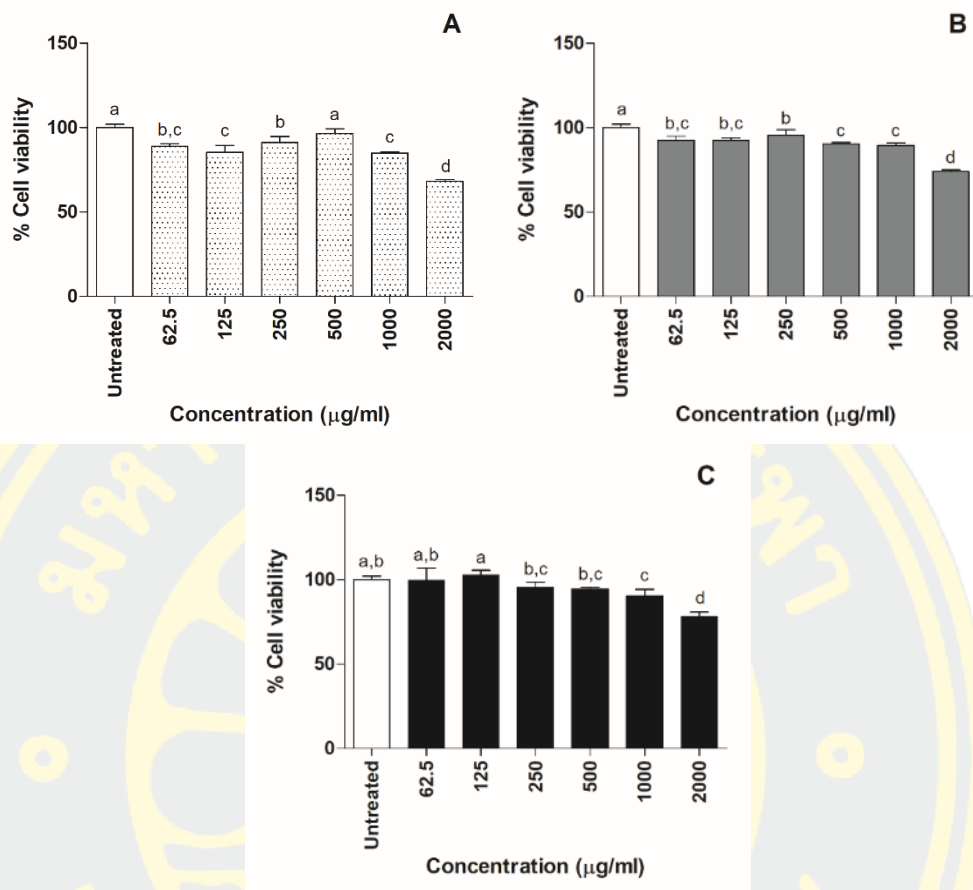
ภาพที่ 24 กราฟแสดงผลการทดสอบสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซตด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage RAW264.7) ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

การศึกษาความเข้มข้นของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวน โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง (Anticancer activity)

1. ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (Lung carcinoma, A549) จากผลทดลองการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (Lung carcinoma, A549) ของสารลิแวนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ จากการวัดค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cellular viability) ด้วยวิธีทดสอบ MTT พบว่า ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) คือ 88.78%, 85.48%, 91.10%, 96.43% และ 84.95% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง คือ 68.04% เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 92.38%, 92.32%, 95.33%, 90.39% และ 89.44% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จะลดลงถึง 73.93% เมื่อถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และการตรวจสอบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จากลิแวน *Bacillus siamensis* แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ 99.44%, 102.61%, 95.16% และ 94.40% ตามลำดับ และ ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย (90.48%) ส่วนความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มาก โดยทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง คือ 77.98% ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA), ลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และลิแวน *Bacillus siamensis* มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยอาจจะมีการกลไกผ่านกระบวนการของไมโทคอนเดรีย คือ การลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) ทำให้เกิดการปลดปล่อยไซโตโครม ซี เข้าสู่ไซโตโซล และกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 และ caspase-9 ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ Apoptosis (Abdel-Fattah et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับกรณีศึกษาของ Ariane Marie et al. (2021) พบว่า ผลการทดสอบสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จาก *Caulerpa taxifolia* แสดงให้เห็นการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (A549) สูงสุดที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ โดยมีค่าเท่ากับ $35.50 \pm 1.66\%$ และมีค่า IC_{50} ที่ 45.44 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Doxorubicin (กลุ่มควบคุมบวก) (Ariane Marie Bayro, 2021) นอกจากนี้งานวิจัยของ Kazak et al. (2014) มีรายงานว่า ลิแวนจากจุลินทรีย์ *Halomonas smyrnensis* AAD6^T มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งใน

ปริมาณสูงสุด (1,000 g/mL) ลิแวนที่ไม่ได้รับการดัดแปลงมีฤทธิ์ต้านต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (AGS) สูงสุด ในขณะที่ไม่มีผลต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด (A549) โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิแวนที่มี หมู่อัลติไฮด์จะมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูงกว่าลิแวนที่ไม่ได้ดัดแปลงต่อเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างของลิ แวนออกซิเดชัน (OL) แสดงฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มากกว่าเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (AGS) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) การเพิ่มระดับออกซิ เดชันทำให้ฤทธิ์การต้านมะเร็งเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการนำหมู่อัลติไฮด์ อัลติไฮด์ ดัดแปลงทางเคมีเข้าสู่โมเลกุลของลิแวนสามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านมะเร็งได้อย่างมี นัยสำคัญ (Kazak Sarilmiser & Toksoy Oner, 2014)





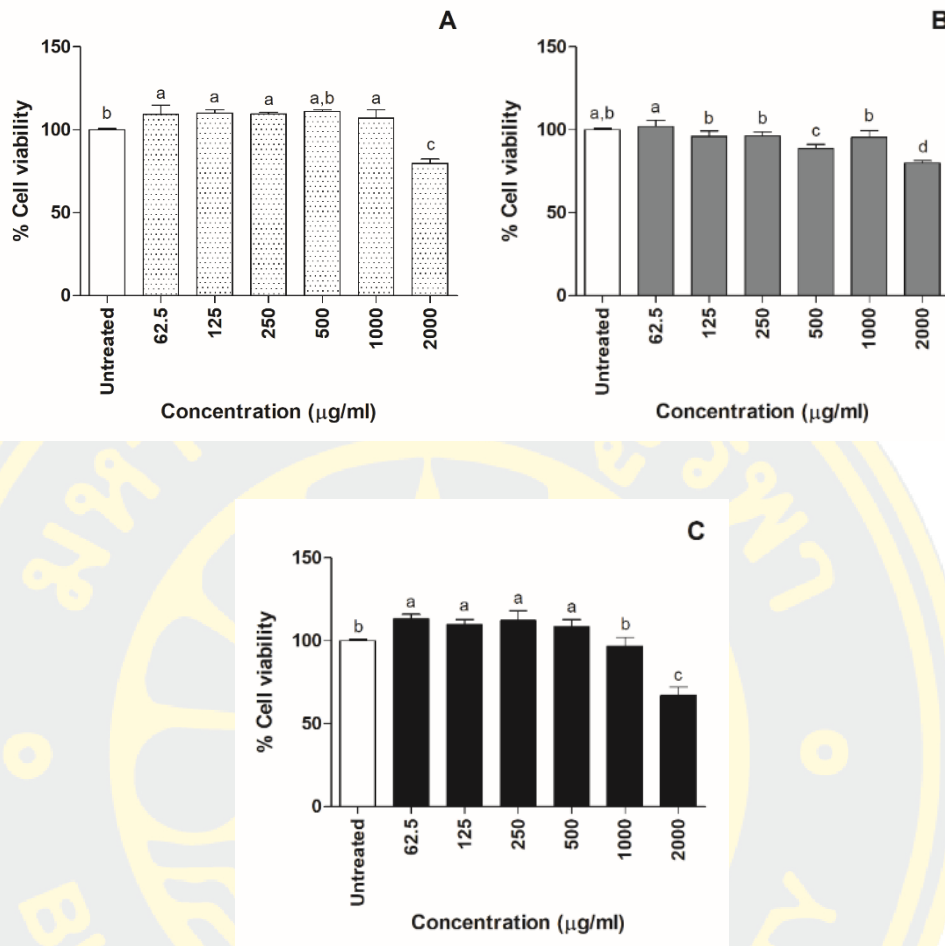
ภาพที่ 25 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (Lung carcinoma, A549) ของสารฟรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ D) ลิแวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

2. ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2)

จากภาพที่ 26 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2) ของสารลิแวนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากการวัดค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cellular viability) ด้วยวิธีทดสอบ MTT แสดงให้เห็น ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) คือ 109.18%, 110.00%, 109.41%, 111.06% และ 107.12% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง คือ 79.63% เช่นเดียวกัน เมื่อทดสอบเซลล์ด้วยลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 101.97%, 96.08%, 96.27% และ 95.39% ตามลำดับ แต่สำหรับที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงคือ 88.64% ซึ่งที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์จะลดลงถึง 79.77% เมื่อถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และการตรวจสอบร้อยละการมีชีวิตของเซลล์จากลิแวน *Bacillus siamensis* พบว่า ที่ความเข้มข้น 62.5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ 113.14%, 109.67%, 112.17% และ 108.58% ตามลำดับ และความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย (96.70%) ส่วนความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเท่ากับ 67.01% ดังนั้นความเข้มข้นของลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) ลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และลิแวน *Bacillus siamensis* มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งกลไกในการต้านมะเร็งน่าจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Alkahtani et al. (2020) พบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด Garden cress polysaccharides ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ได้มากถึง $65.33 \pm 3.75\%$ และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ถึง $60.33 \pm 3.48\%$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัด Garden cress polysaccharides มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด และสามารถพัฒนาไปเป็นยาต้านมะเร็งจากโพลีแซ็กคาไรด์ได้ (Alkahtani et al., 2020) ซึ่งได้มีการศึกษาผลของลิแวนต่อเซลล์มะเร็งโดยพบว่ามีการยับยั้งเซลล์มะเร็งผ่านการลด mitochondria membrane potential ทำให้เกิดการปลดปล่อย Cytochrome c ออกมาและมากระตุ้นการทำงานของ caspase-3

และ caspase-9 ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ Apoptosis นอกจากนี้งานวิจัยของ Yoon et al. (2004) ได้ศึกษาโครงสร้างกิ่งของลิแวนที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านเนื้องอกด้วยลิแวนจาก *M. laevaniformans* ที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 200 ถึง 1,000 g/mL และกิจกรรมการยับยั้งที่แข็งแกร่งที่สุด แสดงให้เห็น ในปริมาณสูงสุด (1,000 g/mL) ของลิแวน เมื่อระดับโครงสร้างการแตกแขนงลดลง กิจกรรมต่อการต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1) จะลดลง ในขณะที่เดียวกันกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1) เนื่องจากระดับการแตกแขนงของกิ่งลดลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโครงสร้างทางเคมีของลิแวนมีบทบาทสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และโครงสร้างกิ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเป็นอย่างมาก (Yoon et al., 2004)





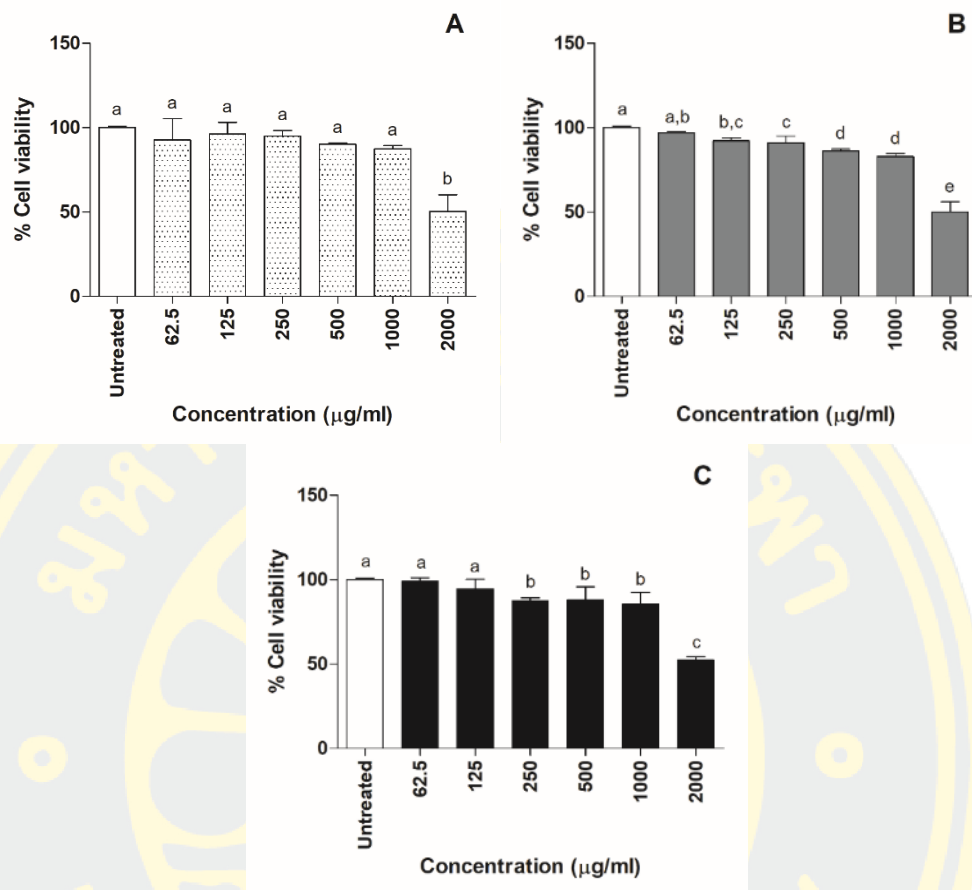
ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ (Human hepatocellular carcinoma, HepG2) ของสารฟรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิแวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* และ D) ลิแวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

3. ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116)

จากผลทดลองดังภาพที่ 27 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116) ของสารลิแวนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ จากการวัดค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cellular viability) ด้วยวิธีทดสอบ MTT ซึ่งให้เห็นว่า ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) คือ 92.59%, 96.24%, 94.87%, 90.24% และ 87.45% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงถึง 50.27% ในกรณีเดียวกันเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าเท่ากับ 96.94%, 92.10%, 90.88%, 86.12%, และ 82.67% ตามลำดับ ซึ่งจะลดลงตามลำดับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จะลดลงถึง 49.91% เมื่อถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และการตรวจสอบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จากลิแวน *Bacillus siamensis* พบว่าที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าลดลงตามลำดับดังนี้ 98.91%, 94.26%, 87.50%, 87.99% และ 85.54% ตามลำดับ ซึ่งไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงถึง 52.15% ดังนั้นความเข้มข้นของลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA), ลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และลิแวน *Bacillus siamensis* มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fang Zhang et al. (2017) พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จาก Peony seed dreg ที่ความเข้มข้น 200 mg/mL มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (Pc-3) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และมะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยมีอัตราการตายแบบ Apoptosis คือ 17.87% (HCT116) 20.22% (Pc-3) 30.94% (HeLa) และ 38.73% (MCF-7) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของเซลล์ Apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Fang Feng, 2018) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยจาก Abdel-Fattah et al. (2012) ได้รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของลิแวนจาก *B. subtilis* ด้วยน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันและรูปแบบของซัลเฟต

ต่อฤทธิ์การต้านมะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT-116) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด histiocytic มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว lymphoblastic พบว่า น้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้นและรูปแบบของซัลเฟต ส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตที่โดดเด่นที่ความเข้มข้น 100 g/mL ลิแวนซัลเฟตที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าแสดงให้เห็นถึงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่แตกต่างกันตามลำดับต่อไปนี้ HepG2 > HeLa > HCT-116 > lymphoblastic leukemia 1301 > MCF-7 (Abdel-Fattah et al., 2012) โดยจะมีกลไกผ่านกระบวนการของไมโทคอนเดรีย คือ การลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) ทำให้เกิดการปลดปล่อย Cytochrome c เข้าสู่ไซโตโซล และกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 และ caspase-9 ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ Apoptosis



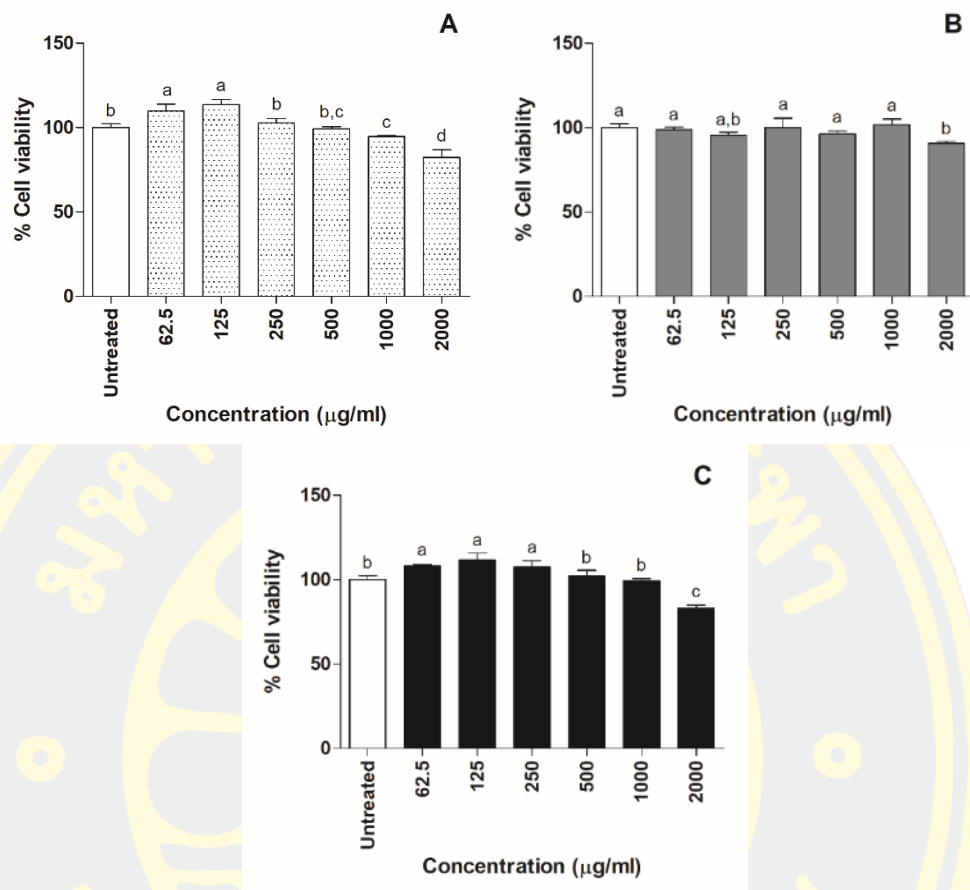


ภาพที่ 27 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal carcinoma, HCT116) ของสารฟรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิเวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิเวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิเวนจาก *Bacillus siamensis* และ D) ลิเวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูป mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test)

4. ผลของลิแวนต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix adenocarcinoma, HeLa)

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix adenocarcinoma, HeLa) ของสารลิแวนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ (ภาพที่ 28) จากการวัดร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cellular viability)

ด้วยวิธีทดสอบ MTT บ่งชี้ว่า ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) มีค่าเท่ากับ 109.84%, 113.65%, 102.66%, 99.29% และ 94.62% ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงถึง 82.19% เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบเซลล์ด้วยลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าเท่ากับ 98.73%, 95.38%, 100%, 96.09% และ 101.63% ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย (90.66%) และการตรวจสอบร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์จากลิแวน *Bacillus siamensis* พบว่า ที่ความเข้มข้น 62.5-1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ 107.94%, 111.50%, 107.42%, 102.11% และ 99.24% ตามลำดับ และ ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเท่ากับ 82.88% ดังนั้นความเข้มข้นของลิแวนมาตรฐาน *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA), ลิแวน *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) และลิแวน *Bacillus siamensis* มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลลัพธ์เหล่านี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ye Yuan et al. (2017) ได้มีรายงานว่า โพลีแซ็กคาไรด์จาก *R. Greiseocarnososa* มีความสามารถในการต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Siha) แม้ว่าฤทธิ์ต้านเนื้องอกของ PRG จะต่ำกว่าสารสังเคราะห์ เช่น cisplatin แต่ PRG ก็มีข้อได้เปรียบของความเป็นพิษต่อเซลล์ที่น้อยกว่า ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่สูงแต่ก็ยังมีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งเนื้องอกได้ (Ye Yuan, 2017) ซึ่งอาจจะมิกัดไคในการต้านเซลล์มะเร็งที่จะเป็นไปได้จากการสูญเสีย mitochondria membrane potential ทำให้เกิดการปลดปล่อย Cytochrome c ออกมากระตุ้นการทำงานของ caspase-3 และ caspase-9 ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ Apoptosis



ภาพที่ 28 กราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervix adenocarcinoma, HeLa) ของสารฟรีไบโอติกแต่ละชนิด A) ลิเวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola*, B) ลิเวนจาก *Chrysanthemum* C) ลิเวนจาก *Bacillus siamensis* และ D) ลิเวนไฮโดรไลเซต ข้อมูลแสดงในรูปแบบ mean \pm S.D., n=4 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติและอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และการทดสอบความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) ของสารพรีไบโอติกในรูปของลีแวน

ตารางที่ 16 ความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และความสามารถในการละลายในน้ำมัน (Oil solubility index) ของสารพรีไบโอติกในรูปของลีแวน

Sample	WSI (%)	OSI (%)	WHC (%)
Levan <i>Bacillus siamensis</i>	95.93 ± 10.75	98.84 ± 303.07	182.71 ± 202.27

ดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และดัชนีความสามารถในการละลายน้ำมัน (OSI) กำหนดความสามารถในการละลายของวัสดุชีวภาพในน้ำและน้ำมัน ผลลัพธ์แสดงให้เห็นเนื่องจากจำนวนครั้งที่ลีแวนสามารถกักเก็บน้ำไว้ได้ ดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และดัชนีความสามารถในการละลายของน้ำมัน (OSI) (ตารางที่ 5) ถูกกำหนดสำหรับตัวอย่างที่มีลีแวน ดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และดัชนีความสามารถในการละลายของน้ำมัน (OSI) สำหรับลีแวนที่ตกตะกอนจาก *Bacillus siamensis* เท่ากับ $95.93 \pm 10.75\%$ และ $98.84 \pm 303.07\%$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และค่าความสามารถในการละลายของน้ำมัน (OSI) ที่กำหนดสำหรับลีแวนจาก *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) เท่ากับ $79.29 \pm 3.23\%$ และ $75.09 \pm 140.85\%$ (ไม่แสดงข้อมูล) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าลีแวนจาก *Bacillus siamensis* มีศักยภาพในการละลายน้ำและสามารถละลายได้ดีที่สุดในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ รายงานก่อนหน้าของ Marta Domzal-Kedzia et al (2019) แสดงให้เห็นว่า ค่าดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) ของลีแวนมาตรฐานจาก *Erwinia herbicola* (Sigma-Aldrich, USA) เท่ากับ $86.30 \pm 3.30\%$ และ Saravan et al. รายงานว่า ค่าดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) ของลีแวนจาก *B. subtilis* KB1 คือ $14.20 \pm 0.21\%$ (Domzal-Kedzia et al., 2019b) ในกรณีศึกษาของ Rashid et al. (2018) มีรายงานว่า ค่าดัชนีความสามารถในการละลายน้ำ (WSI) และความสามารถในการละลายน้ำมันของอินูลินที่สกัดจากรากชิกโครีและอาติไซค์เยรูซาเล็ม เท่ากับ $7.95 \pm 0.26\%$, $6.43 \pm 0.22\%$ และ $118.67 \pm 3.26\%$, $4.62 \pm 0.18\%$ (Summer Rashid, 2018)

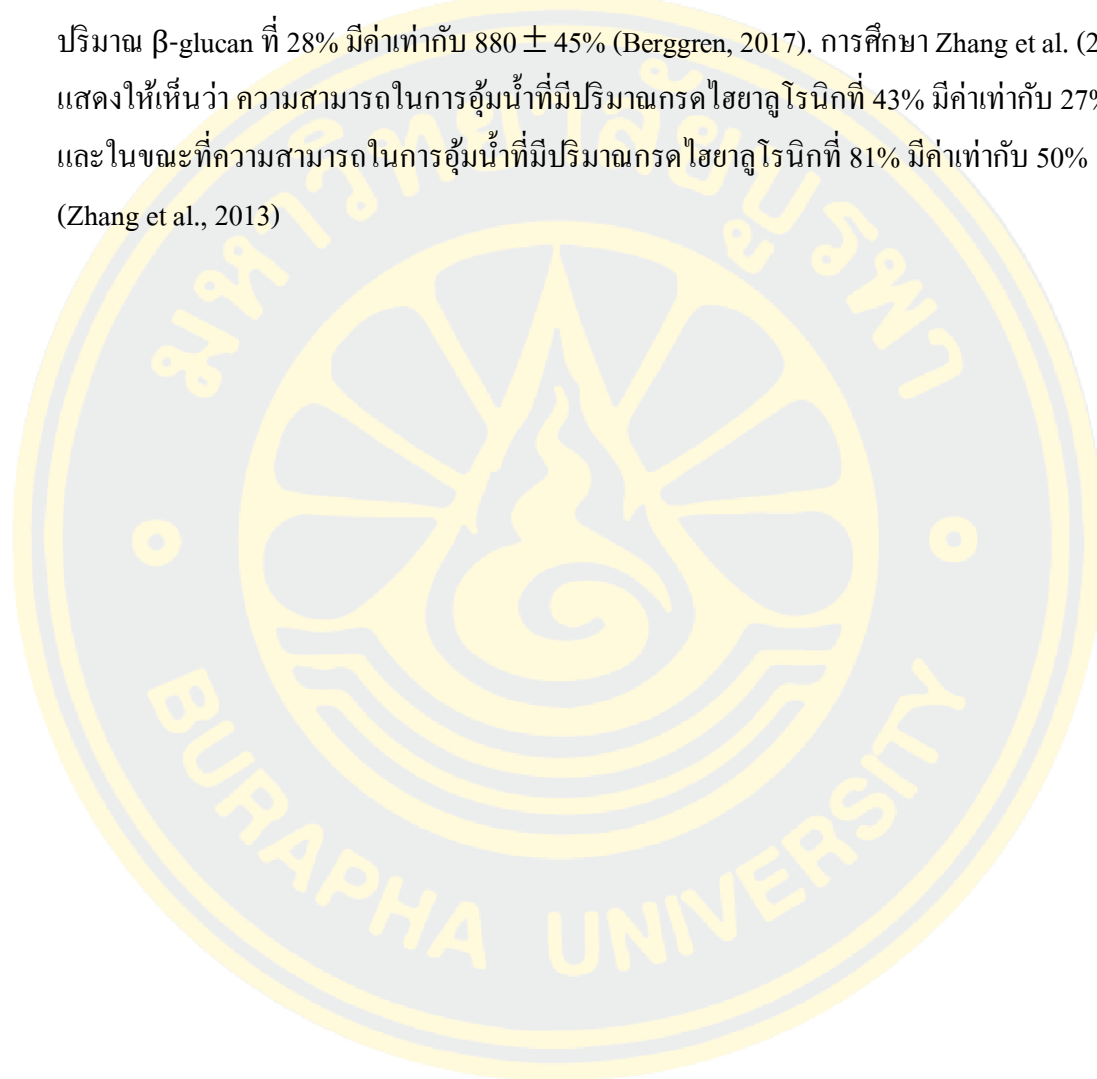
การทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity) ของสารพรีไบโอติก ในรูปของลิแวน

ค่าดัชนีความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity) แสดงให้เห็นถึง ปริมาณน้ำที่วัสดุสามารถกักเก็บไว้ได้ (Domzal-Kedzia et al., 2019b) เมื่ออยู่ภายใต้แรงโน้มถ่วงจากภายนอกหรือการบีบอัด ซึ่งประกอบด้วย การรวมตัวกันของน้ำ (Sum of linked water) อุทกพลศาสตร์ของน้ำ (Hydrodynamic water) และน้ำที่ขังอยู่ในวัสดุ (physically trapped water) (Alfredo et al., 2009) ความสามารถในการอุ้มน้ำ คือ ความสามารถในการดูดซับน้ำและกักเก็บไว้แม้หลังจากผ่านการรักษาด้วยแรงภายนอก (Laufenberg & Schulze, 2009)

ลิแวน เป็นโพลีแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนในระบบที่ออกแบบมาสำหรับการควบคุมการจัดส่งฟีนอลิกที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คอมเพล็กซ์เหล่านี้มีลักษณะในหลาย ๆ ครั้งแสดงให้เห็นว่าโดยหลักแล้วเกิดจากพันธะไฮโดรเจนและในขอบเขตที่จำกัดมากขึ้น โดยปฏิสัมพันธ์ที่ไม่ชอบน้ำ (Laura Gómez-Mascaraque, 2017; Tudorache & Bordenave, 2019) ผลที่ตามมาของปฏิสัมพันธ์เหล่านี้ต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารประกอบฟีนอลิกแสดงให้เห็นว่า การก่อตัวของสารประกอบเชิงซ้อน โพลีแซ็กคาไรด์-ฟีนอลิก มีผลต่อเสถียรภาพทางเคมีและความสามารถในการดูดซึมของสารประกอบฟีนอลิก (Tudorache & Bordenave, 2019) ปัจจัยสุดท้ายก่อให้เกิดความสามารถเหล่านี้มากที่สุด

ผลจากการศึกษาแสดงความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) ของลิแวนจาก *Bacillus siamensis* (ตารางที่ 16) WHC สำหรับตัวอย่างที่ตกตะกอนของลิแวนจาก *Bacillus siamensis* เท่ากับ $182.71 \pm 202.27\%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) ของลิแวนจาก *Chrysanthemum* (Shanghai Huichem, China) ไม่มีความสามารถในการกักเก็บน้ำ แต่อย่างไรก็ตาม ลิแวนจาก *Chrysanthemum* มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่า ลิแวนจาก *Bacillus siamensis* มีผลกระทบ โดยทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถในการจับตัวกับน้ำ เช่นเดียวกับปฏิสัมพันธ์กับเมทริกซ์โพรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของลิแวน โครงสร้างของลิแวนขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้นและกระดูกสันหลังที่แข็งแกร่งกว่าจะมีส่วนทำให้ความหนืดสูงขึ้นเสมอ (Xu et al., 2019) โดยทั่วไปพันธะ β -(1 \rightarrow 4) ส่งผลให้โซ่แข็งขึ้นเมื่อเทียบกับพันธะ α -(1 \rightarrow 4) หรือ β -(1 \rightarrow 3) (J. H. Patricia Ruas-Madiedo, Pieternela Zoon, 2002) นอกจากนี้กิ่งก้านและกลุ่มข้างเคียงยังมีบทบาทสำคัญในการตั้งโซ่ จากกรณีศึกษาของ Patricia Ruas-Madiedo et al. (2002) (R. T. Patricia Ruas-Madiedo, Marja Kanning, Pieternella Zoon, 2002) แสดงให้เห็นว่า ความฝืดของเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharides) จาก *L. lactis sub sp. Cremoris* B39 ลดลง โดย

การนำกากข้าวกาแลคโตซิลลอก (บนโซ่ด้านข้าง). Sofia Berggren และคณะ (2017) แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณ β -glucan ในแป้งหรือรำที่สูงขึ้นพบว่ามีความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) ที่สูงขึ้น ค่าดัชนีความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) สำหรับแป้งข้าวโอ๊ตที่มีปริมาณ β -glucan ที่ 2% มีค่าเท่ากับ $73 \pm 7\%$ ในขณะที่ค่าดัชนีความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) สำหรับรำข้าวโอ๊ตที่มีปริมาณ β -glucan ที่ 28% มีค่าเท่ากับ $880 \pm 45\%$ (Berggren, 2017). การศึกษา Zhang et al. (2013) แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการอุ้มน้ำที่มีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ 43% มีค่าเท่ากับ 27% และในขณะที่ความสามารถในการอุ้มน้ำที่มีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ 81% มีค่าเท่ากับ 50% (Zhang et al., 2013)

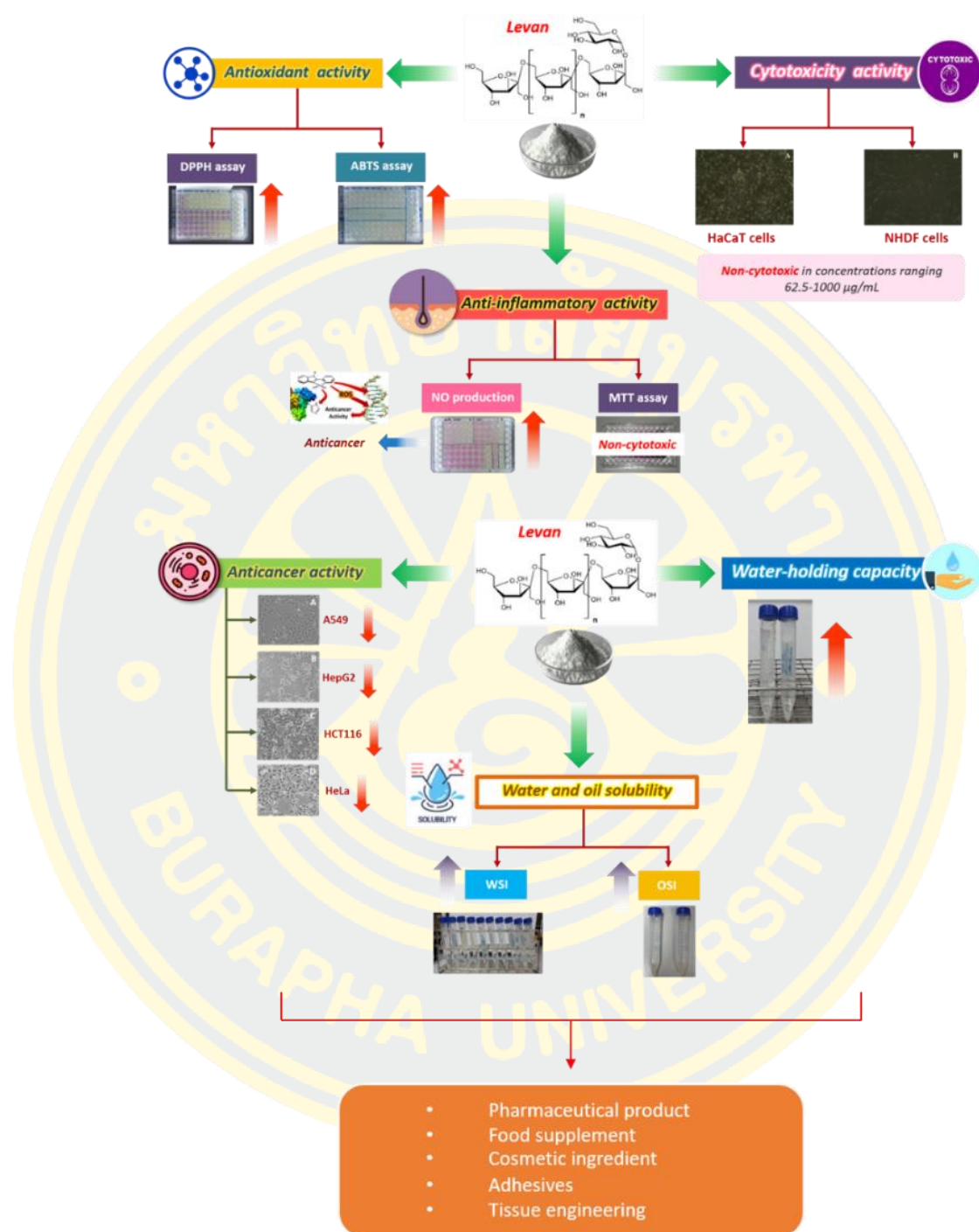


บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ได้พิจารณาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* รวมทั้ง การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง Human keratinocyte (HaCaT) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (NHDF) การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) การทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง (Anticancer activity) การประเมินความสามารถในการละลายน้ำ (Water solubility index) และน้ำมัน (Oil solubility index) และความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity) สำหรับการแยกส่วนของสารลิแวนจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ ให้เปลี่ยนเป็นลิแวนไฮโดรไลเซตนั้น โดยใช้วิธีไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริก ได้รับการพิสูจน์คุณลักษณะความสามารถที่แตกต่างกันของน้ำหนักโมเลกุล โดยน้ำหนักโมเลกุลของลิแวนจะส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงสุด ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า สารฟรีไบโอติกในรูปของลิแวนนั้น มีความปลอดภัยต่อการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง และทางด้านชีวการแพทย์ จากการศึกษาได้ใช้วิธีการวิเคราะห์หลายวิธีเพื่อพิสูจน์ว่าการกำหนดคุณลักษณะโครงสร้างของพอลิเมอร์นั้นมีความสำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ อีกด้วย



ภาพที่ 29 แผนภาพสรุปผลการศึกษาคูณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของสีแวนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus siamensis* เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเวชศาสตร์เครื่องสำอาง

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาลักษณะของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซตที่มีผลมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาวะความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และเวลาในการไฮโดรไลซิส เป็นต้น
2. ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพรีไบโอติกในรูปของลิแวนไฮโดรไลเซต (เพิ่มเติม) เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Superoxide radical, Hydroxy radical, FRAP) ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น
3. ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารลิแวน (Degree of polymerization, DP) โดยการวิเคราะห์ขั้นสูงด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น GPC, HPSEC, GC-MS, MALDI-TOF หรือ ESI-MS
4. ปรับปรุงและพัฒนาสารลิแวนและลิแวนไฮโดรไลเซตให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

บรรณานุกรม

- Abdel-Fattah, A. M., Gamal-Eldeen, A. M., Helmy, W. A., & Esawy, M. A. (2012). Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydr Polym*, 89(2), 314-322.
- Alfredo, V.-O., Gabriel, R.-R., Luis, C.-G., & David, B.-A. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 168-173.
- Alkahtani, J., Soliman Elshikh, M., Almaary, K. S., Ali, S., Imtiyaz, Z., & Bilal Ahmad, S. (2020). Anti-bacterial, anti-scavenging and cytotoxic activity of garden cress polysaccharides. *Saudi J Biol Sci*, 27(11), 2929-2935.
- Anwar, M. A., Leemhuis, H., Pijning, T., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2012). The role of conserved inulosucrase residues in the reaction and product specificity of *Lactobacillus reuteri* inulosucrase. *Febs j*, 279(19), 3612-3621.
- Aramsangtienchai, P., Kongmon, T., Pechroj, S., & Srisook, K. (2020). Enhanced production and immunomodulatory activity of levan from the acetic acid bacterium, *Tanticharoenia sakaeratensis*. *Int J Biol Macromol*, 163, 574-581.
- Ariane Marie Bayro, J. K. M., Renaliza Alonte, Catherine Caniel,, & Patrick Conde, C. E. (2021). Preliminary Characterization Antioxidant and Antiproliferative. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 8, 30-36.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Ionina, R., & Vigants, A. (2003). Catalytic activity of *zymomonas mobilis* extracellular "levan-levansucrase" complex in sucrose medium. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 68(2 Pt A), 321-324.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 99(2), 111-119.
- Benso, B., Franchin, M., Massarioli, A. P., Paschoal, J. A. R., Alencar, S. M., Franco, G. C. N., & Rosalen, P. L. (2016). Anti-Inflammatory, Anti-Osteoclastogenic and Antioxidant Effects of *Malva sylvestris* Extract and Fractions: In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS One*, 11(9),

e0162728.

- Berggren, S. (2017). Water holding capacity and viscosity of ingredients from oats. *Linnaeus university*, 1-32.
- Bojar, R. A., & Holland, K. T. (2002). Review: the human cutaneous microflora and factors controlling colonisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(9), 889-903.
- Bojar, R. A., & Holland, K. T. (2004). Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clin Dermatol*, 22(5), 375-379.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 143.
- Carpiné, D., Dagostin, J. L. A., de Andrade, E. F., Bertan, L. C., & Mafra, M. R. (2016). Effect of the natural surfactant *Yucca schidigera* extract on the properties of biodegradable emulsified films produced from soy protein isolate and coconut oil. *Industrial Crops and Products*, 83, 364-371.
- Chen, F., Huang, G., Yang, Z., & Hou, Y. (2019). Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives. *Int J Biol Macromol*, 138, 673-680.
- Chen, G., Li, C., & Chen, K. (2016). Chapter 6 - Fructooligosaccharides: A Review on Their Mechanisms of Action and Effects. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 48, pp. 209-229): Elsevier.
- Chiller, K., Selkin, B. A., & Murakawa, G. J. (2001). Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3), 170-174.
- Damour, O., Hua, S. Z., Lasne, F., Villain, M., Rousselle, P., & Collombel, C. (1992). Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns*, 18(6), 479-485.
- de Paula, V. C., Pinheiro, I. O., Lopes, C. E., & Calazans, G. C. (2008). Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. *Bioresour Technol*, 99(7), 2466-2470.
- Do, T. T. H., Lai, T. N. B., Stephenson, S. L., & Tran, H. T. M. (2021). Cytotoxicity activities and chemical characteristics of exopolysaccharides and intracellular polysaccharides of

- Physarum polycephalum* microplasmodia. *BMC Biotechnol*, 21(1), 28.
- Domzal-Kedzia, M., Lewinska, A., Jaromin, A., Weselski, M., Pluskota, R., & Lukaszewicz, M. (2019a). Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics. *Bioorg Chem*.
- elaheh, M., Ali, M. S., Elnaz, M., & Ladan, N. (2016). Prebiotic effect of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) fructans on the growth performance of *Bifidobacterium bifidum* and *Escherichia coli*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(5), 385-389.
- Elias, P. M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol*, 29(1), 3-14.
- Esawy, M. A., Abdel-Fattah, A. M., Ali, M. M., Helmy, W. A., Salama, B. M., Taie, H. A., . . . Awad, G. E. (2013). Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies. *Carbohydr Polym*, 96(1), 332-341.
- Ezzat, A., Fayad, W., Ibrahim, A., Kamel, Z., El-Diwany, A. I., Shaker, K. H., & Esawy, M. A. (2020). Combination treatment of MCF-7 spheroids by *Pseudomonas aeruginosa* HI1 levan and cisplatin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24.
- Feng, F., Zhou, Q., Yang, Y., Zhao, F., Du, R., Han, Y., . . . Zhou, Z. (2018). Characterization of highly branched dextran produced by *Leuconostoc citreum* B-2 from pineapple fermented product. *Int J Biol Macromol*, 113, 45-50.
- Fredricks, D. N. (2001). Microbial ecology of human skin in health and disease. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 6(3), 167-169.
- G. Gómez-Mascaraque, L., Dhital, S., López-Rubio, A., & Gidley, M. J. (2017). Dietary polyphenols bind to potato cells and cellular components. *Journal of Functional Foods*, 37, 283-292.
- Gao, Z., Tseng, C. H., Strober, B. E., Pei, Z., & Blaser, M. J. (2008). Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. *PLoS One*, 3(7), e2719.
- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121(2), 307-318.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Renaud, G., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., . . . Segre, J. A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res*, 18(7), 1043-

1050.

- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 244-253.
- Han, Y. W., & Watson, M. A. (1992). Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3), 257-260.
- Handfield, C., Kwock, J., & MacLeod, A. S. (2018). Innate Antiviral Immunity in the Skin. *Trends Immunol*, 39(4), 328-340.
- Ibiza, S., & Serrador, J. M. (2008). The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. *Inmunología*, 27(3), 103-117.
- Inturri, R., Molinaro, A., Di Lorenzo, F., Blandino, G., Tomasello, B., Hidalgo-Cantabrana, C., . . . Ruas-Madiedo, P. (2017). Chemical and biological properties of the novel exopolysaccharide produced by a probiotic strain of *Bifidobacterium longum*. *Carbohydr Polym*, 174, 1172-1180.
- Jappe, U., Ingham, E., Henwood, J., & Holland, K. T. (2002). Propionibacterium acnes and inflammation in acne; P. acnes has T-cell mitogenic activity. *Br J Dermatol*, 146(2), 202-209.
- Jehan A.S. Salman, H. A. A. a. A. Y. K. (2019). Analysis and Characterization of Purified Levan from *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* and its Effects on *Candida albicans* Virulence Factors. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12, 243 - 249.
- Jong Kwon Lee, D. B. K., Jong IL Kim and Pu Young Kim. (2000). In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicology in Vitro*, 14, 345-349.
- Kazak Sarilmiser, H., & Toksoy Oner, E. (2014). Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal*, 92, 28-34.
- Kesavan, S., Holland, K. T., & Ingham, E. (2000). The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro. *Med Mycol*, 38(3), 239-247.
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., & Kim, C. H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J Cosmet Sci*, 56(6), 395-406.

- Kim, S. J., & Chung, B. H. (2016). Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. *Carbohydr Polym*, 150, 400-407.
- Krutmann, J. (2009). Pre- and probiotics for human skin. *J Dermatol Sci*, 54(1), 1-5.
- Krutmann, J. (2012). Pre- and probiotics for human skin. *Clin Plast Surg*, 39(1), 59-64.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J Exp Bot*, 60(3), 727-740.
- Laufenberg, G., & Schulze, N. (2009). A modular strategy for processing of fruit and vegetable wastes into value-added products. In *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing* (pp. 286-353).
- Leandro Freire dos Santos, E. A. G. P., Maria Antonia Pedrine, & Cavalcanti, C. C. a. O. A. (2013). Levan as a new additive for colon-specific films A new approach in the use of exopolysaccharides in time-dependent free films (Aminoalkyl Methacrylate Copolymer RS). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5), 943-948.
- Li, E., Yang, S., Zou, Y., Cheng, W., Li, B., Hu, T., . . . Pang, D. (2019). Purification, Characterization, Prebiotic Preparations and Antioxidant Activity of Oligosaccharides from Mulberries. *Molecules*, 24(12).
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X. (2010). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1278-1283.
- Liu, Q., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., & Mu, W. (2017). Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. *Carbohydr Polym*, 157, 1732-1740.
- Lorenzoni, A. S. G., Aydos, L. F., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2014). Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, 103, 193-197.
- Manosroi, J., Khositsuntiwong, N., & Manosroi, A. (2014). Biological activities of fructooligosaccharide (FOS)-containing *Coix lachryma-jobi* Linn. extract. *J Food Sci Technol*, 51(2), 341-346.
- Mena-Arizmendi, A., Alderete, J., Águila, S., Marty, A., Miranda-Molina, A., López-Munguía, A.,

- & Castillo, E. (2011). Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(1-2), 41-48.
- Mohammad M.F. Al-Halbosiy, Z. A. T., Safaa Al-Deen A. S. Al-Qaysi, Tarek A.A. Moussa. (2018). Biological Activity of Levan Produced from Rhizospheric Soil Bacterium *Brachybacterium phenoliresistens* KX139300. *Baghdad Science Journal*, 15(3).
- Nakatsuji, T., & Gallo, R. L. (2019). The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 122(3), 263-269.
- Ni, D., Xu, W., Bai, Y., Zhang, W., Zhang, T., & Mu, W. (2018). Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 29-37.
- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnology Advances*, 37(2), 306-318.
- Nielsen, M. C., & Jiang, S. C. (2019). Alterations of the human skin microbiome after ocean water exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 145, 595-603.
- Niziol-Lukaszewska, Z., Furman-Toczek, D., & Zagorska-Dziok, M. (2018). Antioxidant activity and cytotoxicity of Jerusalem artichoke tubers and leaves extract on HaCaT and BJ fibroblast cells. *Lipids Health Dis*, 17(1), 280.
- Nobre, C., Castro, C. C., Hantson, A. L., Teixeira, J. A., De Weireld, G., & Rodrigues, L. R. (2016). Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast. *Carbohydr Polym*, 136, 274-281.
- Okada, T., Konishi, H., Ito, M., Nagura, H., & Asai, J. (1988). Identification of secretory immunoglobulin A in human sweat and sweat glands. *J Invest Dermatol*, 90(5), 648-651.
- Oner, E. T., Hernandez, L., & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol Adv*, 34(5), 827-844.
- Pagolu Navya, S. S. K. (2017). In vitro cytotoxicity analysis of sulfated polysaccharides from green seaweed *Codium tomentosum* Stackhouse, 1797. *Journal of Applied Pharmaceutical*

Science.

- Park, S.-K., Jang, K.-H., Kim, M.-H., Lim, J.-D., Han, E.-T., Jang, S.-A., . . . Sohn, E.-H. (2008). The Differential Immunomodulating Effects of Levan and DFA-IV on Macrophage Function. *Preventive Nutrition and Food Science*, 13(1), 1-6.
- Patra, V., Wagner, K., Arulampalam, V., & Wolf, P. (2019). Skin Microbiome Modulates the Effect of Ultraviolet Radiation on Cellular Response and Immune Function. *iScience*, 15, 211-222.
- Patricia Ruas-Madiedo, J. H., Pieterella Zoon. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Patricia Ruas-Madiedo, R. T., Marja Kanning, Pieterella Zoon. (2002). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis sub sp. cremorison* the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, 12, 689-695.
- Porras-Dominguez, J. R., Avila-Fernandez, A., Miranda-Molina, A., Rodriguez-Alegria, M. E., & Munguia, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydr Polym*, 132, 338-344.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., . . . López Munguía, A. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783-790.
- Porras-Domínguez, J. R., Rodríguez-Alegría, M. E., Ávila-Fernández, Á., Montiel-Salgado, S., & López-Munguía, A. (2017). Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB). *Carbohydrate Polymers*, 177, 40-48.
- R. A. Anderson, H. F. C., and A. I. Peplinski, Peoria, Illinois (USA). (1970). Gelatinization of Corn Grits by Roll Cooking, Extrusion Cooking and Steaming. *Die Starke* 22, 130-135.
- Saito, K., Kondo, K., Kojima, I., Yokota, A., & Tomita, F. (2000). Purification and characterization of 2,6-beta-D-fructan 6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *Appl Environ Microbiol*, 66(1), 252-256.
- Schepetkin, I. A., Xie, G., Kirpotina, L. N., Klein, R. A., Jutila, M. A., & Quinn, M. T. (2008). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia*

- polyacantha*. *Int Immunopharmacol*, 8(10), 1455-1466.
- Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2012). Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydr Polym*, 89(4), 1268-1276.
- Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., . . . Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr Polym*, 147, 444-454.
- Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1998). Interleukin 4. In P. J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* (pp. 1451-1453). Oxford: Elsevier.
- Soltan-Dallal, M. M., Validi, M., Douraghi, M., Fallah-Mehrabadi, J., & Lormohammadi, L. (2017). Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEp-2 cell line by MTT assay. *Microb Pathog*, 113, 416-420.
- Srikanth, R., Reddy, C. H., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym*, 120, 102-114.
- Summer Rashid, A. R., Masood Sadiq Butt, Muhammad Asgher. (2018). Physicochemical and techno-functional characterization of inulin extracted from chicory roots and Jerusalem artichoke tubers and exploring their ability to replace the fat in cakes. *Progress in Nutrition*, 20, 191-202.
- Taylan, O., Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2019). Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol*, 136, 436-444.
- Tudorache, M., & Bordenave, N. (2019). Phenolic compounds mediate aggregation of water-soluble polysaccharides and change their rheological properties: Effect of different phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 97.
- Vijayendra, S. V., & Shamala, T. R. (2014). Film forming microbial biopolymers for commercial applications--a review. *Crit Rev Biotechnol*, 34(4), 338-357.
- Wu, F.-C., Chou, S.-Z., & Shih, I.-L. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 846-853.

- Xu, T. Y., W. Liw, K. Saito, Y. Ohshima and Y. Yoshikai. (2006). Levan (b-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling : induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clinical and Experimental Allergy*, 36, 94-101.
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., . . . Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94, 475-499.
- Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41-46.
- Yokota, A., Kondo, K., Nakagawa, M., Kojima, I., & Tomita, F. (2014). Production of Levanbiose by a Levan-degrading Enzyme from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(5), 745-749.
- Yoon, E. J., Yoo, S. H., Cha, J., & Gyu Lee, H. (2004). Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int J Biol Macromol*, 34(3), 191-194.
- Yuan, Y., Liu, Y., Liu, M., Chen, Q., Jiao, Y., Liu, Y., & Meng, Z. (2017). Optimization extraction and bioactivities of polysaccharide from wild *Russula griseocarnosa*. *Saudi Pharm J*, 25(4), 523-530.
- Yuan, Y. V., Bone, D. E., & Carrington, M. F. (2005). Antioxidant activity of dulce (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry*, 91(3), 485-494.
- Zhang, F., Shi, J. J., Thakur, K., Hu, F., Zhang, J. G., & Wei, Z. J. (2017). Anti-Cancerous Potential of Polysaccharide Fractions Extracted from Peony Seed Dreg on Various Human Cancer Cell Lines Via Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Front Pharmacol*, 8, 102.
- Zhang, P., Sun, F., Cheng, X., Li, X., Mu, H., Wang, S., . . . Duan, J. (2019). Preparation and biological activities of an extracellular polysaccharide from *Rhodospseudomonas palustris*. *Int J Biol Macromol*, 131, 933-940.
- Zhang, W., Mu, H., Zhang, A., Cui, G., Chen, H., Duan, J., & Wang, S. (2013). A decrease in moisture absorption-retention capacity of N-deacetylation of hyaluronic acid. *Glycoconj J*, 30(6), 577-583.

Zhu, Y., Ding, X., Wang, M., Hou, Y., Hou, W., & Yue, C. (2016). Structure and antioxidant activity of a novel polysaccharide derived from *Amanita caesarea*. *Mol Med Rep*, 14(4), 3947-3954.



ต้นฉบับไม่ปรากฏหน้า

รางวัลหรือทุนการศึกษา Publication:

2020 Nattapong Thakham, Suphasin Thaweesak, Nuttinee Teerakulkittipong, Natthiwut Traiosot, Autaipohn Kaikaew, Gary Antonio Lirio, and Witawat Jangiam. (2020). Structural Characterization of Functional Ingredient Levam Synthesized by *Bacillus siamensis* Isolated from Traditional Fermented Food in Thailand. *International Journal of Food Science* Volume 2020, 12 pages.

Conference:

Oral presentation

2021 Natthiwut Traiosot, Santi Phosri, Autaipohn Kaikaew, and Witawat Jangiam. (2021). 'Solubility, Water Holding Capacity and Antioxidant Potentials of Levam Synthesized by *Bacillus siamensis* for Cosmeceutical Application', Presented at The 30th TIChE Conference (TIChE2021), Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, May 6-7, 2021.

Poster presentation

2018 Natthiwut Traiosot, Thalatchanan Saikrueakham, Nattapong Thakham, and Witawat Jangiam. (2018). "Isolation and Characterization of *Bacillus siamensis* from Fermented Soybean for Prebiotic (Levan)-production", Presented at MJU Annual Conference 2018, Maejo University, Chiang mai, Thailand, December 11-13, 2018.

Certificate:

1. Biotechnology, Thailand Professional Qualification Institute (TPQI), Faculty of Allied Health Sciences, Burapha university, November 26, 2020.
2. อบรมเชิงปฏิบัติการการสอบเทียบไมโครมิเตอร์ เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์และไฮเกจและการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด, Burapha university, July 29, 2020.
3. หลักสูตรเทคโนโลยีเอนไซม์สู่อุตสาหกรรมที่ยั่งยืน, BIOTEC a member of NSTDA, February 28, 2019.
4. Interpretation Requirement of ISO9001:2015, ISO14001:2015, and ISO45001:2018 Training course, Faculty of Engineering, Burapha university, March 30, 2019.
5. Internal Audit and Management Review of ISO9001:2015, ISO14001:2015, and ISO45001:2018 Training course, Faculty of Engineering, Burapha university, March 31, 2019.
6. Risk Assessment of ISO9001:2015, ISO14001:2015, and ISO45001:2018 Training course, Faculty of Engineering, Burapha university, April 1, 2019.
7. The Laboratory Safety Workshop course, NRCT, April 30, 2019.
8. Biosafety and Biosecurity course, BIOTEC a member of NSTDA, August 7, 2019.