

## แบบเสนอโครงการวิจัย (research project)

ประกอบการเสนอของบประมาณ สนับสนุนการวิจัย ประเภททุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัย จากเงิน

ชื่อโครงการวิจัย ( ภาษาไทย ) การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากกล้วยน้ำว้าดิบเพื่อใช้เป็น  
จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล

( ภาษาอังกฤษ ) Characterization of lactic acid bacteria from raw cultivated  
banana as cholesterol-lowering probiotics

## ส่วน ก. : ลักษณะโครงการวิจัย

- โครงการวิจัยใหม่  
 โครงการวิจัยต่อเนื่อง

ประเภทโครงการ                      โครงการวิจัย

โครงการย่อย

สาขาวิจัย                              สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ประเภทการวิจัย                      การวิจัยประยุกต์

ด้านการวิจัย                          วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สาขาการวิจัยหลัก OECD        วิทยาศาสตร์ธรรมชาติ

สาขาการวิจัยย่อย OECD        วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

แผนยุทธศาสตร์                      ยุทธศาสตร์ที่ 2

## มาตรฐานการวิจัย

- มีการใช้สัตว์ทดลอง
- มีการวิจัยในมนุษย์
- มาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพด้านพันธุวิศวกรรม
- มีการใช้ห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับสารเคมี

## ระยะเวลาการวิจัย

ระยะเวลาโครงการ      1 ปี 0 เดือน

### การตรวจสอบทรัพย์สินทางปัญญาหรือสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง

- ไม่มีการตรวจสอบทรัพย์สินทางปัญญา และ/หรือ สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง
- ตรวจสอบทรัพย์สินทางปัญญาแล้ว ไม่มีทรัพย์สินทางปัญญา และ/หรือ สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง
- ตรวจสอบทรัพย์สินทางปัญญาแล้ว มีทรัพย์สินทางปัญญา และ/หรือ สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง

### คณะผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล	ตำแหน่งในโครงการ	สัดส่วนการมีส่วนร่วม	เวลาที่ทำวิจัย (ชั่วโมง/สัปดาห์)
นางสาวนนทพร รัตนจักร์	หัวหน้าโครงการ	50	15
ส.รรัฐ วงศ์แก้วเขียว	ผู้ร่วมวิจัย	25	10
ดร. ชัชวรินทร์ นวลศรี	ผู้ร่วมวิจัย	10	6
อ.ดร. มนตรา ศรีชะแย้ม	ผู้ร่วมวิจัย	5	3
นางสาวอรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์	ผู้ร่วมวิจัย	5	3
ตรีรัตน์ พิทักษ์สืบสกุล	ผู้ร่วมวิจัย	5	3

### คำสำคัญ (ภาษาไทย)

แบคทีเรียกลุ่มแลคติก, โพรไบโอติก, คอลเลสเตอรอล,กล้วย

### คำสำคัญ (ภาษาอังกฤษ)

Lactic acid bacteria, Probiotic, Cholesterol, Banana

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่การวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) คือแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการสลายน้ำตาลเพื่อนำไปผลิตเป็นกรดแลคติก สามารถพบได้ในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ และบริเวณที่มีการเสื่อมสลายของซากพืช หรือแม้แต่ในร่างกายของคนและสัตว์ ปัจจุบันผู้คนได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับ LAB บางสายพันธุ์ ที่สร้างคุณประโยชน์ให้แก่ร่างกายมนุษย์อย่างมาก อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอและเหมาะสม จุลินทรีย์ชนิดนี้จะช่วยปรับความสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ภายในลำไส้ (Fuller R., 1989) รวมถึงสามารถจับบริเวณผิวของเยื่อลำไส้และผลิตสารต้านหรือกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ จึงก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพได้ (Guarner F. et al., 1998) ซึ่งเราเรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มของ LAB ชนิดนี้ว่า โพรไบโอติก (probiotic) โพรไบโอติกส่วนใหญ่ที่เป็นกลุ่ม LAB ประกอบด้วยหลายชนิด ได้แก่ *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* และ *Bifidobacterium* (W.H. et al., 2001) แต่การที่จะได้โพรไบโอติกสายพันธุ์ที่ดี มีประสิทธิภาพตรงตามความต้องการนั้น จำเป็นต้องมีการคัดเลือกและศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญ จากการวิจัยก่อนหน้านี้ที่คณะผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนจาก กองทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประเภททุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัย เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพและคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบในเขตจังหวัดพิษณุโลก (สัญญารับทุนเลขที่ RDI-2-62-02) เนื่องจากกล้วยเป็นผลไม้ที่มีองค์ประกอบของแป้งต้านทาน

การย่อย (resistant starch; RS2) ซึ่งเป็นสารอาหารกลุ่มพรีไบโอติกชนิดหนึ่ง และสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกได้ดี (สุนันทา, 2557) นอกจากนี้ กล้วยเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดใกล้เคียง ผู้วิจัยจึงได้ทำการคัดแยก LAB จากกล้วยน้ำว้าดิบ และสามารถแยกเชื้อ LAB ได้จำนวน 35 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มี 8 ไอโซเลต ที่มีคุณลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม และติดสีแกรมบวก สามารถทนกรด-ด่างได้ที่ 2-9 ทน bile salts 0.5 % และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ รวมถึงมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากคณะผู้วิจัยมีความต้องการที่จะนำ LAB ทั้ง 8 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้นำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งจะต้องมีความปลอดภัย มีประสิทธิภาพสูง รวมถึงมีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลได้ เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยพบปัญหาภาวะคอเลสเตอรอลสูง และมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 56.0 ในปี พ.ศ. 2551 เป็น ร้อยละ 66.4 ในปี พ.ศ. 2557 ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักที่ก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด หากมีภาวะคอเลสเตอรอลสูงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน มักส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยอีกหลายโรค อีกทั้งการมีภาวะคอเลสเตอรอลสูงอย่างต่อเนื่องส่งผลให้เป็นอันตรายทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิต จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมา พบว่าการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมด้านการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ รวมถึงการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ได้จากธรรมชาติเป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่จะช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดให้เกิดประสิทธิภาพได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการทำวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษา LAB ที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลได้ โดยศึกษา 1) ความเป็นพิษที่อาจก่อให้เกิดโรคจากการทดสอบการสร้างสารโปเจนิคเอมีน และ ตรวจสอบที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมที่ทำให้เชื้อ LAB สามารถก่อโรคได้ 2) ศึกษาความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ bile salts hydrolase (BSH) 3) ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารจำลอง 4) ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของ LAB ทั้ง 8 ไอโซเลต และ 5) ศึกษาความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล ทั้งนี้หากได้เชื้อ LAB ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี มีประสิทธิภาพ ไม่สร้างพิษ และสามารถลดคอเลสเตอรอลได้ จะสามารถนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมซินไบโอติกที่ใช้แปงกล้วยเป็นวัตถุดิบ ซึ่งจะเป็นการยกระดับวัตถุดิบของท้องถิ่นเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

## วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบที่มีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกและมีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. ศึกษาความเป็นพิษที่อาจก่อให้เกิดโรคของ LAB ที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบ

#### 1.1 ทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine)

เพาะเลี้ยง LAB ทั้ง 8 ไอโซเลต ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ที่มีไทโรซีน (Tyrosine) 0.1%, Bromocresol purple 0.004% และ Pyridoxal-5-phosphate, B6 0.005% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 72 ชั่วโมง นำเชื้อมา streak บนอาหาร Improved medium บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-10 วัน ตรวจสอบการสร้างไบโอเจนิคเอมีน โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์รอบ ๆ โคลนินของเชื้อ LAB ที่นำมาทดสอบ (Bover-Cid & Holzapfel, 1999)

#### 1.2 การตรวจหายีนเกี่ยวข้องในการก่อโรคของ LAB

การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมทำให้เชื้อ LAB สามารถก่อโรคได้ (Virulent-associated gene) โดยใช้ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ประกอบด้วย cytolysin A (*cytA*) และ gelatinase E (*gelE*) ตามวิธีการ ของ Tan et al, 2013. โดยการสกัด genomic DNA (gDNA) ของเชื้อ LAB ด้วย DNAzol<sup>®</sup> Reagent จากนั้นนำ gDNA ที่ได้ไปทำ PCR โดยใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 1 กับ น้ำยา PCR Master Mix (ExpressGO Premix?) ที่มีองค์ประกอบของ 2x PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> dNTP และ Taq polymerase จากนั้น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นชนิด DNase-free water ให้ได้ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR เป็นจำนวน 30 รอบ และมีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1% ในสารละลาย 1X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 volt เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์และยีนที่ใช้ในการศึกษา

ยีน

ไพรเมอร์ (ลำดับเบสจากด้าน 5' ถึง 3')

ขนาด (bp)

## ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา LAB ที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบ จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งได้มาจากโครงการวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกที่สามารถลดคลอเลสเทอรอลได้ โดยทำการศึกษาดังนี้ 1) ความเป็นพิษของ LAB ทั้ง 8 ไอโซเลต โดยทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine) รวมถึงตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมที่ทำให้เชื้อ LAB สามารถก่อโรคได้ 2) ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase (BSH) 3) ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารจำลอง 4) ทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ และ 5) ทดสอบความสามารถในการลดคลอเลสเทอรอล

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัย ไม่สร้างสารพิษ ทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารได้ สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ดี และสามารถลดคลอเลสเทอรอลได้
2. จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ได้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในทางอุตสาหกรรมอาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้ในอนาคต

## การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน

ด้านวิชาการ

## สถานที่ทำวิจัย

ในประเทศ/ต่างประเทศ	ชื่อประเทศ/จังหวัด	ชื่อสถานที่
ในประเทศ	พิษณุโลก	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
ในประเทศ	ขอนแก่น	ห้องปฏิบัติการปรีคลินิก ภาควิชาจุลชีววิทยา

## แผนการดำเนินงานวิจัย

กิจกรรม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2563												
วางแผนและเตรียมการ	■	■										
ศึกษาความเป็นพิษที่อาจก่อให้เกิดโรคของ LAB ที่คัดแยกได้จากกล้วยน้ำว้าดิบ			■	■	■							
ทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ bile salts hydrolase (BSH)					■							
ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารจำลอง					■	■						
ทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้						■						
ทดสอบความสามารถในการลดคลอเรสเตอรอล						■	■					
วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนรายงาน								■	■			
คณะกรรมการตรวจพิจารณา									■	■		
ร่างบทความส่งตีพิมพ์เผยแพร่ผลการวิจัยลงในวารสารวิชาการระดับชาติ											■	■

## งบประมาณรวมตลอดโครงการวิจัย

รายการ	งบประมาณ
<b>งบดำเนินการ</b>	
ค่าใช้สอย - ค่าลงทะเบียนร่วมงานประชุมวิชาการระดับชาติ	10,000
ค่าตอบแทน - ค่าตอบแทนนักวิจัย	30,000
ค่าวัสดุ - ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์และวัสดุสำนักงาน	10,000
ค่าวัสดุ - ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว	110,000
ค่าวัสดุ - ค่าสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	140,000
<b>รวมงบประมาณ</b>	<b>300,000</b>

## รายละเอียดการจัดซื้อครุภัณฑ์

ข้อมูลครุภัณฑ์	งบประมาณ
<p>ชื่อครุภัณฑ์ :</p> <p>สถานภาพของครุภัณฑ์ในหน่วยงาน :</p> <p>รายละเอียดครุภัณฑ์ :</p> <p>เหตุผลและความจำเป็นต่อโครงการ :</p> <p>การใช้ประโยชน์เมื่อโครงการสิ้นสุด :</p> <p>รายละเอียดของเดิม :</p>	

## ผลสำเร็จ

ปี	ผลสำเร็จที่คาดว่าจะได้รับ	ประเภท
2563	<p>1) เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สามารถลดคลอเลสเทอรอลได้ ไม่สร้างพิษ ทนสภาวะในระบบทางเดินอาหารได้ สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ดี และพร้อมที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม</p> <p>เชิงปริมาณ - อย่างน้อย 1สายพันธุ์</p> <p>เชิงคุณภาพ - มีคุณสมบัติตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 128/2554</p> <p>2) บทความวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ</p> <p>เชิงปริมาณ - 1 เรื่อง</p> <p>เชิงคุณภาพ - ระดับชาติ</p>	Primary Result

ลงนาม

(นางสาวนันทพร รัตนจักร์)

หัวหน้าโครงการ

ลงนาม

(นายสหรัฐ วงศ์แก้วเขียว)

ผู้ร่วมวิจัย

ลงนาม

(ดร.ชัชวินทร์ นวลศรี)

ผู้ร่วมวิจัย

ลงนาม

(อ.ดร.มนตรา ศรีษะแย้ม)

ผู้ร่วมวิจัย

ลงนาม

(นางสาวอรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์)

ผู้ร่วมวิจัย

ลงนาม

(นางสาวตรีรัตน์ พิทักษ์สืบสกุล)

ผู้ร่วมวิจัย

## หัวข้อโครงการ

## ประวัติส่วนตัว :

ชื่อ - นามสกุล นนทพร รัตนจักร์  
Nontaporn Rattanachak  
วัน/เดือน/ปีเกิด  
หน่วยงาน มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม  
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก  
โทรศัพท์/โทรสาร  
มือถือ 0894211165  
อีเมล Nontaporn19@gmail.com



## การศึกษา :



## ผู้ร่วมวิจัย

## ประวัติส่วนตัว :

ชื่อ - นามสกุล

สหรัฐ วงศ์แก้วเขียว

Saharut Wongkaewkhiaw



วัน/เดือน/ปีเกิด

หน่วยงาน

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

โทรศัพท์/โทรสาร

มือถือ

0840509823

อีเมล

saharut.w@hotmail.com

## การศึกษา :

## ผู้ร่วมวิจัย

## ประวัติส่วนตัว :

ชื่อ - นามสกุล	ชัชวินทร์ นวลศรี
	Chatchawin Nualsri
วัน/เดือน/ปีเกิด	14 กันยายน 2529
หน่วยงาน	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก	พหลโยธิน ต.ตากฟ้า อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ 60190
โทรศัพท์/โทรสาร	055267000 ต่อ 5306
มือถือ	0869256168
อีเมล	chatchawin.n@gmail.com



chatchawin\_ns

## การศึกษา :

พ.ศ. 2551	ปริญญาตรี เทคโนโลยีเครื่องกล มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี
พ.ศ. 2554	ปริญญาโท พลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยนเรศวร
พ.ศ. 2559	ปริญญาเอก เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



## ผู้ร่วมวิจัย

## ประวัติส่วนตัว :

ชื่อ - นามสกุล	อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์ Arunluk Chodnakarin
วัน/เดือน/ปีเกิด	5 สิงหาคม 2526
หน่วยงาน	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม เลขที่ 156 หมู่ 5 ต.พลาญชุมพล อ.เมือง จ.พิษ 65000
โทรศัพท์/โทรสาร	
มือถือ	089-272-3526
อีเมล	Siriangkanakun@gmail.com



## การศึกษา :

พ.ศ. 2549	ปริญญาตรี อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร
พ.ศ. 2556	ปริญญาเอก เทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## ผู้ร่วมวิจัย

## ประวัติส่วนตัว :

ชื่อ - นามสกุล

ตรีรัตน์ พิทักษ์สืบสกุล

TREERATH PHITAKSUEBSAKUL



วัน/เดือน/ปีเกิด

หน่วยงาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

โทรศัพท์/โทรสาร

มือถือ

0661426646

อีเมล

treerath\_nat@hotmail.com

## การศึกษา :