

การศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของ *Lactobacillus plantarum* BL60a ที่แยกจาก อาหารหมักเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพ

Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* BL60a isolated from fermented food for functional food applications

Received:	July	12, 2019
Revised:	October	3, 2019
Accepted:	October	7, 2019

รัชณู เมยดง (Ratchanu Meidong)*

เสาวนิต ทองพิมพ์ (Saowanit Tongpim)**

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีอาหารหมักหลากหลายชนิดที่มีรายงานว่ามีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจากอาหารหมักของไทย โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมด 162 ไอโซเลตแยกมาจากตัวอย่างอาหารหมักของไทย 60 ตัวอย่าง โดยจากไอโซเลตเหล่านี้พบว่าไอโซเลต BL60a ถูกคัดเลือกว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์เนื่องจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบซึ่งได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* ได้ดี ทนต่อสภาวะจำลองในกระเพาะอาหาร (pH 2.5, เพปซินร้อยละ 0.3) และสภาวะจำลองในลำไส้ (pH 8.0, แพนครีเอตินร้อยละ 0.1, เกลือน้ำดีร้อยละ 0.3) ทั้งนี้ยังพบว่าไอโซเลตนี้ยังสามารถเกาะกับมิวซินได้สูง (ร้อยละ 75.8) ยิ่งกว่านั้นไอโซเลต BL60a ยังมีความไวต่อยาปฏิชีวนะและไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ถูกจัดจำแนกบนพื้นฐานของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต BL60a และความสัมพันธ์ใน phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* BL60a มีข้อบ่งชี้ที่แสดงถึงคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่ประกอบด้วยกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค การทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกในลำไส้ (มิวซิน) และความปลอดภัย การตรวจสอบคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่เป็นไปได้ของ *L. plantarum* BL60a น่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพได้

คำสำคัญ : โพรไบโอติกส์ แบคทีเรียกรดแล็กติก การเกาะ

* อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Lecturer in Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Corresponding author, ratchanu.me@bsru.ac.th

** อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Associate Professor, Faculty of Science, Khon Kaen University, saoton@kku.ac.th

Abstract

There are many traditional fermented foods in Thailand, which were reported that lactic acid bacteria (LAB) are the main group of microorganisms with probiotic properties. The objective of this study was to evaluate the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented foods. A total of 162 LAB isolates were isolated from 60 samples of Thai traditional foods. Among these isolates, BL60a was selected as a candidate for probiotics because of its excellent exhibition of antimicrobial activity against pathogens tested which were both gram positive and gram negative bacteria including *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* and tolerance to simulated gastric juice (pH 2.5; 0.3% pepsin) for 3 and simulated intestinal juice (pH 8.0, 0.1% pancreatin, 0.3% bile salt) for 6 h. In addition, the isolate showed a high mucin-adhesion ability (75.8%). Moreover, isolate BL60a showed susceptibility to all antibiotics tested and no blood hemolysis. This bacterial isolate was identified based on cell morphology and 16S rDNA sequence and relationship in the phylogenetic tree revealed that the isolate BL60a was closely related to *Lactobacillus plantarum*. The results obtained in the present study demonstrated that *L. plantarum* BL60a was evidenced for the probiotic characteristics including antimicrobial activity, tolerance to gastrointestinal tract condition, mucin-adhesion ability and safety. The investigation of the potential probiotic features of *L. plantarum* BL60a should be useful for the application in functional foods.

Keyword: Probiotics Lactic acid bacteria Adhesion

บทนำ

ในปัจจุบันผู้คนให้ความสนใจกับอาหารที่รับประทานมากขึ้นอันเนื่องมาจากความใส่ใจในด้านความสำคัญของอาหารที่รับประทานและผลที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพ อาหารที่ส่งผลดีต่อสุขภาพนี้เรียกว่าอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ซึ่งมีการคาดการณ์ว่าอาหารเพื่อสุขภาพมีอัตราการผลิตและความความต้องการเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี (Bimbo et al., 2017) โดยอาหารเพื่อสุขภาพนั้นต้องเป็นอาหารกลุ่มที่มีลักษณะดังนี้ได้แก่ มีคุณประโยชน์เพิ่มสูงขึ้น มีเส้นใยในองค์ประกอบของอาหารมากขึ้น มีวิตามิน แร่ธาตุและสารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น รวมทั้งการมีองค์ประกอบของโพรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์ เป็นต้น จากที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์นั้นจัดว่าเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยในกลุ่มอาหารสุขภาพที่มีโพรไบโอติกส์นั้นเมื่อรับประทานแล้วต้องสามารถปรับปรุงให้ร่างกายของผู้บริโภคดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (Kechagia et al., 2013)

แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. จัดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์เพื่อใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพ (Ding et al., 2017; Freire et al., 2017; Kantachote et al., 2017) จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ได้ถูกให้คำนิยามว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยทั่วไปจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ ซึ่งจะต้องได้รับในปริมาณที่เหมาะสม (FAO/WHO, 2006) จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพโดยมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยการสร้างกรดอินทรีย์และการสร้างสารแบคทีริโอซินออกมายับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านั้น (Hwanhlem et al., 2017) อีกทั้งความสามารถในการแข่งขันการเข้าเกาะที่เยื่อบุผนังลำไส้กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเข้าเกาะได้หรือเรียกว่าความสามารถในการแข่งขันการเข้าเกาะที่เยื่อบุผนังลำไส้ (Candela et al., 2008) รวมถึงโพรไบโอติกส์นั้นต้องสามารถทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารได้ (Huang & Adams, 2004) และมีความปลอดภัยได้แก่ความไวต่อยาปฏิชีวนะและไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เป็นต้น (Isa & Razavi, 2017)

รายงานวิจัยหลายงานพบว่าหลายสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถแยกได้จากอาหารหมักประเภทต่าง ๆ (Klayraung et al., 2008; Ghosh et al., 2015; Ding et al., 2017) ซึ่งในประเทศไทยมีอาหารหมักท้องถิ่นอยู่หลายประเภทกระจายอยู่ในหลายจังหวัด จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างอาหารหมักที่มีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโพรไบโอติกส์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจเพื่อที่จะแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักของไทยที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกส์เพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างอาหารหมัก

ในการแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ดัดแปลงวิธีมาจากงานของ Hwanhlem et al. (2017) โดยตัวอย่างอาหารหมักซื้อมาจากตลาดต่าง ๆ ในจังหวัดสุพรรณบุรี สมุทรสาครและกรุงเทพฯ โดยนำตัวอย่างอาหารหมักปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางและกระจายเชื้อ (spread) บนอาหาร de Man Rogosa and Sharpe (MRS; Biomerieux, France) ที่ผสม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 (w/v) (MRS-CaCO_3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเลือกโคโลนีที่ปรากฏขึ้นในสไลด์และสังเกตลักษณะที่แตกต่างกันไปเลี้ยงลงบนอาหาร MRS-CaCO_3 อีกครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีที่บริสุทธิ์และเก็บใน glycerol ร้อยละ 20 ที่ตู้แช่แข็ง -80°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ทั้งนี้ตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติกเบื้องต้นได้แก่ การไม่สร้างเอนไซม์เคตาเลสโดยทดสอบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 และย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะเซลล์และการติดสีแกรม

ศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรค

นำแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลตเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C ด้วยเครื่องเหวี่ยงปั่นแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น MPW- 352R (Gibthai, Bangkok, Thailand) เพื่อเก็บส่วนใส (supernatant) จากนั้นปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วย 2 N NaOH เพื่อป้องกันผลที่มาจากกรดอินทรีย์แล้วนำไปเติมเอนไซม์คเคตาเลส (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เซลล์สร้างออกมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด pore size 0.45 ไมโครเมตร โดยส่วนนี้เรียกว่า neutralized cell free supernatant (NCFS) แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร Mueller Hinton Broth (Himedia, India) และบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland หมายเลข 0.5 และเติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริมาตร 100 μ l (1×10^7 CFU/ml) ลงในอาหาร Mueller Hinton agar หลอมเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเทราดบน Mueller Hinton agar รอให้อาหารแข็ง จากนั้นเจาะหลุมด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และหยด NCFS ลงในหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดความกว้างของโซนใสที่แสดงความสามารถในการยับยั้ง (Hwanhlem et al., 2017)

ทดสอบการทนต่อสภาวะจำลองของทางเดินอาหาร

ทดสอบการทนต่อสภาวะจำลองในทางเดินอาหารตามวิธีของ Huang & Adams, (2004) โดยเตรียมสารละลายสภาวะจำลองในกระเพาะประกอบด้วยเอนไซม์เพปซิน (pepsin; Sigma, USA) ในสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.5 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3 g/l และปรับให้มีค่ากรด-ด่างเท่ากับ 2.0 ด้วย 2 N HCl ส่วนสารละลายสภาวะจำลองในลำไส้ประกอบด้วยเอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin; Sigma, USA) ในสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.5 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 g/l และเติมเกลือน้ำดี (Bile salt) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย 2.5 N NaOH ในการทดสอบเริ่มจากเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกใน MRS broth และเตรียมเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและแขวนลอยตะกอนเซลล์ด้วย PBS (pH 7.2)

ทดสอบการทนต่อสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารโดยนำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแล็กติกมา 1 มิลลิลิตร (1×10^8 CFU/ml) เติมนลงในสารละลายทดสอบปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และตรวจการรอดชีวิตของเชื้อหลังบ่มที่เวลา 0, 60, 120 และ 180 นาที ในขณะที่การทดสอบการทนต่อสภาวะจำลองในลำไส้ใช้น้ำใช้เซลล์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร (1×10^8 CFU/ml) เติมนลงในสารละลายทดสอบปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และตรวจการรอดชีวิตของเชื้อหลังบ่มที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 6 ชั่วโมง ในการตรวจการรอดชีวิตใช้วิธี plate count technique ด้วยอาหาร MRS-CaCO₃ โดยการรอดชีวิตของแบคทีเรียนำเสนอโดยคำนวณร้อยละการรอดชีวิตดังนี้

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = (\log \text{จำนวนเซลล์รวมหลังทดสอบที่เวลาต่างๆ} \div \log \text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}) \times 100$$

ทดสอบความสามารถในการเกาะ

ทดสอบความสามารถในการเกาะของแบคทีเรียกรดแล็กติกตามวิธีของ Tallon et al. (2007) โดยตัดแปลงบางส่วน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้แบคทีเรีย *L. plantarum* 299v ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการเกาะที่เยื่อลำไส้ได้ดีเป็นเชื้ออ้างอิงในการทดสอบ เริ่มจากเตรียมสารละลายมิวซิน (Sigma, USA) เพื่อใช้ในการศึกษาที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใน PBS (pH 7.2) ในการเตรียมแบคทีเรียสำหรับทดสอบการเกาะติดกับมิวซินจะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกใน MRS broth ที่ผสมสารละลายมิวซินร้อยละ 0.1 และเตรียมเซลล์ทดสอบโดยปรับให้เซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกมีความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นเติมเซลล์ลงใน microtiter 96 MicroWell™ plates (Nunc, Denmark) ที่เคลือบมิวซินไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 μ l จำนวน 12 ครั้ง เพื่อล้างแบคทีเรียที่ไม่เกาะออก หลังจากนั้นเติม PBST (PBS ที่ผสม tween 20 ร้อยละ 0.05) ปริมาตร 200 μ l ลงไปในแต่ละหลุมก่อนนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียในแต่ละหลุมไปทำการเจือจางเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะกับมิวซิน ด้วยเทคนิค spread plate ลงบนอาหาร MRS-CaCO₃ รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อหลุม (CFU/well) และหาร้อยละการเกาะติด [%Adhesion = (จำนวนเซลล์ที่เกาะต่อหลุม ÷ จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อหลุม) × 100] ในการทดลองนี้แต่ไอโซเลตจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกลงบนอาหาร Blood agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 5 (Biomerieux, France) และบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วตรวจผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยดูลักษณะที่ปรากฏอยู่รอบๆโคโลนีของเชื้อ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบได้แก่ แบบที่หนึ่ง คือ β -hemolysis เกิดโซนใสรอบๆโคโลนีของแบคทีเรีย แบบที่สอง คือ α -hemolysis เกิดสีเขียวบริเวณรอบโคโลนีของแบคทีเรีย แบบที่สาม คือ γ -hemolysis ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบนอาหาร blood agar (Lee et al., 2017)

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ในการทดสอบทำตามวิธีของ Meidong et al. (2018) แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะนี้คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยยาปฏิชีวนะ (Oxoid, England) ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ penicillin G (10U), vancomycin (30 μ g), tetracycline (30 μ g), gentamycin (10 μ g), erythromycin (15 μ g), chloramphenicol (30 μ g) และ streptomycin (10 μ g) ในการเตรียมเชื้อก่อนการทดสอบนั้นเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ในอาหาร Mueller Hinton broth บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ขณะที่แบคทีเรียกรดแล็กติกเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเชื้อทั้งหมดก่อนนำไปทดสอบจะปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland หมายเลข 0.5 การเตรียมจานอาหารที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยดูดเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ปริมาตร 20 μ l ลงในอาหาร Mueller Hinton agar หลอมเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเทราดบน Mueller Hinton agar รอให้แข็งก่อนวางแผ่นยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดบนจานอาหาร ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกนั้นใช้เชื้อปริมาตร 20 μ l ลงในอาหาร MRS agar หลอมเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเทราดบน MRS agar รอให้แข็งก่อนวาง antibiotic disc บ่มที่ 35°C หลัง 18 ชั่วโมงของการบ่ม จะตรวจสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone รอบ antibiotic disc ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดนำไป

เปรียบเทียบผลแล้วรายงานในเทอมของ resistant (R), moderately susceptible (MS) และ susceptible (S) (NCCLS, 1997)

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

จำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลต BL60a โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ร่วมกับการจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยเพิ่มจำนวนยีนที่บริเวณ 16S rRNA gene ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1500R (5'-GTTACCTTGTACGACTT-3') (Brosius et al., 1981) โดยผลิตผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้ไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และ EzTaxon server และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016).

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ทุกการทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way Analysis of Variance: ANOVA) ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลอง

ผลการแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างอาหารหมัก

ในงานนี้แยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างอาหารหมักจำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียที่มีคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งประกอบด้วยการเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน และไม่สร้างเอนไซม์เคตาเลส ได้ทั้งสิ้นจำนวน 162 ไอโซเลต

ผลการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรค

คุณสมบัติแรกที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแล็กติกในการเป็นโปรไบโอติกส์คือความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยจากการทดลองพบว่าจากแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมด 162 ไอโซเลต พบว่ามีทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ BL2a, BL5c, BL13a, BL22d, BL38e, BL43b, BL47a, BL55b, BL58a และ BL60a ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 เชื้อ (*E. coli*, *S. enterica* serovar Typhi, *P. aeruginosa* และ *B. cereus*) ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่า ไอโซเลต BL38e สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้สูงที่สุด (17.33 มิลลิเมตร) ขณะที่ไอโซเลต BL60a สามารถยับยั้ง *S. enterica* serovar Typhi, *P. aeruginosa* และ *B. cereus* ได้สูงที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 21.48 มิลลิเมตร 14.71 มิลลิเมตรและ 22.36 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยทั้ง 10 ไอโซเลตนี้ได้นำไปศึกษาต่อไป

ทดสอบความสามารถรอดชีวิตในสภาวะจำลองของทางเดินอาหาร

คุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่ศึกษาต่อคือความสามารถรอดชีวิตเมื่ออยู่ในทางเดินอาหาร โดยความสามารถของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและสภาวะจำลองของลำไส้แสดงในภาพที่ 1 พบว่าหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมงในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 10 ไอโซเลต มีการรอดชีวิตที่ต่างกันที่ร้อยละ 8.73 ถึงร้อยละ 80.30 โดยไอโซเลตที่มีร้อยละการรอดชีวิตสูงสุดคือ BL60a ทั้งนี้จากการทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแล็กติกในสภาวะจำลองของลำไส้ โดยหลังจาก 6 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีการรอดชีวิตที่ต่างกันอยู่ระหว่างร้อยละ 23.54 ถึงร้อยละ 91.20 โดยไอโซเลตที่รอดชีวิตสูงสุดคือ BL60a คุณสมบัติในการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแล็กติกนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากการยืนยันว่าโพรไบโอติกส์สายพันธุ์นั้น ๆ จะสามารถรอดชีวิตในทางเดินอาหารได้นานพอที่จะก่อประโยชน์ให้กับโฮสต์ได้

ตารางที่ 1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนในการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhi	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>
BL2a	12.96 ± 0.33 ^a	10.16 ± 0.26 ^a	13.77 ± 0.12 ^{de}	20.04 ± 0.23 ^f
BL5c	13.36 ± 0.50 ^a	12.22 ± 0.51 ^{bc}	10.46 ± 0.36 ^a	18.41 ± 0.52 ^e
BL13a	14.20 ± 0.48 ^b	9.54 ± 0.48 ^a	11.36 ± 0.37 ^b	18.26 ± 0.27 ^e
BL22d	15.21 ± 0.48 ^{cd}	13.36 ± 0.49 ^{cd}	13.38 ± 0.59 ^{de}	15.18 ± 0.34 ^d
BL38e	17.33 ± 0.43 ^f	14.25 ± 0.56 ^d	10.20 ± 0.48 ^a	13.55 ± 0.20 ^{cd}
BL43b	17.15 ± 0.35 ^f	16.24 ± 0.65 ^e	12.39 ± 0.45 ^c	13.75 ± 0.50 ^{bc}
BL47a	16.20 ± 0.18 ^e	14.28 ± 0.82 ^d	12.19 ± 0.68 ^{bc}	13.45 ± 0.53 ^{bc}
BL55b	15.96 ± 0.38 ^{de}	11.72 ± 0.91 ^b	12.44 ± 0.96 ^c	10.34 ± 0.55 ^a
BL58a	14.88 ± 0.88 ^{bc}	20.06 ± 0.71 ^f	11.32 ± 0.61 ^b	12.61 ± 0.97 ^b
BL60a	14.28 ± 0.44 ^b	21.48 ± 0.43 ^g	14.71 ± 0.45 ^e	22.36 ± 0.61 ^g

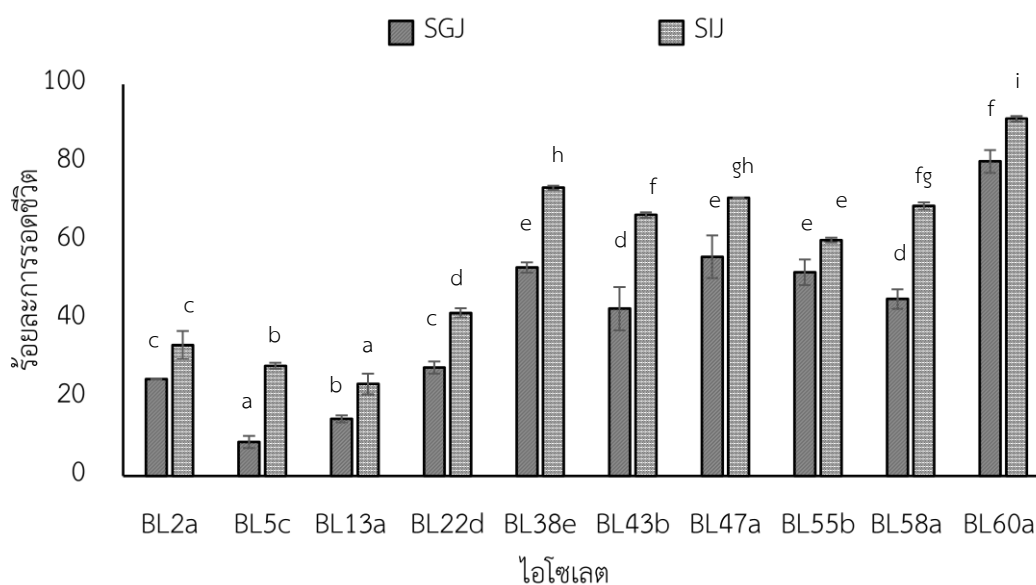
ตัวอักษรตัวยกที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ทดสอบความสามารถในการเกาะ

จากการทดลองนี้พบว่าทั้ง 10 ไอโซเลตสามารถเกาะที่ผิวซินได้แตกต่างกันโดยไอโซเลต BL2a มีร้อยละการเกาะที่ผิวซินน้อยสุดที่ร้อยละ 5.33 ส่วนไอโซเลตที่เกาะที่ผิวซินสูงสุดคือ BL60a โดยเกาะที่ร้อยละ 75.80 ในขณะที่ *L. plantarum* 299v ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้อ้างอิงในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เกาะที่ผิวซินได้ถึงร้อยละ 97.73 โดยผลที่ได้แสดงในภาพที่ 2

การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ศึกษาทั้ง 10 ไอโซเลตไม่พบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง นั้นแสดงให้เห็นถึงว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ ในขณะที่ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 10 ไอโซเลตมีความไวต่อยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน ทั้งนี้ยังพบว่าไอโซเลต BL58a และ BL60a ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ ซึ่งการที่แบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่คัดเลือกมีความไวต่อยาปฏิชีวนะนั้นเป็นคุณลักษณะที่ดีของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ เนื่องจากการบ่งชี้เบื้องต้นว่าสายพันธุ์นั้นไม่มียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่อาจไปส่งต่อให้แบคทีเรียในทางเดินอาหารได้



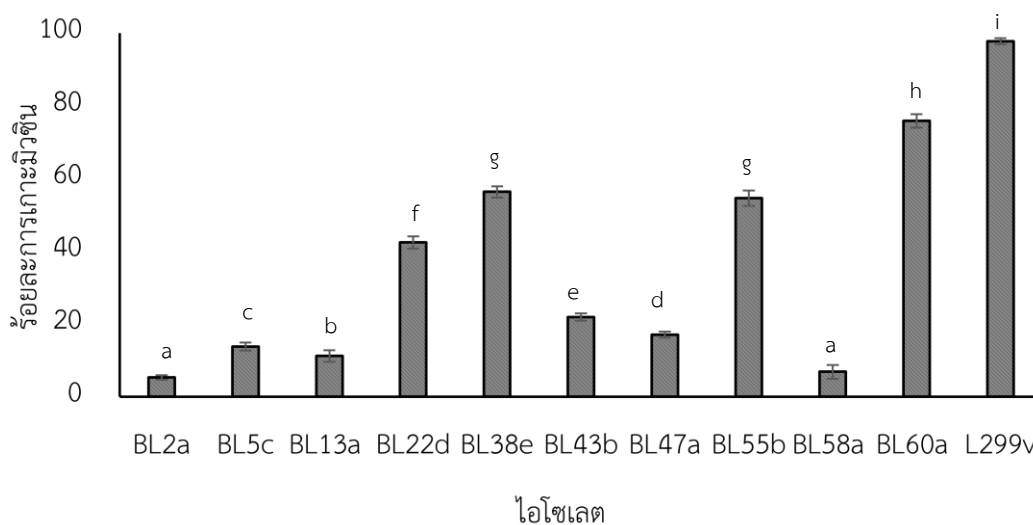
ภาพที่ 1 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลตเมื่อทดสอบในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (SGJ) และในสภาวะจำลองของลำไส้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (SIJ) ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

ทางคณะผู้วิจัยเลือกไอโซเลต BL60a ไปศึกษาต่อ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยการมีกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร ความสามารถในการเกาะติดที่ผิวซิน การไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและความไวต่อยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าไอโซเลต BL60a เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส เมื่อวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA (1498 bp) พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *L. plantarum* ที่ร้อยละความเหมือน 99.93 โดย phylogenetic tree ของไอโซเลต BL60a แสดงในภาพที่ 3 และ Genbank accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลตนี้มี คือ MN088763

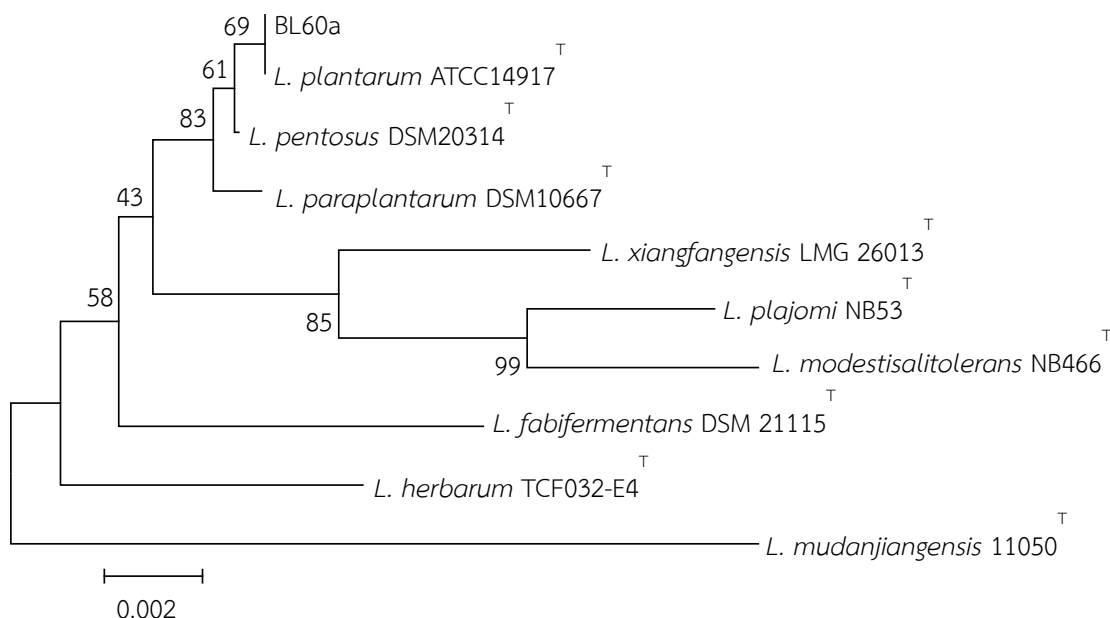
วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียโพรไบโอติกส์มีประโยชน์มากโดยปัจจุบันได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในด้านการเป็นอาหารเพื่อสุขภาพในมนุษย์ (Shekh et al., 2016; Kantachote et al., 2017) เสริมในอาหารสุกร (Nopparatmaitree et al., 2018) อาหารแพะ (Seesawhea et al., 2017) และเสริมในอาหารสำหรับเพาเลียงปลา (Meidong et al., 2018) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการส่งเสริมสุขภาพ และการเจริญเติบโตที่ดี ในการจะพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพที่มีส่วนประกอบจากแบคทีเรียโพรไบโอติกส์นั้น จำเป็นที่จะต้องทำการคัดเลือกจากแหล่งที่เหมาะสม โดยอาหารหมักได้หลายชนิดได้มีรายงานว่าสามารถแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพที่ดี ได้ ดังที่มีรายงานไว้ในงานว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. และ *Lactococcus* spp. ที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ได้ถูกแยกมาจากนํ้านมหมักแบบจีน (Ding et al., 2017) ทั้งนี้ในงานของ Vinothkanna & Sekar (2019) ได้รายงานการแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์จากพืชสมุนไพรที่อยู่ในระหว่างการหมักซึ่งได้โพรไบโอติกส์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมานี้บ่งชี้ได้ว่าอาหารหมักเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการแยกโพรไบโอติกส์ ซึ่งสามารถแยกโพรไบโอติกส์ได้หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ได้จากอาหารหมักเช่นกัน โดย *L. plantarum* BL60a เป็นสายพันธุ์ที่แยกมาจากหนมหมูซึ่งเป็นอาหารของหมักชนิดหนึ่งของไทยที่ได้รับความนิยมรับประทานและนำไปปรุงอาหารหลากหลายเมนู



ภาพที่ 2 ความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแล็กติกต่อมิวซิน ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์หลายชนิดอันได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ และไวรัส แต่ทั้งนี้ในทางเดินอาหารของคนที่มีสุขภาพดีนั้นต้องมีสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่สูงเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เจริญจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ (Korpela et al., 2018) ในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นจึงมีความสำคัญมาก โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้เนื่องจากกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญ โดยในงานวิจัยนี้แบคทีเรียกรดแล็กติก *L. plantarum* BL60a มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวก (*B. cereus*) และแกรมลบ (*E. coli*, *S. enterica* serovar Typhi และ *P. aeruginosa*) ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นที่สนใจในการศึกษาในงานวิจัยอื่นๆ เช่น ในงานของ Lee & Chang, (2018) ได้แยก *B. subtilis* NS7 จากอาหารหมักที่ทำจากถั่วเหลืองพบว่าสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*S. enterica* serovar Typhi, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Vibrio parahaemolyticus*) รวมถึงในงานของ Hwanhlem et al, (2017) แยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างทางเดินอาหารของไก่และคุณสมบัติแรกที่ทดสอบคือการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และในงานของ Tipsing et al. (2019) รายงานผลของ *B. megaterium* BB60a ที่แยกมาจากอาหารหมักกว่าสร้างสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้จะช่วยให้สามารถประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินได้กว้างและเป็นที่ต้องการเนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลากหลายนั่นเอง



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต BL60a เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp.

การที่โพรไบโอติกส์จะทำงานได้ดีและก่อประโยชน์ให้กับโฮสต์ได้นั้น จำเป็นจะต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านทางเดินอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งด่านแรกคือสภาวะที่มีเอนไซม์และความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (pH 1- pH 4) (Nardone & Compare, 2015) และเมื่อโพรไบโอติกส์ผ่านจากกระเพาะอาหารแล้วต้องอาศัยอยู่ในลำไส้ที่มีเอนไซม์แพนক্রีเอติน เกลื่อน้ำดี และค่า pH 8.0 โดยคุณสมบัตินี้เป็นเกณฑ์สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่นักวิจัยให้ความสำคัญ ดังตัวอย่างในงานของ García et al. (2017) ได้ศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของ *L. fermentum* UCO-979C ที่แยกมาจากกระเพาะของมนุษย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกส์เพื่อสุขภาพในมนุษย์ โดยคุณสมบัติหนึ่งที่ผู้วิจัยได้ให้ความสำคัญคือการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารซึ่งโพรไบโอติกส์สายพันธุ์นี้สามารถทนความเป็นกรดได้ถึง pH 2.0 และทนสภาวะที่มีเกลื่อน้ำดีที่ร้อยละ 2.0 ได้ ซึ่งในงานนี้ *L. plantarum* BL60a สามารถทนเอนไซม์เพปซินและความเป็นกรดที่ pH 2.5 อีกทั้งทนต่อเอนไซม์แพนক্রีเอตินและ pH 8.0 แต่อย่างไรก็ตามทั้งนี้จำเป็นต้องทดสอบต่อในระดับ *in vivo* ของสัตว์ทดลองเพิ่มเติมเพื่อผลที่แน่นอน

ตารางที่ 2 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดลอก 10 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ยาปฏิชีวนะ						
	P	V	T	G	E	C	S
BL2a	S	R	S	S	R	S	R
BL5c	S	R	S	S	R	S	R
BL13b	S	R	S	S	S	MS	S
BL22c	S	S	R	R	S	S	R
BL38e	S	R	S	S	R	S	S
BL43b	S	S	S	S	R	S	S
BL47a	S	S	S	S	R	S	S
BL55b	S	R	S	S	MS	S	S
BL58a	S	S	S	S	S	S	S
BL60a	S	S	S	S	S	S	S

หมายเหตุ: P, penicillin G (10U); V, vancomycin (30 µg); T, tetracycline (30 µg); G, gentamycin (10µg); E, erythromycin (15 µg); C, chloramphenicol (30 µg); S, streptomycin (10 µg)
S: susceptible; MS: moderately susceptible; R: resistant (NCCLS, 1997)

คุณสมบัติต่อมาของโพรไบโอติกส์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากคือคุณสมบัติในการเกาะที่เยื่อลำไส้ของโฮสต์ เซลล์เยื่อผิวของทางเดินอาหารถูกปกคลุมด้วยชั้นของเมือกที่ช่วยปกป้องเยื่อผิวจากความเสียหายและปกป้องจากเชื้อโรค อีกทั้งบริเวณนี้ยังมีสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้ การที่จะศึกษาการเกาะของโพรไบโอติกส์ในสิ่งมีชีวิตเป็นเรื่องที่มีความซับซ้อน (García et al., 2017) อีกวิธีหนึ่งของการศึกษาคือตรวจการเกาะที่มีวชิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เคลือบที่เยื่อผนังลำไส้ของสิ่งมีชีวิต โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *L. plantarum* BL60a ถูกศึกษาความสามารถในการเกาะกับมีวชินเช่นกันและพบว่ามีย่อยละการเกาะที่สูง โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้ได้ผลดังเช่นในงานวิจัยของ Boricha et al. (2019) ศึกษาการเกาะของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ศึกษามีความสามารถในการเกาะที่มีวชินได้ดี อีกทั้งในงานของ Shekh et al. (2016) ได้ศึกษาความสามารถในการเกาะที่มีวชินของสายพันธุ์ *L. pentosus* CHIG และ *L. pentosus* NAG1 ซึ่งแยกได้จากผลไม้ พบว่ามีความสามารถในการเกาะที่มีวชินได้สูงจึงถูกคัดเลือกไปใช้ในการศึกษาต่อจากที่กล่าวมานี้จะเห็นความสามารถในการเกาะนั้นเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญมากที่นักวิจัยให้ความสำคัญและวิธีการทดสอบกับมีวชินนั้นเป็นอีกวิธีที่มีความเหมาะสมและเป็นที่ยอมรับในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์เพื่อใช้ต่อไป

ในการศึกษาด้านความปลอดภัยของการใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกส์พบว่า *L. plantarum* BL60a มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบซึ่งได้ผลเหมือนดังในงานวิจัยที่มีรายงานไว้ของนักวิจัยหลายท่าน ตัวอย่างเช่นในงานของ Gunyakti & Asan-ozusaglam, (2019) รายงานว่า *L. gasseri* สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำนมมนุษย์มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides (kanamycin และ gentamicin) และ กลุ่มควิโนโลน (nalidixic acid และ ofloxacin) และอีกคุณสมบัติที่ต้องตรวจสอบคือการที่โพรไบโอติกส์สายพันธุ์นั้นๆ จะถือว่ามีความปลอดภัยต้องไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยคุณสมบัติข้อนี้เป็นเกณฑ์สำคัญข้อหนึ่งที่ต้องตรวจสอบ โดยมีรายงานการวิจัยหลายงานที่ได้ทำการทดสอบโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เช่นสายพันธุ์ *L. gasei* (Gunyakti et al., 2019) *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. และ *Lactococcus* spp. (Ding et al., 2017) และกลุ่ม *Bacillus* spp. (Lee et al., 2017; Vinothkanna & Sekar, 2019) โดยในงานวิจัยนี้สายพันธุ์ที่ศึกษาได้ทำการตรวจสอบและพบว่าไม่ย่อยสลายเม็ดแดงเช่นกัน โดยรวมแล้วจากคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่แยกได้ซึ่งมีความไวต่อยาปฏิชีวนะและไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจึงถือว่าเป็นเชื้อโพรไบโอติกส์ที่มีความปลอดภัยเหมาะแก่การนำไปใช้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

อาหารหมักเป็นแหล่งของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ ในงานวิจัยนี้แยกเชื้อที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ได้คือ *L. plantarum* BL60a จากแหนมหมู โดยเชื้อมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่ดีประกอบด้วย การมีกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบบกว้างทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารทั้งในสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารและสภาวะจำลองในลำไส้ ความสามารถในการเกาะกับมิวซินซึ่งบ่งชี้ว่าสามารถเกาะในเยื่อเมือกในลำไส้ได้ และมีความปลอดภัยเนื่องจากไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จากผลการทดสอบที่กล่าวมานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า *L. plantarum* BL60a มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ที่จะใช้ในการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จได้เนื่องจากการได้รับทุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา (RDG60A00180)

References

- Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., Nardone, G., De Devitiis, B. & Carlucci, D. (2017). Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. *Appetite*, 113, 141–154.
- Boricha, A.A., Shekh, S.L., Pithva, S. P., Ambalam, P.S., & Manuel Vyas, B.R. (2019). *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. *LWT - Food Science and Technology*, 106, 201–208.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. & Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148, 107-127.
- Candela, M., Biagi, E., Turrone, S., Vitali, B. & Brigidi, P. (2008). Mechanisms involved in the intestinal interaction between host and bifidobacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20(4), 189-192.
- Ding, W., Shi, C., Chen, M., Zhou, J., Long, R. & Guo, X. (2017). Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, 32, 324–332.
- FAO/WHO. (2006). Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional Paper. No. 85 (Rome:WHO/FAO).
- Freire, A.L., Ramos, C.L., da Costa Souza, P.N., Cardoso, M.G.B. & Schwan, R.F. (2017). Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 39–46.
- García, A., Navarroa, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., Henríquez, K., Karlyshev, A., Villenae J. & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 75-83.
- Ghosh, K., Ray, M., Adak, A., Halder, S.K., Das, A., Jana, A. & Mondal, K.C. (2015). Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage. *Bioresource Technology*, 188, 161–168.
- Gunyakti, A. & Asan-ozusaglam, M. (2019). *Lactobacillus gasseri* from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 261–269.

- Huang, Y. & Adams, M.C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 253-260.
- Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y. & Haertle, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*, 78, 187–195.
- Isa, J.K. & Razavi, S.H. (2017). Characterization of *Lactobacillus plantarum* as a potential probiotic in vitro and use of a dairy product (yogurt) as food carrier. *Applied Food Biotechnology*, 4(1), 11–18.
- Kantachote, D., Ratanaburee, A., Hayisama-ae, W., Sukhoom, A. & Nunkaew, T. (2017). The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. *Journal of Functional Foods*, 32, 401–408.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N. & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *Hindawi Publishing Corporation ISRN Nutrition Article ID 481651*, 1-7.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J., & Okonogi, S. (2008). Probiotic properties of lactobacilli isolated from Thai traditional food. *Scientia Pharmaceutica*, 76(3), 485–503.
- Korpela, K., Salonen, A., Vepsäläinen, O., Suomalainen, M., Kolmeder, C., Varjosalo, M., & de Vos, W.M. (2018). Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. *Microbiome*, 6(1), 182.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Lee, S., Lee, J., Jin, Y.I., Jeong, J.C., Chang, Y.H., Lee, Y., Jeong, Y. & Kim, M. (2017). Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 518-524.
- Lee, S.G. & Chang, H.C. (2018). Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 8-15.
- Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K. & Tongpim, S. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy

- hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*. *Fish and Shellfish Immunology*, 73, 1–10.
- Nardone, G. & Compare, D. (2015). The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterology Journal*, 3, 255-260.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1997). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Approved standard M2-A7. 6th ed*, Wayne, PA.: National Committee.
- Nopparatmaitree, M., Banglarp, N., Thongprasong, T., Siribut, T., Jieoyee, S., Phueknern, I., Sri-Onlerd, J. & Kitpipit, W. (2018). Effect of multi-probiotics supplementation in diets on apparent nutrient digestibility, intestinal microbiota and histomorphology of weaned pigs. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 5(3), 120-138.
- Seesawhea, Y., Saenphoom, P., Chaokaur, P., Chimtong, S., Bureenok, S. & Prajukboonjatsada, S., (2017). Nutritional improvement of corn peel silage using fermented juice from epiphytic lactic bacteria (FJLB), nutrients digestibility and growth. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 4(5), 144-156.
- Shekh, S.L., Dave, J.M. & Vyas, B.R.M. (2016). Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production. *LWT Food Science and Technology*, 74, 234-241.
- Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P. & Urdaci, M.C. (2007). Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 442–451.
- Tipsing, S., Tongpim, S. & Meidong, R. (2019). Screening of bacteriocin-producing bacillus against fish pathogens from fermented foods and preliminary characterization of the bacteriocin. *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, 10(1), 1-13.
- Vinothkanna, A. & Sekar, S. (2019). Probiotic properties of intrinsic bacteria isolated from fermented polyherbal preparations of Indian Ayurveda. *LWT - Food Science and Technology*, 103, 8–18.