การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

รัชนู เมยดง*, ภัทรวรรณ สุขสวัสดิ์, ศิริพร ทิพย์สิงห์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร

*Corresponding author email: ratchanu.me@bsru.ac.th

ได้รับบทความ: 18 กันยายน 2563
ได้รับบทความแก้ไข: 31 พฤษภาคม 2564
ยอมรับตีพิมพ์: 2 มิถุนายน 2564

บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อคัดเลือกโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ใหม่มีความสำคัญเพื่อนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพแบบใหม่ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส และกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระ โดยแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ทั้งหมด 161 ไอโซเลตและ 32 ไอโซเลต มีกิจกรรมต้านเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Salmonella* Typhi โดยไอโซเลต FF27a มีกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ สิ่งที่น่าสนใจคือไอโซเลต FF27a มีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ และผลิตเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส นอกจากนี้ยังเกาะกับมิวซินได้สูงและไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เมื่อนำไปจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 และการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต FF27a มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* (ร้อยละ 99.93) จากการทดลองสรุปได้ว่า *L. plantarum* FF27a มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ที่สามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

คำสำคัญ: แบคเทอริโอซิน / คอเลสเตอรอล / กิจกรรมจับสารอนุมูลอิสระ

Screening of Lactic Acid Bacteria with Potential Probiotic Properties from Fermented Food Products

Ratchanu Meidong*, Pattarawan Suksawat, Siriporn Thipsing

Microbiology Program, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
*Corresponding author email: ratchanu.me@bsru.ac.th

Received: 18 September 2020
Revised: 31 May 2021
Accepted: 2 June 2021

Abstract

The research for the selection of the novel probiotic strains is important for the development of new functional food products. The objective of this study was to screen of bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) from fermented foods with bile salt hydrolase (BSH) and antioxidant activity. A total of 161 isolates of LAB were isolated and thirty-two isolates showed antimicrobial activity against *Bacillus cereus* and *Salmonell*a Typhi. Isolate FF27a showed significantly the highest antimicrobial activity against pathogen tested. Interestingly, isolate FF27a exhibited significantly the highest of antioxidant activity and produced BSH. Moreover, isolate FF27a exhibited high adhesion to mucin and none blood hemolysis. Isolate FF27a was identified based on morphology, carbohydrate utilization with API 50CHL, and 16S rDNA analysis as *Lactobacillus plantarum* (99.93%). In conclusion, *L. plantarum* FF27a can be used as a probiotic candidate for using in functional food products.

Keywords: Bacteriocin / Cholesterol / Antioxidant activity

บทนำ

ในปัจจุบันคนทั่วโลกมีความตื่นตัวและให้ความใส่ใจด้านสุขภาพมากขึ้น อย่างหนึ่งที่เห็นได้ชัดคือการเลือกบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งเป็นอาหารในกลุ่มที่นอกเหนือจากอาหารในกลุ่มที่ให้พลังงานหลัก อาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เป็นองค์ประกอบนั้นจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ส่งผลดีต่อร่างกายผู้บริโภคเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม [1] จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่นิยมศึกษากันมาก ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. และ *Leuconostoc* spp. เป็นต้น [2-4] โดยคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่ทำการคัดเลือกเพื่อนำไปพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพนั้นประกอบไปด้วย ความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคตัวอย่างเช่นแบคเทอริโอซิน [5] ความสามารถในการเกาะที่เยื่อบุลำไส้เล็ก [3] และต้องมีความปลอดภัยไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง [6] นอกจากนี้คุณสมบัติที่สำคัญในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์อีกอย่างหนึ่งคือการย่อยสลายคอเลสเตอรอล [7] และคุณสมบัติในการจับสารอนุมูลอิสระ [2] ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์เพื่อใช้ในการพัฒนาอาหารสุขภาพ

คอเลสเตอรอลชนิดที่ไม่ดีเมื่อสะสมในร่างกายมากเกินไปจะสะสมอยู่ตามผนังหลอดเลือด ทำให้เลือดไหลเวียนไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ไม่สะดวก เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดจัดเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตทั่วโลก จากความสำคัญที่กล่าวมานี้นักวิจัยจึงมีการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีคุณสมบัติในการลดคอเลสเตอรอลได้ กลไกในการลดคอเลสเตอรอลโดยแบคทีเรีย ได้มีการสันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งมีรายงานผลการทดสอบในสัตว์ทดลอง [8,9] โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. หลายสายพันธุ์ได้นำมาศึกษาและพบว่าสามารถลดคอเลสเตอรอลได้ในทั้งระดับ *in vitro* [10] และ *in vivo* [11] อีกคุณสมบัติหนึ่งของการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์เพื่อนำไปใช้ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพคือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดยในงานวิจัยของ Chen et al. [12] พบแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* 2W, *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* Z7 สามารถจับสารอนุมูลอิสระเมื่อใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นสารทดสอบได้ในระดับสูง ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Ding et al. [13] ได้รายงานประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp. และ *Lactococcus* spp. ว่าสามารถจับสารอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่มีวัตถุประสงค์ในการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อก่อโรค

ตรวจประสิทธิภาพในการจับสารอนุมูลอิสระและสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสในการย่อยสลายคอเลสเตอรอลเพื่อนำไปใช้พัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง

ตัวอย่างอาหารหมักดองจำนวน 37 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักกาดดอง ปลาส้ม แหนมหมู แหนมเนื้อ ข้าวหมาก ไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว ส้มเนื้อ และแหนมปลาห่อใบตอง จากตลาดในจังหวัดสมุทรสาคร สุพรรณบุรี และกรุงเทพมหานคร ในการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก ได้นำตัวอย่างอาหารหมักดอง ปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงในโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และเจือจางตัวอย่าง แล้วนำความเจือจางที่ 10^{-3} - 10^{-5} มากระจายเชื้อ (Spread) ลงในอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0.5 (MRS-$CaCO_3$) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเลือกโคโลนีที่ปรากฏโซนใสรอบ ๆ โคโลนี และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate ลงบนอาหาร MRS-$CaCO_3$ จากนั้นตรวจสอบลักษณะเบื้องต้น ด้วยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 ตรวจการสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะเซลล์และการติดสีแกรม แล้วนำเชื้อที่มีลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติกคือติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไปเก็บด้วยกลีเซอรอล (Glycerol) ร้อยละ 20 ที่ตู้ -80 °C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ศึกษาการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการต้านเชื้อก่อโรค

ในการศึกษานี้ใช้วิธี Agar well diffusion assay [14] โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลตในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C (MPW-352R, MPW Ltd., Poland) เพื่อเก็บส่วนใส (Supernatant) จากนั้นปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วย 2 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อป้องกันผลที่มาจากกรดอินทรีย์ โดยส่วนนี้เรียกว่า Neutralized cell free supernatant (NCFS) แล้วนำ NCFS มาเติมเอนไซม์คะตาเลส (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml (เรียก NCFS-cat) เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นำ NCFS-cat ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำ NCFS-cat มาทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน Membrane filter 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำไปทดสอบ

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Salmonella enterica* serovar Typhi โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร Mueller Hinton (MH) Broth (Himedia, India) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland หมายเลข 0.5 จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 µl ลงในอาหาร MH soft agar หลอมเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเทราดบน MH agar รอให้อาหารแข็ง จากนั้นเจาะหลุมด้วย Cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และหยด NCFS-cat ลงในหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวัดความกว้างของโซนใสของการยับยั้ง

ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการทำงานของสารแบคเทอริโอซิน

วิธีการศึกษาได้ดัดแปลงจาก An et al. [15] โดยนำ NCFS มาเติมเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบได้แก่ โปรติเนส เค (Proteinase K) ทริปซิน (Trypsin) ไลเปส (Lipase) และ แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) (Himedia, India) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 65 °C นำไปศึกษาผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ด้วยวิธี Agar well diffusion assay โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *B. cereus*

ทดสอบกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 161 ไอโซเลตถูกนำมาศึกษาความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระโดยเปรียบเทียบกับเชื้อโพรไบโอติกส์ทางการค้า 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* 299v, *L. plantarum* TISTR 8014 และ *L. casei* TISTR 389 การศึกษานี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ding et al. [13] ในการเลี้ยงเชื้อและเก็บส่วนใสของเซลล์ทำตามวิธีการที่กล่าวมาในขั้นต้น โดยเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml และส่วนใสของเซลล์ปรับให้มี pH เท่ากับ 7 ก่อนใช้ทดสอบ ในการศึกษานี้ใช้สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany) โดยใช้สารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 mM โดยทำการละลายในเอทานอล (Merck, Germany) ร้อยละ 95 ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ทดลอง

ในการทดสอบทำการเติมเซลล์แขวนลอยหรือส่วนใสของเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุม จากนั้นผสมให้เข้ากัน (ให้ค่าเป็น A sample) ในขณะ Blank จะเติม PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แทนเซลล์แขวนลอย และส่วนใสของเซลล์ แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุมเดียวกัน จากนั้นนำไปหุ้มกระดาษฟอยด์แล้วตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (SPECTROstar Nano, BGM LABTECH,

Germany) แล้วนำมาคำนวณค่า Scavenging effect (%) ดังนี้ Scavenging effect (%) = [(A control - A sample) ÷ A control] × 100 โดยในการทดสอบจะใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานในการปรียบเทียบ

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้ทั้งหมดถูกนำมาตรวจการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส (Bile salt hydrolases, BSH) ในการศึกษานี้ตรวจสอบโดยใช้วิธีของ Allain et al. [16] โดยมีการดัดแปลงดังนี้ ในการศึกษาใช้อาหาร MRS agar ผสม taurodeoxycholic acid sodium salt ร้อยละ 0.5 (Sigma-Aldrich, USA) เกลือน้ำดี ร้อยละ 0.3 (Sigma-Aldrich, USA) และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ร้อยละ 0.04 (Univar, Australia) โดยปรับ pH ในอาหารให้มีค่าเท่ากับ 7 จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกในอาหารทดสอบที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส ของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยจะมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี

ทดสอบความสามารถในการเกาะติดมิวซิน

ทดสอบความสามารถในการเกาะของแบคทีเรียกรดแล็กติกตามวิธีของ Tallon et al. [17] โดยดัดแปลงบางส่วน ในการทดลองนี้ใช้แบคทีเรีย *L. plantarum* 299v เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดสอบเนื่องจากเป็นเชื้อที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการเกาะที่มิวซินได้ดี แบคทีเรียสำหรับทดสอบเลี้ยงใน MRS broth ที่ผสมสารละลายมิวซิน (Sigma-Aldrich, USA) ร้อยละ 0.1 ในการทดสอบเริ่มจากเติมเซลล์แบคทีเรียลงใน 96-well microtiter plate ที่เคลือบมิวซินไว้ (18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 12 ครั้ง เพื่อล้างแบคทีเรียที่ไม่เกาะออก หลังจากนั้นเติม PBST (PBS ที่ผสม tween 20 ร้อยละ 0.05) ลงไปในแต่ละหลุมก่อนนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียในแต่ละหลุมไปทำการเจือจางเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะกับมิวซิน ด้วยเทคนิค Spread plate ลงบนอาหาร MRS-$CaCO_3$ รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อหลุม (CFU/well) และหาร้อยละการเกาะติด [%Adhesion = (จำนวนเซลล์ที่เกาะต่อหลุม ÷ จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อหลุม) x 100] ในการทดลองนี้แต่ละไอโซเลตจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตรวจสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

เลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกลงบนอาหาร Blood agar ที่ผสมเลือดแกะร้อยละ 5 (Biomerieux, France) และบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยดูลักษณะที่ปรากฏรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

การจำแนกเชื้อ

แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลต FF27a ถูกนำมาจำแนกเนื่องจากสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์ที่โดดเด่น โดยการจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ เริ่มจากเลี้ยงเชื้อไอโซเลต FF27a ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ โดยล้างตะกอนเซลล์และแขวนลอยเซลล์ด้วย PBS ปรับให้ได้เซลล์ที่มีความเข้มข้น OD_{600} = 2.0 จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยลงในช่องที่บรรจุสารชีวเคมีชนิดแห้งและนั้นนำชุดทดสอบ API 50 CHL (Biomerieux, France) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาตรวจดูผลบันทึกผลการใช้น้ำตาล นำผลที่ได้เข้าโปรแกรม API CHL version 5.2 เพื่อจำแนกเชื้อ จากนั้นยืนยันการจำแนกของไอโซเลต FF27a ด้วยการส่งไปวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ แล้วนำลำดับ 16S rDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีในฐานข้อมูล GenBank databases และ Ezbiocloud databases จากนั้นนำไป align ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W version 2 [18] และนำไปตัดลำดับ DNA ด้วยโปรแกรม SeaView program version 4 [19] และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA ver. 7 [20] โดยใช้ค่า Bootstrap คือ 1000 ซ้ำ

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

ทุกการทดลองทำสามซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance: ANOVA) หาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และร้อยละ 99 ($p < 0.01$)

ผลการศึกษา

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง

การศึกษานี้แยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดองซึ่งประกอบด้วย ผักกาดดอง ปลาส้ม แหนมหมู แหนมเนื้อ ข้าวหมาก ไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว ส้มเนื้อ และแหนมปลาห่อใบตอง จำนวน 37 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งสิ้น 161 ไอโซเลต โดยมีการคัดเลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสบนอาหาร MRS-$CaCO_3$ จากนั้นนำไปทดสอบลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยที่โอโซเลตนั้นไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่สร้างสปอร์ และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

ผลการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินต้านเชื้อก่อโรค

สมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของแบคทีเรียกรดแล็กติกในการเป็นโพรไบโอติกส์คือความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยจากการทดลองพบว่าจากแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมด 161 ไอโซเลต มีทั้งหมด 32 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยแบคทีเรียกรดแล็กติก 10 ไอโซเลตที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* และ *Salmonella* Typhi ได้ดีที่สุดดังแสดงในตารางที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต AHL5c, AHL5d, AHL9c, BL12b, BL13a, BL13c, BL22b, BL36d, FF27a และ L61-26d ผลการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าไอโซเลต FF27a สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้สูงที่สุด (21.67 มิลลิเมตร) ขณะที่ไอโซเลต BL13a สามารถยับยั้ง *Salmonella* Typhi ได้สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไอโซเลต FF27a ($p < 0.01$) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 17.93 มิลลิเมตร และ 17.80 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนในการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	B. cereus	*Salmonella* Typhi
AHL5c	15.50 ± 0.50^{b}	13.50 ± 0.45^{a}
AHL5d	19.73 ± 0.46^{ef}	13.90 ± 0.79^{ab}
AHL9c	20.70 ± 0.36^{fg}	16.90 ± 0.36^{ef}
BL12b	13.83 ± 0.28^{a}	13.96 ± 0.25ab
BL13a	16.83 ± 0.56^{c}	17.93 ± 0.32^{f}
BL13c	18.93 ± 0.40^{de}	16.06 ± 0.22^{de}
BL22b	13.93 ± 0.51^{a}	15.50 ± 0.45^{cd}
BL36d	17.90 ± 0.36^{cd}	14.06 ± 0.42^{ab}
FF27a	21.63 ± 0.71^{g}	17.80 ± 0.52^{f}
L61-26d	19.06 ± 0.42^{e}	14.76 ± 0.25^{bc}

ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

ผลของเอนไซม์ต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน

ในการตรวจสอบคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากไอโซเลต AH5d, AHL9c และ FF27a ได้ทดสอบความเสถียรของแบคเทอริโอซินกับเอนไซม์ต่าง ๆ ดังแสดงผลในตารางที่ 2 โดยแบคเทอริโอซินจากไอโซเลต AHL5d, AHL9c และ FF27a เมื่อ

ทดสอบกับเอนไซม์ catalase, α-amylase และ lipase ยังคงมีกิจกรรมต้านเชื้อทดสอบ แต่หลังการทดสอบกับเอนไซม์ trypsin และ proteinase K ไม่พบกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ซึ่งเป็นลักษณะของแบคเทอริโอซินที่เป็นสารประกอบกลุ่มโปรตีน

ตารางที่ 2 ผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแล็กติก

เอนไซม์	**ผลการยับยั้ง *B. cereus* (mm)**		
	AHL5d	AHL9c	FF27a
α-amylase	19.21 ± 0.32[b]	20.37 ± 0.25[b]	21.28 ± 0.22[b]
lipase	19.18 ± 0.43[b]	20.15 ± 0.35[b]	21.19 ± 0.42[b]
catalase	19.55 ± 0.34[b]	20.45 ± 0.32[b]	21.35 ± 0.55[b]
proteinase K	0.00 ± 0.00[a]	0.00 ± 0.00[a]	0.00 ± 0.00[a]
trypsin	0.00 ± 0.00[a]	0.00 ± 0.00[a]	0.00 ± 0.00[a]

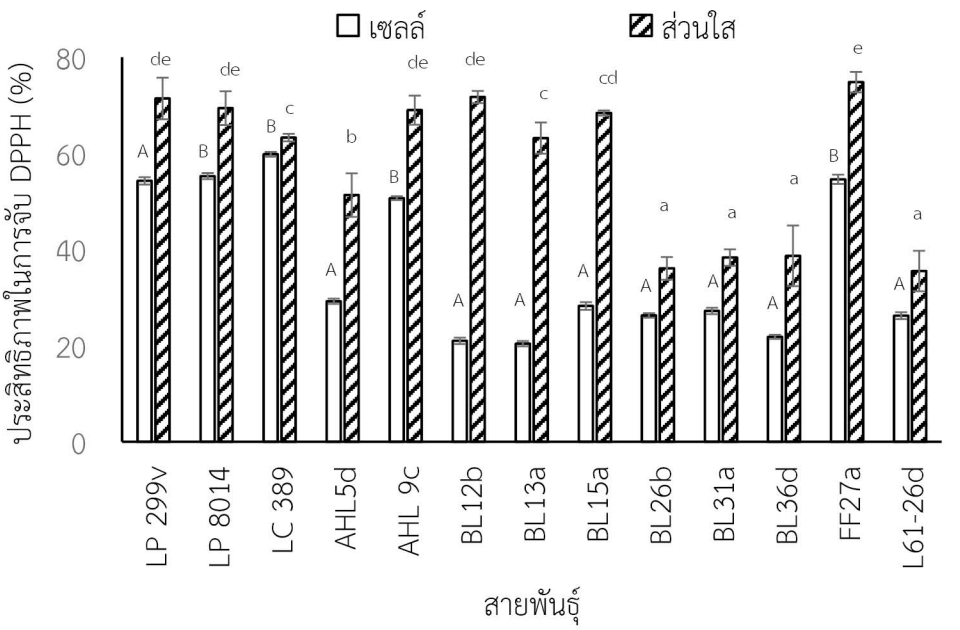
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก

กิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด 10 ไอโซเลต จากทั้งหมด 161 ไอโซเลต เทียบกับแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ทางการค้าทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกมีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระอยู่ระหว่างร้อยละ 20.40 ถึงร้อยละ 59.78 ซึ่งเซลล์ของไอโซเลต AHL9c และ FF27a มีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดแต่ทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับโพรไบโอติกส์ทางการค้าสายพันธุ์ *L. casei* TISTR 389 (ร้อยละ 59.78) ทั้งนี้ยังพบว่าส่วนใสของเซลล์นั้นมีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าเซลล์ โดยมีร้อยละของกิจกรรมอยู่ที่ 35.51 ถึง 74.78 อีกทั้งยังพบว่าส่วนใสของไอโซเลต FF27 มีความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 74.78 ซึ่งสูงกว่าโพรไบโอติกส์ทางการค้าทั้ง 3 สายพันธุ์

ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสของแบคทีเรียกรดแล็กติก

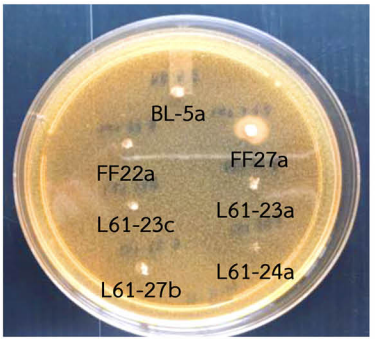
ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต FF27a ซึ่งแยกมาจากปลาส้ม มีการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาศึกษาทั้งหมด 161 ไอโซเลต โดยตรวจสอบจากการเกิดโซนตะกอนที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 17 มิลลิเมตร ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 1 แสดงความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลตต่าง ๆ ตัวอักษรตัวยกที่แสดงในภาพบ่งบอกถึงความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบความสามารถในการเกาะและความปลอดภัย

จากการทดลองนี้พบว่าไอโซเลต AHL5d, AHL9c และ FF27a สามารถเกาะที่มิวซินได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลต FF27 มีร้อยละการเกาะที่มิวซินสูงสุด (ร้อยละ 82.36) ในขณะที่ *L. plantarum* 299v ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้อ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้เกาะที่มิวซินได้ถึงร้อยละ 93.95 โดยผลที่ได้จากการศึกษาแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งจัดว่ามีความปลอดภัย



ภาพที่ 2 การสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสของไอโซเลต FF27a

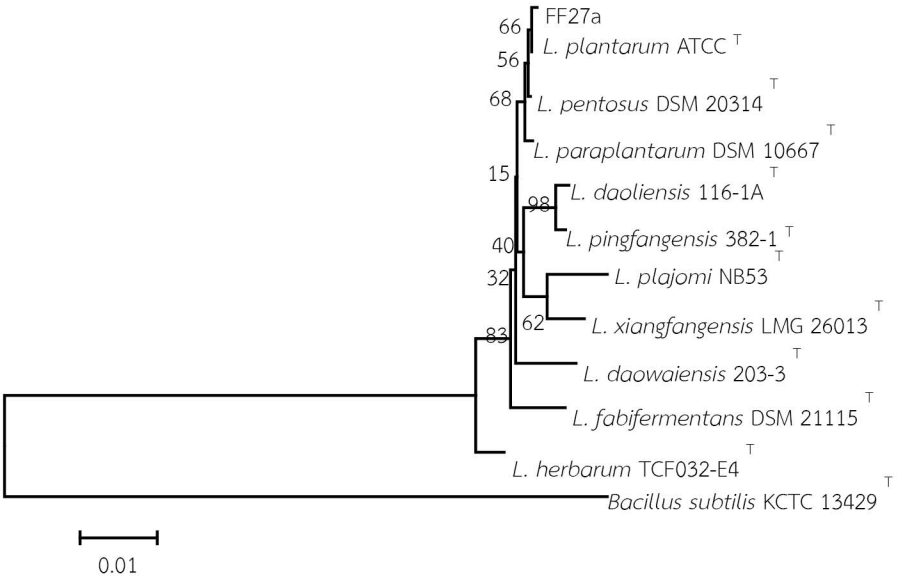
ตารางที่ 3 ความสามารถในการเกาะกับสารมิวซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

โพรไบโอติกส์	ความสามารถในการเกาะกับมิวซิน (%)	การย่อยเม็ดเลือดแดง
L. plantarum 299v	93.05 ± 0.50^{c}	γ-hemolysis
AHL5d	57.53 ± 1.09^{a}	γ-hemolysis
AHL9c	79.75 ± 0.28^{b}	γ-hemolysis
FF27a	82.36 ± 0.38^{bc}	γ-hemolysis

ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการจัดจำแนกเชื้อโพรไบโอติกส์

จากการทดสอบสมบัติของแบคทีเรียกรดแล็กติกในการสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อก่อโรค (*B. cereus* และ *Salmonella* Typhi) สมบัติในการเกาะที่มิวซิน การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ประสิทธิภาพในการจับสารอนุมูลอิสระและการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสของแบคทีเรียกรดแล็กติก พบว่ามีไอโซเลต FF27a เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงที่สุด จึงนำมาจำแนกโดยวิธีการย้อมแกรมพบว่าไอโซเลต FF27a ติดสีแกรมบวก และมีลักษณะเซลล์เป็นท่อนสั้น ทั้งนี้เมื่อทดสอบทางชีวเคมีโดยนำมาทดสอบการใช้น้ำตาลด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API CHL version 5.2 พบว่ารูปแบบการใช้น้ำตาลของไอโซเลต FF27a ตรงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ถึงร้อยละ 99.9 จากนั้นจึงนำไปยืนยันการจำแนกต่อด้วยการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต FF27a ใกล้เคียงกับเชื้อ *L. plantarum* ที่สุดที่ร้อยละ 99.93 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต FF27a เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp.

วิจารณ์

โพรไบโอติกส์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ โดยปัจจุบันนิยมนำไปประยุกต์ใช้หลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการเป็นอาหารเพื่อสุขภาพในมนุษย์ [21,22] ในการจะพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพที่มีส่วนผสมจากแบคทีเรียโพรไบโอติกส์นั้น จำเป็นที่ต้องคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งที่เหมาะสม โดยอาหารหมักหลายชนิดได้มีรายงานว่าสามารถแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพที่ดีได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. และ *Lactococcus* spp. [13] ซึ่งในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ได้จากอาหารหมักเช่นกัน โดย *L. plantarum* FF27a แยกมาจากปลาส้มซึ่งเป็นอาหารหมักชนิดหนึ่งของไทยที่ได้รับความนิยมในการบริโภค

เนื่องจากในทางเดินอาหารของมนุษย์มีจุลินทรีย์หลายกลุ่มทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ที่ดีและที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ในทางเดินอาหารของคนที่มีสุขภาพดีนั้นต้องมีสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สูงกว่ากลุ่มที่ก่อโรค โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้ต้องสามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เจริญจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ [15] ในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจึงมีความสำคัญมาก โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้เนื่องจากกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

และแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญ โดยในงานวิจัยนี้แบคทีเรียกรดแล็กติก *L. plantarum* FF27a มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวก (*B. cereus*) และแกรมลบ (*Salmonella* Typhi) ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นที่สนใจ ตัวอย่างเช่นงานของ Hwanhlem et al. [14] ได้แยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากทางเดินอาหารของไก่ที่มีสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ อีกทั้งในงานของ An et al. [15] แยก *L. plantarum* M1-UVs300 ได้จากไส้กรอกหมักที่สร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ เป็นต้น

สมบัติต่อมาของโพรไบโอติกส์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากคือคุณสมบัติการเกาะติดเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารของโฮสท์ เนื่องจากการที่จะศึกษาการเกาะของโพรไบโอติกส์ในสิ่งมีชีวิตเป็นเรื่องที่มีความซับซ้อน [3] อีกวิธีหนึ่งของการศึกษาคือตรวจการเกาะที่มิวซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เคลือบที่เยื่อบุผนังลำไส้ของสิ่งมีชีวิต โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *L. plantarum* FF27a ได้ศึกษาความสามารถในการเกาะกับมิวซินเช่นกันและพบว่ามีร้อยละการเกาะกับมิวซินที่สูง ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Boricha et al. [23] ซึ่งได้ศึกษาการเกาะที่มิวซินของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ศึกษามีความสามารถในการเกาะกับมิวซินได้ดี จากที่กล่าวมานี้จะเห็นว่าความสามารถในการเกาะนั้นเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญมากที่นักวิจัยให้ความสำคัญและวิธีการทดสอบกับมิวซินนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความเหมาะสมและเป็นที่ยอมรับเพื่อใช้ในการคัดเลือกและทดสอบคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์

อีกหนึ่งคุณสมบัติที่ต้องตรวจสอบคือด้านความปลอดภัย การที่โพรไบโอติกส์สายพันธุ์นั้น ๆ จะถือว่ามีความปลอดภัยต้องไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยสมบัติข้อนี้เป็นเกณฑ์สำคัญข้อหนึ่งที่ต้องตรวจสอบ ในการศึกษาด้านความปลอดภัยของการใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ พบว่า *L. plantarum* FF27a ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจึงจัดว่าสายพันธ์นี้มีความปลอดภัย [6] โดยมีรายงานการวิจัยหลายงานที่ได้ทำการทดสอบโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เช่นสายพันธุ์ *L. gassei* [24] *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. และ *Lactococcus* spp. [13] โดยรวมแล้วจากสมบัติของโพรไบโอติกส์ที่แยกได้ซึ่งไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจึงถือว่าเป็นเชื้อโพรไบโอติกส์สายพันธุ์นี้มีความปลอดภัยเหมาะแก่การนำไปใช้ต่อไป

ในปัจจุบันสมบัติที่สำคัญที่ได้รับความสนใจในการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์คือความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องในการย่อยสลายคอเลสเตอรอล และคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ [2,7] ดังนั้นสมบัติต่อมาที่ได้ศึกษาคือกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก เนื่องจากสารอนุมูลอิสระสามารถเข้าไปทำลายเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและ

นำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ ในการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีประสิทธิภาพที่ดีในการจับสารอนุมูลอิสระทั้งเซลล์และส่วนใสของเซลล์ ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีประสิทธิภาพในการจับสารอนุมูลอิสระได้แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนใสของเซลล์มีประสิทธิภาพในการจับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งกลไกของแบคทีเรียกรดแล็กติกในการจับสารอนุมูลอิสระยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Amaretti et al. [25] รายงานว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกในระหว่างการเจริญมีการผลิตเอนไซม์กลุ่ม Superoxide dismutase (SOD) ที่สามารถทำลายสารอนุมูลอิสระออกมา จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ส่วนใสของเซลล์แบคทีเรียมีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระสูงกว่าเซลล์ อีกทั้งพบว่า *L. plantarum* FF27a มีประสิทธิภาพในการจับสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นที่นำมาศึกษา ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาการจับสารอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก ตัวอย่างเช่นงานของ Aarti et al. [2] ได้ศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ด้านต่าง ๆ รวมถึงความสามารถในการสารต้านอนุมูลอิสระของ *L. brevis* LAP2 ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์จากปลาหมักของอินเดีย ซึ่งพบว่าเชื้อนี้มีสามารถจับสารอนุมูลอิสระได้ทั้งเซลล์และส่วนใสของเซลล์ อีกทั้งงานของ Ding et al. [13] พบว่า *L. delbrueckii* F17 มีความสามารถในการกำจัดสาร OH^- ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 59 และกำจัดสาร O_2^- ได้ถึงร้อยละ 54 ซึ่งคุณลักษณะนี้ของเชื้อโพรไบโอติกส์ถูกพิจารณาว่าเป็นคุณลักษณะที่ดีเมื่อนำไปพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพ

คอเลสเตอรอลเป็นไขมันชนิดหนึ่งที่เมื่อสะสมในร่างกายอาจเป็นสาเหตุของหลายโรค เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง โรคหัวใจวาย โรคหลอดเลือดสมอง ดังนั้นจึงมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาการลดระดับคอเลสเตอรอลเพื่อสุขภาพที่ดีของมนุษย์ ทั้งนี้มีรายงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกส์สามารถลดระดับคอเรสเตอรอลได้ด้วยการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส [8,10,16] ในการศึกษานี้ได้ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสของแบคทีเรียกรดแล็กติก และพบว่าเชื้อ *L. plantarum* FF27a เป็นเพียงไอโซเลตเดียวจาก 161 ไอโซเลต ที่สร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องในการย่อยสลายคอเลสเตอรอล ทั้งนี้มีหลายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสของโพรไบโอติกส์กลุ่ม *Lactobacillus* spp. เช่นเชื้อ *L. plantarum* [26] *L. fermentum, L. fermentum, L. mucosae* และ *L. reuteri* [27] เป็นต้น

สรุป

แบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *L. plantarum* FF27a ที่แยกได้จากปลาส้มเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและ

แกรมลบ อีกทั้งมีความสามารถในการเกาะติดกับมิวซินและไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้ยังมีคุณคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อสุขภาพนั่นคือมีกิจกรรมการจับสารอนุมูลอิสระและสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องในการย่อยสลายคอเลสเตอรอล แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องทำการศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น การทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร และความไวต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษาต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนว่า *L. plantarum* FF27a เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จได้เนื่องจากได้รับการทุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา (RDG60A00180)

เอกสารอ้างอิง

1. FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of United States/World Health Organization. Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: FAO Food and Nutritional Paper; 2006.
2. Aarti C, Khusro A, Varghese R, Arasu MV, Agastian P, Al-Dhabi NA, et al. *In vitro* studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. LWT-Food Sci Technol 2017;86:438-46.
3. García A, Navarroa K, Sanhueza E, Pineda S, Pastene E, Quezada M, et al. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. Electronic J Biotechnol 2017;25:75-83.
4. Panghal A, Chikara N, Kumar V, Janghu S, Virkar K, Gat Y. Potential non-dairy probiotic products -a healthy approach. Food Biosci 2017;21:80-9.
5. Dobson A, Cotter PD, Paul R, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? Appl Environ Microbiol 2012;78:1-6.
6. Lee S, Lee J, Jin YI, Jeong JC, Chang YH, Lee Y, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. LWT-Food Sci Technol 2017;79:518-24.

7. Tomaro-Duchesneau C, Jones ML, Shah D, Jain P, Saha S, Prakash S. Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an *in vitro* investigation. Biomed Res Int 2014:380316.
8. De Smet I, De Boever P, Verstraete W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. Brit J Nutr 1998;79:185-94.
9. Liang X, Lv Y, Zhang Z, Yi H, Liu T, Li R, et al. Study on intestinal survival and cholesterol metabolism of probiotics. LWT-Food Sci Technol 2020;12:109132.
10. Miremadi F, Ayyash M, Sherkat F, Stojanovska L. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. J Func Foods 2014;9:295-305.
11. Zhou J, Shi C, Ding W, Chen M, Guo X, Long R. 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. J Func Foods 2017;32:324-32.
12. Chen P, Zhang Q, Dang H, Liu X, Tian F, Zhao J, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and **α**-glucosidase inhibitory activity. Food Control 2014;35:65-72.
13. Ding W, Wang L, Zhang J, Ke W, Zhou J, Zhu J, et al. Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented. J Func Foods 2017;35:481-8.
14. Hwanhlem N, Ivanova T, Biscola V, Choiset Y, Haertlé T. Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. Food Control 2017;78:187-95.
15. An Y, Wang Y, Liang X, Yi H, Zuo Z, Xu X, et al. Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. Food Control 2017;81:211-7.

16. Allain T, Chaouch S, Thomas M, Travers MA, Valle I, Langella P, et al. Bile salt hydrolase activities: a novel target to screen anti-Giardia lactobacilli? Front Microbiol 2018;9:1-9.
17. Tallon R, Arias S, Bressollier P, Urdaci MC, Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. J Appl Microbiol 2007;102:442-51.
18. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007;23:2947-8.
19. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. Seaview version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 2010;27(2):221-224.
20. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
21. Shekh SL, Dave JM, Vyas BRM. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ-amino butyric acid production. LWT-Food Sci Technol 2016;74:234-41.
22. Kantachote D, Ratanaburee A, Hayisama-ae W, Sukhoom A, Nunkaew T. The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. J Func Foods 2017,32:401-8.
23. Boricha AA, Shekh SL, Pithva SP, Ambalam PS, Manuel-Vyas BR. *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. LWT-Food Sci Technol 2019;106:201-8.
24. Gunyakti A, Asan-Ozusaglam M. *Lactobacillus gasseri* from human milk with probiotic potential and some technological properties. LWT-Food Sci Technol 2019;109:261-9.
25. Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. Appl Microbiol Biotechnol 2013;97:809-17.

26. Abushelaibi A, Mahadin AS, Tarabily EK, Shah PN, Ayyash M. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT-Food Sci Technol 2017;79:316-25.
27. Meleh HU, Choo S, Mohd MN, Chew SY, Rangasamy P, Hassan H, et al. Isolation and safety characterisation of lactobacilli strains with antimicrobial properties as potential probiotics for human use. LWT-Food Sci Technol 2020;131:109796.