

การแยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก จากผลิตภัณฑ์ผักดองพื้นบ้านของไทย

Isolation and selection of lactic acid bacteria with potential probiotics
from traditional Thai local pickle products

สุรัตน์ วังพิกุล^{1*} และ ปริญญาพร อิศรานูวัฒน์²

Surat Vangpikul^{1*} and Pariyaporn Itsaranuwat²

บทคัดย่อ

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจากผักดองพื้นบ้านของไทย ผลการศึกษาสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต มี 20 ไอโซเลตที่ไม่สร้างแคตาเลส เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่ามี 9 ไอโซเลต (SF1, SF2, SF3, GF1, GF2, MF3, MF4, MF5 และ MF6) ที่สามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ และมี 7 ไอโซเลตที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีปริมูมิ (sodium glycolate) และเกลือน้ำดีทุดิอูมิ (sodium taurodeoxycholate) ได้ จึงนำเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* ได้ แต่ไม่มีไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ ผลการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกลำไส้ (มิวซิน) พบว่า มีเพียง 4 ไอโซเลต (SF1, SF2, GF1 และ GF2) ที่สามารถยึดเกาะกับมิวซินได้ ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่า ไอโซเลต SF1 และ SF2 ที่แยกได้จากต้นหอมดอง คือ *Lactobacillus plantarum* HL-12 (100% identity) ไอโซเลต GF1 และ GF2 ที่แยกได้จากผักกาดเขียวปลีคือ *L. fermentum* NBRC 15885 (100% identity) โดยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านี้มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ให้กับชุมชนได้

คำสำคัญ: โปรไบโอติก ผักดอง แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

Abstract

Probiotics are living microorganisms that benefit the host by adjusting the balance of microorganisms in the intestinal system. This research aims to isolate and screen the lactic acid bacteria (LAB) that have probiotic potential from Thai traditional pickles. The results showed that 30 Gram-positive bacterial isolates were obtained and 20 isolates among them

¹ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

¹ Research and Development Institute, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi

² คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

² Faculty of Technology, Mahasarakham University

* Corresponding author. E-mail: surat.v@rmutsb.ac.th

were identified as catalase-negative bacteria. The results of the probiotic properties characterization of isolated bacteria indicated that there were 9 isolates (SF1, SF2, SF3, GF1, GF2, MF3, MF4, MF5, and MF6) that can withstand the acid and bile in the gastrointestinal tract, and 7 of them were able to digest both primary (sodium glycolate) and secondary bile salts (sodium taurodeoxycholate). The results of the antibacterial activity against pathogenic bacteria of those 7 isolates were evaluated. It was found that all 7 isolates were able to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*, whereas none of them was capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*. The result of bacterial adhesion property on the intestinal mucosa (mucin) showed that only 4 isolates (SF1, SF2, GF1, and GF2) were able to adhere to mucin. The results of bacterial identification using DNA sequencing indicated that SF1 and SF2 isolated from pickled spring onion were *Lactobacillus plantarum* HL-12 (100% identity), and GF1 and GS2 isolated from pickled mustard green were *L. fermentum* NBRC 15885 (100% identity). The isolated LAB from this research could be developed to be a starter for local pickle food products to increase the value of the product for community.

Keywords: probiotics, pickles, lactic acid bacteria

บทนำ

อาหารหมักดอง เป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทย มาช้านาน เป็นกรรมวิธีถนอมอาหารเพื่อให้สามารถเก็บรักษาอาหารนั้นได้นานขึ้น ไม่เน่าเสียเร็ว ซึ่งอาหารที่นำมาหมักดองนั้นจะมีสี สัน และรสชาติที่เปลี่ยนไป การถนอมอาหารด้วยวิธีนี้จะให้กลายเป็นวัตถุดิบสำคัญ และมักใช้ในการถนอมอาหารที่มีเพียงบางฤดู เช่น ผักและผลไม้บางชนิดซึ่งเมื่อถึงฤดูการจะมีผลผลิตมาก ราคาถูก จะถูกนำมาหมักดองเพื่อให้เก็บไว้บริโภคได้ตลอดทั้งปี เนื่องจากอาหารหมักดองพื้นบ้านหลายชนิดนั้นอาจยังไม่ได้มาตรฐาน เพราะยังขาดการควบคุมในเรื่องของความสะดวกของวัตถุดิบ ขั้นตอนการทำและภาชนะบรรจุ รวมถึงการป้องกันอาหารจากการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค ซึ่งหากรับประทานอาหารหมักดองที่ไม่มีการควบคุมความสะดวก อาจทำให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายได้ และหากวัตถุดิบ เช่น พืช และผัก ที่นำมาทำเป็นของหมักดองมีความสะอาดไม่เพียงพอ ก็อาจทำให้ร่างกายได้รับเชื้อชนิดนี้เข้าไปโดยไม่รู้ตัว (Pumriw, Luang-In, & Samappito, 2021) จุลินทรีย์ที่พบใน

อาหารหมักพื้นบ้าน ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (probiotics) คือเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อประโยชน์ให้กับสุขภาพของผู้บริโภค หรือช่วยปรับสภาพความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ (FAO/WHO, 2002) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ป้องกันและรักษาโรคท้องร่วงทั้งที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น (Guo, Kim, Nam, Park, & Kim, 2010; Ratanaburee, Kantachote, Charemjiratrakul, & Sukhoom, 2013) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria: LAB) ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* (Fuller, 1997; Itsaranuwat, Al-Haddad, & Robinson, 2003; Vinderola, & Reinheimer, 2003) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรไบโอติกที่ดีที่สุด (Rial, 2000) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ทนต่อกรดและเกลือได้ดี ทำให้สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็น

โปรไบโอติก (Kos, Suskovic, Goreta, & Matosic, 2000) รวมทั้งสามารถสร้างกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียอินเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคนักวิจัยได้คัดแยกโปรไบโอติกจากแหล่งต่าง ๆ เช่น โปรไบโอติกจากมนุษย์ (Vinderola et al., 2008) ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมัก (Mathara et al., 2008) เพื่อพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารหมักดองที่บ้านจึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีการบริโภคอย่างแพร่หลาย เป็นอาหารทางเลือกสำหรับผู้บริโภคมังสวิรัต และในผักผลไม้อุดมไปด้วยสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ ไฟเบอร์ วิตามิน เกลือแร่ และสารต้านอนุมูลอิสระ (Lee et al., 2011) มีหลายงานวิจัยที่แยกเชื้อโปรไบโอติกได้จากผักดอง เช่น Pumriw, Luang-In, & Samappito (2021) สามารถคัดแยก LAB ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากผักเสี้ยนดอง ได้แก่ *L. fermentum*, *L. brevis* และ *L. plantarum* นอกจากนี้ Karasu, Simsek, & Çon (2010); Lee et al., (2011) สามารถแยกเชื้อโปรไบโอติก *L. plantarum* จากผักดอง คนไทยนิยมบริโภคอาหารหมักโดยไม่ได้ผ่านการปรุงสุกด้วยความร้อน ซึ่งอาจทำให้ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร โดยเกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* การใช้โปรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและบำบัดรักษาโรค จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทดแทนการใช้ยา การนำเข้ายาจากต่างประเทศ และลดการใช้ยาปฏิชีวนะด้วย (Guo, Kim, Nam, Park, & Kim, 2010) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อ LAB ที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจากผักดองที่บ้านของไทย และนำเชื้อที่คัดแยกได้มาศึกษา

คุณสมบัติและศักยภาพการเป็นโปรไบโอติก รวมทั้งการจัดจำแนกสายพันธุ์ชนิดของจุลินทรีย์ เพื่อประยุกต์ใช้โปรไบโอติกดังกล่าวเป็นกล้ำเชื้อในการผลิตผักดองให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอ มีกลิ่นคล้ายกับการหมักตามธรรมชาติ อีกทั้งเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เสริมประโยชน์ด้านสุขภาพสำหรับผู้บริโภค และเป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมการแปรรูปผักพื้นบ้านของไทย

วิธีการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (LAB) จากตัวอย่างอาหารหมัก

วิธีการแยกเชื้อ LAB ดัดแปลงจาก Di Cagno et al. (2008); Ruttanasutja, & Thongdee, (2020) โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมัก 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 90 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-1} - 10^{-7} เท่า ดูดตัวอย่างสารละลายเฉพาะที่เจือจางระดับ 10^{-3} ถึง 10^{-7} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเทอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เข้มข้นร้อยละ 0.3 (w/v) ที่ปราศจากเชื้อและหลอมเหลวแล้ว อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าจนแล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเลือกเก็บตัวอย่างเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงที่มีเชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ กระจายตัวอย่างเหมาะสม นำเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้มาศึกษาการติดสีแกรมและดูรูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์ และคุณสมบัติการ

สร้างคาตาเลส (catalase) โดยจะคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างคาตาเลส จากนั้นนำเชื้อเก็บรักษาในลิตมัสมิลค์ (litmus milk) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดสอบต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการทนกรดและน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร

วิธีทดลองดัดแปลงจาก Kos, Suskovic, Goreta, & Matosic (2000); Mathara et al. (2008) โดยนำเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการทนกรดน้ำดีและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร โดยนำตัวอย่างเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อีกครั้ง แล้วบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับปริมาณเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ที่ปลอดเชื้อโดยการทำให้มีระดับการเจือจางระหว่าง 10^{-1} ถึง 10^{-7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร คัดเลือกช่วงระดับการเจือจางที่ 10^{-3} ถึง 10^{-7} มาับจำนวนเชื้อด้วยวิธีเพลทเคาท์อาการ์ (plate count agar) รายงานปริมาณเชื้อเป็นโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) นำตะกอนเซลล์แขวนลอยที่เหลือมาเจือจางด้วยสารละลายละลายอิเล็กโตรไลต์ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl_2) 6.20 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 2.20 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 0.22 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 1.20 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 6.40 จากนั้นเติมไลโซไซม์ (lysozyme) ให้ได้

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (อัตราส่วน 1:1) นำหลอดตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายเซลล์ดังกล่าวมาเจือจางด้วยสารละลายอิเล็กโตรไลต์ที่ปรับพีเอชเป็น 2.50 ซึ่งเติมเปปซิน (pepsin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 (w/v) (อัตราส่วน 3:5) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธีเพลทเคาท์อาการ์บนอาหารแข็ง MRS

การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในลำไส้ส่วนดูโอดินัม (duodenum) โดยนำเชื้อ LAB มาเจือจางด้วยสารละลายที่มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำย่อยในลำไส้ส่วนดูโอดินัมซึ่งประกอบด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 6.40 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (NaCl_2) 1.28 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.24 กรัมต่อลิตร (พีเอช 7.2) และเติม น้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 (w/v) และแพนครีเอติน (pancreatin) ร้อยละ 1 (w/v) (อัตราส่วน 1:4) จากนั้นนำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อบับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลส (bile salt hydrolase)

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไบล์ซอลท์ไฮโดรเลสโดยวิธี plate assay (ดัดแปลงจาก du Toit et al., 1998) โดยมีเกลื่อน้ำดีปฐภูมิ คือ โซเดียมไกลโคเลต (sodium glycolate) และเกลื่อน้ำดีทุติยภูมิคือโซเดียมทอโรดีออกซีโคเลต (sodium taurodeoxycholate) ทำการทดลองโดยนำเชื้อ LAB ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เจือจางตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายไอโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ที่ปลอดเชื้อ 2 รอบ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับปริมาณเซลล์ด้วยสารละลายไอโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ให้เพิ่มปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อแล้วนำไปแขวนลอยบนอาหารแข็ง MRS ที่ผสมเกลือน้ำดีร้อยละ 0.50 (w/v) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญของเชื้อและตะกอนขึ้นจากการตกตะกอนของเกลือน้ำดีซึ่งเป็นบริเวณที่แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ไบโอสฟอลไฮโดรเลส

4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธีอาการ์เวลดิฟฟิชั่น (agar well diffusion) (ดัดแปลงจาก Uhlman, Schillinger, Rupnow, & Holzapfel, 1992) ทดสอบต่อเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* TISTR 887, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ *Bacillus cereus* TISTR 687 วิธีการเตรียมส่วนอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ของเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้ โดยนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS อีกครั้งแล้วนำไปปั่นที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใสมาปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายไอโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ก่อนนำไปทดสอบ สำหรับการเตรียมเชื้อก่อโรคทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* ในอาหารเหลว

NB (nutrient broth) ส่วนเชื้อ *S. aureus* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB (tryptic soy broth) นำเชื้อทั้งหมดไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนเซลล์และล้างด้วยสารละลายไอโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ทำซ้ำ 2 รอบ) ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายเดิมโดยปรับความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ให้ได้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเป็น 0.1 จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ที่เตรียมได้ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร เติมหาอาหาร NA ที่ยังไม่แข็งตัวสำหรับเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* และเติมหาอาหาร TSA ที่ยังไม่แข็งตัว สำหรับเชื้อ *S. aureus* ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เขย่าจานเพื่อผสมเชื้อกับอาหารให้ผสมกันแล้วทิ้งให้อาหารแข็งตัว จากนั้นเจาะผิวหน้าอาหารด้วยคอร์กบอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.60 มิลลิเมตร จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ LAB ที่เตรียมไว้ลงในหลุมปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีนินซิน (nisin) เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยดูจากบริเวณรอยใสการยับยั้งบริเวณรอบ ๆ หลุมและวัดขนาดการยับยั้ง (วัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง)

5. ทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ (มิวซิน)

การตรึงมิวซินกับ polystyrene microtiter plate well (ดัดแปลงจาก Tallon, Arias, Bressollier, & Urdaci, 2007) ทำได้โดยละลายมิวซินใน phosphate

buffer saline (PBS) pH 7 ที่ปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายมิวซิน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม polystyrene microtiter plate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV เป็นเวลา 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.50 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อตรึงมิวซินกับ polystyrene microtiter plate ล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้อิ่มตัวด้วยการเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ร้อยละ 2 (w/v) ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง

การเตรียมเชื้อ LAB เพื่อทดสอบการยึดเกาะกับมิวซิน โดยเลี้ยงเชื้อ LAB ในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ที่ปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ ด้วย PBS ปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ให้เท่ากับ 0.10

การทดสอบการยึดเกาะกับมิวซิน ถ่ายเชื้อ LAB ที่เตรียมไว้ลงในหลุม polystyrene microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เชื้อละ 4 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยไม่เขย่า จากนั้นล้างเซลล์ที่ไม่ได้ยึดเกาะกับ

มิวซินด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 12 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย triton-X 100 ร้อยละ 0.05 (v/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เพื่อชะเซลล์ออกจากมิวซิน เขย่าบนเครื่อง orbital agitator ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะกับมิวซินโดยนำเซลล์แขวนลอย ในแต่ละหลุมมาเจือจางใน PBS ที่ปลอดเชื้อ แล้วนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีเพลทเคาท์อาหารบนอาหารแข็ง MRS

6. การจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์โดยวิธีหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

นำเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาทำการพิสูจน์บ่งชี้สายพันธุ์ด้วยวิธี 16s rRNA gene sequencing analysis (Lee et al., 2011) โดยวิเคราะห์หาลำดับเบสและเปรียบเทียบสายพันธุ์กับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTN

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การแยกและคัดเลือก LAB จากอาหารหมัก

การศึกษารั้งนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อ LAB จากตัวอย่างอาหารหมักผักดองพื้นบ้าน 3 ชนิด ได้แก่ ต้นหอมดอง ผักกาดดอง และผักรวมดอง ด้วยอาหาร MRS (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960) ผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยก LAB ได้ 30 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทดสอบคาตาเลส ผลการทดสอบพบว่า มีเพียง 20 ไอโซเลทที่ไม่สร้างคาตาเลส ดัง (Table1) จึงจะได้นำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

Table 1 Lactic acid bacteria isolated from fermented foods.

fermented foods	isolates	Gram stain (positive)	catalase test (negative)
pickled spring onions (SF)	10	10	7
pickled mustard green (GF)	10	10	6
mixed pickled vegetables (MF)	10	10	7
total	30	30	20

2. ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดและน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร

ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลองของเชื้อ LAB ที่คัดแยกจากตัวอย่างอาหารหมัก แสดงดัง (Table 2) ผลการทดลองพบว่า LAB จำนวน 9 ไอโซเลท (SF1, SF2, SF3, GF1, GF2, MF3, MF4, MF5 และ MF6) ที่สามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่ออยู่ได้ภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งความคงทนดังกล่าวจัดได้ว่าเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรไบโอติก จึงนำ LAB ทั้ง 9 ไอโซเลทดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไบโอสลอลที่ไฮโดรเลสต่อไป

การทดสอบความสามารถในการทนกรดของเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้ในสภาวะจำลองคล้ายในกระเพาะอาหารของมนุษย์ ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น ทั้งนี้เนื่องจากกระเพาะอาหารของคนเราจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 2-4 ในขณะที่รับประทานอาหารเข้าไป และจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (Erkkila, & Petaja, 2000) การที่เชื้อมีความสามารถในการมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ค่อนข้างดี

ในสภาวะทดสอบนั้น อาจเนื่องมาจากแหล่ง (ถิ่นที่อยู่อาศัยดั้งเดิม) ที่นำมาแยกเชื้อซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ตัวอย่างจากน้ำนมเหลืองคน ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นกรด โดยมีค่า pH ประมาณ 4.6 (Otterby et al., 1980) โดยปกติแล้วเชื้อที่มีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะของถิ่นที่อยู่อาศัยดั้งเดิมที่เป็นกรดอยู่แล้วนั้น ก็มักจะสามารถทนต่อการทนต่อสภาวะทดสอบจำลองที่เป็นกรดได้ดีด้วยเสมอ ซึ่งจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Vinderola, & Reinheimer (2003) พบว่า โปรไบโอติกและหัวเชื้อ LAB ในอุตสาหกรรมนมสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือกรดน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ผลการทดลองสอดคล้องกับ Kos, Suskovic, Goreta, & Matosic (2000) ในระบบการย่อยสลายในส่วนของลำไส้เล็กตอนต้น (duodenum) มีอิทธิพลอย่างมากต่อการมีชีวิตรอดอยู่รอดของแบคทีเรีย เนื่องจากในส่วน of ลำไส้เล็กตอนต้นนี้มีการหลั่งสารทั้งเกลือกรดน้ำดีและน้ำย่อย (pancreatic juice) ดังนั้นจึงมีปริมาณของเชื้อที่สามารถรอดชีวิตผ่านลำไส้ส่วนนี้ไปได้มากที่สุดไม่เกินร้อยละ 10-30

Table 2 Survival rate of selected LAB in acid and simulated duodenum condition.

isolates	viable cell (CFU/mL)				
	starter	after treat with lysozyme	incubate in simulated duodenum condition		
		+0.3% pepsin (1 hr)	1 hr	2 hr	3 hr
SF1	7.80×10^9	4.90×10^9	8.20×10^7	4.00×10^7	5.40×10^7
SF2	7.90×10^9	2.40×10^9	1.40×10^8	4.70×10^6	2.40×10^7
SF3	6.90×10^9	6.40×10^9	3.40×10^8	1.90×10^8	7.50×10^7
SF4	4.30×10^{10}	3.80×10^9	3.70×10^6	1.70×10^2	nd
SF8	2.10×10^{10}	2.90×10^9	3.50×10^6	2.50×10^2	nd
SF9	6.80×10^9	4.20×10^8	3.40×10^8	3.90×10^2	nd
SF10	3.80×10^9	7.20×10^8	6.40×10^5	nd	nd
GF1	7.90×10^9	3.90×10^8	5.70×10^6	4.70×10^7	1.40×10^7
GF2	6.90×10^9	4.20×10^8	3.60×10^6	1.90×10^6	1.30×10^6
GF6	2.30×10^{10}	2.90×10^8	nd	nd	nd
GF7	2.50×10^{10}	3.20×10^9	nd	nd	nd
GF8	3.10×10^{10}	nd	nd	nd	nd
GF9	3.70×10^{10}	nd	nd	nd	nd
MF3	2.30×10^{10}	4.60×10^{10}	1.30×10^6	3.40×10^7	3.80×10^6
MF4	2.50×10^9	2.80×10^{10}	1.20×10^6	1.50×10^6	1.30×10^6
MF5	7.90×10^9	3.90×10^8	2.70×10^8	3.70×10^6	1.20×10^6
MF6	5.10×10^{10}	6.50×10^7	3.70×10^6	3.40×10^6	8.30×10^6
MF7	6.90×10^9	nd	nd	nd	nd
MF8	5.10×10^{10}	4.70×10^7	2.10×10^8	nd	nd
MF9	6.30×10^{10}	1.90×10^9	1.50×10^8	nd	nd

Note: nd = not detected

3. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไบโกลท์-ไฮโดรเลส

จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไบโกลท์-ไฮโดรเลสของเชื้อ LAB ทั้ง 9 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมเกลือน้ำดีร้อยละ 0.5 โดยสังเกตจากการเกิดตะกอนขึ้นจากการตกตะกอนของเกลือน้ำดี พบว่ามีเชื้อ LAB จำนวน 7 ไอโซเลท (SF1, SF2, SF3, GF1, GF2, MF3 และ MF4) สามารถผลิตเอนไซม์ไบโกลท์-

ไฮโดรเลสที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีที่ใช้ในการทดสอบได้คือเกลือน้ำดีปาล์มมูมิ (sodium glycolate) เกลือน้ำดีทิวติยุมมิ (sodium taurodeoxycholate) ดังแสดงใน (Table 3)

ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Pennacchia et al. (2004) ที่พบว่า *Lactobacillus* สามารถเจริญได้บนอาหาร MRS ที่เติมเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 ได้ และจากรายงานของ Jacobsen et al. (1999)

เมื่อนำเชื้อ LAB มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกพบว่า *Lactobacillus* จำนวน 47 สายพันธุ์ สามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 นอกจากนี้ Erkkila, & Petaja (2000) ยังรายงานว่า *L. sake* และ *Pediococcus acidilactici* มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30 พีเอช 6 เนื่องจากเชื้อ LAB ดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ไบโอสคัลลิ่ง-ไฮโดรเลส และจากงานวิจัยของ Brennan, Wanismail, & Ray (1983) พบว่า *L. acidophilus* เป็นเชื้อ LAB ที่อาศัยในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี โดยมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *L. acidophilus* จึงมีส่วนช่วยปรับปรุงและรักษาสสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้และช่วยรักษาโรคที่เกิดจากลำไส้ด้วย

Table 3 Result of bile salt hydrolase activity.

isolates	bile salt hydrolase activity	
	primary bile salt	secondary bile salt
	(sodium glycolate)	(sodium taurodeoxycholate)
SF1	+	+
SF2	+	+
SF3	+	+
GF1	+	+
GF2	+	+
MF3	+	+
MF4	+	+
MF5	-	-
MF6	-	-

Note: + = positive, - = negative

4. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลท (SF1, SF2, SF3, GF1, GF2, MF3 และ MF4) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* ได้ (ยกเว้นไอโซเลทที่ได้แยกได้จาก

ผักตบชว) และพบว่าไม่มีเชื้อ LAB ไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *S. aureus* ได้ ดังแสดงใน (Table 4) จึงได้นำเชื้อ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือก ลำไส้ (มิวซิน) ต่อไป ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบอาจมาจากฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินที่เชื้อ LAB ผลิตขึ้นจากรายงานการศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเชื้อ LAB ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ นั้นมีหลายชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รูเทอริน อะซิติก-ดีไฮด์ ไดอะซิติก และแบคทีเรียโอซิน (De vuyst, & Vandamme, 1994; Rattanachakunsopon, & Phumkhachorn, 2000) และจากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับการรายงานของ Jacobsen et al. (1999) กล่าวคือเชื้อทดสอบกลุ่มที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก พบว่า เชื้อทดสอบกลุ่มที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus*, *E. coli* และ *Listeria monocytogenes* ได้ดี แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้น้อย ในขณะที่เชื้อโปรไบโอติกสายพันธุ์ที่ใช้ในทางการค้าอย่างแพร่หลาย เช่น LA1 และ DSM 12246 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด โดยเกิดบริเวณส่วนไอโซเนดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งมากกว่า 2 มิลลิเมตรขึ้นไป อย่างไรก็ตามเชื้อที่แยกจากอาหารข้าวโพดหมัก พบว่า มีเพียง 4 สายพันธุ์ (จาก 10 สายพันธุ์) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* มีจำนวน 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* มีจำนวน 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และมี

1 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhimurium* นอกจากนี้ Mishra, & Prasad (2005) รายงานว่าเชื้อ *L. casei* NCDC 17 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhimurium*, *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดี ซึ่งจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Topisirovic et al. (2006) ที่พบว่าเชื้อ LAB ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แยกจากเนยแข็งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้

5. ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อผนังลำไส้ (mucin)

ผลการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับมิวซิน พบว่า เมื่อนับจำนวนเซลล์ของแต่ละไอโซเลทที่ทดสอบการยึดเกาะกับมิวซิน โดยการเพาะเชื้อที่เกาะมิวซินได้ออกมา มีเพียง 4 ไอโซเลท (SF1, SF2, GF1 และ GF2) ที่สามารถยึดเกาะกับมิวซินได้ ดังแสดงใน (Table 5) การใช้มิวซินในการทดสอบการเกาะติดของผนังลำไส้ เป็นการให้โปรตีนเป็นตัวแทนของ intestinal mucin (Tollon et al., 2007) ซึ่งเชื้อ LAB ทั้ง 4 ไอโซเลท แยกได้จากผักดองต่างชนิดกัน จึงได้นำทั้ง 4 ไอโซเลท ไปทำการจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์ต่อไป

Table 4 Antagonistic activity of selected LAB strains against pathogenic bacteria.

isolates	antagonistic activity against pathogenic bacteria		
	<i>E. coli</i> TISTR 887	<i>S. aureus</i> TISTR 029	<i>B. cereus</i> TISTR 687
SF1	+	-	+
SF2	+	-	+
SF3	+	-	-
GF1	+	-	+
GF2	+	-	+
MF3	+	-	-
MF4	+	-	-

Note; degree of inhibition; - = no clear zone (no inhibition) , + = clear zone ≥ 8 mm (inhibition)

Table 5 Adhesion capacity to mucin of selected LAB.

isolates	before mucin adhesion (CFU/mL)	after mucin adhesion (CFU/mL)	adhesion activity
SF1	6.2×10^9	2.7×10^6	+
SF2	7.4×10^9	3.2×10^6	+
SF3	5.8×10^9	nd	-
GF1	2.4×10^{10}	4.5×10^7	+
GF2	3.8×10^9	3.6×10^7	+
MF3	2.9×10^9	nd	-
MF4	1.3×10^{10}	nd	-

Note; - = no adhesion, += mucin adhesion, nd = not detected

6. การจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์เชื้อ LAB ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

เมื่อนำเชื้อ LAB ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ SF1, SF2, GF1 และ GF2 มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ ผลการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ LAB ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยใช้ FTA kit ของ Whatman และเพิ่มปริมาณด้วยการทำพีซีอาร์โดยใช้ universal primer คือ 20F และ 520R ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 bp จากนั้นนำตัวอย่าง PCR product ที่ได้ทั้ง 4 ตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบสายพันธุ์ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTN ผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงขึ้นส่วนของยีน *16S rDNA* พบว่า ไอโซเลท SF1 และ SF2 ที่แยกได้จากต้นหอมแดง คือ *L. plantarum* HL-12 (ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์) ส่วนไอโซเลท GF1 และ GF2 ที่แยกได้จากผักกาดเขียวปลีแดง คือ *L. fermentum* NBRC 15885 (ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์) ผลการทดลองสอดคล้องกับ Yasanga (2008) ซึ่งได้แยกเชื้อ LAB จากผักและผลไม้แดงของไทย 10 ชนิด ได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลท และทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินโดยใช้เชื้อก่อโรค 4 ชนิด เป็นเชื้อทดสอบพบว่า มี 3 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินเมื่อจำแนกชนิดแล้วคือ *L. plantarum* นอกจากนี้ Lee et al. (2011) ได้แยกเชื้อ LAB จากกิมจิได้เชื้อ *L. plantarum* NR74 ที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก จากผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงข้างต้นแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *16S rDNA* ของเชื้อ LAB ไอโซเลท DM068, UMO54, UMO55, VM095, VM096, JM085, JM0812, YM122

และ YM126 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันอยู่ระหว่าง 97-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยทั่วไปเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *16S rDNA* ต้องมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะจัดว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (Simpson, Dijkwel, Quesada, Henderson, & Dean, 2003)

สรุป

เก็บตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้าน ได้แก่ ต้นหอมแดง ผักกาดเขียวปลีแดง และผักรวมแดง มาทำการแยกหาเชื้อ LAB ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท มี 20 ไอโซเลท ที่ไม่สร้างคาตาเลส จึงได้นำมาศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่า มีเชื้อ LAB จำนวน 9 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือได้ดีในระบบทางเดินอาหารได้ ซึ่งใน 9 ไอโซเลท มี 7 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีปัสสาวะ (sodium glycolate) และเกลือน้ำดีทูดิยุม (sodium taurodeoxycholate) จึงนำเชื้อ LAB ทั้ง 7 ไอโซเลท ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* ได้ ยกเว้นไอโซเลทที่แยกได้จากผักกาดรวม เมื่อนำเชื้อ LAB ที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการยึดเกาะผิวเซลล์ พบว่า มีเพียง 4 ไอโซเลท ที่สามารถยึดเกาะผิวเซลล์ได้ จึงได้นำทั้ง 4 ไอโซเลท มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ โดยทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงขึ้นส่วนของยีน *16S rDNA* พบว่า จำแนกชนิดเชื้อได้ 2 สายพันธุ์ ดังนี้ ไอโซเลท SF1 และ SF2 ที่แยกได้จากต้นหอมแดง คือ *L. plantarum* HL-12 ส่วนไอโซเลท GF1 และ GF2 ที่แยกได้จากผักกาดเขียวปลีแดง คือ *L. fermentum*

NBRC 15885 สรุปได้ว่าเชื้อ LAB ทั้ง 4 ไอโซเลตที่แยกได้จากผักดองพื้นบ้านไทยมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดและทนต่อสภาวะเกลือ น้ำดี สามารถยึดเกาะมิวซิน ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย จึงควรพัฒนาและประยุกต์ใช้โปรไบโอติกดังกล่าวในอุตสาหกรรมอาหารหมักต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

เอกสารอ้างอิง

- Brennan, M., WanisMAIL, B., & Ray, B. (1983). Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. *Journal of Food Protection*, 46, 887-892.
- De Man, L. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria : Microbiology, genetics and applications* (pp. 91-142). London: Blackie Academic and Professional.
- Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., & Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 220-228.
- du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlase, B., Ahrens, F., & Holzapfel, W. H. (1998). Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 93-104.
- Erkkila, S., & Petaja. (2000). Screening of commercial meat starter culture at low pH in the presence of bile salt for potential probiotic use. *Journal of Meat Science*, 55, 297-300.
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London Ontario, Canada: FAO/WHO.
- Fuller, R. (1997). *Probiotics 2: Applications and practical aspects*. London: Chapman & Hall.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Itsaranuwat, P., Al-Haddad, K. S. H., & Robinson, R. K. (2003). The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. *International Journal of Dairy Technology*, 56(4), 203-210.
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., & Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization

- ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Karasu, N., Şimşek, Ö., & Çon, A. H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60, 227-234.
- Kos, B., Suskovic J., Goreta, J., & Matosic, S. (2000). Effect of proteases on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal condition. *Food Biotechnology*, 38(2), 121-127.
- Lee, J., Yun, H. U., Cho, K. W., Oh, H., Kim, S. H., Chun, T., Kim, B., & Whang, K. Y. (2011). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 80-86.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H-K, & Holzapfel, W. H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 57-64.
- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 109-115.
- Otterby, D. E., Johnson, D. G., Foley, J. A., Tomsche, D.S., Lundquist, R. G., & Hanson, P. J. (1980). Fermented or chemically-treated colostrum and non-saleable milk in feeding programs for calves. *Journal Dairy Science*, 63, 951-958.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67(2), 309-317.
- Pumriw, S., Luang-In, V., & Samappito, W. (2021). Screening of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented Pak-Sian for use as a starter culture. *Current Microbiology*, 78, 2695-2707.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charemrjitrakul, W., & Sukhoom, A. (2013). Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics for use as starter cultures in Thai fermented sausages (Nham). *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1371-1382.
- Rattanachakunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2000). A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods, *Science Asia*, 26, 195-200.
- Rial, D. R. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *American Society for Nutritional Sciences*, 14(6), 396-402.
- Ruttanasutja, P., & Thongdee, U. (2020). The isolation of cellulase producing bacteria from paddy field soil samples in Phra Nakhon Si Ayutthaya province. *RMUTSB Academic Journal*, 8(2), 165-175. (in Thai)
- Simpson, G. G., Dijkwel, P. P., Quesada, V., Henderson, I., & Dean, C. (2003). FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the Arabidopsis floral transition. *Cell*, 113(6), 777-787.
- 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, 442-451.

- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., & Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 230-235.
- Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J. R., & Holzapfel, W. H. (1992). Identification and characterisation of two bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* isolate from vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 141-151.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895-904.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suarez, V., Quiberoni, A., & Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple *in vitro* tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1678-1688.
- Yasanga, N. (2008). *Isolation and screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from fermented vegetable and fruit products* (Master's thesis). Chiangmai University, Chiangmai. (in Thai)