



การตรวจสอบคุณสมบัติแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเป็นโพรไบโอติกส์สำหรับหมักเครื่องดื่มแพลนต์เบส

Characterization of Lactic Acid Bacteria as Probiotics for the Fermentation of Plant-Based Beverages

รัชณู เมยดง*, รัตน์สุภา ธรรมาภรณ์, สติย์ พันวิไล

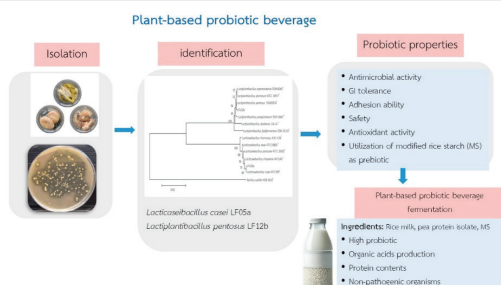
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600

Ratchanu Meidong*, Ratsupa Thammaporn, Sathit Panvilai

Department of Medical Science, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600

Received 22 January 2024; Received in revised 10 February 2025; Accepted 20 March 2025

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Plant-based probiotic products are a type of functional food. The objectives of this study were to screen lactic acid bacteria (LAB) and evaluate their probiotic properties for use as starter cultures in producing plant-based fermented beverages. Isolates LFU05a and LFU12b were selected for further study based on their high antimicrobial activity against the tested bacterial pathogens, survival after exposure to simulated gastrointestinal tract conditions (67.54-73.83%), good adhesion ability, absence of hemolytic activity, antibiotic susceptibility, and antioxidant activity (64.23-83.26%). LFU05a and LFU12b were identified as *Lactocaseibacillus casei* and *Lactiplantibacillus pentosus*, respectively. For prebiotic selection, modified rice starch (MS) demonstrated a prebiotic

effect by enhancing the growth of *L. casei* LFU05a and *L. pentosus* LFU12b. Furthermore, plant-based fermented beverages made from rice supplemented with 10% of pea protein isolate (PPI) and 1% of MS exhibited high probiotic viability (8.45 log CFU/ml). The results indicated that *L. casei* LFU05a and *L. pentosus* LFU12b are effective starter cultures for the production of plant-based probiotic beverages.

คำสำคัญ

แบคทีเรียกรดแล็กติก;
โพรไบโอติกส์;
เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ;
ข้าว;
ถั่วลันเตา

Keywords

Lactic acid bacteria;
Prebiotics;
Functional beverage;
Rice;
Pea

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์แพลนต์เบสเป็นอาหารเพื่อสุขภาพประเภทหนึ่ง วัดประสิทธิภาพของการศึกษานี้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกและประเมินคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเครื่องดื่มหมักแพลนต์เบส ไอโซเลต LFU05a และ LFU12b ถูกเลือกไปศึกษาต่อเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทดสอบได้สูง สามารถรอดชีวิตเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะจำลองของทางเดินอาหาร (ร้อยละ 67.54-73.83) มีคุณสมบัติในการเกาะที่ดี ไม่ย่อยสลายเมื่อดูดซับ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะและมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ 64.23-83.26) ไอโซเลต LFU05a และ LFU12b ถูกจำแนกว่าตรงกับเชื้อ *Lactocaseibacillus casei* และ *Lactiplantibacillus pentosus* ตามลำดับ สำหรับการคัดเลือกโพรไบโอติกส์พบว่าแป้งข้าวตัดแปลงมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์สำหรับการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ LFU05a และ LFU12b ทั้งนี้เครื่องดื่มหมักแพลนต์เบสจากข้าวเสริมโปรตีนสกัดจากถั่วลันเตาร้อยละ 10 และแป้งข้าวตัดแปลงร้อยละ 1 มีเชื้อโพรไบโอติกส์ปริมาณสูง (8.45 log CFU/ml) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า *L. casei* LFU05a และ *L. pentosus* LFU12b เป็นหัวเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเครื่องดื่มหมักแพลนต์เบสโพรไบโอติกส์

*ผู้รับผิดชอบบทความ: ratchanu.me@bsru.ac.th

1. บทนำ

แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์หลักในการผลิตอาหารหมักและใช้เป็นโพรไบโอติกส์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียจีส *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactocaseibacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Bacillus* sp. [1] โดยโพรไบโอติกส์คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม [2, 3] เกณฑ์สำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ประกอบด้วยความสามารถในการรอดชีวิตเมื่อทดสอบในสภาวะของทางเดินอาหาร การทนต่อเกลือ น้ำดี ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อผิวของลำไส้ มีความปลอดภัย อีกทั้งต้องเป็นเชื้อที่ไม่ก่อต่อยาปฏิชีวนะ ไม่ผลิตสารพิษ และไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเมื่อดูดแห้ง [4, 5] รวมถึงมีคุณสมบัติทางฟังก์ชันประกอบด้วยกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ การผลิตวิตามิน และการผลิตกาบา เป็นต้น การที่โพรไบโอติกส์จะสามารถแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ได้ดีนั้นมียางานว่าต้องได้รับอาหารที่เหมาะสม นั่นคือสารประกอบกลุ่มพรีไบโอติกส์ (Prebiotics) [6] สารประกอบที่มีรายงานว่าเป็นพรีไบโอติกส์ได้แก่ อินนูลิน (Inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosaccharide, FOS) และกาแล็กโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharide, GOS) รวมถึงกลุ่มแป้งดัดแปลง โดยมีรายงานการใช้แป้งดัดแปลงเป็นพรีไบโอติกส์ในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกส์และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ [7, 8] ซึ่งการใช้โพรไบโอติกส์ร่วมกับพรีไบโอติกส์เรียกว่าซินไบโอติกส์ (Synbiotics) ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในรูปแบบซินไบโอติกส์ต่อสุขภาพหลายประการ

อาหารที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ได้ถูกจัดให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ (Functional foods) ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมคือน้ำนมที่หมักด้วย

โพรไบโอติกส์ เช่นโยเกิร์ต และนมเปรี้ยว แต่ทั้งนี้มียางานว่าการบริโภคน้ำนมอาจส่งผลเสียต่อคนบางกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแพ้น้ำตาลแล็กโตสในนม [9] รวมถึงรูปแบบการเลือกบริโภคในปัจจุบัน เช่น กลุ่มมังสวิรัตและวีแกน จึงมีแนวโน้มที่เครื่องดื่มจากพืชหรือแพลนต์เบสเริ่มเข้ามาทดแทนเครื่องดื่มจากน้ำนมสัตว์ เพื่อเป็นทางเลือกของผู้บริโภค ซึ่งตรงกับรายงานผลการสำรวจความต้องการด้านผลิตภัณฑ์สำหรับกลุ่มมังสวิรัตและวีแกนพบว่าเพิ่มขึ้นทุกปี [10] แต่ข้อด้อยของเครื่องดื่มแพลนต์เบสนั้นคือมีโปรตีนต่ำกว่าน้ำนมสัตว์ [11] จึงจำเป็นต้องเสริมให้ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นนั้นมีปริมาณโปรตีนเทียบเท่ากับเครื่องดื่มจากน้ำนมเพื่อความสะดวกด้านคุณค่าทางโภชนาการอาหาร

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชที่ปลูกมากในหลายประเทศของเอเชียรวมถึงประเทศไทย เป็นอาหารที่ให้พลังงานสูงอันเนื่องมาจากองค์ประกอบหลักคือแป้ง นอกจากนี้ยังประกอบด้วยโปรตีนและแร่ธาตุรวมถึงวิตามิน [12] จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเครื่องดื่มหมักแพลนต์เบส ทั้งนี้พืชอีกชนิดที่ได้รับความนิยมคือถั่วลันเตา (*Pisum sativum* Linn) ในด้านของโปรตีนที่สกัดมาจากถั่วลันเตา จึงนำมาศึกษาเพื่อเสริมโปรตีนให้แก่เครื่องดื่มที่พัฒนาขึ้น เนื่องจากถั่วลันเตามีโปรตีนย่อยได้ที่ร้อยละ 66-91 อีกทั้งในปัจจุบันโปรตีนสกัดจากถั่วลันเตาได้รับความนิยมสูง จึงเหมาะสมในการใช้เป็นโปรตีนเสริมให้แก่เครื่องดื่มที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ [13] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ที่สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการพัฒนาเครื่องดื่มหมักด้วยโพรไบโอติกส์จากข้าวเสริมโปรตีนจากถั่วลันเตาได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง

ตัวอย่างอาหารหมักที่เก็บจากตลาดสดในพื้นที่กรุงเทพมหานคร นำมาเจือจางลงครึ่งละ 10 เท่า (10-

Fold dilution) ด้วย Normal saline solution (0.85% NaCl, NSS) ก่อนแยกเชื้อด้วย Spread plate technique บนอาหาร De man rogosa and sharpe agar (BioMérieux, France) ที่ผสม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 (MRS- CaCO_3) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลือกโคโลนีที่ปรากฏขึ้นในสไลด์ โคโลนี ตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการศึกษาลักษณะเซลล์และการติดสีแกรมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (CX22, Olympus, Tokyo, Japan) และเก็บในกลีเซอรอลร้อยละ 20 (w/v) ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์

2.2.1 การทดสอบกิจกรรมต้านแบคทีเรียก่อโรค

ตรวจการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคตามวิธีของ Meidong et al. [14] แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DMST 8023, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* DMST 562 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 เลี้ยงในอาหาร Mueller hinton (MH) broth (BD Difco, USA) และปรับความขุ่นเทียบเท่า McFarland no 0.5 ก่อน Swab บน MH agar และเจาะหลุมด้วย Cork borer และหยด Neutralized cell-free supernatant (NCFS) ลงในหลุมที่เจาะไว้ ก่อนนำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดของโซนใสการยับยั้ง (Inhibition zone)

2.2.2 การทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะจำลองของทางเดินอาหาร

การทดสอบทำตามวิธีของ Huang and Adams [15] โดยนำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแล็กติก (1×10^8 CFU/ml) ทดสอบใน Simulated gastric fluid (SGF) (1% Pepsin, pH 2.5) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนตรวจการรอดชีวิตของเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างที่อยู่ใน SGF ไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์เพื่อไปทดสอบต่อในด้านการทนต่อสภาวะจำลองในลำไส้โดย

ทดสอบด้วย Simulated intestinal fluid (SIF) (1% Pancreatin, 0.3% Bile salt, pH 8.0) ตรวจการรอดชีวิตหลังทดสอบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี Drop plate technique ด้วยอาหาร MRS- CaCO_3 จากนั้นคำนวณการรอดชีวิตใน SGF และ SIF ดังนี้ $\% \text{Survival} = (\log_{10} \text{จำนวนเซลล์หลังทดสอบที่เวลาต่างๆ} / \log_{10} \text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}) \times 100$

2.2.3 การทดสอบความสามารถในการเกาะ

Auto-aggregation assay ทำตามวิธีของ Meidong et al. [14] ใช้เซลล์แขวนลอยที่มีความขุ่นที่ OD_{600} ที่ค่า 1.0 จัดเป็นค่าความขุ่นเริ่มต้น (OD_0) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่า และนำส่วนด้านบนของเซลล์แขวนลอยไปวัดความขุ่นของเชื้อ (OD_5) ด้วย UV-Vis Spectrophotometer (C7₁₀₀, Peak instruments Inc., USA) จากนั้นคำนวณ $\% \text{Auto-aggregation (AAg\%)}$ ดังนี้: $1 - (\text{OD}_5 / \text{OD}_0) \times 100$

Hydrophobicity assay ทดสอบตามวิธีของ Meidong et al. [14] โดยปรับความขุ่นของแบคทีเรียกรดแล็กติกใน PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.2) โดยปรับให้มีความขุ่นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.5 ($\text{OD}_{\text{before}}$) นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาตร 3 ml ผสมกับไซลีน (Xylene) ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปเขย่า (Vortex) ให้ผสมกันเป็นเวลา 60 วินาที ตั้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นเป็นเวลา 30 นาที นำเซลล์แขวนลอยในชั้นของน้ำไปตรวจวัดความขุ่น (OD_{after}) โดยใช้ PBS เป็นสารละลายตัวอย่างแบบลงค์ (Blank) นำผลที่ได้ไปคำนวณ $\% \text{Hydrophobicity} = [(\text{OD}_{\text{before}} - \text{OD}_{\text{after}}) / \text{OD}_{\text{before}}] \times 100$

Mucin binding assay ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียต่อการเกาะกับมูซิน (Mucin type III, Sigma-aldrich, USA) ตามวิธีของ Tallon et al. [16] โดยใช้สารประกอบมูซินเคลือบที่ Microtiter 96 MicroWell™ plates และอูบรีเวนท์ที่มูซินไม่เกาะด้วยสารละลาย Bovine serum albumin (BSA; Sigma-

aldrich, USA) ก่อนที่จะเติมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียทดสอบ (1×10^6 CFU/ml) ปริมาตร 0.1 ml ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นนับเซลล์ที่เกาะกับผิวชิ้นด้วยเทคนิค Spread plate ด้วยอาหาร MRS-CaCO₃ และหาร้อยละการเกาะติด [% Adhesion = (จำนวนเซลล์ที่เกาะต่อหลุม / จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อหลุม) $\times$ 100] ในการทดลองนี้แต่ละไอโซเลตจะทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ *Lactiplantibacillus plantarum* 299v เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

2.2.4 การทดสอบความปลอดภัย

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแล็กติกทดสอบตามวิธี Kirby-bauer agar disk diffusion method ที่อธิบายไว้ในงานของ Selvin et al. [17] แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดสอบนี้คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ 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) ตรวจโซนใสในการยับยั้งเชื้อของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดนำไปเทียบผลกับ Clinical laboratory standards institute (CLSI) Guidelines แล้วรายงานในเทอมของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Resistant; R) และไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptible; S)

ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity) ตรวจสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกลงบนอาหาร Blood agar (BioMérieux, France) โดยตรวจผลหลังการบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.5 การตรวจสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH Free radical scavenging ability ทำตามวิธีของ Jang et al. [18] ใช้ Cell-free supernatant (CFS) ปริมาตร 0.05 ml ของแบคทีเรียกรดแล็กติกมาทดสอบ (A_{sample}) กับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich, USA) (0.2 mM ละลายใน 95% Ethanol)

ปริมาตร 0.15 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (ให้ค่าเป็น A blank) แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm ในการทดสอบนี้ใช้ MRS Broth เป็นหลอดควบคุม (A control) แล้วนำไปคำนวณค่า Scavenging effect (%) = $[1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100]$ วิธีที่สองคือ Reducing power ใช้วิธีของ Safronova et al. [19] โดยใช้ CFS ผสมกับสารละลาย 1 M PBS (pH 6.6) และเติม 1% Potassium ferricyanide นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่บ่มจนเย็น และเติมสารละลาย 10% Trichloroacetic acid (TCA) ที่บ่มให้ตกตะกอน นำสารละลายไปผสมกับ 0.1% Ferric chloride และนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนในก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm นำผลมาคำนวณค่า Reducing power (%) = $[1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100]$

2.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี และทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL (BioMérieux, France) จากนั้นยืนยันด้วย 16S rRNA gene sequencing โดยเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเอนไซม์ Taq DNA Polymerase ร่วมกับไพรเมอร์ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') นำลำดับ 16S rRNA gene ของแต่ละไอโซเลตที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีฐานข้อมูลใน GenBank databases และ Ezbiocloud databases สร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA ver. 11 [20]

2.4 การคัดเลือกพรีไบโอติกส์

ศึกษาผลของสารประกอบพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ *Lactocaseibacillus casei* LFU05a ที่แยกมาจากนม และ *Lactocaseibacillus paracasei* LFU12b ที่แยกมาจากนมเห็ด โดยอาหารที่ใช้ทดสอบคือ Basal medium (ใน 1 L ประกอบด้วย NH₄Cl, 2.5 g; Yeast extract,

0.01 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; NaCl, 0.02 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g ที่ pH 7.0) แหล่งคาร์บอนทดสอบประกอบด้วย กลูโคส, แป้งดัดแปลง (Modified rice starch; MS [8]), ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และอินูลิน (Sigma-aldrich, USA) ที่ร้อยละ 1.0 ปรับเชื้อทดสอบมีค่าเริ่มต้นที่ 1×10^5 CFU/ml จากนั้นนำไปหมักแบบเขย่าที่ 150 rpm, 35°C ตรวจการเจริญของโพรไบโอติกส์ในอาหารสูตรต่าง ๆ ด้วยวิธี Drop plate technique ด้วยอาหาร MRS- CaCO_3 ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

2.5 การศึกษาการทำเครื่องดื่มหมักซินไบโอติกส์จากข้าวเสริมโปรตีนสกัดจากถั่วลิสง

เตรียมข้าวสาคูด้วยการนำเมล็ดข้าวสาคูพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นำมาสักรด้วยน้ำร้อน (80°C) ในอัตราส่วน 3:10 เป็นเวลา 30 นาที แต่ละสูตรของเครื่องดื่มที่ศึกษาใช้โปรตีนถั่วลิสงสกัด [Pea protein isolate (PPI), Nuzest pea protein, Australia] ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในแต่ละสูตร โดยส่วนประกอบในเครื่องดื่มปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย น้ำตาล (1 %) เพคติน (0.05 %) โปรไบโอติกส์ MS (1 %) น้ำข้าวสาคู (100 ml) โดยสูตรที่ 1 ไม่มี PPI (ชุดควบคุม, RPPI_0) สูตรที่ 2 PPI 5% (RPPI_5) สูตรที่ 3 PPI 10% (RPPI_10) สูตรที่ 4 PPT 15% (RPPI_15) ในแต่ละสูตรเมื่อผสมให้เข้ากันแล้วนำไปฆ่าเชื้อ (95°C , 30 นาที) ปล่อยให้เย็นก่อนเติมหัวเชื้อโพรไบโอติกส์แบบเชื้อผสมสายพันธุ์ *L. casei* LFU05a และ *L. pentosus* LFU12b (10^6 CFU/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C โดยที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวิเคราะห์เครื่องดื่มหมัก ดังนี้ 1) ตรวจหาปริมาณโพรไบโอติกส์ด้วยวิธี Plate count technique ด้วย MRS- CaCO_3 2) ตรวจ pH ด้วย pH Meter (Mettler toledo, Switzerland) 3) วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกในเครื่องดื่มด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ C18 Reversed phase column (Alltech, Prevail™ Organic Acid, $5\mu\text{m}$, 150×4.6 mm) สารละลายที่ใช้เป็น Mobile phase คือ $25 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2.5; 3M

Phosphoric acid) ที่อัตราการไหล 1 mL/min และตรวจวัดสารด้วย UV-Vis detector (Waters 2489, Waters Corp., USA) ที่ 220 nm ปริมาตรที่ฉีดคือ 10 μL และคำนวณความเข้มข้นของกรดอินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับกรดมาตรฐานแต่ละชนิด และ 4) เครื่องดื่มแต่ละสูตรนำไปวิเคราะห์สารอาหารแบบ Proximate analysis ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถ้าในเครื่องดื่มแต่ละสูตร [21]

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance: ANOVA) เมื่อความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

แยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จำนวน 70 ไอโซเลต จากตัวอย่างอาหารหมักต้องจำนวน 24 ตัวอย่าง ประกอบด้วย กิมจิ แหนมปลา แหนมหมู หมูไม่ดอง หม่า ปูดอง ต้นหอมดอง ผักดอง แหนมเห็ด ปลาสามไส้กรอกอีสาน หอยดองและแหนมเนื้อ แบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion assay โดยไอโซเลตที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ได้สูงแสดงผลการทดสอบไว้ใน Table 1 และเป็นไอโซเลตที่ถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป จากผลการศึกษาพบว่าไอโซเลต LFU05a ยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium (20.33 mm) และ *P. aeruginosa* (21.33 mm) ได้สูงที่สุด แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลตอื่น ๆ ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคทดสอบได้สูงคือ LFU23d ยับยั้ง *E. coli* (21.33 mm), LFU22b ยับยั้ง *S. aureus* (19.50 mm), และ LFU12b ยับยั้ง *B. cereus* (17.66 mm)

Table 1 Antimicrobial activity of LABs against bacterial pathogen tested strains.

Bacterial pathogen tested	Inhibition zone (mm)				
	LFU05a	LFU12b	LFU16c	LFU22b	LFU23d
<i>Salmonella typhimurium</i>	20.33±0.47 ^c	17.66±1.24 ^a	19.66±0.37 ^b	19.68±0.56 ^b	17.33±0.65 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	21.33±0.57 ^d	15.33±0.43 ^b	18.66±0.55 ^c	12.66±0.68 ^a	15.66±0.63 ^b
<i>E. coli</i>	18.33±0.36 ^b	19.68±0.56 ^c	20.67±0.49 ^c	15.66±0.75 ^a	21.33±1.54 ^d
<i>S. aureus</i>	17.33±0.54 ^b	16.50±0.86 ^{ab}	15.83±0.28 ^a	19.50±0.5 ^c	17.33±0.52 ^b
<i>B. cereus</i>	17.33±0.57 ^d	17.66±0.56 ^d	13.67±0.64 ^a	16.83±0.28 ^c	15.33±0.54 ^b

Means in the same row with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

3.2 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์

ผลการทดสอบการทนต่อสภาวะจำลองในทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแล็กติกหลังเวลา 3 ชั่วโมง ของการทดสอบในสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารเชื้อที่รอดชีวิตสูงสุด 3 อันดับแรกคือ LFU22b, LFU16c และ LFU12b โดยมีร้อยละการรอดชีวิตที่ร้อยละ 95.97, 92.22 และ 88.74 ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต LFU22b, LFU16c และ LFU05a มีอัตราการรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะในลำไส้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่ร้อยละ 88.19, 83.46 และ 76.54 ตามลำดับ (Table 2)

ผลการทดสอบค่าการเกาะของแบคทีเรียกรดแล็กติกแสดงใน Table 2 โดยเริ่มจากค่า Auto-aggregation พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 5 ไอโซเลตมีค่า Auto-aggregation อยู่ระหว่างร้อยละ 36.98 ถึง 82.65 ค่า Hydrophobicity ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 5 ไอโซเลตมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 19.91 ถึง 69.96 ในขณะที่การทดสอบ Mucin binding บ่งบอกถึงค่าการเกาะกับสารประกอบมิวซินที่ผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 5 ไอโซเลต ซึ่งในการศึกษานี้เทียบกับเชื้ออ้างอิง *L. plantarum* 299v ที่มีค่าการเกาะกับมิวซินที่ร้อยละ 80.38 ในขณะที่แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 5 ไอโซเลต มีค่าการเกาะที่มีมิวซินอยู่ระหว่างร้อยละ 18.35 ถึง 65.20

การทดสอบความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแล็กติก แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 5 ไอโซเลต ไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงหลังทดสอบด้วยการเลี้ยงในอาหาร Blood agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงถือว่ามีความปลอดภัยในเบื้องต้น อีกทั้งผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด ซึ่งเป็นยาที่ใช้ทางคลินิก ประกอบด้วย Penicillin G (10U), Vancomycin (30 µg), Tetracycline (30 µg), Gentamycin (10 µg), Erythromycin (15 µg), Chloramphenicol (30 µg) และ Streptomycin (10 µg) พบว่าไอโซเลตที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ Tetracycline ได้แก่ LFU05a และ LFU23d ไอโซเลตที่ไวต่อยา Penicillin G คือ LFU16c ไอโซเลตที่ไวต่อยา Erythromycin, Chloramphenicol และ Streptomycin คือ LFU23d, LFU22b และ LFU12b ตามลำดับ

ผลการทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 5 ไอโซเลต ผลการทดสอบแสดงใน Table 2 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH Free radical scavenging พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่างร้อยละ 58.65 ถึง 83.26 ไอโซเลตที่มีค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงที่สุดคือ ไอโซเลต LFU12b ที่ร้อยละ 83.26 และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Reducing power พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 48.31 ถึง 65.26 โดยไอโซเลตที่มีค่า Reducing power สูงที่สุดคือ LFU12b (ร้อยละ 65.26)

Table 2 Gastrointestinal tract tolerance, antioxidant, auto-aggregation, hydrophobicity, and mucin binding activity of LAB strains.

Probiotic properties (%)	LFU05a	LFU12b	LFU16c	LFU22b	LFU23d
3 h after exposure in SGF	82.67±0.75 ^a	88.74±1.38 ^{bc}	92.22±0.71 ^c	95.97±0.76 ^d	85.34±4.12 ^{ab}
6 h after exposure in SIF	76.54±4.17 ^b	73.38±0.88 ^{ab}	83.46±3.86 ^c	88.19±1.14 ^c	69.67±3.86 ^a
DPPH assay	64.28±3.15 ^{ab}	83.26±4.57 ^d	75.19±4.02 ^c	58.65±5.85 ^a	68.16±2.32 ^{bc}
Reducing assay	57.96±2.66 ^{ab}	65.26±3.26 ^b	56.28±5.45 ^{ab}	48.31±9.31 ^a	59.33±8.68 ^{ab}
Auto-aggregation	64.13±3.05 ^b	44.54±4.08 ^a	36.98±6.02 ^a	74.21±4.17 ^c	82.65±5.49 ^c
Hydrophobicity	42.40±3.29 ^c	34.82±4.61 ^b	19.91±2.06 ^a	56.54±4.16 ^d	69.96±2.21 ^e
Mucin binding	37.68±1.54 ^c	25.68±4.26 ^b	18.35±2.51 ^a	50.63±3.03 ^d	65.20±4.15 ^e

Means in the same row with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

3.3 ผลการจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพสำหรับนำไปศึกษาต่อ มี 2 ไอโซเลต ได้แก่ LFU05a และ LFU12b ถูกนำมาจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลต LFU05a ตรงกับ *Lactocaseibacillus casei* (99.98%) และไอโซเลต LFU12b ตรงกับ *Lactiplantibacillus pentosus* (99.76%) โดย Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งสองสายพันธุ์แสดงใน Figure 1

3.4 ผลการคัดเลือกพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์

ผลของสารประกอบพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์แสดงใน Figure 2 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *L. casei* LFU05a ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิด หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเจริญได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเลี้ยงใน MS (9.14 log CFU/ml) และอินูลิน (9.01 log CFU/ml) ขณะที่ *L. pentosus* LFU12b มีการเจริญสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงในพรีไบโอติกส์ FOS โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 8.77 log CFU/ml ทั้งนี้ยังพบว่าสามารถเจริญได้ดีเช่นเดียวกันเมื่อเลี้ยงใน MS (8.32 log CFU/ml) และอินูลิน (8.29 log CFU/ml) จากผลการทดลองนี้พบว่า MS มีคุณสมบัติของพรีไบโอติกส์ในการส่งเสริมการเจริญแบคทีเรียโพรไบโอติกส์

ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีเทียบเท่าพรีไบโอติกส์ทางการค้าจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5 การหมักเครื่องดื่มแพลนต์เบสได้จากข้าวและโปรตีนสกัดจากถั่วลันเตา

การวิเคราะห์เครื่องดื่มแสดงใน Table 3 พบว่าการเจริญของเชื้อ LABs เพิ่มสูงหลังบ่ม 12 ชั่วโมง (6.78-6.97 log CFU/ml) และเจริญสูงสุดหลังหมัก 24 ชั่วโมง (7.45-8.58 log CFU/ml) โดยสูตรที่มี PPI ที่ร้อยละ 5-15 มีการเจริญของโพรไบโอติกส์ได้สูงกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในสูตรที่มี PPI ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยค่า pH ในเครื่องดื่มมีค่าอยู่ระหว่าง 4.432-4.912 โดยสูตร RPPI_5, RPPI_10 และ RPPI_15 มีค่า pH ต่ำกว่าสูตรควบคุม (RPPI_0) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบปริมาณกรดแล็กติกในเครื่องดื่มพบว่าในเครื่องดื่มหมักทั้ง 4 สูตรมีปริมาณระหว่าง 346.35-362.66 mg/L โดยเครื่องดื่ม RPPI_10 และ RPPI_15 มีปริมาณกรดแล็กติกสูงกว่าสูตร RPPI_0 และ RPPI_5 อย่างมีนัยสำคัญ ในด้านโภชนาการของเครื่องดื่มของทุกสูตรมีค่าไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 91.58-93.76 โปรตีนร้อยละ 0.33-13.94 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 7.68-12.01 ไขมันร้อยละ 0.073-0.13 เกลือร้อยละ 0.033-0.035 และพลังงาน 0.83-3.35 Kcal/100 g

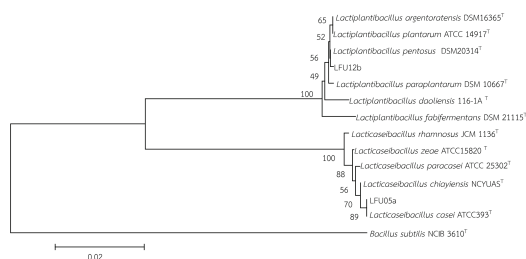


Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of LAB strains.

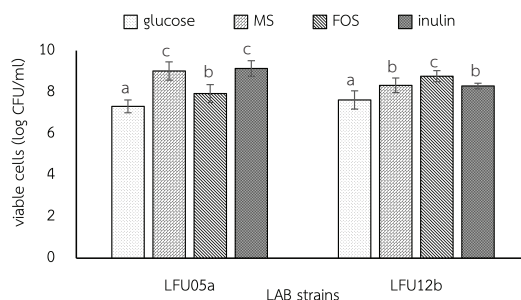


Figure 2 The growth of *L. casei* LFU05a and *L. pentosus* LFU12b in various sources of prebiotics. Means at the same strain with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Table 1 Antimicrobial activity of LABs against bacterial pathogen tested strains.

Beverage analysis	LABs growth in beverage (log CFU/ml)			
	RPPI_0	RPPI_5	RPPI_10	RPPI_15
0 h	5.20±0.11 ^a	5.19±0.08 ^a	5.21±0.01 ^a	5.07±0.06 ^a
12 h	6.78±0.17 ^a	6.87±0.28 ^{ab}	6.90±0.46 ^{ab}	6.97±0.64 ^b
24 h	7.45±0.15 ^a	8.34±0.57 ^b	8.45±0.52 ^b	8.58±0.85 ^b
DPPH assay in beverage (48 h)	57.96±2.66 ^{ab}	65.26±3.26 ^b	56.28±5.45 ^{ab}	48.31±9.31 ^a
pH	4.912±0.12 ^b	4.461±0.42 ^{ab}	4.443±0.36 ^a	4.432±0.28 ^a
Lactic acids (mg/L)	346.35±16.16 ^a	347.67±18.33 ^a	358.67±8.32 ^b	362.66±17.47 ^b

Means in the same row with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

4. วิจัยการผลิตทดลอง

โพรไบโอติกส์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกมีรายงานว่าสามารถแยกได้จากกลุ่มอาหารหมักดอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากนํ้านมหมัก และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (หม่า แหนมเนื้อ แหนมหมู และผักดอง) ในงานนี้ โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ *L. casei* LFU05a แยกได้จากหม่า และ *L. pentosus* LFU12b แยกมาจากแหนมเห็ด ซึ่งมีสมบัติของโพรไบโอติกส์ประกอบด้วยการมีกิจกรรมต้านเชื้อก่อโรค มีความสามารถทนต่อสภาวะในกระเพาะและลำไส้ การเกาะในเยื่อลำไส้ [4] มีความปลอดภัยได้แก่การไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะและไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง [22]

และคุณสมบัติทางฟังก์ชันคือมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ [5] โดยทั้งสองสายพันธุ์ยังมีรายงานว่ามีความปลอดภัยในการใช้เป็นโพรไบโอติกส์ดังรายการใน European food safety authority (EFSA) [23]

คุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคจัดเป็นเกณฑ์สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ การที่แบคทีเรียโพรไบโอติกส์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อันเนื่องมาจากการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กรดอินทรีย์และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตแบคทีเรียโอซิน โพรไบโอติกส์ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตสารประกอบกลุ่มแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้ง

แบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Broad spectrum) ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น *Pediococcus acidilactici* F32 [24] และ *L. paracasei* [25] ทั้งนี้ในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ต้องเป็นสายพันธุ์ที่รอดชีวิตเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารได้ โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกมานี้ เมื่อทดสอบอย่างต่อเนื่องในสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้พบว่ามียัตรารอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 60 ซึ่งถือว่าการรอดชีวิตที่สูง ดังการทดสอบของเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. จำนวน 30 สายพันธุ์ ที่รอดชีวิตหลังทดสอบในสภาวะ SGF และ SIF [4] ในส่วนคุณสมบัติด้านการเกาะจับเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญในการคัดเลือกโพรไบโอติกส์ ในงานนี้ตรวจสอบในระดับ *in vitro* ของโพรไบโอติกส์ *L. casei* LFU05a และ *L. pentosus* LFU12b จากค่า Auto-aggregation ที่เป็นความสามารถของจุลินทรีย์ที่จับกันโดยทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ บนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกัน [5] ถัดมาตรวจสอบค่า Hydrophobicity ซึ่งเป็นหนึ่งค่าที่ใช้ประเมินความสามารถในการเกาะเช่นเดียวกัน ทำการทดสอบกับ Xylene เป็นการตรวจสอบลักษณะบนผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic cell) และตรวจสอบค่า Mucin binding ability ที่ทดสอบกับสารประกอบมิวซินที่พบในเยื่อของลำไส้เล็ก จากคุณสมบัติทั้ง 3 นี้สามารถบ่งบอกความสามารถของจุลินทรีย์ในการเกาะที่ดี [22, 26]

สมบัติของโพรไบโอติกส์ที่สำคัญต่อมาคือด้านความปลอดภัย โดยตรวจสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นเกณฑ์ด้านความปลอดภัยอย่างหนึ่งของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ การที่จุลินทรีย์ย่อยเม็ดเลือดแดงอันเนื่องมาจากการผลิตฮีมโกลิน คือสารพิษที่ทำลายเมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก และอีกคุณสมบัติคือความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยพบว่า *L. casei* LFU05a ต่อยาเตตราไซคลิน และ *L. pentosus* LFU12b ต่อยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน แต่ไวต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิดที่ทดสอบ จากการศึกษา

แสดงให้เห็นว่า *L. casei* LFU05a และ *L. pentosus* LFU12b มีความปลอดภัยในเบื้องต้นสามารถนำไปใช้ในมนุษย์และสัตว์ได้ [1, 2] อีกหนึ่งคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีความสำคัญ และได้ตรวจสอบในครั้งนี้ คือ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีรายงานว่าการผลิตสารอนุมูลอิสระในร่างกายที่มากเกินไปจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย [27] โดยในงานนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติก *L. casei* LFU05a และ *L. pentosus* LFU12b มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jang et al. [18] ได้ศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสายพันธุ์ *L. plantarum* Ln1 ด้วยวิธี DPPH assay มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 24.16 และในงานของ Safronova et al. [19] รายงานว่า CFS ของโพรไบโอติกส์มีค่า Reducing power อยู่ที่ร้อยละ 78.8

ในการคัดเลือกสารประกอบพรีไบโอติกส์ได้ทำการทดสอบกับแป้งดัดแปลง (MS) อินูลิน และ FOS พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีใน MS เทียบเท่ากับพรีไบโอติกส์ทางการค้า ซึ่งมีรายงานการใช้แป้งดัดแปลงหรือแป้งท่นย่อยมาศึกษาคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกส์ ตัวอย่างเช่น แป้งดัดแปลงจากมันม่วงในการส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium* sp. [28] แป้งท่นย่อยจากปาล์มสาคุต่อการส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* และ *B. animalis* [29] แป้งท่นย่อยจากกล้วยต่อการเจริญของ *Lactobacillus* sp. [30] และ แป้งดัดแปลงจากข้าวต่อการเจริญของ *L. plantarum* [31] ในการพัฒนาเครื่องดื่มครั้งนี้ได้ใช้ข้าวซึ่งเป็นแหล่งอาหารหลักที่มีการเพาะปลูกมากในไทยมาศึกษาโดยการหมักเครื่องดื่มซินไบโอติกส์แพลนต์เบสได้จากข้าวเสริม PPI พบว่าเครื่องดื่มที่เสริม PPI ที่ร้อยละ 5-15 มีปริมาณโพรไบโอติกส์ และปริมาณกรดแล็กติก สูงกว่าสูตรควบคุม โดยเครื่องดื่มหมักจากโพรไบโอติกส์ควรมีปริมาณเชื้อ 6-7 log CFU/100 ml [32] ในงานนี้พบว่า มีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกส์สูงกว่า 8 log CFU/ml จึงถือว่าโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถใช้เป็นหัวเชื้อ

ในการผลิตเครื่องดื่ม เนื่องจากเจริญในสูตรเครื่องดื่มที่พัฒนาขึ้นได้และมีปริมาณโพรไบโอติกส์เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องปริมาณเชื้อที่มีชีวิตตลอดระยะเวลาต้องไม่น้อยกว่า 6 log CFU/g และสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาอยู่ในรายชื่อที่แนบท้ายประกาศ อีกทั้งยังพบว่าโพรไบโอติกส์สามารถผลิตกรดแล็กติกสูงในสูตรที่เสริม PPI เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม และปริมาณโปรตีนในเครื่องดื่มที่วิเคราะห์ได้ขึ้นกับปริมาณที่เติมลงไปในแต่ละสูตร สูตรที่เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อคือ RPPI_10 ซึ่งพิจารณาจากปริมาณโพรไบโอติกส์ การผลิตกรดอินทรีย์ และคุณค่าทางโภชนาการ

5. สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจากอาหารหมักดองได้แก่สายพันธุ์ *L. casei* LFU05a และ *L. pentosus* LFU12b ถูกคัดเลือกเป็นโพรไบโอติกส์ที่เหมาะสมด้วยคุณสมบัติที่สำคัญประกอบด้วย คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค การทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ ความสามารถในการเกาะ เป็นเชื้อที่ปลอดภัยและมีคุณสมบัติฟังก์ชันคือกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แปรรูปที่ทางผู้วิจัยเตรียมขึ้นเป็นแหล่งพรีไบโอติกส์สำหรับการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ทั้งสองสายพันธุ์ได้ อีกทั้งเมื่อพัฒนาเครื่องดื่มหมักขึ้นโพรไบโอติกส์แพลนต์เบสได้จากข้าวเสริมโปรตีนจากถั่วลันเตาสกัดพบว่าเครื่องดื่มหมักนี้ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตสูง โดยสูตรที่เหมาะสม มีโปรตีนสูง ให้พลังงานต่ำเหมาะสมเป็นเครื่องดื่มหมักขึ้นโพรไบโอติกส์แพลนต์เบสเพื่อสุขภาพ

6. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ รหัสโครงการ N13A660020 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

7. References

- [1] Dudek-Wicher, R., Junka, A., Paleczny, J. and Bartoszewicz, M., 2020, Clinical trials of probiotic strains in selected disease entities, *Int. J. Microbiol.* 2020: 8854119.
- [2] Ghosh, T., Beniwal, A., Semwal, A. and Navani, N.K., 2019, Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products, *Front. Microbiol.* 10: 502.
- [3] Deng, Z., Hou, K., Zhao, J. and Wang, H., 2021, The probiotic properties of lactic acid bacteria and their applications in animal husbandry, *Curr. Microbiol.* 79(1): 22.
- [4] Shen, F., Zhuang, J., Wang, Q., Zhang, J., Liu, T., Ruan, S., Du, J., Zhong, H., Zhao, M. and Feng, F., 2023, Screening of novel probiotics with intestinal peristalsis-promoting potential based on *in vitro* and *in vivo* investigations, *Food Bios.* 53: 102681.
- [5] Gebre, T.S., Emire, S.A., Chelliah, R., Alloo, S.O. and Oh, D., 2023, Isolation, functional activity, and safety of probiotics from Ethiopian traditional cereal-based fermented beverage, "Borde", *LWT.* 184: 115076.
- [6] Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K. and Reid, G., 2017, Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14: 491-502.

- [7] Ashwar, B.A., Gani, A., Ashraf, Z., Jhan, F., Shah, A., Gani, A. and Wani, T.A., 2021, Prebiotic potential and characterization of resistant starch developed from four Himalayan rice cultivars using β -amylase and transglucosidase enzymes, LWT. 143: 111085.
- [8] Meidong, R., Seangkaew, B., Thammaporn, R. and Thipsing, S., 2023, Effect of modified ice starch on enhancing survival of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* BL60a in synbiotic gummy candy supplemented with khao-mak, Thai Sci. Technol. J. 31(3): 105-118 (in Thai).
- [9] Verduci, E., D'Elisio, S., Cerrato, L., Comberiati, P., Calvani, M., Palazzo, S., Martelli, A., Landi, M., Trikamjee, T. and Peroni, D.G., 2019, Cow's milk substitutes for children: nutritional aspects of milk from different mammalian species, special formula and plant-based beverages, Nutrients. 11(8): 1739.
- [10] Escobar-Sáez, D., Montero-Jiménez, L., García-Herrera, P. and Sánchez-Mata, M.C., 2022, Plant-based drinks for vegetarian or vegan toddlers: nutritional evaluation of commercial products, and review of health benefits and potential concerns, Food Res. Int. 160: 111646.
- [11] Haas, R., Schnepfs, A., Pichler, A. and Meixner, O., 2019, Cow milk versus plant-based milk substitutes: a comparison of product image and motivational structure of consumption, Sustainability. 11(8): 5046.
- [12] Verma, D.K. and Srivastav, P.P., 2020, Bioactive compounds of rice (*Oryza sativa* L.): Review on paradigm and its potential benefit in human health, Trends Food Sci. Technol. 97: 355-365.
- [13] Wu, D. T., Li, W. X., Wan, J. J., Hu, Y. C., Gan, R. Y. and Zou, L., 2023, Comprehensive review of pea (*Pisum sativum* L.): chemical composition, processing, health benefits, and food applications, Foods. 12(13): 2527.
- [14] Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K. and 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 Shellfish Immunol. 73: 1-10.
- [15] Huang, Y. and Adams, M.C., 2004, *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria, Int. J. Food Microbiol. 91(3): 253-260.
- [16] Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P. and Urdaci, M.C., 2007, Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds, J. Appl. Microbiol. 102(2): 442-451.
- [17] Selvin, J., Maity, D., Sajayan, A. and Kiran, G.S., 2020, Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements, J. Glob. Antimicrob. Resist. 22: 202-205.

- [18] Jang, H.J., Song, M.W., Lee, N.K. and Paik, H.D., 2018, Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi, J. Food Sci. Technol. 55(8): 3174-3180.
- [19] Safronova, L.S., Skorochod, I.A. and Ilyash, V.M., 2021, Antioxidant and antiradical properties of probiotic strains *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, Probiotics Antimicro. Prot. 13: 1585-1597.
- [20] Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S., 2021, MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11, Mol. Biol. Evol. 38(7): 3022-3027.
- [21] Wang, S., Chelikani, V. and Serventi, L., 2018, Evaluation of chickpea as alternative to soy in plant-based beverages, fresh and fermented, LWT. 97: 570-572.
- [22] Mazlumi, A., Panahi, B., Hejazi, M.A. and Nami, Y., 2022, Probiotic potential characterization and clustering using unsupervised algorithms of lactic acid bacteria from saltwater fish samples, Sci. Rep. 12: 11952.
- [23] EFSA Panel on Biological Hazards, 2017, Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed, EFSA J. 15(3): e04664.
- [24] Jang, W.J., Kim, C.E., Jeon, M., Lee, S., Lee, J.M., Lee, E. and Hasan, T., 2021, Characterization of *Pediococcus acidilactici* FS2 isolated from Korean traditional fermented seafood and its blood cholesterol reduction effect in mice, J. Funct. Foods. 87: 104847.
- [25] Dinev, T. Rusenova, N., Velichkova, K. and Beev, G., 2022, Antimicrobial potential of eleven *Lactocaseibacillus paracasei* strains isolated from mountain anthills, Bulg. J. Agric. Sci. 28: 949-955.
- [26] Nishiyama, K., Takaki, T., Sugiyama, M., Fukuda, I., Aiso, M., Mukai, T., Odamaki, T., Xiao, J. Z., Osawa, R. and Okada, N., 2020, Extracellular vesicles produced by bifidobacterium longum export mucin-binding proteins, Appl. Environ. Microbiol. 86(19): e01464-20.
- [27] Hoffmann, A., Kleniewska, P. and Pawliczak, R., 2019, Antioxidative activity of probiotics, Arch. Med. Sci. 17(3): 792-804.
- [28] Zheng, Y., Wang, Q., Li, B., Lin, L., Tundis, R., Loizzo, M. R., Zheng, B. and Xiao, J., 2016, Characterization and prebiotic effect of the resistant starch from purple sweet potato, Molecules. 21(7): 932.
- [29] Arshad, N.H., Zaman, S.A., Rawi, M.H. and Sarbini, S.R., 2018, Resistant starch evaluation and *in vitro* fermentation of Lemantak (native sago starch), for prebiotic assessment, Int. Food Res. J. 25(3): 951-957.

- [30] Jaiturong, P., Laosirisathian, N., irithunyalug, B., Eitssayeam, S., Sirilun, S., Chaiyana, W. and Sirithunyalug, J., 2020, Physicochemical and prebiotic properties of resistant starch from *Musa sapientum* Linn., ABB group, cv. Kluai Namwa Luang, Heliyon. 6(12): e05789.
- [31] Hettige, K.D.T., Jayarathna, G.E.D.A.M. and Wijewardane, R.M.N.A., 2020, Prebiotic potential of resistant starches and dietary fibers of Sri Lankan traditional rice varieties and its application in the food industry, J. Dry Zone Agr. 6(2): 60-67.
- [32] Rathore, S., Salmerón, I. and Pandiella, S.S., 2012, Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures, Food Microbiol. 30: 239-244.