ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

ผลของแป้งข้าวดัดแปลงต่อการเจริญของ *Lacticaseibacillus paracasei* ที่แยกมาจากต้นหอมดอง

Effect of Rice Modified Starch on the Growth of *Lacticaseibacillus paracasei* Isolated from Pickled Spring Onions

ทิตยา พานิชเจริญ*

Thitaya Panicharoen

วีระพล มีตา*

Veelaphol Meeta

ศิริพร ทิพย์สิงห์**

Siriporn Tipsing

รัชนู เมยดง**

Ratchanu Meidong

Received : May 2, 2023

Revised : September 5, 2023

Accepted : October 6, 2023

บทคัดย่อ

โพรไบโอติกส์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ในการศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาผลของแป้งดัดแปลงจากข้าวต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์ ผลการวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ 61 ไอโซเลต โดยจำนวน 29 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ โดยไอโซเลต LF22b มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella enterica* Typhimurium DMST 8023 (22.66 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* DMST 562 (20.45 มิลลิเมตร) และ *Escherichia coli* DMST 4212 (18.33 มิลลิเมตร) สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ 48.12) อีกทั้งยังพบว่าแป้งดัดแปลงจากข้าวช่วยส่งเสริมการเจริญของไอโซเลต LF22b อย่างมีนัยสำคัญ ไอโซเลต LF22b ถูกจำแนกโดย

*นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Bachelor of Science Students Department of Microbiology Faculty of Science and Technology Bansomdejchaopraya Rajabhat University e-mail: ratchanu.me@bsru.ac.th

**อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Lecturer, Department of Microbiology Faculty of Science and Technology Bansomdejchaopraya Rajabhat University(Corresponding Author)

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าคือ *Lacticaseibacillus paracasei* จากผลการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า *L. paracasei* LF22b มีประสิทธิภาพที่จะนำไปใช้พัฒนาเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแล็กติก / การต้านเชื้อ / การต้านอนุมูลอิสระ / พรีไบโอติกส์

ABSTRACT

Probiotics are a group of microorganisms that are beneficial to human. The objectives of this study were to isolate lactic acid bacteria from fermented foods, to investigate antimicrobial activity and antioxidant activity and to study the effects of modified rice starch on the growth of probiotics. It was found that 61 isolates of lactic acid bacteria were isolated and 29 isolates inhibited pathogenic tested strains. Isolate LF22b showed significantly highest effective antimicrobial activity against *Salmonella enterica* Typhimurium DMST 8023 (22.66 mm), *Staphylococcus aureus* DMST 562 (20.45 mm) and *Escherichia coli* DMST 4212 (18.33 mm). Moreover, this isolate exhibited antioxidant activity (48.12 %). Modified rice starch significantly enhanced the growth of LF22b. Isolate LF22b was identified based on 16S rDNA sequencing as *Lacticaseibacillus paracasei*. These results indicated that *L. paracasei* LF22b is effective for further development of functional beverage.

Keywords : Lactic Acid Bacteria / Antimicrobial / Antioxidant / Prebiotics

บทนำ

โพรไบโอติกส์เป็นแบคทีเรียที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์เมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม (FAO/WHO, 2006) แบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่ถูกนำมาศึกษา และพบว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์คือ แบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งสามารถแยกได้จากอาหารหมักดองหลายชนิด เช่น นมหมัก ชีส (de Souza, Borgonovi, Casarotti, Todorov & Penna, 2019) และอาหารหมักที่ทำจากผัก (รัชนู, ภัทรวรรณ และศิริพร, 2564) แบคทีเรียกรดแล็กติกมีลักษณะทั่วไปคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รวมถึงไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) มีทั้งชนิดที่มีรูปท่อน และรูปกลม (Wansutha, Yuenyaow, Jantama & Jantama, 2018) ทนต่อกรด และด่าง เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ของมนุษย์ สามารถผลิตสารประกอบของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ได้ เรียกสารนั้นว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีการศึกษากันอย่างมาก เช่น สายพันธุ์ *Lactiplantibacillus plantarum* (Angmo, Kumari, Savitri & Bhalla, 2016) *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactococcus lactis* (Ibarra-Martínez, et al., 2022) ทั้งนี้แบคทีเรียกรดแล็กติกจัดเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์เป็นอย่างมาก เช่น มีประสิทธิภาพในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรค ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ป้องกันโรคภูมิแพ้ มะเร็ง รักษาอาการลำไส้แปรปรวน รักษาโรคลำไส้อักเสบ และ

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

อาการท้องร่วงที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ (Shokryazdan, et al., 2014) เป็นต้น ทำให้ในปัจจุบันผู้คนมีความสนใจในโพรไบโอติกส์มากขึ้น

นอกจากคุณสมบัติหลักของโพรไบโอติกส์ที่สามารถต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้แล้ว (Angmo, Kumari, Savitri & Bhalla, 2016) ในปัจจุบันได้มีความสนใจในการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional properties) ที่เป็นคุณสมบัติเสริมที่ดีต่อร่างกายของโฮสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) มีการศึกษาที่รายงานถึงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ เช่นสายพันธุ์ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Ding, et al., 2017), *L. plantarum* (Lin, et al., 2020), *Weissella confuse* (Sharma, Kandasamy, Kavitake & Shetty, 2018) สารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการชะลอวัย ชะลอกระบวนการที่ทำให้เข้าสู่วัยชรา ลดความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็ง ช่วยในเรื่องความผิดปกติของสมอง โรคข้ออักเสบ ต้อกระจก หลอดเลือดแดง ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด (Shori, et al., 2022)

ปัจจุบันมีการนำโพรไบโอติกส์ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพมากขึ้น และเริ่มมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ซินไบโอติกส์ (Synbiotic) นั่นก็คือผลิตภัณฑ์ที่มีทั้งโพรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์ การที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์จะรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารได้นาน จำเป็นจะต้องมีอาหารของโพรไบโอติกส์นั่นคือสารประกอบพรีไบโอติกส์ ตัวอย่างแหล่งของพรีไบโอติกส์ที่มีรายงาน เช่น สารสกัดจากเมล็ดถั่วเหลือง สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกส์ได้สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Wongputtisin, Ramaraj, Unpaprom, Kawaree & Pongtrakul, 2015) ในงานของ Ferronatto, Rossi, Pinto & Garavaglia, (2021) รายงานว่าสารสกัดพรีไบโอติกส์จากรำข้าวสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และมีรายงานการสกัดสารประกอบจากหอมแดง ที่เป็นสารประกอบในกลุ่ม inulin-fructooligosaccharides ซึ่งสารประกอบที่สกัดได้นี้มีคุณสมบัติของพรีไบโอติกส์ซึ่งประกอบด้วยการไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหาร มีคุณสมบัติการหมัก และสามารถส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกส์ได้ (Aisara, et al., 2021) ทั้งนี้จากงานของมัลลิกา (2562) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์จากข้าวเชิงเศรษฐกิจ (ข้าวขาวดอกมะลิ 105) พบว่ามีสารประกอบพรีไบโอติกส์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ได้สูง อีกทั้งในงานของ Ashwar, et al. (2018) พบว่าแป้งข้าวดัดแปลงมีสมบัติของพรีไบโอติกส์เมื่อใช้ร่วมในกระบวนการห่อหุ้มเซลล์พบว่าช่วยให้ *L. casei, L. brevis* และ *L. plantarum* หลังการห่อหุ้มเซลล์ สามารถรอดชีวิตในสภาวะของทางเดินอาหารและระหว่างการเก็บรักษาได้สูง จากข้อมูลนี้จึงมีความสนใจในการพัฒนาแป้งข้าวดัดแปลงจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และนำมาใช้ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ต่อไป

งานวิจัยนี้ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง และตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์ ประกอบด้วยความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และสมบัติในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงศึกษาสมบัติของแป้งข้าวดัดแปลงในด้านการเป็นพรีไบโอติกส์ต่อโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้พัฒนาเครื่องดื่มสุขภาพต่อไป

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง

นำตัวอย่างอาหารหมักดอง (เช่น ผักดอง แหนมปลา แหนมหมู แหนมเนื้อ หม่ำและหน่อไม้ดอง) จำนวน 24 ตัวอย่าง ที่นำมาจากตลาดในจังหวัดสมุทรสาคร ราชบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา และกรุงเทพมหานคร มาแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก รัชนู, ภัทรวรรณ และศิริพร (2564) ใช้ตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.85 (Normal saline solution; NSS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางก่อนนำไปเกลี่ย (Spread) ลงในอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0.5 (MRS-$CaCO_3$) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ปรากฏโซนใสรอบๆ โคโลนีและมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการขีดลาก (Streak) ลงบนอาหาร MRS-$CaCO_3$ จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติก ด้วยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) การติดสีแกรม และลักษณะเซลล์ แล้วนำเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส เก็บในกลีเซอรอล (Glycerol) ร้อยละ 20 ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การศึกษานี้ใช้วิธี Agar well diffusion assay (Georgieva et al., 2015) โดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลตในอาหาร MRS broth นำไปบ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บส่วนใส (Supernatant) จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 7.0 (2 *N* NaOH) และเติมเอนไซม์คะตะเลส (1.0 mg/ml) เรียก Neutralized cell free supernatant (NCFS) โดยทำการกรองตัวอย่างก่อนนำไปใช้ทดสอบ ในส่วนของเชื้อก่อโรคนั้นนำเชื้อก่อโรค (*Salmonella enterica* Typhimurium DMST 8023, *Staphylococcus aureus* DMST 562 และ *Escherichia coli* DMST 4212) เลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 0.5 และทำการ Swab ลงบนผิวหน้าอาหาร MH agar (MHA) ทำการเจาะหลุมด้วย Cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร แล้วหยดตัวอย่าง NCFS ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้ โดยหลุมควบคุมเติม MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบ และวัดขนาดโซนใสที่เกิดการยับยั้ง

3. การทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ในการศึกษานี้ใช้วิธี DPPH assay ที่ดัดแปลงมาจาก Ding et al., (2017) โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บส่วนใส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป การทำปฏิกิริยาเริ่มจากเติมส่วนใสของเซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม 96-well microtiter plate แล้วเติมสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุม ผสมให้เข้ากัน

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

(ให้ค่าเป็น A sample) ในขณะ blank จะเติม MRS broth ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (A control) แล้วเติมสาร DPPH solution ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุมเดียวกัน จากนั้นนำไปตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย Microplate reader (Spectrostar nano, Germany) โดยในการทดสอบจะใช้ Trolox (100 µg/ml) เป็นสารมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณค่า Antioxidant (%) ดังนี้

Antioxidant (%) = [(A control - A sample) ÷ A control] x 100

4. การศึกษาผลของพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกมาศึกษาคือ ไอโซเลต LF22b เนื่องจากมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งไอโซเลตนี้แยกมาจากตัวอย่างอาหารหมักคือ ต้นหอมดอง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Medium (MM) (1 ลิตร ประกอบด้วย Yeast extract; 20 g, Beef extract; 5 g, Peptone; 10 g, $MnSO_4.H_2O$; 0.02 g, $MgSO_4$; 0.05 g, Sodium citrate; 0.1 g, Ammonium citrate; 5 g, Ferrous sulfate; 0.2 g, แหล่งคาร์บอน; 1.0 g, pH 7.0) โดยกลุ่มทดลองที่ 1 ใช้กลูโคส กลุ่มทดลองที่ 2 ใช้แป้งข้าวดัดแปลง (ที่เตรียมขึ้นโดยใช้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยกระบวนการใช้ความร้อนร่วมกับการใช้เอนไซม์) และกลุ่มทดลองที่ 3 ใช้อินูลิน ในการตรวจสอบผลของพรีไบโอติกส์ในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ LF22b นั้นได้ทำการศึกษาโดยใส่เชื้อ LF22b ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่ผสมแหล่งคาร์บอนต่างๆ ให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น (OD_{600}) เท่ากับ 0.05 แล้วนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจการเจริญและวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) หลังบ่ม ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยตรวจการเจริญด้วยวิธี Drop plate technique บนอาหาร MRS-$CaCO_3$ เมื่อครบเวลาบ่มทำการนับจำนวนโคโลนี และนำมาคำนวณการเจริญ (CFU/ml) ขณะที่ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH Meter (Seven Easy, Mettler Toledo, Switzerland) เปรียบเทียบผลของพรีไบโอติกส์ชนิดต่างๆ ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์โดยนำข้อมูลการเจริญในหน่วย log CFU/ml ไปวิเคราะห์

5. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

จำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลต LF22b โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ร่วมกับการจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยเพิ่มจำนวนยีนที่บริเวณ 16S rRNA gene ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 20F (5’-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) และ 1500R (5’-GTTACCTTGTTACGACTT-3’) โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย GenepHlowTM Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) โดยอุณหภูมิต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ (1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (3) annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (4) elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำซ้ำ 25 รอบ และ (5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้ไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

(NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi) และ EzTaxon server และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง การตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค การทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก และการศึกษาผลของพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์ทุกการทดลองทำสามซ้ำ ใช้โปรแกรม SPSS โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ ค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง

ในการศึกษานี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดอง จำนวน 24 ตัวอย่าง จากกรุงเทพมหานคร (ปลาส้ม ไส้กรอกวุ้นเส้น แหนมเนื้อ แหนมหมูและไส้กรอกอีสาน) ได้ 25 ไอโซเลต จังหวัดนครปฐม (กิมจิ แหนมปลา ต้นหอมดองและผักเสี้ยนดอง) ได้ 7 ไอโซเลต จังหวัดชัยภูมิ (หม่ำ แหนมเห็ด ปลาส้มและหม่ำ) ได้ 11 ไอโซเลต จังหวัดสมุทรสาคร (ไส้กรอกอีสาน หอยดอง ผักดอง แหนมหนังหมู ปูดองเกลือ ไส้กรอกอีสานและปลาส้ม) ได้ 12 ไอโซเลต และจังหวัดราชบุรี (แหนมหมู หน่อไม้ดอง หม่ำ ปลาส้ม) ได้ 6 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 61 ไอโซเลต ซึ่งทุกไอโซเลตมีลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติก ได้แก่ เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส และไม่สร้างสปอร์ เป็นต้น

2. ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

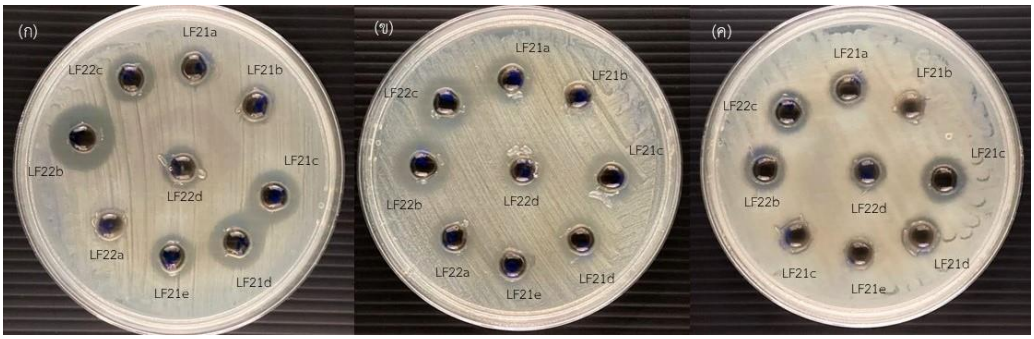
คุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียกรดแล็กติกในการเป็นโพรไบโอติกส์คือ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion assay โดยจากการทดลองพบว่าจากแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมด 61 ไอโซเลต มี 29 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยแบคทีเรียกรดแล็กติก 10 ไอโซเลตที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีสุด แสดงในตารางที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต LF12c, LF13b, LF13c, LF17a, LF17b, LF17e, LF21c, LF22b, LF22c และ LF23d ผลการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค พบว่าไอโซเลต LF22b สามารถยับยั้งก่อโรคทดสอบสองสายพันธุ์ได้สูงสุดคือ *Salmonella* Typhimurium (22.66±0.57 มิลลิเมตร) และ *S. aureus* (20.45 ± 0.57 มิลลิเมตร) และพบว่าไอโซเลต LF13b สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้สูงที่สุด (18.33 ± 1.52 มิลลิเมตร) โดยภาพของแบคทีเรียกรดแล็กติกบางไอโซเลตในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion assay ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งไอโซเลตที่มีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสูงแยกมาจากอาหารหมักดองประเภทต้นหอมดอง ปลาส้ม และแหนมเห็ด เป็นต้น

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

ตารางที่ 1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสในการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Salmonella Typhimurium	*S. aureus*	*E. coli*
LF12c	17.33 ± 0.57^{b}	15.00 ± 0^{b}	16.33 ± 1.15^{e}
LF13b	17.33 ± 1.52^{b}	15.33 ± 0.57^{bc}	18.33 ± 1.52^{g}
LF13c	16.66 ± 0.57^{b}	15.33 ± 1.15^{bc}	17.33 ± 2.51^{f}
LF17a	16.66 ± 0.57^{b}	14.33 ± 0.57^{ab}	13.66 ± 0.57^{bc}
LF17b	18.66 ± 0.57^{c}	13.00 ± 1.00^{a}	13.00 ± 1.00^{ab}
LF17e	15.33 ± 0.57^{a}	15.33 ± 0.57^{bc}	12.33 ± 0.57^{a}
LF21c	16.00 ± 0^{ab}	14.00 ± 0^{ab}	15.33 ± 0.57^{d}
LF22b	22.66 ± 0.57^{d}	20.45 ± 0.57^{e}	15.66 ± 0.57^{de}
LF22c	19.66 ± 0.57^{c}	19.66 ± 0.57^{d}	14.00 ± 0^{c}
LF23d	17.33 ± 0.57^{b}	17.33 ± 0.57^{c}	15.66 ± 0.57^{de}

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมม์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



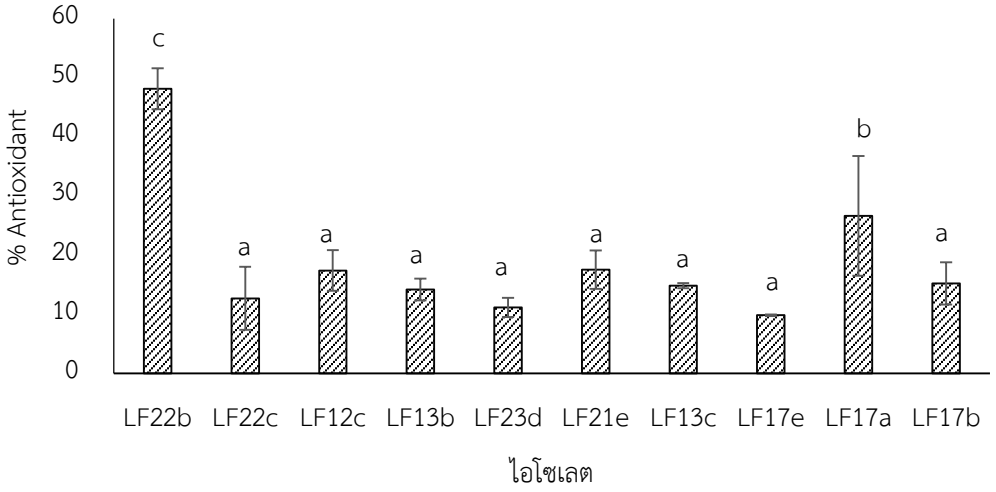
ภาพที่ 1 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียกรดแล็กติกเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay ต่อเชื้อ *Salmonella* Typhimurium (ก); *S. aureus* (ข); *E. coli* (ค)

3. ผลทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติก

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยวิธี DPPH assay ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่ามีค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง ร้อยละ 9.82±0.04 - 48.12±3.76 ซึ่งไอโซเลต LF22b มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ร้อยละ 48.12±3.76 ดังแสดงในภาพที่ 3 รองลงมาคือ ไอโซเลต LF17a (ร้อยละ 26.64±9.58) และกลุ่มเชื้อไอโซเลต LF22c, LF12c, LF13b, LF23d, LF21e, LF13c และ LF17e มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

โดยไอโซเลต LF22b ซึ่งมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดแยกมาจากต้นหอมดอง ขระที่ไอโซเลต LF17a แยกมาจากแหมหมู



ภาพที่ 2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลตต่างๆ (ตัวอักษรที่แตกต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

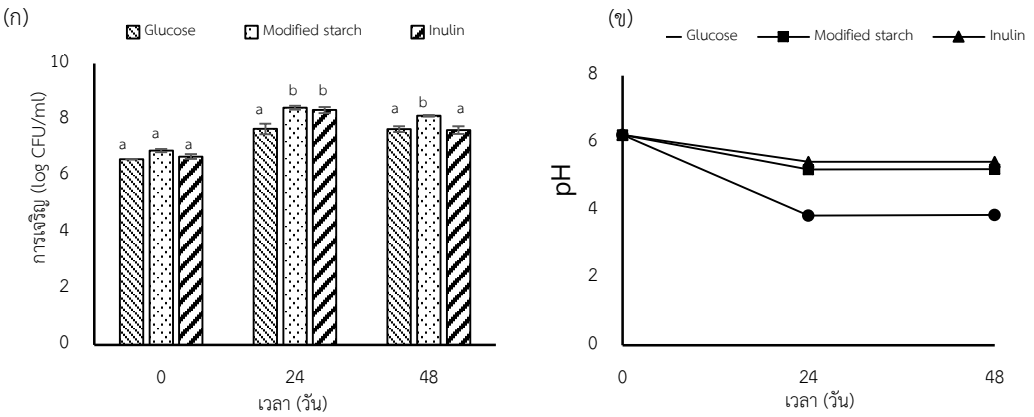
4. ผลการศึกษาผลของพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของโพรไบโอติกส์

ผลการเจริญของ LF22b ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ แสดงในภาพที่ 4ก โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ กลูโคส (Glucose) แป้งดัดแปลง (Modified starch) และอินนูลิน (Inulin) และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อเจริญในอาหารที่มีแป้งดัดแปลง (8.42±0.22 log CFU/ml) ได้ดีเทียบเท่าอินนูลิน (8.34±0.17 log CFU/ml) และสูงกว่าการเจริญในกลูโคส (7.67±0.15 log CFU/ml) และเมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง เชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกกลุ่มมีการเจริญลดลง ในขณะที่ค่า pH ชั่วโมงที่ 0 มีค่า pH เริ่มต้นอยู่ที่ 6.24 เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงมีค่า pH ของอาหารทั้ง 3 สูตรอยู่ระหว่าง 3.21-5.84 และเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงมีค่า pH ลดลงอยู่ที่ 3.87-5.44 เนื่องจากระหว่างการเจริญมีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนให้เป็นกรดอินทรีย์จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า pH ที่ลดลง แสดงในภาพที่ 4ข

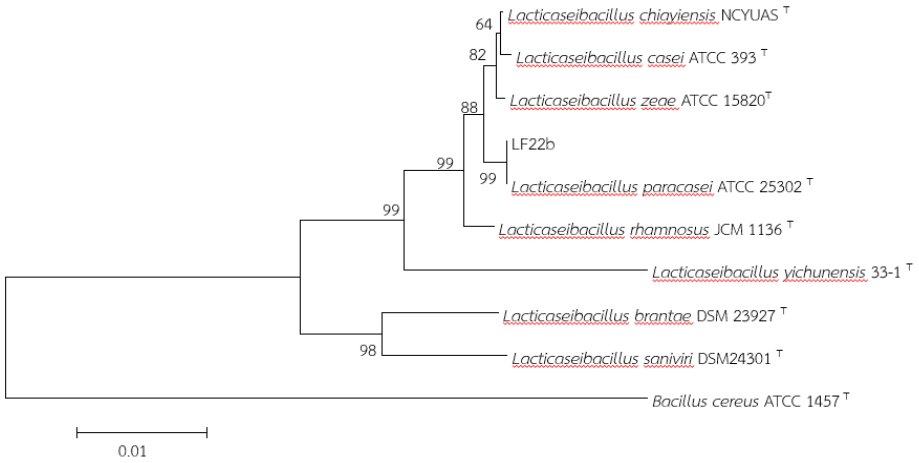
5. ผลการจำแนกไอโซเลต LF22b

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (*Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli*) การมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูง และผลของแป้งข้าวดัดแปลงที่มีสมบัติพรีไบโอติกส์ต่อการเจริญของไอโซเลต LF22b จึงจัดว่าไอโซเลตนี้เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการถูกนำไปใช้ต่อและมีคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ จึงนำไอโซเลตนี้มาจัดจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลต LF22b ใกล้เคียงกับเชื้อ *L. paracasei* ที่ร้อยละ 99.93 โดยมีความใกล้เคียงกับเชื้ออื่นๆ ในกลุ่ม *Lacticaseibacillus* sp. ซึ่งแสดงใน Phylogenetic tree ดังภาพที่ 5

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)



ภาพที่ 3 การเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลต LF22b ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (ก) และค่า pH ระหว่างการเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (ข) (ตัวอักษรที่แตกต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต LF22b เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม *Lacticaseibacillus* sp. โดยมี outgroup คือแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus*

อภิปรายผล

แบคทีเรียกรดแล็กกติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักดองดอง ในงานวิจัยนี้จึงแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ ได้แก่ ผักดอง แหนมปลา แหนมหมู แหนมเนื้อ หม่ำและหน่อไม้ดอง เป็นต้น อีกทั้งแบคทีเรียกรดแล็กติกมีรายงานถึงการนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ ประกอบไปด้วยคุณสมบัติด้านการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Zhang, et al., 2022) การเกาะที่เยื่อบุลำไส้ ความปลอดภัย (de Souza, Borgonovi, Casarotti, Todorov & Penna, 2019) และ

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ต่างๆ เช่นการสร้างสารกาบา หรือมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Ding, et al., 2017) ทั้งนี้ในปัจจุบันผู้คนเริ่มให้ความสนใจกับผลิตภัณฑ์ที่มีโพรไบโอติกส์มากขึ้น การคัดเลือกโพรไบโอติกส์เพื่อนำไปพัฒนาเครื่องดื่มจากแหล่งที่เหมาะสม จะทำให้ได้โพรไบโอติกส์ที่มีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากขึ้น ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกจากงานวิจัยนี้จะถูกศึกษาและพัฒนาให้เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพได้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่ถูกนำมาศึกษาสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ เช่น สายพันธุ์ *L. plantarum* จากแป้งข้าวหมัก (He, et al., 2022) *L. helveticus* แยกจากผลิตภัณฑ์น้ำนมหมัก (Zhong, et al., 2021) และ *L. plantarum* แยกมาจากผักดอง (Zhang, et al., 2022) เป็นต้น โดยไอโซเลตที่คัดเลือกไปศึกษาต่อในงานวิจัยนี้คือ LF22b ซึ่งถูกจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *L. paracasei* ที่สุดที่ร้อยละ 99.93

การต้านเชื้อก่อโรค (antimicrobial activity) จัดเป็นสมบัติที่สำคัญของเกณฑ์การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ ในงานวิจัยนี้มี 29 ไอโซเลต ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* การที่แบคทีเรียโพรไบโอติกส์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อันเนื่องมาจากการผลิตกรดอินทรีย์ H_2O_2 และการสร้างแบคเทอริโอซิน (Georgieva, et al., 2015) ซึ่งจากการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นพบว่า *L. paracasei* LF22b สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อาจมาจากแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นมา ดังนั้น *L. paracasei* LF22b จึงถูกคัดเลือกไปศึกษาต่อ อันเนื่องมาจากสมบัติหลักของโพรไบโอติกส์ในด้านการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสายพันธุ์นี้สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Broad spectrum) ทั้งนี้มีผลการศึกษาว่า *L. paracasei* ZFM54 สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium, *Micrococcus luteus* และ *Listeria monocytogenes* ได้ (Ye, et al., 2021)

อีกหนึ่งคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีความสำคัญ และได้ตรวจสอบในครั้งนี้คือกิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ซึ่งมีรายงานว่าการผลิตสารอนุมูลอิสระในร่างกายที่มากเกินไปจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Shang, et al., 2022) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาหาแนวทางในการต้านกิจกรรมของสารอนุมูลอิระที่เกิดขึ้น โดยในงานนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาศึกษามีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแล็กติกส์ เช่น *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* F17 ที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 59 (Ding, et al., 2017), สายพันธุ์ *L. rhamnosus* MG4502, *L. gasseri* MG4524, *Limosilactobacillus reuteri* MG5149 และ *Weissella cibaria* MG5285 ที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 26.1 (Jeong, et al., 2021) รวมถึงสายพันธุ์ *L. paracasei* LP33 ที่ใช้ในกระบวนการหมักเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ พบว่าผลิตภัณฑ์จากการหมักจากเชื้อโพรไบโอติกส์สายพันธุ์นี้มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (Zhang, et al., 2023)

แบคทีเรียโพรไบโอติกส์จะส่งผลที่ดีต่อสุขภาพของโฮสท์ได้เมื่อสามารถรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์ระหว่างกระบวนการเก็บรักษา และคงความมีชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระบบทางเดินอาหาร โดยหนึ่งในหลายๆ กระบวนการที่นักวิจัยศึกษาคือ การมีพรีไบโอติกส์ชนิดที่เหมาะสมกับโพรไบโอติกส์สายพันธุ์นั้น (Succi, et al., 2017) ในงานวิจัยนี้จึงได้นำแป้งข้าวดัดแปลงที่ได้เตรียมขึ้นโดยคณะผู้วิจัย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) มาทดสอบ

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

คุณสมบัติในด้านการเป็นแหล่งพรีไบโอติกส์ต่อเชื้อ *L. paracasei* LF22b เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่ไม่ใช่พรีไบโอติกส์ (กลูโคส) และอินูลินซึ่งเป็นพรีไบโอติกส์ทางการค้า พบว่าแป้งข้าวดัดแปลงส่งเสริมการเจริญของ *L. paracasei* LF22b ได้ดีเทียบเท่ากับอินูลิน และสูงกว่ากลูโคสอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การที่แป้งดัดแปลงมีสมบัติของพรีไบโอติกส์เมื่อทดสอบกับ *L. paracasei* LF22b พิจารณาจากผลการส่งเสริมการเจริญของเชื้อนั้นเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Cunningham, et al., 2021) มีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาแป้งทนย่อย (Resistant starch) หรือแป้งดัดแปลงในด้านคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ โดยจุลินทรีย์จะย่อยแป้งทนย่อยและผลิตกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งเป็นลักษณะที่แบคทีเรียโพรไบโอติกส์ใช้พรีไบโอติกส์ชนิดอื่นและเกิดผลิตภัณฑ์นี้ขึ้น โดยแป้งดัดแปลงที่รายงานคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์เช่นแป้งดัดแปลงที่ทำมาจากมันฝรั่ง (Wang, et al., 2022) ข้าว (Ashwar, et al., 2021) กล้วย (Jaiturong, et al., 2020) และถั่วลันเตา (Cui, Ma, Li & Hu, 2021) เป็นต้น ผลจากการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้น สามารถบ่งชี้ได้ว่าแป้งข้าวดัดแปลงมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. paracasei* LF22b ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ข้อมูลนี้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

เอกสารอ้างอิง

มัลลิกา โลนุช. (2562). **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพรีไบโอติกส์จากข้าวหอมมะลิ (สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105)**. บัณฑิตนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

รัชนู เมยดง, ภัทรวรรณ สุขสวัสดิ์ และศิริพร ทิพย์สิงห์. (2564). การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกส์จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก. **วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์**, **21**(1), 101-118.

Aisara, J., Wongputtisin, P., Deejing, S., Maneewong, C., Unban, K., Khanongnuch, C., Kosma, P., Blaukopf, M. & Kanpiengjai, A. (2020). Potential of inulin-fructooligosaccharides extract produced from red onion (*Allium cepa* var. viviparum (Metz) Mansf.) as an alternative prebiotic product. **Plants**, **10**, 2401.

Angmo, K., Kumari A., Savitri. & Bhalla, T.C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of ladakh. **LWT-Food Science and Technology**, **66**, 248-435.

Ashwar, B.A., Gani, A., Gani, A., Shah, A. & Masoodi, F.A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. **Food Chemistry, 239,** 287-294.

Ashwar, B.A., Gani, A., Ashraf, Z., Jhan, F., Shah, A., Gani, A. & Wani, T.A. (2021). Prebiotic potential and characterization of resistant starch developed from four Himalayan rice cultivars using β-amylase and transglucosidase enzymes. **LWT-Food Science and Technology**, **143**, 111085.

Cui, W., Ma, Z., Li, X. & Hu, X. (2021). Structural rearrangement of native and processed pea starches following simulated digestion in vitro and fermentation characteristics of their resistant starch residues using human fecal inoculum. **International Journal of Biological Macromolecules**, **172**, 490-502.

Cunningham, M., Azcarate-Peril, M.A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H.D., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Steinert, R.E., Swanson, K.S., Sinderen, D., Vulevi, J.M.I. & Gibson, G.R. (2021). Shaping the future of probiotics and prebiotics. **Trends in Microbiology, 29**(8), 667-685.

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

de Souza, B.M.S., Borgonovi, T.F., Casarotti, S.N., Todorov, S.D. & Penna, A.L.B. (2019). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains Isolated from mozzarella cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. **Probiotics and antimicrobial proteins**, **11**(2), 382-396.

Ding, W., Wang, L., Zhang, J., Ke, W., Zhou, J., Zhu, J. & Long, R. (2017). Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented yak milk in the Tibetan plateau. **Journal of Functional Foods**, **35**, 481-488.

FAO/WHO. (2006). **Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation**. Report of a Joint FAO Food Nutrition Paper 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, ISBN 92-5-105513-0, Rome.

Ferronatto, A.N., Rossi, R., Pinto, L.M.N. & Garavaglia, J. (2021). Development of a freeze-dried symbiotic obtained from rice bran. **Biotechnology Reports**, **30**, e00636.

Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N. & Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, **29**(1), 84-91.

He, L., Chen, Y., Zhang, H., Wang, H., Chen, S., Liu, S. & Liu, Y. (2022). Isolation and identification of *Lactobacillus* and yeast species and their effect on the quality of fermented rice cakes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **77**, 102984.

Ibarra-Martínez, D., Muñoz-Ortega, M.H., Quintanar-Stephano, A., Luz, S., Hernández, M., Ávila-Blanco, M.E. & Ventura-Juárez, J. (2022). Antibacterial activity of supernatants of *Lactoccocus lactis, Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* and curcumin against *Aeromonas hydrophila in vitro* study. **Veterinary Research Communications**, **46**, 459-470.

Jaiturong, P., Laosirisathian, N., Sirithunyalug, B., Eitssayeam, S., Sirilun, S., Chaiyana, W. & Sirithunyalug, J. (2020). Physicochemical and prebiotic properties of resistant starch from *Musa sapientum* Linn, ABB group, cv Kluai Namwa Luang. **Heliyon**, **6**(12), e05789.

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

Jeong, Y., Kim, H., Lee, J.Y., Won, G., Choi, S.I., Kim, G.H. & Kang, C.H. (2021). The antioxidant, anti-diabetic, and anti-adipogenesis potential and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human and fermented foods. **Fermentation**, **7**(3), 123.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, **33**(7), 1870-1874.

Lin, X., Xia, Y., Yang, Y., Wang, G., Zhou, W. & Ai, L. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant. **LWT-Food Science and Technology**, **126**, 109278.

Shang, Z., Li, M., Zhang, W., Cai, S., Hu, X. & Yi, J. (2022). Analysis of phenolic compounds in pickled chayote and their effects on antioxidant activities and cell protection. **Food Research International, 157**, 111325.

Sharma, S., Kandasamy, S., Kavitake, D. & Shetty, P.H. (2018). Probiotic characterization and antioxidant properties of *Weissella confusa* TKR780676, isolated from an Indian fermented food. **LWT-Food Science and Technology**, **97**, 53-60.

Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Jahromi, M.F. & Ho, Y.W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. **BioMed Research International**, **16**, 927268.

Shori, A.B., Aljohani, G.S., Al-zahrani, A.J., Al-sulbi, O.S. & Baba, A.S. (2022). Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. **LWT-Food Science and Technology**, **153**, 112482.

Succi, M., Tremonte, P., Pannella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Romaniello, R., Sorrentino, E. & Coppola, R. (2017). pre-cultivation with selected prebiotics enhances the survival and the stress response of *Lactobacillus rhamnosus* strains in simulated gastrointestinal transit. **Frontiers in Microbiology**, **8**, 1067.

Wang. Z., Lin, Y., Liu, L., Zheng, B., Zhang, Y. & Zeng, H. (2022). Effect of lotus seed resistant starch on lactic acid conversion to butyric acid fermented by rat fecal microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **70**(5), 1525-1535.

Wansutha, S., Yuenyaow, L., Jantama, K. & Jantama, S.S. (2018). Antioxidant activities of almond milk fermented with lactic acid bacteria. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)**, **42**, 115-119. [In Thai]

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

Wongputtisin, P., Ramaraj, R., Unpaprom, Y., Kawaree, R. & Pongtrakul, N. (2015). Raffinose family oligosaccharides in seed of *Glycine max* cv. Chiang Mai60 and potential source of prebiotic substances. **International Journal of Food Science & Technology**, **50**(8), 1750-1756. [In Thai]

Ye, P., Wang, J., Liu, M., Li, P. & Gu, Q. (2021). Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* ZFM54. **LWT-Food Science and Technology**, **143**, 111125.

Zhang, J., Zhang, C., Lei, P., Xin, X., Liu, D. & Yi, H. (2022). Isolation, purification, identification, and discovery of the antibacterial mechanism of LD-phenyllactic acid produced by *Lactiplantibacillus plantarum* CXG9 isolated from a traditional Chinese fermented vegetable. **Food Control**, **132**, 108490.

Zhang, J., Huang, X., Cheng, J. & Wang, C. (2023). Effect of Lactobacillus (*L. acidophilus* NCIB1899, *L. casei* CRL 431, *L. paracasei* LP33) fermentation on free and bound polyphenolic, antioxidant activities in three Chenopodium quinoa cultivars. **Journal of Food Science**, **88**(6), 2679-2692.

Zhong, Z., Hu, R., Zhao, J., Liu, W., Kwok, L. Y., Sun, Z. & Chen, Y. (2021). Acetate kinase and peptidases are associated with the proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus* isolated from fermented food. **Food Microbiology, 94**, 103651.