# การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน สำหรับผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก

สุภัสสร วันสุทะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

# SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FOR FERMENTED SOY MILK AND ALMOND MILK PRODUCTS

SUPASSON WANSUTHA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBONRATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2018

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริมา สุวรรณกูฏ จันต๊ะมา ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดเห็นในการดำเนินการวิจัยตรวจสอบและแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์ ข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ รวมทั้งการเป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ และขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมหวัง จรรยาขันติกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาววาริณี เบิกบาน และนางสาวลัดดาวัลย์ ยืนยาว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาแนะนำในทุก ๆ ด้าน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ในการศึกษาค้นคว้างานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ประสิทธิ์ประสาทวิชา และให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนนักศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษา และขอขอบพระคุณสถาบันการศึกษาแห่งนี้ ที่ได้ให้ความรู้ และประสบการณ์อันมีค่าในการศึกษาตลอดมา

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นแรงบันดาลใจ และเป็นกำลังใจ ส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาที่ดี คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอมอบแด่ผู้ที่อยู่เบื้องหลังในการส่งเสริมความสำเร็จ ทั้งที่ได้กล่าวนามถึงและมิได้กล่าวนามถึงทุกท่าน และขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

สุภัสสร วันสุทะ
ผู้วิจัย

# บทคัดย่อ


| | | |
|---|---|---|
| เรื่อง | : | การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสำหรับผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก |
| ผู้วิจัย | : | สุภัสสร วันสุทะ |
| ชื่อปริญญา | : | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| สาขาวิชา | : | เภสัชศาสตร์ชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | : | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริมา สุวรรณกูฏ จันต๊ะมา |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | : | รองศาสตราจารย์ ดร.เขมวิทย์ จันต๊ะมา |
| คำสำคัญ | : | โพรไบโอติก, แบคทีเรียกรดแลคติก, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, นมถั่วเหลืองหมัก, นมอัลมอนด์หมัก |

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร โพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน มีการพัฒนานมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักโดยใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกโดยไม่ใช้นมวัวจึงจัดว่าเป็นทางเลือกใหม่ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองท้องถิ่น และศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักและประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก ตัวอย่างอาหารหมักดองจำนวน 17 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl assay (DPPH), 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay (ABTS) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีเพื่อประเมินคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติกที่ดี และทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัยของโพรไบโอติก ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต A62 แสดงศักยภาพการเป็นโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการผลิตเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส การพิสูจน์ชนิดแบคทีเรียของไอโซเลต A62 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่ามีระดับความเหมือนร้อยละ 100 กับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลต A62 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและมีสารประกอบฟีนอลิกมากกว่านมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมัก ผลการทดสอบความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักพบว่ามีความคงตัวของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงว่า *P. acidilactici* A62 มีแนวโน้มในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกสำหรับการผลิตนมหมักเพื่อเพิ่มคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน

# ABSTRACT

TITLE : SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FOR FERMENTED SOY MILK AND ALMOND MILK PRODUCTS
AUTHOR : SUPASSON WANSUTHA
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. SIRIMA SUVARNAKUTA JANTAMA, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. KAEMWICH JANTAMA, Ph.D.
KEYWORDS : PROBIOTICS, LACTIC ACID BACTERIA, ANTIOXIDANT ACTIVITY, FERMENTED SOY MILK, FERMENTED ALMOND MILK

Lactic acid bacteria (LAB) are probiotics that have beneficial effects on the human gastrointestinal tract to maintain its microbial balance. It also reveals that some probiotic bacteria may contain antioxidant properties. Fermented soy milk and almond milk have been developed using probiotic bacteria with different potencies. Therefore, there can be new non-dairy fermented products that have functional antioxidant features. This study aimed to isolate LAB from traditional fermented foods and to investigate their antioxidant properties. Fermentation condition was optimized, and antioxidation activity with the stability of soy milk and almond milk fermented with probiotic bacteria, was also evaluated. Seventy LAB isolates were isolated from 17 fermented food samples. Antioxidant activities were determined by DPPH, ABTS and FRAP methods. The LABs exhibiting high antioxidant activity were further selected for evaluating its basic probiotic properties and safety. The isolate A62 showed probiotic potential with antioxidant and antibacterial activities and tolerance to acid and bile salt. It also showed the negative results of hemolytic and DNase activities. The bacterial identification of A62 through 16S rDNA gene sequencing showed similarity to *Pediococcus acidilactici* with 100 % identity. Soy milk and almond milk fermented with the isolate A62 showed higher antioxidant activity and total phenolic content than those of unfermented soy milk and almond milk. The stability study showed that antioxidant activity of fermented soy milk and almond milk remained constant during storage at 4°C for 4 weeks. The findings of the present study suggested that *P. acidilactici* A62 may be a promising candidate for use as a probiotic starter for fermented milk with antioxidant properties.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| **กิตติกรรมประกาศ** | **ก** |
| **บทคัดย่อภาษาไทย** | **ข** |
| **บทคัดย่อภาษาอังกฤษ** | **ค** |
| **สารบัญ** | **ง** |
| **สารบัญตาราง** | **ช** |
| **สารบัญภาพ** | **ซ** |
| **คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ** | **ญ** |
| **บทที่ 1 บทนำ** | |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย | 2 |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| 1.4 ขอบเขตการศึกษา | 2 |
| **บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | |
| 2.1 โพรไบโอติก (Probiotics) | 4 |
| 2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก | 4 |
| 2.3 บทบาทของโพรไบโอติกต่อสุขภาพ | 7 |
| 2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก | 9 |
| 2.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก | 11 |
| 2.6 อนุมูลอิสระ | 14 |
| 2.7 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) | 15 |
| 2.8 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน | 16 |
| 2.9 คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของโพรไบโอติก | 18 |
| 2.10 โยเกิร์ตนมถั่วเหลือง (soy yogurt) | 19 |
| 2.11 โยเกิร์ตนมอัลมอนด์ | 21 |
| 2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 22 |
| **บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย** | |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี | 24 |
| 3.2 วิธีการทดลอง | 26 |
| **บทที่ 4 ผลการวิจัย** | |
| 4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง | 36 |
| 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติก | 39 |
| 4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก | 44 |

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ 51
4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA (rDNA) 53
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 55
4.7 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 56
4.8 ผลการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก 59
4.9 การศึกษาความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 62
4.10 ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ A62, F3 และ M47 66

**บทที่ 5 อภิปรายผล**

5.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง 71
5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติก 72
5.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก 73
5.4 การทดสอบด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ 75
5.5 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 76
5.6 การประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก 77
5.7 การศึกษาความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 78
5.8 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 79
5.9 การนำแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 ไปใช้ประโยชน์ 81

**บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 83**

**เอกสารอ้างอิง 86**

**ภาคผนวก 102**

ก กราฟการเจริญ (Growth curve) ของแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 103
ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 105
ค การเตรียมสารเคมี 107
ง กราฟมาตรฐาน 110

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**

จ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA 112
ฉ การขออนุญาตดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ 118
ช การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการ 120
**ประวัติผู้วิจัย** **126**

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.1 | ข้อมูลแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง | 36 |
| 4.2 | ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay (mean±SD; n=3x2) | 40 |
| 4.3 | ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และวิธี FRAP assay (mean±SD; n=3x2) | 42 |
| 4.4 | ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติก (mean±SD; n=3x2) | 45 |
| 4.5 | ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และคุณสมบัติการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก | 50 |
| 4.6 | ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 (mean±SD; n=3x2) | 51 |
| 4.7 | ลำดับนิวคลีโอไทด์และร้อยละความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 | 54 |
| 4.8 | ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 สัปดาห์ | 65 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1.1 | กรอบแนวคิดของการศึกษาวิจัย | 3 |
| 4.1 | จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองแต่ละประเภท | 39 |
| 4.2 | ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และวิธี FRAP assay ทั้งหมด 28 ไอโซเลต | 43 |
| 4.3 | ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกแสดงค่าเป็น mean ± SD เครื่องหมาย (*) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3x2) | 46 |
| 4.4 | ร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อบ่มในสภาวะกรด ระยะเวลา 3 ชั่วโมง | 47 |
| 4.5 | ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกแสดงค่าเป็น mean ± SD เครื่องหมาย (*) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3x2) | 48 |
| 4.6 | ร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อบ่มในเกลือน้ำดี ระยะเวลา 4 ชั่วโมง | 49 |
| 4.7 | ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย A62; หมายเลข 1-15 ได้แก่ streptomycin, tetracycline, gentamicin, vancomycin, chloramphenicol, kanamycin, erythromycin, ampicillin, ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, meropenem, ceftazidime และ imipenem ตามลำดับ | 52 |
| 4.8 | ผลการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียหมายเลข A62 | 55 |
| 4.9 | ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอสของแบคทีเรียหมายเลข A62 | 55 |
| 4.10 | ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า | 56 |
| 4.11 | ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 บนอาหาร MRS agar | 56 |
| 4.12 | ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองหมัก (mean±SD; n=3x3) | 57 |
| 4.13 | ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมอัลมอนด์หมัก (mean±SD; n=3x3) | 58 |
| 4.14 | ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมัก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เครื่องหมาย (*) แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (mean±SD; n=3x2) | 60 |
| 4.15 | ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมัก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เครื่องหมาย (*) แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (mean±SD; n=3x2) | 61 |
| 4.16 | การรอดชีวิตของ *P. acidilactici* A62 ในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ | 63 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพที่** **หน้า**


4.17 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay แสดงค่าเป็น mean±SD ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันของแผนภูมิแท่งแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 64

4.18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay (mean±SD; n=3) 65

4.19 จำนวนแบคทีเรียและค่า pH ของนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก 66

4.20 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mean±SD; n=3x2) 67

4.21 จำนวนแบคทีเรียและค่า pH ของนมอัลมอนด์หมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก 69

4.22 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mean±SD; n=3x2) 69

ก.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และจำนวนของแบคทีเรีย *P.acidilactici* A62 (CFU/ml) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง 104

ก.2 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ pH ของแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง 104

ง.1 กราฟมาตรฐานของเฟอรัสซัลเฟต 111

ง.2 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก 111

# คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

| สัญลักษณ์และอักษรย่อ | ความหมาย |
|---|---|
| LAB | แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) |
| % | ร้อยละ (percentage) |
| w/v | น้ำหนักต่อปริมาตร (weight per volume) |
| v/v | ปริมาตรต่อปริมาตร (volume per volume) |
| °C | องศาเซลเซียส (degree Celsius) |
| mL | มิลลิลิตร (milliliter) |
| mM | มิลลิโมลาร์ (milliMolar) |
| µg/g | ไมโครกรัมต่อกรัม (microgram per gram) |
| µL | ไมโครลิตร (microliter) |
| mm | มิลลิเมตร (millimeter) |
| GAE | กรดแกลลิก (gallic acid) |
| $FeSO_4$ | เฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulfate) |
| FAO/WHO | องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ และองค์การอนามัยโลก (Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization) |
| CFU/mL | จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร (colony-forming units per milliliter) |
| 16S rDNA | ตำแหน่งยีน 16S rDNA (16S ribosomal DNA) |
| DPPH | 2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl |
| ABTS | 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| TPTZ | 2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine |
| MRS | de Man, Rogosa and Sharpe |
| rpm | รอบต่อนาที (revolutions per minute) |
| OD | การวัดการดูดกลืนแสง (optical density) |
| SPSS | โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical Package for the Social Science for Windows) |
| SD | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) |

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โพรไบโอติก (probiotics) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (FAO/WHO, 2002) และมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2556) ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นโพรไบโอติกที่มีการนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมากที่สุด โดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ และในอาหารหมักดองต่าง ๆ เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง ปลาร้า แหนม ไส้กรอก ปลาส้ม เป็นต้น (Šušković et al., 2000) โพรไบโอติกบางสายพันธุ์พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันอาจช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ (Mishra et al., 2015)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอม โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว ซึ่งเกิดขึ้นเป็นปกติจากปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว (Cheeseman and Slater, 1993) โดยร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น จากอาหารบางชนิด หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต การแผ่รังสี รังสีเอกซ์ หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จากไอเสียรถยนต์ หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลง ก็จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไปซึ่งจะเป็นอันตรายต่อไขมัน โปรตีน หน่วยพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคชรา เป็นต้น (Lobo et al., 2010) เมื่อมีการสะสมสารอนุมูลอิสระมากขึ้น กลไกการควบคุมสารต้านออกซิเดชันจากภายในร่างกายอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ จึงมีความจำเป็นต้องอาศัยกลไกอื่นจากภายนอก คือ กลุ่มของสารต้านออกซิเดชันที่ได้มาจากอาหาร เช่น วิตามินซี วิตามินอี บีตา-แคโรทีน ที่มีในอาหารรวมทั้งสารกลุ่มพอลิฟีนอลฟลาโวนอยด์ที่พบมากอยู่ในพืช ผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างการทำงานของระบบต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (Carlsen et al., 2010)

การหมักน้ำนมด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสเปรี้ยว ซึ่งพีเอช (pH) ที่ลดลงจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ และจับตัวตกตะกอน (curd) ทำให้ได้โยเกิร์ตที่มีลักษณะข้น (Kilara and Shahani, 1974) โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองหรือนมถั่วเหลือง เป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เคซีน (casein) เดดซีน (daidzein) และเจนิสเตอีน (genistein) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูง (Fukushima, 2001) และโยเกิร์ตนมอัลมอนด์อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดไลโนเลอิก (linoleic acid) และอัลมอนด์ยังเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่ประกอบด้วยเส้นใยอาหาร

ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) โพลีฟีนอล วิตามินและเกลือแร่ (Yada et al., 2011) ซึ่งสารประกอบส่วนใหญ่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ยังเหมาะสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ และผู้ที่มีภาวะที่ไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส (lactose in tolerance) (de Vrese et al., 2001) ดังนั้นการพัฒนานมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค

ปัจจุบันมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน (Sun et al., 2013) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน สำหรับนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการส่งเสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง สำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีความปลอดภัย และมีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1.2.1 แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง

1.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1.2.3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.2.4 ประเมินความปลอดภัยและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.2.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์

1.2.6 ประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

1.2.7 ศึกษาความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

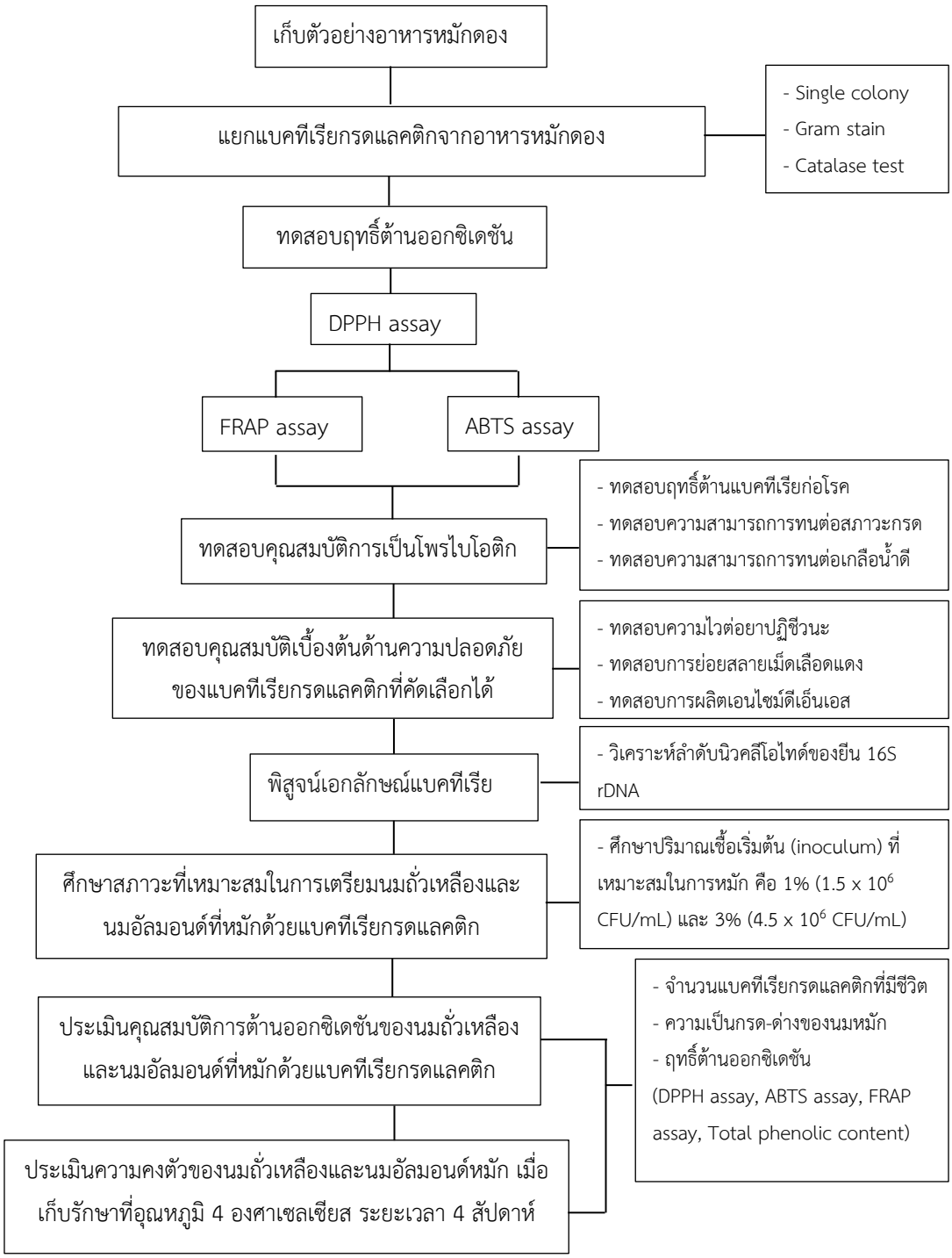
## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและเป็นโพรไบโอติกที่มีความปลอดภัย สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักที่เตรียมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพทางเลือกใหม่ในผู้ที่แพ้นมวัว หรือผู้ที่รับประทานมังสวิรัติ

## 1.4 ขอบเขตการศึกษา

ขอบเขตของการศึกษาวิจัยนี้คือ การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองที่เก็บจากตลาด ร้านค้าในเขตอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดีและทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีน 16S rDNA เพื่อระบุชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติก และประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ และประเมินความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (รายละเอียดของกรอบแนวคิดการศึกษาวิจัย แสดงดังภาพที่ 1.1)




**ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดของการศึกษาวิจัย**

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 โพรไบโอติก (Probiotics)

คำว่า “โพรไบโอติก” นั้น ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Lilley และ Stillwell ในปี ค.ศ. 1965 ซึ่งได้กล่าวว่า โพรไบโอติก หมายถึง สารคัดหลั่งจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ (Lilly and Stillwell, 1965)

ใน ค.ศ. 1999 Salminen และคณะ กล่าวว่าโพรไบโอติก คือเซลล์จุลินทรีย์หรือองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (Salminen et al., 1999)

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้นิยามโพรไบโอติกว่าคือจุลินทรีย์มีชีวิตเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (FAO/WHO, 2002)

ดังนั้น โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่พบในร่างกายมนุษย์อยู่แล้ว หรือเมื่อรับประทานเข้าไปแล้วช่วยให้ร่างกายผู้นั้นมีสุขภาพที่ดีขึ้น และต้องยังคงสภาพที่มีชีวิต ซึ่งทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ โดยสามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้และให้ประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ โดยไม่ก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย (Amara and Shibl, 2015)

## 2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ในการนำจุลินทรีย์มาเป็นโพรไบโอติกนั้นจะต้องมีการศึกษาและทดสอบทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูลด้านคุณสมบัติ ประสิทธิผลต่อสุขภาพ และความปลอดภัย โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับคนและสัตว์นั้นมีแนวทางหลัก ๆ คือ สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้ ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหาร และมีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ $10^7$-$10^9$ CFU/mL ของผลิตภัณฑ์) (Dunne et al., 2001)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุขในการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ต้องมีหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกให้เป็นไปอย่างถูกต้องเหมาะสม และปลอดภัยต่อการบริโภค ดังนี้

“จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic)” หมายความว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ทั้งนี้ไม่รวมถึง

(1) จุลินทรีย์ ที่ใช้เป็นสารชีวบำบัด (biotherapeutic agents)

(2) จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganisms) ที่ไม่ใช้ในอาหาร

(3) จุลินทรีย์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Microorganism, GMM)

(4) จุลินทรีย์ บักเตรี แบคทีเรีย หรือยีสต์ ตามที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข

อาหารที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องได้รับอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และต้องใช้จุลินทรีย์ตามที่กำหนดและมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่ คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า $10^6$ CFU ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้น

คุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกตามหลักการใน Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food ในปี ค.ศ. 2002 มีดังนี้

(1) การตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ด้วยวิธีการที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ทั้งทางลักษณะ (phenotype) และทางพันธุกรรม (genotype) และการเรียกชื่อ (nomenclature) ของจุลินทรีย์นั้นต้องเป็นชื่อที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและเป็นที่รู้ทั่วกันในทางวิทยาศาสตร์

(2) การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

(2.1) การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

(2.2) การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี (bile salt resistance)

(2.3) ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อมูก หรือ เซลล์ผิวเยื่อบุของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ (adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell line)

(2.4) ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity)

(3) การประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์ โดยการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) หรือในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และการศึกษาในมนุษย์ เพื่อประเมินความปลอดภัยและปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

(3.1) การดื้อต่อสารปฏิชีวนะ

(3.2) การประเมินฤทธิ์ทางเมแทบอลิก เช่น การผลิตดี - แลกเทต (D-lactate) หรือการสลายเกลือน้ำดี เป็นต้น

(3.3) การประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์

(3.4) การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังออกจำหน่ายในท้องตลาด

(3.5) การสร้างสารพิษ กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีการผลิตสารพิษ

(3.6) ฤทธิ์ทางฮีโมไลติก กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (FAO/WHO, 2002)

โดยเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก มีดังนี้

(1) ความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ซึ่งสัมพันธ์กับสภาวะการหลั่งเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณร้อยละ 0.15 - 0.30 และเป็นแหล่งที่แบคทีเรียโพรไบโอติกอาศัยอยู่ โดยการหลั่งของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharides) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโยเกิร์ต มีผลต่อความทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 (Ruiz et al., 2013) ซึ่งมีการศึกษาพบว่า *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากผักดองสามารถทนสภาวะเกลือน้ำดีที่

ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ได้ (Yang et al., 2017) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกจะต้องมีความทนทานต่อระบบทางเดินอาหารและการหลั่งเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กของมนุษย์

(2) ความสามารถในการเจริญได้ในภาวะความเป็นกรด - ด่าง ที่ค่าพีเอช (pH) ประมาณ 2, 3, 4, 8 และ 9 ซึ่งเป็นระดับความเป็นกรด - ด่าง เช่นเดียวกับที่พบในกระเพาะอาหารของมนุษย์ซึ่งมีความเป็นกรดที่ค่าพีเอชเท่ากับหรือต่ำกว่า 3 และในลำไส้เล็กที่มีความเป็นด่างในระดับค่าพีเอชประมาณ 8 ถึง 9 ซึ่งมีการศึกษาพบว่า *Lactobacillus casei* ที่แยกได้จากชีส (cheese) สามารถทนความเป็นกรดที่ pH 2.0 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงได้ (Hassanzadazar et al., 2012)

(3) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย ซึ่งคุณสมบัตินี้ของแบคทีเรียอาจช่วยในการลดการก่อโรคโดยแบคทีเรียชนิดดังกล่าว และป้องกันปัญหาสุขภาพอื่น ๆ ที่มีแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นสาเหตุ เมื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติกมาจากมูลวัว พบว่าส่วนเซลล์แบคทีเรียและส่วนใส (supernatant) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* CB6 ได้ (Adeniyi et al., 2015) แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอาหาร เช่น จากไส้กรอกพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย เช่น *Listeria innocua* และ *E. coli* (Ammor et al., 2006) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากเนยแข็งและโยเกิร์ตต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *L. innocua*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารกันบูดได้ (Yang et al., 2012)

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบคุณสมบัติการไวต่อยาปฏิชีวนะ (Charteris et al., 1998) และการทดสอบความสามารถเกาะติดและอาศัยอยู่ในลำไส้ ซึ่งความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของเจ้าบ้านเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค เพราะเป็นการเริ่มต้นของการอาศัยในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตและช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านหรือผู้บริโภคได้ แบคทีเรียที่สามารถเกาะติดลำไส้ จึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญทำให้เกิดกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายได้ (Piatek et al., 2012)

บัญชีรายชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารซึ่งแนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร มีดังนี้

| | |
|---|---|
| (1) บาซิลลัส โคแอกกูแลน | *Bacillus coagulans* |
| (2) บิฟิโดแบคทีเรียม อะโดเลสเซนทิส | *Bifidibacterium adolescentis* |
| (3) บิฟิโดแบคทีเรียม อะนิมอลิส | *Bifidobacterium animalis* |
| (4) บิฟิโดแบคทีเรียม บิฟิดัม | *Bifidobacterium bifidum* |
| (5) บิฟิโดแบคทีเรียม เบรเว | *Bifidobacterium breve* |
| (6) บิฟิโดแบคทีเรียม อินฟานทิส | *Bifidobacterium infantis* |
| (7) บิฟิโดแบคทีเรียม แล็กทิส | *Bifidobacterium lactis* |
| (8) บิฟิโดแบคทีเรียม ลองกัม | *Bifidobacterium longum* |
| (9) บิฟิโดแบคทีเรียม ซูโดลองกัม | *Bifidobacterium pseudolongum* |

(10) เอ็นเทอโรค็อกคัส ดูแรน *Enterococcus durans*
(11) เอ็นเทอโรค็อกคัส เฟเซียม *Enterococcus faecium*
(12) แล็กโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส *Lactobacillus acidophilus*
(13) แล็กโทบาซิลลัส คริสปาทัส *Lactobacillus crispatus*
(14) แล็กโทบาซิลลัส แก็สเซอรี *Lactobacillus gasseri*
(15) แล็กโทบาซิลลัส จอห์นโซนอิ *Lactobacillus johnsonii*
(16) แล็กโทบาซิลลัส พาราคาเซอิ *Lactobacillus paracasei*
(17) แล็กโทบาซิลลัส รียูเทอรี *Lactobacillus reuteri*
(18) แล็กโทบาซิลลัส รามโนซัส *Lactobacillus rhamnosus*
(19) แล็กโทบาซิลลัส ซาลิวาเรียส *Lactobacillus salivarius*
(20) แล็กโทบาซิลลัส ซีอี *Lactobacillus zeae*
(21) โพรพิโอนิแบคทีเรียม อะราไบโนซัม *Propionibacterium arabinosum*
(22) สแตปฟิโลคอคคัส ไซน์ยูรี *Staphylococcus sciuri*
(23) แซ็กคาโรไมซีส เซรีวิซิอี สับสปีชีย์ บัวลาดิอิ *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *Boulardii* (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2554)

ดังนั้น องค์การอนามัยโลกจึงให้การรับรองว่าจุลินทรีย์ใดเป็นชนิดที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded as Safe หรือ GRAS) จะต้องมีการศึกษาข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รองรับถึงความปลอดภัย นอกจากนี้การทดสอบความสามารถในการติดเชื้อในสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องจะเพิ่มความเชื่อมั่นในความปลอดภัยของโพรไบโอติกได้ (FAO/WHO, 2002)

## 2.3 บทบาทของโพรไบโอติกต่อสุขภาพ

### 2.3.1 การปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย

มีการนำ *Lactobacillus rhamnosus* GG มาใช้ป้องกันภาวะท้องเสียในเด็กขาดสารอาหารโดยเฉพาะที่ไม่ได้รับการเลี้ยงด้วยนมแม่ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันได้ดี (Oberhelman et al., 1999) และพบว่า *Lactobacillus* สามารถลดระยะเวลาและความรุนแรงของอาการท้องเสียที่เกิดจากภาวะอาหารเป็นพิษ (Isolauri et al., 2002) และได้ผลดีมากในกลุ่มที่เกิดอาการท้องเสียจากโรตาไวรัส (rota virus) (Guandalini et al., 2000) นอกจากนี้ *Lactobacillus* GG และ *Saccharomyces boulardii* สามารถลดอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงจากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ที่มักเกิดจากการติดเชื้อหลังคลอดได้ (Guandalini, 2015) และพบว่า *S. boulardii*, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* มีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยในการป้องกันอาการท้องเสียในนักท่องเที่ยว (traveler's diarrhea) (McFarland, 2007) และ *Bifidobacterium* BB536 สามารถช่วยป้องกันและลดภาวะท้องผูก โดยช่วยเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้ทำให้ขับถ่ายได้คล่องขึ้น (Ouwehand et al., 1999)

**2.3.2 การลดภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยหรือไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส (lactose in intolerance)**

ผู้ที่มีภาวะที่ไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส จะมีอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องเดิน ปวดท้องเมื่อร่างกายได้รับน้ำตาลแลกโตสซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบมากในน้ำนมวัว ซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดจากร่างกายไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโตสได้ เพราะขาดเอนไซม์บีต้า-กาแล็กโทสิเดส (β-galactosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยน้ำตาลแลกโตส หรือมีปริมาณของเอนไซม์บีต้า-กาแล็กโทสิเดสต่ำ โดยทำให้แลกโตสไม่สามารถถูกย่อยในทางเดินอาหาร จึงมักพบว่ามีหลายคนที่เมื่อดื่มนมแล้วมีอาการดังกล่าว ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถผลิตน้ำย่อยเพื่อช่วยย่อยน้ำตาลแลกโตสในนมได้ จึงทำให้มีน้ำตาลแลกโตสเหลือน้อยกว่าหรือไม่มีเลย จึงทำให้ผู้ที่ไม่มีการสร้างน้ำย่อยดังกล่าวสามารถดื่มนมวัว และผลิตภัณฑ์นมได้โดยไม่เกิดอาการดังกล่าว (de Vrese et al., 2001)

**2.3.3 การลดภาวะภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรง**

โพรไบโอติกในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจะช่วยปรับสภาวะภูมิต้านทานในร่างกาย โดยช่วยลดการอักเสบและทำให้ปัญหาเกี่ยวกับภูมิแพ้ลดน้อยลง พบว่าเด็กอายุ 2 ขวบ ที่ได้รับแบคทีเรีย *Lactobacillus* GG สามารถลดการเกิดภาวะภูมิแพ้ได้ร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก (Kalliomaki et al., 2001) ซึ่งโรคภูมิแพ้ (allergic diseases) เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โพรไบโอติกอาจช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ผลิตสารตอบสนองที่สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น (Kirjavainen et al., 1999) โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยช่วยลดหรือป้องกันการสร้างโปรตีนหรือแอนติบอดี (antibody) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรงของร่างกายได้ (Ezendam and van Loveren, 2006)

**2.3.4 การป้องกันหรือลดระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง**

มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus polyfermenticus* มีฤทธิ์ต้านมะเร็งซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์คือเซลล์ HT-29, DLD-1 และ Caco-2 ได้ ดังนั้น *B. polyfermenticus* อาจสามารถนำมาใช้เพื่อป้องกันและรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Ma et al., 2010) แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่มีส่วนในการก่อให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยการสร้างสารก่อมะเร็งหรือเป็นตัวร่วมในการก่อมะเร็ง โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารประเภทไขมันและเนื้อสัตว์จำนวนมาก โดยไม่รับประทานผักและผลไม้ (Mazmanian et al., 2005) โพรไบโอติกสามารถช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างสารพิษ โดยแบคทีเรียในลำไส้ ทั้งแลคโตบาซิลไลและไบฟิโดแบคทีเรียจะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Yadav et al., 2016) และมีการวิจัยพบว่า *Lactococcus lactis* NK34 เป็นโพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง SK-MES-1, DLD-1, HT-29, LoVo, AGS และ MCF-7 ในหลอดทดลองได้ (Han et al., 2015) โพรไบโอติกยังอาจควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสารหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็งได้ และมีผลต่อการเคลื่อนไหวหรือการบีบตัวของลำไส้ ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็งให้ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น (Benno et al., 1996)

**2.3.5 ประโยชน์ด้านอื่น ๆ**

มีการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ในการกำจัดแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ร่วมกับยาปฏิชีวนะอื่น พบว่าได้ผลดีเช่นเดียวกับการรักษาด้วยวิธีอื่น (Cremonini et al., 2002) โพรไบโอติกอาจช่วยชะลอวัย (anti-aging) ซึ่งพบว่าโพรไบโอติกสามารถฟื้นฟูพีเอชของผิวที่เป็นกรด ช่วยลดความเครียดจากสภาวะออกซิเดชัน และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันผิว (Sharma et al., 2016) และโพรไบโอติกสามารถรักษาอาการอักเสบของช่องคลอดเนื่องจากเชื้อราได้ โดยพบว่าแบคทีเรีย *L. acidophilus* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ในช่องคลอดได้ (Amara and Shibl, 2015) นอกจากนี้โพรไบโอติกอาจช่วยป้องกันการแพร่กระจายของโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์และการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งโพรไบโอติกสามารถนำคอเลสเตอรอลไปใช้ได้โดยตรงเพื่อการสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง (Gilliland et al., 1985)

## 2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับลักษณะ รูปร่าง รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การผลิตสารต่าง ๆ และการทนต่อสภาวะกรดหรือด่าง (Soomro et al., 2002)

**2.4.1 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก** (Salvetti et al., 2012)

2.4.1.1 แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มแลคโตบาซิลไล

1) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate homofermenter) หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเพียงอย่างเดียวในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าร้อยละ 85 จากน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เช่น กลูโคส ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. delbruckii* และ *L. helveticus*

2) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้งสองแบบ (facultative heterofermenter) หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก หรือเอธานอล ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลเฮกโซสได้ และสามารถใช้น้ำตาลเพนโทส (pentose) ได้เล็กน้อย ได้แก่ *L. casei, L. plantarum* และ *L. sake*

3) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก หรือเอธานอล ได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียสามารถสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสได้ดี ได้แก่ *L. bervis*, *L. fermentum* และ *L. kefir*

2.4.1.2 แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แลคโตบาซิลไล

1) *Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างกลม (coccus) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญ ที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวกแลคโตบาซิลไลได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยม

นำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดการสร้างเมือก (slime) จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้เดกซ์แทรน (dextran) ซึ่งทำให้เกิดเมือก สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีแรงดันออสโมซีสสูง (osmophilic bacteria) และมีหลายสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) โดยเจริญได้ในอุณหภูมิ 1-2 องศาเซลเซียส จึงเป็นสาเหตุให้อาหารแช่เย็นเน่าเสีย ตัวอย่างเช่น

*Leuconostoc mesenteroides* ก่อให้เกิดเมือกในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาล ใช้ในการหมักผักต่าง ๆ เช่น ผักกะหล่ำ แตงกวา เป็นต้น แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยังตรวจพบในผลไม้และผลิตภัณฑ์นมอีกด้วย

*Leuconostoc cremoris* ใช้เป็นหัวเชื้อ (starter) ในการผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว

2) *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างกลม (coccus) ที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติก เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ไม่สร้างสปอร์ ตัวอย่าง เช่น

*P. halophilus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) เจริญได้ดีในที่มีเกลือร้อยละ 6-8 และทนเกลือมากกว่าร้อยละ 15 ในปัจจุบันถูกจัดไว้ในสปีชีส์ใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus* เจริญในระหว่างการผลิตซีอิ๊ว (fermented soy sauce) เนยแข็ง (cheese)

*P. cerevisiae* ก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของเบียร์ เนื่องจากสารไดแอซีทิล (diacetyl) ที่สร้างขึ้นมา และทนต่อสารเคมีของดอกฮอพ (hop) ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antiseptics) ในกระบวนการผลิตเบียร์

*P. acidilactici* ใช้ในการผลิต แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เช่น นิซิน (nisin) ซึ่งใช้เป็นสารกันเสีย (preservative)

*P. pentosaceus* พบในอาหารหมักจากธัญพืช ผักกะหล่ำ และแตงกวา

3) *Streptococcus* แบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตคอกไคมีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม (จีนัส) คือ *Enterococci*, *Lactococcus* และ *Streptococcus* แบคทีเรียมีรูปร่างกลม สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีความต้องการสารอาหารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และสามารถทนต่อการฉายรังสี (food irradiation) สายพันธุ์ที่ทนต่อรังสีได้ดี ได้แก่ *Streptococcus faecalis* ตัวอย่างเช่น

*Streptococcus thermophiles* ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว

**2.4.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก**

2.4.2.1 ผลิตภัณฑ์นม

มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์นมหมัก การสร้างกรดแลคติกในระหว่างการหมักทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์ลดลง และเกิดการจับตัวของโปรตีนในนม เกิดเป็นเคิร์ด (curd) รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ตัวอย่าง เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และชีส แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivarius*

subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Tillisch et al., 2013)

2.4.2.2 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ใช้แบคทีเรียแลคติกในการผลิตส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น แหนม ไส้กรอก ในระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจาก pH 6.5-6.6 เป็น pH 5.0-4.5 ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีผลต่อรสชาติของอาหาร และทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและจุลินทรีย์ก่อโรคลดจำนวนลง ซึ่งเกิดขึ้นจากสารที่แบคทีเรียผลิตขึ้น เช่น แบคเทอริโอซิน ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ใช้แบคทีเรียแลคติกในการหมักมีความปลอดภัยต่อการบริโภค สามารถเก็บได้นานขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้แก่ *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. (Vuyst et al., 2008)

2.4.2.3 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาส้ม และน้ำปลา ซึ่งส่วนผสมหลักในการผลิตประกอบด้วยปลาและเกลือ แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *L. pentosu*, *L. plantarum*, *Lactobacillus* sp. และ *Leuconostoc* sp. (Tamang et al., 2016)

2.4.2.4 ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว

การทำผักดองเป็นการแปรรูปผักอีกวิธีหนึ่งทำให้เก็บไว้บริโภคได้นานมากขึ้น และยังรวมไปถึงการผลิตผลไม้ดองด้วย การดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่พบในการดองผัก ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. buchineri, L. plantarum*, *L. brevi*, *L. fermentum* และ *Pediococcus cerevisiae* (Tamang et al., 2016)

2.4.2.5 ผลิตภัณฑ์จากถั่วและธัญพืช

การหมักถั่วและธัญพืช เป็นการหมักโดยใช้ถั่วหรือธัญพืชกับเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นต้น ตัวอย่างได้แก่ ซีอิ๊ว ประกอบด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลีหมักร่วมกับ *Aspergillus oryzae*, *L. delbrueckii* และ *P. halophillus* เครื่องปรุงรสในอาหารประเภทถั่วหมัก เช่น ทู-ชิน (toushin) และ เตา-ซิ (tao-si) เป็นอาหารหมักของญี่ปุ่น โดยใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและแป้งข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Aspergillus*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* (Tamang et al., 2016)

## 2.5 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีหลากหลายสายพันธุ์ การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียจึงมีประโยชน์ทำให้ทราบสกุล (genus) ชนิด (species) และสายพันธุ์ (strain) ต่าง ๆ ของแบคทีเรีย ซึ่งการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

**2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

2.5.1.1 การมองด้วยตาเปล่า

การศึกษารูปร่างของเซลล์และโคโลนีด้วยตาเปล่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีลักษณะโคโลนีสีขาว ขุ่น ขอบเรียบนูน (Batdorj et al., 2006)

2.5.1.2 การย้อมสีแกรม (Gram's stain)

การย้อมสีแกรมเป็นเทคนิคการย้อมสีเซลล์ของแบคทีเรีย ใช้ในการศึกษาเซลล์ของแบคทีเรียโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง คิดค้น โดย Han Christian Gram ใน ค.ศ. 1984 สามารถจำแนกแบคทีเรียออกได้เป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) จากคุณสมบัติของผนังเซลล์ (cell wall) โดยแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟลานินโอ (safranin O) ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) โดยเมื่อมีการเติมสารละลายไอโอดีนเพื่อยึดสีย้อมกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสีย้อมกับสารละลายไอโอดีนจับกัน (crystal violet – iodine complex) ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะไม่ติดกับสารประกอบดังกล่าว แต่จะติดกับสีย้อมของซาฟลานินโอแทน

การย้อมสีแบคทีเรียแกรมบวกและลบที่ติดสีย้อมแตกต่างกันเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีสารพวกไขมันเกาะอยู่ที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกและมีผนังเซลล์ที่บางกว่า ในกระบวนการย้อมสี เมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์หรืออะซิโตนจะไปละลายไขมันทำให้รูที่ผนังเซลล์เปิดกว้างขึ้น ยอมให้สารประกอบเชิงซ้อนของสีคริสตัลไวโอเลตกับไอโอดีนหลุดออกมา จึงติดสีแดงของซาฟลานินโอ แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์จะทำให้เซลล์เหี่ยวเพราะเกิดจากการสูญเสียน้ำ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีขนาดเล็กลง สารประกอบเชิงซ้อนของสีคริสตัลไวโอเลตกับไอโอดีนจึงละลายออกมาไม่ได้ ทำให้เซลล์ยังคงติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลตและเมื่อย้อมทับด้วยสีซาฟลานินโอเซลล์จึงไม่ติดสีแดง (Coico, 2005)

**2.5.2 การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test)**

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารต่าง ๆ ซึ่งการทดสอบทางชีวเคมีทำเพื่อดูสมบัติของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับข้อมูลในคู่มือ Bergey's manual ซึ่งเป็นหนังสือที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรีย โดยตัวอย่างการทดสอบทางชีวเคมี คือ

2.5.2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

เป็นการทดสอบที่จำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนจะทำให้เกิดไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ผลผลิตคือได้ก๊าซออกซิเจนกับน้ำ ดังสมการเคมี 2.1

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O+O_2 \qquad (2.1)$$

ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จะสามารถป้องกันการถูกทำลายจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังมีส่วนในการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และไฮดรอกไซด์ (hydroxide) ที่สามารถทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุล ได้แก่ กรดนิวคลีอิก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียไม่ใช้อากาศ ไม่ใช้ออกซิเจน หรือ ไม่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ในการดำรงชีวิต ออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียกรดแลคติกจึงไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จะให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นลบ (catalase negative) ทดสอบโดยการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแบคทีเรียที่เขี่ยลงบนแผ่นสไลด์จะไม่เกิดปฏิกิริยาโดยไม่มีฟองเกิดขึ้น (Whittenbury, 1964)

2.5.2.2 ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรต คือสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่น ๆ ได้ โดยผลิตสารต่าง ๆ ออกมา เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดแอซีติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) และเอธานอล (ethanol) เป็นต้น แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรต คือสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่น ๆ ได้ โดยผลิตสารต่าง ๆ ออกมา ซึ่งจากชนิดและปริมาณสารที่แบคทีเรียผลิตได้นี้สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) สามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมักย่อยน้ำตาลได้สูงประมาณร้อยละ 95 ที่เหลืออีกร้อยละ 5 จะผลิตกรดแอซีติก (acetic acid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย และกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) หลังจากการหมักย่อยน้ำตาล และผลิตกรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 และอีกร้อยละ 50 ผลิตกรดแอซีติก กรดฟอร์มิก (formic acid) รวมทั้งเอธานอล (ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Stiles, 1996) คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมแพะหมักแบบธรรมชาติ เมื่อนำมาทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และมีเพียง 1 ไอโซเลต ที่สันนิษฐานว่าเป็น *Lactobacillus pentosus* (Yelnetty et al., 2014)

**2.5.3 การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน 16S rDNA**

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA เป็นการพิจารณาความเหมือนกันของ DNA (DNA-DNA homology) ที่ใช้จำแนกได้ในระดับสปีชีส์และสกุล โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของ RNA ในไรโบโซม (rRNA) โดยเฉพาะในส่วนของ Well conserved region และ Less conserved region ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส ใน 16s rRNA ซึ่งการเปรียบเทียบมีความแม่นยำมากในการจัดจำแนกและใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์กันของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็นสกุลต่าง ๆ ดังนี้ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella, Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ (Stiles, 1996)

Ribosomal RNA (rRNA) ของโพรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยขนาดใหญ่ 50S (large subunit) และหน่วยขนาดเล็กขนาด 30S (small subunit) ซึ่งหน่วยเล็กประกอบด้วย 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์และโปรตีน 21 ชนิด (ลัดดาเอกสมทราเมษฐ์, 2547) ดังนั้น rRNA จึงเหมาะสำหรับนำมาศึกษาวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์ เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิดและมีหน้าที่ในการผลิตโปรตีนเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการที่อยู่ในระดับเหมาะสม และโครงสร้างของ 16S rRNA มีความสำคัญต่อเซลล์เป็นอย่างมาก ซึ่ง rRNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะแน่นอนจึงสามารถนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Janda and Abbott, 2007)

## 2.6 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น อนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นปกติจากปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิลน้อย มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลง ก็จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป เป็นสาเหตุของโรคภัยได้ อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนของออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระ และว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาและดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่เพื่อให้เกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$),

hydrogen peroxide, superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), reactive oxygen species (ROS), transition metals (โลหะทรานซิชัน) เป็นต้น (Halliwell, 1999)

นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ อนุมูลอิสระสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลทุกประเภทและส่วนประกอบของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น ไขมัน (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) หน่วยพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Ames et al., 1993)

อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในชีวิตประจำวัน เช่น การได้รับเชื้อโรค การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย ในกลไกป้องกันตัวเองของร่างกายเมื่อถูกเชื้อโรคเข้ารุกรานจะมีการสร้างอนุมูลอิสระ ROS โดยเรียกว่า oxidative burst จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet: UV) รังสีเอ็กซ์ (X-Ray) รังสีแกมมา (Gamma ray) โดยรังสีเหล่านี้จะกระตุ้นให้น้ำเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) อย่างง่ายดาย และจากมลภาวะ ควันบุหรี่ มลพิษ เขม่าจากเครื่องยนต์ แก๊สจากท่อไอเสีย (ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์) จากการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่างที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก เป็นต้น (ไมตรี สุทธจิตต์, 2555)

## 2.7 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) หรืออาจเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ในสิ่งมีชีวิตจะมีการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด เช่น เอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ สารประกอบที่ละลายในไขมัน เป็นต้น ซึ่งสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน สารต้านออกซิเดชัน สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1) ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant)

2) ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (scavenging antioxidant)

3) ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (chain breaking antioxidant)

สารต้านออกซิเดชัน ประกอบด้วยสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ และสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ซึ่งสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ EDTA, butylated hydroxyanisole

(BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ tertiary butyl hydro quinone (TBHQ) สารสังเคราะห์นี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค

สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ได้แก่ โพลีฟีนอล (polyphenol) ในเครื่องเทศ (spices) สารสกัดจากเมล็ดองุ่น ชา ขมิ้น แอสตาแซนทิน (astaxanthin) ยูจีนอล (eugenol) ในกานพลู วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) กรดซิตริก แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซีลีเนียม (selenium) และกลูตาไธโอน (glutathione) ส่วนสารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ได้แก่ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase: GPX), กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) และกลูตาไธโอนทรานเฟอร์เรส (glutathione transferase) ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD) สามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และคะตะเลส (catalase) เป็นเอนไซม์ทั่วไปที่พบในเกือบทุกสิ่งมีชีวิตเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะทำหน้าที่เร่งการสลายตัวของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงสู่น้ำและออกซิเจน (Gaetani et al., 1996)

ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านออกซิเดชันขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากสารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวได้จากพืชผักและผลไม้เป็นส่วนใหญ่ (Carlsen et al., 2010)

## 2.8 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีดีพีพีเอช (diphenyl-picryhydrazyl radical scavenging assay: DPPH) วิธีเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay: ABTS) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน (ferric ion reducing antioxidant power: FRAP) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เช่น โทรลอกซ์ (trolox) วิตามินซี (vitamin C) และเฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulfate) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ

(1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

(2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ($IC_{50}$, 50% of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

ซึ่งทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัม (μM/mg), มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม (mM/mg), ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิลิตร (μM/mL), มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร (mM/mL) เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

**วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน** มีดังนี้

**2.8.1 DPPH assay**

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันที่ละลายด้วยเมทานอล คือ สารที่ให้อิเล็กตรอน ตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง เมื่อมีสารต้านออกซิเดชันจะทำให้สีม่วงกลายเป็นสีเหลือง ดังสมการ 2.2

$$DPPH^{\bullet}\text{ (สีม่วง)} + AH\text{ (สารต้านออกซิเดชัน)} \longrightarrow DPPH\text{-}H\text{ (สีเหลือง)} + A^{\bullet} \qquad (2.2)$$

โดย $DPPH^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระดีพีพีเอช $A^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านออกซิเดชัน

การหาสารต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างหาได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยสามารถคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นก่อนใส่สารตัวอย่าง ดังสมการ 2.3

$$\%\ DPPH\ radical\ scavenging\ activity = [(A_0-A_s)/A_0] \times 100 \qquad (2.3)$$

โดย $A_0$ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ $A_s$ = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$) ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระดีพีพีเอช จางลงได้เช่นกัน (Lee et al., 2008)

**2.8.2 ABTS assay**

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ซึ่งสารเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการ

ดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ดังสมการ 2.4

$$ABTS^{\bullet+} \text{ (สีเขียวปนน้ำเงิน)} + AH \text{ (สารต้านออกซิเดชัน)} \longrightarrow ABTS \text{ (สีจางลง)} + A^{\bullet} \quad (2.4)$$

โดย $ABTS^{\bullet+}$ คือ อนุมูลอิสระเอบีทีเอส $A^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านออกซิเดชัน

การหาสารต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณจะเทียบกับสารมาตรฐาน โทรลอกซ์หรือวิตามินซี และสามารถคำนวณเหมือนกับวิธี DPPH assay ดังสมการ 2.3 ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ สามารถละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอชกว้าง (Re and Pellegrini et al., 1999) ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่สามารถพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตก่อนประมาณ 4-16 ชั่วโมง ถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระขึ้น (Javanmardi et al., 2003)

**2.8.3 FRAP assay**

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านออกซิเดชันสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ดังสมการ 2.5

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} \quad \text{antioxidant} \longrightarrow [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+} \quad (2.5)$$

ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเทตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารต้านออกซิเดชัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย (Payne et al., 2013)

## 2.9 คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของโพรไบโอติก

### 2.9.1 *Lactobacillus rhamnosus*

ได้มีการศึกษาความสามารถการต้านออกซิเดชันต่าง ๆ เพื่อป้องกันภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง โดยได้ศึกษาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไฮดรอกซิล ซึ่งพบว่า *L. rhamnosus* GG มีอัตราการมีชีวิตรอดในลำไส้ใหญ่มากกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่ง *L. paracasei* Fn 032 และ *L. plantarum* Fn 001 สามารถ

กำจัดอนุมูลอิสระโดยการสร้างสารภายในเซลล์ (intracellular free extracts) และมีการขับสารมากขึ้นเมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและตับอ่อน (Sun et al., 2013) การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใน *Caenorhabditis elegans* พบว่า *L. rhamnosus* สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *C. elegans* ได้ดีกว่าแบคทีเรีย *E. coli* OP50 แสดงว่า *L. rhamnosus* มีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *C. elegans* (Grompone et al., 2012)

**2.9.2 *Lactobacillus fermentum***

มีการศึกษาพบว่า *L. fermentum* ME-3 นอกจากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแล้วยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงโดยออกฤทธิ์ในรูปแบบของกลูต้าไทโอน (glutathione) ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Mikelsaar and Zilmer, 2009)

**2.9.3 *Lactobacillus casei***

ส่วนของเซลล์และสารที่หลั่งออกมาภายในเซลล์ ของ *L. casei* KCTC 3260 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ได้ถึง 46.2% และ 72.9% ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งสารคีเลต (chelating activity) ที่ 10.6 และ 21.8 ppm ตามลำดับ (Lee et al., 2006)

**2.9.4 *Lactobacillus gasseri***

มีการศึกษาพบว่า *L. gasseri* NLRI 312 สามารถยับยั้งความเสียหายจากการเกิดออกซิเดชันต่อไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์และดีเอ็นเอในเซลล์ Jurkat ซึ่ง *L. gasseri* NLRI 312 มีผลต่อการป้องกันเซลล์ Jurkat ในแง่ของความเสียหายจากการเกิดออกซิเดชันและสามารถลดความเสียหายของดีเอ็นเอได้ (Kim et al., 2006)

**2.9.5 *Bifidobacterium* sp.**

มีการศึกษาพบว่า *Bifidobacerium longum* ATCC 15708 ทั้งส่วนของเซลล์ (intact cells) และสารที่หลั่งออกมาภายในเซลล์ (intracellular free extracts) มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา linoleic acid peroxidation ได้ 32% และ 48% และมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดยมีค่า %DPPH scavenging activity เท่ากับ 52% และ 42% (Lin and Chang, 2000)

## 2.10 โยเกิร์ตนมถั่วเหลือง (soy yogurt)

### 2.10.1 ถั่วเหลือง (Soybean, Soya bean)

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Glycine max* (L.) Merr.

จัดอยู่ในวงศ์ คือ LEGUMINOSAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ต้นถั่วเหลืองมีลำต้นตั้งตรง ลักษณะเป็นพุ่ม มีความสูงประมาณ 30-150 เซนติเมตร ลำต้นมีขนปกคลุมอยู่ทั่วไป ยกเว้นในส่วนของใบเลี้ยงและกลีบดอก รากถั่วเหลืองเป็นรากแก้ว ซึ่งประกอบไปด้วยรากแก้วที่เจริญมาจากรากแรกของต้น และมีรากแขนงที่เจริญมาจากรากแก้ว ส่วนบริเวณปมรากนั้นเกิดจากแบคทีเรียไรโซเบียมที่เข้าไปอาศัยอยู่ ใบถั่วเหลืองระยะต้นอ่อนจะมีใบเลี้ยงใบจริงคู่แรกเป็นใบเดี่ยว โดยใบจริงที่เกิดขึ้นต่อมาจะเป็นใบประกอบแบบ 3 ใบย่อย คือ มีใบย่อยด้านปลาย 1 ใบและมีใบย่อยด้านข้างอีก 2 ใบ ดอกถั่วเหลือง ออกดอกเป็นช่อ

มีช่อดอกเป็นแบบกระจะ ดอกมีสีขาวหรือสีม่วง โดยสีขาวเป็นลักษณะด้อย เมื่อดอกบานเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 3-8 มิลลิเมตร โดยดอกจะเกิดตามมุมของก้านใบหรือตามยอดของลำต้น ฝักถั่วเหลืองออกฝักเป็นกลุ่ม กลุ่มละประมาณ 2-10 ฝัก ที่ฝักมีขนสีเทาหรือสีน้ำตาลปกคลุมอยู่ทั่วฝัก ฝักมีความยาวประมาณ 2-7 เซนติเมตร ในแต่ละฝักจะมีเมล็ดอยู่ประมาณ 1-5 เมล็ด (Newell and Hymowitz, 1983)

**2.10.2 ประโยชน์ของโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง**

โยเกิร์ตนมถั่วเหลือง คือ การใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการหมักนมถั่วเหลือง เนื่องจากถั่วเหลืองมีโปรตีนสูงจึงเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ เพราะถั่วเหลืองมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับโปรตีนจากสัตว์ ถ้าบริโภคถั่วเหลืองในปริมาณที่สูงพอ ร่างกายจะได้รับโปรตีนเพียงพอกับความต้องการได้ และเหมาะสำหรับผู้ที่มีภาวะที่ไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส ซึ่งมักมีอาการปวดท้องเมื่อร่างกายได้รับน้ำตาลแลกโตสซึ่งพบมากในน้ำนมวัว ดังนั้นโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบริโภค ซึ่งมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.10.2.1 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

โปรตีนจากถั่วเหลืองพบว่าสามารถยับยั้งการบุกรุก (invasion) ของเซลล์มะเร็งรังไข่โดยการควบคุมการแสดงของยีนยูโรไคเนส (urokinase) การบริโภคโยเกิร์ตถั่วเหลืองสามารถช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ของหนูทดลองที่เกิดจากสาร Azoxymethane ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้ (Kobayashi et al., 2004) สารลูนาซิน (Lunasin) เป็นกรดอะมิโน (43-amino acid) ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งได้จากถั่วเหลืองและพืชอื่น ๆ ซึ่งมีรายงานว่ามีคุณสมบัติต้านการอักเสบและต้านมะเร็ง (Xiao et al., 2005) ถั่วเหลืองประกอบไปด้วยไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซึ่งเป็นกลุ่มของไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) ซึ่งสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านมได้ ในผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมเมื่อบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลืองสามารถลดความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตและการกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำอีกครั้ง (Hakkak et al., 2001)

2.10.2.2 ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

โปรตีนจากถั่วเหลืองมีฤทธิ์ในการปรับภูมิคุ้มกัน เนื่องจากถั่วเหลืองมีโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysates) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulating peptide) ช่วยป้องกันอาการผมร่วงที่เกิดจากการรักษามะเร็งด้วยเคมีบำบัด ซึ่งได้แยกมาจากเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนถั่วเหลือง (Dia and Torres et al., 2009) ฤทธิ์ในการกระตุ้นการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis-stimulating activity) (Egusa and Otani, 2009)

2.10.2.3 ฤทธิ์ลดความดันโลหิต

พบสารยับยั้งแองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติงเอนไซม์ (Angiotensin-Converting Enzyme: ACE) หลายชนิดในเอนไซม์ไฮโดรไลเซต (protein hydrolysates) ของโปรตีนถั่วเหลือง (Hernandez-Ledesma et al., 2003) การหมักเปปไทด์ถั่วเหลืองจากมิโซ (miso) และทเวนจัง (doenjang) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และไตรเปปไทด์ (tripeptides) (Val-Pro-Pro และ Ile-Pro-Pro) ในโยเกิร์ตถั่วเหลืองการย่อยโปรตีนของโพรไบโอติกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ ACE (Crook and Penumalee 2002; Johnston, 1992)

2.10.2.4. ฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอล

การบริโภคโปรตีนถั่วเหลืองมากกว่าโปรตีนจากสัตว์สามารถลดระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด โดยไม่มีผลต่อระดับ high density lipoprotein (HDL) ในเลือด (Inoue et al. 2009; Anderson and Moore, 2004) การหมักโยเกิร์ตถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรีย *Bifidobacterium* จะช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมา และลดไขมัน low-density lipoprotein (LDL) ในหนูทดลอง (Wang et al., 2004) โปรตีนจากถั่วเหลืองจะช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งไอโซฟลาโวน (isoflavones) ในโยเกิร์ตถั่วเหลืองส่งผลในการป้องกันไขมัน LDL ในการเกิดออกซิเดชันได้

2.10.2.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งสารจีนิสทีน (genistein) และเดดซีน (daidzein) จากถั่วเหลืองสามารถช่วยปกป้องเซลล์จากผลเสียหายที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดริ้วรอยและโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือด ข้ออักเสบ และโรคแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โยเกิร์ตถั่วเหลืองมีสารไอโซฟลาโวน (daidzein และ genistein) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาพบว่าสารไอโซฟลาโวนมีฤทธิ์ในการลดการเกิดออกซิเดชันในการเกิดไขมัน LDL โดยมีความสำคัญในการป้องกันความเสียหายของโรคหลอดเลือด ซึ่งมีการศึกษาในชายและหญิงชาวญี่ปุ่นพบว่าสารไอโซฟลาโวนอะไกลโคน (isoflavone aglycones) มีการดูดซึมได้ดีกว่ากลูโคไซด์ (glucosides) ซึ่งในโยเกิร์ตถั่วเหลืองมีไอโซฟลาโวนอะไกลโคนที่สามารถดูดซึมได้ง่ายในลำไส้เล็กได้อย่างรวดเร็ว (Kikuchi-Hayakawa et al., 2000)

## 2.11 โยเกิร์ตนมอัลมอนด์

### 2.11.1 อัลมอนด์ (Almond)

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Prunus dulcis*

อยู่ในวงศ์ คือ ROSACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชตระกูลถั่ว ลำต้นเป็นพืชยืนต้น มีลำต้นเดี่ยว แตกกิ่งก้านมีทรงพุ่ม ลำต้นมีลักษณะกลม ๆ เป็นไม้เนื้อแข็ง มีเปลือกหนาแข็งมีสีน้ำตาล รากมีระบบรากแก้วแทงลึกลงในดิน มีลักษณะทรงกลม มีรากแขนงแตกฝอยเล็ก ๆ ออกมาจากรากแก้ว มีสีน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว มีใบออกตรงข้ามกัน ใบมีลักษณะทรงรี ขอบหยัก มีก้านใบรองรับ มีขนอ่อน ๆ ปกคลุม มีสีเขียว ดอกออกเดี่ยว ออกที่ซอกใบ ดอกมีลักษณะทรงกลม กลีบดอกจะมีสีชมพู หรือสีขาว มีก้านช่อดอกสั้น ผลเป็นผลเดี่ยว มีลักษณะทรงกลมรี มีขนอ่อน ๆ ปกคลุม ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่เปลือกแตกออกมีสีน้ำตาล ข้างในมีเมล็ดมีเปลือกหนาแข็ง มีสีน้ำตาล เมล็ดมีเปลือกหนาแข็งหุ้มเมล็ดอยู่ มีสีน้ำตาล ภายในมีเมล็ดอยู่ มีลักษณะทรงกลมรี มีรอยลึกตามยาว มีเยื่อบางมีสีน้ำตาลหุ้มเมล็ดอยู่ ข้างในมีเนื้อ สีขาวนวล มีรสชาติมัน (Ladizinsky, 1999)

### 2.11.2 ประโยชน์ของโยเกิร์ตนมอัลมอนด์

โยเกิร์ตนมอัลมอนด์เป็นการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้ในการหมักนมอัลมอนด์ ซึ่งอัลมอนด์เป็นแหล่งโปรตีนที่ดีสำหรับผู้ที่ไม่บริโภคเนื้อสัตว์ และนมอัลมอนด์มีปริมาณแคลอรี่น้อยกว่า

นมวัว เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และผู้ที่มีภาวะที่ไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส ดังนั้นโยเกิร์ตจากนมอัลมอนด์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบริโภค ซึ่งมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.11.2.1 ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

มีการศึกษาพบว่านมอัลมอนด์หมักกับแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ *B. longum* CECT 4551 และ *L. rhamnosus* CECT 278 มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่ดีผ่านแมกโครเฟจ (macrophages) และไม่ก่อให้เกิดผลเสียเกี่ยวกับการดูดซึมอาหารของเยื่อบุลำไส้เล็กและการบ่มแบคทีเรียโพรไบโอติกร่วมกัน บางสายพันธุ์ให้ผลดีเกี่ยวกับการดูดซึมธาตุเหล็กในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก การหมักนมอัลมอนด์กับแบคทีเรียโพรไบโอติกอาจเป็นประโยชน์สำหรับการดูดซึมสารอาหารในลำไล้เล็กได้ (Bernata et al., 2015)

2.11.2.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

อัลมอนด์มีวิตามินอี (vitamin E) สูงมาก ซึ่งนมอัลมอนด์เป็นแหล่งวิตามินอีที่ได้จากธรรมชาติ โดยวิตามินอีเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งจะช่วยป้องกันโรคหัวใจ โรคมะเร็ง และอาจส่งผลดีต่อกระดูกและดวงตา นอกจากนี้วิตามินอียังส่งผลดีต่อสมองอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าช่วยเพิ่มความจำและยังลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคโรคอัลไซเมอร์ (La Fata et al., 2014)

2.11.2.3 การแพ้น้ำตาลแลกโตส (lactose intolerance)

การแพ้น้ำตาลแลกโตสเป็นภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลกโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลในนมได้ สาเหตุเกิดจากการขาดเอนไซม์แลกเตส (lactase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยแลกโตสให้แตกตัว ความบกพร่องนี้อาจเกิดจากพันธุกรรม อายุหรือปัจจัยอื่น ๆ การแพ้อาจก่อให้เกิดอาการปวดท้องและอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ซึ่งพบว่าประชากรทั่วโลกมีการแพ้น้ำตาลแลกโตสถึงร้อยละ 75 โดยพบว่าทวีปยุโรปมีอัตราการแพ้ร้อยละ 5-17 และทวีปอเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชียมีอัตราการแพ้ร้อยละ 50-100 (Rienzo et al., 2013) ซึ่งนมอัลมอนด์ไม่มีน้ำตาลแลกโตสจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับผู้ที่แพ้น้ำตาลแลกโตส

## 2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ใน ค.ศ. 2012 การศึกษาของ Abubakr และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี DPPH assay และ ferrous chelating activity (FCA) พบว่ามี 7 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) ในอาหาร skim milk agar และมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ตั้งแต่ 14.7 ถึง 50.8% (v/v) หลังการหมัก 24 ถึง 72 ชั่วโมง และทดสอบ FCA ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันหลังจาก 72 ชั่วโมงของการหมักแบคทีเรียกรดแลคติก มีค่าระหว่าง 41.8 ถึง 97.6% (v/v) สำหรับกรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอาเซติก (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการสร้างเปปไทด์ในนมที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ (Abubakr et al., 2012)

ใน ค.ศ. 2015 การศึกษาของ Ji และคณะ ได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่แยกได้จากกิมจิและอุจจาระของทารก ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียได้ คือ A1, A2, S1, S2 และ S3 เมื่อระบุสายพันธุ์เป็น *Lactobacillus* sp. และแยก A3, A4, E1, E2,

E3 และ E4 ระบุสายพันธุ์เป็นเชื้อ *Leuconostoc* sp. บนพื้นฐานของคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ได้รับการยืนยันว่าปลอดภัยไม่มีเอนไซม์ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และไม่ก่อให้เกิดเอนไซม์ที่เป็นอันตราย พบว่ามี 11 ไอโซเลต ที่สามารถทนต่อกรดและเกลือน้ำดีได้ และยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารคือ *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* และมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งพบว่า A1, A3, S1 และ S3 สามารถนำไปการพัฒนาเป็นอาหารที่มีประโยชน์และผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้อาจมีส่วนช่วยในการป้องกันและควบคุมโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้ (Ji et al., 2015)

ใน ค.ศ. 2016 การศึกษาของ Muniandya และคณะ ได้ศึกษาผลของโยเกิร์ตชาเขียว ชาขาว และชาดำ (*Camellia sinensis*) ที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดยในการเก็บเป็นระยะเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งได้นำโยเกิร์ตมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, FRAP assay และ ferrous ion chelating (FIC) ซึ่งผลการทดลองพบว่าโยเกิร์ตชาเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตามด้วยโยเกิร์ตชาขาวและโยเกิร์ตชาดำ และโยเกิร์ตชาเขียว ชาขาว และชาดำ มีค่า FRAP และ FIC สูงกว่าโยเกิร์ตธรรมดาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 21 วัน นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโยเกิร์ตชาทุกชนิดคงที่ตลอดช่วงการเก็บรักษา สรุปได้ว่าชาเขียว ชาขาวและชาดำสามารถช่วยเสริมคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของโยเกิร์ตและให้สารต้านออกซิเดชันอย่างคงที่ในช่วงการเก็บรักษา (Muniandy et al., 2016)

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

### 3.1.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) บริษัท Bacthax Bangkok Equipment and chemical, ประเทศไทย

3.1.1.2 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) บริษัท Scientific promotion, ประเทศไทย

3.1.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท Scientific promotion, ประเทศไทย

3.1.1.4 ตู้อบแห้ง (Hot air oven) บริษัท Heraeus instruments, ประเทศเยอรมนี

3.1.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Anti-mold Nikon

3.1.1.6 เครื่องวัด pH (pH meter) บริษัท Mettler Toledo, ประเทศไทย

3.1.1.7 เครื่องชั่ง (Balance) บริษัท Mettler Toledo, ประเทศไทย

3.1.1.8 เครื่องปั่น (Blender) บริษัท Mettlertech, ไต้หวัน

3.1.1.9 เตาความร้อน (Hot plate) บริษัท Gibthai, ประเทศไทย

3.1.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated centrifuge) บริษัท Eppendorf™, ประเทศมาเลเซีย

3.1.1.11 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Jenway, ประเทศจีน

3.1.1.12 เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper) บริษัท Mitutoyo, ประเทศญี่ปุ่น

3.1.1.13 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Heraeus instruments, ประเทศเยอรมนี

### 3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.2.1 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.2.2 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.2.3 Mueller Hinton Agar (MHA agar) บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.2.4 Tryptic soy (TSA) agar บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.2.5 Tryptic soy broth (TSB) บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.2.6 Tetracycline บริษัท Applichem Panreac, ประเทศเยอรมนี

3.1.2.7 Ampicillin บริษัท Applichem Panreac, ประเทศเยอรมนี

3.1.2.8 Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.2.9 2,2-DiPhenyl-2-Picryl hydrazyl hydrate (DPPH) บริษัท Sigma-Aldrich Chemistry, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2.10 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{\bullet+}$) บริษัท Sigma-Aldrich Chemistry, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2.11 Alcohol บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.2.12 Methanol บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.2.13 hydrogen peroxide ($H_2O_2$) บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.2.14 Sodium chloride (NaCl) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.2.15 Disodium Hydrogenphosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.2.16 Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.2.17 Hydrochloric acid (HCl) บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.2.18 Sodium hydroxide (NaOH) บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.2.19 Crystal violet บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.2.20 Safranin O บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.3.21 Glacial acetic acid บริษัท British Drug Houses Chemicals, ประเทศอังกฤษ

3.1.3.22 นมถั่วเหลืองสำเร็จรูป รสจืด ชนิดพาสเจอร์ไรส์

3.1.3.23 L-ascorbic acid (Vitamin C) บริษัท Sigma-Aldrich Chemistry, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.24 Potassium persulphate ($K_2O_8S_2$) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.3.25 Sodium acetate ($CH_3COONa.3H_2O$) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.3.26 2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine (TPTZ) บริษัท Acros Organics, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.27 Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3$-$6H_2O$) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.3.28 นมอัลมอนด์ รสธรรมชาติ แบบยูเอชที

3.1.3.29 Blood agar กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, ประเทศไทย

3.1.3.30 DNase agar บริษัท HiMedia, ประเทศอินเดีย

3.1.3.31 Folin-Ciocalteu reagent บริษัท Sigma-Aldrich Chemistry, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3.32 Sodium carbonate ($Na_2CO_3$) บริษัท Unilab Scientific, ประเทศนิวซีแลนด์

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง

เก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ ปลาส้ม ปลาร้า ปลาจ่อม ไส้กรอกหมู หม่ำส้มหมู ไส้กรอกวัว ส้มกุ้ง ผักดอง หน่อไม้ดอง และหน่อไม้ส้ม เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างอาหารจากตลาด ร้านค้า ในเขตอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

3.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

นำตัวอย่างอาหารหมักดองอย่างละ 10 กรัม เติมลงในน้ำเกลือ (normal saline 0.9% w/v) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมสารโดยใช้เครื่องปั่น (blender) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar ทำการเจือจางแบบอนุกรม 10 เท่า (ten-fold dilution) จากนั้นนำไปเกลี่ยให้ทั่ว (spread) บนหน้าอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร MRS agar โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาว ขุ่น ขอบเรียบนูน และแยกเชื้ออีกครั้งเพื่อทำให้บริสุทธิ์โดยนำไปขีด (streak) บนอาหาร MRS agar จนได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) และนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดลองขั้นต่อไป (Batdorj et al., 2006)

3.2.1.3 การย้อมสีแกรม (Gram stain)

นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ยอมดวยสารละลายคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) เปนเวลา 1 นาที เทสีทิ้งพรอมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนเปนเวลา 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งพรอมทั้งหยดเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ลางแผนสไลดดวยน้ำกลั่นแลวจึงยอมสีด้วยสารละลายซาฟลานินโอ (safranin O) เปนเวลา 1 นาที ลางดวยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผนสไลดใหแหง นำไปตรวจสอบรูปร่างเซลล สังเกตการจัดเรียงตัวโดยใชกลองจุลทรรศน ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะย้อมสีติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต และมีลักษณะรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม (Kaban and Kaya, 2008)

3.2.1.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แลวเขี่ยเชื้อบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเพอรออกไซด ($H_2O_2$) ความเข้มข้น 3% (v/v) ถาพบโคโลนีเกิดฟองอากาศ แสดงวาแบคทีเรียนั้นให ผลเปนบวกแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ สวนโคโลนีที่ไมเปลี่ยนแปลงจะใหผลลบแสดงวาแบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) โดยใช้แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) (Kaban and Kaya, 2008)

**3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติก**

3.2.2.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ช่วงระหว่าง 0.08-0.10 มีเชื้อแบคทีเรียประมาณ $1.5 \times 10^8$ CFU/mL) และนำ 1 มิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรีย เติมลงใน MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำ จำนวน 4,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใส (supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay

3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay โดยดำเนินการตามวิธีของ Shimada และคณะ (Shimada et al., 1992) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (w/v) โดยการละลายสาร DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) กับเมทานอล จากนั้นเติมส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองและเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ MRS broth เป็นตัวควบคุมเปล่า (blank) และใช้โทรลอกซ์ (trolox) กับวิตามินซี (vitamin C) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) เป็นสารมาตรฐาน และคำนวณหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสมการ 3.1

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = [1- (Abs_{sample}/ Abs_{control})] \times 100\% \qquad (3.1)$$

โดย $Abs_{sample}$ = ค่าดูดกลืนแสงของแบคทีเรียกรดแลคติกกับสารละลาย DPPH และ

$Abs_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของ MRS broth กับสารละลาย DPPH

3.2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay โดยดำเนินการตามวิธีของ Re และคณะ (Re et al., 1999) โดยการเตรียมอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) ความเข้มข้น

7 มิลลิโมลาร์ (w/v) กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน (1:1,v/v) ทิ้งไว้ประมาณ 4-16 ชั่วโมงจนกว่าปฏิกิริยาจะเสร็จสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงประมาณ 0.700 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และผสมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร กับส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 0.1 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด เป็นเวลา 4 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และใช้โทรลอกซ์ (trolox) กับวิตามินซี (vitamin C) ความเข้มข้น 0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันคำนวณโดยใช้สมการ 3.2

$$\% \text{ ABTS scavenging ability} = [Abs_{control} - (Abs_{control} / Abs_{control})] \times 100\% \qquad (3.2)$$

โดย $Abs_{sample}$ = ค่าดูดกลืนแสงของแบคทีเรียกรดแลคติกกับสารละลาย ABTS และ

$Abs_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของ MRS broth กับสารละลาย ABTS

3.2.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay โดยดำเนินการตามวิธีของ Benzie และ Strain (Benzie and Strain, 1996) เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ (300 mM (w/v), pH 3.6) โดยนำ 3.1 กรัม ของโซเดียมอะซิเตตผสมกับกรดแกลเชียลแอซีติก (glacial acetic acid) ปริมาตร 16 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรขั้นสุดท้ายเพิ่มขึ้นเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น และเตรียมสารละลาย FRAP โดยการผสม 10 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 300 mM (pH 3.6) กับ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine) ความเข้มข้น 10 mM (v/v) (10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl) และสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ($FeCl_3$-$6H_2O$) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 1.2 มิลลิลิตร นำส่วนใส (supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เพื่อคำนวณการดูดกลืนแสงสำหรับแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ $FeSO_4 7H_2O$ เป็นสารมาตรฐาน (1 ถึง 8 mM)

**3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก**

3.2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี cylinder plate method ซึ่งดำเนินการตามวิธีของ Plein และ Plein (Plein and Plein, 1957) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* DMST 562, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 ในอาหาร TSB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความขุ่นของแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดโดยนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ช่วงระหว่าง OD

0.08-0.10 จากนั้นนำมาป้าย (swab) ลงบนผิวหน้าอาหาร MHA agar วาง cylinder cup บนหน้าอาหาร นำแบคทีเรียกรดแลคติกไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) มากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปเติมลงใน cylinder cup ที่วางบน MHA ซึ่งยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline) และแอมพิซิลลิน (ampicillin) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และ MRS broth เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ 2 การทดลอง บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (zone of inhibition) ด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ได้ค่าเป็นมิลลิเมตรแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

3.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร

3.2.3.2.1 ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วยเครื่อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงระหว่าง OD 0.08-0.10 มีเชื้อโดยประมาณ $1.5 \times 10^8$ CFU/mL) โดยนำ 1 มิลลิลิตร ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วเติมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี pH 2, pH 3 และ pH 6.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่า pH ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริค (HCl) ความเขมขน 2 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด (NaOH) ความเขมขน 2 นอรมอล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 3 ชั่วโมง และทำการเจือจางและเกลี่ยให้ทั่ว (spread) บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ 2 การทดลอง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณค่า CFU/mL ดังสมการ 3.3 และแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) (Hassanzadazar et al., 2012) และคำนวณค่าร้อยละของการรอดชีวิต (% survival) ดังสมการ 3.4

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร X ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่เติมลงในจานอาหาร}} \quad (3.3)$$

วิธีการคำนวณค่าร้อยละของการรอดชีวิต (% survival)

$$\text{ร้อยละของการรอดชีวิต (\% survival)} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการบ่ม X 100}}{\text{จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น}} \quad (3.4)$$

3.2.3.2.2 การทดสอบความสามารถในการทนตอเกลือน้ำดี โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่า OD อยู่ในช่วงระหว่าง 0.08-0.10 มีเชื้อโดยประมาณ $1.5 \times 10^8$ CFU/mL โดยนำ 1 มิลลิลิตร ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีการเติมเกลือน้ำดีความ

เข้มข้นร้อยละ 0.15 (w/v) และร้อยละ 0.30 (w/v) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 4 ชั่วโมง ทำการเจือจางและเกลี่ยให้ทั่ว (spread) บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงทำการทดลอง 3 ซ้ำ 2 การทดลอง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณค่า CFU/mL ดังสมการ 3.5 และแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) (Gilliland et al., 1984) และคำนวณค่าร้อยละของการรอดชีวิต (% survival) ดังสมการ 3.6

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร X ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่เติมลงในจานอาหาร}} \quad (3.5)$$

วิธีการคำนวณค่าร้อยละของการรอดชีวิต (% survival)

$$\text{ร้อยละของการรอดชีวิต (\% survival)} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียหลังการบ่ม X 100}}{\text{จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น}} \quad (3.6)$$

**3.2.4 การทดสอบด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้**

3.2.4.1 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility)

ในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้โดยวิธี disk diffusion ตามวิธีการของ Ortu และคณะ (Ortu et al., 2007) โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่า OD อยู่ในช่วงระหว่าง 0.08-0.10 มีเชื้อประมาณ 1.5 x $10^8$ CFU/mL ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย แล้วป้ายลงผิวหน้าของอาหาร MRS agar ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ (antibiotic disk) ที่เติมยาปฏิชีวนะ ประกอบด้วย streptomycin (S) 10 µg, gentamicin (CN) 10 µg, tetracycline (TE) 30 µg, penilcillin (P) 10 µg, vancomycin (VA) 30 µg, erythromycin (E) 15 µg, chloramphenicol (C) 30 µg, kanamycin (K) 30 µg, ampicillin (AMP) 10 µg, norfloxacin (NOR) 10 µg, ofloxacin (ORX) 5 µg, ciprofloxacin (CIP) 5 µg, imipenem (IMP) 10 µg, meropenem (MEM) 10 µg และ ceftazidime (CAZ) 30 µg ลงบนผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกได้โดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) รอบ antibiotic disk และทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น บันทึกผลและแปลความหมายตาม National Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยถ้าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะจะบันทึกในรูปของ sensitive (S) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลางบันทึกเป็น intermediate (I) และดื้อต่อยาปฏิชีวนะบันทึกเป็น resistant (R) (Jorgensen et al., 2010)

3.2.4.2 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Haemolytic activity)

นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แลวนำมาขีด (streak) บนอาหาร Blood agar ที่ผสมเลือดแกะ (sheep blood) บมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่มีบริเวณใส (clear halos) เกิดขึ้น โดยโคโลนีของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งเป็นกลุ่ม gamma-hemolysis ซึ่งจะได้รับเลือกเป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ ในขณะที่กลุ่ม beta-hemolysis จะมีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์เกิดวงใสสีเหลือง (clear hemolysis zone) และกลุ่ม alpha-hemolysis เกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนีของเชื้อ (greenish halo) จะไม่ได้การรับการคัดเลือกเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยใช้แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) (Angmo et al., 2016)

3.2.4.3 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase activity)

การทดสอบการผลิตเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease: DNase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะระหว่างหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลที่เป็นโครงสร้างหลักในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำการทดสอบโดยนำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แลวนำมาหยด (spot) บนอาหาร DNase agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายไฮโดรคลอริค (HCl) ความเขมขน 1 นอร์มอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 5 นาที ถ้าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) จะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี โดยนำแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และ *Staphylococcus epidermidis* DMST15505 เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) (Han et al., 2015)

**3.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA**

การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยโอซาก้าหรือ (MU-OU: CRC) เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

**3.2.6 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้**

โดยนำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่คัดเลือกจากอาหารหมักดอง มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงระหว่าง OD 0.08-0.10 มีเชื้อโดยประมาณ $1.5 \times 10^8$ CFU/mL โดยนำ 1 มิลลิลิตร ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วเติมลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต จำนวน 2 รอบ ทำการถ่ายแบคทีเรียโพรไบโอติก 1% (v/v) มีแบคทีเรียโดยประมาณ 1.5 x $10^6$ CFU/mL และ 3% (v/v) มีแบคทีเรียโดยประมาณ 4.5 x $10^6$ CFU/mL เติมในน้ำนมถั่วเหลือง และนมอัลมอนด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่างการหมักที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 18, 20 และ 24 ชั่วโมง (Opara et al., 2013)

**3.2.7 การประเมินผลิตภัณฑ์และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก**

3.2.7.1 การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีชีวิต

หมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และนำนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ (normal saline 0.9% w/v) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการเจือจางแบบอนุกรม 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จากนั้นเกลี่ยให้ทั่ว (spread) บนหน้าอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณค่า CFU/mL ดังสมการ 3.7 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร X ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่เติมลงในจานอาหาร}} \qquad (3.7)$$

3.2.7.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของนมหมัก

วัดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก ระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง pH meter โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.7.3 การเตรียมสารสกัดน้ำจากนมถั่วเหลืองหมักและนมอัลมอนด์หมัก

การเตรียมสารสกัดดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Muniandy และคณะ (Muniandy et al., 2016) นำนมหมักปริมาณ 10 กรัม มาปรับค่า pH ให้เป็นกรดที่ค่า pH 4.0 ด้วยการเติม HCl (0.1 M) จากนั้นบ่มเป็นเวลา 10 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับค่า pH ของส่วนใส (supernatant) เท่ากับค่า pH 7.0 ด้วยการเติม NaOH (0.1 โมลาร์) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.2.7.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay

นำสารสกัดน้ำจากนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก จำนวน 800 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นแบลงก์ (blank) และนำเมทานอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุม (control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมัก และคำนวณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสมการ 3.8 (Muniandy et al., 2016)

$$\% \text{ DPPH scavenging activity} = [1 - (Abs_{sample}/Abs_{control})] \times 100\% \quad (3.8)$$

ซึ่ง $Abs_{sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงสารสกัดจากนมหมักกับสารละลาย DPPH และ
$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลกับสารละลาย DPPH

3.2.7.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM ในน้ำกลั่น เตรียมสารอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cations) จากปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ผสมกับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 mM (ในอัตราส่วน 1:1 v/v) บ่มในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำกลั่น ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง OD 0.700 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำสารละลาย ABTS ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดน้ำจากนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และบ่มในที่มืด เป็นเวลา 45 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมัก คำนวณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสมการ 3.9 (Re and et al., 1999)

$$\% \text{ ABTS scavenging ability} = [Abs_{control} - (Abs_{sample} / Abs_{control})] \times 100\% \quad (3.9)$$

ซึ่ง $Abs_{sample}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดน้ำจากนมหมักกับสารละลาย ABTS และ
$Abs_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของเอทานอลกับสารละลาย ABTS

3.2.7.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการผสมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ (300 mM) กับ 2,4,6-tri (2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ) reagent (10 mM) และสารละลาย 20 mM $FeCl_3$ ในอัตราส่วน 10: 1: 1 จากนั้นนำ FRAP reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารสกัดน้ำของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมสารละลายบ่ม ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ทำการทดลอง 3 ซ้ำและเปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองและ

นมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมัก โดยใช้ $FeSO_4 7H_2O$ เป็นสารมาตรฐาน (0.4 ถึง 2 mM) (Benzie and Strain, 1996)

3.2.7.7 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) ความเข้มข้น 7% (w/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมสารสกัดน้ำจากนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน แล้วเติมสาร Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน (50 ถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Xiao et al., 2015)

**3.2.8 การศึกษาความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์**

โดยนำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะแบบที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงระหว่าง OD 0.08-0.10 มีแบคทีเรียประมาณ $1.5 \times 10^8$ CFU/mL โดยนำ 1 มิลลิลิตร ของแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วเติมลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 2 รอบ ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 3% (v/v) มีแบคทีเรียประมาณ $4.5 \times 10^6$ CFU/mL เติมในน้ำนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ ปริมาตรละ 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำการนับจำนวนโคโลนีและวัด pH และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตามข้อ 3.2.7 โดยบันทึกผลการศึกษาทุก ๆ สัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

**3.2.9 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ**

นำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 3 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A62 เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ในการศึกษาวิจัยนี้ แบคทีเรีย F3 แยกได้จากปลาส้มจากงานวิจัยวิทยานิพนธ์ของนางสาวลัดดาวัลย์ ยืนยาว และแบคทีเรีย M47 แยกได้จากผักกาดดองจากงานวิจัยสารนิพนธ์ของนางสาวชฎาภรณ์ นวจองพันธ์ และนางสาวอนัญญา วงษ์ดรมา โดยแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลตเป็นแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปรับความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงระหว่าง OD 0.08-0.10 มีเชื้อประมาณ $1.5 \times 10^8$ CFU/mL โดยนำ 1 มิลลิลิตร ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วเติมลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จำนวน 2 รอบ ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก ที่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 3% (v/v) มีเชื้อประมาณ 4.5 x $10^6$ CFU/mL เติมในน้ำนมถั่วเหลือง และนมอัลมอนด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตามข้อ 3.2.7 โดยบันทึกผลการศึกษาทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

**3.2.10 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย**

ผลการทดลองแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ผลการทดสอบได้รับการประเมินโดยการทดสอบสถิติ one-way ANOVA โดยใช้แบบทดสอบ Tukey post-hoc test ใช้โปรแกรมซอฟต์แวร์ SPSS รุ่น 16 กำหนดระดับนัยสำคัญไว้ที่ค่า $p<0.05$

# บทที่ 4
# ผลการวิจัย

ผลการศึกษาวิจัย หัวข้อเรื่อง การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักดอง เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยมีการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งผลการทดลองแสดงดังนี้

## 4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง

จากการเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง จำนวน 17 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาส้ม ปลาร้า ส้มไข่ปลา (ไข่ปลาหมัก) หน่อไม้ส้ม (หน่อไม้ดอง) ส้มปลาน้อย (ปลาหมัก) กุ้งจ่อม (กุ้งหมัก) หม่ำขี้ปลา (ขี้ปลาหมัก) กระเทียมดอง ไส้กรอกหมู ไส้กรอกวัว กะปิ และหม่ำวัว โดยเก็บตัวอย่างอาหารจากตลาดวาริน อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี เมื่อนำตัวอย่างอาหารหมักดองมาทำการเจือจาง และเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลือกโคโลนีแบบสุ่มจำนวน 10 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม นูน ผิวหน้ามันวาว ผิวเรียบ สีขาวใส หรือสีขาวขุ่น นำไปขีด (streak) บนอาหาร MRS agar จนไดโคโลนีเดี่ยว (single colony) จำนวนทั้งหมด 150 ไอโซเลต จากนั้นนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมและตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าแบคทีเรียที่ติดสีม่วงหรือแกรมบวก และแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติก มีจำนวนทั้งหมด 70 ไอโซเลต โดยมีลักษณะรูปร่างกลม (coccus) จำนวน 28 ไอโซเลต รูปร่างแท่ง (bacilli) จำนวน 24 ไอโซเลต และรูปร่างท่อนสั้นเกือบกลม (coccobacilli) จำนวน 18 ไอโซเลต ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1 ข้อมูลแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง**

| ไอโซเลต | ชนิดอาหาร | ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส | รูปร่าง |
|---|---|---|---|
| A1 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | กลม |
| A2 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | แท่ง |
| A3 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | กลม |
| A4 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | แท่ง |
| A5 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A6 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | กลม |
| A7 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | แท่ง |
| A8 | ส้มไข่ปลา | ผลลบ | แท่ง |
| A9 | ไส้กรอกหมู 1 | ผลลบ | กลม |

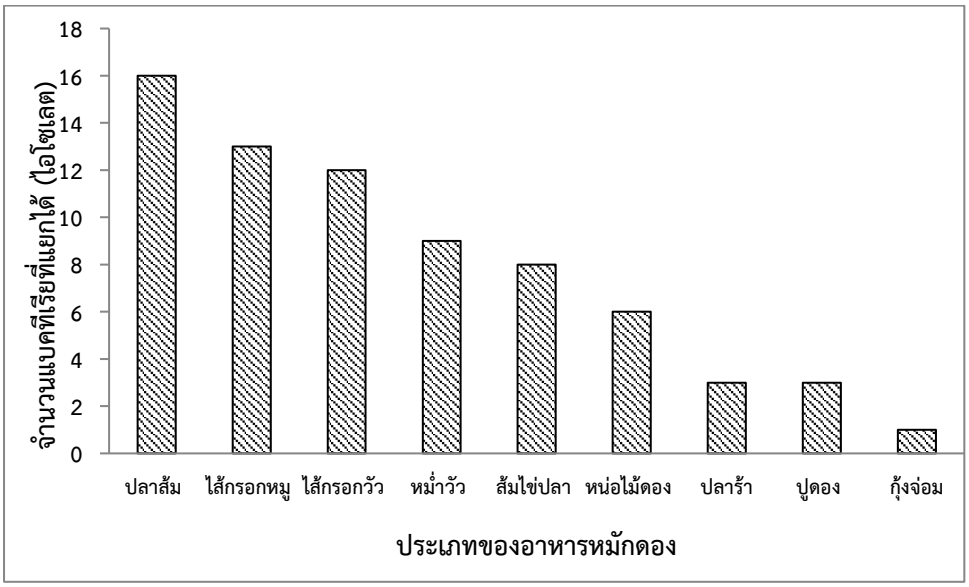
**ตารางที่ 4.1 ข้อมูลแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง (ต่อ)**

| ไอโซเลต | ชนิดอาหาร | ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส | รูปร่าง |
|---|---|---|---|
| A10 | ไส้กรอกหมู 1 | ผลลบ | แท่ง |
| A11 | ไส้กรอกหมู 1 | ผลลบ | กลม |
| A12 | ไส้กรอกหมู 1 | ผลลบ | กลม |
| A13 | ไส้กรอกหมู 1 | ผลลบ | กลม |
| A14 | ปลาร้า 2 | ผลลบ | กลม |
| A15 | ปลาร้า 2 | ผลลบ | กลม |
| A16 | ปลาร้า 2 | ผลลบ | กลม |
| A17 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A18 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | กลม |
| A19 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A20 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A21 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A22 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A23 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A24 | ไส้กรอกหมู 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A25 | หน่อไม้ดอง | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A26 | หน่อไม้ดอง | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A27 | หน่อไม้ดอง | ผลลบ | แท่ง |
| A28 | หน่อไม้ดอง | ผลลบ | แท่ง |
| A29 | หน่อไม้ดอง | ผลลบ | แท่ง |
| A30 | หน่อไม้ดอง | ผลลบ | แท่ง |
| A31 | ปูดอง | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A32 | ปูดอง | ผลลบ | กลม |
| A33 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A34 | ปูดอง | ผลลบ | กลม |
| A35 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A36 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | กลม |
| A37 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | กลม |
| A38 | ไส้กรอกวัว 1 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A39 | ไส้กรอกวัว 1 | ผลลบ | กลม |
| A40 | ไส้กรอกวัว 1 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A41 | ไส้กรอกวัว 1 | ผลลบ | แท่ง |
| A42 | ไส้กรอกวัว 1 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A43 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A44 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A45 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A46 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |

**ตารางที่ 4.1 ข้อมูลแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง (ต่อ)**

| ไอโซเลต | ชนิดอาหาร | ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส | รูปร่าง |
|---|---|---|---|
| A45 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A46 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A47 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A48 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A49 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A50 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | กลม |
| A51 | ปลาส้ม 2 | ผลลบ | กลม |
| A52 | หม่ำวัว | ผลลบ | กลม |
| A53 | หม่ำวัว | ผลลบ | กลม |
| A54 | กุ้งจ่อม | ผลลบ | แท่ง |
| A55 | หม่ำวัว | ผลลบ | กลม |
| A56 | หม่ำวัว | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A57 | หม่ำวัว | ผลลบ | กลม |
| A58 | หม่ำวัว | ผลลบ | แท่ง |
| A59 | หม่ำวัว | ผลลบ | กลม |
| A60 | หม่ำวัว | ผลลบ | กลม |
| A61 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | กลม |
| A62 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | กลม |
| A63 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | กลม |
| A64 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | แท่ง |
| A65 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | กลม |
| A66 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | กลม |
| A67 | ปลาส้ม 1 | ผลลบ | กลม |
| A68 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | ท่อนสั้น |
| A69 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | แท่ง |
| A70 | ไส้กรอกวัว 2 | ผลลบ | แท่ง |

แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนทั้งหมด 70 ไอโซเลต แยกมาได้จากอาหารหมักดองชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ส้มไข่ปลา (8 ไอโซเลต) ไส้กรอกหมู (13 ไอโซเลต) ปลาร้า (3 ไอโซเลต) หน่อไม้ดอง (6 ไอโซเลต) ปูดอง (3 ไอโซเลต) ไส้กรอกวัว (12 ไอโซเลต) ปลาส้ม (16 ไอโซเลต) หม่ำวัว (9 ไอโซเลต) และกุ้งจ่อม (1 ไอโซเลต) จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบในอาหารหมักดองประเภทปลาส้มมากที่สุดคือ 16 ไอโซเลต รองลงมาคือ ไส้กรอกหมู ไส้กรอกวัว หม่ำวัว ส้มไข่ปลา หน่อไม้ดอง ปลาร้า ปูดอง และกุ้งจ่อม ตามลำดับ ซึ่งรายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1




**ภาพที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองแต่ละประเภท**

## 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่วิธีการทดสอบนี้มีความไวต่อปฏิกิริยาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น เวลาและอุณหภูมิในการทดลอง เป็นต้น วิธีการนี้จึงเหมาะสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด และเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจึงจำเป็นต้องทดสอบด้วยวิธีอื่น ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay โดยนำส่วนใส (supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนทั้ง 70 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใส (supernatant) ประกอบด้วยสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น โดยมีการศึกษาพบว่าส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน (Xing et al., 2015) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 28 ไอโซเลต ที่แสดงค่า %DPPH scavenging activity มากกว่า 50% คือ A1, A2, A3, A6, A11, A13, A14, A18, A19, A22, A23, A24, A25, A26, A27, A28, A29, A40, A45, A46, A47, A48, A53, A54, A55, A62, A63 และ A67 ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay เป็นการทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นในคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันดังนั้นจึงนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 28 ไอโซเลตข้างต้นมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay เพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยกลไกการต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay (mean±SD; n=3x2)**

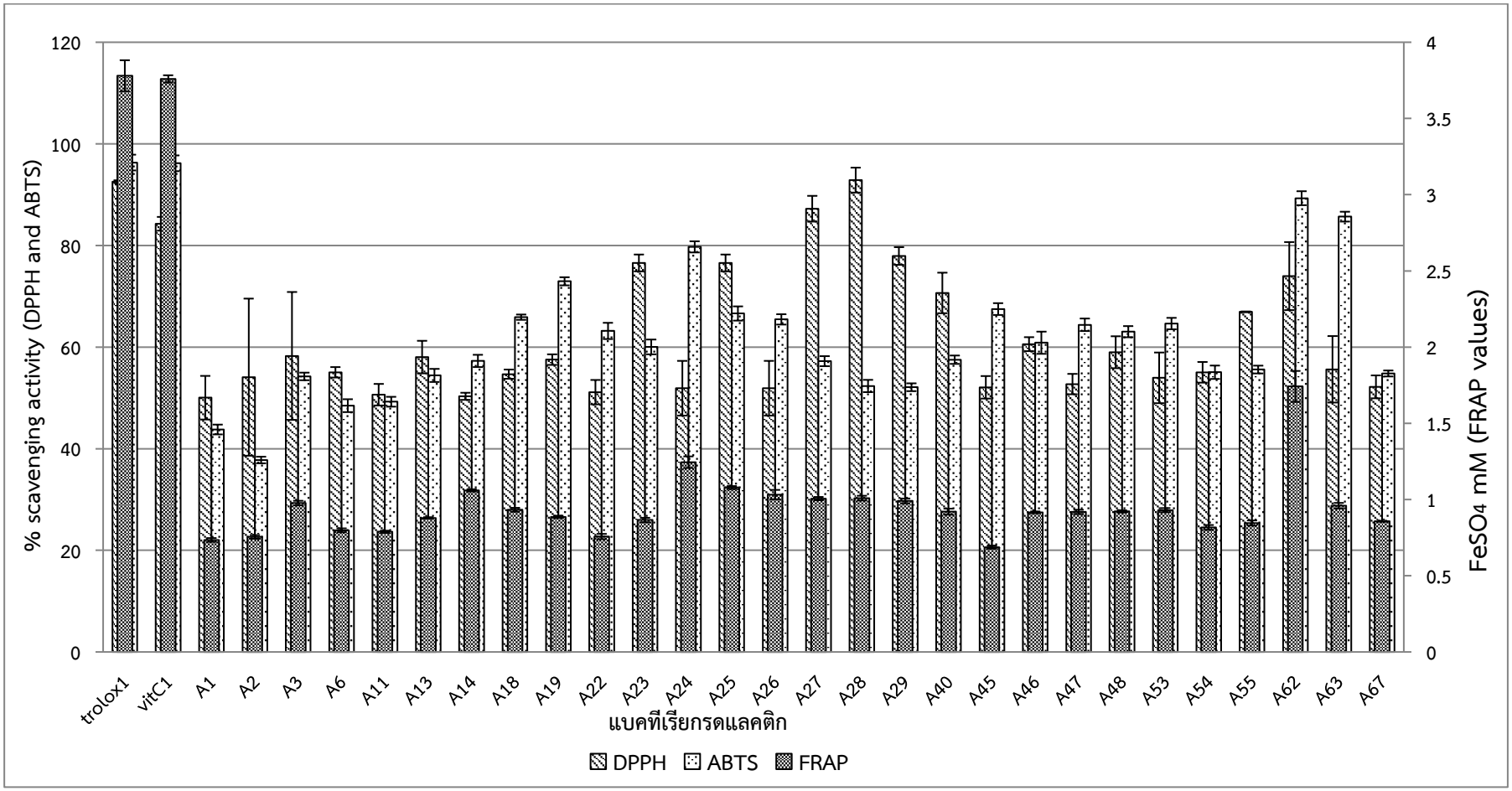
| แบคทีเรียกรดแลคติก | ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (% DPPH Scavenging activity) |
|---|---|
| A1 | 50.04±4.29 |
| A2 | 54.08±15.46 |
| A3 | 58.26±12.58 |
| A4 | 47.27±4.58 |
| A5 | 46.91±2.21 |
| A6 | 55.04±1.02 |
| A7 | 30.56±1.13 |
| A8 | 41.46±4.04 |
| A9 | 45.82±1.97 |
| A10 | 15.39±2.96 |
| A11 | 50.63±2.12 |
| A12 | 45.54±2.04 |
| A13 | 58.03±3.20 |
| A14 | 50.31±0.69 |
| A15 | 45.95±4.86 |
| A16 | 47.82±1.96 |
| A17 | 45.45±4.69 |
| A18 | 54.67±0.90 |
| A19 | 57.53±1.04 |
| A20 | 45.00±1.44 |
| A21 | 43.86±1.29 |
| A22 | 51.13±2.40 |
| A23 | 76.56±1.65 |
| A24 | 51.90±5.38 |
| A25 | 76.56±1.65 |
| A26 | 51.90±5.38 |
| A27 | 87.23±2.53 |
| A28 | 92.87±2.45 |
| A29 | 77.92±1.73 |
| A30 | 32.56±1.08 |
| A31 | 9.94±1.65 |
| A32 | 37.87±1.90 |
| A33 | 35.46±3.89 |
| A34 | 35.92±3.15 |
| A35 | 33.96±4.37 |
| A36 | 29.42±2.35 |
| A37 | 43.36±5.23 |

**ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay (mean±SD; n=3x2) (ต่อ)**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (% DPPH Scavenging activity) |
|---|---|
| A38 | 37.60±5.90 |
| A39 | 14.21±1.45 |
| A40 | 70.66±3.98 |
| A41 | 37.10±2.51 |
| A42 | 23.66±1.46 |
| A43 | 23.43±1.08 |
| A44 | 9.30±1.10 |
| A45 | 52.08±2.21 |
| A46 | 60.58±1.37 |
| A47 | 52.72±2.00 |
| A48 | 58.99±3.14 |
| A49 | 46.36±6.83 |
| A50 | 42.09±2.48 |
| A51 | 37.32±1.65 |
| A52 | 40.96±2.79 |
| A53 | 53.95±4.98 |
| A54 | 55.04±2.03 |
| A55 | 66.93±0.07 |
| A56 | 46.09±1.93 |
| A57 | 34.33±2.71 |
| A58 | 49.90±2.53 |
| A59 | 27.24±1.06 |
| A60 | 44.18±3.81 |
| A61 | 41.55±5.07 |
| A62 | 73.97±6.69 |
| A63 | 55.63±6.54 |
| A64 | 27.83±9.44 |
| A65 | 36.96±3.74 |
| A66 | 37.01±5.07 |
| A67 | 52.17±2.25 |
| A68 | 42.37±1.11 |
| A69 | 32.65±3.51 |
| A70 | 39.60±3.10 |
| trolox | 92.56±0.26 |
| Vitamin C | 84.27±1.35 |

**ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และวิธี FRAP assay (mean±SD; n=3x2)**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน | |
|---|---|---|
| | ABTS assay (%ABTS scavenging ability) | FRAP assay ($FeSO_4$ mM of LAB) |
| A1 | 43.78±0.96 | 0.73±0.01 |
| A2 | 37.78±0.65 | 0.75±0.01 |
| A3 | 54.23±0.74 | 0.97±0.01 |
| A6 | 48.47±1.26 | 0.79±0.01 |
| A11 | 49.25±0.96 | 0.78±0.00 |
| A13 | 54.42±1.29 | 0.87±0.00 |
| A14 | 57.28±1.20 | 1.05±0.00 |
| A18 | 65.89±0.52 | 0.93±0.01 |
| A19 | 72.95±0.79 | 0.88±0.00 |
| A22 | 63.18±1.59 | 0.75±0.01 |
| A23 | 60.03±1.45 | 0.86±0.01 |
| A24 | 79.72±1.09 | 1.24±0.03 |
| A25 | 66.61±1.39 | 1.07±0.00 |
| A26 | 65.45±1.01 | 1.03±0.03 |
| A27 | 57.23±0.98 | 1.00±0.01 |
| A28 | 52.34±1.20 | 1.00±0.01 |
| A29 | 52.10±0.76 | 0.99±0.01 |
| A40 | 57.52±0.82 | 0.92±0.01 |
| A45 | 67.48±1.16 | 0.68±0.01 |
| A46 | 60.86±2.18 | 0.91±0.00 |
| A47 | 64.39±1.23 | 0.91±0.01 |
| A48 | 63.03±1.09 | 0.92±0.00 |
| A53 | 64.63±1.12 | 0.93±0.01 |
| A54 | 55.05±1.31 | 0.81±0.01 |
| A55 | 55.58±0.76 | 0.84±0.01 |
| A62 | 89.30±1.37 | 1.74±0.10 |
| A63 | 85.67±0.96 | 0.95±0.01 |
| A67 | 54.81±0.58 | 0.85±0.00 |
| trolox | 96.32±1.55 | 3.75±0.02 |
| Vitamin C | 96.17±1.55 | 3.78±0.10 |




**ภาพที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และวิธี FRAP assay ทั้งหมด 28 ไอโซเลต**

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 28 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกันไปตามคุณสมบัติของแต่ละไอโซเลต โดยแสดงค่าร้อยละ DPPH scavenging activity อยู่ระหว่าง 50.04 - 92.87 และมีค่าร้อยละ ABTS scavenging ability เท่ากับ 37.78 – 89.30 และมีค่า FRAP values อยู่ระหว่าง 0.68 – 1.74 $FeSO_4$ mM ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A24, A28, A29, A62 และ A63 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจ แต่ต้องมีการศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ เพื่อการนำไปพัฒนาเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ดีและมีความปลอดภัยต่อไป

**4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก**

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกดังต่อไปนี้

4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี จำนวน 28 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 28 ไอโซเลต มาทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร 4 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella typhimurium* DMST 562 ส่วนแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี cylinder plate method

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 6 ไอโซเลต มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีและสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารได้ทั้ง 4 ชนิด คือ แบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A25, A27, A28, A29, A40 และ A62 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zones) มากกว่า 10 มิลลิเมตร ในการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งมากกว่า 20 มิลลิเมตร แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีมาก (strong inhibition) ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นระหว่าง 10-20 มิลลิเมตร แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ปานกลาง (intermediate inhibition) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลชีพได้น้อย (low inhibition) ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 28 ไอโซเลต แสดงในตารางที่ 4.4

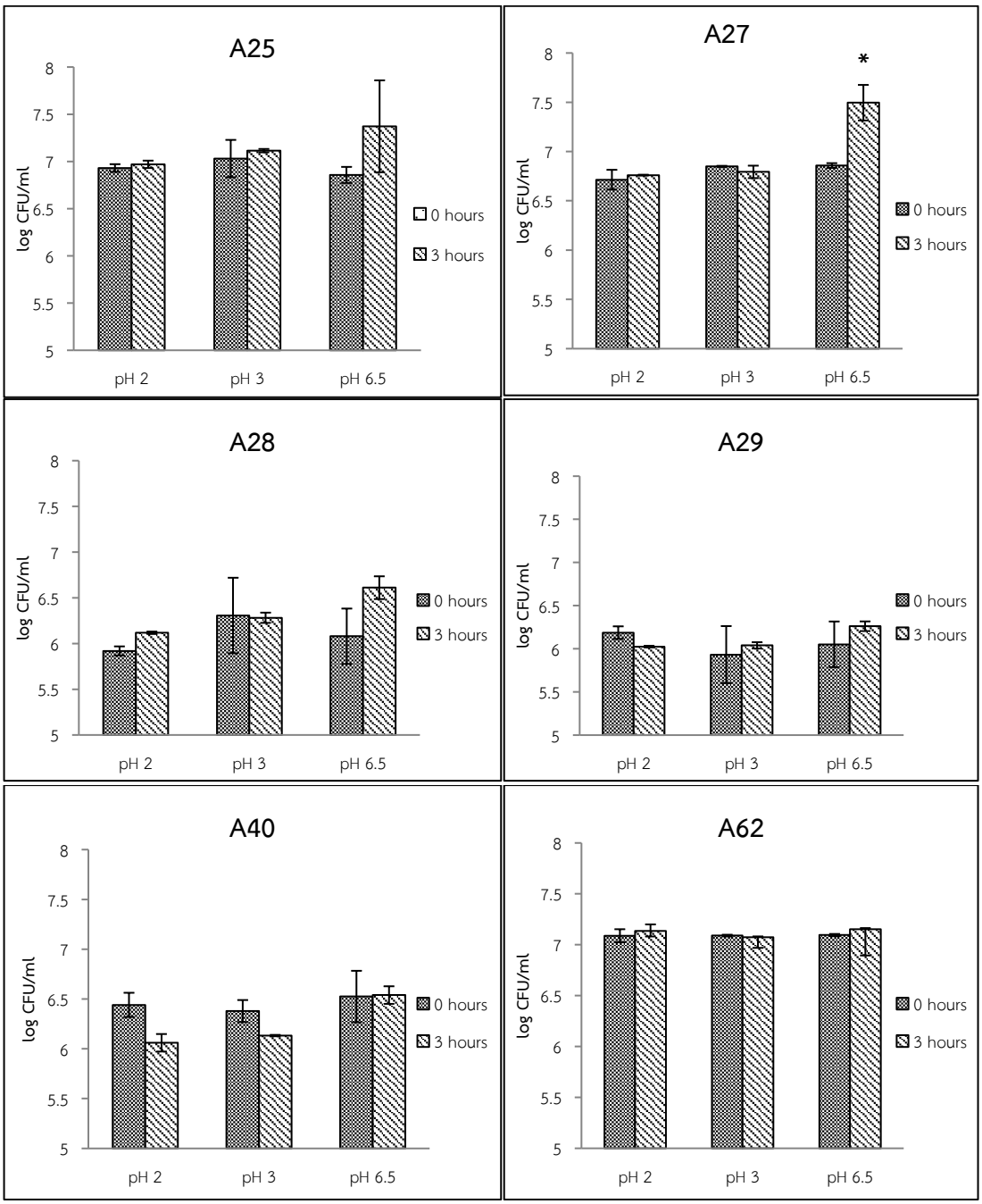
การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี โดยผลการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ดีที่สุด คือ แบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A25, A27, A28, A29, A40 และ A62 ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลต ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดีคือการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี

**ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติก (mean±SD; n=3x2)**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* ATCC 25922 | *S. typhimurium* DMST 562 | *S. aureus* ATCC 25923 | *B. cereus* DMST 5040 |
| A1 | 8.63±0.23 | 12.50±2.06 | 11.66±2.06 | 11.63±0.61 |
| A3 | 8.16±0.12 | 10.10±0.91 | 9.13±0.91 | 13.23±1.60 |
| A6 | 8.50±0.52 | 12.06±1.04 | 10.60±1.04 | 11.03±0.58 |
| A14 | 8.36±0.46 | 8.66±0.42 | 8.73±0.42 | 9.80±0.50 |
| A18 | 8.36±0.81 | 12.13±1.08 | 9.63±1.08 | 10.40±1.66 |
| A19 | 11.00±1.57 | 14.16±0.52 | 11.8±0.52 | 10.03±1.21 |
| A23 | 9.20 ±0.36 | 11.80±2.02 | 10.30±2.02 | 10.20±2.88 |
| A24 | 9.50 ±1.54 | 13.46±0.50 | 10.23±0.50 | 10.30±0.90 |
| A25 | 11.30± 0.75 | 14.23±0.60 | 10.33±0.60 | 10.66±1.85 |
| A26 | 10.86 ±1.80 | 13.80±0.95 | 11.16±0.95 | 13.80±1.83 |
| A27 | 10.80 ±2.17 | 11.76±1.00 | 10.80±1.00 | 13.46±2.84 |
| A28 | 10.13 ±1.17 | 12.90±0.26 | 11.70±0.26 | 12.10±2.00 |
| A29 | 10.06± 1.12 | 14.20±3.70 | 12.20±3.70 | 12.76±3.20 |
| A45 | 10.73± 0.91 | 13.70±0.93 | 12.03±0.93 | 9.86±1.39 |
| A46 | 8.53 ±0.15 | 13.73±1.76 | 9.50±1.76 | 9.76±0.29 |
| A48 | 10.46 ±1.71 | 14.16±0.25 | 14.13±0.25 | 11.40±2.39 |
| A49 | 8.90 ±1.51 | 12.56±1.95 | 12.80±1.95 | 13.13±2.06 |
| A54 | 11.33± 1.42 | 13.60±1.96 | 10.23±1.96 | 11.76±0.30 |
| A55 | 9.83 ±1.38 | 14.36±1.26 | 11.43±1.26 | 11.10±1.86 |
| A62 | 11.30 ±1.24 | 15.36±0.50 | 12.56±1.79 | 13.03±2.07 |
| A2 | 9.00 ±1.04 | 14.30±2.19 | 13.03±1.47 | 10.23±1.12 |
| A13 | 8.86 ±0.47 | 13.13±1.58 | 11.90±0.85 | 11.33±2.68 |
| A40 | 11.26 ±1.88 | 16.13±1.20 | 11.10±2.76 | 12.16±0.81 |
| A53 | 10.16±1.25 | 14.63±0.99 | 9.53±0.83 | 11.03±1.91 |
| A61 | 9.13±0.64 | 13.76±2.75 | 11.43±0.06 | 10.73±0.98 |
| A11 | 9.66±1.12 | 13.16±2.91 | 11.80±2.77 | 10.83±1.69 |
| A22 | 11.00 ±1.58 | 14.23±0.40 | 13.06±0.25 | 13.70±1.20 |
| A47 | 8.93± 1.02 | 12.76±1.14 | 10.00±2.44 | 12.50±0.87 |
| tetracycline | 8.46 ±0.40 | 23.20±0.60 | 31.00±0.78 | 32.23±3.95 |
| ampicillin | 7.83± 0.51 | 26.53±1.07 | 35.63±2.33 | 15.00±2.35 |
| MRS broth | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

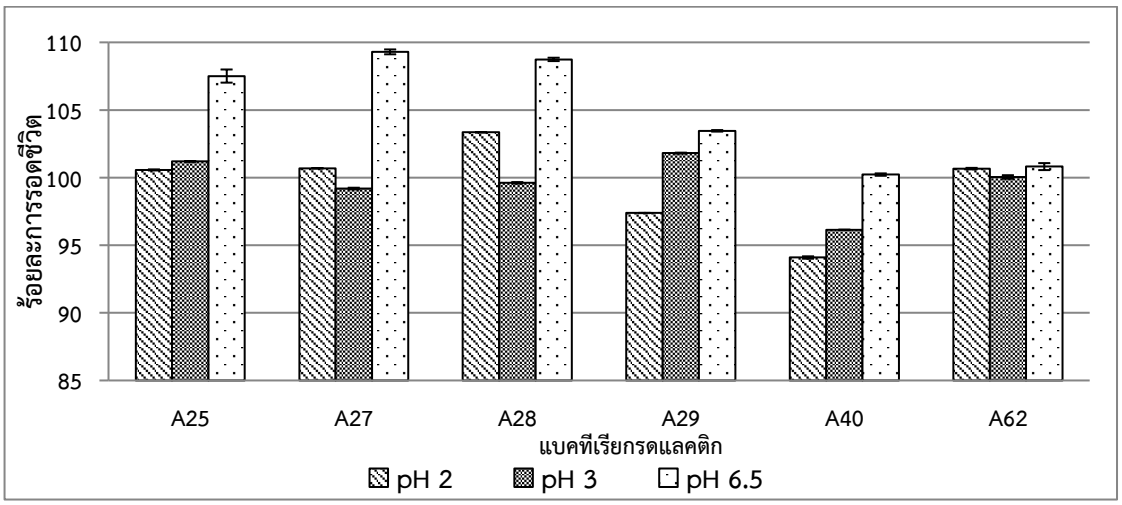
**4.3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร**

4.3.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด ทำการทดสอบโดยการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 2, pH 3 และ pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.3




**ภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก แสดงค่าเป็น mean±SD เครื่องหมาย (*) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3x2)**

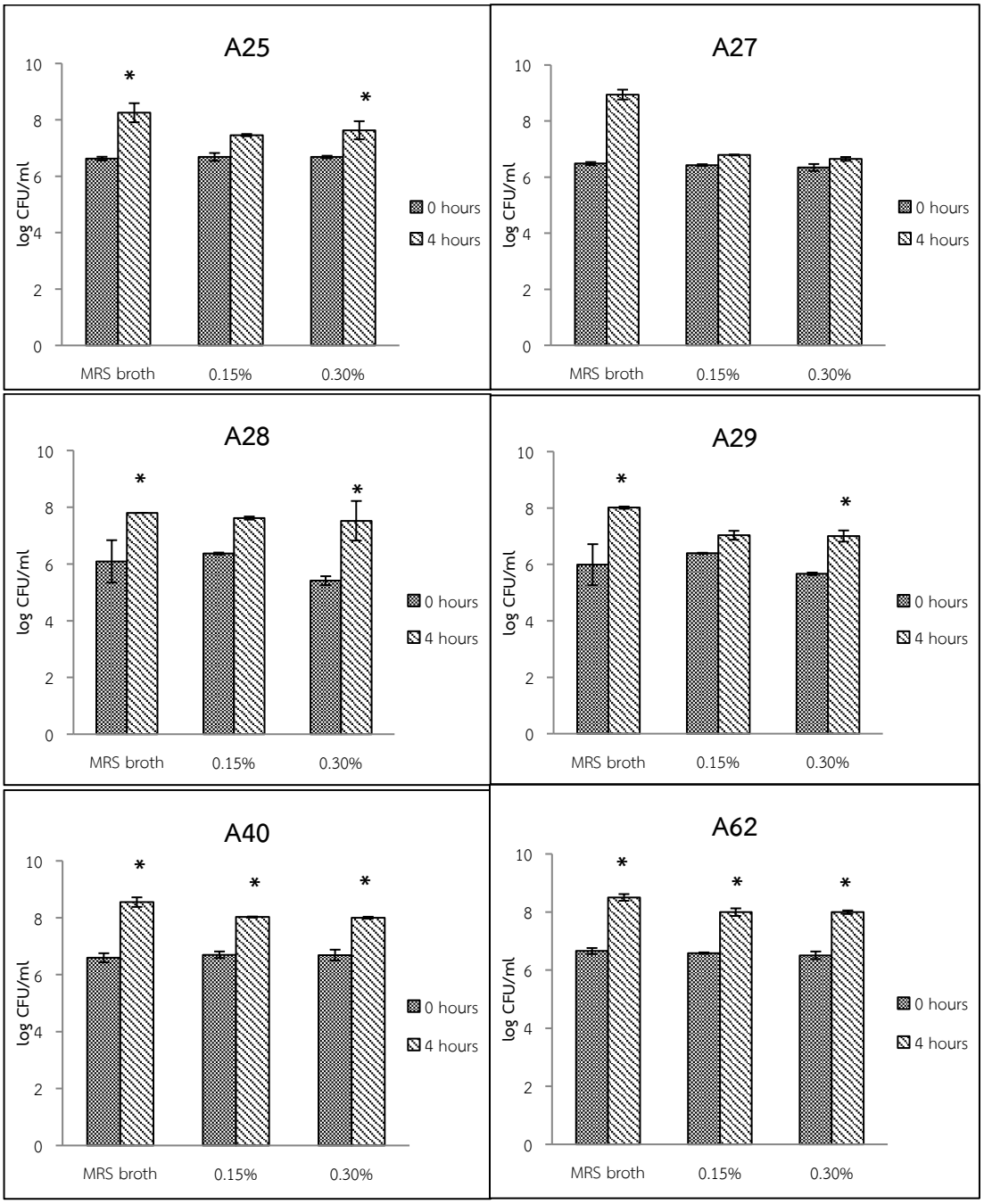
การศึกษาคุณสมบัติการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลต คือ A25, A27, A28, A29, A40 และ A62 โดยทดสอบการทนต่อสภาวะกรดที่ pH 2, pH 3 และ pH 6.5 ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหารในส่วนของกระเพาะอาหารที่มีสภาวะเป็นกรด ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะต้องทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดแก่ร่างกาย ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย A25, A27, A28 และ A62 สามารถทนต่อสภาวะกรดที่ pH 2 ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย A25, A29 และ A62 สามารถทนต่อสภาวะกรดที่ pH 3 ได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลต มีค่าร้อยละการรอดชีวิตมากกว่า 100 เมื่อบ่มที่ pH 6.5 ระยะเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งสามารถแสดงค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังภาพที่ 4.4




**ภาพที่ 4.4 ร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อบ่มในสภาวะกรดระยะเวลา 3 ชั่วโมง**

ความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลต เมื่อพิจารณาค่าร้อยละการรอดชีวิตพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทนต่อสภาวะกรดทั้ง pH 2 และ pH 3 ได้ดีคือ แบคทีเรีย A25 และ A62

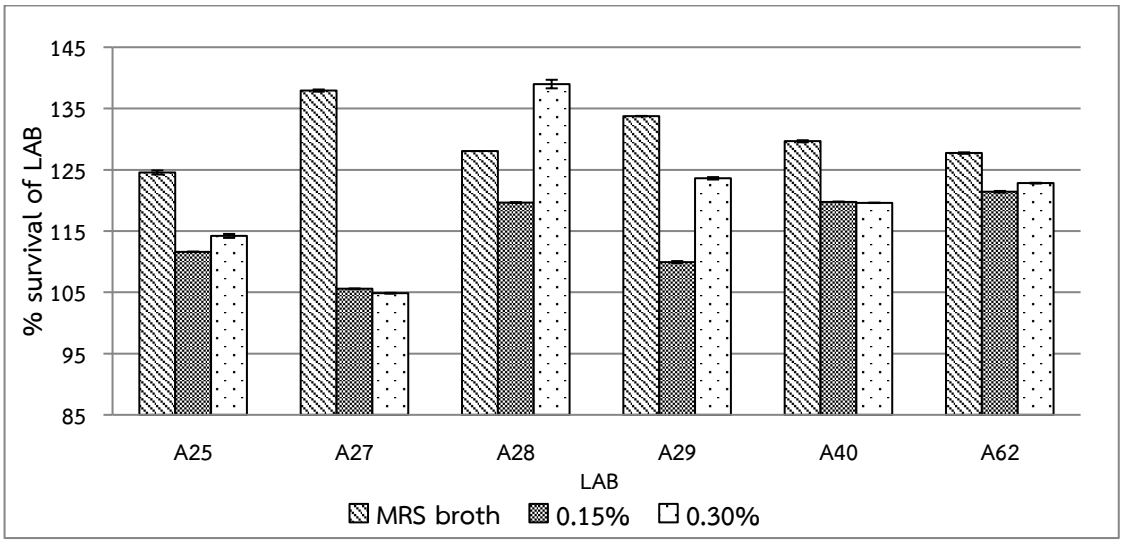
4.3.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี ทำการทดสอบโดยการบ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (w/v) และเติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.30 (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 4 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณค่า CFU/mL ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.5




**ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกแสดงค่าเป็น mean±SD เครื่องหมาย (*) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3x2)**

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลต สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหารในส่วนของลำไส้เล็กที่มีการหลั่งของเกลือน้ำดี โดยหลังจากการบ่ม 4 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติก

สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ในสภาวะที่มีการหลั่งเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร และพบว่าแบคทีเรีย A40 และ A62 มีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติมเกลือน้ำดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 เมื่อพิจารณา ค่าร้อยละการรอดชีวิตพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมีร้อยละการรอดชีวิตได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยมีร้อยละค่าของการรอดชีวิตมากกว่า 100 หลังการบ่มเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ดังผลที่แสดงในภาพ 4.6




**ภาพที่ 4.6 ร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อบ่มในเกลือน้ำดี ระยะเวลา 4 ชั่วโมง**

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี โดยผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี คือ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* DMST 562, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 พบว่าแบคทีเรีย A62 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด และนอกจากนี้แบคทีเรีย A62 ยังมีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีศักยภาพดีที่สุด ซึ่งแสดงคุณสมบัติดังตารางที่ 4.5

ดังนั้นการศึกษาขั้นตอนต่อไปจึงนำแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 ไปทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัยเบื้องต้น เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

**ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และคุณสมบัติการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก**

| LAB | ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity) (mean±SD) | | | ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) (zone of inhibition) (mm) (mean±SD) | | | | คุณสมบัติการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี (จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต; log CFU/mL) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | DPPH assay % DPPH scavenging | ABTS assay %ABTS scavenging | FRAP assay ($FeSO_4$ mM) | *E. coli* | *S. typhimurium* | *S. aureus* | *B. cereus* | การทนสภาวะกรดเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม. (Acid Tolerance) (mean±SD) | | | การทนเกลือน้ำดีเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชม. (Bile Salt Tolerance) (mean±SD) | | |
| | | | | | | | | pH 2 | pH 3 | pH 6.5 | 0.00% (MRS broth) | 0.15% | 0.30% |
| A25 | 76.56±1.65 | 66.66±1.39 | 1.07±0.00 | 11.30±0.75 | 14.23±0.60 | 10.33±0.60 | 10.66±1.85 | 6.96±0.04 | 7.11±0.19 | 7.37±0.48 | 6.62±0.06 | 7.45±0.14 | 7.63±0.04 |
| A27 | 87.23±2.53 | 57.23±0.98 | 1.00±0.01 | 10.80±2.17 | 11.76±1.00 | 10.80±1.00 | 13.46±2.84 | 6.76±0.10 | 6.79±0.05 | 7.49±0.18 | 6.48±0.05 | 6.78±0.03 | 6.65±0.12 |
| A28 | 92.87±2.45 | 52.34±1.20 | 1.00±0.01 | 10.13±1.17 | 12.90±0.26 | 11.70±0.26 | 12.10±2.00 | 6.11±0.04 | 6.28±0.41 | 6.61±0.12 | 6.09±0.74 | 7.61±0.03 | 7.52±0.15 |
| A29 | 77.92±1.73 | 52.10±0.76 | 0.99±0.01 | 10.06±1.12 | 14.20±3.70 | 12.20±3.70 | 12.76±3.20 | 6.02±0.07 | 6.03±0.33 | 6.26±0.05 | 5.99±0.72 | 7.03±0.01 | 7.00±0.04 |
| A40 | 70.66±3.98 | 57.52±0.82 | 0.92±0.01 | 11.26±1.88 | 16.13±1.20 | 11.10±2.76 | 12.16±0.81 | 6.06±0.08 | 6.13±0.00 | 6.53±0.08 | 6.59±0.15 | 8.02±0.01 | 8.00±0.03 |
| A62 | 73.97±6.69 | 89.30±1.37 | 1.74±0.10 | 11.30±1.24 | 15.36±0.50 | 12.56±1.79 | 13.03±2.07 | 7.13±0.05 | 7.09±0.10 | 7.15±0.25 | 6.65±0.10 | 7.99±0.02 | 7.99±0.13 |

## 4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

### 4.4.1 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility)

ทดสอบความไวของแบคทีเรียหมายเลข A62 ต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 15 ชนิด ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ได้ค่าเป็นมิลลิเมตรแสดงค่าเป็น mean ± SD บันทึกผลและแปลความหมายตาม National Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยถ้าแบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะจะบันทึกเป็น Sensitive (S) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลางแปลผลเป็น Intermediate (I) และไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะแปลผลเป็น Resistant (R) ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6

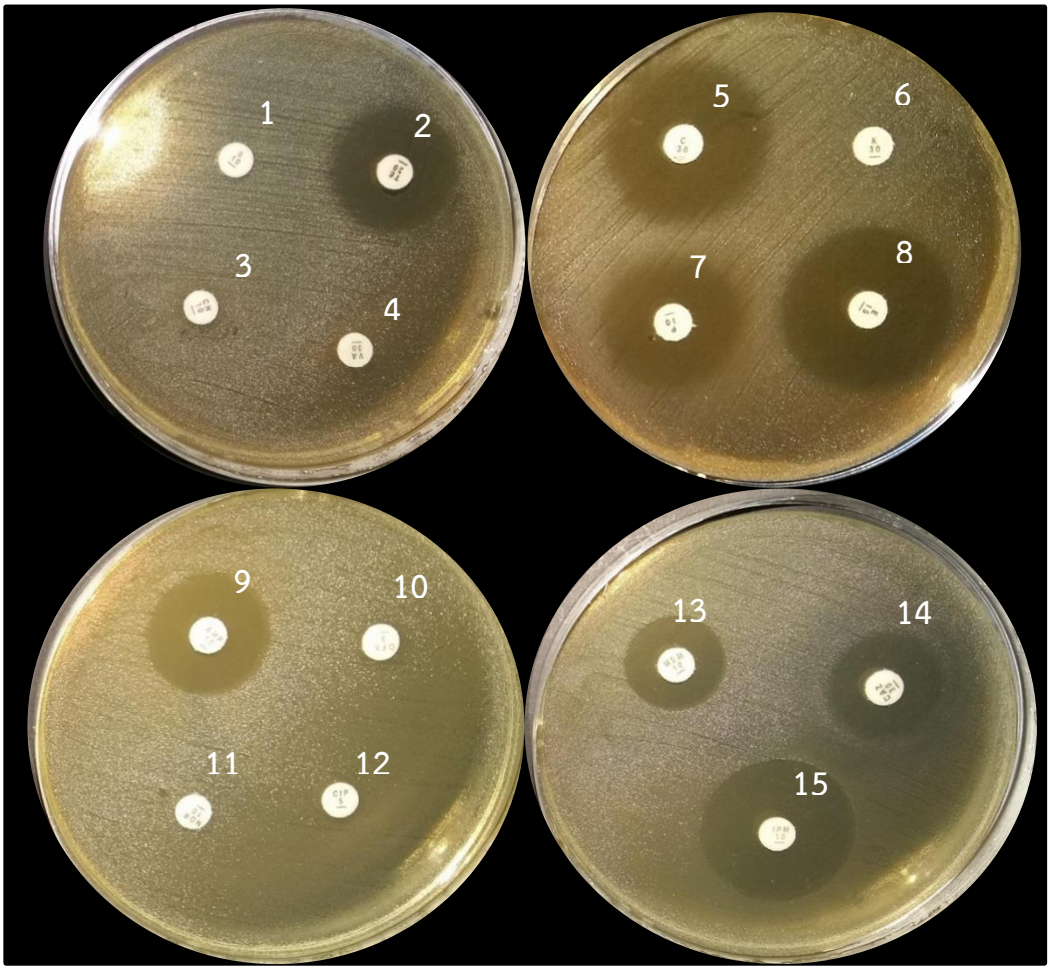
**ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 (mean±SD; n=3x2)**

| ชนิดของยาปฏิชีวนะ | เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) | รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (CLSI) |
|---|---|---|
| Streptomycin (S) 10 µg | 0.00 | R |
| Gentamicin (CN) 10 µg | 9.06 ± 0.15 | R |
| Tetracycline (TE) 30 µg | 15.43 ± 3.90 | S |
| Penilcillin (P) 10 µg | 25.86 ± 1.98 | S |
| Vancomycin (VA) 30 µg | 0.00 | R |
| Erythromycin (E) 15 µg | 27.13 ± 2.41 | S |
| Chloramphenicol (C) 30 µg | 19.73 ± 3.94 | S |
| Kanamycin (K) 30 µg | 0.00 | R |
| Ampicillin (AMP) 10 µg | 23.50 ± 2.44 | S |
| Norfloxacin (NOR) 10 µg | 0.00 | R |
| Ofloxacin (ORX) 5 µg | 8.40 ± 0.60 | R |
| Ciprofloxacin (CIP) 5 µg | 0.00 | R |
| Imipenem (IMP) 10 µg | 20.00 ± 2.70 | S |
| Meropenem (MEM) 10 µg | 13.93 ± 0.96 | S |
| Ceftazidime (CAZ) 30 µg | 11.70 ± 1.56 | I |

**หมายเหตุ:** รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ; Sensitive (S) หมายถึงแบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Intermediate (I) หมายถึงแบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง, Resistant (R) หมายถึงแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ผลการทดลองพบว่า A62 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 7 ชนิด คือ tetracycline, penilcillin, erythromycin, chloramphenicol, ampicillin, imipenem และ meropenem และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ streptomycin, gentamicin, vancomycin, kanamycin,

norfloxacin, ofloxacin และ ciprofloxacin นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย A62 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ceftazidime ในระดับปานกลาง ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.7




**ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย A62; หมายเลข 1-15 ได้แก่ streptomycin, tetracycline, gentamicin, vancomycin, chloramphenicol, kanamycin, erythromycin, ampicillin, ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, meropenem, ceftazidime และ imipenem ตามลำดับ**

**4.4.2 ผลการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Haemolytic activity)**

ทำการทดสอบโดยนำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 มาขีด (streak) บนอาหาร blood agar ที่ผสมเลือดแกะ (sheep blood) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้น และลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งผลการทดลองพบว่า A62 ไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี (Gamma-hemolysis) ส่วนตัวควบคุมผลบวก (positive control) คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี

(Beta-hemolysis) แสดงถึงการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์เกิดวงใสสีเหลือง (clear hemolysis zone) ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.8

**4.4.3 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase activity)**

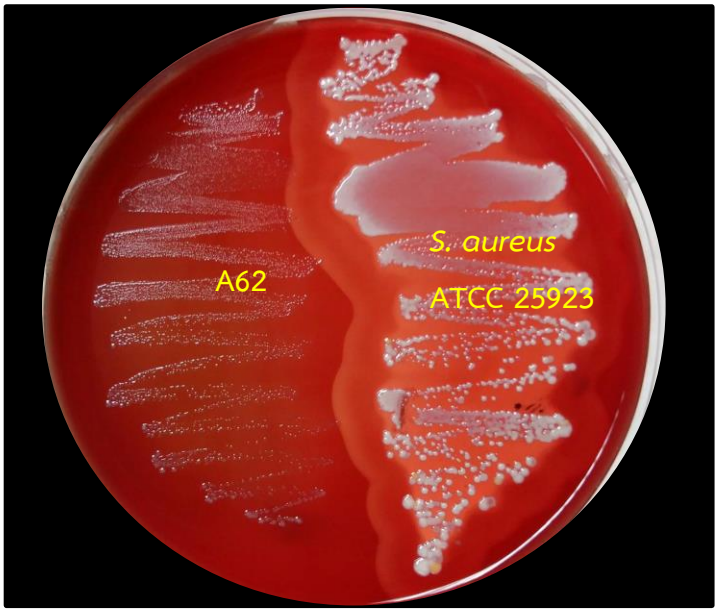
ทำการทดสอบโดยนำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของ A62 นำมาขีด (streak) บนอาหาร DNase agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บนอาหาร DNase agar ที่มีโคโลนีของแบคทีเรีย A62 บ่มไว้เป็นเวลา 5 นาที โดยนำแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และ *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505 เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย A62 และ *S. epidermidis* DMST15505 ไม่เกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี แสดงผลเป็นลบ (negative) ส่วน *S. aureus* ATCC 25923 เกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี แสดงผลบวก (positive) ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.9

**4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA (rDNA)**

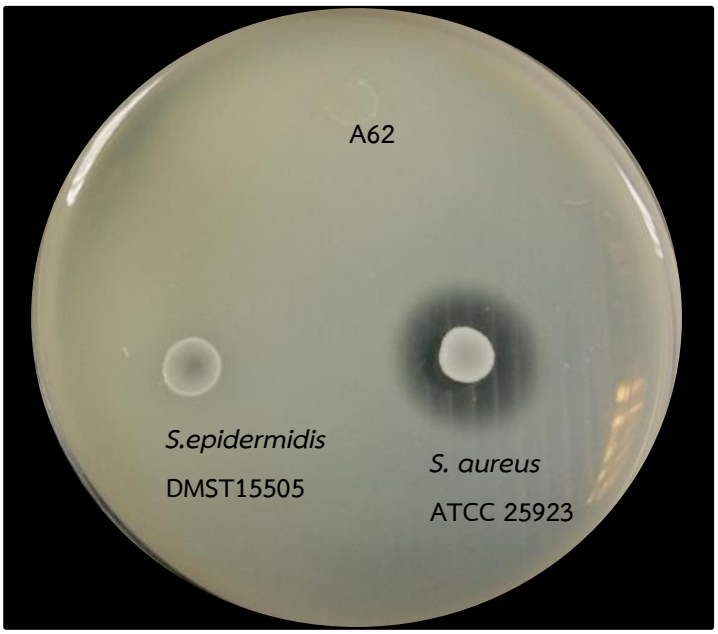
การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S ribosomal DNA (rDNA) กับฐานข้อมูล โดยนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTN 2.8.0 (basic local alignment search tools) จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการหาค่าร้อยละความเหมือน (% identity) หรือความคล้าย (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยผลการวิเคราะห์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 มีความเหมือนกับ *Pediococcus acidilactici* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 (100 % identity) ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.7

**ตารางที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และร้อยละความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62**

| แบคทีเรียกรดแลคติก | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3') | ร้อยละความเหมือนกับสายพันธุ์ใกล้เคียง |
|---|---|---|
| A62<br>(500 เบส) | A62_F<br>TAGGACGTGCTTGCACTGACTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGACN<br>GGTGANTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAA<br>ACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAG<br>ATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG<br>AGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTACCCGACCTGAGAGGGTAATC<br>GGCCACNTTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA<br>GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG<br>AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTGA<br>GAGTAACTGTTCACCCAGTGACGGTATTTAACCANAAAGCCACGGCTAACTA<br>CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATT<br>GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCG<br>GCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGNAGACTTGAGTGCANAAGAGG<br>ACAGTGNANCTCCNTGTGTAGCGGTGAAATGCGTATATATATGGAAGAACA<br>CCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGANGCTCGAAAG<br>CATGGGTAGCGAACAGGATNAAATNCCCTGGT<br>A62_R<br>TTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGA<br>GTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGCACTTCTT<br>CGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCTGCGCTCGCT<br>TTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTG<br>CTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCACTGGGTGAAC<br>AGTTACTCTCACCCACGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAAC<br>CCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAG<br>ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATG<br>TGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCATCGCCTTGGTGAGCCGTT<br>ACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCCAGAAGTGATAGCAGA<br>GCCATCTTTTAAAAGAAAACCAGGCGGTTTTCTCTGTTATACGGTATTAGCA<br>TCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCTGCTTCTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACT<br>CACCCGTCCGCCACTCACTTCATGTTAAAATCTCATTCAGTGCANGCACGTC<br>CTGATCAATTAACGGAAGTTCGTTC | 100% *Pediococcus acidilactici* strain A5, complete genome: (MF093223.1) |



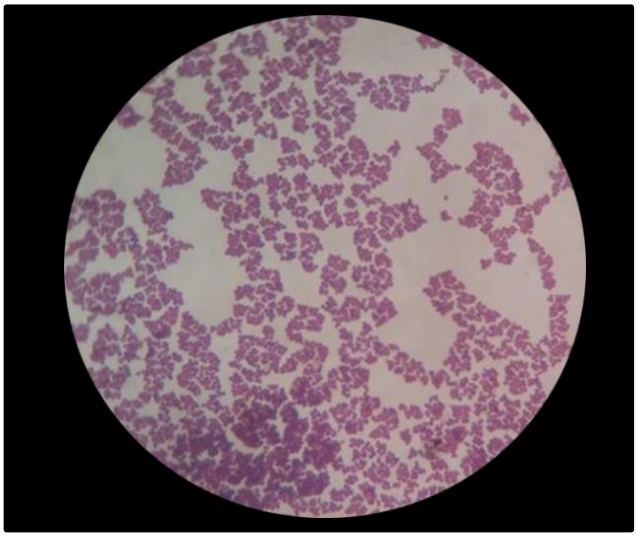

**ภาพที่ 4.8 ผลการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียหมายเลข A62**



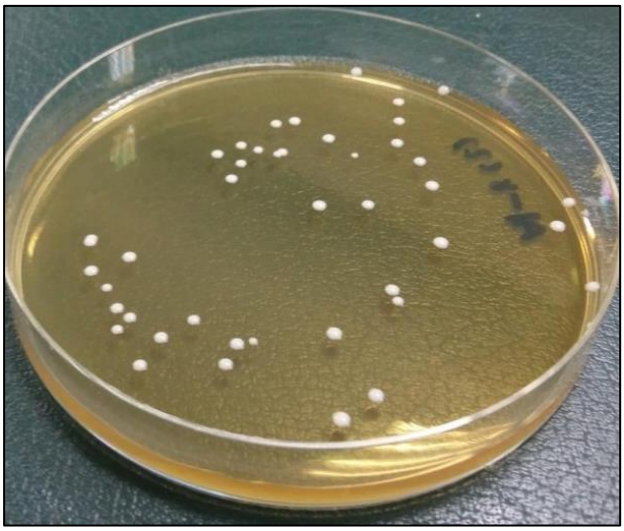

**ภาพที่ 4.9 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอสของแบคทีเรียหมายเลข A62**

### 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันข้างต้น ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด คือ *P. acidilactici* A62 และเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการย้อมสีแกรม และบันทึกลักษณะโคโลนีภายนอก พบว่าติดสีม่วง (Gram-positive bacteria) มีรูปร่างกลม (coccus) ลักษณะโคโลนีสีขาวค่อนข้างกลม ผิวเรียบ และขอบเรียบ ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.10 และ 4.11



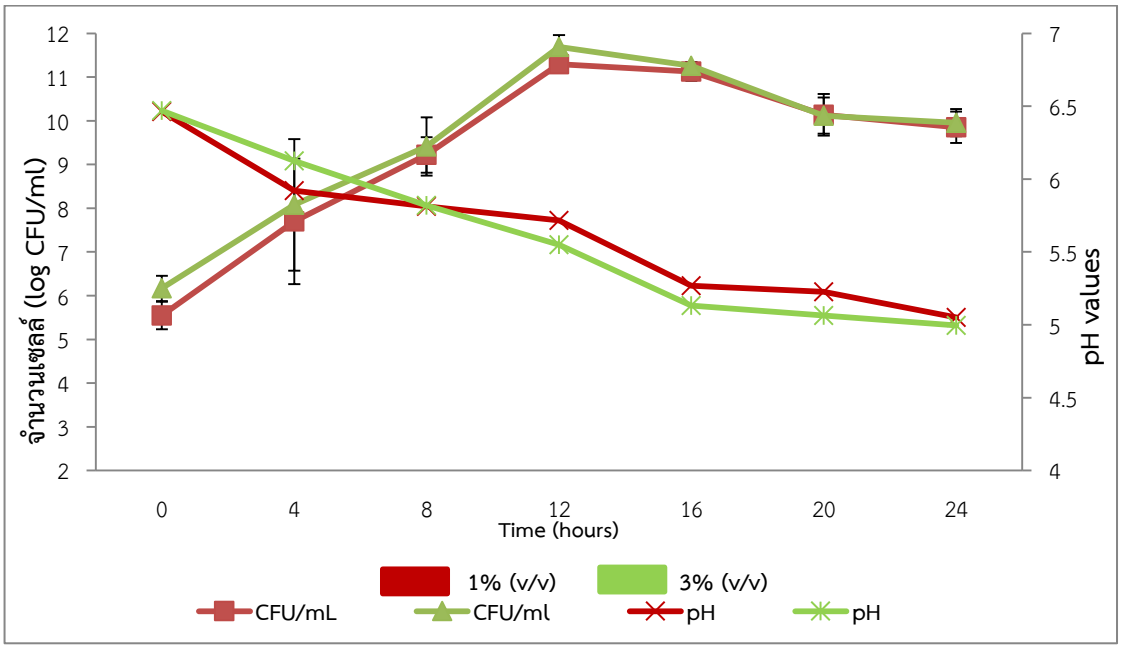
**ภาพที่ 4.10 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า**



**ภาพที่ 4.11 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 บนอาหาร MRS agar**

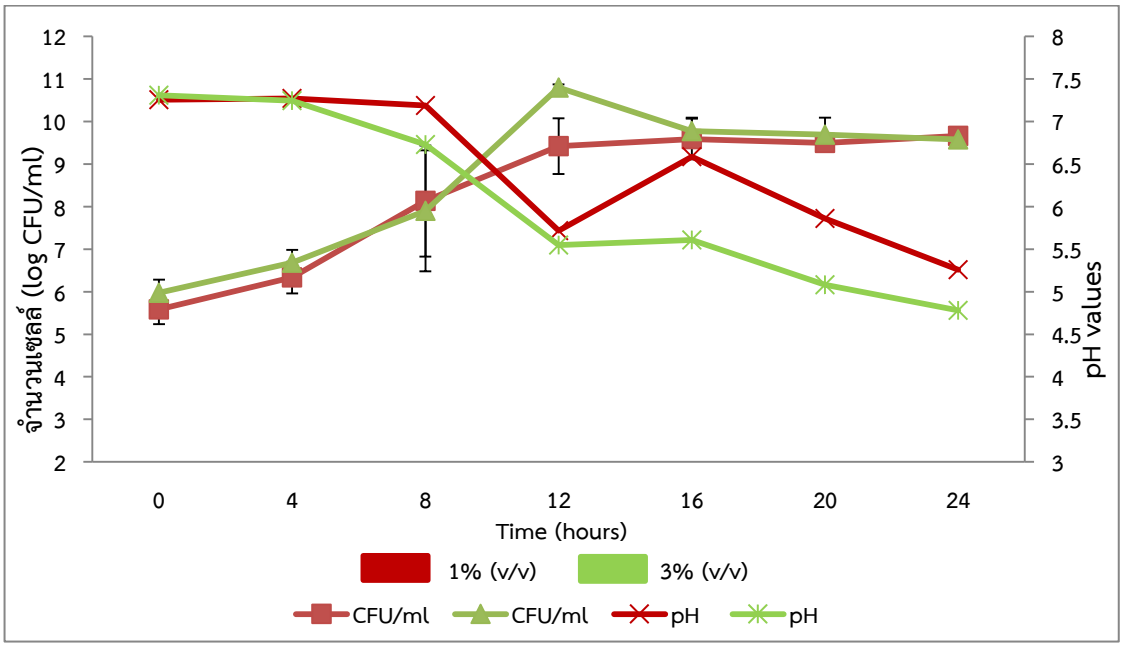
**4.7 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62**

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ ทำการทดสอบโดยเติมแบคทีเรียปริมาณเริ่มต้นคือ 1% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 1.5 x $10^6$ CFU/mL และ 3% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 4.5 x $10^6$ CFU/mL และหมักนมโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.12 และ 4.13




**ภาพที่ 4.12 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองหมัก (mean±SD; n=3x3)**

ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 ผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 1% (v/v) หลังการหมัก 12 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย A62 เท่ากับ 11.29±0.26 log CFU/mL และค่า pH ของนมหมักคือ 5.71±0.41 และหลังการหมัก 24 ชั่วโมง พบว่าค่า pH ของนมหมักลดลง เท่ากับ 5.05±0.19 และเมื่อเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) หลังการหมัก 12 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 11.69±0.17 log CFU/mL และมีค่า pH เท่ากับ 5.55±0.47 และหลังการหมักนม 24 ชั่วโมง พบว่าค่า pH ของนมหมักลดลง เท่ากับ 4.99±0.16 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) มีจำนวนแบคทีเรียที่เจริญมากกว่าและมีค่า pH ของนมหมักที่ลดลงมากกว่าการหมักโดยใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 1% (v/v)



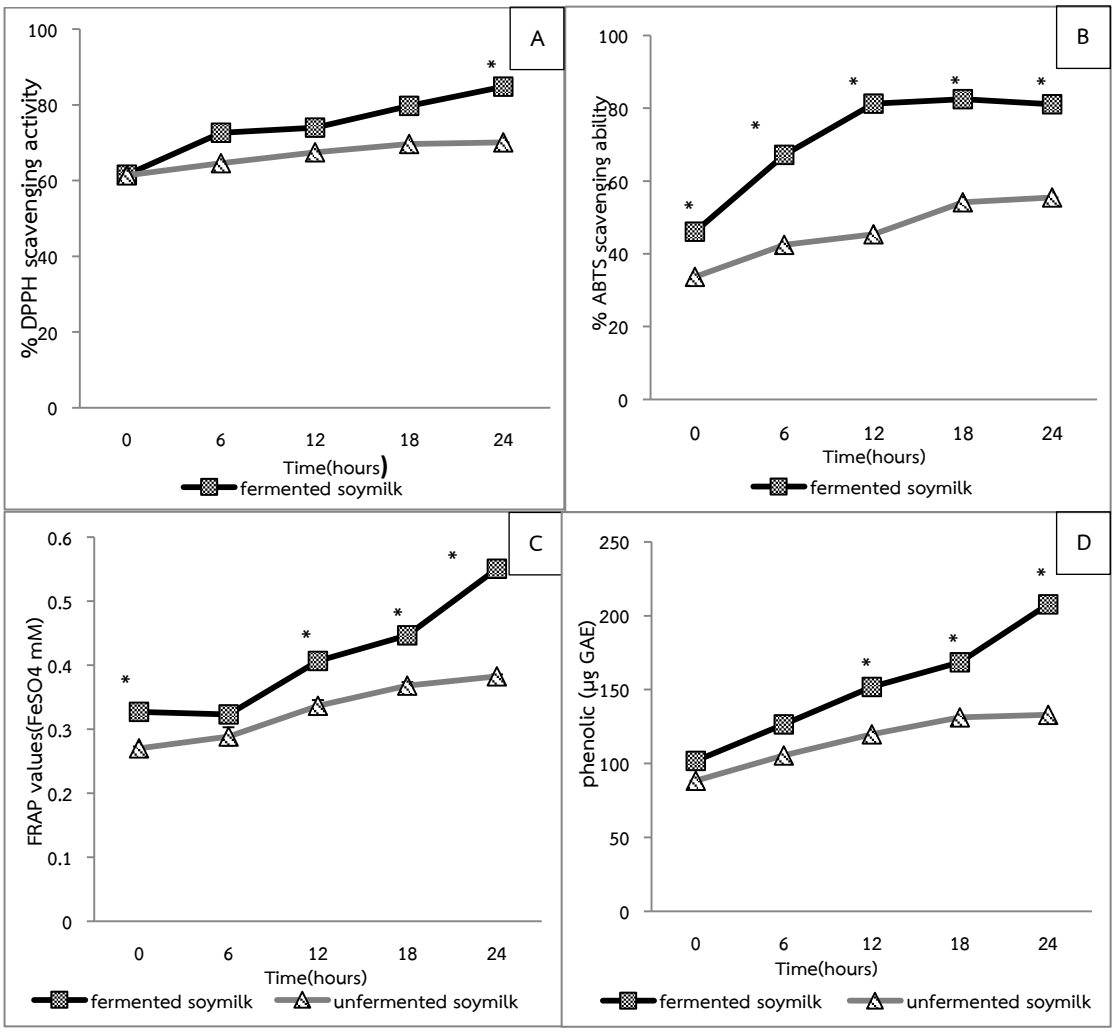

**ภาพที่ 4.13 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมอัลมอนด์หมัก (mean±SD; n=3x3)**

ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 ทำการทดสอบโดยเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 1% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 1.5 x $10^6$ CFU/mL และเติมแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 4.5 x $10^6$ CFU/mL ผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 1% (v/v) หลังการหมัก 12 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในนมหมัก เท่ากับ 9.42±0.07 log CFU/mL และมีค่า pH เท่ากับ 5.71±0.86 และหลังการหมัก 24 ชั่วโมง พบว่าค่า pH ของนมอัลมอนด์หมักลดลงเท่ากับ 5.25±0.18 ส่วนเมื่อเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) หลังการหมัก 12 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียคือ 10.80±0.15 log CFU/mL และมีค่า pH เท่ากับ 5.55±0.17 และหลังการหมัก 24 ชั่วโมง พบว่าค่า pH ของนมอัลมอนด์หมักลดลง เท่ากับ 4.78±0.33 จากการทดลองแสดงให้เห็นการเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) มีจำนวนแบคทีเรียเจริญมากกว่าและมีค่า pH ที่ลดลงกว่าการเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 1% (v/v) โดยผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วย *P. acidilactici* A62 คือการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 3% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 4.5 x $10^6$ CFU/mL ซึ่งการลดลงของค่า pH ของแบคทีเรียกรดแลคติกมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญและกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ (Zhang et al., 2014)

**4.8 ผลการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก**

ในการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วย *Pediococcus acidilactici* A62 โดยศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay นอกจากนั้นยังศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ของสารสกัดนมหมัก ในระหว่างการหมัก 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับการหมัก ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.14 และภาพที่ 4.15

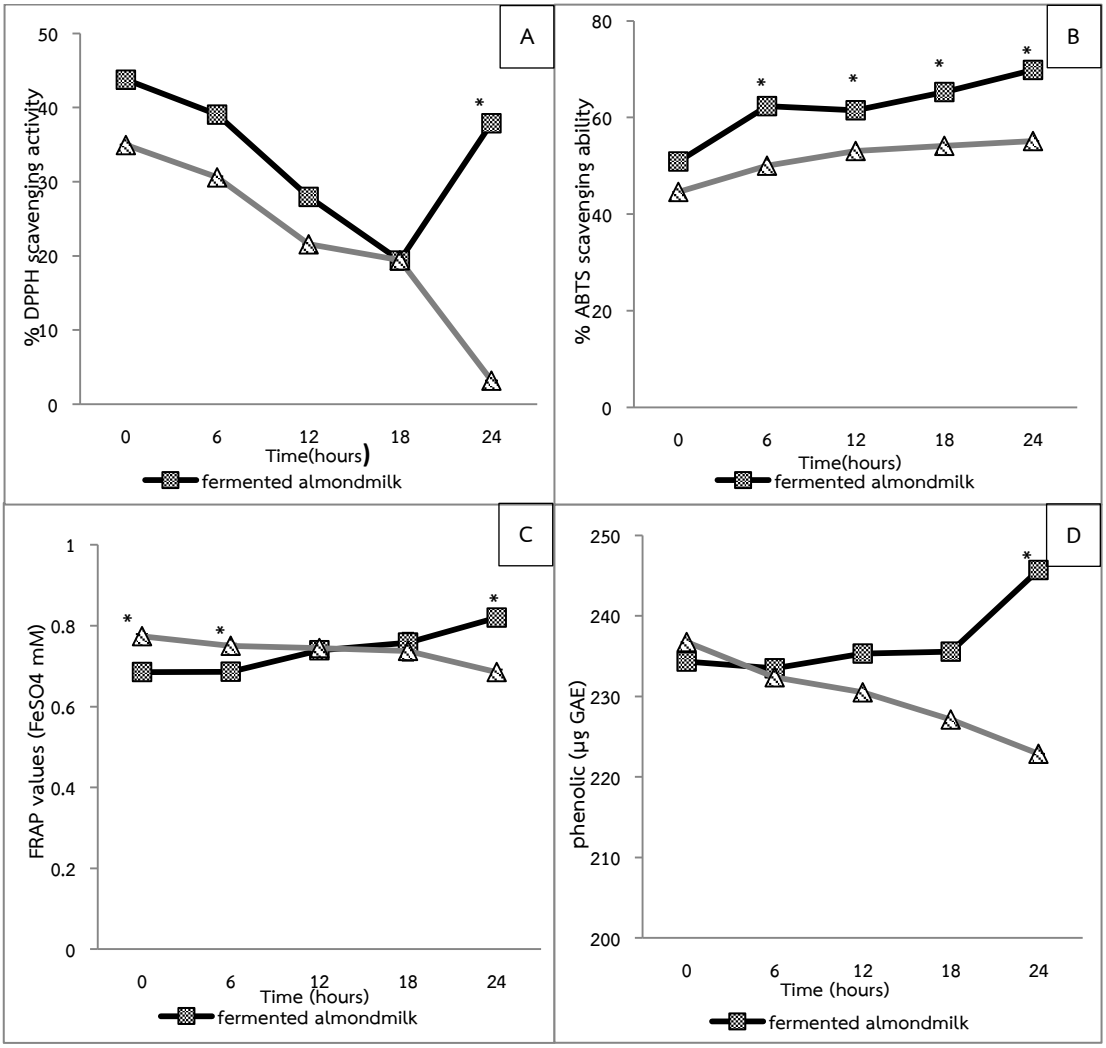
ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.14 คือการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมัก พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ในนมถั่วเหลืองเริ่มต้นมีค่า %DPPH scavenging activity คือ 61.55 - 61.37% และเมื่อหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีค่า %DPPH scavenging activity ในการหมักระยะเวลา 24 ชั่วโมง คือ 84.81% ซึ่งมีค่ามากกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมัก คือ 70.10% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.14 (A) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay พบว่านมถั่วเหลืองที่เวลาเริ่มต้นมีค่า %ABTS scavenging ability คือ 33.66 - 46.05% และเมื่อมีการหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีค่า %ABTS scavenging ability ในการหมักระยะเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 81.13% ซึ่งมีค่ามากกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมัก คือ 55.50% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.14 (B)




**ภาพที่ 4.14 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมัก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เครื่องหมาย (*) แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (mean±SD; n=3x2)**

การประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay พบว่าค่า FRAP values ของนมถั่วเหลืองที่เวลาเริ่มต้นคือ 0.27- 0.32 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด และเมื่อมีการหมักด้วย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีปริมาณ FRAP values ในการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คือ 0.55 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ซึ่งมีค่ามากกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมัก คือ 0.38 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.14 (C) และในการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของนมถั่วเหลือง ผลการทดลองพบว่านมถั่วเหลืองที่เวลาเริ่มต้นมีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคือ 88.43 – 101.71 µg GAE ของสารสกัด และเมื่อมีการหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในการหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง คือ 207.78 µg GAE ของสารสกัด ซึ่งมีค่ามากกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการ

หมัก คือ 133.05 µg GAE ของสารสกัด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.14 (D)




**ภาพที่ 4.15 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมัก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เครื่องหมาย (*) แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (mean±SD; n=3x2)**

ภาพที่ 4.15 แสดงผลการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักผลการทดลองพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay พบว่า นมอัลมอนด์ในการหมักชั่วโมงเริ่มต้นมีค่า %DPPH scavenging activity คือ 34.98% และเมื่อมีการหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีค่า %DPPH scavenging activity ในการหมักหลัง 24 ชั่วโมง คือ 37.90% ซึ่งมีค่ามากกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับการหมัก คือ 3.16% ซึ่งมีความแตกต่าง

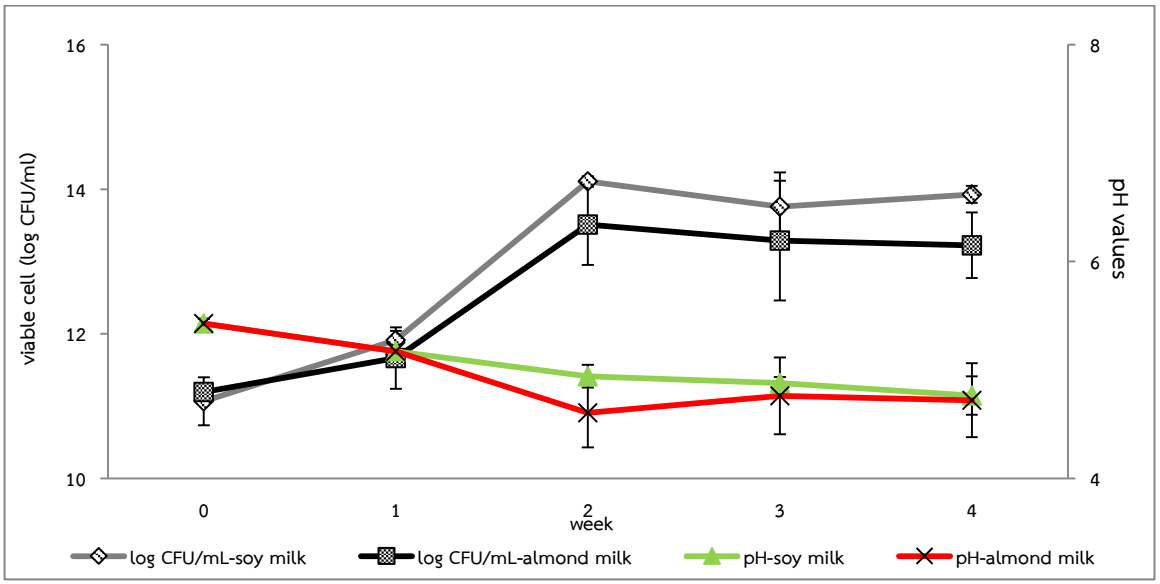
กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.15 (A) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay พบว่าที่เวลาเริ่มต้นมีค่า %ABTS scavenging ability เท่ากับ 44.60 – 55.85% และเมื่อหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 เวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่า %ABTS scavenging ability เท่ากับ 69.86% ซึ่งมีค่ามากกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับการหมัก คือ 55.13% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.15 (B)

การประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay พบว่าที่เวลาเริ่มต้นมีค่า FRAP values คือ 0.68 - 0.77 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด และเมื่อมีการหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 เวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณ FRAP values เท่ากับ 0.81 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ซึ่งมีค่ามากกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับการหมัก คือ 0.68 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.14 (C) และในการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของนมอัลมอนด์หมัก พบว่าที่เวลาเริ่มต้นมีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคือ 234.31 – 236.73 µg GAE ของสารสกัดนมหมัก และเมื่อมีการหมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 เวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 245.67 µg GAE ของสารสกัดนมหมัก ซึ่งมีค่ามากกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 222.85 µg GAE ของสารสกัดนมหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.15 (D)

### 4.9 การศึกษาความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 สัปดาห์

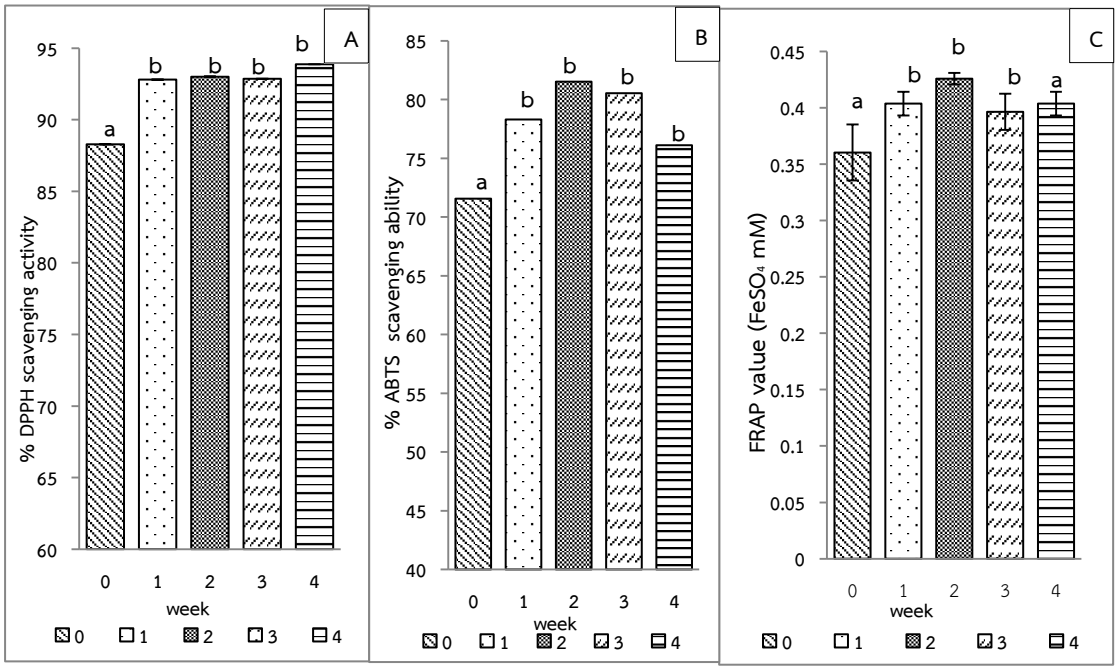
ในการศึกษาความคงตัวของคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 เมื่อเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay และศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.16, 4.17 และ 4.18

ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.16 พบว่าจำนวนแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 ในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ระหว่าง 11.06±0.33 – 13.92±0.33 log CFU/mL และมีค่า pH ลดลงระหว่าง 5.42±0.04 - 4.76±0.17 และนมอัลมอนด์หมักในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ระหว่าง 11.19±0.03 – 13.22±0.43 log CFU/mL และมีค่า pH ลดลงระหว่าง 5.42±0.04 - 4.72±0.34



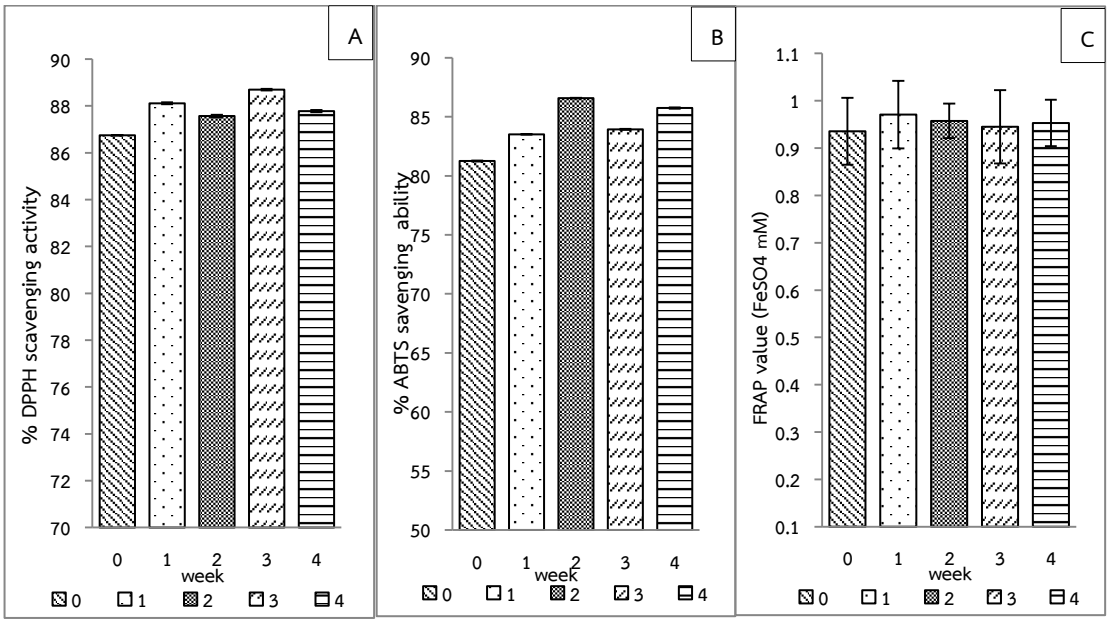

**ภาพที่ 4.16 การรอดชีวิตของ *P. acidilactici* A62 ในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์**

ภาพที่ 4.17 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay มีค่า %DPPH scavenging activity ของนมถั่วเหลืองในสัปดาห์ที่ 0 คือ 88.28% และหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 92.80%, 93.00%, 92.86% และ 93.87% ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay มีค่า %ABTS scavenging ability ในนมถั่วเหลืองหมักในสัปดาห์ที่ 0 คือ 71.56% และหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 78.30%, 81.52%, 80.54% และ 76.11% ตามลำดับ และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay มีค่า FRAP values ในนมถั่วเหลืองหมักในสัปดาห์ที่ 0 คือ 0.36 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด และหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 0.40, 0.42, 0.39 และ 0.40 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ตามลำดับ จากภาพที่ 4.17 ทุกวิธีการทดสอบแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักมีความแตกต่างจากค่าเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay




**ภาพที่ 4.17 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay แสดงค่าเป็น mean±SD ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันของแผนภูมิแท่งแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3)**

ภาพที่ 4.18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay ค่า %DPPH scavenging activity ของนมอัลมอนด์หมักในสัปดาห์ที่ 0 มีค่าเท่ากับ 86.74% และหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 88.11%, 87.57%, 88.69% และ 87.77% ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay ค่า %ABTS scavenging ability ของนมอัลมอนด์หมักในสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 81.25% และหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 83.50%, 86.57%, 83.93% และ 85.74% ตามลำดับ และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay ค่า FRAP values ของนมอัลมอนด์หมักในสัปดาห์ที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.93 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด และหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 0.97, 0.95, 0.94 และ 0.95 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ตามลำดับ




**ภาพที่ 4.18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay (mean±SD; n=3)**

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักโดยพบว่าการหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ด้วยแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* A62 ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น และนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกยังคงอยู่และเพิ่มมากขึ้น

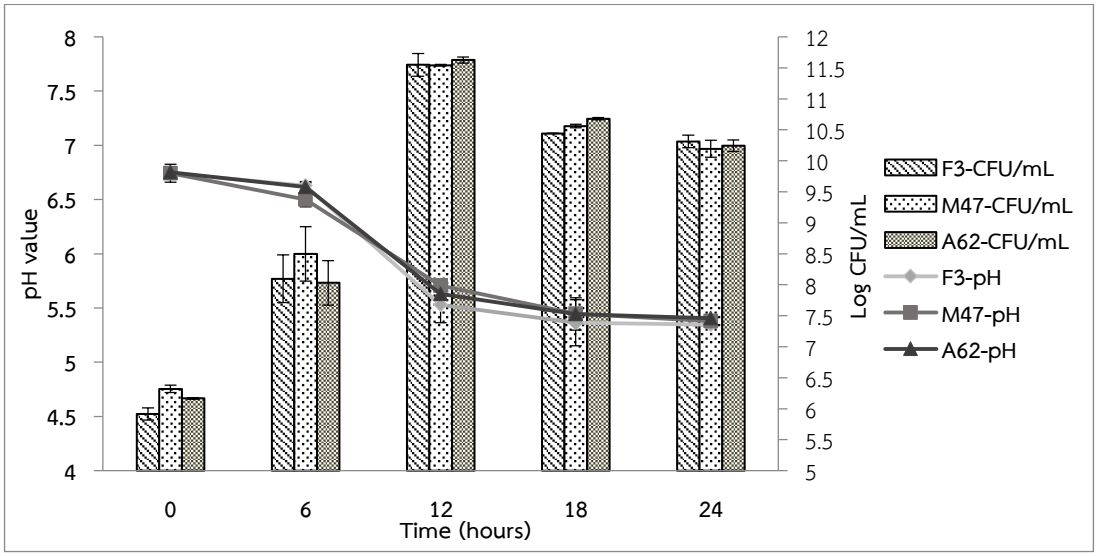
**ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์**

| สัปดาห์ | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (µg GAE of extract) | |
|---|---|---|
| | นมถั่วเหลืองหมัก | นมอัลมอนด์หมัก |
| นมที่ไม่ได้หมัก | 141.50 ± 0.04[a] | 204.15 ± 0.05[a] |
| 0 | 164.71 ± 0.07[b] | 231.00 ± 0.03[b] |
| 1 | 216.53 ± 0.01[c] | 234.46 ± 0.06[c] |
| 2 | 224.11 ± 0.07[c] | 240.03 ± 0.07[c] |
| 3 | 213.22 ± 0.06[c] | 243.25 ± 0.02[c] |
| 4 | 223.35 ± 0.05[c] | 246.35 ± 0.10[c] |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันของคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, n=3)

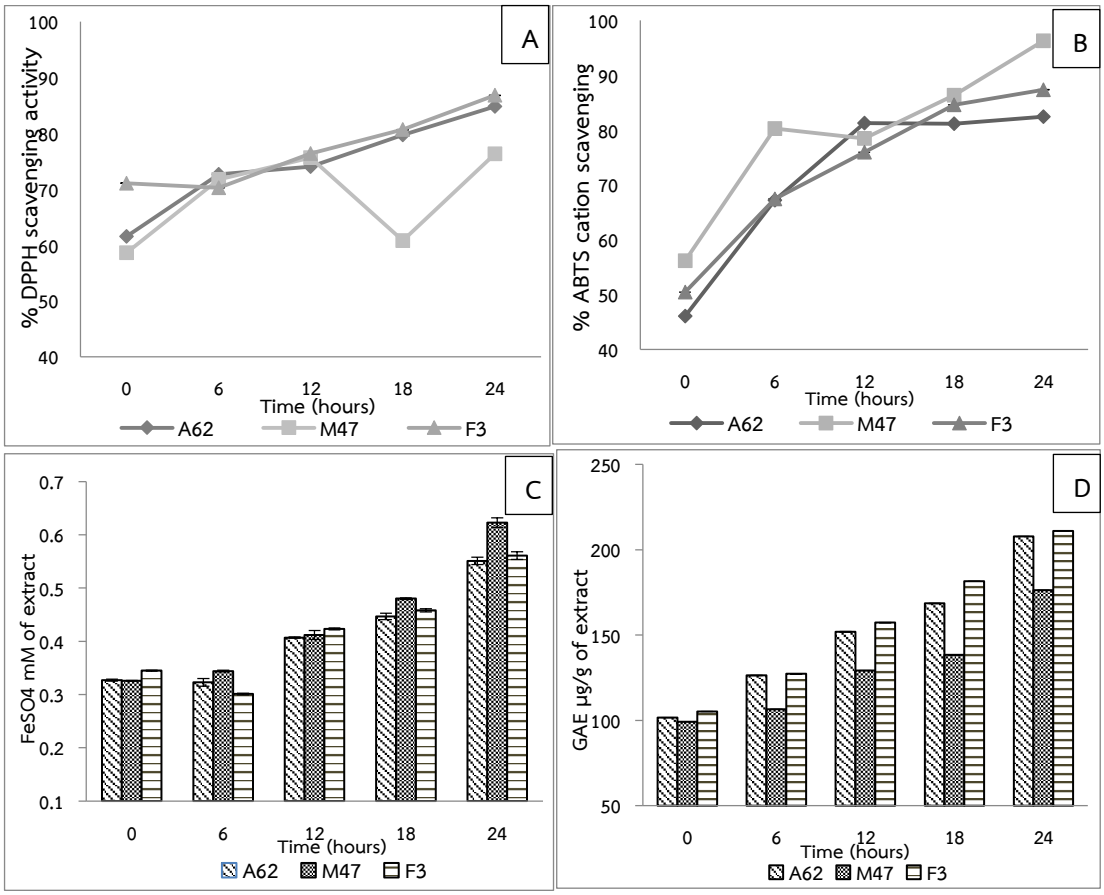
**4.10 ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ A62, F3 และ M47**

ผลการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (A62, F3 และ M47) ที่พบในนมถั่วเหลืองหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 10.19-10.31 log CFU/mL หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง และค่า pH มีค่าลดลงระหว่างการหมักคือ 5.34-5.40 ซึ่งมีค่า pH ใกล้เคียงกันของแต่ละสายพันธุ์ หลังจากหมัก 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 4.19




**ภาพที่ 4.19 จำนวนแบคทีเรียและค่า pH ของนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก**

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay จากการทดลองพบว่านมถั่วเหลืองที่หมักมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้หมัก โดยเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ในนมถั่วเหลืองหมัก มีค่า %DPPH scavenging activity ระหว่าง 76.34 ถึง 86.80% ขณะที่นมถั่วเหลืองที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่าเท่ากับ 69.79% หลังจากการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองพบว่านมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ A62 และ F3 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด รองลงมาคือ M47 ดังแสดงผลในภาพที่ 4.20 (A)




**ภาพที่ 4.20 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก; (A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mean±SD; n=3x2)**

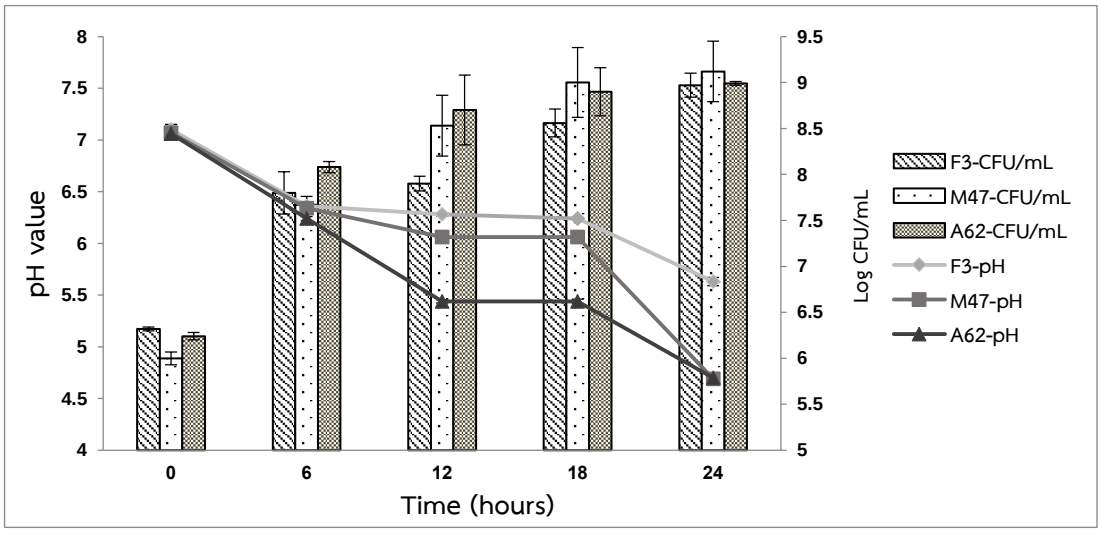
ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay ของนมถั่วเหลืองที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า %ABTS scavenging ability เท่ากับ 42.51% ในขณะที่นมถั่วเหลืองที่มีการหมักมีค่าระหว่าง 82.45 ถึง 96.26% โดยพบว่านมที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ M47 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือ F3 และ A62 ดังแสดงในภาพที่ 4.20 (B) และการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay พบว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า FRAP values เท่ากับ 0.25 mM $FeSO_4$ ส่วนนมถั่วเหลืองที่ได้รับการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า FRAP values ระหว่าง 0.55 ถึง 0.62 mM $FeSO_4$ หลังการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพ 4.20 (C) ผลการศึกษาพบว่าการหมักนมถั่วเหลืองกับแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลต เพิ่มขึ้นหลังการบ่ม 6 ชั่วโมงและถึงสูงสุดเมื่อบ่มที่ 24 ชั่วโมง โดยพบว่านมที่

หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ F3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อหมักนมแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือ A62 และ M47

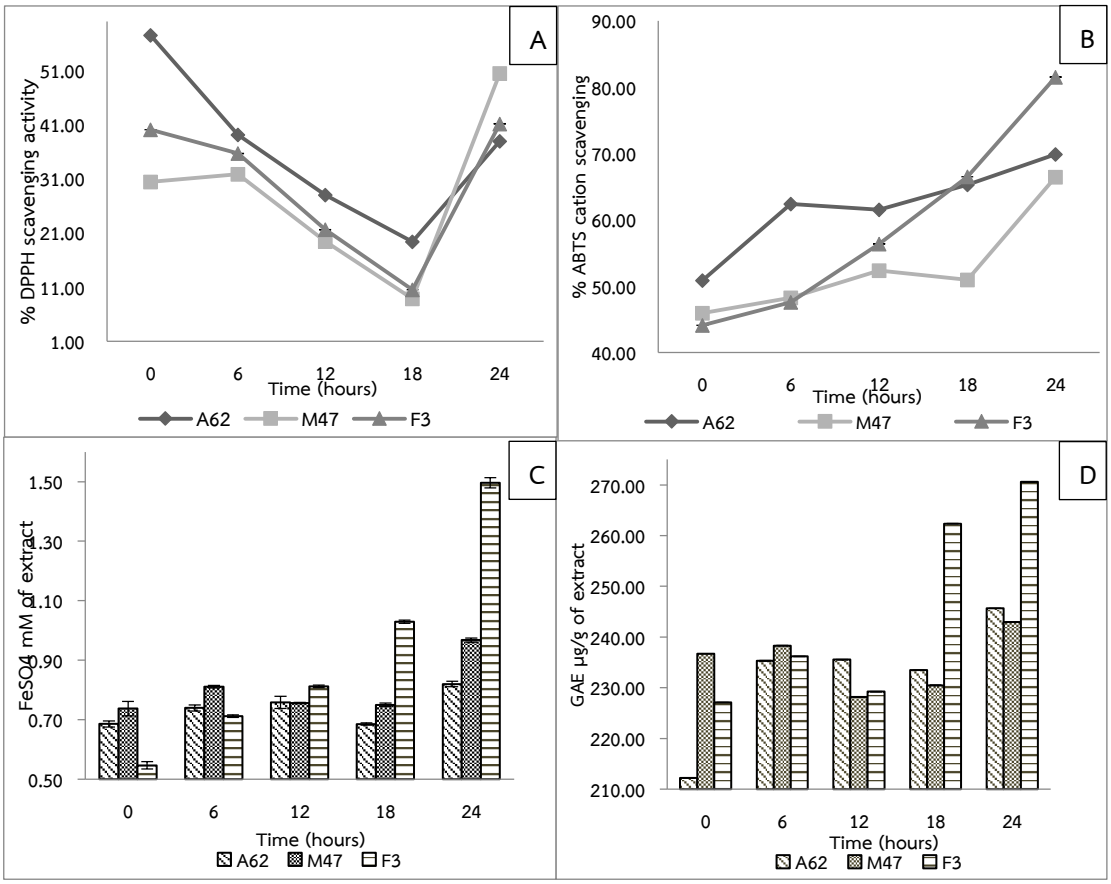
ผลการทดลองแสดงในภาพ 4.20 (D) พบว่านมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้หมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังการบ่มเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 176.03±0.04 ถึง 211.00±0.03 μg GAE ในขณะที่นมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมักมีปริมาณฟีนอลิก คือ 119.80±0.01 μg GAE ผลการศึกษาพบว่าการหมักนมถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยเพิ่มปริมาณฟีนอลิกในนมถั่วเหลือง โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ F3 และ A62 เมื่อหมักนม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ M47

การศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ A62, F3 และ M47 ผลการทดลองพบว่าจำนวนโดยมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักในนมอัลมอนด์มีการเจริญในช่วง 24 ชั่วโมงของการหมัก จำนวนแบคทีเรียในนมอัลมอนด์หมักอยู่ในช่วง ระหว่าง 8.97 ถึง 9.12 log CFU /mL หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง และค่า pH มีค่าลดลงระหว่างการหมักคือ 4.7-5.6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ A62 และ M47 เมื่อหมักนมมีค่า pH ลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ F3 หลังการหมัก 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.21

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมักที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay จากการทดลองพบว่านมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเมื่อศึกษาด้วยวิธี DPPH assay ในนมอัลมอนด์หมัก พบว่ามีค่า %DPPH scavenging activity ระหว่าง 37.90 ถึง 50.41% ขณะที่นมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่าเท่ากับ 3.16% หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ M47 เมื่อหมักนมแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือ F3 และ A62 หลังการหมัก 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.22 (A)




**ภาพที่ 4.21 จำนวนแบคทีเรียและค่า pH ของนมอัลมอนด์หมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก**




**ภาพที่ 4.22 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก; (A)DPPH assay, (B)ABTS assay, (C)FRAP assay, (D) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mean±SD; n=3x2)**

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay ของนมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า % ABTS scavenging ability เท่ากับ 44.60% ในขณะที่นมอัลมอนด์หมักมีค่าระหว่าง 49.67 ถึง 81.09% โดยพบว่านมที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ F3 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือแบคทีเรีย A62 และ M47 หลังการหมัก 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.21 (B) และการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay พบว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า FRAP values เท่ากับ 0.68 mM $FeSO_4$ ส่วนนมอัลมอนด์ที่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า FRAP values ช่วงระหว่าง 0.82 ถึง 1.49 mM $FeSO_4$ หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่านมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ F3 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือ M47 และ A62 หลังการหมัก 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพ 4.22 (C)

ผลการทดลองพบว่านมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยนมอัลมอนด์ที่ไม่ได้หมักพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในระหว่าง 235.33±0.01 ถึง 270.59±0.02 μg GAE ในขณะที่นมอัลมอนด์ที่ได้รับการหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก มีค่าเท่ากับ 222.86±0.01 μg GAE ผลการศึกษาพบว่าการหมักนมอัลมอนด์ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในนมอัลมอนด์ โดยพบว่าการหมักนมอัลมอนด์ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ F3 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือ A62 และ M47 ดังแสดงในภาพ 4.22 (D)

ผลการศึกษาพบว่าการหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์กับแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก และพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ F3 เมื่อหมักนมแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุดรองลงมาคือ A62 และ M47 แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 นอกจากแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีแล้ว ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และสามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นกล้าแบคทีเรียสำหรับผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ต่อไปในอนาคต

# บทที่ 5
# อภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากอาหารหมักดอง และศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดี และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อการนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อสุขภาพต่อไป

## 5.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง โดยเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง จำนวน 17 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาส้ม ปลาร้า ส้มไข่ปลา หน่อไม้ส้ม ส้มปลาน้อย กุ้งจ่อม หม่ำขี้ปลา กระเทียมดอง ไส้กรอกหมู ไส้กรอกวัว กะปิ และหม่ำวัว ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus hirae* ได้จากไส้กรอกอาหารพื้นเมืองของประเทศไทย (Phalakornkule and Tanasupawat, 2007) นอกจากนี้การศึกษาของ Angmo และคณะ ใน ค.ศ. 2016 สามารถแยกแบคทีเรียแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต มาจากอาหารหมักดองซึ่งได้ทำการย้อมแกรมและคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง และทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสให้ผลลบคือไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และได้นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก (Angmo et al, 2016) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ซึ่งได้เก็บตัวอย่างอาหารหมักดองมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เมื่อย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรียติดสีม่วงหรือเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างกลม (coccus) รูปร่างแท่ง (bacilli) และรูปท่อนสั้น (coccobacilli) และสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักดองประเภทปลาส้มมากที่สุด รองลงมาคือ ไส้กรอกหมู ไส้กรอกวัว หม่ำวัว ส้มไข่ปลา หน่อไม้ดอง ปลาร้า ปูดอง และกุ้งจ่อม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และสามารถทนต่อสภาวะกรดได้ มีทั้งชนิดที่มีรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม แหล่งที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมักดองต่าง ๆ เป็นต้น (Sonomoto and Yokota, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบในปลาส้มอีกด้วยโดยการศึกษาของ Kopermsub และ Yunchalard ใน ค.ศ. 2010 พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มในประเทศไทยได้ทั้งหมด 762 ไอโซเลต ซึ่ง

พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus bovis*, *Weissella cibaria*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum* และ *L. fermentum* (Kopermsub and Yunchalard , 2010)

**5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติก**

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay โดยพบว่ามี 28 ไอโซเลต ที่มีร้อยละ scavenging activity มากกว่า ร้อยละ 50 การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกหมู ผักดอง และปลาส้ม ซึ่งการหมักของ *L. plantarum* จะพบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay เท่ากับ 50.8% และ 50.7% และยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานคือ *L. plantarum* ATCC8014 (Abubakr et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนใส (supernatant) ประกอบด้วยสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* และ *L. casei* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay เท่ากับ 77.9-86.1%, 45.7-86.4% และ 36.9-45.8% (Xing et al., 2015) และยังมีการศึกษาโดยสามารถแยกแบคทีเรีย *L. plantarum* LAB1 จากอาหารหมักดองในท้องถิ่นพบว่ามีค่าร้อยละ DPPH scavenging activity เท่ากับ 57.07±0.57 (Kachouri et al., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งแสดงค่าร้อยละ DPPH scavenging activity มากกว่า ร้อยละ 50 มีทั้งหมด 28 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติด้านอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งสารต้านออกซิเดชันมีหลากหลายชนิดที่อาจทำหน้าที่หรือกลไกในการต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะสามารถประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้อย่างแม่นยำ (Xiao et al., 2015) ซึ่ง DPPH radical คือสารอนุมูลอิสระที่เสถียร แต่สามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนไปเป็น radical character (Naik et al., 2003) และการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันที่มีอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) (Banerjee et al., 2005) และเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจึงมีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay โดยพบว่าทั้ง 28 ไอโซเลต มีค่าร้อยละ ABTS scavenging activity อยู่ระหว่าง 37.78-89.30 การศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ 3, 8, 12, 32, และ C5 ด้วยวิธี ABTS assay พบว่ามีค่าร้อยละ ABTS scavenging activity มีค่าอยู่ระหว่าง 59-92.5 (Pieniza et al., 2015) ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการความสามารถในการยึดจับอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันที่นำมาทดสอบ และเป็นวิธีการที่ดีในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านออกซิเดชันจะเป็นผู้ให้ไฮโดรเจนอะตอมของกลไกต้านออกซิเดชัน (Re et al., 1999) การศึกษาของ Ibrahim และคณะ ในปี 2014 ได้ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักในสมุนไพรพบว่ามีค่า FRAP values อยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 1.0 mM $FeSO_4$ (Ibrahim et al., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 28 ไอโซเลต มีค่า FRAP values อยู่ระหว่าง 0.68-1.74 mM $FeSO_4$ ซึ่ง Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay เป็น

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการวัดความสามารถในการลดสารต้านออกซิเดชันในการสร้าง ferrous tripyridyltriazine ( $Fe2^{+}$ -TPTZ) จ า ก ferric tripyridyltriazine ($Fe3^{+}$-TPTZ) complex (Othman, 2007) ซึ่งคุณสมบัติการลดลงนี้เกี่ยวข้องกับสารประกอบที่ไปทำลายอนุมูลอิสระผ่านอะตอมของไฮโดรเจน (Duh, 1999) สารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันอาจทำหน้าที่แตกต่างกันในแต่ละกลไกการต่อต้านออกซิเดชัน ดังนั้นหนึ่งวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่สามารถประเมินความสามารถในการต่อต้านออกซิเดชันได้อย่างสมบูรณ์ (Xiao et al., 2015)

## 5.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

### 5.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 28 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella typhimurium* DMST 562 ส่วนแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาส้มมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีต่อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ คือ *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่มาจากกรดอินทรีย์ (organics acid) หรือสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น (Noraphat et al., 2011) และยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมวัวสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยพบว่ามีบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย (inhibition zone) ของการยับยั้งแบคทีเรียสูงสุด คือ 10-14 มิลลิเมตร ต่อแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบได้แก่ *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *S. typhimurium*, *S. paratyphimurium* B, *Clostridium* sp., *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *B. megaterium* ID07817 และ *B. megaterium* ID07818 (Djadounil et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 12 ไอโซเลต ได้แก่ A19, A22, A25, A26, A27, A28, A29, A40, A48, A53, A54 และ A62 พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* DMST 562, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* DMST 5040 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zones) มากกว่า 10 มิลลิเมตร โดยในการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งมากกว่า 20 มิลลิเมตร แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีมาก (strong inhibition) ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งระหว่าง 10-20 มิลลิเมตร แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ปานกลาง (intermediate inhibition) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้น้อย (low inhibition) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในการยับยั้งแบคทีเรียมาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกต่อไป (Prabhurajeshwar and Chandrakanth, 2017) ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

6 ไอโซเลต คือ A25, A27, A28, A29, A40 และ A62 ยังเสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่คัดเลือกได้ และการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *Enterococcus durans* LAB18s มีคุณสมบัติของโพรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียจุลินทรีย์ก่อโรคและมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและสามารถทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองได้ (Pieniza et al., 2014) และการศึกษาของ Prabhurajeshwar และคณะ ในปี 2017 ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 30 ไอโซเลต พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรด แลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* มีคุณสมบัติดีที่สุด จำนวน 16 สายพันธุ์ โดยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข T16,T2 และ T4 เหมาะสำหรับการนำมาพัฒนาเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ (Prabhurajeshwar et al., 2017) และโพรไบโอติกอาจสร้างสารบางอย่างในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Revanasiddappa and Chandrakanth, 2017)

**5.3.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร**

การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งก่อนที่จะถึงลำไส้ใหญ่แบคทีเรียโพรไบโอติกจะต้องอยู่รอดในสภาวะความเป็นกรดของกระเพาะอาหาร ซึ่งมีค่า pH อยู่ระหว่าง 2.0 ถึง 4.0 โดยความเป็นกรดในกระเพาะอาหารมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของแต่ละบุคคลและจากปัจจัยต่าง ๆ (Dunne et al., 2001) ความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ทดสอบอาจมาจากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น พืชหมักจะมีค่า pH ลดลงหลังจากการหมักเพียงวันเดียวประมาณ 4.0-3.4 และเกลือน้ำดีก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารในร่างกาย (Havenaar et al., 1992) จากการศึกษาวิจัยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่ดีที่สุด พบว่าสามารถทนต่อสภาวะกรดที่ pH 2, pH 3 และ pH 6.5 โดยแต่ละไอโซเลตสามารถรอดชีวิตหลังจากการบ่มที่สภาวะกรด pH 2, pH 3 และ pH 6.5 ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหารในส่วนของกระเพาะอาหารที่มีสภาวะความเป็นกรด และพบว่าสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหารในส่วนของลำไส้เล็กที่มีการหลั่งของเกลือน้ำดี ซึ่งความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.30 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเลือกเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำมาใช้ประโยชน์กับมนุษย์ (Goldin et al., 1992)

จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A62 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดจากวิธีการทดสอบทั้ง 3 วิธี คือ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร และมีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลต A62 จึงเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นำมาศึกษาเพื่อการพัฒนาและใช้ประโยชน์ต่อไป

**5.4 การทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้**

**5.4.1 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility)**

โดยทั่วไปการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรคนั้น ยาส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ไม่จำเพาะ ทำให้ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกายให้มีจำนวนที่น้อยลง การที่แบคทีเรียโพรไบโอติกมีคุณสมบัติในการทนต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดนั้นจะช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยจะช่วยฟื้นฟูสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ทำให้เป็นผลดีต่อสุขภาพของผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต A62 มีคุณสมบัติที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ streptomycin, gentamicin, vancomycin, kanamycin, norfloxacin, ofloxacin และ ciprofloxacin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides (streptomycin, kanamycin และ gentamicin) และยากลุ่ม glycopeptide antibiotic (vancomycin) และกลุ่ม fluoroquinolone (norfloxacin, ofloxacin และ ciprofloxacin) โดยมีการศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับความไวตอยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 46 ไอโซเลต สวนใหญ่มีรูปแบบการดื้อตอยาปฏิชีวนะ vancomycin, kanamycin, norfloxacin และ ciprofloxacin (Charteris et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลรายงานวาแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 187 ไอโซเลต ดื้อยา kanamycin ที่ร้อยละ 79 และดื้อต่อยา vancomycin ร้อยละ 65 (Temmerman et al., 2003) จากการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด norfloxacin, ciprofloxacin และ ofloxacin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม fluoroquinolone อาจจะมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่พัฒนาจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A62 ถ้าผู้บริโภคป่วยด้วยอาการติดแบคทีเรียในทางเดินปัสสาวะ การติดแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง การติดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร หรือโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และได้รับยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ อาจไม่ส่งผลต่อจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติก A62 ที่บริเวณลำไส้ใหญ่ทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกในระหว่างการรักษาอาการติดแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะ (Wilton et al., 1996) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความปลอดภัยแล้วยีน (gene) ที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้นั้นควรจะเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม (chromosomally coded resistance) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ (Bujnakova et al., 2014) มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pEOC01 ในแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* NCIMB 6990 พบว่ามีส่วนของยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ erythromycin, streptomycin และ clindamycin ซึ่ง *P. acidilactici* NCIMB 6990 มียีนที่ดื้อยา streptomycin คือ *aadE* พบในพลาสมิดของแบคทีเรีย *Campylobacter jejuni* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบการปนเปื้อนในอาหารทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ ยีนในพลาสมิดดังกล่าวอาจเกิดการถ่ายทอดยีนดื้อต่อยา streptomycin จากแบคทีเรียกรดแลคติกไปยังแบคทีเรียที่ก่อโรคในลำไส้ได้ (O'Connor et al., 2007) ดังนั้นควรมีการประเมินความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกผ่านการศึกษาทั้งในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลอง และการศึกษาในมนุษย์ โพรไบโอติกบางสายพันธุ์จะต้องปฏิบัติตามมาตรฐานความปลอดภัยก่อนนำมาใช้ได้จริง (Vankerckhoven et al, 2008) อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียกรด แลคติกไอโซเลต A62 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ tetracycline, penilcillin, erythromycin, chloramphenicol, ampicillin, imipenem, meropenem และ ceftazidime

ซึ่งความไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวอาจใช้เป็นข้อบ่งชี้ในการรับประทานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกร่วมกับยาปฏิชีวนะดังกล่าวได้โดยเมื่อได้ยาปฏิชีวนะควรหลีกเลี่ยงการบริโภคกรดแลคติกไอโซเลต A62 ดังนั้นในการที่จะนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ในรูปแบบใด ควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นอย่างดี เพื่อความปลอดภัยและได้รับประโยชน์สูงสุดในการส่งเสริมสุขภาพ

**5.4.2 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการทดสอบการผลิตเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (Deoxyribonuclease : DNase)**

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A62 ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและไม่ผลิตเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส แบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจผลิตสารฮีโมไลซิน (Hemolysins) ซึ่งเป็นไขมันหรือโปรตีนที่ทำให้เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดงโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง (Vesper et al., 2004) และเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะระหว่างหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลที่เป็นโครงสร้างหลักในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (Han et al., 2015) ซึ่งในโครงสร้างเซลล์ของร่างกายมนุษย์ประกอบด้วยดีเอ็นเอซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์เป็นอย่างมาก ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อบริโภคควรคำนึงถึงความปลอดภัยเมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกาย มีผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมหมักพื้นบ้านจำนวนทั้งหมด 308 ไอโซเลต พบว่ามี 305 ไอโซเลต ที่ไม่มีบริเวณใส (clear halos) เกิดขึ้นโดยโคโลนีของแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งเป็นกลุ่ม Gamma-hemolysis และมี 1 ไอโซเลต ที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์เกิดวงใสสีเหลือง (clear hemolysis zone) อยู่ในกลุ่ม Beta-hemolysis และกลุ่ม Alpha-hemolysis จะเกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนีของแบคทีเรีย (greenish halo) มี 2 ไอโซเลต (Ibrahim et al., 2015)

## 5.5 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62

ปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการบริโภคอาหารประเภทผลิตภัณฑ์จากนม ซึ่งสามารถบริโภคได้ทุกกลุ่มอายุตั้งแต่วัยเด็กจนถึงวัยหมดประจำเดือน จากการวิจัยครั้งนี้ซึ่งได้ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 ที่คัดเลือกได้ทำการทดสอบโดยเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 1% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 1.5 x $10^6$ CFU/mL และปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียโดยประมาณ 4.5 x $10^6$ CFU/mL ผลการทดลองพบว่าน้ำนมหมักที่เตรียมโดยการเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) มีจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกที่รอดชีวิตมากกว่าและมีค่า pH ที่ลดลงมากกว่าการเติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 1% (v/v) ดังนั้นการเตรียมน้ำนมหมักโดยใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น 3% (v/v) จึงเหมาะสมสำหรับการเตรียมผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก จากการวิจัยของ Ramakrishnan และคณะ ในปี ค.ศ. 2016 ได้ทำการศึกษา *E. faecium* MTCC 5695 ที่มีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และมีความสามารถในการผลิตสารเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย การผลิตแบคเทอริโอซิน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

และความเป็นกรดด่าง (pH) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักคือเวลา 26.48 ชั่วโมง และปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 2.17% (v/v) (Ramakrishnan et al., 2014) มีการศึกษาการหมักนมอัลมอนด์เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้แทนโยเกิร์ตจากนมวัว โดยปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 1% (v/v) ของกล้าแบคทีเรีย (starter suspension) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่า pH ลดลงเหลือ 4.4-4.6 จึงนำไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป (Bernata et al., 2015) ปัจจุบันการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ได้จากนมส่วนใหญ่มาจากนมวัวจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาทางเลือกของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากนมอื่น ๆ เนื่องจากนมวัวอาจก่อให้เกิดการแพ้น้ำตาลแลกโตส และมีปริมาณคอเลสเตอรอลสูง จึงมีการศึกษาพัฒนาโยเกิร์ตจากนมถั่วลิสง ซึ่งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) พบว่าปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเตรียมผลิตภัณฑ์ คือ 1.9% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (Bansal et al., 2016) และในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องพิจารณาเมื่อนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ในการหมัก เช่น โยเกิร์ต ซึ่งโพรไบโอติกต้องมีปริมาณมากพอในการบริโภคเพื่อให้ได้รับประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นผลิตภัณฑ์นมหมักของโพรไบโอติกควรมีปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตอย่างน้อย 6-7 log CFU/g ในขณะที่บริโภคและควรบริโภคอย่างสม่ำเสมอในปริมาณที่สูงกว่า 100 กรัมต่อวัน หรืออย่างน้อย 9 log CFU ต่อวัน (Codex, 2003)

### 5.6 การประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการประเมินคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักด้วยวิธี DPPH assay มีค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ในการหมักหลัง 24 ชั่วโมง เท่ากับ 84.81 ซึ่งมีค่ามากกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมัก เท่ากับร้อยละ 70.10 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของหางนมถั่วเหลืองหมักด้วยแบคทีเรีย *L. plantarum* B1-6 ผลการศึกษาพบว่าหางนมถั่วเหลืองที่ได้รับการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีปริมาณฟีนอลิก และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay สูงกว่าหางนมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมัก (Xiao et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองและนมวัวที่หมักด้วยแบคทีเรีย *S. thermophilus* ATCC 4356 และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IM 025 (Farnworth et al., 2007) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าจากนมถั่วเหลืองหมักมีค่าร้อยละ ABTS scavenging ability เท่ากับ 81.13 และมีปริมาณ FRAP values เท่ากับ 0.55 $FeSO_4$ mM และมีปริมาณฟีนอลิก คือ 207.78 μg GAE ซึ่งมีค่ามากกว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.13 นมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. rhamnosus* และ *L. casei* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าในนมถั่วเหลืองหมักสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี คือ

ABTS assay, DPPH assay และ FRAP assay และหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Subrota et al., 2013) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าการหมักนมถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A62 สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การหมักนมอัลมอนด์ด้วยโพรไบโอติก *Lactobacillus reuter* และ *S. thermophilus* จะเป็นทางเลือกหนึ่งของสุขภาพและสำหรับผู้ที่แพ้นมวัวและเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากนมอัลมอนด์ (Bernata et al., 2015) ซึ่งจากการวิจัยพบว่าการหมักนมอัลมอนด์ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำให้สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงขึ้น โดยมีค่าร้อยละ DPPH scavenging activity คือ 70.10 และมีค่าร้อยละ ABTS scavenging ability คือ 69.86 และมีค่า FRAP values คือ 0.55 $FeSO_4$ mM นอกจากนี้ยังมีปริมาณฟีนอลิก คือ 207.78 µg GAE ในการหมักหลัง 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่ามากกว่านมอัลมอนด์ที่ไม่ได้รับการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.14 โดยมีการรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาแบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* มาหมักนมแพะ นมอูฐ และนมวัว และประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay พบว่านมแพะอุดมไปด้วยสารต้านออกซิเดชันที่มี ค่าร้อยละ scavenging activity มากที่สุดคือ 93 รองลงมาคือนมอูฐมี ร้อยละ 86 และนมวัวมีร้อยละ 79 (Balakrishnan et al., 2014) แต่ยังไม่มีรายงานการหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์กับแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* โดยผู้วิจัยได้ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ เติมปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นคือ 3% (v/v) และหมักนมโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกและมีค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก และยังสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิกในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักอีกด้วย

### 5.7 การศึกษาความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

อายุการเก็บรักษามีบทบาทสำคัญในด้านการตลาดและการขายผลิตภัณฑ์อาหารที่เน่าเสียง่าย ปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ และเวลา มีบทบาทสำคัญต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหาร การศึกษานี้จึงมีการพัฒนานมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักที่อุดมไปด้วยสารต้านออกซิเดชัน และมีความคงตัวของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการประเมินความคงตัวของโยเกิร์ตผลไม้ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 23±4 องศาเซลเซียส 15 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องมีรสชาติรสเปรี้ยวภายในวันที่จัดเก็บ และในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างมากหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลาผ่านไป 18 วัน และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เวลาผ่านไป 9 วัน และสารต้านออกซิเดชันยังคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา

21 วัน (Selvamuthukumaran et al., 2014) จากการวิจัยพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักมีความคงตัวของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ โดยพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองหมักมีค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 92.80, 93.00, 92.86 และ 93.87 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละ ABTS scavenging ability ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 78.30, 81.52, 80.54 และ 76.11 ตามลำดับ และมีค่า FRAP values ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 0.40, 0.42, 0.39 และ 0.40 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ตามลำดับ และยังพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมอัลมอนด์หมัก มีค่าร้อยละ DPPH scavenging activity ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 88.11, 87.57, 88.69 และ 87.77 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละ ABTS scavenging ability ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 83.50, 86.57, 83.93 และ 85.74 ตามลำดับ และมีค่า FRAP values ในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 0.97, 0.95, 0.94 และ 0.95 $FeSO_4$ mM ของสารสกัด ตามลำดับ ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการประเมินสมบัติทางชีวเคมีและการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองแอฟริกัน (*Sphenostylis stenocarpa*) ซึ่งหมักนมถั่วเหลืองด้วย *S. thermophilus* และ *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* บ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง และประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่า pH ของผลิตภัณฑ์อยู่ระหว่าง 4.45 ถึง 4.54 และมีปริมาณจุลินทรีย์ตั้งแต่ $1.6 \times 10^6$ ถึง $2.6 \times 10^8$ CFU/ml ในระหว่างการเก็บรักษาไม่เกิน 3 สัปดาห์ และยังพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความคงตัว (Aminigo et al., 2009) นอกจากนี้การศึกษายังพบว่าปริมาณฟีนอลิกของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก เมื่อเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณฟีนอลิกยังคงอยู่และเพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งเป็นไปได้ว่าในระหว่างการเก็บรักษาอาจเกิดกระบวนการหมักอยู่ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของนม การศึกษาของ Subrota และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 ได้ทำการหมักนมถั่วเหลืองกับ *L. rhamnosus* NCDC 19, 24, *L. rhamnosus* C2, C6 และ *L. casei* NCDC 17, 297 ซึ่งสามารถคัดแยกได้จากชีส พบว่าหลังกระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกในนมถั่วเหลืองอาจมีความสามารถในการย่อยสลายของโปรตีน แร่ธาตุ และคาร์โบไฮเดรตในนมหมัก (Subrota et al., 2003) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกผ่านกระบวนการหมักทำให้สามารถย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ดีขึ้น และยังช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซึมแร่ธาตุในผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งจะช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ นอกเหนือจากประโยชน์ทางโภชนาการโพรไบโอติก ยังมีบทบาทในการเผาผลาญอาหาร ลดอาการท้องผูก ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Sindhu and Khetarpaul, 2003)

### 5.8 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก

สารโพลีฟีนอล (polyphenols) มักพบอยู่ในพืช เช่น ถั่วเหลือง ธัญพืช ผัก ผลไม้ และชา และสารประกอบธรรมชาติที่พบได้ในพืชที่สำคัญคือสารไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) มีโครงสร้างและการออกฤทธิ์ที่คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง คือ เอสโตรเจน (estrogen) โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง และกระตุ้นการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง แต่ออกฤทธิ์ได้ต่ำกว่าเอสโตรเจนของมนุษย์ แต่สามารถแย่งที่กับเอสโตรเจนในการจับกับตัวรับเอสโตรเจนที่มีอยู่ในทุกเซลล์ของ

ร่างกาย และชักนำให้เกิดการตอบสนองเฉพาะต่อเอสโตรเจน ในธรรมชาติสามารถพบสารไฟโตเอสโตรเจนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ 3 ชนิดหลัก คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ลิกแนน (lignans) และ คิวเมสแทน (coumestans) (Harris et al., 2005) สารเหล่านี้อาจจะช่วยป้องกันโรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคกระดูก โรคมะเร็ง และผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (Landete et al., 2016) มีการศึกษาพบว่าประโยชน์จากการบริโภคสารไฟโตเอสโตรเจนเป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียในกระเพาะอาหารและลำไส้ในการปรับสมดุลของประชากรแบคทีเรีย (Bolca et al., 2012) ดังนั้นการรับประทานอาหารที่ประกอบไปด้วยสารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง ลิกแนนจากธัญพืช เช่น อัลมอนด์ เป็นต้น ผสมกับโพรไบโอติกอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารไอโซฟลาโวนและลิกแนนทำให้เกิดสารอีควอล (equol) และเอนเทอโรลิกแนน (enterolignans) ในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้น (Gaya et al., 2017) จากการวิจัยพบว่าการหมักนมถั่วเหลืองกับ *P. acidilactici* A62 มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่สูงขึ้นหลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง ซึ่งกระบวนการหมักจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารไอโซฟลาโวน โดยสวนใหญ่พบอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ (glycoside) คือ เดดซีน (daidzin) จีนีสติน (genistin) เดดซีอีน (daidzein) และ จีนีสทีอีน (genistein) เป็นสารไกลโคน (aglycones) การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากการเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) และแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในรูปแบบ O-glucosides, C-glucosides หรือรูปแบบการเติมหมู่เมทธิว (methylated forms) ทำให้สารที่เกิดขึ้นสามารถดูดซึมและออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้น (Marazza et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เมื่อทำการหมักนมถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มากขึ้น และในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยังมีความคงตัวและมีปริมาณสารปะกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการหมักในนมถั่วเหลืองที่ประกอบด้วยสารประกอบในนมที่มีปริมาณสารอาหารสูง และเส้นใยอาหารจากสารประกอบฟีนอลิกไม่สามารถละลายน้ำได้แต่ในระหว่างการหมักของจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น (Xiao et al., 2015) จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Weissella confusa*, *Enterococcus durans* KH, *L. paraplantarum* KM และ *L. rhamnosus* CRL981 มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารเดดซีน (daidzin) เป็นสารเดดซีอีน (daidzein) (Chun et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus* sp. Niu-O16 ซึ่งแยกได้จากกระเพาะอาหารของสามารถเปลี่ยนสารเดดซีนเป็นไดไฮโดรเดดซีอิน (dihydrodaidzein) (Wang et al., 2005)

นมอัลมอนด์อุดมไปด้วยสารอาหารที่ประกอบไปด้วย ไขมันที่ดี วิตามินอีและสารโพลีฟีนอลและยังพบสารอื่น ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และลิกแนน (lignans) (Bolling, 2017) สารลิกแนนเป็นไฟโตเอสโตรเจนที่สำคัญต่อสุขภาพ พืชที่ประกอบด้วยลิกแนนจะไม่ถูกดูดซึม จึงต้องถูกเปลี่ยนเป็นเอนเทอโรไดออล (enterodiol) และเอนเทอโรแลคโทน (enterolactone) ก่อนถึงจะสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ (Quartieri et al., 2016) การเปลี่ยนแปลงลิกแนนของพืชโดยจุลินทรีย์ในลำไส้จึงมีความสำคัญอย่างมาก (Clavel et al., 2005) กระบวนการ Deglycosylation ของสารซีโคไอโซลาริซิเรซินอลไดไกลโคไซด์ (secoisolariciresinol

diglycoside; SDG) ทำให้เกิดสารซีโคไอโซลาริซิเรซินอล (secoisolariciresinol; SECO) เป็นขั้นตอนแรกทำให้เกิดสารเอนเทอโรลิกแนน (enterolignans) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการช่วยลดอาการของวัยหมดประจำเดือน (Clavel et al., 2007) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้าง SECO จากสารลิกแนน ทำให้สามารถดูดซึมในลำไส้ใหญ่ได้มากขึ้น และพบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Butyribacterium methylotrophicum*, *Eubacterium callanderi*, *Peptostreptococcus* และ *B. adolescentis* INIA P784 มีความสามารถในการผลิตเอนเทอโรลิกแนน (Clavel et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เมื่อหมักอัลมอนด์ด้วย *P. acidilactici* A62 พบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากขึ้น และในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยังมีความคงตัวและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการหมักในนมอัลมอนด์ที่ประกอบด้วยปริมาณเส้นใยอาหารน้อยจากสารประกอบฟีนอลิกไม่สามารถละลายน้ำได้แต่ในระหว่างการหมักของจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเล็กนี้ซึ่งยังไม่มีงานวิจัยใดศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากนมอัลมอนด์หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก และการศึกษานี้ยังนำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus acidilactici* มาหมักในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพื่อส่งเสริมสุขภาพต่อไป

### 5.9 การนำแบคทีเรียโพรไบโอติก *Pediococcus acidilactici* A62 ไปใช้ประโยชน์

*Pediococcus acidilactici* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างกลม (cocci) อยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วง pH อุณหภูมิ และช่วงความดันออสโมซิสกว้าง จึงสามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหาร และมักพบอาหารในหมักดอง แบคทีเรีย *P. acidilactici* สามารถผลิตสารเพดิโอซิน (pediocins) ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Barros et al., 2001) มีการนำ *P. acidilactici* ไปใช้รักษาสุนัขที่ติดแบคทีเรีย parvovirus ซึ่งมีอาการอาเจียนและท้องเสียเป็นเลือด โดยการผสม *P. acidilactici* กับ *Saccharomyces boulardii* พบว่า หลังจากได้รับการรักษาเป็นเวลา 3 วัน สุนัขมีอาการดีขึ้น (Lin and Ishida, 2008) มีการศึกษาพบว่าเมื่อสุนัขที่มีความผิดปกติทางเดินอาหารได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร่วมกับ *P. acidilactici* จะช่วยรักษาสมดุลในลำไส้ของสุนัขได้ (Mizutani et al., 2007) และมีการศึกษาพบว่า *P. acidilactici* Ch-2 มีความสามารถทนต่อสภาวะกรดด่างและเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3 และในสภาวะทางเดินอาหารและลำไส้จำลอง และสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียหรือกรดแลคติกในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด (Gupta and Sharma, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจากอาหารหมักดอง *P. acidilactici* A62 สามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และมีปลอดภัยเบื้องต้นแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และไม่ผลิตเอนไซม์ดีเอ็นเอสได้ ซึ่งมีข้อมูลจากการศึกษาของ Mastro และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 พบว่าผู้ป่วย 9 ราย มีอาการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (*P. acidilactici* bacteremia) สามารถแยกแบคทีเรีย *P. acidilactici* ได้จากเลือด โดยเป็นผู้สูงอายุจำนวน 8 ราย มีอาการแทรกซ้อนของโรคต่าง ๆ และมีทารกแรกเกิด 1 รายที่มีอาการเกี่ยวกับลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่ง *P. acidilactici* ส่วนใหญ่จะดื้อยา vancomycin ทำให้ยากต่อการรักษา

(Mastro et al., 1990) และยังมีการรายงานว่า *P. acidilactici* ทำให้เกิดหลอดลมอักเสบ (pneumonitis) และเกิดภาวะการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia) ในหญิงตั้งครรภ์ 14 สัปดาห์ อายุ 26 ปี (Sarma, 1998) ดังนั้น *P. acidilactici* A62 จึงเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเกี่ยวกับคุณสมบัติด้านความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง และการศึกษาเพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยในมนุษย์ก่อนการนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

# บทที่ 6
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง จำนวน 17 ตัวอย่าง ได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต โดยการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย MRS agar เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมจะติดสีม่วง และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มีลักษณะรูปร่างกลมและรูปร่างแท่ง และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay พบว่ามี 28 ไอโซเลต ที่มีค่าร้อยละ DPPH scavenging activity มากกว่า 50 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 28 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay เพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ด้วยกลไกการต้านออกซิเดชันต่าง ๆ และนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ A25 A27 A28 A29 A40 และ A62 สามารถต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* DMST 562, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 ได้ดี และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลตข้างต้น สามารถทนต่อสภาวะกรดที่ pH 2, pH 3 และ pH 6.5 รวมทั้งสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (w/v) และ 0.30 (w/v) ได้

เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติโดยรวมจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต A62 แสดงคุณสมบัติทั้งด้านฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร และมีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรีย A62 เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัยเพิ่มเติม โดยผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า A62 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด คือ streptomycin, gentamicin, vancomycin, kanamycin norfloxacin, ofloxacin และ ciprofloxacin ซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบริโภคร่วมกับยาปฏิชีวนะและ A62 ยังมีความไวต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดซึ่งอาจนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้ และ A62 ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและไม่ผลิตเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สามารถระบุชนิดแบคทีเรีย A62 ได้ว่าคือแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* โดยมีค่าร้อยละความเหมือน เท่ากับ 100 (100 % identity) เมื่อนำไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

เมื่อนำ *Pediococcus acidilactici* A62 มาเป็นกล้าเชื้อ (starter) ในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก พบว่า A62 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักคือใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 3% (v/v) ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ $4.5 \times 10^6$ CFU/mL การหมักนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนล์ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกคือ A62 พบว่าสามารถเพิ่ม

คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันแก่นมหมักได้ โดยพบว่าเมื่อหมักนมกับแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และเพิ่มปริมาณฟีนอลิกในนมหมักเพิ่มมากขึ้น

จากการประเมินความคงตัวของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีความคงตัวของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อประเมินผลโดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยังคงอยู่และอาจเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 และลดลงในสัปดาห์ที่ 4 นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าปริมาณฟีนอลิกของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักเพิ่มมากขึ้น เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ *P. acidilactici* A62, *P. acidilactici* F3 และ *L. fermentum* M47 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมักได้

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข A62 นอกจากแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีแล้ว ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และสามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นกล้าแบคทีเรียเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกต่อไปในอนาคต

**ข้อเสนอแนะ**

(1.) ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติด้านความปลอดภัยของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Pediococcus acidilactici* A62 เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันความปลอดภัยก่อนนำไปพัฒนาเพื่อเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกต่อไป ดังนี้

(1.1) การศึกษาเกี่ยวกับยีนดื้อยา และการถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาแบคทีเรียดื้อยาตามมา

(1.2) การศึกษาความเป็นพิษของแบคทีเรียต่อเซลล์

(1.3) การศึกษาสารที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ เช่น การผลิตเอนไซม์เจลาติเนส

(1.4) การศึกษาคุณสมบัติด้านความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง ก่อนการนำไปใช้ในมนุษย์

(1.5) ประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์ และการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังออกจำหน่ายในท้องตลาด

(2.) ควรศึกษาสารประกอบที่มีในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์ที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก เพื่อให้ทราบถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับขั้นตอนการพัฒนากระบวนการผลิตรวมทั้งการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพและมีความคงตัวที่ดี เช่น

(2.1) การวิเคราะห์หาสารไอโซฟลาโวนที่ประกอบด้วย เดดซีน (daidzin) จีนีสติน (genistin) เดดซีอีน (daidzein) และจีนีสทีอีน (genistein) และกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก

(2.2) การวิเคราะห์หาสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก วิตามินซี และวิตามินอี

(2.3) การวิเคราะห์สารประกอบทั้งหมดในนมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก

(3.) ควรวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองและนมอัลมอนด์หมัก ให้มีรสชาติ เนื้อสัมผัส ที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค สำหรับการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพและควรศึกษาการยอมรับในผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภคต่อไป

# เอกสารอ้างอิง

# เอกสารอ้างอิง


กระทรวงสาธารณสุข. **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร**. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข, 2554.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. **โพรไบโอติกจุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ**. นนทบุรี: สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2556.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. "อนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination", **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 21(3): 275-286; กรกฎาคม – กันยายน, 2556.

ไมตรี สุทธจิตต์. **ความรู้พื้นฐานของออกซิเดชัน อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**. เชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพ, 2555.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. **ชีววิทยาของเซลล์**. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์, 2547.

Abubakr, M and et al. "Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA)", **African Journal of Microbiology Research**. 6(34): 6358-6364; September, 2012.

Adeniyi, B.A and et al. "Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens", **African Health Sciences**. 15(3): 888-895; September, 2015.

Amara, A.A and et al. "Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management", **Saudi Pharmaceutical Journal**. 23(2): 107-114; April, 2015.

Ames, B.N and et al. "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences (US)**. 90(17): 7915-7922; September, 1993.

Aminigo, E.R and et al. "Biochemical composition and storage of a yoghurt – like product from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*)", **International Journal of Food Science & Technology**. 44: 560–566; March, 2009.

Ammor, S and et al. "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility", **Food Control**. 17(6): 454-461; February, 2006.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)


Anderson, G.H and Moore S.E. "Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans", **The Journal of Nutrition**. 134(4): 974-979; April, 2004.

Angmo, K and et al. "Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh", **LWT - Food Science and Technology**. 66: 428-435; October, 2016.

Balakrishnan, G and Agrawal R. "Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*", **Journal of Food Science and Technology**. 51(12): 4138–4142; December, 2014.

Banerjee, A and et al. "*In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit", **Food Chemistry**. 90(4): 727-733; April, 2005.

Bansal, S and et al. "Non-dairy based probiotics: a healthy treat for intestine", **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 56(11): 1856-1867; March, 2016.

Barros, R.R and et al. "Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources", **Journal of Clinical Microbiology**. 39(4): 1241–1246; April, 2001.

Batdorj, B and et al. "Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag", **Journal of Applied Microbiology**. 101(4): 837-848; August, 2006.

Bernata, N and et al. "Almond milk fermented with different potentially probiotic bacteria improves iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) Cells", **International Journal of Food Studies**. 4(1): 49-61; April, 2015.

————. "Probiotic fermented almond milk as an alternative to cow-milk yoghurt", **International Journal of Food Studies**. 4(2): 201-211; October, 2015.

Bernat, P and et al. "Phospholipids and protein adaptation of *Pseudomonas* sp. to the xenoestrogen tributyltin chloride (TBT)", **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 30(9): 2343–2350; September, 2014.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Benzie, I.F and Strain J.J. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay", **Analytical Biochemistry**. 239(1): 70-76; July, 1996.

Benno, Y and et al. "Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects", **Nutrient Today**. 31(6): 12; November-December, 1996.

Bolca, S and et al. "Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols", **Current Opinion in Biotechnology**. 24(2): 1-6; April, 2012.

Bolling, B.W. "Almond Polyphenols: Methods of Analysis, Contribution to Food Quality, and Health Promotion", **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 16(3): 346-368; March, 2017.

Bujnakova, D and et al. *"In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of Lactobacilli isolated from chicken and calves", **Anaerobe**. 29: 118–127; October, 2014.

Carlsen, M.H and et al. "The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide", **Nutrient Journal**. 9(1): 3; January, 2010.

Charteris, W.P and et al. "Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species", **Journal of food protection.** 61(12): 1636-1643; December, 1998.

Cheeseman, K.H and Slater T.F. "An introduction to free radical biochemistry", **British Medical Bulletin**. 49(3): 481-493; July, 1993.

Chun, J and et al. "Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria", **Journal of Food Science.** 72(2): 39–44; March, 2007.

Clavel, T and et al. "Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans", **Applied and Environmental Microbiology**. 71(10): 6077-6085; October, 2005.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Cremonini, F and et al. "Effect of different probiotic preparations on anti-*helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study", **The American Journal of Gastroenterology**. 97(11): 2744-2749; November, 2002.

Crook, E.D and Penumalee S. "Therapeutic controversies in hypertension management: angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy? ACE inhibitors", **Ethnicity and Disease.** 14(2): 1-4; September, 2002.

Codex. (2003). "Codex Standard 243-2003: Codex standard for fermented milks", **Codex standard for fermented milks-FAO.** http://www.fao.org/input/download/standards.htm. July 11, 2018.

Coico, R. "Gram staining", **Current Protocols in Microbiology.** 3: 10; October, 2005.

de Vrese, M and et al. "Probiotics-compensation for lactase insufficiency", **The American Journal of Clinical Nutrition**. 73(2): 421-429; February, 2001.

Dia, V.P and et al. "Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57(4): 1260-1266; February, 2009.

Djadounil, F and Kihal M. "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods", **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 55(3): 435-443; May-June, 2012.

Duh, P.D and et al. "Antioxidant Activity of Water Extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)", **LWT-Food Science and Technology**. 32(5): 269-277; August, 1999.

Dunne, C and et al. " *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings", **The American Journal of Clinical Nutrition**. 73(2): 386-392; February, 2001.

Egusa, S and Otani H. "Characterization of a cellular immunostimulating peptide from a soybean protein fraction digested with peptidase R", **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. 55(5): 428-433; November, 2009.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ezendam, J and van Loveren H. “Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy”, **Nutrition Reviews**. 64(1): 1-14; January, 2006.

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 2002: April 30 and May 1”, **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. http://www.who.int/foodsafety/fs management/en/probiotic guidelines.htm. July 12, 2018.

Farnworth, E.R and et al. “Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation”, **International Journal of Food Microbiology**. 116(1): 174-181; May, 2007.

Fukushima, D. “Recent progress in research and technology on soybeans”, **Food Science and Technology Research**. 7(1): 8-16; 2001.

Gaetani, G.F and et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes”, **Blood.** 87(4): 1595-1599; February, 1996.

Gaya, P and et al. “*Bifidobacterium adolescentis* INIA P784: The first probiotic bacterium capable of producing enterodiol from lignan extracts”, **Journal of Functional Foods**. 29: 269-274; February, 2017.

Gilliland, S.E and et al. “Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct”, **Journal of Dairy Science**. 67(12): 3045-3051; September, 1984.

_____. “Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*”, **Applied and Environmental Microbiology**. 49(2): 377-381; February, 1985.

Goldin B.R and et al. “Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract”, **Digestive Diseases and Sciences**. 37(1): 121-128; January, 1992.

Grompone, G and et al. “Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*”, **PLoS One**. 7(12): 52493; December, 2012.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Guandalini, S and et al. “*Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial”, **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. 30(1): 54-60; January, 2000.

_____. “Probiotics for prevention and treatment of diarrhea”, **Journal of Clinical Gastroenterology**. 49(1): 149-153; November-December, 2015.

Gupta, A and Sharma N. “Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria-*Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli- A traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties”, **Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene**. 2(1): 1-11; March, 2017.

Halliwell, B. “Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)”, **Free Radical Research.** 31(4): 261-272; October, 1999.

Hakkak, R and et al. “Soy protein isolate consumption protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats”, **Cancer Letters**. 166(1): 27-32; May, 2001.

Han, K.J and et al. “Anticancer and anti-inflammatory activity of probiotic *Lactococcus lactis* NK34”, **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 25(10): 1697-1701; October, 2015.

Harris, D.M and et al. “Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells”, **Experimental Biology and Medicine**. 230(8): 558-568; September, 2005.

Hassanzadazar, H and et al. “Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese”, **Veterinary Research Forum**. 3(3): 181-5; June, 2012.

Havenaar, R et al. **Probiotics: A General View**. USA: Springer Boston MA, 1992.

Hernandez-Ledesma, B and et al. “Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: influence of the inhibition type”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51(15): 4175-4179; July, 2003.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ibrahim, A and et al. “Pre-Identification of lactic acid bacteria Isolated during fermentation process of Egyptian Kishk”, **Alexandria Science Exchange Journal.** 36(2): 100-121; February, 2015.

Ibrahim, N.A and et al. “Effect of lactic fermentation on the antioxidant capacity of Malaysian herbal teas”, **International Food Research Journal.** 21(4): 1483-1488; February, 2014.

Inoue, K and et al. “Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein”, **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 108(2): 111-115; August, 2009.

Isolauri, E and et al. “Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation”, **Gut.** 50(3): 354-359; May, 2002.

Janda, J.M and Abbott S.T. “16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls”, **Journal of Clinical Microbiology**. 45(9): 2761-2764; September, 2007.

Javanmardi, J and et al. “Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions”, **Food Chemistry**. 83(4): 547-550; September, 2003.

Ji, K and et al. “Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces”, **Journal of Microbiology and Biotechnology.** 25(9): 1568-1567; September, 2015.

Johnston, C.I. “Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control”, **Journal of hypertension**. 10(7): 13-26, 1992.

Jorgensen J.H and et al. “Methods for antimicrobial dilution and susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition M45-A2”, **Clinical and Laboratory.** 30(18): 1-77, 2011.

Kaban, G and Kaya M. “Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk)”, **Journal of Food Science**. 73(8): 385-388; October, 2008.

Kachouri, F and et al. “Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds”, **Journal of Food Science and Technology**. 52(12): 7924-7933; December, 2015.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Kalliomaki, M and et al. “Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial”, **Lancet**. 357(9262): 1076-1079; April, 2001.

Kikuchi-Hayakawa, H and et al. “Lower plasma triglyceride level in Syrian hamsters fed on skim milk fermented with *Lactobacillus casei* strain Shirota”, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.** 64(3): 466-475; January, 2000.

Kilara, A and Shahani K.M. β-Galactosidase activity of cultured and acidified dairy products. **Journal of Dairy Science**. 57: 592; December, 1974.

————. “Lactic fermentations of dairy foods and their biological significance”, **Journal of Dairy Science.** 61(12): 1793-1800; December, 1978.

Kim, H.S and et al. “Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces”, **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 19(9): 1335-1341; August, 2006.

Kirjavainen, P.V and et al. “New aspects of probiotics-a novel approach in the management of food allergy”, **Allergy.** 54(9): 909-915; September, 1999.

Kobayashi, H and et al. “A soybean kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation”, **Clinical and Experimental Metastasis**. 21(2): 159-166; 2004.

Kopermsub, P and Yunchalard S. “Identification of lactic acid bacteria associated with the production of pla-som, a traditional fermented fish product of Thailand”, **International Journal of Food Microbiology**. 138(3): 200-204; April, 2010.

Ladizinsky, G. “On the origin of almond”, **Genetic Resources and Crop Evolution**. 46(2): 143-147; April, 1999.

La Fata, G and et al. “Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in alzheimer’s disease”, **Nutrients**. 6(12): 5453-5472; December, 2014.

Landete, J.M and et al. “Bioactivation of phytoestrogens: intestinal bacteria and health”, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 56(11): 1826-1843; August, 2016.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Lee, J et al. "Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal Ion chelating effect", **Journal of Food Science.** 70(8): 388-391; May, 2006.

Lee, V.S and et al. "Structural determination and DPPH radical-scavenging activity of two acylated flavonoid tetraglycosides in oolong tea (*Camellia sinensis*)", **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 56(6): 851-853; June, 2008.

Lilly, D.M and Stillwell R.H. "Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms", **Science.** 147(3659): 747-748; February, 1965.

Lin, J.J and Ishida T. "In collaboration with a well-respected Japanese veterinarian scientist, Dr.shida, we found *Pediococcus acidilactici* & *Saccharomyces boulardii* based Imagilin pet probiotics are active in the presence of commonly used antibiotics", **Companion Animal Practice**. 231: 74-75; 2008.

Lin, M.Y and Chang F.J. "Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356", **Digestive Diseases and Sciences**. 45(8): 1617-1622; August, 2000.

Lobo, V and et al. "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", **Pharmacognosy Reviews**. 4(8): 118-126; July-December, 2010.

Ma, E.L and et al. "The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition**",** **International Journal of Cancer**. 127(4): 780-790; August 2010.

Marazza, J.A and et al. "Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*", **Journal of Functional Foods**. 4(3): 594-601; July, 2012.

Mastro, T.D and et al. "Vancomycin-Resistant *Pediococcus acidilactici*: Nine Cases of Bacteremia", **The Journal of Infectious Diseases.** 161(5): 956-960; May, 1990.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mazmanian, S.K and et al. “An Immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system”, **Cell**. 122(1): 107-118; July, 2005.

McFarland, L.V. “Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea”, **Travel Medicine and Infectious Disease**. 5(2): 97-105; March, 2007.

Mikelsaar, M and Zilmer M. “*Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic”, **Microbial Ecology in Health and Disease**. 21(1): 1-27; April, 2009.

Mishra, V and et al. “Probiotics as potential antioxidants: a systematic review”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63(14): 3615-3626; March, 2015.

Mizutani, W and et al. “*Pediococcus*-an unique probiotics we use as a novel GI supplement”, **Annual Meeting of JBVP**. 3: 269-272, 2007.

Muniandy, P and et al. “Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage”, **Food Packaging and Shelf Life**. 8: 1-8; June, 2016.

Naik, G.H and et al. “Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine”, **Phytochemistry**. 63(1): 97-104; May, 2003.

Newell, C.A and Hymowitz T. “Hybridization in the genus glycine subgenus glycine Willd (Leguminosae, Papilionoideae)”, **American Journal of Botany**. 70(3): 334-348; March, 1983.

Noraphat, H and et al. “Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains”, **Food Control**. 22(3-4): 401-407; March, 2011.

Oberhelman, R.A and et al. “A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children”, **The Journal of Pediatrics**. 134(1): 15-20; January, 1999.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Opara, C and et al. “Production of soy-yoghurt by fermentation of soymilk with *Lactobacillus* isolated from Nunu”, **International Dairy Journal**. 21(12): 568-574, 2013.

Ortu, S and et al. “Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk”, **International Dairy Journal**. 17(11): 1312-1320; November, 2007.

Othman, A and et al. “Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans”, **Food Chemistry**. 100(4): 1523-1530; January, 2007.

Ouwehand, A.C and et al. “Probiotics: mechanisms and established effects”, **International Dairy Journal**. 9(1): 43-52; January, 1999.

O’Connor, E.B and et al. “pEOC01: A plasmid from *Pediococcus acidilactici* which encodes an identical streptomycin resistance (*aadE*) gene to that found in *Campylobacter jejuni*”, **Plasmid**. 58(2): 115-126; September, 2007.

Payne, A.C and et al. “Antioxidant assays-consistent findings from FRAP and ORAC reveal a negative impact of organic cultivation on antioxidant potential in spinach but not watercress or rocket leaves”, **Food Science & Nutrition**. 1(6): 439-444; October, 2013.

Phalakornkule, C and Tanasupawat S. “Characterization of lactic acid bacteria from traditional thai fermented sausages”, **Journal of Culture Collections**. 5: 46-57; January, 2007.

Piatek, J and et al. “The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination-*in vitro* study”, **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. 19(1): 99-102; March, 2012.

Pieniza, S and et al. “Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolated from meat and dairy products”, **Brazilian Journal of Biology**. 75(4): 923-931; November, 2015.

Plein, E.M and Plein J.B. “A cylinder-plate method for the quantitative determination of diffusion of antibacterial drugs from ointments”, **Journal of the American Pharmacists Association**. 46(12): 716-720; December, 1957.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Prabhurajeshwar, C and Chandrakanth R.K. "Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances", **Biomedical Journal**. 40(5): 270-283; October, 2017.

Quartieri, A and et al. "Detection of novel metabolites of flaxseed lignans *in vitro* and *in vivo*", **Molecular Nutrition and Food Research**. 60(7): 1590–1601; July, 2016.

Ramakrishnan, P et al. "Cytotoxic responses to 405 nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species", **Toxicology *in Vitro***. 33: 54-62; June, 2016.

Re, R and et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", **Free Radical Biology and Medicine**. 26(9-10): 1231-1237; May, 1999.

Revanasiddappa, C.P and Chandrakanth K. "Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances", **Biomedical Journal**. 40(5): 270-283; October, 2017.

Rienzo, T.D and et al. "Lactose intolerance: from diagnosis to correct management", **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. 17(2): 18-25; 2013.

Ruiz, L and et al. "Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*", **Frontiers in Microbiology**. 4: 396; December, 2013.

Salminen, S and et al. "Probiotics: how should they be defined?", **Trends in Food Science & Technology**. 10(3): 107-110; March, 1999.

Salvetti, E and et al. "The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update", **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 4(4): 217-226; December, 2012.

Sarma, P.S. "*Pediococcus acidilactici* pneumonitis and bacteremia in a pregnant woman", **Journal of Clinical Microbiology**. 36(8): 2392-2393; August, 1998.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Selvamuthukumaran, M and Farhath K. "Evaluation of shelf stability of antioxidant rich seabuckthorn fruit yoghurt", **International Food Research Journal**. 21(2): 759-765; December, 2014.

Sharma, D and et al. "Anti-aging effects of probiotics", **Journal of Drugs in Dermatology**. 15(1): 9-12; January, 2016.

Shimada, K and et al. "Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 40(6): 945-948; June, 1992.

Sindhu, S.C and Khetarpaul N. "Fermentation with one step single and sequential cultures of yeast and lactobacilli: Effect on antinutrients and digestibilities (*in vitro*) of starch and protein in an indigenously developed food mixture", **Plants Foods for Human Nutrition**. 58(3): 1-10; September, 2003.

Sonomoto, K and Yokota A. **Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria**. Japan: Caister Academic Press, 2011.

Soomro, A.H and et al. "Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review", **Pakistan Journal of Nutrition**. 1(1): 20-24; January, 2002.

Stiles, M. "The genera of lactic acid bacteria", **International Dairy Journal**. 6(5): 537-538; 1996.

Subrota, H and et al. "Antioxidative activity and polyphenol content in fermented soy milk supplemented with WPC-70 by probiotic Lactobacilli", **International Food Research Journal**. 20(5): 2125-2131; January, 2013.

Sun, J and et al. "Inhibition of Fe-induced colon oxidative stress by lactobacilli in mice", **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 29(2): 209-216; February, 2013.

Šušković, J and et al. "The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92", **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 16(7): 673-678; August, 2000.

Tamang, J.P and et al. "Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages", **Frontiers in Microbiology**. 7: 377; March, 2016.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

_____. "Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods", **Frontiers in Microbiology**. 7: 578; April, 2016.

Temmerman, R and et al. "Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products", **International Journal of Food Microbiology**. 81(1): 1-10; February, 2003.

Tillisch, K and et al. "Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity", **Gastroenterology**. 144(7): 1394-1401; June, 2013.

Uchiyama, S and et al. "Identification of a newly isolated equol-producing lactic acid bacterium from the human feces", **Journal of Intestinal Microbiology**. 21: 217–220; August, 2007.

Vankerckhoven, V and et al. "Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: Recommendations from the EU-PROSAFE project", **Trends in Food Science and Technology**. 19(2): 102-114; February, 2008.

Vesper, S.J and Vesper M.J. "Possible role of fungal hemolysins in sick building syndrome", **Advances in Applied Microbiology**. 55: 191-213; February, 2004.

Vuyst, L.D and et al. "Probiotics in fermented sausages", **Meat Science**. 80(1): 75-78; September, 2008.

Wang, X.L and et al. "Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium", **Applied and Environmental Microbiology**. 71(1): 214-219; January, 2005.

Wang, Y and et al. "Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects", **Atherosclerosis**. 173(2): 269-275; April, 2004.

Whittenbury, R. "Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria", **Journal of general microbiology**. 35(1): 13-26; April, 1964.

Wilton, L.V and et al. "A comparison of ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, azithromycin and cefixime examined by observational cohort studies", **British Journal of Clinical Pharmacology**. 41(4): 277-284; April, 1996.

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Xiao, R and et al. “Dietary exposure to soy or whey proteins alters colonic global gene expression profiles during rat colon tumorigenesis”, **Molecular Cancer**. 4(1): 12-19; January, 2005.

Xing, J and et al. “Determining antioxidant activities of Lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: a comparison with traditional methods”, **PLoS One**. 10(1371): 1-16; March, 2015.

Xiao, Y and et al. “Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6”, **Journal of Functional Foods**. 12: 33-44; January, 2015.

Yada, S and et al. “A review of composition studies of cultivated almonds: macronutrients and micronutrients”, **Journal of Food Composition and Analysis**. 24(4-5): 469-480; June-August, 2011.

Yadav, R and et al. “Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi”, **Frontiers in Microbiology**. 7: 1683; October, 2016.

Yang, E and et al. “Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts”, **AMB Express**. 2(1): 48; September, 2012.

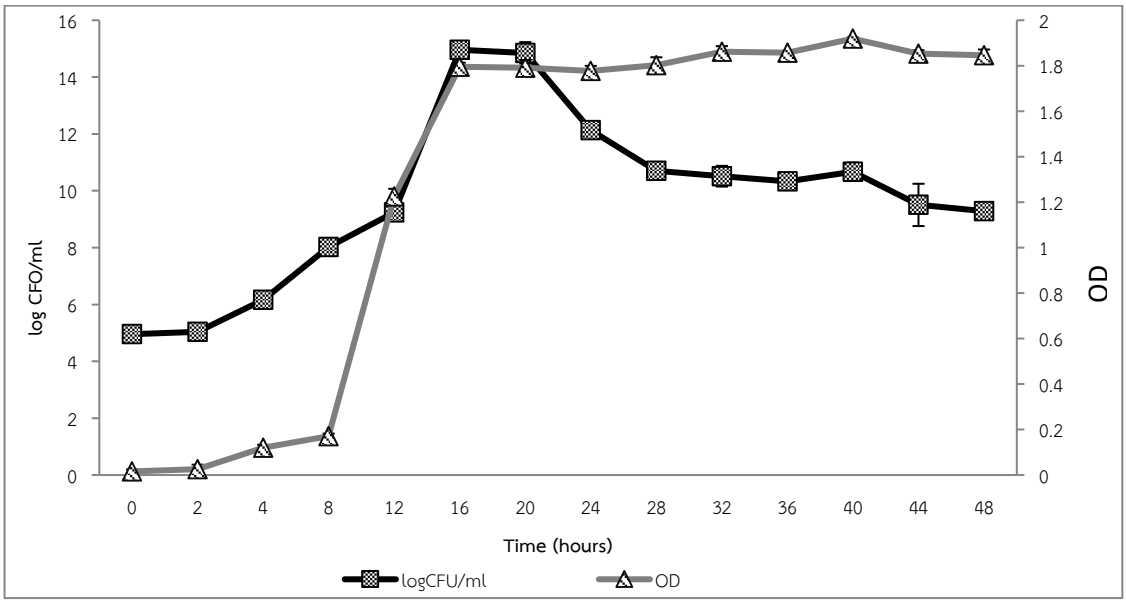
Yang, M and et al. “Study of the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional fermented pickles”, **Journal of Food Processing and Preservation**. 41(3): 12954; June, 2017.

Yelnetty, A and et al. “Biochemical characteristics of lactic acid bacteria with proteolytic activity and capability as starter culture isolated from spontaneous fermented local goat milk”, **Journal of Natural Sciences Research**. 4(10): 137-146; August, 2014.

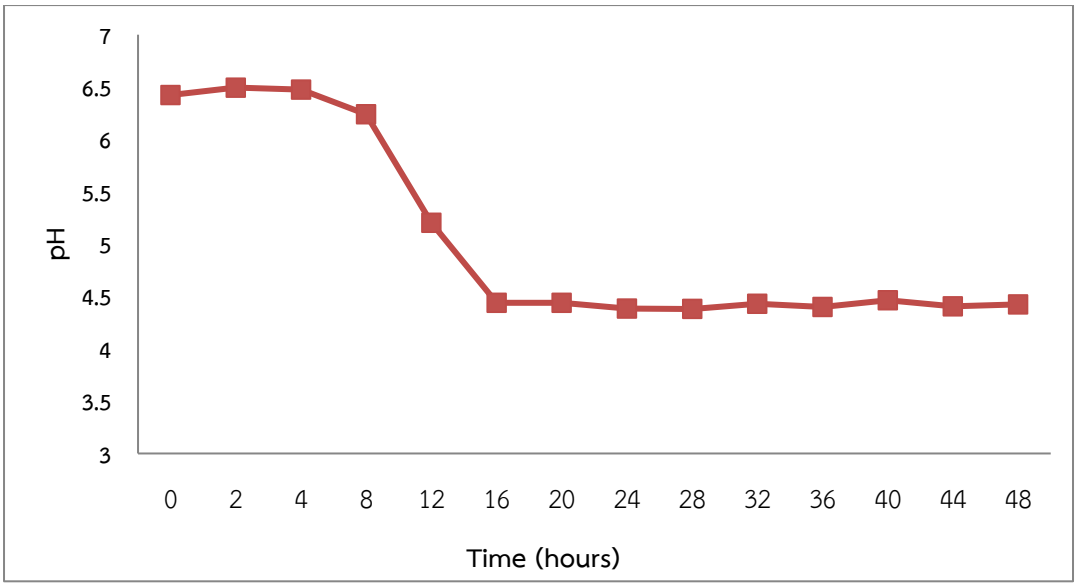
Zhang, S.T and et al. “Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation”, **Food Control**. 41: 1-6; July, 2014.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก
# กราฟการเจริญ (Growth curve)
# ของแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62




ภาพที่ ก.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และจำนวนของแบคทีเรีย *P.acidilactici* A62 (CFU/ml) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง




ภาพที่ ก.2 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ pH ของแบคทีเรีย *P. acidilactici* A62 ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

# ภาคผนวก ข
# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

**สูตรอาหารและวิธีการเตรียม**

**1. การเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS) broth** ประกอบด้วย (กรัม/ลิตร)

| | | |
|---|---|---|
| Dextrose | 20 | กรัม |
| Meat peptone | 10 | กรัม |
| Beef extract | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium acetate | 5 | กรัม |
| Disodium Phosphate | 2 | กรัม |
| Ammonium Citrate | 2 | กรัม |
| Tween 80 | 1 | กรัม |
| Magnesium Sulfate | 0.1 | กรัม |
| Manganese Sulfate | 0.05 | กรัม |

วิธีเตรียม

ชั่ง MRS broth หนัก 55.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**2. การเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar**

| | | |
|---|---|---|
| Dextrose | 20 | กรัม |
| Agar | 12 | กรัม |
| Proteose peptone | 10 | กรัม |
| Beef extract | 10 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| Sodium acetate | 5 | กรัม |
| Disodium Phosphate | 2 | กรัม |
| Ammonium Citrate | 2 | กรัม |
| Tween 80 | 1 | กรัม |
| Magnesium Sulfate | 0.1 | กรัม |
| Manganese Sulfate | 0.05 | กรัม |

วิธีเตรียม

ชั่ง MRS agar หนัก 67.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงจานเพาะเชื้อ โดยแต่ละจานเพาะเชื้อให้มีปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร และรอให้แห้ง

# ภาคผนวก ค
# การเตรียมสารเคมี

**1. การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer pH 7.4**

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 2.884 | กรัม |
| $NaH_2PO_4$ | 0.524 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 200 | มิลลิลิตร |
| 1 M NaOH | | |

วิธีเตรียม

ชั่ง $Na_2HPO_4$ หนัก 2.884 กรัม และ $NaH_2PO_4$ หนัก 0.524 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร และปรับ pH ด้วย 1 M NaOH จนได้ pH เท่ากับ 7.4 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**2. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% (w/v)**

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 0.9 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

วิธีเตรียม

ชั่ง NaCl หนัก 0.9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**3. การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM**

| | | |
|---|---|---|
| 2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH) | 3.9433 | มิลลิกรัม |
| Methanol | 50 | มิลลิลิตร |

วิธีเตรียม

ชั่ง DPPH หนัก 3.9433 กรัม ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**4. การเตรียมสารละลาย $ABTS^+$**

| | | |
|---|---|---|
| 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) | 3.84 | กรัม |
| $K_2S_2O_8$ | 0.00662 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 50 | มิลลิลิตร |

วิธีเตรียม

ชั่ง ABTS หนัก 3.84 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mmol/L และชั่ง $K_2S_2O_8$ หนัก 0.00662 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 2.45 mmol/L จากนั้นนำสารละลาย ABTS และสารละลาย $K_2S_2O_8$ มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย $ABTS^+$ นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

**5. การเตรียมสารละลาย FRAP reagent**

5.1 การเตรียมสารละลาย Acetate buffer pH 3.6 ความเข้มข้น 300 mM

| | | |
|---|---|---|
| Glacial Acetic acid | 17 | มิลลิลิตร |
| Sodium acetate | 3.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

วิธีเตรียม ชั่ง sodium acetate หนัก 3.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และเติม glacial acetic acid ปริมาตร 17 มิลลิลิตร และวัด pH ด้วยเครื่อง pH meter

5.2 การเตรียมสารละลาย 2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 mM

| | | |
|---|---|---|
| TPTZ | 0.0156 | กรัม |
| HCl | 5 | มิลลิลิตร |

วิธีเตรียม ชั่ง TPTZ หนัก 0.0156 กรัม ผสมกับ HCl ความเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5.3 การเตรียมสารละลาย $FeCl_3$ ความเข้มข้น 20 mM

| | | |
|---|---|---|
| $FeCl_3$ | 5.4 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

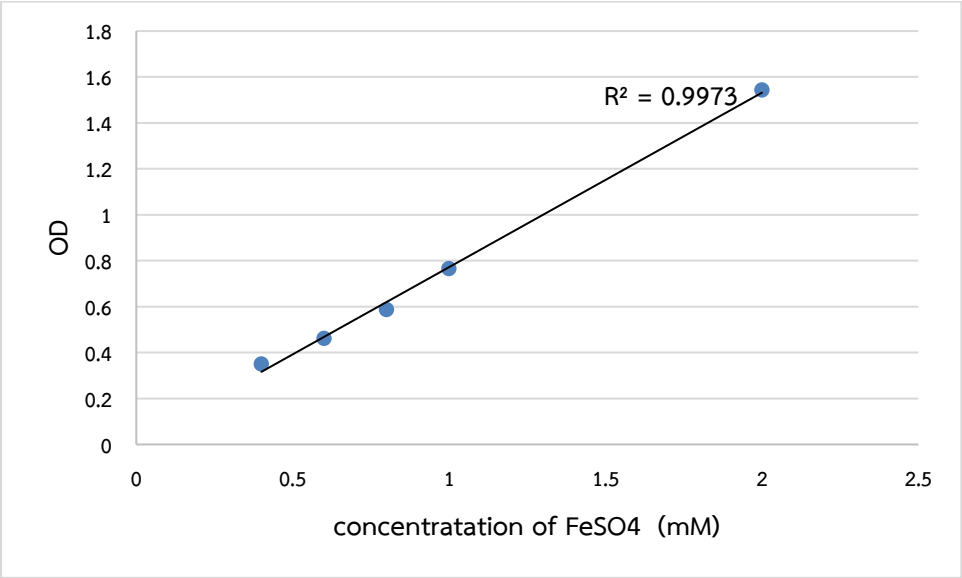
วิธีเตรียม ชั่ง Ferric chloride หนัก 5.4 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

5.4 การเตรียมสารละลาย FRAP reagent

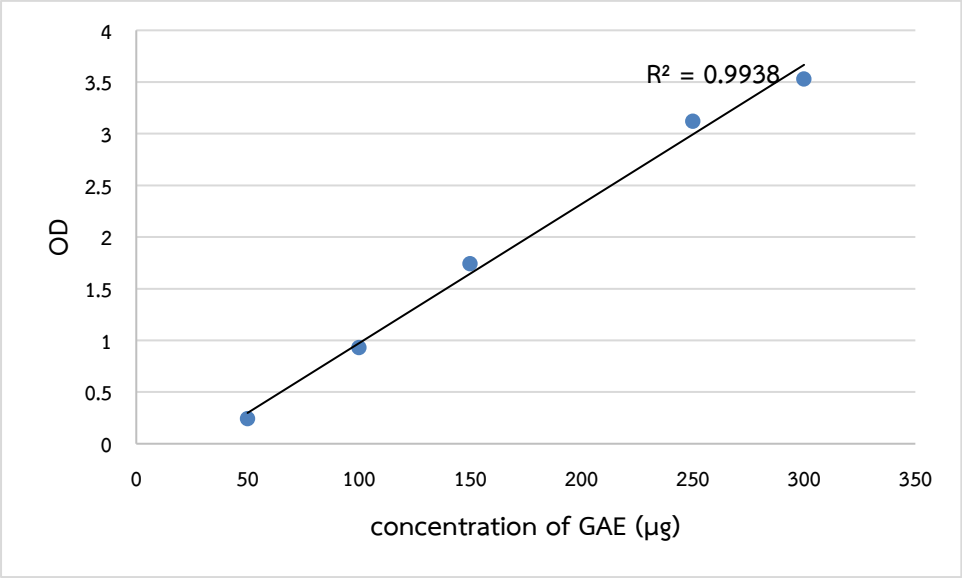
| | | |
|---|---|---|
| สารละลาย Acetate buffer pH 3.6 ความเข้มข้น 300 mM | 50 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 mM | 5 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย $FeCl_3$ ความเข้มข้น 20 mM | 5 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 5 | มิลลิลิตร |

วิธีเตรียม ผสมสารละลาย Acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย $FeCl_3$ ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร

# ภาคผนวก ง
# กราฟมาตรฐาน




ภาพที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของเฟอรัสซัลเฟต




ภาพที่ ง.2 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

# ภาคผนวก จ
# การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยโอซาก้า หรือ (MU-OU: CRC)

### *16S rRNA* Gene Sequencing for Bacterial Identification

1. **DNA Extraction**
2. **PCR Amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมาย**

- 1X PCR Buffer pH 8.8 (10 mMKCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_2$, 0.1% Triton X-100)
- 2.0 mM $MgCl_2$ (เนื่องจาก Buffer ของBioLab มี $MgSo_2$ อยู่แล้วจึงไม่ได้ใช้ จะใช้เพิ่มในกรณีที่ Buffer ของบางบริษัทไม่ได้ใส่ $Mg^{2+}$ มาให้)
- DNA Template (ที่เตรียมจากวิธีการต้มเซลล์) 2-5 ไมโครลิตร
- 0.4 µM dNTP
- 0.4 µM ของ Primer แต่ละข้าง UFUL (forward) : 5'-gCC TAA CAC ATg CAA gTC gA-3'
  802R (reverse) : 5'-TAC Cag ggT ATC TAA TCC-3'
- 1 U Taq DNA Polymerase (BioLab)
- Deionized water ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร

**PCR Cycle for *16S rRNA* Gene**

| | | | |
|---|---|---|---|
| 94°C | 5 | นาที | |
| 94°C | 30 | วินาที | 30 รอบ |
| 55°C | 30 | วินาที | |
| 72°C | 30 | วินาที | |
| 72°C | 5 | นาที | |

3. **DNA Sequencing PCR Reaction เพื่ออ่านลำดับเบสของ DNA เป้าหมาย (*16S rDNA*)**

| สารเคมี | ปริมาณ |
|---|---|
| BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit | 8.0 ไมโครลิตร |
| DNA Template | ดูตามตารางที่ 1 |
| Primer | 3.2 pmol |
| Deionized water | ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร |
| Total volume | 20 ไมโครลิตร |

BigDye นั้นเป็นชื่อทางการค้าของ Master Mix สำหรับทำ DNA Sequencing ซึ่งทางบริษัทไม่บอกส่วนประกอบเอาไว้เพราะเป็นความลับทางการค้า ในการลง report โดยทั่วไปเพียงระบุว่าเป็น BigDye v3.1 ก็เป็นที่เข้าใจกันแล้วครับ สำหรับส่วนประกอบของ BigDye คาดว่าน่าจะเหมือนกับ Master Mix ของ PCR ทั่วๆ ไป คือประกอบด้วย PCR buffer, dNTP, Taq DNA polymerase และมีสิ่งที่เพิ่มขึ้นมาคือ Labeled ddNTP ซึ่งก็คือ ddNTP ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 สีตามชนิดของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ตัว โดยจะใส่เป็นปริมาณเท่ากับ dNTP นอกจากนี้แล้วอาจมีส่วนประกอบพิเศษอื่นๆ ที่เป็นความลับของบริษัทผสมอยู่ด้วย

**ตารางที่ 1**

| ขนาดของ PCR Product | ปริมาณ |
|---|---|
| 100-200 bp | 1-3 ng |
| 200-500 bp | 3-10 ng |
| 500-1,000 bp | 5-20 ng |
| 1,000-2,000 bp | 10-40 ng |
| > 2000 bp | 20-50 ng |

DNA Sequencing PCR cycle :

| | | | |
|---|---|---|---|
| 95°C | 5 | นาที | |
| 95°C | 30 | วินาที | 30 รอบ |
| 50°C | 10 | วินาที | |
| 60°C | 4 | นาที | |
| 60°C | 4 | นาที | |

**Purify Sequencing PCR product ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส**

| สาร | 1x |
|---|---|
| $H_2O$ (3A) | 14.5 µl |
| Absolute Ethanol | 62.5 µl |
| 3M sodium acetate pH 4.6 | 3.0 µl |

**ก่อนนำ Sample มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Sequencing**

- ละลายตะกอน DNA ด้วย Hi-Di Formamide 10-15 µl

**การนำ DNA sequence ไปเทียบกับฐานข้อมูลในอินเทอร์เนต**

- เข้าไปที่เวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากนั้นเลือกที่ BLAST แล้วเลือก Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) จะขึ้นหน้าต่างใหม่ให้เราใส่ข้อมูลลำดับเบสลงไป

ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียหมายเลย A62 กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

A62

Program
BLASTN 2.8.0+ Citation
Description
Nucleotide collection (nt) See details
Query Length 500
Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pediococcus acidilactici strain A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF093223.1 |
| Pediococcus acidilactici strain A4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF093222.1 |
| Pediococcus acidilactici strain A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF093220.1 |
| Pediococcus acidilactici strain MYZI-J4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG966143.1 |
| Pediococcus acidilactici strain NG64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG928526.1 |
| Pediococcus acidilactici strain RSP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG911001.1 |
| Pediococcus acidilactici strain Pe4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG825733.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784194.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL7-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784193.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL4-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784189.1 |

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pediococcus acidilactici strain BL8-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784163.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL8-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784160.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL14-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784132.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL13-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784120.1 |
| Pediococcus acidilactici strain BL10-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF784093.1 |
| Pediococcus acidilactici strain Unknown16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG751355.1 |
| Pediococcus acidilactici strain Unknown3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG751343.1 |
| Pediococcus acidilactici strain 3W25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MF033475.1 |
| Pediococcus acidilactici strain YNAU00001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | KY576543.1 |
| Pediococcus sp. strain L2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | MG591705.1 |
| Pediococcus acidilactici gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: ML96 | 924 | 924 | 100% | 0.0 | 100% | LC274608.1 |

Pediococcus acidilactici strain A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MF093223.1Length: 1294Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 112 to 611GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match

Alignment statistics for match #1

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | Frame |
|---|---|---|---|---|---|
| 924 bits(500) | 0.0() | 500/500(100%) | 0/500(0%) | Plus/Minus | |

Features:

```
Query  1    ATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  611  ATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGT  552

Query  61   CTCCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  551  CTCCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAG  492

Query  121  ACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491  ACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC  432

Query  181  CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCACTGGGTGAAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  431  CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCACTGGGTGAAC  372

Query  241  AGTTACTCTCACCCACGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  371  AGTTACTCTCACCCACGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTC  312

Query  301  ACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  311  ACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC  252

Query  361  TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  251  TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGG  192

Query  421  CTACGCATCATCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  191  CTACGCATCATCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCC  132

Query  481  ATCCAGAAGTGATAGCAGAG  500
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  131  ATCCAGAAGTGATAGCAGAG  112
```

# ภาคผนวก ฉ
# การขออนุญาตดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

งานวิจัยได้รับการอนุญาตให้ดำเนินการวิจัยทางด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

# บันทึกข้อความ

**ส่วนราชการ** สำนักงานส่งเสริมบริหารงานวิจัยฯ สำนักงานอธิการบดี โทร. ๓๐๔๒

**ที่** ศธ ๐๕๒๙.๑.๔/ ๔๐๓ **วันที่** ๘ ม.ค. ๒๕๖๑

**เรื่อง** ผลการพิจารณารับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (IBC-T ๑/๒๕๖๑)

เรียน คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ตามที่ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาในคณะฯของท่าน คือ **นางสาวสุภัสสร วันสุทะ** ได้ยื่นข้อเสนอโครงการ เรื่อง "การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอาหารหมักดอง" เพื่อขอรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพนั้น คณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ ได้พิจารณาข้อเสนอโครงการวิจัยดังกล่าวตามกระบวนการแล้ว พิจารณาเห็นว่า ข้อเสนอโครงการดังกล่าวจัดอยู่ในโครงการวิจัยตาม พ.ร.บ.เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ โดยต้องทำการแจ้งต่อคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพเพื่อทราบ

ในการนี้ คณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ ได้รับทราบและขอให้ผู้วิจัยปฏิบัติตามหลักความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการตาม พ.ร.บ.เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๕๘ เพื่อความปลอดภัยในการดำเนินการวิจัยทางชีวภาพ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบและแจ้งผู้เกี่ยวข้อง

(รองศาสตราจารย์ชวลิต ถิ่นวงศ์พิทักษ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและพันธกิจสังคม ปฏิบัติราชการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ผศ.ดร.ชุติมันท์ ประสิทธิภูริปริชา)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

# ภาคผนวก ช
# การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการ

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการ

TJPS Vol.42 (Supplement Issue) 2018

**Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)**
34th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences and
2nd CU FPhS - RIKEN CDB Symposium
(IAMPS34 and 2nd CU FPhS - RIKEN CDB)

## Antioxidant Activities of Almond Milk Fermented with Lactic Acid Bacteria

**Supasson Wansutha[1], Laddawan Yuenyaow[1], Kaemwich Jantama[2], Sirima Suvarnakuta Jantama[1,*]**

[1] *Division of Biopharmacy, Faculty of Pharmaceutical sciences, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani, and*
[2] *Institute of agricultural technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.*

* Corresponding author: Tel. +66(0)817605892; Fax. +66(45)353626; E-mail address: sirima.s@ubu.ac.th

**Keywords:** Antioxidant, Lactic acid bacteria, Probiotics, Almond Milk

### Introduction

Probiotics are live microbial feed supplements which beneficially affect the animal host by improving its intestinal microbial balance.[1] Some of their benefits include promoting intestinal health, improving the immune system, and preventing chronic diseases.[2] Lactic acid bacteria (LAB) are the most common probiotics that have beneficial effects on the human gastrointestinal tract.[3] They are a group of Gram-positive, non-sporulating, anaerobic or facultative aerobic cocci or rods, which produce lactic acid as one of the main fermentation products of the metabolism of carbohydrates.[4] Free radicals and other reactive oxygen species (ROS) are derived either from normal essential metabolic processes in the human body or from external sources such as exposure to X-rays, ozone, cigarette smoking, air pollutants, and industrial chemicals. The free radicals may cause oxidative damages by oxidizing biomolecules and result in cell death and tissue damage. They are important role in many lifestyle-related diseases such as neurodegenerative, coronary heart, arthritis and cancer.[5,6] Probiotics have been known for many beneficial health effects, and the consumption of probiotics alone or in food. It shows that strain-specific probiotics can present antioxidant activity and reduce damages caused by oxidation.[7] Almond milk has long been used as an alternative to cow-milk for lacto-intolerant people, pregnant women and celiac mainly due to their high levels of calcium, phosphorous and potassium.[9] Almond has high antioxidant activity owing to the α-tocopherol and polyphenolic constituents.[10] Fermented almond milk was developed, using different potentially probiotic bacteria, in order to meet the current demand for healthy, versatile non-dairy products.[8] Therefore, it could be used as a base product to develop new non-dairy fermented products with functional features, in which the nutritional and health benefits of almonds and probiotic bacteria are included.

The aim of this study was to evaluate whether almond milk fermented with different potential probiotic bacteria, affected the antioxidant activity by 2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH) assay, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assay, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay and total phenolic content. Also, the evaluation of all viability and pH change of LAB were studied.

### Methods

***Inoculum preparation and fermentation of almond milk***

Three isolates of LAB (F3, M47, A62) were inoculated separately in 10 ml de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth and incubated at 37 °C for 24 hours. The cultures were then transferred into 10 ml MRS broth and incubated under the same conditions. The cells were harvested by centrifuging at 3,500 rpm for 10 min at 4 °C for 10 min. The bacteria cells were re-suspended with PBS-1x buffer (10 mmol/L phosphate, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.4) in order to obtain the final concentration of cell cultures at least 1.5 x $10^8$ CFU/ml (0.5 McFarland Standard). Three mL of each suspension were inoculated into 100 mL of almond milks and subsequently incubated at 37 °C for 24 hours. Duration of the fermentation was 24 hours and samples were aseptically withdrawn at 0, 6, 12, 18 and 24 hours. The serial dilutions of culture samples were spread on the MRS Agar and incubated at 37°C for 24 hours, to quantify the number of living LAB cells and measured pH. Experiments were made by triplicate and then reported.

***Preparation of fermented almond milk extraction***

Fermented almond milk samples (10 mL) were acidified to pH 4.0 with HCl (1 M) followed by heating (water bath; 45 °C, 10 min) and centrifugation at 3,500 rpm for 10 min at 4 °C). The pH of supernatants was adjusted to 7.0 using NaOH (3 M) and re-centrifuged (3,500 rpm, 10 min 4 °C) for further precipitation of proteins and salts. The supernatants were harvested and kept in the refrigerator at 4 °C and used within 12 hours.

***DPPH assay***

The antioxidant activity of LAB was measured using the DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) assay. The supernatant 800 µl of extract sample in 50 ml ethanol mixed with 1000 µl of 3.9 mg/ µl DPPH solution was prepared. The solution was incubated in the dark for 30 min and the absorbance of the solution was measured at 517 nm by spectrophotometer. All determinations were carried out in triplicate. The DPPH scavenging antioxidant activity was calculated in the following way:

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = 1 - (Ab_{sample} / Ab_{control}) \times 100$$

Where, $Ab_{sample}$ is the absorbance of fermented almond milk extract and $Ab_{control}$ is the absorbance of the blank (ethanol).

***ABTS assay***

This assay was based on the ability of different substances to scavenge ABTS radical cation. The radical cation was prepared by mixing a 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate (1:1 v/v) and leaving the mixture for 4-16 hours until the reaction was completed and the absorbance was stable. The $ABTS^{\cdot+}$ solution was diluted with water to an absorbance of 0.70 ± 0.05 at 734 nm for measurements. The photometric assay was conducted on 3.9 mL of $ABTS^{\cdot+}$ solution mixed with 0.1 mL of extract sample. Measurements were taken at 734 nm after 4 min. The antioxidant activity of the tested samples was calculated by determined the decrease in absorbance by using the following equation:

$$\text{ABTS radical cation scavenging activity (\%)} = [1-(Ab_{sample} / Ab_{control})] \times 100$$

Where, $Ab_{sample}$ is the absorbance of fermented almond milk extract and $Ab_{control}$ is the absorbance of the blank (distilled water).

***FRAP assays***

Stock solution of acetate buffer (300 mM, pH 3.6) was made by mixing 3.1 g of sodium acetate trihydrate in 16 mL of glacial acetic acid and final volume was made up to 1000 mL with distilled water. FRAP reagent was prepared by mixing 10 mL of 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 1 mL of 10 mM 2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine (TPTZ) solution (10 mM TPTZ in 40 mM HCl) and 1 mL of 20 mM $FeCl_3$-$6H_2O$ solution, and 1.2 mL distilled water. Fresh reagent was prepared immediately before analysis. Thirty µL of extract sample were mixed with 1 mL of FRAP reagent. The samples were mixed and then incubated at room temperature for 4 min. The increase in absorbance was measured at 593 nm against acetate buffer using Spectrophotometer. The results were expressed as ferrous sulphate equivalent values by using $FeSO_4 7H_2O$ as standard (0.4 mM to 2 mM).

***Total phenolic content***

An 1 mL aliquot of extract sample was introduced into a test-tube with 5 ml of $Na_2CO_3$ at 7% (w/v) solution and was mixed briefly with 1 mL Folin-Ciocalteu reagent. The solution was stirred and allowed to stand for 30 min. The absorbance of the extract sample was measured at 725 nm and data were expressed as micrograms gallic acid equivalent (GAE)/g extract. GAE standard were at 50 to 300 mg/L.

## Results

### *Cell growth and pH changes during the fermentation*

The microorganism population of the assessed strains in almond milk exhibited well growth performance during 24 hours of fermentation. The bacterial counts of fermented almond milk were ranged between 8.97 to 9.12 log CFU/mL after 24 hours incubation. A decline of pH values during fermentation was observed. The pH of fermented almond milk was declined to the range of 4.7-5.6 after 24 hours incubation at 37 °C (Fig. 1).

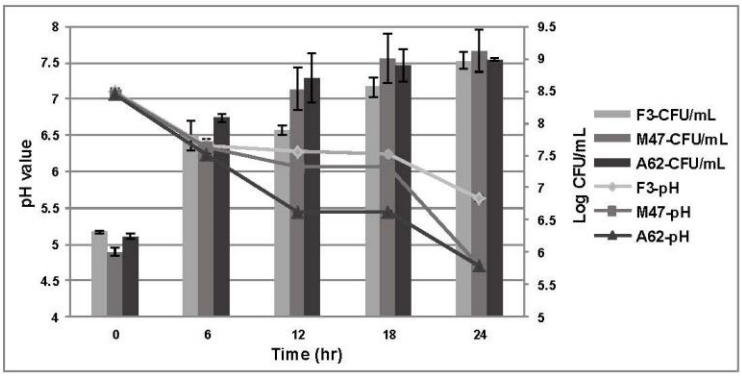



**Figure 1** Viable cell counts and pH values of fermented almond milk during incubation at 37°C for 24 hours.

### *Antioxidant activity*

In the present study, we evaluated the antioxidant activity of fermented almond milk against three different DPPH, ABTS and FRAP assay. Fermented almond milk extract showed higher antioxidant activity than those of control (unfermented almond milk). The antioxidant activity of extracts from fermented almond milk and unfermented almond milk is shown in Fig 2 and Fig 3. The DPPH scavenging activity of fermented almond milk extracts were ranged between at 37.90 to 50.41%, while it was about 3.16% for unfermented was almond milk extracts after the 24 hours at 37 °C of fermentation. The ABTS radical scavenging activity of unfermented almond milk extracts was 44.60%, while it was ranged from 49.67 to 81.09% for fermented almond milk extracts. As shown in Fig. 3 (A), it was found that the ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the extracts was 0.68 mM $FeSO_4$ for the unfermented almond milk extracts, while for the fermented almond milk extracts, FRAP was ranged from 0.82 to 1.49 mM $FeSO_4$ after the 24 hours of fermentation at 37 °C. The results demonstrated that fermentation with LAB could enhance antioxidant activities of almond milk. In addition, the antioxidant activity of fermented almond milk by all tested LAB began rising after 18 hours incubation, and reached maximum at 24 hours.

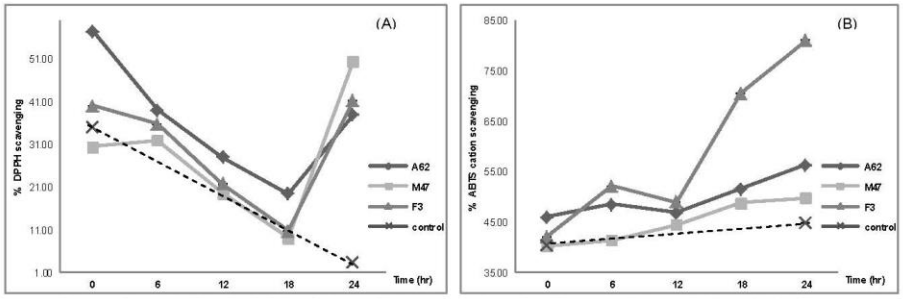



**Figure 2** Antioxidant activities of fermented almond milk and unfermented almond milk. (A) DPPH scavenging and (B) ABTS radical cation scavenging activity.

***Total phenolic content***

As shown in Fig.3 (B), fermented almond milk showed higher total phenolic contents more than that of unfermented almond milk. After the 24 hours at 37 °C of fermentation, total phenolic contents were ranged from 235.33±0.01 to 270.59±0.02 µg GAE/g extract, while it was ranged from 222.86±0.01 µg GAE/g extract for unfermented almond milk extracts after the 24 hours of fermentation at 37 °C.

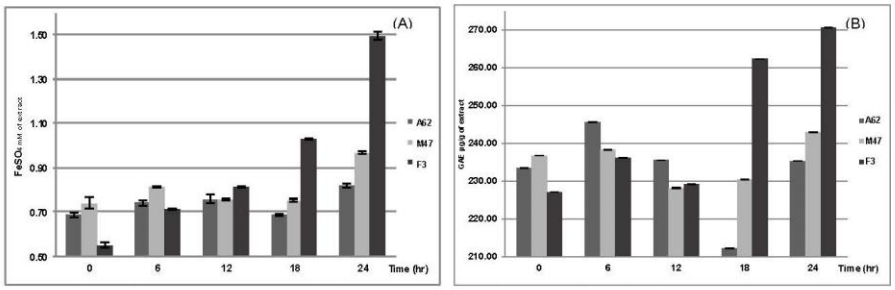



**Figure 3** Ferric reducing antioxidant power (A) and total phenolic content (B) in fermented almond milk.

## Discussion

In this study, pH values and microbial population during almond milk fermentation with LAB were evaluated. The pH was gradually declined during 24 hours of fermentation. It may be mainly due to the accumulation of lactic acid during fermentation. For LAB, the pH decline rate was closely related to the growth performance of the strains. A previous study has also demonstrated that the pH decline was strain dependent based on the metabolic activity and the growth requirement of the strain.[11] Our results also showed that LAB counts of fermented almond milk were in the range of 8.97 to 9.12 logCFU/mL after 24 h fermentation. As probiotics, LAB was considered to provide therapeutic effects at minimum concentrations of $10^6$ CFU/ml,[12] and higher viable cell counts in our fermented almond milks may result in promoting a biological effects to host.

Several antioxidant capacity assays with different approaches and mechanisms were used to reflect the antioxidant capacities of fermented almond milk and unfermented almond milk extracts. DPPH is a stable free radical with a maximum absorbance at 517 nm in ethanol. When DPPH encounters a proton-donating substance such as an antioxidant, the radical is scavenged and the absorbance is reduced. Our finding indicated that almond milk fermented with the different strains of LAB isolates produced higher antioxidant activity compared to control (unfermented almond milk) as determined by DPPH after 18 hours incubation. Similarly, Xiao Y and Wang L et al. (2013) reported that lactic acid bacteria in soywhey showed good antioxidant activity. The ABTS almond milk also produced higher antioxidant activity compared to that of control. The results of FRAP analysis suggested that the antioxidant capacity might possibly be related to phenolic content since the higher phenolic contents of fermented almond milk were found higher than those of non-fermented almond milk. The presences of phenolic in the sample extracts caused the reduction of TPTZ–$Fe^{3+}$ complex to the TPTZ–$Fe^{2+}$ form.[13] As antioxidants, phenolic compounds prevent or control the formation of free radicals with deleterious health effects and are therefore important to reduce the risk of chronic diseases.

## Conclusion

The present study focused on antioxidant activity of LAB strains in fermented almond milk. Probiotics cultures (F3, M47, and A62) possess higher antioxidative properties, and phenolic contents than those of non-fermented almond milk. The fermented almond milk has the potential to be a good dietary supplement into food formulations for prevention of oxidative stress related diseases such as atherosclerosis, coronary heart disease and cancer.

## Acknowledgements

Authors would like to thank faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University for providing research facility.

## References

1. Fuller R. Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriology. 1989; 66(5): 365-78.
2. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. ISRN Nutrition. 2013; 2013: 1-7.
3. Ljungh A and Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. Current Issues in Intestinal Microbiology. 2006; 7(2): 73-89.
4. Ghoddusi H. Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*: Current Progress in Advanced Research (2011). International Journal of Dairy Technology. 2012; 65(3): 462-64.
5. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews. 2010; 4(8): 118.
6. Xiao Y, Wang L, Rui X, Li W, Chen X, Jiang M et al. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. Journal of Functional Foods. 2015; 12: 33-44.
7. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. Nutrients. 2017; 9(6): 521.
8. Bernata N, Chafera M, Chiralta A, Laparrab J, Gonzalez-Martheza C. Almond milk fermented with different potentially probiotic bacteria improves iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) Cells. International Journal of Food Studies. 2015; 4: 49-61.
9. Bernata N, Chafera M, Chiralta A, Laparrab J, Gonzalez-Martheza C. Probiotic fermented almond "milk" as an alternative to cow-milk yoghurt. International Journal of Food Studies. 2015; 4: 201-11.
10. Chen C, Lapsley K, Blumberg J. A nutrition and health perspective on almonds. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2006; 86(14): 2245-50.
11. Zhang S, Shi Y, Zhang S, Shang W, Gao X, Wang H. Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. Food Control. 2014; 41: 1-6.
12. Ghosh D, Chattoraj D, Chattopadhyay P. Studies on changes in microstructure and proteolysis in cow and soy milk curd during fermentation using lactic cultures for improving protein bioavailability. Journal of Food Science and Technology. 2011; 50(5): 979-85.
13. Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. LWT - Food Science and Technology. 2008; 41(6): 1060-66.

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| **ชื่อ-สกุล** | นางสาวสุภัสสร วันสุทะ |
| **วัน เดือน ปีเกิด** | เกิดวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2536 |
| **สถานที่เกิด** | อำเภอเบญจลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ |
| **ประวัติการศึกษา** | 2554 – 2558 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาการแพทย์แผนไทย คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ด้วยเกรดเฉลี่ย 3.85 เกียรตินิยมอันดับ 1 เหรียญทอง |
| **ที่อยู่** | 12 หมู่ 8 ตำบลท่าคล้อ อำเภอเบญจลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ 33110 |
| **สถานที่ทำงานปัจจุบัน** | มหาวิทยาลัยเฉลิมกาญจนา 99 หมู่ 6 ต.โพธิ์ เทศบาลเมืองศรีสะเกษ จังหวัดศรีสะเกษ 33000 |