



คุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้
ใหญ่ Caco-2



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

คุณสมบัติโพรไปโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

POTENTIAL PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR ANTI-
PROLIFERATIVE EFFECTS ON CACO-2 CELLS



By
MISS Hataipat SIRINAWEE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Department of MICROBIOLOGY

Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	คุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2
โดย	นางสาวหทัยภัทร ศิรินาวี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. ทักษิณ ทองอร่าม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล)	
	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร. ทักษิณ ทองอร่าม)	
	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา)	
	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร. วิริยาภรณ์ สุ่มสกุล)	

620720047 : จุลชีววิทยา แขนง ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก, โพรไบโอติก, เซลล์ Caco-2

นางสาว หทัยภัทร ศิรินาวิ: คุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. ทักษิวัน ทองอร่าม

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สำคัญและนิยมใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์นมหมักส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ส่งผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์และมีส่วนช่วยในการป้องกันโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) คัดแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene จำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacti. paracasei* และ *Streptococcus thermophilus* (2) ศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก 11 ไอโซเลทในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 พบว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ที่เวลา 2 ชั่วโมง (16.35-85.77% viability) และเมื่อทดสอบการทนต่อเกลือ น้ำดี 0.3% (w/v) พบว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี 0.3% (w/v) ที่เวลา 3 ชั่วโมง (8.86-99.50% viability) เมื่อทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก 8 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติการทนต่อกรดและเกลือ น้ำดีในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 ชนิด พบว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin ได้ จากการทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ (86.97-91.81% DPPH radical scavenging activity) ผลทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่า MD-6 (*L. paracasei* W1-D-5) สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด (6.78% adhesion) และ (3) ศึกษาคุณสมบัติยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรกับเซลล์ Caco-2 และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* TISTR 887 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ทั้งวิธี competition และ exclusion นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด (87.97% inhibition) ซึ่งมีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันที่เหมาะสมสำหรับควบคุมและป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไป

620720047 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : LACTIC ACID BACTERIA, PROBIOTIC, CACO-2 CELL

MISS Hataipat SIRINAWEE : Potential probiotic lactic acid bacteria and their anti-proliferative effects on Caco-2 cells Thesis advisor : Taksawan Thongaram, Ph.D.

Lactic acid bacteria are the most widely used probiotics in fermented dairy products and foods. Since probiotics play an important role in human health promotion and disease prevention. In this study, the first aim was to isolate and identify lactic acid bacteria from dairy products and dietary supplements. A total of 11 isolates of lactic acid bacteria (LAB) were obtained and analyzed by 16S rRNA gene sequencing. The LAB isolates were identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacti. paracasei* and *Streptococcus thermophilus*. In the second aim, probiotic properties of LAB were characterized by acid and bile salt tolerance, antioxidant activity, antimicrobial activity, and adhesion to Caco-2 cells. Results indicated that (1) eleven LAB strains showed wide spectrum acid tolerance to pH 2.5 for 2h (16.35-85.77% viability), (2) all strains exhibited tolerance to 0.3% (w/v) bile salt for 3h with 8.86-99.50% viability, (3) among these LAB, eight strains with acid and bile salt tolerance were selected for further susceptibility assay to nine antibiotics, and all *Lactobacillus* and *Lacticaseibacillus* strains were resistant to gentamycin, sulfamethoxazole and vancomycin, (4) all LAB strains had a strong antioxidative effect with 86.97-91.81% DPPH radical scavenging activity, (5) among eight strains investigated by agar well diffusion method, six strains including MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) and MD-11 (*L. casei* F4S1) had an antibacterial activity against five common pathogenic bacteria, (6) among the tested strains investigated, MD-6 (*L. paracasei* W1-D-5) had the highest adhesion capacity on Caco-2 cells (6.78% adhesion). The third aim was to determine the inhibition of pathogenic bacteria adhesion to Caco-2 cells and the antiproliferative effect against Caco-2 cells by selected lactobacilli. The results suggested that the adhesion of *E. coli* TISTR 887 and *S. Typhimurium* TISTR 292 to Caco-2 cells was reduced by competition and exclusion with all six LAB strains. In conclusion, the isolate MD-5 (*L. plantarum* 3335) was found to be the most efficient probiotic lactobacillus strain with significant dose-dependent antiproliferative effect against Caco-2 cells (87.97% inhibition). The findings of this study suggest that MD-5 could be a promising candidate species with potential for application in a functional food strategy for the colorectal cancer control and chemoprevention by dietary compounds.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ อาจารย์ ดร. ทักษวัน ทองอร่าม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ คำปรึกษาและคำแนะนำที่ดีในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ อีกทั้งยังให้การสนับสนุนทั้งงบประมาณ อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา และ ดร. วิริยาภรณ์ สุ่มสกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณคุณกรพรรณ เศรษฐสุวรรณกุล นักวิทยาศาสตร์ของภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านของภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ช่วยติดต่อประสานงาน และให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ขอขอบคุณนางสาวไอลดา ชุนอินทร์ รุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาตลอดจนอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

และสุดท้ายขอขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวของผู้วิจัย ที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนด้านการศึกษาตลอดมา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

นางสาว หทัยภัทร ศิรินาวี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
3. สมมติฐานของการศึกษา.....	2
4. ขอบเขตของการศึกษา.....	2
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
1. โรคมะเร็ง.....	3
1.1 สาเหตุการเกิดมะเร็ง.....	3
1.2 ระบาดวิทยาของโรคมะเร็ง.....	4
2. โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	6
2.1 นิยามและระบาดวิทยาของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	6
2.2 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	6
2.3 แนวทางการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	7
2.4 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2.....	9

3. แบคทีเรียกรดแลคติก	12
3.1 นิยามของแบคทีเรียกรดแลคติก	12
3.2 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก	12
3.3 สารเมแทบอลิต์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	13
4. โพรไบโอติก	15
4.1 นิยามของโพรไบโอติก	15
4.2 จุลินทรีย์โพรไบโอติก	15
4.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติก	16
5. โพรไบโอติกและกลไกการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	25
เชื้อจุลินทรีย์ เซลล์ และสารเคมี	25
เครื่องมือ อุปกรณ์ และเครื่องแก้ว	26
วิธีการดำเนินงานวิจัย	28
1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	28
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	29
3. การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์บริเวณ 16S rRNA gene....	29
4. การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในงานวิจัย	31
5. การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก	31
6. การศึกษากับเซลล์ Caco-2	33
7. สถิติที่ใช้ในการวิจัย	37
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	38
1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก	38
2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	39

3.	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	42
4.	การทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก	43
4.1	ผลการทดสอบการทนต่อกรด	43
4.2	ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี.....	45
4.3	ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ.....	48
4.4	ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl radical scavenging activity).....	53
4.5	ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion.....	55
5.	การทดสอบกับเซลล์ Caco-2.....	58
5.1	ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2.....	58
5.2	ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับเซลล์ Caco-2	59
5.3	ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2	65
	บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	72
	ข้อเสนอแนะ	75
	รายการอ้างอิง	76
	ภาคผนวก.....	91
	ภาคผนวก ก	91
	ภาคผนวก ข	94
	ประวัติผู้เขียน.....	96

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 จุลินทรีย์โพรไบโอติก.....	16
ตารางที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย.....	17
ตารางที่ 3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์	30
ตารางที่ 4 สภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	30
ตารางที่ 5 แหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้.....	38
ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000X).....	39
ตารางที่ 7 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene	42
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	45
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	47
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ <i>Lactobacillus</i> จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ Charteris และคณะ (1998).....	51
ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ <i>S. thermophilus</i> จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ CLSI M100-S28.....	52
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์.....	60
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของขนาด clear zone (mm).....	61
ตารางที่ 14 ผลของ lyophilized cell free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 และค่า IC ₅₀ ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	70
ตารางที่ 15 ผลของ lyophilized cell free supernatants (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 และค่า IC ₅₀ ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	71

สารบัญรูปร่างภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แผนภูมิวงกลมแสดงผู้ป่วยโรคมะเร็งร้ายใหม่ที่เป็นเพศชาย ปี 2020 ในประเทศไทย	5
รูปที่ 2 แผนภูมิวงกลมแสดงผู้ป่วยโรคมะเร็งร้ายใหม่ที่เป็นเพศหญิง ปี 2020 ในประเทศไทย	5
รูปที่ 3 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่	7
รูปที่ 4 ลักษณะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2.....	10
รูปที่ 5 ลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2.....	10
รูปที่ 6 หลักการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT.....	11
รูปที่ 7 กระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	13
รูปที่ 8 กลไกการทนต่อกรดของ <i>Lactobacillus</i>	19
รูปที่ 9 กลไกของโพรไบโอติกในการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	24
รูปที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl).....	55
รูปที่ 11 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ...	59
รูปที่ 12 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคร่วมกับเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี competition และ exclusion (A) เซลล์ Caco-2 ที่ยึดเกาะกับ <i>E. coli</i> (B) เซลล์ Caco-2 ที่ยึดเกาะกับ <i>S. Typhimurium</i>	64

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนทั่วโลก จากรายงานของ The Global Cancer Observatory (GCO) ในปี 2020 พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งจำนวน 18 ล้านคน ซึ่งโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 3 รองมาจากโรคมะเร็งเต้านมและโรคมะเร็งปอด และรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในปี พ.ศ. 2563 ในประเทศไทย พบว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ในเพศชาย และอันดับ 2 ในเพศหญิง ซึ่งโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นโรคที่มีอัตราการอุบัติการณ์ของการเกิดโรค และการเสียชีวิตสูง การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มี 3 วิธีการหลัก ได้แก่ การผ่าตัด รังสีรักษา และเคมีบำบัด ซึ่งวิธีเหล่านี้มีผลข้างเคียง เช่น การสูญเสียอวัยวะ อาการคลื่นไส้ อาเจียน แผลผ่าตัดติดเชื้อ เป็นต้น ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะตรวจพบมะเร็งก็พบว่าเป็นมะเร็งระยะที่มีการแพร่กระจายของโรค หรือมะเร็งระยะลุกลามแล้ว ทำให้มีโอกาสรักษาชีวิตสูง

ปัจจุบันงานวิจัยที่ศึกษาจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยเป็น จุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เช่น แบคทีเรียจะต้องคงสภาพที่มีชีวิต สามารถทนต่อสภาพกรดและน้ำดี สามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยไม่ก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 ด้วย (Dallal et al., 2015; Arian et al., 2019; Bazireh et al., 2020) ซึ่งโพรไบโอติกได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (The United States Food and Drug Administration, FDA) ว่ามีความปลอดภัย และสามารถนำไปใช้เป็นอาหารให้กับสิ่งมีชีวิตได้ (Generally Recognized As Safe, GRAS) (Salminen et al., 1998)

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก และทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก ได้แก่ การทนกรดและทนเกลือ น้ำดี การต้านอนุมูลอิสระ การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ความสามารถในการยึดเกาะภายใต้สภาวะจำลอง และการยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 จากนั้นทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 โดยวิธี MTT ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็น

แนวทางสำหรับการศึกษาพัฒนาต่อยอดให้เกิดผลงานวิจัยที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการใช้งาน เพื่อป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก และจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้โดย 16S rRNA gene analysis

2.2 เพื่อทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

2.3 เพื่อให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

3. สมมติฐานของการศึกษา

3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติโพรไบโอติก

3.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 ได้

4. ขอบเขตของการศึกษา

4.1 คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า

4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

4.3 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

4.4 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

5.2 ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาพัฒนาต่อยอดให้เกิดผลงานวิจัยที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการใช้งาน เพื่อประยุกต์ใช้ในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคมะเร็ง

ในร่างกายมนุษย์ประกอบด้วยเซลล์หลายล้านเซลล์ โดยเซลล์พื้นฐานในร่างกายมนุษย์มีอยู่ 4 ประเภท ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) เซลล์กล้ามเนื้อลาย (muscle cells) เซลล์เนื้อเยื่อประสาท (nervous cells) และ เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective cells) ซึ่งเซลล์ปกติของมนุษย์จะมีกลไกในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (normal growth regulation) การเปลี่ยนแปลงสภาพใหม่มีลักษณะจำเพาะของเซลล์ (differentiation) รวมถึงการควบคุมการเจริญ (proliferation) และการตายของเซลล์ (apoptosis) ถ้ามีความผิดปกติเกี่ยวกับการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์จะทำให้เกิดก้อนเนื้อที่เรียกว่า เนื้องอก โดยแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ เนื้องอกชนิดที่ไม่ร้ายแรงจะเกิดเฉพาะที่ และไม่มีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่น แต่อาจทำให้เกิดความเสียหายหรืออันตรายต่อร่างกายได้ และเนื้องอกชนิดร้ายแรงหรือมะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ที่มีความผิดปกติ ส่วนหนึ่งเกิดจากการกำหนดหน้าที่ของเซลล์ด้วยสารพันธุกรรมที่เรียกว่า DNA ภายในเซลล์ (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2564) หากเกิดการเปลี่ยนแปลงข้อมูลของ DNA ทำให้เซลล์เจริญผิดปกติ (unregulated cell growth) มีการเบียดของเซลล์ข้างเคียง (invasion of adjacent organs) และกระจายไปยังอวัยวะที่ไกลออกไป (metastasis to far organs) โดยแพร่กระจายผ่านระบบน้ำเหลืองหรือกระแสเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายที่อยู่ห่างไกลได้ ทำให้อวัยวะนั้น ๆ ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จนกลายเป็นเซลล์ก่อกำเนิดมะเร็ง และพัฒนาจนกลายเป็นเนื้อเยื่อมะเร็งในที่สุด หากเซลล์มะเร็งมีต้นกำเนิดมาจาก epithelial cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่เรียงตัวกันอยู่ในช่องต่าง ๆ หรืออวัยวะที่เป็นท่อนกลาง เมื่อเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง เรียกว่า carcinoma ส่วนเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากต่อมต่าง ๆ (glandular cells) เรียกว่า adenocarcinoma และเซลล์มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจากชั้น mesoderm เช่น กล้ามเนื้อ กระดูก กระดูกอ่อน เป็นต้น เรียกว่า sarcoma (Punjaruk, 2015; National Cancer Institute, 2021) ทำให้เกิดชนิดของมะเร็งและคุณลักษณะที่แตกต่างกันออกไป และส่งผลไปถึงวิธีการรักษาที่แตกต่างกันออกไปด้วย

1.1 สาเหตุการเกิดมะเร็ง

สาเหตุการเกิดมะเร็งเป็นเรื่องที่มีความซับซ้อนและมีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง แบ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงจากสิ่งแวดล้อม เช่น สารเคมี รังสี ไวรัสก่อมะเร็ง สารอาหารก่อมะเร็ง และพยาธิ เป็นปัจจัยที่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ส่วนปัจจัยเสี่ยงจากภายในร่างกาย เช่น กรรมพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกัน

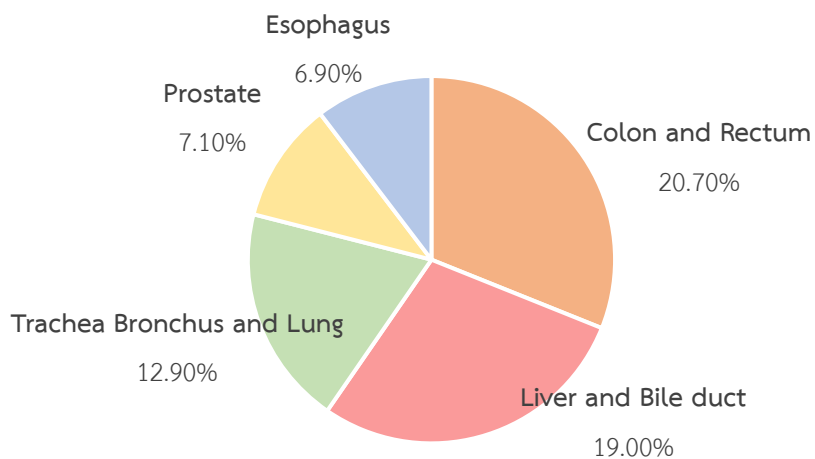
ภาวะโภชนาการ รวมทั้งจิตใจและอารมณ์ ซึ่งปัจจัยส่วนใหญ่เป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้เนื่องจากติดตัวมาแต่กำเนิด นอกจากนี้พฤติกรรมการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น การสูบบุหรี่ การรับประทานอาหาร ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2564)

1.2 ระบาดวิทยาของโรคมะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนทั่วโลก องค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (IARC) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้จัดทำอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งของทุกประเทศทั่วโลก หรือที่เรียกว่า The Global Cancer Observatory (GCO) ปี 2020 พบว่ามีผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งรายใหม่จำนวน 18 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 9.9 ล้านคน โดยโรคมะเร็งที่พบ 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งพบว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 3 ของมะเร็งทั้งหมด

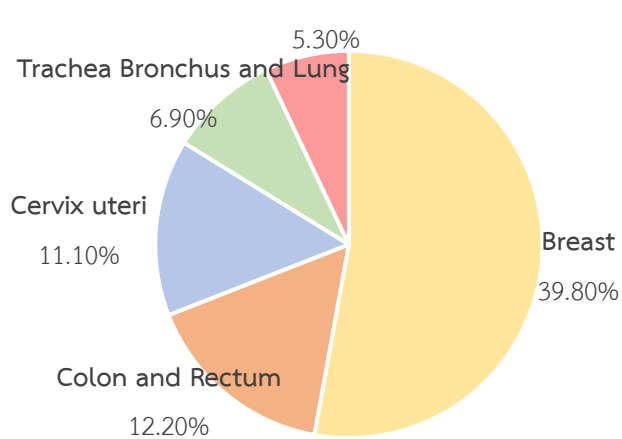
ข้อมูลจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2563 ในประเทศไทย พบว่าโรคมะเร็งที่พบบ่อย 5 อันดับแรกในเพศชาย ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ คิดเป็น 20.70% มะเร็งตับและท่อน้ำดี คิดเป็น 19.00% มะเร็งหลอดลมและมะเร็งปอด คิดเป็น 12.90% และมะเร็งต่อมลูกหมาก คิดเป็น 7.10% ดังรูปที่ 1 และโรคมะเร็งที่พบบ่อย 5 อันดับแรกในเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งเต้านม คิดเป็น 39.80% มะเร็งลำไส้ใหญ่ คิดเป็น 12.20% มะเร็งปากมดลูก คิดเป็น 11.10% และมะเร็งปอด คิดเป็น 6.90% ดังรูปที่ 2 ซึ่งพบผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในเพศชายเป็นอันดับ 1 และในเพศหญิงเป็นอันดับ 2 รองลงมาจากมะเร็งเต้านม และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

Estimated number of new case in 2020, Thailand, Male



รูปที่ 1 แผนภูมิวงกลมแสดงผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ที่เป็นเพศชาย ปี 2020 ในประเทศไทย
ที่มา: สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2563

Estimated number of new case in 2020, Thailand, Female



รูปที่ 2 แผนภูมิวงกลมแสดงผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ที่เป็นเพศหญิง ปี 2020 ในประเทศไทย
ที่มา: สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2563

2. โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

2.1 นิยามและระบาดวิทยาของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ เกิดจากเยื่อบุผิวของลำไส้แบ่งตัว และเจริญผิดปกติจนกลายเป็นก้อนเล็ก ๆ ที่เรียกว่า ตีง (Polyp) ซึ่งลำไส้ใหญ่แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่ 1) ลำไส้ใหญ่ส่วนที่อยู่ในช่องท้อง (colon) และ 2) ลำไส้ใหญ่ส่วนที่อยู่ในอุ้งเชิงกรานที่เรียกว่า ลำไส้ตรง (rectum) มักถูกเรียกรวมว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) โดยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จะเกิดในลำไส้ใหญ่ส่วนที่อยู่ในช่องท้องมากกว่าเกิดที่ลำไส้ตรง และสามารถเกิดขึ้นได้กับลำไส้ใหญ่ทุก ๆ ส่วน ซึ่งโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่สามารถพบได้ในทุกอายุ และพบมากในคนอายุ 60 ปีขึ้นไป สาเหตุการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากพันธุกรรม พฤติกรรม และพฤติกรรมการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น ไม่ออกกำลังกาย สูบบุหรี่ และการดื่มสุรา รวมถึงการบริโภคอาหาร สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ดังนั้นการตรวจคัดกรองเป็นวิธีที่จะช่วยตรวจพบรอยโรคได้ตั้งแต่อ่อนเป็นมะเร็งระยะแรก และสามารถรักษาได้ก่อนที่จะมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนอื่น ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะรู้ว่า เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ เมื่อมีอาการขับถ่ายผิดปกติ เช่น อุจจาระเป็นเลือด ถ่ายมีมูกเลือด ท้องผูก และพบโรคในระยะสุดท้ายแล้ว ซึ่งทำให้มีโอกาสรักษาชีวิตสูง (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2564)

2.2 ระยะเวลาของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

การจำแนกระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เพื่อให้ทราบข้อมูล และสามารถวางแผนจัดการรักษาได้อย่างเหมาะสม ระบบที่ใช้จำแนกระยะของโรคมะเร็งแบบมาตรฐานสากลทั่วโลก คือ TNM กำหนดขึ้นโดย The Union for International Cancer Control (UICC) และ The American Joint Committee on Cancer (AJCC) ประกอบด้วย

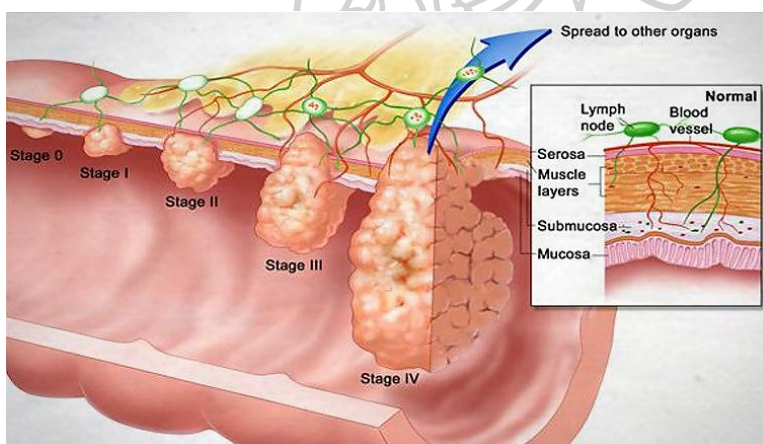
ระยะที่ 0 (Carcinoma in situ) หรือระยะก่อนเป็นมะเร็ง เป็นระยะที่พบเซลล์ผิดปกติ เกิดเฉพาะที่บริเวณชั้นเยื่อบุผิวด้านในของลำไส้ใหญ่ (Mucosa)

ระยะที่ 1 เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งอยู่ในชั้น Mucosa และลุกลามไปยังชั้นกล้ามเนื้อของลำไส้ใหญ่ (Muscle layers)

ระยะที่ 2 ซึ่งในระยะนี้แบ่งออกเป็นระยะ IIA เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามผ่านชั้น Muscle layers ไปยังชั้นเยื่อบุผิวด้านนอกของลำไส้ใหญ่ (Serosa) ระยะ IIB เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามผ่านชั้น Serosa ไปยังเนื้อเยื่อช่องท้อง (Visceral peritoneum) แต่ยังไม่มีการลุกลามไปยังอวัยวะใกล้เคียง และระยะ IIC เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามผ่านชั้น Serosa ไปยังอวัยวะใกล้เคียง

ระยะที่ 3 ซึ่งในระยะนี้แบ่งเป็นระยะ IIIA เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามผ่านชั้น Mucosa ไปยังชั้น Muscle layers และลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง 1-3 ต่อมน้ำเหลือง หรือ 4-6 ต่อมน้ำเหลือง ระยะ IIIB เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามผ่านชั้น Muscle ไปยังชั้น Serosa หรือลุกลามผ่านชั้น Serosa ไปยังเนื้อเยื่อช่องท้อง (Visceral peritoneum) มะเร็งได้ลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง 1-3 ต่อมน้ำเหลือง หรือ 4-6 ต่อมน้ำเหลือง หรือตั้งแต่ 7 ต่อมน้ำเหลืองขึ้นไป และระยะ IIIC เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามผ่านชั้น Serosa ไปยัง Visceral peritoneum เซลล์มะเร็งได้ลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง 4-6 ต่อมน้ำเหลือง หรือตั้งแต่ 7 ต่อมน้ำเหลืองขึ้นไป หรือเป็นระยะที่เซลล์มะเร็งได้ลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้เคียงอย่างน้อย 1 ต่อมน้ำเหลือง

ระยะที่ 4 ซึ่งในระยะนี้แบ่งออกเป็น ระยะ IVA เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะที่อยู่ไกลจากลำไส้ใหญ่ เช่น ตับ ปอด รังไข่ หรือต่อมน้ำเหลือง ระยะ IVB เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะมากกว่า 1 ส่วนที่อยู่ไกลจากลำไส้ใหญ่ เช่น ตับ ปอด รังไข่ หรือต่อมน้ำเหลือง และระยะ IVC เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งลุกลามไปยัง Visceral peritoneum และอาจลุกลามไปยังบริเวณหรืออวัยวะอื่น ๆ (National cancer institute, 2021) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

ที่มา: National cancer institute, 2021

2.3 แนวทางการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มีหลายวิธี ซึ่งในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งลำไส้มี 3 วิธี ได้แก่ การผ่าตัด (Surgery) รังสีรักษา (Radiotherapy) และเคมีบำบัด (Chemotherapy) (National Cancer Institute, 2021)

2.3.1 การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยการผ่าตัด

การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยการผ่าตัดเป็นการรักษาที่สามารถทำได้ในทุกๆระยะของ ซึ่งการผ่าตัดมะเร็งลำไส้ใหญ่มีหลายวิธี ซึ่งการผ่าตัดรักษาจะทำในผู้ป่วยที่โรคมะเร็งอยู่เฉพาะ ตำแหน่งเริ่มต้นหรือมะเร็งระยะที่ 1 หรือแพร่กระจายไปเยื่อเนื้อข้างเคียง หรือลุกลามผ่านอวัยวะที่เป็นโพรง (hollow viscus organ) เท่านั้น การผ่าตัดเป็นการรักษาหลักของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ แต่การรักษาผู้ป่วยที่มีการลุกลามของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่าง ๆ ต้องรักษาโดยการผ่าตัดร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด หรือการผ่าตัดร่วมกับรังสีรักษาเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งที่ยังคงหลงเหลืออยู่หลังการผ่าตัด และลดความเสี่ยงที่จะกลับมาเป็นโรคมะเร็งอีกครั้ง ซึ่งการผ่าตัดมีผลข้างเคียง คือ การสูญเสียอวัยวะ แผลผ่าตัดมีเลือดออก เสี่ยงต่อการติดเชื้อในขั้นตอนการผ่าตัด การทำความสะอาดแผลหลังการผ่าตัด เป็นต้น

2.3.2 การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยการฉายรังสี

การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยการฉายรังสีจัดเป็นประเภทหนึ่งของรังสีรักษาที่ใช้สำหรับบำบัดรักษาโรคมะเร็ง มี 2 วิธี คือ 1) การฉายแสง (External radiation therapy) เป็นการฉายแสงจากภายนอกกร่างกายผ่านเข้าไปยังก้อนมะเร็งที่อยู่ภายใน โดยใช้รังสีพลังงานสูงเพื่อทำลายหรือยับยั้งก้อนมะเร็ง และ 2) การฝังแร่ (Internal radiation therapy) เป็นการใส่สารกัมมันตรังสีกับก้อนมะเร็งหรือบริเวณใกล้เคียง ๆ กับก้อนมะเร็ง การรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการฉายรังสีจะขึ้นกับระยะของโรค ชนิดของโรค และสุขภาพของผู้ป่วยด้วย ซึ่งจะมีผลข้างเคียงต่อผิวหนังบริเวณส่วนเฉพาะที่ได้รับรังสี

2.3.3 การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยวิธีเคมีบำบัด

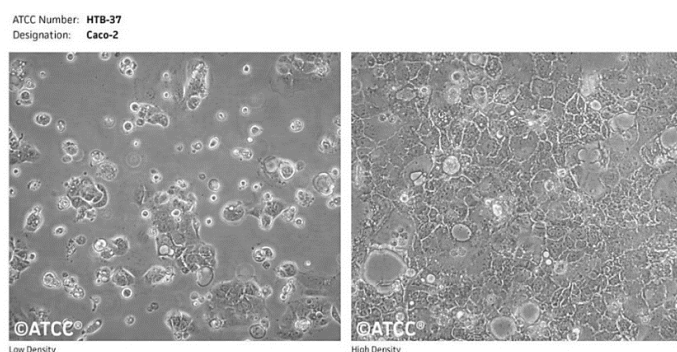
การรักษาด้วยเคมีบำบัดจะใช้รักษาผู้ป่วยใน 2 กรณี คือ 1) ใช้รักษาหลังการผ่าตัดเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งที่ยังหลงเหลืออยู่ในส่วนที่การผ่าตัดทำลายเซลล์มะเร็งไม่หมด และ 2) ใช้ในกรณีที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดรักษาได้ ใช้เพื่อประคับประคองอาการเท่านั้น ยาเคมีบำบัดหรือที่เรียกว่า คีโม ซึ่งย่อมาจาก “คีโมเทอราปี” (chemotherapy) หมายถึง สารเคมีหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านหรือทำลายเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ คือ 5-fluorouracil (5-FU) ยาเคมีบำบัดจะออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวต่อไป และตายในที่สุด รวมถึงเซลล์ร่างกายปกติที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วด้วย เช่น เซลล์เยื่อทางเดินอาหาร เส้นผม เม็ดเลือด ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่แตกต่างกัน

ไปขึ้นกับชนิดยาเคมีบำบัด ปริมาณยา วิธีการให้ยา และปัจจัยของแต่ละบุคคล อาการที่พบ เช่น ผม ร่วง คลื่นไส้ อาเจียน ปริมาณเม็ดเลือดลดลง ในผู้ป่วยบางรายอาจพบอาการข้างเคียงที่รุนแรง เช่น มีไข้ หนาวสั่น หายใจลำบาก ระบบภูมิคุ้มกันโรคลดลง ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อซึ่งอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้

2.4 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

2.4.1 นิยามของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

เซลล์ Caco-2 เป็นมะเร็ง adenocarcinoma ชนิดหนึ่งถูกแยกมาจากเนื้ออกในลำไส้ใหญ่ของชายวัย 72 ปี ชาวคอเคเซียน ที่สถาบันวิจัยมะเร็ง Sloan-Kettering (Fogh et al., 1977) ลักษณะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 แสดงดังรูปที่ 4 ในช่วงแรกของการศึกษาพบว่าเซลล์ Caco-2 แสดงคุณสมบัติสำคัญทั้งด้านโครงสร้างที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อลำไส้เล็กและด้านการดูดซึมสารต่าง ๆ คล้ายคลึงกับ enterocyte ของลำไส้เล็กของมนุษย์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 แสดงดังรูปที่ 5A ในสภาวะที่เหมาะสมใช้เวลาประมาณ 14-21 วัน เซลล์จะเจริญยึดเกาะบนพื้นผิวแบบ monolayer แสดงดังรูปที่ 5B และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยมี brush border และ tight cellular junctions (Meunier et al., 1995) แสดงดังรูปที่ 5C ในปัจจุบันเซลล์ Caco-2 จึงถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อเป็นแบบจำลองเยื่อในลำไส้มนุษย์ในระดับหลอดทดลองในการศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรีย การขนส่งสารอาหารผ่านเยื่อผิว และการป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้โพรไบโอติก (Grajek & Olejnik, 2004)



(A)

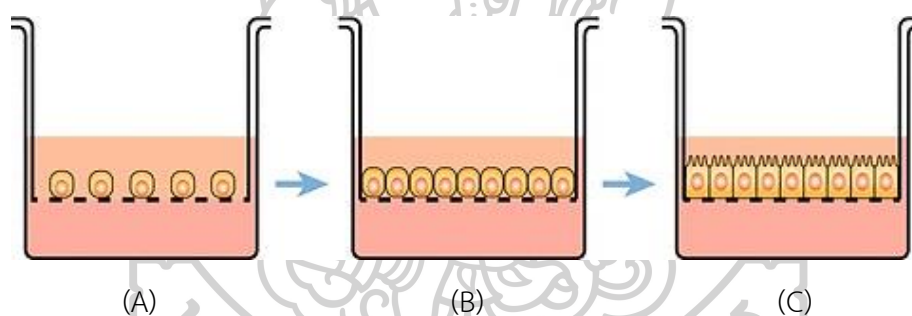
(B)

รูปที่ 4 ลักษณะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

(A) ลักษณะของเซลล์ Caco-2 ที่มีจำนวนเซลล์น้อย (Low density)

(B) ลักษณะของเซลล์ Caco-2 ที่มีจำนวนเซลล์มาก (High density)

ที่มา: American Type Culture Collection (ATCC)



(A)

(B)

(C)

รูปที่ 5 ลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 (A) จนเซลล์ Caco-2 เจริญยึดเกาะบนพื้นผิวแบบ monolayer

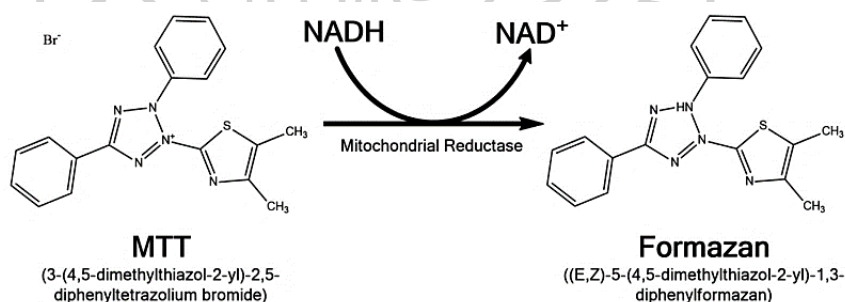
(B) หลังจากทำการเพาะเลี้ยง 21 วัน เซลล์จะแสดง brush border บน apical side ซึ่งเป็นลักษณะ enterocyte ของลำไส้เล็ก (C)

ที่มา: Lea, 2015

2.4.2 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ Dye exclusion, Colorimetric assay, Fluorometric assay และ Luminometric assay ซึ่งแต่ละวิธีวัดจากลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน เช่น ความสมบูรณ์ และหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน เมแทบอลิซึมของเซลล์ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยในปัจจุบันนิยมตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี 1) Dye exclusion เช่น trypan blue, eosin และ Congo red ซึ่งวิธี trypan blue

เป็นวิธีตรวจสอบความสมบูรณ์ของเมมเบรน และใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ในการแปลผลซึ่งตรวจสอบโดยการนับเซลล์โดยการใช้ hemacytometer อาจเกิดข้อผิดพลาดจากการนับได้ และ 2) Colorimetric assay ได้แก่ MTT assay, MTS assay, XTT assay, WST-1 assay และ WST-8 assay (Aslantürk, 2018) ซึ่งปัจจุบันวิธี Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Nozari et al., 2019; Sharma et al., 2020; Faghfoori et al., 2021) เนื่องจาก MTT assay เป็นวิธีตรวจสอบการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะผลิตเอนไซม์ mitochondrial reductase ไปรีดิวซ์ tetrazolium salt (สีเหลือง) เกิดเป็นผลึกของ formazan (สีม่วง) แสดงดังรูปที่ 6 แต่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ mitochondrial reductase ทำให้ไม่สามารถรีดิวซ์ MTT นอกจากนี้ MTT assay ยังเป็นวิธีการทดสอบที่ใช้ทดแทนหรือลดการใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งมีความยุ่งยากในการดูแลสัตว์ และต้องปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ลดการใช้สัตว์ทดลอง มีงานวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่คัดแยกจากนมหมักในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2 โดยใช้วิธี MTT และ Trypan Blue exclusion พบว่า *Enterococcus faecium* RM11 และ *L. fermentum* RM28 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ 21-29% และ 22-29% ตามลำดับ (Thirabunyanon et al., 2009)



รูปที่ 6 หลักการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

ที่มา: Kamiloglu et al., 2020

3. แบคทีเรียกรดแลคติก

3.1 นิยามของแบคทีเรียกรดแลคติก

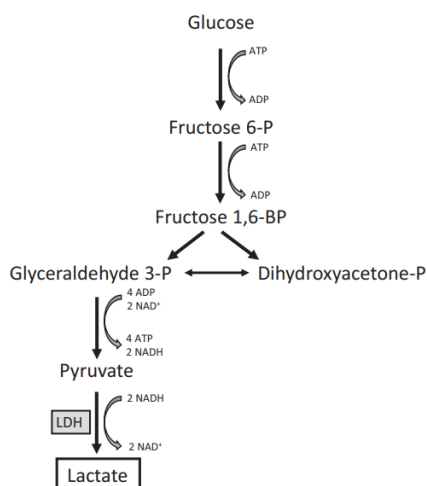
แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งรูปท่อน และทรงกลม แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerobic bacteria) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศ (strict anaerobe) ซึ่งในกระบวนการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกมีหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส และกลูโคส ทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดแอซีติก เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนี้ในระหว่างการหมักยังมีการสร้างกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เป็นสารที่ช่วยในการเจริญ และเป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ แบคทีเรียกรดแลคติกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) (Salminen et al., 1998)

3.2 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก

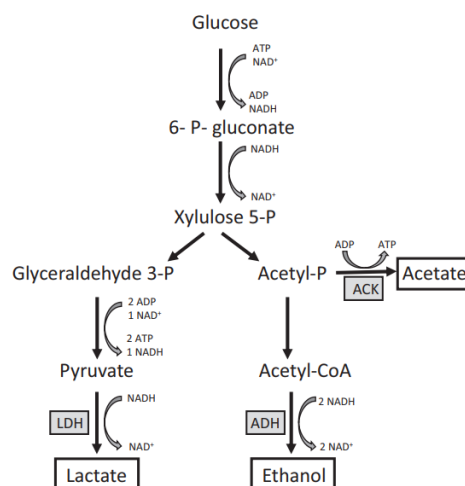
3.1.1 Homofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 85-95% เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus* และ *Pediococcus* (ดังรูปที่ 7A)

3.1.2 Heterofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 50% เปลี่ยนให้เป็นกรดแลคติก น้ำตาลที่เหลืออีกประมาณ 20-25% เปลี่ยนให้เป็นกรดแอซีติก และเอทิลแอลกอฮอล์ ส่วนที่เหลืออีก 20-25% ใช้ในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Leuconostoc* (ดังรูปที่ 7B) ซึ่ง *Lactobacillus* มีทั้งชนิดที่เป็น Homofermentative bacteria และ Heterofermentative bacteria

(A) Homolactic fermentation



(B) Heterolactic fermentation



รูปที่ 7 กระบวนการหมักกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก

(A) Homolactic fermentation

(B) Heterolactic fermentation

หมายเหตุ ACK: acetate kinase, ADH; alcohol dehydrogenase, BP; bisphosphate, LDH; lactic dehydrogenase และ P; phosphate

ที่มา: Suissa et al., 2021

3.3 สารเมแทบอลิต์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตสารได้หลายชนิด เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียโอซิน กรดไขมันสายสั้น เป็นต้น ซึ่งสารเมแทบอลิต์จากแบคทีเรียกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงรสชาติของอาหารหมัก การเก็บรักษาอาหาร ซึ่งสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกมีดังนี้ (Ray and Joshi, 2014)

3.3.1 กรดอินทรีย์

กระบวนการหมักในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกได้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดแลคติก กรดแอสซิติค และกรดโพรพิโอนิก โดยกรดอินทรีย์จะไปขัดขวางการทำงานของและการขนส่งของเมมเบรน ซึ่งกรดแอสซิติค สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ดีกว่ากรดแลคติก นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งยีสต์ และเราได้อีกด้วย

3.3.2 แบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซิน คือ สารเมแทบอลิต์หลักของโพลีเปปไทด์ โพรตีน หรือโพรตีนเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ด้วยไรโบโซม แบคทีเรียโอซินเป็นสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ และนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และสารกันบูด (Wang et al., 2021) ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยโพรไบโอติก เช่น *B. bifidum* ผลิต bifidocin B, *Lactococcus lactis* ผลิต nisin และ *L. acidophilus* ผลิต lactacin B ซึ่งแบคทีเรียโอซินเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด รวมทั้ง *S. Typhimurium* SL1344 และ *E. coli* C1845 (Ślizewska et al., 2021)

3.3.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ทำให้เกิดสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กระตุ้น lactoperoxidase system ของนมสด ทำให้เกิดการก่อตัวของ hypothiocyanite และสารต้านแบคทีเรียชนิดอื่น

3.3.4 ไตอะซิติล

ไตอะซิติลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก บางสายพันธุ์ มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนย เพราะเป็นสารให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้

3.3.5 รูเทอริน

รูเทอรินเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดย *L. reuterin* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะผลิตรูเทอริน ซึ่งรูเทอรินสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ในวงกว้างโดยยับยั้ง ribonucleotide reductase ของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา ไวรัส และโปรโตซัว

3.3.6 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative และแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermentative บางชนิด คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้เนื่องจากทำให้เกิดสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งไม่

เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการใช้ออกซิเจน นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ยังทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย

4. โพรไบโอติก

4.1 นิยามของโพรไบโอติก

ตามเกณฑ์ขององค์การด้านอาหารและเกษตรแห่งชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารและส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อโฮสต์ ปัจจุบันสกุล *Lactobacillus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีการศึกษามากที่สุด และได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally recognized as safe : GRAS) (Salminen et al., 1998) โดยสายพันธุ์ที่มักถูกใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น (Schepper et al., 2017) การมีสุขภาพที่ดีขึ้นกับสมดุลของแบคทีเรียเหล่านี้ด้วย เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ พบมากที่บริเวณลำไส้ใหญ่

4.2 จุลินทรีย์โพรไบโอติก

ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *L. acidophilus* และ *L. rhamnosus GG* พบในอุจจาระของมนุษย์และมักถูกใช้ในผลิตภัณฑ์นม ส่วน *L. gasseri* พบในทางเดินอาหาร ช่องปาก และทางเดินปัสสาวะ *Bifidobacterium* พบในน้ำนมแม่ และ *Enterococcus* พบใน ดิน น้ำผิวดิน น้ำทะเล และในทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ แสดงจุลินทรีย์โพรไบโอติกดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์โพรไบโอติก

Genus	Species	Genus	Species	Others
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>crispatus</i>		<i>bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>johnsonii</i>		<i>infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>gasseri</i>		<i>animalis</i>	<i>Escherichia coli</i> (Nissle 1917)
	<i>casei</i>		<i>adolescentis</i>	<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>
	<i>rhamnosus</i>		<i>lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>reuteri</i>		<i>breve</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>plantarum</i>			<i>Bacillus cereus</i>
	<i>fermentum</i>			<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>salivarius</i>			

ที่มา: Schepper et al., 2017

4.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

4.3.1 โพรไบโอติกต้องมีความปลอดภัย (Generally recognized as safe : GRAS) ต่อมนุษย์และสัตว์ ทั้งแหล่งที่มาและสายพันธุ์ของโพรไบโอติก โดยไม่สร้างสารพิษ และมีคุณสมบัติในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นในการคัดเลือกโพรไบโอติกให้มีความเหมาะสมและปลอดภัย (Campedelli et al., 2019) การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1) intrinsic resistance และ 2) acquire resistance ดังนั้นโพรไบโอติกที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้จะสามารถอยู่รอดได้เมื่อร่างกายได้รับยาปฏิชีวนะ ส่งผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์ ในงานวิจัยนี้ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด แบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ แสดงดังตาราง 2

ตารางที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย

ยาปฏิชีวนะ	กลไกการออกฤทธิ์
Penicillin	ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (cell wall synthesis inhibitor)
Ampicillin	
Vancomycin	
Erythromycin	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitor)
Clindamycin	
Tetracycline	
Gentamycin	
Chloramphenicol	ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic synthesis inhibitor)
Sulfamethoxazole	

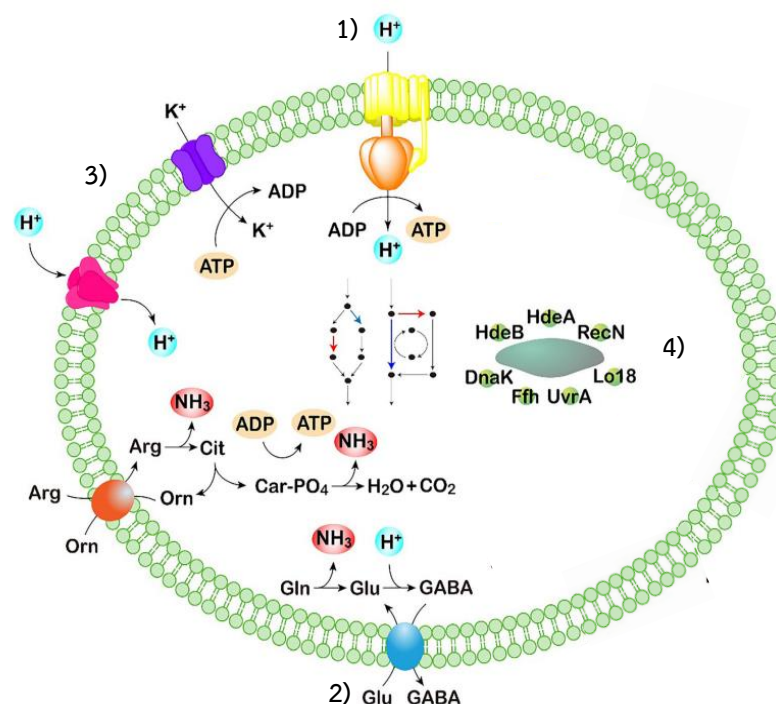
ที่มา: Khoka, 2020

4.3.2 โพรไบโอติกสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมือกลำไส้ คุณสมบัติในการยึดเกาะที่ดีสามารถช่วยส่งเสริม ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของลำไส้ โพรไบโอติกจะไปแย่งสารอาหาร และลดจำนวน แบคทีเรียก่อโรคที่เป็นอันตรายภายในลำไส้โดยการแข่งขันเพื่อยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมือก ลำไส้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า competitive exclusion (Lee et al., 2023) ซึ่งในงานวิจัยนี้ทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี 1) competition คือการบ่มร่วมกันระหว่างโพรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคเพื่อทดสอบการแข่งขันในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมือก ลำไส้ และ 2) exclusion คือการบ่มโพรไบโอติกก่อนเพื่อให้โพรไบโอติกไปยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมือก ลำไส้ ตามด้วยบ่มแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของโพรไบโอติกในการขัดขวางการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรค โดยมีรายงานว่าส่วนประกอบพื้นผิว ตัวอย่างเช่น mucus-binding proteins, lipoteichoic acid และ exopolysaccharides (Nantavisai et al., 2018) อ้างจาก Lebeer et al., 2008; Kleerebezem et al., 2010) ของ *Lactobacillus* มีส่วนช่วยในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมือก (Kleerebezem et al., 2010) ซึ่ง *Lactobacillus* บางสายพันธุ์จะมี mucus binding (MUB) protein และ/หรือ MucBP (MUCin-binding protein) เป็นโปรตีนที่ช่วยยึดเกาะกับพื้นผิวของโฮสต์โดยสร้างพันธะโควาเลนต์จับกับ peptidoglycan บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และสามารถพบ MUB ได้ในแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น ใน

L. plantarum มีชั้นเฉพาะ (MUC2 และ MUC3) ป้องกันการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ mucus ในลำไส้ (Alp and Kuleaşan, 2019 อ้างจาก Ouwehand et al., 2002; Collado et al., 2005; Bermudez-Brito et al., 2012) และผนังเซลล์ของ *Lactobacillus* มี Teichoic acid (TA) ทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกกับเซลล์เยื่อผิวของมนุษย์ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ไว้ด้านนอกเพื่อป้องกันสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น กรดและเกลือแร่ และ EPS ที่โพรไบโอติกสร้างขึ้นยังช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการยึดเกาะ การตั้งถิ่นฐานและการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายในทางเดินอาหารด้วย

4.3.3 โพรไบโอติกสามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือแร่ภายในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ ซึ่งภายในระบบทางเดินอาหารมีสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น ในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดสูง และมีการหลั่งน้ำดีในลำไส้เล็ก ซึ่งน้ำดีสามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไลปิด และกรดไขมัน ทั้งนี้ความสามารถในการทนต่อกรดของ *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์อาจเนื่องมาจากกลไกต่าง ๆ ได้แก่ 1) F_0F_1 -ATPase proton pump เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ ATPase พบได้ที่เซลล์เมมเบรน และมีส่วนเกี่ยวข้องในการรักษาสมดุลของค่า pH โดยการแลกเปลี่ยน H^+ และ K^+ เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารจึงสามารถมีชีวิตรอดได้เนื่องจากเกิดสภาวะเป็นกลางที่เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Macpherson et al., 2005) 2) Decarboxylation and deamination เป็นกลไกที่อาศัยเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) ไปเร่งปฏิกิริยา decarboxylation เปลี่ยน glutamate ให้เป็น γ -aminobutyric acid (GABA) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) นอกจากนี้ยังมี arginine deaminase (ADI) system เป็นกลไกที่อาศัยเอนไซม์ carbamate kinase (CK) ทำให้เกิดการแตกของโมเลกุล arginine ได้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และสามารถขับโปรตอนออกผ่าน H^+ -ATPase pump กลไกทั้งสองนี้มีการดึงโปรตอนมาใช้ในปฏิกิริยา จึงทำให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Guan et al., 2013; Reeve and Reid, 2016) 3) Cell membrane modification เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันและขนาด channel ของ H^+ -ATPase pump ทำให้ H^+ -ATPase pump มีประสิทธิภาพในการขับโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมได้ดีขึ้น ส่งผลให้สามารถทนต่อกรดได้ดีขึ้นด้วย (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Yang et al., 2014)

และ 4) Macromolecule protection and repair เป็นการป้องกันการรวมตัวของโปรตีน โดยอาศัย HdeA และ HdeB ที่เป็น periplasmic chaperone และซ่อมแซมความเสียหายของ DNA ที่เกิดจากรวด โดย UvrABCD, DNA polymerase และ DNA ligase (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Das et al., 2015) นอกจากนั้นความสามารถในการทนต่อกรดของ *Streptococcus* เท่าที่มีรายงานพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไก 1) F_0F_1 -ATPase proton pumps และ 4) Macromolecule protection and repair เท่านั้น (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Martin-Galiano et al., 2005; Kuhnert and Quivey, 2003; Shabayek and Spellerberg, 2017) แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 กลไกการทนต่อกรดของ *Lactobacillus*

1) F_0F_1 -ATPase proton pump; 2) Decarboxylation and deamination; 3) Cell membrane modification และ 4) Macromolecule protection and repair

ที่มา: ดัดแปลงจาก Guan and Liu, 2020

นอกจากนี้ยังมีรายงานกลไกในการทนต่อเกลือแร่ของ *Lactobacilli* มีดังนี้ 1) Metabolism of carbohydrate *Lactobacilli* จะสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย glucose เช่น glucose-6-phosphate dehydrogenase เพื่อผลิตพลังงานเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือแร่ และนำมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ รวมทั้ง bile efflux, fatty acid biosynthesis และ cell

wall architecture เป็นต้น 2) Cell envelope and lipid metabolism แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้สามารถทนต่อสภาวะที่มีเกลือแร่ได้ เนื่องจากมีชั้น exopolysaccharide (EPS) ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันจากเกลือแร่ที่จะไปทำลายหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไขมันและกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Alp and Aslim, 2010; Ruiz et al., 2013) 3) Bile efflux pump ใน lactobacilli จะมี pump ที่ทำหน้าที่ขับเกลือแร่และกรดน้ำดีออกจากไซโตพลาสซึม เรียกว่า multidrug efflux pump (MDR) ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อการทนเกลือแร่ของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น transporters ของ *L. acidophilus* NCFM ได้แก่ LBA1429, LBA1446, LBA1679 และ LBA1680 (Ruiz et al., 2013 อ้างจาก Pfeiler and Klaenhammer, 2009) 4) General stress response protein แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเสริมความแข็งแรงของโปรตีนและดีเอ็นเอให้เสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือแร่ โดยสร้าง heat shock protein เช่น DnaK, GroEL และ GroES (Bustos et al., 2018 อ้างจาก Siciliano and Mazzeo, 2012; Ruiz et al., 2016) ใน *L. fermentum* และ *L. reuteri* จะพบ GroEL (Bustos et al., 2018 อ้างจาก Bustos et al., 2015) และ 5) bile salt hydrolase (BSH) แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือแร่ได้เนื่องจากผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase โดยเอนไซม์นี้สลายเกลือแร่ผ่านกระบวนการ bile salt deconjugation ได้เป็นกรดน้ำดีอิสระที่ละลายน้ำได้น้อยลงทำให้เกิดการตกตะกอนและขับออกทางอุจจาระ

4.3.4 โพรไบโอติกสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรครภายในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบภายในลำไส้

มีงานวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่แยกจากน้ำลายและอุจจาระของคน ได้แก่ *L. fermentum*, *E. faecium*, และ *E. hire* ซึ่งทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไม่พบการย่อยสลายเม็ดเลือด (non-hemolytic) สามารถทนต่อกรด และเกลือแร่ และสามารถยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ได้ดี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2 (Bazireh et al., 2020)

มีรายงานว่าโพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเฉพาะที่นอกเหนือไปจากคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 (Liu and Pan, 2010; Nowak et al., 2022)

4.3.5 การต้านอนุมูลอิสระ

มีการศึกษาพบว่าโพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีความสามารถในการลดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress) โดยการดักจับสารอนุมูลอิสระหรือการป้องกันไม่ให้สร้างสารอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็งและเป็นสารก่อมะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งเจริญและยับยั้ง apoptosis ได้ (Wirasorn et al., 2014) โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 1) radical scavenging โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อทำให้อนุมูลอิสระเสถียรมากขึ้น 2) singlet oxygen quenching โดยสารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยน singlet oxygen ที่เป็นพิษต่อสารชีวโมเลกุลและทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ให้อยู่ในรูป triplet oxygen 3) metal chelation โดยสารต้านอนุมูลอิสระจับกับโลหะที่สามารถเร่ง oxidation ได้ เช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} จึงช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ 4) chain-breaking สารต้านอนุมูลอิสระจะไปรบกวนการรับอะตอมไฮโดรเจนของ peroxy ในขั้น propagation ป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จาก lipid peroxidation 5) synergism เป็นการทำงานร่วมกันของสารต้านอนุมูลเพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานได้ดีขึ้น และ 6) enzyme inhibitor สารประกอบประเภท phenolic บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (Phansawan B., 2013) ซึ่งแหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase เป็นต้น และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามิน และ glutathione เป็นต้น 2) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น BHT (butylated hydroxytoluene) นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งสามารถยับยั้ง lipid peroxidation ที่เป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสที่เปลี่ยนไป ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในปริมาณมาก อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจาก BHT มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Kulawik et al., 2013) ทำให้มีงานวิจัยที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ และมีงานวิจัยศึกษาความสามารถของ *L. rhamnosus* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SHA111, SHA112 และ SHA113 ที่แยกได้จากน้ำนมแม่ ซึ่ง cell-free supernatant ของทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH free radical, superoxide anion radical และ hydroxyl radical (Riaz Rajoka et al., 2019)

4.3.6 การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

โพรไบโอติกบางชนิดมีความสามารถการยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2 มีการศึกษาผลของ *L. acidophilus* ต่อเซลล์ Caco-2 โดยใช้วิธี MTT assay พบว่า supernatant และสารสกัดจาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2 และชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Isazadeh et al., 2020)

5. โพรไบโอติกและกลไกการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการพัฒนาของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่ง Dos Reis และคณะ (2017) และ Słizewska และคณะ (2021) ได้รายงานกลไกการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ของโพรไบโอติกไว้ดังนี้ (รูปที่ 9)

5.1 การปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้

ในสภาวะสมดุล (homeostasis) ของลำไส้จะมีความหลากหลายของแบคทีเรีย หากมีแบคทีเรียก่อโรคมะเร็ง (dysbiosis) ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและเพิ่มการผลิตสารก่อมะเร็ง เสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่มากขึ้น ซึ่งโพรไบโอติกสามารถลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคมะเร็งโดยการไปยึดเกาะกับลำไส้และแย่งสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมะเร็งได้ เช่น แบคเทอรีโอซิน รูเทอริน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดแลคติก เป็นต้น

5.2 การปรับเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในลำไส้

แบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์สามารถผลิตสารก่อมะเร็งได้จากอาหาร โดยมีกิจกรรมเอนไซม์บางชนิด เช่น azoreductase, β -glucosidase, β -glucuronidas และ nitrate reductase เอนไซม์เหล่านี้สามารถเปลี่ยน heterocyclic aromatic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons และ primary bile acids ให้เป็นสารก่อมะเร็ง และสังเคราะห์ aglycones, ammonia, cresols, phenols และ N-nitroso compound ซึ่งการเมแทบอลิซึมกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม และเซลล์ ทำให้เซลล์เจริญผิดปกติ และต้านอะพอพโทซิส ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียโดยการปรับกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้เป็นหนึ่งในกลไกที่สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

5.3 การผลิตสารประกอบที่มีความสามารถในการต้านมะเร็ง

5.3.1 Short-chain fatty acids (SCFA)

SCFA คือ ผลิตภัณฑ์หลักและผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่มีชีวิตในลำไส้เล็ก ได้แก่ acetic, propionic, butyric, valeric, caproic และ butyric acid ซึ่ง butyric acid ช่วยควบคุมความสมดุลระหว่างการเจริญ การแบ่งตัว และอะพอโทซิสของเซลล์ลำไส้ นอกจากนี้ butyric acid มีส่วนช่วยในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ เนื่องจากไปส่งเสริมการทำงานของ intestinal barrier โดยไปเพิ่มการผลิตเมือก และส่งเสริมการเจริญของเซลล์ลำไส้ปกติ นอกจากนี้ butyric acid ยังช่วยกระตุ้นการผลิต growth factors และ anti-inflammatory cytokines เช่น interleukin (IL)-10

5.3.2 Conjugated linoleic acid (CLA)

โพรไบโอติกสามารถผลิต conjugated linoleic acid (CLA) จาก linoleic acid (LA) กรดไขมันชนิดนี้ผลิตขึ้นในลำไส้เล็กส่วนปลาย ซึ่ง CLA มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอโทซิส (Bcl-2, caspase 3 และ 9) และการตอบสนองของเซลล์ต่อปัจจัยการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นการบริโภคโพรไบโอติกช่วยเพิ่มการผลิตกรดไขมัน CLA เพื่อส่งเสริมความสามารถในการต้านมะเร็ง

5.4 การกำจัดสารก่อมะเร็งในลำไส้

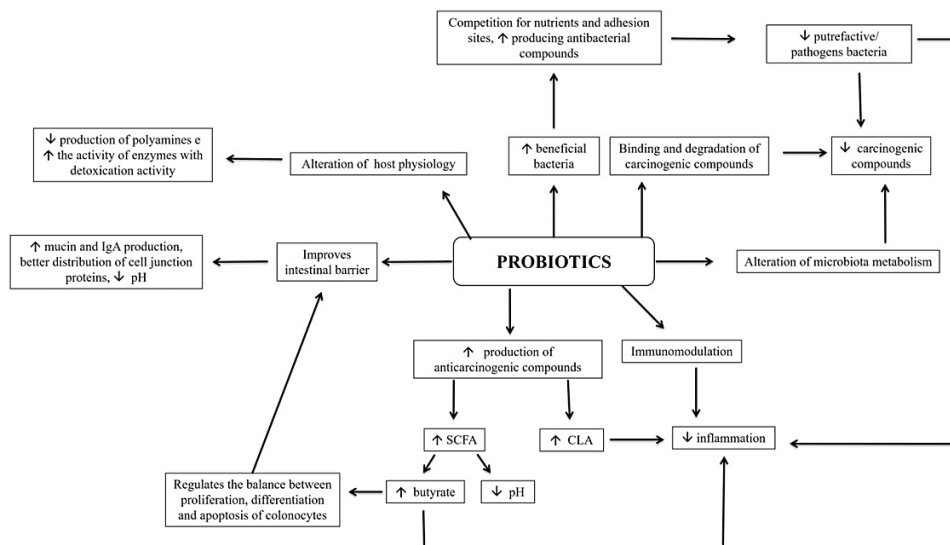
ผนังเซลล์ของโพรไบโอติกบางชนิดจะจับกับสารก่อมะเร็ง และขับสารก่อมะเร็งออกผ่านทางอุจจาระ นอกจากนี้โพรไบโอติกสามารถย่อยสลายสารก่อมะเร็ง dimethyl-nitrosamine และ volatile metabolites ซึ่ง amine เป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดเป็น dimethylamine ซึ่งโพรไบโอติกสร้างเมแทบอลิต์หรือ catalyze reactions ที่ทำให้เกิด amine detoxification

5.5 การเสริมภูมิคุ้มกัน

เมื่อเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะมี proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) ซึ่งโพรไบโอติกช่วยเพิ่มการผลิต anti-inflammatory cytokines และลดการผลิต proinflammatory cytokines ทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พัฒนาได้ช้าลง

5.6 การเสริมการป้องกันของ Intestinal barrier

โพรไบโอติกบางชนิดสามารถลดการซึมผ่านของลำไส้ และปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ intestinal barrier ได้แก่ การปรับ pH ของลำไส้ การผลิต mucin และ cellular junction proteins



รูปที่ 9 กลไกของโพรไบติกในการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

ที่มา: Dos Reis et al., 2017

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ เซลล์ และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
2. เซลล์เพาะเลี้ยง
Human colon epithelial cell (Caco-2, ATCC HTB-37™)
3. แบคทีเรียก่อโรค
 - 3.1 *Bacillus subtilis* TISTR 008
 - 3.2 *Escherichia coli* TISTR 887
 - 3.3 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287
 - 3.4 *Staphylococcus aureus* TISTR 885
 - 3.5 *Salmonella* Typhimurium TISTR 292
4. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย
 - 4.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Medium (Himedia)
 - 4.2 Nutrient broth (NB) (Himedia)
 - 4.3 Nutrient agar (NA)
 - 4.4 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Himedia)
5. อาหารเลี้ยงเซลล์
 - 5.1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich)
6. ชุดทดสอบสำเร็จรูป
 - 6.1 GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)
 - 6.2 PCR Enzymes and Master Mixes (Thermo Scientific)
 - 6.3 PCR Purification Kit (Favorgen)
7. เอนไซม์
 - 7.1 Proteinase K
 - 7.2 RNase A
8. ไพรมเมอร์
 - 8.1 Forward primer 27F: (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

8.2 Reverse primer 1492R: (5'-TACGGYTACCGTTACGACTT-3')

9. สารเคมีที่ใช้ทดสอบแบคทีเรีย

9.1 ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillin (10 µg/disc), erythromycin (15 µg/disc), gentamycin (10 UI), penicillin (10 units), tetracycline (30 µg/disc), vancomycin (30 µg/disc), clindamycin (2 µg/disc), chloramphenicol (30 µg/disc) และ sulfamethoxazole (23.75 µg/disc) (Oxoid™ Antimicrobial susceptibility disc)

9.2 1% Agarose gel

9.3 Distilled water

9.4 DPPH (2, 2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) (Alfa Aesar)

9.5 50% Ethanol

9.6 95% (v/v) Ethanol

9.7 15% Glycerol (Fisher Scientific)

9.8 Gram crystal violet

9.9 Gram iodine

9.10 Gram safranin

9.11 n-Hexadecane (Alfa Aesar)

9.12 1X TAE buffer

10. สารเคมีที่ใช้ทดสอบเซลล์

10.1 Fetal bovine serum (Sigma-Aldrich)

10.2 10X Phosphate-buffered saline (PBS) (Hyclone)

10.3 100 µg/ml Penicillin (Appliedchem)

10.4 Sodium bicarbonate solution (Sigma-Aldrich)

10.5 100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)

10.6 0.25% (w/v) Trypsin-EDTA (Hyclone)

10.7 0.1% (v/v) Triton-X (Merck)

10.8 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และเครื่องแก้ว

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องเจลอเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis: Bio-rad, Horizon)

เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation: Bio-Rad)

- 1.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (Microscope: Olympus DP72)
- 1.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope (Microscope: Invitrogen, EvosXL Core)
- 1.4 เครื่องปั่นแยก (Centrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5427)
- 1.5 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometer: Thermo, 2000C)
- 1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter: Metrohm, 730)
- 1.7 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer: Vision Scientific, KMC-13000V)
- 1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer: PG Instruments T70 UV/VIS

Spectrophotometer)

- 1.9 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer: Labconco)
 - 1.10 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Freezer: SANYO)
 - 1.11 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Freezer: ThermoScientific)
 - 1.12 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator: SANYO, MIR-253)
 - 1.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet: LABOGENE, Scanlaf Mars)
 - 1.14 ตู้เย็น (Refrigerator)
 - 1.15 ตู้อบแห้ง (Hot air oven: Memmert)
 - 1.16 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave: Hirayama)
 - 1.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: Fisher Scientific, ISOTHEMP 228)
 - 1.18 ตู้บ่มเชื้อแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber 90% N₂, 5% CO₂, and 5% H₂: Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI)
 - 1.19 ตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (CO₂ Incubator: Heracell™ VIOS 160i CO₂ Incubator Dual Chamber, 165 L per chamber, Electropolished Stainless Steel
 - 1.20 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine: Eppendorf™ Mastercycler™ Nexus Gradient)
 - 1.21 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW)
 - 1.22 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW)
2. อุปกรณ์และเครื่องแก้ว
- 2.1 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² (Cell Culture Flask, T25: Nunclon™ Delta Surface)

- 2.2 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm² (Cell Culture Flask, T75: Nunclon™ Delta Surface)
- 2.3 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
- 2.4 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 2.5 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 2.6 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
- 2.7 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
- 2.8 เมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.22 µm (FilterBio® Sterile syringe filters PES, 13 mm)
- 2.9 เมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.22 µm (FilterBio® Sterile syringe filters PES, 25 mm)
- 2.10 เมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 µm (FilterBio® Sterile syringe filters PES, 25 mm)
- 2.11 ไมโครเพลท ชนิด 24 หลุม ใช้หรับในงาน Cell Culture (Nunclon™ Delta Surface)
- 2.12 ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม ใช้หรับในงาน Cell Culture (Nunclon™ Delta Surface)
- 2.13 รางใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)
- 2.14 ห่วงเย็บเชื้อ (Loop)
- 2.15 หลอดแช่แข็ง (Cryo tube)
- 2.16 หลอดทดลอง (Test tube)
- 2.17 หลอดปั่นแยกขนาด 1.5 ml (Microcentrifuge tube)
- 2.18 หลอดปั่นแยกขนาด 15 ml (Centrifuge tube)
- 2.19 หลอดปั่นแยกขนาด 50 ml (Centrifuge tube)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยนำตัวอย่างมาทำ serial dilution ในสารละลาย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ และ spread ลงบนอาหาร de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อแบบไร้ออกซิเจน (90% N₂, 5% CO₂, and 5% H₂, COY Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันบนอาหาร MRS agar มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MRS agar มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการตรวจสอบการติดสีแกรม (gram staining) รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ทำได้โดยการเกลี่ยสารแขวนลอยแบคทีเรียลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดปล่อยให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 3-5 ครั้ง หยด crystal violet จนท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที ต่อมาล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา แล้วย้อมต่อด้วย Gram iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย 95% (v/v) ethanol แล้วย้อมต่อด้วย safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา นำสไลด์ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาการติดสีแกรม รูปร่าง ขนาด และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

3. การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์บริเวณ 16S rRNA gene

3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 3 ml บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการสกัด Genomic DNA ด้วย GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ดังกล่าว ปริมาตร 1.5 ml ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม Gram positive bacteria lysis buffer ปริมาตร 180 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม lysis solution ปริมาตร 200 μ l และ Proteinase K ปริมาตร 20 μ l บ่มใน water bath อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม RNase A Solution ปริมาตร 20 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม 50% ethanol ปริมาตร 400 μ l ย้าย cell lysate ลงใน GeneJET Genomic DNA Purification Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000xg เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash Buffer I ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000xg เป็นเวลา 1 นาที และเติม Wash Buffer II ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000xg เป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง GeneJET Genomic DNA Purification Column ที่ 12000xg เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง จากนั้นย้าย GeneJET Genomic DNA Purification Column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000xg เป็นเวลา 1 นาที เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rRNA gene ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีการข้อ 3.1 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene โดยใช้ forward primer 27F: (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ reverse primer 1492R: (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3') (Frank et al., 2008) โดยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3 และสถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 4 (Dubernet et al., 2002) โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler: Eppendorf™)

ตารางที่ 3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	1 reaction (µl)
27F (10 pmol/µl)	2.5
1492R (10 pmol/µl)	2.5
PCR master mix	12.5
DNA	1.0
Nanopure water	6.5
Total volume	25.0

ตารางที่ 4 สถานะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	} 35 cycles
Pre-denaturation	95	2.0	
Denaturation	95	0.5	
Annealing	50	1.0	
Extension	72	2.0	
Final extension	72	10.0	

3.3 วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.2 ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel เมื่อเจลแข็งตัวจึงนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท 1X TAE buffer ให้ท่วมเจล แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาผสมกับ loading dye และ load ลงในช่องเจล ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำเจลมาข้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10-20 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation: Bio-Rad)

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.2 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR Purification Kit (Favorgen) และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (A T G C Co., Ltd.) จากนั้นนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

4. การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในงานวิจัย

4.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากขั้นตอนที่ 1 มาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2 การเตรียมสารละลายส่วนใส (supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงขั้นตอนที่ 4.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนสารละลายใส (supernatant) ไว้ใช้ในการทดสอบ

4.3 การเตรียมตะกอนเซลล์ (cell pellet) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงขั้นตอนที่ 4.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS (pH 7.4) 2 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ (cell pellet) ไว้ใช้ในการทดสอบ

5. การทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก

5.1 การทดสอบทนกรด

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.3 มาละลายตะกอนด้วย PBS (pH 2.5) โดยให้มีเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 10^8 - 10^9 CFU/ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บผลโดยวิธีการ spread plate ที่เวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/ml) (Gharbi et al., 2019) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยคำนวณดังสมการ

$$\% \text{ Viability} = (\log \text{ CFU } N_1 / \log \text{ CFU } N_0) \times 100$$

โดยที่ N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น

N_1 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงสุดท้าย

5.2 การทดสอบทนเกลือน้ำดี

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.3 มาละลายตะกอนด้วย PBS ที่มี 0.3% bile salt โดยให้มีเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 10^8 - 10^9 CFU/ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บผลโดย

วิธีการ spread plate ที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/ml) (Haghshenas et al., 2014) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยคำนวณดังสมการ

$$\% \text{ Viability} = (\log \text{ CFU } N_1 / \log \text{ CFU } N_0) \times 100$$

โดยที่ N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น

N_1 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงสุดท้าย

5.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในขั้นตอนที่ 4.1 โดยให้มีเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 10^8 - 10^9 CFU/ml นำมา swab ลงบนอาหาร MRS agar และทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด โดยวาง antibiotic disc ได้แก่ ampicillin (10 µg/disc), erythromycin (15 µg/disc), gentamycin (10 UI), penicillin (10 units), tetracycline (30 µg/disc), vancomycin (30 µg/disc), clindamycin (2 µg/disc), chloramphenicol (30 µg/disc) และ sulfamethoxazole (23.75 µg/disc) (Oxoid™ Antimicrobial Susceptibility discs) โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น negative control แล้วปมที่สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วตรวจสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) และวิเคราะห์ข้อมูลตามเกณฑ์การวัดขนาด clear zone ของ Charteris และคณะ (1998) และ CLSI M100-S28

5.4 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-PicrylHydrazyl radical scavenging activity)

นำ supernatant ที่เตรียมไว้ตามวิธีการในขั้นตอนที่ 4.2 ปริมาตร 100 µl ผสมกับสารละลาย 0.4 mM DPPH ที่ละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 100 µl แล้วนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที ในที่มืด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และนำค่าที่ได้มาคำนวณคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity (%)) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐาน 0.5% (w/v) L-ascorbic acid ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ดัดแปลงวิธีทำจาก Riaz Rajoka et al., 2019 และรายงานผลเป็น DPPH radical scavenging activity (%) โดยคำนวณจาก

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดยที่ A_{sample} คือ absorbance ของ supernatant ที่ผสมกับ DPPH solution

A_{blank} คือ absorbance ของ 95% ethanol

A_{control} คือ absorbance ของน้ำกลั่นที่ผสมกับ DPPH solution

5.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion

5.5.1 นำ supernatant ที่เตรียมตามวิธีการในขั้นตอนที่ 4.2 มากรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.45 μm

5.5.2 เตรียมแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น $\sim 10^8$ CFU/ml เพื่อเตรียมเป็น inoculum ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

5.5.3 ใช้ไม้พันสำลี swab แบคทีเรียก่อโรคลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) หลังจากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm แล้วเติมส่วนสารละลายที่เตรียมไว้ลงในหลุม หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และรายงานผลขนาดของ clear zone (mm) ดัดแปลงการคำนวณจาก Vinderola และคณะ (2008) โดยคำนวณดังสมการ

$$\text{Clear zone (mm)} = \text{เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน}$$

6. การศึกษากับเซลล์ Caco-2

6.1 การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ Caco-2

6.1.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากวิธีการในขั้นตอนที่ 4.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 10 นาที ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง และละลายตะกอนเซลล์ใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ไม่เติม Fetal Bovine Serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น $\sim 10^8$ CFU/ml

6.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2

เพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 โดยใช้อาหาร DMEM ที่มี 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin และ 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นใช้ 0.25% (w/v) trypsin-EDTA ทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิว สำหรับลงใน 24-well plate ให้มีเซลล์เริ่มต้น หลุมละ $\sim 10^5$ cells/ml บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 21 วัน จนเซลล์มีลักษณะจำเพาะ (differentiation) ก่อนนำไปทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

6.1.3 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ Caco-2

เมื่อเซลล์ Caco-2 เจริญแล้วในขั้นตอนที่ 6.1.2 ล้างเซลล์ Caco-2 ด้วย PBS 2 ครั้งเพื่อล้างอาหารเก่าที่มียาปฏิชีวนะซึ่งจะไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก จากนั้นเติม cell suspension ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้ตามวิธีการในขั้นตอนที่ 6.1.1 ลงใน 24-well plate ที่มีเซลล์ Caco-2 บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เกาะกับเซลล์ Caco-2 ออกด้วย PBS 3 ครั้ง และใช้ 0.1% (v/v) Triton-X100 ปริมาตร 1 ml/well เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากเซลล์ Caco-2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำ serial dilution และ spread บน MRS agar และบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกาะติดเซลล์ Caco-2 โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ดัดแปลงวิธีทำจาก Fonseca และคณะ (2021) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ (Hojjati et al., 2020) ดังสมการ

$$\% \text{ adhesion} = (\text{Number of bacteria adhered} / \text{Total number bacteria added to well}) \times 100$$

6.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับเซลล์ Caco-2

6.2.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากวิธีการในขั้นตอนที่ 4.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 10 นาที ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ไม่เติม Fetal Bovine Serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น $\sim 10^8$ CFU/ml

6.2.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค

นำแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli* TISTR 887 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 มาเพาะเลี้ยงใน BHI broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 10 นาที และล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ไม่เติม fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะ โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น $\sim 10^8$ CFU/ml

6.2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2

เพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 โดยใช้อาหาร DMEM ที่มี 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml penicillin และ 100 µg/ml

streptomycin บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นใช้ 0.25% (w/v) trypsin-EDTA ทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิว สำหรับลงใน 24-well plate ให้มีเซลล์เริ่มต้น หลุมละ $\sim 10^5$ cells/ml บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 21 วัน จนเซลล์มีลักษณะจำเพาะ (differentiation) ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

6.2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรค

เมื่อเซลล์ Caco-2 เจริญแล้วในขั้นตอนที่ 6.2.3 ล้างเซลล์ Caco-2 ด้วย PBS 2 ครั้งเพื่อล้างอาหารเก่าที่มียาปฏิชีวนะซึ่งจะไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

- 1) competition: เติม cell suspension ของแบคทีเรียกรดแลคติก ($\sim 10^8$ CFU/ml) และแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* หรือ *S. Typhimurium* ($\sim 10^8$ CFU/ml) ลงใน 24-well plate ที่มีเซลล์ Caco-2 และบ่มร่วมกันในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2) exclusion: เติม cell suspension ของแบคทีเรียกรดแลคติก ($\sim 10^8$ CFU/ml) ลงใน 24-well plate ที่มีเซลล์ Caco-2 บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดูด cell suspension ของแบคทีเรียออก จากนั้นเติม cell suspension ของแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* หรือ *S. Typhimurium* ($\sim 10^8$ CFU/ml) และบ่มต่อในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เกาะกับเซลล์ Caco-2 ออกด้วย PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้นใช้ 0.1% (v/v) Triton-X100 ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 1 ml/well แยกแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากเซลล์ Caco-2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำ serial dilution และ spread ลงบน BHI agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียก่อโรคที่เกาะติดเซลล์ Caco-2 โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ดัดแปลงวิธีทำจาก Fonseca และคณะ (2021) และดัดแปลงการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ (Dangmanee et al., 2016) โดยคำนวณตามสมการ

$$\% \text{ Adhesion} = (N_1 / N_0) \times 100$$

โดยที่ N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น

N_1 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงสุดท้าย

6.3 การทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 โดยวิธี 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

6.3.1 การเตรียม lyophilized cell free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำ supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมตามวิธีการในขั้นตอน 4.2 ทำให้แห้งด้วยการแช่แข็ง (lyophilization) และนำ lyophilized cell free supernatant (LCFS) มาละลายใน DMEM และกรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.22 μm จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้น 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/ml (Sadeghi-Aliabadi et al., 2014) และนำไปใช้ทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2

6.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2

เพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 โดยใช้อาหาร DMEM ที่มี 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin และ 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นใช้ trypsin-EDTA ทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิว เพื่อเติมเซลล์ Caco-2 ลงใน 96-well plate ให้มีเซลล์เริ่มต้น หลุมละ $\sim 10^5$ cells/well และเติม DMEM ปริมาตร 200 μl บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเป็น monolayer ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2

6.3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2

นำเซลล์ Caco-2 ที่ได้จากขั้นตอน 6.3.2 มาแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติม LCFS ที่เตรียมไว้ตามวิธีการในขั้นตอนที่ 6.3.1 ปริมาตร 200 μl ลงไปใน 96-well plate ที่มีเซลล์ Caco-2 บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม MTT solution (5 mg/ml) ปริมาตร 20 μl ในแต่ละหลุม บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนเกิด formazan และละลายผลึก formazan ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100 μl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยใช้ microplate reader ซึ่งในการทดสอบนี้ใช้ 5-fluorouracil (5-FU) เป็น positive control (Guo et al., 2020; Faghfoori et al., 2021; Yue et al., 2022) และ MRS เป็น negative control เปรียบเทียบกับเซลล์ Caco-2 เป็นชุด control ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ Caco-2 โดยดัดแปลงวิธีทำจาก Faghfoori et al., 2021 และคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตตาม Dowdell et al., 2020 ดังสมการ

$$\% \text{ Viability} = (\text{OD of treated cells} / \text{OD of cells without treatment}) \times 100$$

7. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ผลการทดสอบที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way Analysis of Variance: ANOVA) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics Base 23.0 และตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับ control ด้วยวิธี Dunnett' multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($P < 0.05$)



บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ โยเกิร์ต (2 ตัวอย่าง) โยเกิร์ตพร้อมดื่ม (2 ตัวอย่าง) นมผงพร้อมมันเนย (1 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (2 ตัวอย่าง) สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท แบ่งเป็นคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นมจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ MD-1, MD-2, MD-3, MD-4, MD-6, MD-9 และ MD-11 และคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ MD-5, MD-7, MD-8 และ MD-10 แสดงแหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 11 ไอโซเลท ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้




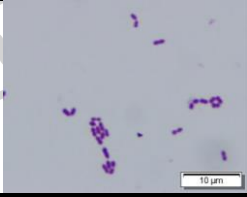

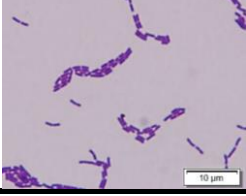
ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งที่มา
1	MD-1	โยเกิร์ต ตัวอย่างที่ 1
2	MD-2	โยเกิร์ต ตัวอย่างที่ 1
3	MD-3	โยเกิร์ต ตัวอย่างที่ 2
4	MD-4	โยเกิร์ต ตัวอย่างที่ 2
5	MD-5	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 1
6	MD-6	โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ตัวอย่างที่ 1
7	MD-7	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 2
8	MD-8	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 2
9	MD-9	นมผงพร้อมมันเนยสำหรับสตรีมีครรภ์และให้นมบุตร
10	MD-10	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 1
11	MD-11	โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ตัวอย่างที่ 2

2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาการติดสีแกรม และรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังตารางที่ 6


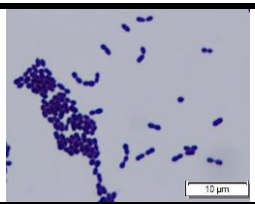


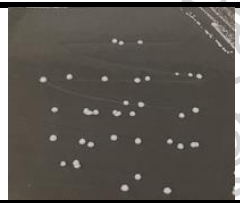
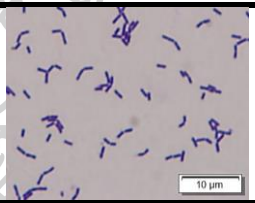

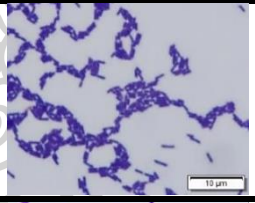


ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาการติดสีแกรมและศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 11 ไอโซเลท ติดสี crystal violet ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) และแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์รูปร่างเป็นท่อนจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ MD-1, MD-3, MD-5, MD-6, MD-7, MD-9, MD-10 และ MD-11 และรูปร่างทรงกลมจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ MD-2, MD-4 และ MD-8

ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000X)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar		สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
MD-1		กลม สีขาว ตรงกลางนูนมากกว่าขอบ (umbonate) ลักษณะขอบเป็นแบบคลื่น (undulate)		เซลล์มีลักษณะท่อนยาว ขนาด 0.48x9.85 μm
MD-2		กลม สีขาว ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะกลมรี ขนาด 0.84x0.92 μm
MD-3		กลม สีครีม ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.31x1.54 μm

หมายเหตุ บันทึกลักษณะโคโลนีตาม Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2020)


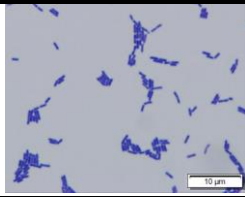
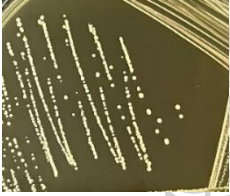
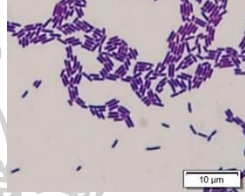
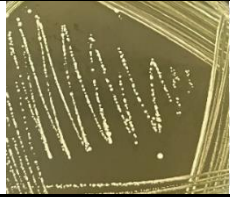
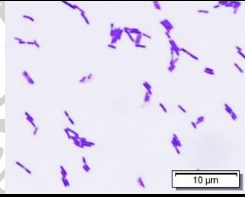
ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar		สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
MD-4		กลม สีขาว ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะกลมรี ขนาด 0.69x0.72 μm
MD-5		กลม สีครีม ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.50x1.93 μm
MD-6		กลม สีขาว ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.34x1.34 μm
MD-7		กลม สีครีม ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.34x1.60 μm
MD-8		กลม สีขาว ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะกลมรี ขนาด 0.71x0.98 μm

หมายเหตุ บันทึกลักษณะโคโลนีตาม Centers for Disease Control and Prevention (CDC),

2020

ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar		สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
MD-9		กลม สีครีม ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.29x1.28 μm
MD-10		กลม สีครีม ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.46x1.97 μm
MD-11		กลม สีขาว ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		เซลล์มีลักษณะท่อน ขนาด 0.38x1.85 μm

หมายเหตุ บันทึกลักษณะโคโลนีตาม Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020



3. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จำนวน 11 ไอโซเลท โดยนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rRNA gene แล้ววิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN แสดงผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene ดังตารางที่ 7

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ไอโซเลท สามารถระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Lactobacillus* จำนวน 5 ไอโซเลท *Lactocaseibacillus* จำนวน 3 ไอโซเลท และ *Streptococcus* จำนวน 3 ไอโซเลท โดยไอโซเลท MD-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.80 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท MD-3 และ MD-7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactocaseibacillus rhamnosus* 442 และ *Lactocaseibacillus rhamnosus* 2795 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 100.00 และ 99.93 เปอร์เซ็นต์ ชื่อเดิม *Lactobacillus rhamnosus* reclassified ใหม่ เป็น *Lactocaseibacillus rhamnosus* (Petrova et al., 2021) และไอโซเลท MD-6 มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactocaseibacillus paracasei* W1-D-5 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ชื่อเดิม *Lactobacillus paracasei* reclassified ใหม่ เป็น *Lactocaseibacillus paracasei* (Singhal et al., 2021) ไอโซเลท MD-5 และ MD-10 มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* 3335 และ *Lactobacillus plantarum* YLL-03 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.79 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท MD-9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus rhamnosus* HDB1311 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลท MD-11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus casei* F4S1 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท MD-2, MD-4 และ MD-8 มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Streptococcus thermophilus* 3284, *Streptococcus thermophilus* 3504 และ

Streptococcus thermophilus 4079 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.65, 94.26 และ 99.93 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Lactobacillus* และ *Lacticaseibacillus* (99.79-100.00% similarity) และ *Streptococcus* (94.26-99.93% similarity) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา โดยงานวิจัยของ Maragkoudakis และคณะ (2006) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมวัวและชีสและระบุสายพันธุ์ ได้เป็น *Lactobacillus* ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* และ *L. rhamnosus* ส่วนงานวิจัยของ Gad และคณะ (2014) รายงานว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์ยาและระบุลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีและพบ *Lactobacillus* spp. มากที่สุด (76.70 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ *Streptococcus* spp. (36.10 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนั้น Ispiril และคณะ (2017) รายงานว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากโยเกิร์ตแบบดั้งเดิมของตุรกี (Turkish yogurt) และระบุสายพันธุ์ด้วย 16S rRNA gene ได้เป็น *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *S. thermophilus* และ *Leuconostoc mesenteroides* และงานวิจัยของ Wang และคณะ (2019) ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากโยเกิร์ตและชีสได้ 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *L. bulgaricus* จำนวน 3 สายพันธุ์ และ *S. thermophilus* จำนวน 6 สายพันธุ์ และยังมีงานวิจัยของ Ngamsomchat และคณะ (2022) ที่รายงานว่าคัดแยก *Lactobacillus* จากอาหารหมักและผลิตภัณฑ์นมและระบุสายพันธุ์ด้วย 16S rRNA gene ได้เป็น *L. plantarum* JCM 1149 จำนวน 3 ไอโซเลท และ *L. fermentum* CIP102980 จำนวน 3 ไอโซเลท

ตารางที่ 7 ผลการจัดจำแนกแบบที่เรียกกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene

ไอโซเลท	Description	Strain	Accession No.	Pairwise Similarity	Length (bp)
MD-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CH 2	MW820921.1	99.80	1473
MD-2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	3284	MT613593.1	99.65	1421
MD-3	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	442	MT573091.1	100.00	1440
MD-4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	3504	MT538404.1	94.26	1449
MD-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3335	MT613628.1	99.79	1435
MD-6	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	W1-D-5	OK272160.1	100.00	1497
MD-7	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	2795	MT611795.1	99.93	1432
MD-8	<i>Streptococcus thermophilus</i>	4079	MT544658.1	99.93	1436
MD-9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HDB1311	MT322928.1	99.93	1456
MD-10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	YLL-03	MN636335.1	100.00	1470
MD-11	<i>Lactobacillus casei</i>	F4S1	KF245546.1	100.00	1458

4. การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก

4.1 ผลการทดสอบการทนต่อกรด

การทนกรดเป็นคุณสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก เนื่องจากในกระเพาะอาหารของมนุษย์มีค่า pH อยู่ในช่วง 1.5-4.5 ซึ่งเป็นค่า pH ตั้งแต่ก่อนจนถึงหลังรับประทานอาหาร (Nami et al., 2018) และอาหารจะอยู่ในกระเพาะอาหารเป็นเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง ที่ผ่านมามีการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการทนกรดโดยใช้ phosphate buffer saline (PBS) ที่ปรับ pH 2.0-3.0 เพื่อจำลองสภาวะที่เกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของมนุษย์ (Tokatl et al., 2015; Lee et al., 2016; Nami et al., 2018) ในงานวิจัยนี้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) โดยทดสอบการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/ml) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Tukey's test แสดงผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดังตารางที่ 8

ผลการทดสอบการทนต่อกรด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลท และ *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.20-9.54 log CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 1.46-7.35 log CFU/ml ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 16.35-85.77 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 85.77 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการทนต่อกรดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) กับแบคทีเรียอื่นที่ทดสอบ รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 58.31 และ 54.21 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-4 (*S. thermophilus* 3504), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 50.76, 50.47, 42.49, 37.83, 32.82, 29.49, 19.77 และ 16.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบการรอดชีวิตของไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) และ *L. curvatus* TISTR 938

จากผลทดสอบการทนต่อกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกในงานวิจัยนี้ พบว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้ โดย *L. acidophilus* TISTR 2365 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 85.77 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bujnakova และ Strakova (2017) ที่คัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 4 ไอโซเลท จากผลิตภัณฑ์ทางการค้า พบว่า *L. acidophilus* จากโยเกิร์ต (Danone) สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 58.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haghshenas และคณะ (2015) ที่คัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 6 ไอโซเลท จากโยเกิร์ต พบว่า *L. paracasei* 19M และ *L. paracasei* 13M สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 57 และ 63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ความสามารถในการทนต่อกรดของ *Lactobacillus* อาจเนื่องมาจากกลไกต่าง ๆ ได้แก่ 1) F_0F_1 -ATPase proton pump 2) Decarboxylation and deamination 3) Cell membrane modification และ 4) Macromolecule protection and repair ตัวอย่างเช่น *L. acidophilus* จะอาศัย F_0F_1 -ATPase proton pump เป็นกลไกหลักในการควบคุมค่า pH ซึ่งเอนไซม์ ATPase ที่บริเวณเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย จะมีส่วนช่วยในการแลกเปลี่ยน H^+ และ K^+ ในสภาวะที่เป็นกรด (Kullen and Klaenhammer, 1999) สำหรับ *L. acidophilus* NCFM จะอาศัยกลไก glutamate decarboxylase (GAD) system ที่ช่วยในการทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร (Wang et al, 2018) ผ่านปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดกลูตามิกและเกลือของกรดกลูตามิก ได้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และสามารถขับโปรตอนออกผ่านทาง H^+ -ATPase pump ส่วนการทนต่อกรดของ *Streptococcus* เท่าที่มีรายงานพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไก 1) F_0F_1 -ATPase proton pumps และ 4) Macromolecule protection and repair เท่านั้น (Guan and Liu, 2020)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ไอโซเลท	strain	log CFU/ml		Viability (%)
		0h	2h	
MD-1	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CH 2	8.31±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00 ^a
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	8.20±0.03	2.69±0.03	32.82±0.34 ^{cd}
MD-3	<i>Lacti. rhamnosus</i> 442	8.75±0.12	2.58±0.09	29.49±1.03 ^c
MD-4	<i>S. thermophilus</i> 3504	8.30±0.08	4.19±0.63	50.47±7.63 ^f
MD-5	<i>L. plantarum</i> 3335	9.30±0.02	3.52±0.07	37.83±0.79 ^{de}
MD-6	<i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5	8.64±0.09	5.04±0.04	58.31±0.46 ^g
MD-7	<i>Lacti. rhamnosus</i> 2795	9.11±0.07	4.94±0.13	54.21±1.47 ^{fg}
MD-8	<i>S. thermophilus</i> 4079	9.00±0.04	3.83±0.04	42.49±0.39 ^e
MD-9	<i>L. rhamnosus</i> HDB1311	8.82±0.11	4.48±0.03	50.76±0.33 ^f
MD-10	<i>L. plantarum</i> YLL-03	8.67±0.11	1.72±0.12	19.77±1.41 ^b
MD-11	<i>L. casei</i> F4S1	8.93±0.05	1.46±0.15	16.35±1.69 ^b
TISTR 2365	<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	8.57±0.06	7.35±0.11	85.77±1.26 ⁱ
TISTR 938	<i>L. curvatus</i> TISTR 938	9.54±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00 ^a

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ a-i แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P<0.05)

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี

การทนต่อเกลือน้ำดีเป็นคุณสมบัติพื้นฐานที่สำคัญของโพรไบโอติก โดยน้ำดีที่หลังในลำไส้เล็กมีความเข้มข้นประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Kusada et al., 2021 อ้างจาก Prasad et al., 1998) จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่มีส่วนประกอบหลักคือ ไขมันและกรดไขมัน อาจส่งผลต่อการซึมผ่านของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ และการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (Succi et al., 2005) ดังนั้นคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดีจึงส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในลำไส้เล็ก ในงานวิจัยนี้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ โดยทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/ml) ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำและวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Tukey's test แสดงผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดังตารางที่ 9

ผลการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงได้ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.20-9.32 log CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 0.83-8.53 log CFU/ml ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 8.86-99.50 เปอร์เซ็นต์ โดย MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 99.50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) กับไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 97.12 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) กับ ไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F451) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 91.77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-8 (*S. thermophilus* 4079), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), *L. acidophilus* TISTR 2365, MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ *L. curvatus* TISTR 938 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 67.07, 67.02, 65.91, 61.09, 46.79, 41.77 และ 8.86 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไม่พบการรอดชีวิตของไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504)

จากผลทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกในงานวิจัยนี้พบว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่ที่ทดสอบสามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) โดย MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) ได้ดีที่สุด (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 99.50 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่างานวิจัยของ Nami และคณะ (2018) ที่คัดแยก *L. plantarum* จำนวน 16 ไอโซเลท จากผลิตภัณฑ์นม พบว่าทุกไอโซเลทที่ทดสอบสามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้ โดย *L. plantarum* DP3 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 84.30 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Nath และคณะ (2020) ที่คัดแยก *L. plantarum* GCC_19M1 จากนมหมัก พบว่าสามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 83.70 เปอร์เซ็นต์

ทั้งนี้ความสามารถในการทนเกลือน้ำดีอาจเนื่องมาจากในสภาพที่มีเกลือน้ำดี *Lactobacillus* สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย glucose เพื่อผลิตพลังงานเพิ่มมากขึ้นและนำมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีชั้น exopolysaccharide (EPS) ทำหน้าที่

เป็นเกราะป้องกันจากเกลือแร่ที่จะไปทำลายหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันและกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ และมี bile efflux pump ที่หน้าที่ขับเกลือแร่และกรดน้ำดีออกจากไซโตพลาสซึม (Alp and Aslim, 2010; Ruiz et al., 2013)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อเกลือแร่ (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ไอโซเลท	strain	log CFU/ml		Viability (%)
		0h	3h	
MD-1	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CH 2	8.41±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00 ^a
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	8.20±0.03	5.50±0.05	67.02±0.67 ^d
MD-3	<i>Lacti. rhamnosus</i> 442	9.15±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00 ^a
MD-4	<i>S. thermophilus</i> 3504	8.43±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00 ^a
MD-5	<i>L. plantarum</i> 3335	8.78±0.03	8.53±0.01	97.12±0.17 ^{ef}
MD-6	<i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5	8.69±0.12	4.06±0.03	46.79±0.30 ^c
MD-7	<i>Lacti. rhamnosus</i> 2795	8.91±0.04	5.88±0.07	65.91±0.75 ^d
MD-8	<i>S. thermophilus</i> 4079	8.79±0.05	5.90±0.08	67.07±0.92 ^d
MD-9	<i>L. rhamnosus</i> HDB1311	8.82±0.11	3.68±0.13	41.77±1.49 ^c
MD-10	<i>L. plantarum</i> YLL-03	8.58±0.09	8.53±0.04	99.50±0.46 ^f
MD-11	<i>L. casei</i> F4S1	8.93±0.05	8.19±0.07	91.77±0.75 ^e
TISTR 2365	<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	8.54±0.07	5.22±0.05	61.09±0.62 ^d
TISTR 938	<i>L. curvatus</i> TISTR 938	9.32±0.01	0.83±0.75	8.86±8.09 ^b

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ a-f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P<0.05)

จากการทดสอบคุณสมบัติในการทนต่อกรดและเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ไอโซเลทและแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ พบว่าไอโซเลทที่ไม่สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้แก่ MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) และ *L. curvatus* TISTR 938 และไอโซเลทที่ไม่สามารถทนต่อเกลือแร่ (0.3% w/v) ได้แก่ MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504) จึงถูกคัดออกจากการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกในขั้นตอนต่อไป ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหลือจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ MD-2, MD-5, MD-6, MD-7, MD-8, MD-9, MD-10 และ MD-11 และ *L. acidophilus*

TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้ (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 8.25-85.77 เปอร์เซ็นต์) และทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) ได้ (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 16.35-99.50 เปอร์เซ็นต์) จึงนำไปทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก ได้แก่ การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2

4.3 ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

การรับประทานยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานอาจส่งผลกระทบต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งกลไกของยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่นอกจากจะไปทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคแล้วยังทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่นด้วย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ภายในลำไส้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบของทางเดินอาหารส่วนต้น หรือทำให้เกิดท้องเสียได้ (Auputinan, 2020) ในขั้นตอนนี้จึงนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลทและ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี มาทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ โดยยาปฏิชีวนะที่ทดสอบแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) cell wall synthesis inhibitor ได้แก่ penicillin และ ampicillin 2) protein synthesis inhibitor ได้แก่ erythromycin, clindamycin, tetracycline, gentamycin, vancomycin และ chloramphenicol 3) nucleic acid synthesis inhibitor ได้แก่ sulfamethoxazole ด้วยวิธี disc diffusion และวิเคราะห์ข้อมูลขนาด clear zone ของ *Lactobacillus* เปรียบเทียบกับเกณฑ์ตามวิธีของ Charteris และคณะ (1998) แสดงผลดังตารางที่ 10 และ *S. thermophilus* เปรียบเทียบกับเกณฑ์ตามวิธีของ CLSI M100-S28 แสดงผลดังตารางที่ 11

ผลการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ พบว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (R) 4 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole, vancomycin และ penicillin และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ปานกลาง (I) 2 ชนิด ได้แก่ clindamycin และ tetracycline แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (S) 3 ชนิด ได้แก่ erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

ไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) และ MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (R) 3 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ในระดับปานกลาง (I) 1 ชนิด ได้แก่ penicillin

แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (S) 5 ชนิด ได้แก่ clindamycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (R) 3 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (S) 6 ชนิด ได้แก่ penicillin, clindamycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

L. acidophilus TISTR 2365 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (R) 3 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole และ clindamycin แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (S) 6 ชนิด ได้แก่ vancomycin, penicillin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin แสดงดังตารางที่ 10

และผลการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของ *S. thermophilus* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ MD-2 (*S. thermophilus* 3284) และ MD-8 (*S. thermophilus* 4079) ต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 ชนิด และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เกณฑ์ตามวิธีของ CLSI M100-S28 พบว่า *S. thermophilus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (S) 5 ชนิด ได้แก่ vancomycin, clindamycin, tetracycline, erythromycin และ chloramphenicol ส่วนยาปฏิชีวนะอีก 4 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole, penicillin และ ampicillin ไม่มีรายงานใน CLSI M100-S28 แสดงดังตารางที่ 11

จากผลทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (R) gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin ยกเว้น *L. acidophilus* TISTR 2365 และในงานวิจัยนี้ยังพบว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้มากกว่าทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ โดยต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้มากที่สุด 4 ชนิด ได้แก่ gentamycin, vancomycin, sulfamethoxazole และ penicillin และต้านทานต่อยา clindamycin และ tetracycline ได้ในระดับปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Anisimova และ Yarullina (2019) ที่ศึกษาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *L. plantarum* จำนวน 12 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นมและผักดอง พบว่า *L. plantarum* ส่วนใหญ่ที่ทดสอบสามารถต้านทานต่อยา gentamycin และ vancomycin ได้ แต่มีความไวต่อยา erythromycin,

chloramphenicol และ ampicillin นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides (gentamicin, kanamycin, streptomycin และ neomycin), ciprofloxacin และ trimethoprim และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ chloramphenicol, tetracycline, erythromycin, linezolid และ quinupristin-dalforistin (Campedelli et al., 2019 อ้างจาก Abriouel et al., 2015)

การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* อาจเนื่องมาจาก *Lactobacillus* บางชนิดมี intrinsic resistance ต่อยา vancomycin และยาในกลุ่ม aminoglycoside เช่น gentamycin เป็นต้น (Sharma et al., 2014) โดยในแบคทีเรียทั่วไป vancomycin จะจับกับ D-alanine terminus ของ peptidoglycan ซึ่งใน *L. plantarum* มีการผลิตเอนไซม์ D-Ala-D-Lac ligase (DdlLp) ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ depsipeptide และมีเอนไซม์ D-lactate dehydrogenase ที่ผลิต D-lactate โดย D-lactate จะแทนที่ D-alanine ทำให้ความสามารถในจับกับ vancomycin น้อยลง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ vancomycin binding site ที่ peptidoglycan นี้จึงช่วยป้องกันการจับกันระหว่าง vancomycin กับ peptidoglycan ของแบคทีเรียกรดแลคติก ส่งผลให้เกิดการต้านทานต่อ vancomycin (Goldstein et al., 2021 อ้างจาก Gueimonde et al., 2013) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่ายาในกลุ่ม nucleic acid synthesis inhibitor เช่น sulfamethoxazole มีผลในการยับยั้ง *Lactobacillus* ได้ต่ำ เป็นสาเหตุที่ทำให้ *Lactobacillus* ต้านทานต่อยาในกลุ่มนี้ได้ (Gueimonde et al., 2013) ทั้งนี้กลไกการต้านต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับชนิดของยาปฏิชีวนะ ตำแหน่งเป้าหมาย สายพันธุ์ของแบคทีเรีย รวมไปถึงพลาสมิดและการกลายพันธุ์ของโครโมโซม (Sharma et al., 2014) นอกจากนั้น *Lactobacillus* บางชนิดมีการต้านต่อยาปฏิชีวนะผ่านกลไกที่อาศัย multidrug resistance (MDR) transporter และมีรายงานว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์มีความไวต่อยา ampicillin เนื่องจากยาปฏิชีวนะในกลุ่ม cell wall synthesis inhibitor จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (Sharma et al., 2014)

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ *Lactobacillus* จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ Charteris และคณะ (1998)

ไอโซเลท	strain	Gentamycin	Sulfamethoxazole	Vancomycin	Penicillin	Clindamycin	Tetracycline	Erythromycin	Chloramphenicol	Ampicillin
MD-5	<i>L. plantarum</i> 3335	R	R	R	R	I	I	S	S	S
MD-10	<i>L. plantarum</i> YLL-03	R	R	R	R	I	I	S	S	S
MD-7	<i>Lacti. rhamnosus</i> 2795	R	R	R	I	S	S	S	S	S
MD-9	<i>L. rhamnosus</i> HDB1311	R	R	R	I	S	S	S	S	S
MD-6	<i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5	R	R	R	S	S	S	S	S	S
MD-11	<i>L. casei</i> F451	R	R	R	S	S	S	S	S	S
TISTR 2365	<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	R	R	S	S	R	S	S	S	S

หมายเหตุ R=Resistant (ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้), I=Intermediate (ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ระดับปานกลาง), S=Susceptible (ไวต่อยาปฏิชีวนะ)

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ *S. thermophilus* จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ CLSI M100-S28

ไอโซเลท	strain	Gentamycin	Sulfamethoxazole	Vancomycin	Penicillin	Clindamycin	Tetracycline	Erythromycin	Chloramphenicol	Ampicillin
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	*	*	S	*	S	S	S	S	*
MD-8	<i>S. thermophilus</i> 4079	*	*	S	*	S	S	S	S	*

หมายเหตุ R=Resistant (ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้), I=intermediate (ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ระดับปานกลาง), S=Susceptible (ไวต่อยาปฏิชีวนะ), สัญลักษณ์ * ; ไม่มีรายงานใน CLSI M100-S28

4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-Hydrazyl radical scavenging activity)

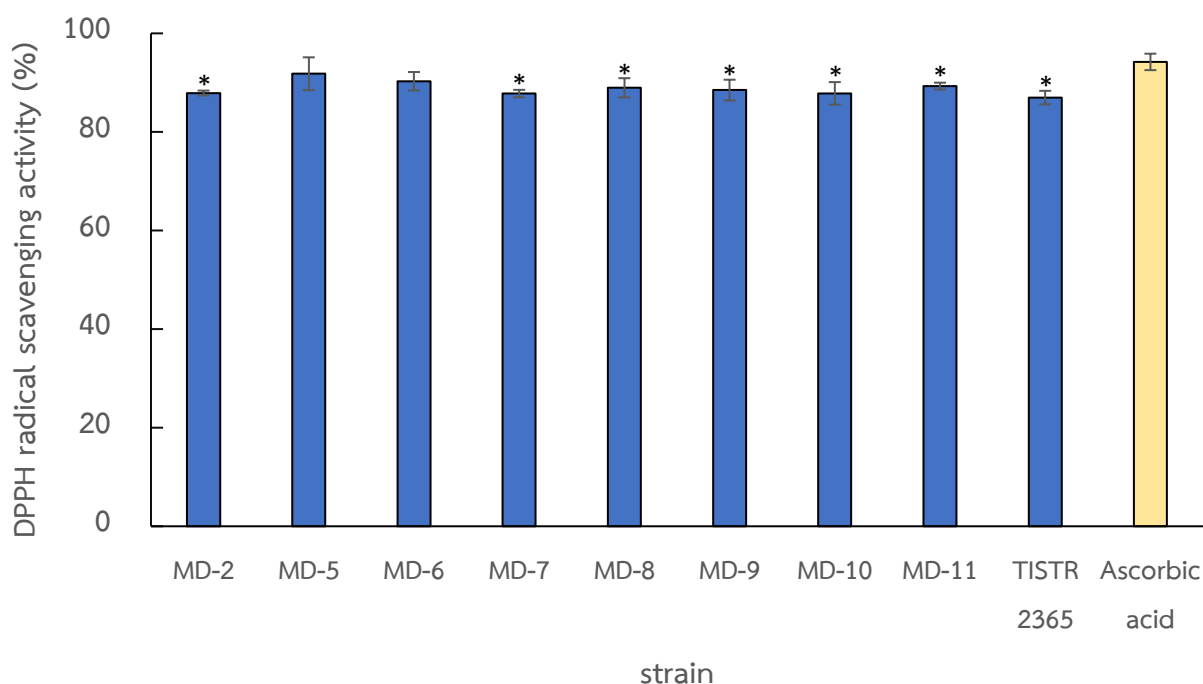
อนุมูลอิสระเป็นสารที่มี unpaired electron ทำให้สารนั้นไม่เสถียรและไวต่อปฏิกิริยา อนุมูลอิสระจะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปทำให้เกิดความสมดุล ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากทำให้ไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระ (oxidative stress) เป็นสาเหตุของการเกิดโรค ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Tian et al., 2022) ทั้งนี้แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) และ 2) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่าการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในปริมาณมากอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ก่อให้เกิดมะเร็งและทำลายตับ (Riaz Rajoka, et al., 2019 อ้างจาก Wang et al., 2009) ทำให้มีงานวิจัยที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ (Shi et al., 2019; Adelekan et al., 2020) ในงานวิจัยนี้ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลทและ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกเบื้องต้น ได้แก่ การทนต่อกรดและเกลือน้ำดี และการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5% (w/v) L-ascorbic acid และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Dunnett' multiple range test แสดงผลเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระดังรูปที่ 10

ผลจากการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดย 0.5% (w/v) L-ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน (control) มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 94.21 และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลทและ *L. acidophilus* TISTR 2365 มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 86.97-91.81 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 91.81 เปอร์เซ็นต์ ลำดับต่อมา ได้แก่ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) กับ 0.5% (w/v) L-ascorbic acid ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-11 (*L. casei* F4S1), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-7 (*Lacti.*

rhamnosus 2795) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 89.30, 88.96, 88.50, 87.90, 87.82, 87.79 และ 86.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) กับ 0.5% (w/v) L-ascorbic acid

จากผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี DPPH ในงานวิจัยนี้พบว่า *Lactobacillus* และ *Streptococcus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ โดย MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 91.81 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่างานวิจัยของ Shi และคณะ (2019) ที่รายงานว่าคัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 322 สายพันธุ์ จากชีสแบบดั้งเดิมและทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อกรด การทนต่อเกลือน้ำดี และความสามารถในการอยู่รอดภายในระบบทางเดินอาหารจำลอง และคัดเลือก *Lactobacillus* จำนวน 23 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า *L. plantarum* subsp. *plantarum* W2/KX261527.1 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 39.3 เปอร์เซ็นต์) และงานวิจัยของ Riane และคณะ (2019) รายงานว่าคัดแยก *L. plantarum* จากน้ำนมและศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH จากการทดสอบ *Lactobacillus* จำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่า *L. plantarum* 15 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ เท่ากับ 75.21 เปอร์เซ็นต์)

ซึ่งความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการต้านอนุมูลอิสระ อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีส่วนประกอบหรือสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ exopolysaccharide, bioactive peptide และ antioxidant enzyme เช่น NADH oxidase, glutathione reductase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น (Abdullah Al-Dhabi et al., 2020 อ้างจาก Wojcik et al., 2010; Arasu et al., 2013) และมีรายงานว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกยึดเกาะกับลำไส้จะผลิตเมแทบอลิต์หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ และแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสารเมแทบอลิต์เหล่านี้สามารถช่วยกำจัด reactive oxygen species (ROS) เป็นการปรับสมดุล oxidation และ reduction ในลำไส้ได้ (Kim et al., 2022) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรไบโอติกสามารถป้องกันการเกิด oxidative stress โดยการกำจัด ROS, chelation of metal ion และการลด ascorbate autoxidation (Kim et al. 2022 อ้างจาก Tang et al., 2018)



รูปที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl)

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

กำหนดให้ MD-2: *S. thermophilus* strain 3284, MD-5: *L. plantarum* strain 3335, MD-6: *Lacti. paracasei* strain W1-D-5, MD-7: *Lacti. rhamnosus* strain 2795, MD-8: *S. thermophilus* strain 4079, MD-9: *L. rhamnosus* strain HDB1311, MD-10: *L. plantarum* strain YLL-03 และ MD-11: *L. casei* strain F4S1,

สัญลักษณ์ * : แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเทียบกับ control (P<0.05)

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion

ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ กลุ่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งในทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีสุขภาพดีจะมีสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มากกว่าจุลินทรีย์ที่ก่อโรค หากมีจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคมักอาจเป็นสาเหตุการติดเชื้อในทางเดินอาหารและมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสียได้ ตัวอย่างของแบคทีเรีย

ก่อโรคในทางเดินอาหาร ได้แก่ *E. coli* และ *S. aureus* เป็นต้น (Arqués et al., 2015) ทั้งนี้ คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเป็นคุณสมบัติโพรไบโอติกที่สำคัญอย่างหนึ่ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลทและ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี การต้านยาปฏิชีวนะ และการต้านอนุมูลอิสระ มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยวิธี agar well diffusion และวิเคราะห์ข้อมูลขนาด clear zone (mm) ด้วย Tukey's test แสดงผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรสดังตารางที่ 12 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm) ดังตารางที่ 13

ผลการทดสอบพบว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่สุด โดยมี clear zone ขนาด 10.33, 10.33, 10.00, 10.00, 9.00 และ 8.67 mm ตามลำดับ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) กับ *L. acidophilus* TISTR 2365 และไอโซเลท MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ MD-2 (*S. thermophilus* 3284) สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้ มี clear zone ขนาด 4.67, 3.00 และ 3.00 mm ตามลำดับ

ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด มี clear zone ขนาด 9.00 mm แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P > 0.05$) กับไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) โดยมี clear zone ขนาด 8.33, 8.33, 8.33 และ 8.00 mm ตามลำดับ ทั้งนี้ทั้ง 4 ไอโซเลทไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P > 0.05$) กับไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ มีขนาด clear zone ขนาด 7.67 mm แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 6 ไอโซเลทที่กล่าวข้างต้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) กับ *L. acidophilus* TISTR 2365 ซึ่งสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ มีขนาด clear zone ขนาด 3.33 mm ส่วนไอโซเลท MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ MD-2 (*S. thermophilus* 3284) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้

ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด โดยมี clear zone ขนาด 9.67, 9.33, 9.33 และ 9.33 mm ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) กับไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ โดยมี clear zone ขนาด 7.33 และ 7.00 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ MD-2 (*S. thermophilus* 3284) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้

ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด โดยมี clear zone ขนาด 9.33, 9.00, 9.00 และ 8.33 mm ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) กับไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้ ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลทมี clear zone ขนาด 6.67 mm ส่วนไอโซเลท MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ MD-2 (*S. thermophilus* 3284) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* ได้

ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมี clear zone ขนาด 7.00, 7.00 และ 6.33 mm ตามลำดับ โดยไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P > 0.05$) กับไอโซเลท MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ มี clear zone ขนาด 6.00 และ 5.67 mm ตามลำดับ ไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ มี clear zone ขนาด 5.00 mm ส่วนไอโซเลท MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ MD-2 (*S. thermophilus* 3284) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้

จากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335),

MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยของ clear zone ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ สูงที่สุด อยู่ในช่วง 7.00-10.33 mm ซึ่งมีการวิจัยของ Gharbi และคณะ (2019) รายงานว่า *L. plantarum* 9 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของมนุษย์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* โดยมี clear zone ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ เฉลี่ยอยู่ในช่วง 12.00-15.00 mm และงานวิจัยของ Saboori และคณะ (2022) คัดแยก *L. plantarum* PM411 (KK5) จากผลิตภัณฑ์นมหมักของอิหร่านและทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด และยับยั้ง *P. aeruginosa* PTCC 1707 และ *S. Typhimurium* ATCC 14028 ได้ปานกลาง

ส่วน *S. thermophilus* ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้สามารถยับยั้งได้เพียง *B. subtilis* TISTR 008 ซึ่งงานวิจัยของ Yerlikaya และคณะ (2021) ที่คัดแยก *S. thermophilus* จากโยเกิร์ตและศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่า *S. thermophilus* จำนวน 9 ไอโซเลท มีเพียง 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ เช่น *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 9027

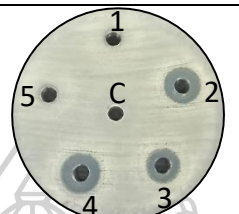
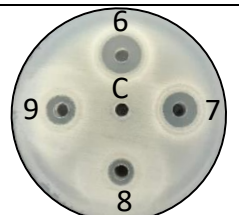
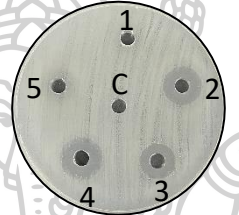
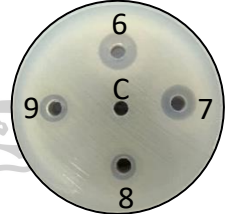
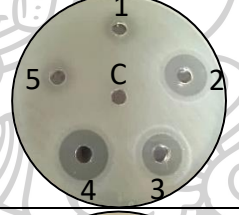
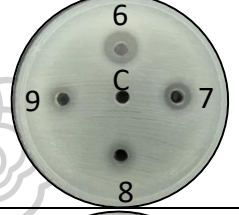
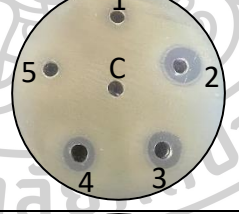
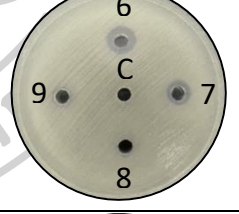
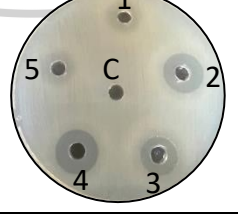
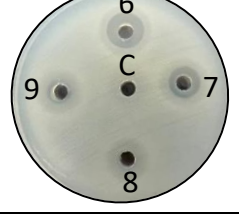
ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไดอะซีติล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น มีงานวิจัยของ Reis และคณะ (2012) รายงานว่าสารเมแทบอลิต์หลักที่ได้จากการหมักน้ำตาลแลคโตส คือ กรดแลคติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถลดค่า pH ในลำไส้ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Prabhurajeshwar และ Chandrakanth (2018) รายงานว่าแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ตัวอย่างของแบคเทอริโอซิน เช่น nisin ที่ผลิตจาก *L. lactis* และ lactacin B ที่ผลิตจาก *L. acidophilus* ซึ่งแบคเทอริโอซินเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้ง

แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด รวมทั้ง *S. Typhimurium* SL1344 และ *E. coli* C1845 (Śliżewska et al., 2021)

จากผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลทและ *L. acidophilus* TISTR 2365 ในงานวิจัยนี้ พบว่าไอโซเลท MD-2 และ MD-8 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ จึงถูกคัดออกจากการทดสอบคุณสมบัติโพรบิโอติกในขั้นตอนต่อไป ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ MD-5, MD-6, MD-7, MD-9, MD-10 และ MD-11 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 จะนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรบิโอติกในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2



ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค ที่ใช้ในการทดสอบ	ผลการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion	
<i>B. subtilis</i> TISTR 008		
<i>E. coli</i> TISTR 887		
<i>P. aeruginosa</i> TISTR 1287		
<i>S. aureus</i> TISTR 885		
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 292		

หมายเหตุ รูปประกอบเป็นตัวแทนจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

กำหนดให้ (1); MD-2: *S. thermophilus* strain 3248, (2); MD-5: *L. plantarum* strain 3335, (3); MD-6: *Lacti. paracasei* strain W1-D-5, (4); MD-7: *Lacti. rhamnosus* strain 2795, (5); MD-8: *S. thermophilus* strain 4079, (6); MD-9: *L. rhamnosus* strain HDB1311, (7); MD-10: *L. plantarum* strain YLL-03, (8); MD-11: *L. casei* strain F4S1, (9); *L. acidophilus* TISTR 2365 และ (C) Control: MRS broth

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของขนาด clear zone (mm)

Isolate	strain	Clear zone (mm)				
		<i>B. subtilis</i> TISTR 008	<i>E. coli</i> TISTR 887	<i>P. aeruginosa</i> TISTR 1287	<i>S. aureus</i> TISTR 885	<i>S. Typhimurium</i> TISTR 292
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	3.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
MD-5	<i>L. plantarum</i> 3335	10.33±0.58 ^b	8.33±0.58 ^{cd}	9.33±0.58 ^c	7.00±0.00 ^d	9.33±0.58 ^c
MD-6	<i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5	9.00±0.00 ^b	7.67±0.58 ^c	7.33±0.58 ^b	5.67±0.58 ^c	6.67±0.58 ^b
MD-7	<i>Lacti. rhamnosus</i> 2795	10.00±0.00 ^b	8.33±0.58 ^{cd}	9.00±0.00 ^c	6.33±0.58 ^{cd}	8.33±0.58 ^c
MD-8	<i>S. thermophilus</i> 4079	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
MD-9	<i>L. rhamnosus</i> HDB1311	10.00±0.00 ^b	8.33±0.58 ^{cd}	9.33±0.58 ^c	6.00±0.00 ^c	9.00±0.00 ^c
MD-10	<i>L. plantarum</i> YLL-03	10.33±0.58 ^b	9.00±0.58 ^d	9.67±0.58 ^c	7.00±0.00 ^d	9.00±0.00 ^c
MD-11	<i>L. casei</i> F4S1	8.67±1.53 ^b	8.00±0.00 ^{cd}	7.00±0.00 ^b	5.00±0.00 ^b	6.67±0.58 ^b
TISTR 2365	<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	4.67±1.53 ^a	3.33±0.58 ^b	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ a-d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P<0.05)

5. การทดสอบกับเซลล์ Caco-2

5.1 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2

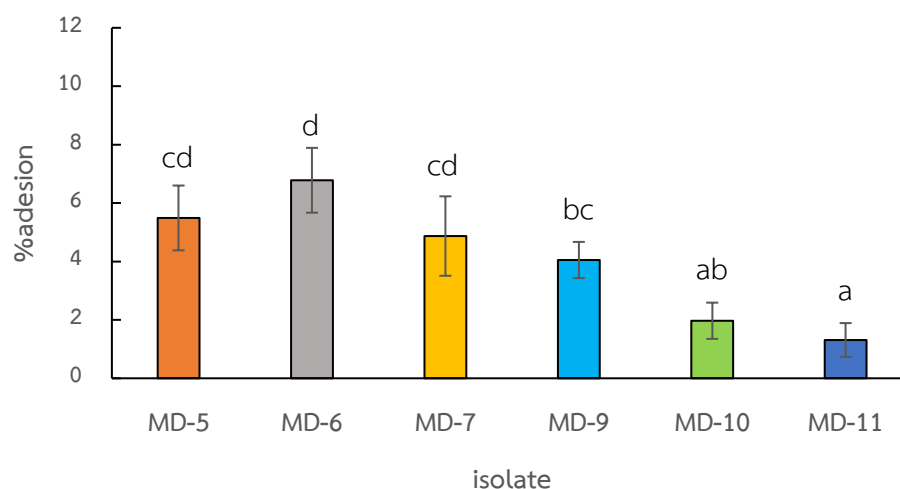
การยึดเกาะกับเยื่อบุลำไส้เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโปรไบโอติก ส่งผลให้โปรไบโอติก สามารถอยู่รอดและตั้งรกรากภายในลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อดีต่อสุขภาพของโฮสต์ เช่น กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันการติดเชื้อ เป็นต้น ดังนั้นในขั้นตอนนี้นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค มาทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยทั่วไปในงานวิจัยนิยมใช้เซลล์ Caco-2 เป็นแบบจำลองเยื่อบุลำไส้สำหรับทดสอบในระดับหลอดทดลอง เนื่องจากมีลักษณะคล้ายกับ enterocyte ของลำไส้เล็กของมนุษย์ (Nantavisai et al., 2018 อ้างจาก Ouwehand et al., 1999) ในงานวิจัยนี้ทดสอบแบคทีเรีย กรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ MD-5, MD-6, MD-7, MD-9, MD-10 และ MD-11 ในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 (CFU/ml) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Dunnett' multiple range test แสดงผลเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะดังรูปที่ 11

ผลจากการทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 1.31-6.78 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 สูงที่สุด เท่ากับ 6.78 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) กับไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 5.49 และ 4.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของทั้ง 2 ไอโซเลทไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) กับไอโซเลท MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 4.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 1.97 และ 1.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากงานวิจัยนี้พบว่าไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 สูงที่สุด เท่ากับ 6.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่ารายงานของ Fonseca และคณะ (2021) ที่คัดแยก *L. paracasei* CCMA 0505 จากนมหมัก (kefir) มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 สูงที่สุด เท่ากับ 4.75 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 อาจเนื่องมาจาก *Lactobacillus* มี protein, polysaccharide และ (lipo) teichoic acid ที่อยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อลำไส้ (Zhang et al., 2020)

จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโพรบิโอติกที่กล่าวมาข้างต้นไปทำการทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรครักกับเซลล์ Caco-2 ต่อไป



รูปที่ 11 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2
หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
กำหนดให้ MD-5: *L. plantarum* strain 3335, MD-6: *Lacti. paracasei* strain W1-D-5, MD-7: *Lacti. rhamnosus* strain 2795, MD-9: *L. rhamnosus* strain HDB1311, MD-10: *L. plantarum* strain YLL-03 MD-11: *L. casei* strain F4S1

สัญลักษณ์ a-d : แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$)

5.2 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรครักกับเซลล์ Caco-2

การยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรครักกับเซลล์เยื่อลำไส้เป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในลำไส้ (Tuomola et al., 1999; Joghataei et al., 2019) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคโดยการแย่งชิงตำแหน่งที่จับกับเซลล์เยื่อผิวของลำไส้ส่งผลให้สามารถ ลดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคและป้องกันการติดเชื้อได้ (Campana et al., 2017 อ้างจาก Abdel-Daim et al., 2013) ดังนั้นในขั้นตอนนีจึงนำ

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโพโรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อกรด และเกลือน้ำดี การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคร่วมกับเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี competition และ exclusion กับแบคทีเรียก่อโรค 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากนั้นนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียก่อโรคที่เกาะติดเซลล์ Caco-2 (CFU/ml) และเปรียบเทียบกับ control ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Dunnett' multiple range test แสดงผลเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะดังรูปที่ 12

ผลจากการทดสอบการยึดเกาะของ *E. coli* เพียงสายพันธุ์เดียว (control) กับเซลล์ Caco-2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 78.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทในการยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* ด้วยวิธี competition พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 0.71-4.12 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด จาก 78.94 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 74.77 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 4.12 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.94 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 74.99 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 3.95 เปอร์เซ็นต์) ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.94 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 76.84, 77.45, 77.64 และ 78.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 2.10, 1.49, 1.30 และ 0.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถลดเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของ *E. coli* ได้ แต่ไม่แตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) แสดงดังรูปที่ 12A

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทในการยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* ด้วยวิธี exclusion พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 0.87-10.02 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด จาก 78.94 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 68.92 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 10.02 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.94 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 72.47

เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 6.47 เปอร์เซ็นต์) ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.94 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 74.50, 75.17, 77.46 และ 78.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 4.44, 3.77, 1.48 และ 0.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* ได้ โดยไม่แตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) แสดงดังรูป 12A

ผลจากการทดสอบการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* เพียงสายพันธุ์เดียว (control) กับเซลล์ Caco-2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 78.86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทในการยับยั้งการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี competition พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 0.12-3.64 เปอร์เซ็นต์ โดย MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 75.22 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 3.64 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) และ MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 75.28 และ 75.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 3.58 และ 3.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยแตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P<0.05$) ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 77.97, 78.18 และ 78.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 0.90, 0.68 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) แสดงดังรูปที่ 12B

เมื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทในการยับยั้งการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี exclusion พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 0.91-9.90 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 68.96 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 9.90 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา

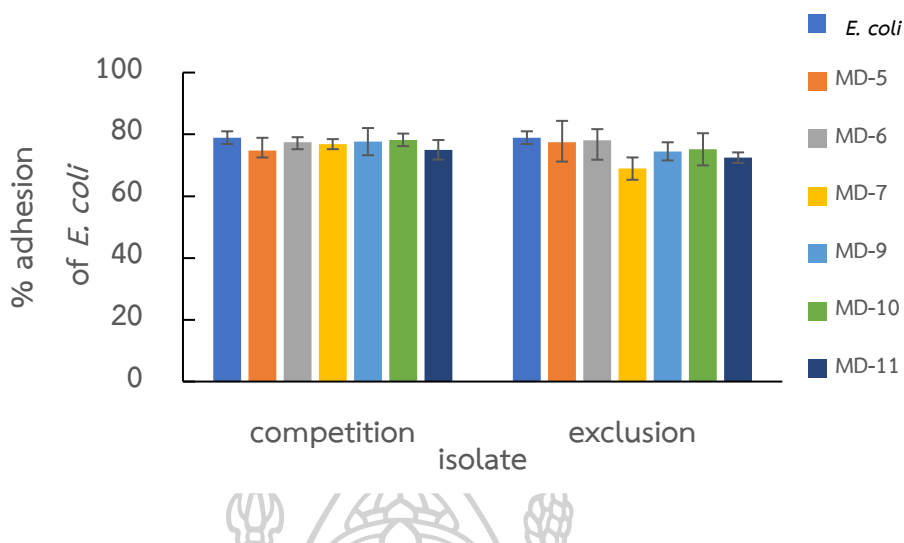
ได้แก่ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 69.06 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 9.81 เปอร์เซ็นต์) ถัดมาได้แก่ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 71.33 และ 73.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 7.53 และ 5.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยแตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) และ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 จาก 78.86 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 73.49 และ 77.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 5.38 และ 0.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P > 0.05$) แสดงดังรูปที่ 12B

จากการทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี competition ในงานวิจัยนี้พบว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* ได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการของ Lin และคณะ (2022) คัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 5 สายพันธุ์จากลูกหม่อนหมักและศึกษาการยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* ด้วยวิธี competition, exclusion และ replacement พบว่า *L. plantarum* NCU001557 สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* ด้วยวิธี competition ได้ดีที่สุด และจากการทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* กับเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี exclusion พบว่าไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* ได้ดีที่สุดในงานวิจัยรายงานว่า *L. plantarum* 299v และ *L. rhamnosus* GG สามารถกระตุ้นเซลล์เยื่อผิวให้สร้าง mucin ที่สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* ได้ (Gharbi et al., 2019 อ้างจาก Mack et al., 1999) นอกจากนี้ *Lactobacillus* บางสายพันธุ์มีตำแหน่งการจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต receptor บนโฮสต์ ส่งผลให้สามารถแย่งจับ receptor กับแบคทีเรียก่อโรคนำไส้ได้ (Gharbi et al., 2019 อ้างถึง Fujiwara et al., 2001; Neeser et al., 2000) ส่วนการทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* กับเซลล์ Caco-2 พบว่าไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุดในทั้งวิธี competition และ exclusion โดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลง 3.64 และ 9.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี exclusion ให้ผลในการยับยั้งการยึดเกาะได้ดีกว่าวิธี competition ทั้งใน *E. coli* และ *S. Typhimurium* ยกเว้นไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335)

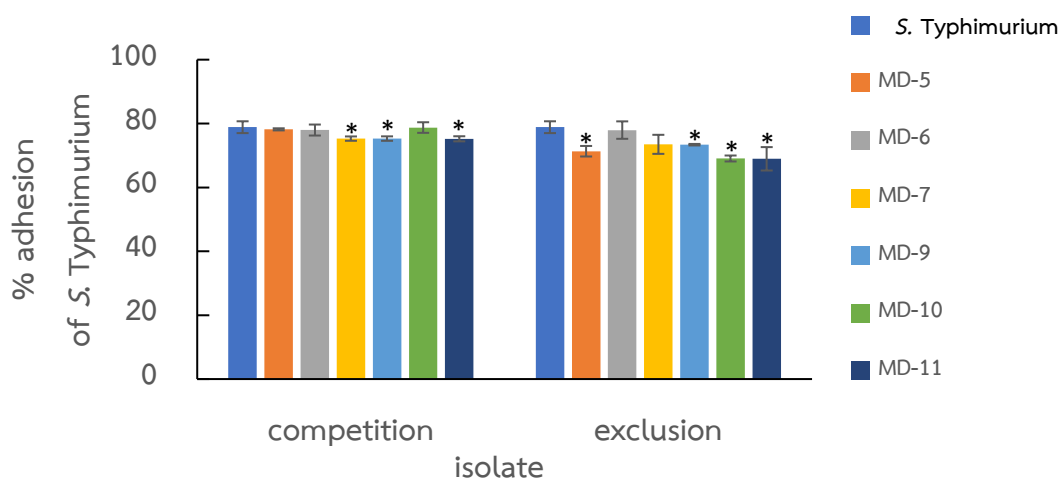
และ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) เมื่อทดสอบด้วยวิธี competition สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* ได้ดีกว่าการทดสอบด้วยวิธี exclusion แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ค่อนข้างมีความจำเพาะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* และแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ (Gharbi et al., 2019 อ้างจาก Gueimonde et al., 2006)



(A)



(B)



รูปที่ 12 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคร่วมกับเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี competition และ exclusion (A) เซลล์ Caco-2 ที่ยึดเกาะกับ *E. coli* (B) เซลล์ Caco-2 ที่ยึดเกาะกับ *S. Typhimurium*

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กำหนดให้ MD-5: *L. plantarum* strain 3335, MD-6: *Lacti. paracasei* strain W1-D-5, MD-7: *Lacti. rhamnosus* strain 2795, MD-9: *L. rhamnosus* strain HDB1311, MD-10: *L. plantarum* strain YLL-03) และ MD-11: *L. casei* strain F4S1

สัญลักษณ์ * : แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเทียบกับ control (P<0.05)

5.3 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2

ในปัจจุบันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนทั่วโลก ซึ่งการรักษาโดยวิธีผ่าตัดและการใช้ยาเคมีบำบัดอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์อื่นในร่างกาย จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาสารจากธรรมชาติ เช่น พืชและจุลินทรีย์ เป็นต้น (Riaz Rajoka et al., 2019 อ้างถึง George and Abrahamse, 2016; Huang et al., 2016) เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบความสามารถของ lyophilized cell free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/ml (Sadeghi-Aliabadi et al., 2014) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในการทดสอบนี้ใช้ 5-fluorouracil (5-FU) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้เป็น positive control (Guo et al., 2020; Faghfoori et al., 2021; Yue et al., 2022) และ MRS เป็น negative control เปรียบเทียบกับเซลล์ Caco-2 เป็นชุด control และตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay และคำนวณ half minimal inhibitory concentration (IC₅₀) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Dunnett' multiple range test แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของดั่งตารางที่ 14 และ 15

จากการทดสอบ lyophilized cell free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท ที่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 14 พบว่า LCFS ของทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ โดยผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 84.79, 85.50, 72.00, 65.99, 57.38, 17.34 และ 3.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition มีค่า 15.21, 14.50, 28.00, 34.01, 42.62, 82.66 และ 98.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.61 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 92.12, 90.23, 81.39, 80.28, 67.24, 51.26 และ 7.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 7.88, 9.77, 18.61, 19.72, 32.76, 48.64 และ 92.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.97 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 101.02, 100.52, 96.76,

91.68, 84.68, 59.05 และ 42.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ -1.02, -0.51, 3.24, 8.32, 15.32, 40.95 และ 57.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.06 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 81.81, 86.49, 78.18, 70.49, 61.34, 58.68 และ 36.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 18.19, 13.51, 21.82, 29.51, 38.66, 41.32 และ 63.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.65 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 98.92, 96.20, 91.50, 85.94, 63.52, 53.62 และ 6.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 1.08, 3.80, 8.50, 14.06, 36.48, 46.38 และ 93.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.14 mg/ml

และผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-11 (*L. casei* strain F4S1) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 94.79, 91.13, 91.04, 79.17, 78.65, 51.32 และ 14.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 5.21, 8.87, 8.96, 20.83, 21.35, 48.68 และ 85.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.52 mg/ml

จากการทดสอบ lyophilized cell free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท ที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 15 พบว่า LCFS ของทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ โดยผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 96.05, 95.45, 87.27, 70.15, 50.95, 12.03 และ 2.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 3.95, 4.55, 12.73, 29.85, 49.05, 87.97 และ 99.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.81 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 95.70, 85.84, 86.69, 78.75, 72.96, 53.75 และ 2.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 4.30, 14.16, 13.31, 21.25, 27.04, 46.25 และ 97.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.93 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 96.19, 94.84, 92.96, 91.72,

84.67, 67.23 และ 39.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 3.81, 5.16, 7.04, 8.28, 15.33, 32.77 และ 60.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.13 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 98.73, 95.52, 93.98, 85.56, 77.59, 66.34 และ 32.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 1.27, 4.48, 6.02, 14.44, 22.41, 33.66 และ 67.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.28 mg/ml

ผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 91.83, 89.18, 88.40, 77.66, 69.74, 53.35 และ 1.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ (% inhibition เท่ากับ 8.17, 10.82, 11.60, 22.34, 30.26, 46.65 และ 98.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.81 mg/ml

และผลการทดสอบกับ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-11 (*L. casei* strain F4S1) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 82.91, 73.64, 71.52, 69.95, 68.36, 44.39 และ 2.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ (% inhibition เท่ากับ 17.09, 26.36, 28.48, 30.05, 31.64, 55.61 และ 97.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.20 mg/ml

จากการทดสอบ LCFS (0.156-10.00 mg/ml) ของทั้ง 6 ไอโซเลทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า LCFS ของทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ในลักษณะ dose dependent manner อย่างไรก็ตามไม่พบงานวิจัยที่รายงานความเข้มข้นของ MRS ที่ใช้เป็น negative control สำหรับการทดสอบกับเซลล์ Caco-2 (Nami et al., 2014; ER et al., 2015; Faghfoori et al., 2020; Faghfoori et al., 2021) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดสอบ lyophilized MRS ที่ความเข้มข้นเดียวกับ LCFS ของแบคทีเรียกรดแลคติก (0.156-10.00 mg/ml) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของ lyophilized MRS (0.156-5.00 mg/ml) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ control) ทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดย lyophilized MRS (5.00 mg/ml) เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 แสดงให้เห็นว่า lyophilized MRS (5.00 mg/ml) ไม่มีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ดังนั้นจึงนำ LCFS (5.00 mg/ml) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทรวมทั้ง lyophilized

MRS medium (negative control) และ 100 µg/ml ของ 5-FU (positive control) มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตกับเซลล์ Caco-2 (control) แสดงดังรูปที่ 4 พบว่าผลของ 5-FU (100 µg/mL) ที่ใช้เป็น positive control (Guo et al., 2020; Yue et al., 2022) โดยเซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 46.48 เปอร์เซ็นต์ (% inhibition เท่ากับ 53.52 เปอร์เซ็นต์) และ LCFS (5.00 mg/ml) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของอยู่ในช่วง 12.03-67.23 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด ซึ่งเซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 12.03 เปอร์เซ็นต์ (% inhibition เท่ากับ 87.97) รองลงมาได้แก่ LCFS (5.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F4S1) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 44.39 เปอร์เซ็นต์ (% inhibition เท่ากับ 55.61) ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) เซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 48.51, 53.35, 66.34 และ 67.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (% inhibition เท่ากับ 51.49, 46.65, 33.66 และ 32.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ control แสดงดังรูปที่ 13

จากผลการทดสอบพบว่า LCFS (5.00 mg/ml) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด โดยเซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 12.03 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ดีกว่างานวิจัย Sadeghi-Aliabadi และคณะ (2014) รายงานว่า *L. plantarum* A7 (5.00 mg/ml) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 47.30 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ อาจเนื่องมาจาก 1) การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย 2) การเปลี่ยนแปลงสภาวะทาง physicochemical ของลำไส้ 3) การยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อมะเร็ง เช่น β -glucuronidase และ nitroreductase และ 4) การผลิต short chain fatty acid เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับโฮสต์ (Sadeghi-Aliabadi et al., 2014; Dallal et al., 2015) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำงานร่วมกับแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์เพื่อหมักคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยไม่ได้ในอาหารให้เป็น short chain fatty acid (SCFA) เช่น butyric acid และ propionic acid ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ (Guo et

al., 2020 อ้างจาก Louis and Flint, 2017; Wang et al., 2019a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า butyric acid ซึ่งเป็น short chain fatty acid (SCFA) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียภายในลำไส้ใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและยังส่งเสริมประสิทธิภาพของ 5-fluorouracil (5-FU) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดอย่างมีนัยสำคัญต่อเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้น้อยลง (Geng et al., 2021 อ้างจาก Liu et al., 2018) และมีงานวิจัยรายงานว่า cell free supernatant (CFS) ของโพรไบโอติกสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก butyric acid ที่ผลิตจากโพรไบโอติกและสภาวะความเป็นกรด ซึ่งกลไกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาของนิวเคลียส การรบกวน cell cycle และการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis อีกด้วย (Pahumunto and Teanpaisan, 2022 อ้างจาก Baskic et al., 2006)



ตารางที่ 14 ผลของ lyophilized cell free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 และค่า IC₅₀ ที่เวลา 24 ชั่วโมง

lyophilized cell free supernatant concentration (mg/ml)	Caco-2 cell viability (%) ^a									
	MD-5	MD-6	MD-7	MD-9	MD-10	MD-11	MRS			
Caco-2 cell (control)	100.00±8.87	100.00±9.11	100.00±4.33	100.00±9.11	100.00±4.33	100.00±3.29	100.00±11.11			
0.156	84.79±2.97	92.12±8.70	101.02±0.79	81.81±3.86	98.92±10.97	94.79±14.15	96.92±9.32			
0.312	85.50±8.89	90.23±13.66	100.52±1.76	86.49±3.96	96.20±5.56	91.13±11.58	97.54±16.58			
0.625	72.00±10.46	81.39±4.22	96.76±1.93	78.18±2.71	91.50±5.92	91.04±18.76	102.19±1.53			
1.25	65.99±4.55	80.28±9.27	91.68±0.94	70.49±3.94	85.94±5.18	79.17±6.77	100.56±15.31			
2.50	57.38±7.39	67.24±5.97	84.68±5.21	61.34±1.82	63.52±4.23	78.65±4.09	100.48±12.66			
5.00	17.34±5.98	51.26±5.25	59.05±1.54	58.68±2.26	53.62±7.10	51.32±4.72	95.03±3.00			
10.00	2.63±1.50	7.76±0.85	42.78±6.86	36.23±3.90	6.84±0.94	14.55±6.81	75.47±7.14*			
IC ₅₀ ^b	3.61	4.97	8.06	6.65	5.14	5.52	-			

หมายเหตุ ^a: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ส่วนเป็นเบเนมาตราฐาน, ^b: half minimal inhibitory concentration (IC₅₀) และกำหนดให้ MD-5: *L. plantarum* strain 3335, MD-6: *L. paracasei* strain W1-D-5, MD-7: *L. rhamnosus* strain 2795, MD-9: *L. rhamnosus* strain HDB1311, MD-10: *L. plantarum* strain YLL-03) และ MD-11: *L. casei* strain F4S1 และ MRS: negative control

ตารางที่ 15 ผลของ lyophilized cell free supernatants (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 และค่า IC₅₀ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

lyophilized cell free supernatant concentration (mg/ml)	Caco-2 cell viability (%) ^a									
	MD-5	MD-6	MD-7	MD-9	MD-10	MD-11	MRS			
Caco-2 cell (control)	100.00±15.24	100.00±2.97	100.00±2.76	100.00±2.97	100.00±2.76	100.00±11.79	100.00±10.39			
0.156	96.05±3.39	95.70±9.02	96.19±13.85	98.73±7.91	91.83±15.93	82.91±17.19	101.07±7.99			
0.312	95.45±3.64	85.84±3.98	94.84±10.59	95.52±9.06	89.18±3.65	73.64±10.10	109.98±6.29			
0.625	87.27±4.22	86.69±3.63	92.96±8.37	93.98±10.17	88.40±6.59	71.52±11.33	117.31±5.04			
1.25	70.15±10.35	78.75±1.52	91.72±8.25	85.56±6.99	77.66±4.59	69.95±8.56	111.60±8.16			
2.50	50.95±14.29	72.96±7.89	84.67±5.26	77.59±2.89	69.74±8.53	68.36±8.04	91.15±8.82			
5.00	12.03±1.91	53.75±1.21	67.23±4.92	66.34±6.62	53.35±6.02	44.39±10.85	82.84±9.68			
10.00	2.31±2.67	2.93±1.36	39.27±2.33	32.83±10.42	1.13±0.34	2.27±1.30	65.03±6.13*			
IC ₅₀ ^b	3.81	4.93	8.13	7.28	4.81	4.20	-			

หมายเหตุ ^a: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ส่วนเชิงเบนมาตรฐาน, ^b: half minimal inhibitory concentration (IC₅₀) และกำหนดให้ MD-5: *L. plantarum* strain 3335, MD-6: *L. paracasei* strain W1-D-5, MD-7: *L. rhamnosus* strain 2795, MD-9: *L. rhamnosus* strain HDB1311, MD-10: *L. plantarum* strain YLL-03) และ MD-11: *L. casei* strain F451 และ MRS: negative control

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติก โดยในงานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลทติดสี crystal violet ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และเซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนจำนวน 8 ไอโซเลทและรูปร่างทรงกลมจำนวน 3 ไอโซเลท

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ผลการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* และ *Lactocaseibacillus* (99.79-100.00% similarity) และแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 3 ไอโซเลทมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Streptococcus* (94.26-99.93% similarity)

และนำมาศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกทั้งหมด 5 การทดลอง ได้แก่ การทนต่อกรด การทนเกลือ น้ำดี การต้านต่อยาปฏิชีวนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จากแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทและแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) โดยทดสอบการทนต่อกรดที่ pH 2.5 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลท และ *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงได้ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสภาวะความเป็นกรด pH 2.5 อยู่ในช่วง 16.35-85.77 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. acidophilus* TISTR 2365 ซึ่งเป็นแบคทีเรียอ้างอิง สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้ดีที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 85.77 เปอร์เซ็นต์ และจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถทนต่อกรดได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 58.31 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบการทนต่อเกลือ น้ำดี พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลทและแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) เวลา 3 ชั่วโมงได้ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 8.86-99.50 เปอร์เซ็นต์ โดย MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

เท่ากับ 99.50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีกลไกในการป้องกันสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น มีการสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) เพื่อเป็นเกราะป้องกันและมี pump ในการขนส่งสารผ่านเข้าออกไซโตพลาซึม ส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการทนต่อกรดเกลือ น้ำดี จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ไปทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกต่อไป ได้แก่ การต้านต่อยาปฏิชีวนะ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ต่อไป

จากการทดสอบความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลท และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ด้วยการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 9 ชนิด พบว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านต่อยาปฏิชีวนะต่อ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin ได้ โดย *Lactobacillus* มี intrinsic resistance ต่อยา vancomycin และมีการเปลี่ยนแปลง vancomycin binding site ที่ peptidoglycan จึงช่วยป้องกันการจับกันระหว่าง vancomycin กับ peptidoglycan ของแบคทีเรียกรดแลคติก ส่งผลให้เกิดการต้านทานต่อ vancomycin ได้

จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี DPPH พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 86.97-91.81 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 91.81 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์หลายชนิดที่ช่วยกำจัด reactive oxygen species (ROS) เป็นการปรับสมดุล oxidation และ reduction ในลำไส้ได้ ดังนั้นการปรับสมดุล ROS จึงเป็นการป้องกันการเกิด oxidative stress ที่อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งและโรคต่าง ๆ ได้อีกทางหนึ่ง

และจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6

ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ซึ่งการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจเนื่องมาจากความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไดอะซีติล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ไปทดสอบกับเซลล์ ได้แก่ การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2

จากการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 1.31-6.78 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 สูงที่สุด (มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 6.78 เปอร์เซ็นต์) และนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทไปทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคร่วมกับเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี competition และ exclusion พบว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง *E. coli* และ *S. Typhimurium* โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) สามารถลดการยึดเกาะของ *E. coli* ด้วยวิธี competition และด้วยวิธี exclusion ได้ดีที่สุดในลำดับ และไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถลดการยึดเกาะของ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุดในทั้งวิธี competition และ exclusion

นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ยังทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าผลการทดสอบกับ lyophilized cell free supernatant (5.00 mg/ml) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ Caco-2 อยู่ในช่วง 12.03-82.84 เปอร์เซ็นต์ โดย LCFS (5.00 mg/ml) ของ ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุดใน (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 เท่ากับ 87.97 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีรายงานว่า *Lactobacillus* สามารถยึดเกาะโดยตรงกับเซลล์มะเร็งลำไส้ และกระตุ้นการสร้างกรดไขมันสายสั้น (SCFAs) โดยเฉพาะ butyric acid และ propionic acid ที่ส่งผลต่อการยับยั้งเพิ่ม

จำนวนของเซลล์มะเร็งรังไข่ได้ (Zhao et al., 2023 อ้างจาก Thirabunyanon and Hongwittayakorn, 2013)

จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากแบคทีเรียทั้งหมด 11 ไอโซเลทและแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกและสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้สรุปได้ว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีคุณสมบัติโปรไบโอติกและมีความสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ซึ่งมีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาพัฒนาต่อยอดให้เกิดผลงานวิจัยที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการใช้งาน เพื่อป้องกันการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ใหญ่ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกและมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง adenocarcinoma ดังนั้นในขั้นตอนการทดสอบต่อไปควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ และศึกษาความสามารถของ lyophilized cell free supernatant ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 เพิ่มเติม โดยศึกษาสารใน lyophilized cell free supernatant ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Caco-2 ได้ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ นอกจากนี้อาจศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และระยะการตาย (apoptosis) ด้วยวิธี Flow cytometry เพื่อที่จะนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยต่อไป

รายการอ้างอิง

- Abdel-Daim, A., Hassouna, N., Hafez, M., Ashor, M. S. A., and Aboulwafa, M. M. (2013). Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* *in vitro*. *BioMed Research International*, 2013, 1–12.
- Abriouel, H., Muñoz, M.D.C.C., Lerma, L.L., Montoro, B.P., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G.S., Franz, C.M., Gálvez, A. and Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International*, 78, 465-481.
- Adelekan, A. O., Olurin, T. O., and Ezeani, A. O. (2020). Antioxidant activities of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria isolated from commercial yoghurt samples. *Advances in Microbiology*, 10(08), 359.
- Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., Vijayaraghavan, P., Esmail, G. A., Duraipandiyan, V., Kim, Y. O., Kim, H. and Kim, H. J. (2020). Probiotic and antioxidant potential of *Lactobacillus reuteri* LR12 and *Lactobacillus lactis* LL10 isolated from pineapple puree and quality analysis of pineapple-flavored goat milk yoghurt during storage. *Microorganisms*, 8(10), 1461.
- Alp, D., and Kuleaşan, H. (2019). Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-9.
- Alp, G., and Aslim, B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16(2), 101-105.
- Anisimova, E. A., and Yarullina, D. R. (2019). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Current Microbiology*, 76, 1407-1416.
- Arian, S., Kaboosi, H., Heshmatipour, Z., Koochpar, Z. K., and Pyravii-Ghadikolaii, F. (2019). Anti-proliferative effects of two new *Lactobacillus* strains of human origin on Caco-2 cell line. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 21(3).
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., and Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on

- pathogens. *BioMed Research International*, 2015, 584183.
- American Type Culture Collection (ATCC). (2021). Caco-2. Accessed January 4, 2022 Available from <https://www.atcc.org/search#q=Caco-2&sort=relevancy&numberOfResults=24>
- Aslantürk, Ö. S. (2018). *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity- A Predictable Risk to Our Actual World*, 2, 64-80.
- Aputinan, P., and Kusalaruk, W. (2020). Characterization of probiotic lactic acid bacteria as pure culture starter for Plasom fermentation. *Naresuan Phayao Journal*, 13(2), 42-50.
- Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., and Arsenijević, N. N. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International*, 30(11), 924-932.
- Bazireh, H., Shariati, P., Jamalkandi, S. A., Ahmadi, A., and Boroumand, M. A. (2020). Isolation of novel probiotic *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains from human salivary and fecal sources. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3064.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorrente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
- Bujnakova, D., and Strakova, E. (2017). Safety, probiotic and technological properties of *Lactobacilli* isolated from unpasteurised ovine and caprine cheeses. *Annals of Microbiology*, 67, 813-826.
- Bustos, A. Y., de Valdez, G. F., Fadda, S., and Taranto, M. P. (2018). New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Research International*, 112, 250-262.
- Bustos, A. Y., de Valdez, G. F., Raya, R., de Almeida, A. M., Fadda, S., and Taranto, M. P. (2015). Proteomic analysis of the probiotic *Lactobacillus reuteri* CRL1098 reveals novel tolerance biomarkers to bile acid-induced stress. *Food Research International*, 77, 599-607.

- Campana, R., van Hemert, S., and Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9(1), 1-12.
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., and O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), e01738-01718.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020. Accessed April 15, 2023 Available from [Colonial Characteristics \(cdc.gov\)](https://www.cdc.gov/colonial-characteristics/)
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636-1643.
- CLSI. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-eighth informational supplement. CLSI Document M100-S28.
- Collado, M. C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y., and Salminen, S. (2005). Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2672-2678.
- Dallal, M. M. S., Mojarrad, M., Baghbani, F., Raoofian, R., Mardaneh, J., and Salehipour, Z. (2015). Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on colorectal tumor cells activity (Caco-2). *Archives of Iranian Medicine*, 18(3), 0-0.
- Dangmanee, N., Ruenchol, N., Tongnaowarat, S., & Rattanasuksri, N. (2016). Paper presented at the adhesion ability and adhesion inhibition of bacterial gastrointestinal pathogens on Caco-2 cell of lactic acid bacteria PK3, PK5 and PK6 isolated from pickle, Rangsit University.
- Das, S., Ganeriwal, S., Mangwani, N., and Patel, B. (2015). Survival and expression of DNA repair genes in marine bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* NP103 and *P. aeruginosa* N6P6 in response to environmental stressors. *Microbiology*, 84, 644-653.
- Dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siqueira, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., and Peluzio, M. d. C. G. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the

- prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1-19.
- Dowdell, P., Chankhamhaengdecha, S., Panbangred, W., Janvilisri, T., and Aroonual, A. (2020). Probiotic activity of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Thai fermented sausages and their protective effect against *Clostridium difficile*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 641-648.
- Dubernet, S., Desmasures, N., and Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 271-275.
- Er, S., Kopalal, A. T., and Kivanc, M. (2015). Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 23-30.
- Faghfoori, Z., Faghfoori, M. H., Saber, A., Izadi, A., and Khosroushahi, A. Y. (2021). Anticancer effects of *bifidobacteria* on colon cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 21(1), 1-12.
- Faghfoori, Z., Gargari, B. P., Saber, A., Seyyedi, M., Fazelian, S., and Khosroushahi, A. Y. (2020). Prophylactic effects of secretion metabolites of dairy lactobacilli through downregulation of ErbB-2 and ErbB-3 genes on colon cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 29(3), 201-209.
- Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221-226.
- Fonseca, H. C., de Sousa Melo, D., Ramos, C. L., Dias, D. R., and Schwan, R. F. (2021). Probiotic properties of lactobacilli and their ability to inhibit the adhesion of enteropathogenic bacteria to Caco-2 and HT-29 cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 102-112.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., and Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., and Forstner, J. F. (2001). Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor

- gangliotetraosylceramide on the cell surface. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 97-106.
- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., and Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 25-33.
- Geng, H.-W., Yin, F.-Y., Zhang, Z.-F., Gong, X., and Yang, Y. (2021). Butyrate suppresses glucose metabolism of colorectal cancer cells via GPR109a-AKT signaling pathway and enhances chemotherapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 634874.
- Gharbi, Y., Fhoula, I., Ruas-Madiedo, P., Afef, N., Boudabous, A., Gueimonde, M., and Ouzari, H.-I. (2019). *In-vitro* characterization of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human microbiota: interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line HT29. *Annals of Microbiology*, 69(1), 61-72.
- Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., and Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98-S107.
- Grajek, W. o., and Olejnik, A. (2004). Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13(54), 5-24.
- Guan, N., and Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 51-65.
- Guan, N., Liu, L., Shin, H. D., Chen, R. R., Zhang, J., Li, J., Du, G., Shi, Z., and Chen, J. (2013). Systems-level understanding of how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: mechanism and application. *Journal of Biotechnology*, 167(1), 56-63.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., and Salminen, S. (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*, 39(4), 467-471.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C., and Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 202.
- Guo, Y., Zhang, T., Gao, J., Jiang, X., Tao, M., Zeng, X., Zhen, W., and Pan, D. (2020).

Lactobacillus acidophilus CICC 6074 inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells *in vitro* and in HT-29 cells induced-mouse model. *Journal of Functional Foods*, 75, 104290.

Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., and Khosroushahi, A. Y. (2014). Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15 HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44 Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*, 30, 51-59.

Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., Abdullah, N., Rosli, R., Radiah, D., and Yari Khosroushahi, A. (2015). Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Microbiologyopen*, 4(5), 803-813.

Hojjati, M., Behabehani, B. A., and Falah, F. (2020). Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104420.

Huang, L., Shan, Y.-J., He, C.-X., Ren, M.-H., Tian, P.-J., and Song, W. (2016). Effects of *L. paracasei* subsp. *paracasei* X12 on cell cycle of colon cancer HT-29 cells and regulation of mTOR signalling pathway. *Journal of Functional Foods*, 21, 431-439.

Institute, N. C. (2021). Retrieved from <https://www.cancer.gov/types/colorectal>

Isazadeh, A., Hajazimian, S., Shadman, B., Safaei, S., Bedoustani, A.B., Chavoshi, R., Shanehbandi, D., Mashayekhi, M., Nahaei, M. and Baradaran, B. (2020). Anti-cancer effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for colorectal cancer cell line Caco-2 through apoptosis induction. *Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 262-267.

İspirli, H., and Dertli, E. (2018). Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13351.

Joghataei, M., Shahidi, F., Pouladfar, G., Mortazavi, S. A., and Ghaderi, A. (2019). Probiotic potential comparison of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian traditional food products and human feces with standard probiotic strains. *Journal of the*

- Science of Food and Agriculture*, 99(15), 6680-6688.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., and Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- Khoka, A. (2020). Antibiotics and antibiotic resistance. *Journal Medicine Health Sciences*, 27(2), 125-139.
- Kim, S., Lee, J. Y., Jeong, Y., and Kang, C.-H. (2022). Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. *Fermentation*, 8(1), 29.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., and Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 199-230.
- Kuhnert, W. L., and Quivey Jr, R. G. (2003). Genetic and biochemical characterization of the F-ATPase operon from *Streptococcus sanguis* 10904. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1525-1533.
- Kulawik, P., Özogul, F., Glew, R., and Özogul, Y. (2013). Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 475-491.
- Kullen, M. J., and Klaenhammer, T. R. (1999). Identification of the pH-inducible, proton-translocating F1F0-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1152-1161.
- Kusada, H., Morinaga, K., and Tamaki, H. (2021). Identification of bile salt hydrolase and bile salt resistance in a probiotic bacterium *Lactobacillus gasseri* JCM1131T. *Microorganisms*, 9(5), 1011.
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (pp. 103-111). Cham: Springer International Publishing.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.

- Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S.-K., Heo, H.-J., Kim, H.-J., Ham, K.-S., and Kim, J. H. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Science and Technology*, *71*, 130-137.
- Lee, M. D., Pedroso, A. A., and Maurer, J. J. (2023). Bacterial composition of a competitive exclusion product and its correlation with product efficacy at reducing *Salmonella* in poultry. *Frontiers in Physiology*, *13*, 2737.
- Lin, J.-X., Xiong, T., Peng, Z., Xie, M., and Peng, F. (2022). Novel lactic acid bacteria with anti-hyperuricemia ability: screening and *in vitro* probiotic characteristics. *Food Bioscience*, *49*, 101840.
- Liu, C. F., and Pan, T. M. (2010). *In vitro* effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, *18*(2), 8.
- Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D., and Ma, X. (2018). Butyrate: a double-edged sword for health? *Advances in Nutrition*, *9*(1), 21-29.
- Louis, P., and Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 29-41.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *276*(4), G941-G950.
- Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M. G., and Davies, J. M. (2005). Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology*, *151*(6), 1995-2003.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., and Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, *16*(3), 189-199.
- Martín-Galiano, A. J., Overweg, K., Ferrandiz, M. J., Reuter, M., Wells, J. M., and De la Campa, A. G. (2005). Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, *151*(12), 3935-3946.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., and Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology*, *11*(3-4), 187-194.

- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., and Khosroushahi, A. Y. (2014). Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5 BL. *Microbiology and Immunology*, *58*(9), 492-502.
- Nami, Y., Haghshenas, B., Bakhshayesh, R. V., Jalaly, H. M., Lotfi, H., Eslami, S., and Hejazi, M. A. (2018). Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. *LWT - Food Science and Technology*, *98*, 85-93.
- Nantavisai, K., Puttikamonkul, S., Chotelersak, K., and Taweechoitipatr, M. (2018). *In vitro* adhesion property and competition against enteropathogens of *Lactobacillus* strains isolated from Thai infants. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *40*, 69-74.
- Nath, S., Sikidar, J., Roy, M., and Deb, B. (2020). *In vitro* screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. *Food Quality and Safety*, *4*(4), 213-223.
- National Cancer Institute. (2021). Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. Accessed October 22, 2020 Available from <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>
- Neeser, J.-R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., and Karlsson, K.-A. (2000). *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*, *10*(11), 1193-1199.
- Ngamsomchat, A., Kaewkod, T., Konkitt, M., Tragoolpua, Y., Bovonsombut, S., and Chitov, T. (2022). Characterisation of *Lactobacillus plantarum* of dairy-product origin for probiotic chèvre cheese production. *Foods*, *11*(7), 934.
- Nowak, A., Zakłós-Szyda, M., Rosicka-Kaczmarek, J., and Motyl, I. (2022). Anticancer potential of post-fermentation media and cell extracts of probiotic strains: an *in vitro* study. *Cancers*, *14*(7), 1853.
- Nozari, S., Faridvand, Y., Etesami, A., Ahmad Khan Beiki, M., Miresmaeili Mazrakhondi, S. A., and Abdolalizadeh, J. (2019). Potential anticancer effects of cell wall protein fractions from *Lactobacillus paracasei* on human intestinal Caco-2 cell line. *Letters in Applied Microbiology*, *69*(3), 148-154.

- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., and Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43-52.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Tölkö, S., Roberts, P., Ovaska, J., and Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(1), 184-186.
- Pahumunto, N., and Teanpaisan, R. (2022). Anti-cancer properties of potential probiotics and their cell-free supernatants for the prevention of colorectal cancer: An *in vitro* study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-14.
- Petrova, M. I., Reid, G., and Ter Haar, J. A. (2021). *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, aka *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 : Past and future perspectives. *Trends in Microbiology*, 29(8), 747-761.
- Pfeiler, E. A., and Klaenhammer, T. R. (2009). Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 6013-6016.
- Phansawan, B. (2013). Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. *Thai Science and Technology Journal*, 21(3), 275-286.
- Plackal Adimuriyil George, B., and Abrahamse, H. (2016). A review on novel breast cancer therapies: Photodynamic therapy and plant derived agent induced cell death mechanisms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(7), 793-801.
- Prabhurajeshwar, C., and Chandrakanth, K. (2019). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria *in-vitro* by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23, 97-115.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., and Gopal, P. K. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12), 993-1002.
- Punjaruk, W. (2015). Physiology of cancer: prospective aspects beyond the 21st Century. *Srinagarind Medical Journal*, 30(2), 175-183.
- Riaz Rajoka, M. S., Zhao, H., Mehwish, H. M., Li, N., Lu, Y., Lian, Z., Shao, D., Jin, M., Li, Q., Zhao, L., and Shi, J. (2019). Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *Food*

Research International, 123, 286-297.

- Ray, R. C., and Joshi, V. (2014). Fermented foods: past, present and future. *Microorganisms and fermentation of Traditional Foods*, 1-36.
- Reeve, B., and Reid, S. (2016). Glutamate and histidine improve both solvent yields and the acid tolerance response of *Clostridium beijerinckii* NCP 260. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1271-1281.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., and Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
- Riane, K., Sifour, M., Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Bounar, S., and Boussebt, S. (2021). Probiotic properties and antioxidant efficiency of *Lactobacillus plantarum* 15 isolated from milk. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 516-520.
- Ruiz, L., Hidalgo, C., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Sánchez, B., and Margolles, A. (2016). Tackling probiotic and gut microbiota functionality through proteomics. *Journal of Proteomics*, 147, 28-39.
- Ruiz, L., Margolles, A., and Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 396.
- Saboori, B., Shahidi, F., Hedayati, S., and Javadmanesh, A. (2022). Investigating the probiotic properties and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from an Iranian fermented dairy product, Kashk. *Foods*, 11(23), 3904.
- Sadeghi-Aliabadi, H., Mohammadi, F., Fazeli, H., and Mirlohi, M. (2014). Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(10), 815.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., and Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- Schepper, J. D., Irwin, R., Kang, J., Dagenais, K., Lemon, T., Shinouskis, A., Parameswaran, N., and McCabe, L. R. (2017). Probiotics in gut-bone signaling. *Advances in*

Experimental Medicine and Biology, 1033, 225-247.

- Shabayek, S., and Spellerberg, B. (2017). Acid stress response mechanisms of group B streptococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 395.
- Sharma, M., Chandel, D., and Shukla, G. (2020). Antigenotoxicity and cytotoxic potentials of metabiotics extracted from isolated probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 on Caco-2 and HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition and cancer*, 72(1), 110-119.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., and Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195.
- Shi, Y., Cui, X., Gu, S., Yan, X., Li, R., Xia, S., Chen, H., and Ge, J. (2019). Antioxidative and probiotic activities of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 1086-1099.
- Siciliano, R. A., and Mazzeo, M. F. (2012). Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 390-396.
- Singhal, N., Singh, N. S., Mohanty, S., Kumar, M., and Virdi, J. S. (2021). Rhizospheric *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) strains exhibit bile salt hydrolysis, hypocholesterolemic and probiotic capabilities *in vitro*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9.
- Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć, P., and Śliżewska, W. (2021). The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers*, 13(1), 20.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., and Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 129-137.
- Suissa, R., Oved, R., Jankelowitz, G., Turjeman, S., Koren, O., and Kolodkin-Gal, I. (2021). Molecular genetics for probiotic engineering: dissecting lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 30(3), 293-306.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for*

Clinicians, 71(3), 209–249.

- Tang, W., Li, C., He, Z., Pan, F., Pan, S., and Wang, Y. (2018). Probiotic properties and cellular antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibetan kefir grains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 523-533.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., and Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters*, 31(4), 571-576.
- Thirabunyanon, M., and Hongwittayakorn, P. (2013). Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 511-525.
- Tian, L., Zhang, S., Yi, J., Zhu, Z., Cui, L., Andrew Decker, E., and Julian McClements, D. (2022). Antioxidant and prooxidant activities of tea polyphenols in oil-in-water emulsions depend on the level used and the location of proteins. *Food Chemistry*, 375, 131672.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., and Özçelik, F. (2015). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*, 2015, 315819.
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. J. (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26(2), 137-142.
- Valan Arasu, M., Jung, M. W., Ilavenil, S., Jane, M., Kim, D. H., Lee, K. D., Park, H. S., Hur, T. Y., Choi, G. J., Lim, Y. C., Al-Dhabi, N. A., and Choi, K. C. (2013). Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1172-1185.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., and Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple *in vitro* tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1678-1688.

- Wang, A. N., Yi, X. W., Yu, H. F., Dong, B., and Qiao, S. Y. (2009). Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and its antioxidative effect on growing–finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(4), 1140-1148.
- Wang, G., Yu, Y., Wang, Y. Z., Wang, J. J., Guan, R., Sun, Y., Shi, F., Gao, J., and Fu, X. L. (2019). Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(10), 17023-17049.
- Wang, K., Zhang, H., Feng, J., Ma, L., de la Fuente-Núñez, C., Wang, S., and Lu, X. (2019). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *Journal of Agriculture and Food Research*, *1*, 100006.
- Wang, R.-M., Li, N., Zheng, K., and Hao, J.-F. (2018). Enhancing acid tolerance of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM with trehalose. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(19), fny217.
- Wirasorn, K., Klarod, K., Hongprabhas, P., and Boonsiri, P. (2014). Oxidative stress, antioxidant and cancer. *Sringarind Medical Journal*, *29*(2), 207-219.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., and Wozniak, L. (2010). A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry*, *17*(28), 3262-3288.
- Yang, Y., Kadim, M. I., Khoo, W. J., Zheng, Q., Setyawati, M. I., Shin, Y. J., Lee, S. C., and Yuk, H. G. (2014). Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella Enteritidis* cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, *191*, 24-31.
- Yerlikaya, O., Saygili, D., and Akpinar, A. (2020). Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*, *41*, 418-425.
- Yue, Y., Wang, S., Shi, J., Xie, Q., Li, N., Guan, J., Evvie, S. E., Liu, F., Li, B., and Huo, G. (2022). Effects of *Lactobacillus acidophilus* KLDS1.0901 on proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 4298.
- Zhang, X., Esmail, G. A., Alzeer, A. F., Arasu, M. V., Vijayaraghavan, P., Choi, K. C., and Al-Dhabi, N. A. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated

from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3505-3513.

Zhao, T., Wang, H., Liu, Z., Liu, Y., DeJi., Li, B., and Huang, X. (2023). Recent perspective of *Lactobacillus* in reducing oxidative stress to prevent disease. *Antioxidants*.; 12(3),769.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวง สาธารณสุข. (2563). ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2563 Hospital-Based Cancer Registry 2020. กรุงเทพฯ.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวง สาธารณสุข. (2564) “ความรู้โรคมะเร็งสำหรับประชาชน” เข้าถึงเมื่อ 9 กันยายน 2564 เข้าถึงได้จาก https://www.nci.go.th/th/New_web/service/sv1.html



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

1. อาหารเลี้ยงเซลล์

1.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium ที่ประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum

DMEM (ผสมใน ultrapure water)

Fetal bovine serum

Penicillin-streptomycin

ผสมส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าด้วยกันแล้วกรองด้วยตัวกรองที่มีกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

2.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, pH 6.5± 0.20

MRS broth media 55.15 กรัม

น้ำกลั่น 1000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร (กรัม/ลิตร)

Peptone	10.00 กรัม
Beef extract	10.00 กรัม
Yeast extract	5.00 กรัม
Glucose	10.00 กรัม
Sodium acetate trihydrate	5.00 กรัม
Tween 80	1.00 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.00 กรัม
Ammonium citrate	2.00 กรัม

Magnesium sulfate heptahydrate	0.10 กรัม
Manganese sulfate tetrahydrate	0.05 กรัม

2.2 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

MRS broth	55.15 กรัม
Agar	15.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารลงในน้ำกลั่น ทำให้ร้อนละลายหมด (ใส) โดยใช้ความร้อน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส เขย่าภาชนะที่ใส่อาหารเพื่อให้วุ้นที่ตกตะกอนกระจายตัวก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20-25 มิลลิลิตร รองอาหารแข็งตัว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 Nutrient broth (NB)

Nutrient broth	13.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 Nutrient agar (NA)

Nutrient broth	13.00 กรัม
Agar	15.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารและ agar ลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วเขย่าภาชนะที่ใส่อาหารเพื่อให้วุ้นที่ตกตะกอนกระจายตัวก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20-25 มิลลิลิตร รองอาหารแข็งตัวจากนั้น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5 Brain Heart Infusion (BHI) broth

BHI broth	37.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.6 Brain Heart Infusion (BHI) agar

BHI broth	37.00 กรัม
Agar	15.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารและ agar ลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วเขย่าภาชนะที่ใส่อาหารเพื่อให้วุ้นที่ตกตะกอนกระจายตัวก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ ประมาณ 20-25 มิลลิลิตร ร่อนอาหารแข็งตัวจากนั้น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. Phosphate Buffered Saline (PBS buffer), pH 7.4

Sodium chloride	8.00 กรัม
Potassium chloride	0.20 กรัม
Disodium phosphate	1.42 กรัม
Monopotassium phosphate	0.24 กรัม
น้ำกลั่น	1000.00 มิลลิลิตร

ละลายสารเคมีในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 ด้วย 1M Hydrochloric acid จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1000.00 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลง เก็บสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง

2. 50X TAE buffer

Tris base	48.40 กรัม
0.5 M EDTA, pH 8.0	20.00 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	11.42 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.00 มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น แล้วเติม EDTA จากนั้นค่อย ๆ จากนั้นเติม Glacial acetic acid (ทำชั้นตอนนี้ในตู้ดูดควัน) ผสมให้เข้ากันและปรับให้มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลง เก็บสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง

3. 100 mg/ml Penicillin

Penicillin	0.50 กรัม
Ultrapure water	5.00 มิลลิลิตร

ละลาย Penicillin ใน ultrapure water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.22 μm และแบ่งใส่ Microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. 100 mg/ml Streptomycin

Streptomycin 0.50 กรัม

Ultrapure water 5.00 มิลลิลิตร

ละลาย Streptomycin ใน ultrapure water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองผ่านเมมเบรนป
ลอดเชื้อขนาด 0.22 μm และแบ่งใส่ Microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	หทัยภัทร ศิรินาวี
วัน เดือน ปี เกิด	30 กันยายน 2539
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2558-2561 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2562-ปัจจุบัน ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	187/2 หมู่ 7 ตำบล อ่างทอง อำเภอ เมือง จังหวัด ราชบุรี รหัสไปรษณีย์ 70000
ผลงานตีพิมพ์	Thongaram T, Samlee A, Lertprasert N, Klongpitkul N, Chaiyananta S, and Sirinawee H. 2020. Probiotic potential of lactic acid bacteria as antibiotic alternatives in feed for swine. Abstract of the 30th National Academic Conference at Thaksin University: Thailand-Driven Research & Innovation, Songkhla, Thailand, May 30, 2020. Sirinawee, H., and Thongaram, T. 2022. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from dairy products and dietary supplements. Proceedings of the 13th National Science Research Conference (SRC13): Research and Innovation for the New Normal Life at Thaksin University, Phatthalung, Thailand. May 12-13, 2022, p.194-202.
รางวัลที่ได้รับ	รางวัล Best presentation award ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 13 (13th Science Research Conference, SRC13) ณ มหาวิทยาลัยทักษิณ จัดขึ้นระหว่างวันที่ 12-13 พฤษภาคม พ.ศ. 2565