



คุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลต่อระดับคอเลสเตอรอลและเซลล์ไขมัน 3T3-

L1

โดย

นางสาวไอลดา ชุนอินทร์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

คุณสมบัติโพธิ์ไปโอดิกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลต่อระดับคอเลสเทอรอลและเซลล์

ไขมัน 3T3-L1



โดย  
นางสาวไอลดา ชุนอินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA FOR CHOLESTEROL-  
LOWERING PROPERTIES AND THEIR EFFECTS ON 3T3-L1 PREADIPOCYTES



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



620720051 : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก, โพรไบโอติก, คอเลสเทอรอล, เซลล์ 3T3-L1 preadipocyte

นางสาว ไอลดา ขุนอินทร์: คุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลต่อระดับคอเลสเทอรอลและเซลล์ไขมัน 3T3-L1 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. ทักษิณ ทองอร่าม

ปัจจุบันโพรไบโอติกได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาผลต่อภาวะเมแทบอลิซึม ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญทั่วโลก ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีผลต่อการลดคอเลสเทอรอล และสามารถยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 ได้ จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมดจำนวน 11 ไอโซเลท ระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Lactobacillus* จำนวน 5 ไอโซเลท *Lacticaseibacillus* จำนวน 3 ไอโซเลท และ *Streptococcus* จำนวน 3 ไอโซเลท เมื่อทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียอ้างอิง (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบสามารถทนต่อกรด (pH 2.5) ได้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 16.35-85.77 เปอร์เซ็นต์ สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) ได้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 8.86-99.50 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Lacticaseibacillus* ส่วนใหญ่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin ได้ และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ทดสอบ (*B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 และ *S. Typhimurium* TISTR 292) นอกจากนี้จากการศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมของโพรไบโอติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 83.76-91.81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปทดสอบผลต่อการลดระดับคอเลสเทอรอล พบว่ามีเพียงไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase และลดระดับคอเลสเทอรอลได้ดี (82.70 และ 70.73 เปอร์เซ็นต์) ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P > 0.05$ ) กับไอโซเลทอื่น หลังจากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ไปศึกษาการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte พบว่า LCFS ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถยับยั้งการสร้างไขมันได้ดี โดย LCFS ของทั้งสองไอโซเลทที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (500  $\mu\text{g/ml}$ ) สามารถลดไขมันสะสมในเซลล์ไขมันได้ดีที่สุด (40.96 และ 42.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกสามารถลดระดับคอเลสเทอรอลและยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ได้ จึงเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองและพัฒนาเพื่อใช้ร่วมกับยาสังเคราะห์สำหรับภาวะเมแทบอลิซึมต่อไป

620720051 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : LACTIC ACID BACTERIA, PROBIOTIC, CHOLESTEROL, 3T3-L1 PREADIPOCYTE

MISS Ailada KUNIN : Probiotic potential of lactic acid bacteria for cholesterol-lowering properties and their effects on 3T3-L1 preadipocytes Thesis advisor : taksawan thongaram, Ph.D.

Probiotics are currently receiving considerable interest in studying their effects on metabolic syndrome, which is a major global health problem. The objective of this research was to isolate lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential from dairy products and dietary supplements that have the ability to lower cholesterol and have effects on 3T3-L1 adipocytes. A total of 11 isolates were isolated and identified as 5 isolates of *Lactobacillus*, 3 isolates of *Lacticaseibacillus* and 3 isolates of *Streptococcus*. When tested for probiotic potential in combination with reference strains (*L. acidophilus* TISTR 2365 and *L. curvatus* TISTR 938), most of the lactic acid bacteria tested were acid tolerant (pH 2.5). Survival was in the range of 16.35-85.77%. Bile salt tolerance (0.3% w/v) was in the range of 8.86-99.50%. The results of all 9 antibiotic resistance tests showed that *Lactobacillus* and *Lacticaseibacillus* are most resistant to gentamycin, sulfamethoxazole, and vancomycin. They also inhibited all five pathogenic bacteria strains tested (*B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 and *S. Typhimurium* TISTR 292). In addition, from the study of additional properties of probiotics, it was found that all strains of lactic acid bacteria tested had DPPH scavenging activity (%) in the range of 83.76-91.81%. When the lactic acid bacteria were tested for their effect on cholesterol-lowering properties, it was found that only MD-5 (*L. plantarum* 3335) and MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) had bile salt hydrolase activity and had effective cholesterol removal (82.70 and 70.73%) that is significantly different from other isolates, with a significance level of 0.05 ( $P > 0.05$ ). The concentrations of lyophilized cell-free supernatant (LCFS) of MD-5 (*L. plantarum* 3335) and MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) that are non-toxic to 3T3-L1 preadipocyte cells were screened. To investigate the anti-adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte, it was found that the LCFS of MD-5 (*L. plantarum* 3335) and MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) were able to inhibit of lipid content accumulated in 3T3-L1 adipocyte. Both strains inhibited of lipid content the most at the highest concentration of 500  $\mu\text{g/ml}$  (40.96 and 42.08% respectively). These results collectively demonstrate that the lactic acid bacteria MD-5 (*L. plantarum* 3335) and MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) have probiotic properties that can lower cholesterol and have anti-adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte. Therefore, they are suitable to be studied *in vivo* and developed to be used in conjunction with synthetic drugs for metabolic syndrome in the future.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากความกรุณาอย่างยิ่งของ อาจารย์ ดร.ทักษวัน ทองอร่าม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และคำปรึกษาแนะนำที่ดีในการทำวิจัยมาโดยตลอด อีกทั้งยังให้การสนับสนุนทั้งงบประมาณ อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ประศุพัฒนา และดร.ศรัณญา เหล่าวิทยางค์กูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษา รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับทุนการศึกษาสำหรับนักศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตเพื่อเป็นผู้ช่วยวิจัย ประจำปีการศึกษา 2562 จำนวน 200,000 บาท

ขอขอบคุณคุณอาจารย์ภาคจุลชีวะวิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่ดีตลอดมา ขอขอบพระคุณนางสาวกรพรรณ เศวตสุวรรณกุล นักวิทยาศาสตร์ของภาคจุลชีวะวิทยาที่คอยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาจุลชีวะวิทยาทุกท่านที่ติดต่อประสานงานและให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ขอขอบคุณนางสาวหทัยภัทร ศิรินาวิ รุ่งที่ รุ่งน้อง และเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาตลอดจนอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัย ที่คอยให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนการศึกษาตลอดมา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณมา ณ ที่นี้

นางสาว ไอลดา ขุนอินทร์



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
3. สมมติฐานของงานวิจัย.....	2
4. ขอบเขตของการศึกษา.....	2
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. ภาวะเมแทบอลิกซินโดรม.....	4
1.1 นิยามของภาวะเมแทบอลิกซินโดรม.....	4
1.2 สาเหตุ.....	4
1.3 เกณฑ์การวินิจฉัย.....	4
2. ภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน.....	5
2.1 นิยามของภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน.....	5
2.2 สาเหตุ.....	5
2.3 เกณฑ์การวินิจฉัย.....	5



2.4 การรักษา.....	6
2.5 ผลของสารเมแทบอลิต์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อโรคอ้วน.....	6
3. เนื้อเยื่อไขมัน.....	8
3.1 นิยามของเนื้อเยื่อไขมัน.....	8
3.2 ประเภทของเซลล์ไขมัน.....	9
3.3 เซลล์ไขมันชนิด 3T3 L-1.....	10
3.4 กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน.....	11
3.5 การวิเคราะห์ไขมันสะสมบนเซลล์ไขมัน ด้วยวิธี Oil Red O (ORO) staining.....	12
4. คอเลสเตอรอล.....	14
4.1 นิยามของคอเลสเตอรอล.....	14
4.2 โครงสร้างของคอเลสเตอรอล.....	14
4.3 ประเภท และหน้าที่ของคอเลสเตอรอล.....	15
4.4 การลดคอเลสเตอรอลโดยโพรไบโอติก.....	16
5. แบคทีเรียกรดแลคติก.....	18
5.1 นิยามของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	18
5.2 สกูลของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	18
5.3 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	20
6. โพรไบโอติก.....	21
6.1 นิยามของโพรไบโอติก.....	21
6.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติก.....	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
เชื้อจุลินทรีย์ เซลล์ และสารเคมี.....	27
เครื่องมือ อุปกรณ์และเครื่องแก้ว.....	29
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31

1.การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร .....	31
2.การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา .....	31
3.การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้.....	31
4.การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้.....	33
4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก.....	33
4.2 การเตรียมสารละลายส่วนใส (supernatant) .....	33
4.3 การเตรียมตะกอนเซลล์ (cell pellet) .....	34
5.การทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ .....	34
5.1 การทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี.....	34
5.2 การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ .....	34
5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค .....	35
5.4 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH .....	35
6.การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคอเลสเทอรอล .....	35
6.1 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) .....	35
6.2 การทดสอบการลดระดับคอเลสเทอรอล .....	36
7. การทดสอบผลของโปรไบโอติกต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 .....	37
7.1 การเตรียม lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติก..	37
7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไขมัน 3T3-L1 .....	37
7.3 adipocyte differentiation .....	38
7.4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	38
7.5 การตรวจสอบการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1.....	39
8.การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	39
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง .....	40
1.ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก.....	40

2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	41
3. ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene.....	44
4. ผลการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	46
4.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรด.....	46
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี .....	49
4.3 ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ.....	52
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค .....	57
4.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ .....	62
5. ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการลดระดับคอเลสเตอรอล .....	65
5.1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase .....	65
5.2 ผลการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอล .....	69
6. ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte .....	74
6.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte.....	74
6.2 ผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte.....	79
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	86
รายการอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเซลล์ .....	107
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	110
ประวัติผู้เขียน.....	114

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ดัชนีมวลกาย (BMI) ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและระดับความเสี่ยงของการเกิดโรคร่วม.....	6
ตารางที่ 2 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ .....	32
ตารางที่ 3 สภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ .....	33
ตารางที่ 4 แหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้ .....	40
ตารางที่ 5 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัญญาณวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	41
ตารางที่ 6 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene.....	45
ตารางที่ 7 ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	48
ตารางที่ 8 ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	51
ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ Lactobacillus จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ Charteris et al., 1998 .....	55
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ S. thermophilus จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ CLSI M100-S28.....	56
ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA .....	60
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของขนาด clear zone (mm).....	61
ตารางที่ 13 ผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี DPPH .....	64
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase.....	68
ตารางที่ 15 เซลล์ไขมัน 3T3-L1 หลังการกระตุ้นด้วยการเติม adipogenesis inducers (control) และเซลล์ไม่ได้รับการกระตุ้น (undifferentiated) ที่เวลา 6 วัน .....	82
ตารางที่ 16 การทดสอบผลของ simvastatin (positive control) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1 .....	82

ตารางที่ 17 การทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1 ..... 83

ตารางที่ 18 การทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1..... 84



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 เนื้อเยื่อไขมันของหนู.....	8
รูปที่ 2 ชนิดของเซลล์ไขมัน .....	9
รูปที่ 3 ลักษณะของเซลล์ 3T3-L1 ในสภาวะ low density (A), และสภาวะ high density (B).....	11
รูปที่ 4 กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน (adipogenesis) .....	12
รูปที่ 5 โครงสร้างของ Oil Red O.....	12
รูปที่ 6 differentiated human adipocyte ที่ย้อมด้วย Oil Red O ในหลอดทดลอง.....	13
รูปที่ 7 โครงสร้างของคอเลสเทอรอล.....	14
รูปที่ 8 เอชดีแอลคอเลสเทอรอล และแอลดีแอลคอเลสเทอรอล .....	15
รูปที่ 9 การย่อยสลายกรดน้ำดี (Bile acid metabolism) .....	16
รูปที่ 10 ลักษณะสัณฐานของ <i>L. plantarum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	19
รูปที่ 11 ลักษณะสัณฐานของ <i>Streptococcus thermophilus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	20
รูปที่ 12 กลไกการทนต่อกรดของ <i>Lactobacillus</i> 1) F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATPase proton pump, 2) Decarboxylation and deamination, 3) Cell membrane modification และ 4) Macromolecule protection and repair .....	23
รูปที่ 13 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar (A) เทียบกับ MRS agar ที่เสริมด้วย TDCA และ CaCl <sub>2</sub> (B) .....	67
รูปที่ 14 เปอร์เซ็นต์การลดลงของคอเลสเทอรอลเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ Cholesterol-PEG 600 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	72
รูปที่ 15 เปอร์เซ็นต์ของคอเลสเทอรอลในอาหาร MRS broth (supernatant) และ cell pellet เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ Cholesterol-PEG 600 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง.....	73

รูปที่ 16 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 24 ชั่วโมง (A); และ 48 ชั่วโมง (B); และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน (C) เมื่อทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03)..... 78

รูปที่ 17 เปอร์เซ็นต์ของไขมันสะสมในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน เมื่อทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03)..... 85





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กลุ่มโรคไม่ติดต่อ (noncommunicable diseases: NCDs) เป็นปัญหาสุขภาพอันดับหนึ่งของโลก ทั้งในมิติของจำนวนการเสียชีวิตและภาวะโรคโดยรวม จากการรายงานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) ระบุว่าโรคไม่ติดต่อเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตทั่วโลก คิดเป็นร้อยละ 71 ของสาเหตุการเสียชีวิตทั้งหมดของประชากรโลก (Budreviciute et al., 2020) และสำหรับประเทศไทยนั้นกลุ่มโรคไม่ติดต่อยังคงเป็นปัญหาสุขภาพอันดับหนึ่ง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสถานการณ์ระดับโลก มีอัตราการเสียชีวิตจากโรคไม่ติดต่อเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มทวีความรุนแรงมากขึ้นในประชากรไทย (อรรถเกียรติ และคณะ, 2562)

โรคไม่ติดต้อมีปัจจัยเสี่ยงหลักมาจากภาวะเมแทบอลิกซินโดรม (metabolic syndrome) ซึ่งภาวะเมแทบอลิกซินโดรม หมายถึง กลุ่มอาการที่ประกอบด้วย โรคอ้วนลงพุง ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง และระดับไขมันในเลือดสูง ที่จะเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และหลอดเลือด ซึ่งถือว่าเป็นโรคไม่ติดต่อที่มีอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับต้น ๆ โดยการป้องกันภาวะอาการเมแทบอลิกซินโดรมที่สำคัญ ได้แก่ การควบคุมระดับไขมันในเลือด ระดับความดันโลหิต ระดับน้ำตาลในเลือด และที่สำคัญคือ การลดเส้นรอบเอวหรือการลดน้ำหนัก ซึ่งจะส่งผลต่อการลดลงของไขมันในช่องท้องที่เป็นต้นเหตุ (ปานทิพย์ และคณะ, 2559)

ภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน (overweight and obesity) คือ การมีปริมาณไขมันในร่างกายมากกว่าปกติ โดยมีลักษณะการขยายตัวของเนื้อเยื่อไขมันจากการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ไขมัน (adipocyte) ซึ่งเกิดจากร่างกายสะสมพลังงานจากการรับประทานอาหารมากกว่าการเผาผลาญอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จนเป็นปัจจัยเสี่ยงหรือเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ ที่ส่งผลถึงสุขภาพจนอาจเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตได้ ในปัจจุบันมีวิธีการรักษาโรคอ้วนที่หลากหลาย โดยวิธีที่นิยมใช้ คือ การควบคุมปริมาณอาหารในการรับประทานแต่ละมื้อ การออกกำลังกาย การใช้น้ำหนัก และการผ่าตัดลดความอ้วน อย่างไรก็ตามการใช้น้ำหนัก และการผ่าตัดลดความอ้วนค่อนข้างมีผลข้างเคียงสูง ซึ่งสามารถเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการช่วยลดไขมันในร่างกายซึ่งมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อร่างกายน้อยกว่ายาสังเคราะห์

แบคทีเรียโพรไบโอติก (probiotic) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งหากได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลดีให้แก่โฮสต์ (Sanders, 2009) ประโยชน์ของโพรไบโอติก เช่น ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น และยังช่วยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น (มาลัย, 2553) นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกที่

สามารถผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase จะมีคุณสมบัติช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลได้ (Kumar et al., 2013; Shehata et al., 2016) และในปัจจุบันยังมีการศึกษาโพรไบโอติกที่มีส่วนช่วยยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมันอีกด้วย (Choi et al., 2020; Park et al., 2011)

จากประโยชน์ที่ได้กล่าวมาทั้งหมดของโพรไบโอติก โดยเฉพาะความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลและไขมัน อาจเป็นทางเลือกในการรักษาโรคอ้วน และลดระดับไขมันในเลือด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญของภาวะเมแทบอลิกซินโดรม ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก ทดสอบผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อระดับคอเลสเตอรอลและการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันในหลอดทดลอง

## 2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

2.2 เพื่อให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีผลต่อการลดระดับคอเลสเตอรอล

2.3 เพื่อให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมัน

3T3-L1

## 3. สมมติฐานของงานวิจัย

3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีคุณสมบัติโพรไบโอติก

3.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก สามารถลดระดับคอเลสเตอรอล และลดไขมันสะสมในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 ในหลอดทดลองได้

## 4. ขอบเขตของการศึกษา

4.1 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งระบุสายพันธุ์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

4.2 ศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ โดยทดสอบคุณสมบัติทนต่อกรด การทนต่อเกลือ น้ำดี การต้านยาปฏิชีวนะ การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และการต้านอนุมูลอิสระ

4.3 คัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลอง

4.4 ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte และการลดไขมันสะสมในเซลล์ไขมัน 3T3-L1

## 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1 ได้แบบคที่เรียกรวดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก
- 5.2 ได้แบบคที่เรียกรวดแลคติกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลและลดไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 ในหลอดทดลอง



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ภาวะเมแทบอลิกซินโดรม

##### 1.1 นิยามของภาวะเมแทบอลิกซินโดรม

ภาวะเมแทบอลิกซินโดรม (metabolic syndrome) หมายถึง กลุ่มอาการที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายผิดปกติ ได้แก่ ภาวะความดันโลหิตสูง ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ระดับไขมันในเลือดสูง รวมไปถึงระบบฮอร์โมนและสารเคมีอีกหลายกลุ่มในร่างกายที่ส่งผลเชื่อมโยงกันและก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะต่าง ๆ (Grundy, 2004)

##### 1.2 สาเหตุ

สาเหตุหลักของภาวะเมแทบอลิกซินโดรมมาจากความอ้วน โดยเฉพาะอ้วนลงพุง (central obesity) คือ ผู้ที่มีไขมันหน้าท้องมาก ทำให้เกิดภาวะดื้อต่อการออกฤทธิ์ของอินซูลิน ความดันโลหิตสูง ไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง เอชดีแอลคอเลสเตอรอลในเลือดต่ำ น้ำตาลในเลือดสูง ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือด หรือภาวะเซลล์บุผนังหลอดเลือดผิดปกติ (endothelial dysfunction) ตามมา (Grundy et al., 2004)

##### 1.3 เกณฑ์การวินิจฉัย

ในปี พ.ศ. 2553 ได้มีการร่วมมือระหว่างสหพันธ์เบาหวานนานาชาติ องค์การอนามัยโลก สมาคมโรคหัวใจ สถาบันหัวใจ ปอด และเลือดแห่งชาติของประเทศสหรัฐอเมริกา สมาคมหลอดเลือดนานาชาติ และสมาคมเพื่อการศึกษาของโรคอ้วน มีมติร่วมกันให้ใช้เกณฑ์วินิจฉัยเดียวกันทั่วโลกโดยเรียกว่า harmonizing the metabolic syndrome ซึ่งเกณฑ์การวินิจฉัยโรคจะต้องมีความผิดปกติอย่างน้อย 3 ใน 5 ข้อ ต่อไปนี้ (Khamchata et al., 2018)

- 1.) อ้วนลงพุง โดยใช้เส้นรอบวงเอวแตกต่างกันตามข้อมูลของแต่ละเชื้อชาติหรือแต่ละประเทศ
- 2.) ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 150 mg/dl หรือรับประทานยา หรือรับการรักษาอยู่
- 3.) ระดับเอชดีแอลคอเลสเตอรอล ในเพศชายน้อยกว่า 40 mg/dl และในเพศหญิงน้อยกว่า 50 mg/dl หรือรับประทานยาหรือรับการรักษาอยู่
- 4.) ความดันโลหิตมากกว่าหรือเท่ากับ 130/85 mmHg หรือรับประทานยาลดความดันโลหิตอยู่
- 5.) ระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารมากกว่าหรือเท่ากับ 110 mg/dl หรือรับประทานยา หรือรับการรักษาอยู่

## 2. ภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน

### 2.1 นิยามของภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน

ภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน (overweight and obesity) หมายถึง ภาวะที่ร่างกายมีการสะสมไขมันตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายมากกว่าปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ จากน้ำหนักตัวที่มากเกินไป รวมถึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อ และอาจเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตได้ เช่น ไขมันในเลือดสูง โรคหลอดเลือดหัวใจ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน ข้อเข่าเสื่อม และโรคซึมเศร้า เป็นต้น (Kongjarern, 2017)

### 2.2 สาเหตุ

สาเหตุสำคัญของโรคอ้วนเกิดจากการที่ร่างกายขาดสมดุลระหว่างพลังงาน โดยมีการใช้พลังงานน้อยกว่าพลังงานที่ได้รับเข้าไป พลังงานที่ได้จึงมากเกินไปจนเกินความต้องการในแต่ละวันทำให้ร่างกายเก็บสะสมพลังงานส่วนเกินไว้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกลายเป็นโรคอ้วน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคอ้วน เช่น ปัจจัยทางพฤติกรรม กรรมพันธุ์ ปัญหาสุขภาพ สิ่งแวดล้อม สังคมและวัฒนธรรม เป็นต้น (Kopelman, 2000)

### 2.3 เกณฑ์การวินิจฉัย

เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะน้ำหนักเกิน และโรคอ้วน โดยการวินิจฉัยโรคอ้วนที่มีความแม่นยำมากที่สุด คือ การวัดปริมาณไขมันในร่างกายว่ามีอย่างน้อยเพียงใด แต่การวัดปริมาณไขมันในร่างกายต้องใช้เครื่องมือพิเศษและมีค่าใช้จ่าย เช่น การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของร่างกาย (body composition) ด้วยวิธี Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA) เพื่อตรวจวัดปริมาณไขมันในร่างกาย และคำนวณรูปร่างโดยใช้โปรแกรม Hologic QDR เป็นต้น (Nicolucci et al., 2017) ในทางปฏิบัติจึงนิยมใช้ดัชนีมวลกาย (Body Mass Index: BMI) เพื่อการวินิจฉัยโรคอ้วน

การใช้ดัชนีมวลกาย (Body Mass Index: BMI) องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้มีการแบ่งเกณฑ์ค่าระดับดัชนีมวลกาย เพื่อใช้เป็นแบบคัดกรองผู้ที่มีภาวะน้ำหนักเกิน โรคอ้วน และผู้ที่มีน้ำหนักต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานในผู้ใหญ่ที่อายุ 20 ปีขึ้นไป โดยค่า BMI คำนวณจาก ค่าของน้ำหนักตัว (kg) หารด้วยส่วนสูง ( $m^2$ ) ค่าดัชนีมวลกายและระดับความเสี่ยงของการเกิดโรคแสดงดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ดัชนีมวลกาย (BMI) ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและระดับความเสี่ยงของการเกิดโรคร่วม

Classification	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Risk of co-morbidities
Underweight	<18.50	Low (other health risk)
Normal range	18.50-24.99	Average
Overweight	≥25.00	-
Preobese	25.00-29.99	Increased
Obese class I	30.00-34.99	Moderate
Obese class II	35.00-39.99	Severe
Obese class III	≥40.00	Very severe

ที่มา World Health Organization, 2000

#### 2.4 การรักษา

ปัจจุบันมีการศึกษาแนวทางการรักษาโรคอ้วนหลากหลายวิธี โดยวิธีที่เป็นที่นิยมส่วนใหญ่ ได้แก่ การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย การใช้ยาลดน้ำหนัก และการผ่าตัด แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาลดน้ำหนักลดความอ้วนค่อนข้างมีผลข้างเคียงสูงสามารถเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ในปัจจุบันจึงมีการยกเลิกการใช้ยาลดน้ำหนักหลายชนิด เช่น ยา Fenfluramine และ Dexfenfluramine ที่ส่งผลให้เกิดลิ้นหัวใจรั่ว ยา Rimonabant ทำให้มีอาการซึมเศร้า ฆ่าตัวตายได้ และยา Sibutramine ส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและสมอง (กรมการแพทย์, 2553)

มีรายงานการวิจัยที่ใช้โพรไบโอติกในการป้องกันและรักษาโรคอ้วนในมนุษย์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ปลอดภัย มีการรายงานว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* Dad-13 สามารถช่วยลดน้ำหนักตัวและดัชนีมวลกายในมนุษย์ได้ และยังช่วยเพิ่มจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroidetes* และลด *Firmicutes* ในร่างกายของผู้ทดลองด้วย (Rahayu et al., 2019) นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. sakei* สามารถลดมวลไขมันในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอ้วนได้ (Lim et al., 2020)

#### 2.5 ผลของสารเมแทบอลิต์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อโรคอ้วน

มีการศึกษากลไกเพิ่มเติมของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าสารเมแทบอลิต์ของแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลต่อการต้านโรคอ้วนโดยสามารถควบคุมเมแทบอลิซึมของโฮสต์ได้ รวมทั้งยับยั้งการสร้างไขมัน เร่งการสลายไขมัน และลดความอยากอาหารหรือการบริโภคอาหารผ่านระบบประสาทส่วนกลาง (Shen et al., 2022) อ้างจาก (Org et al., 2017) ซึ่งสามารถสรุปกลไกของสารเมแทบอลิต์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อโรคอ้วนได้ดังนี้



### 1.) short chain fatty acids (SCFAs)

แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถหมัก polysaccharide บางชนิดที่ย่อยไม่ได้ แล้วได้ผลผลิตสุดท้ายออกมาเป็นกรดแลคติก และกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids, SCFAs) ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดบิวทีริก (butyric acid)

จากรายงานของ Shen et al. (2022) สามารถสรุปกลไกที่เป็นไปได้ของการต่อต้านโรคอ้วน โดย SCFAs ออกเป็นสองประเด็น ได้แก่ 1) SCFAs มีผลในการควบคุมฮอร์โมนของไฮสแตเพื่อยับยั้งความอยากอาหารและการบริโภคอาหารโดย SCFAs จะไปควบคุมการแสดงออกของ G-protein coupled receptor (GPR) ซึ่ง GPR สามารถควบคุมความอยากอาหารและการหลั่งของเปปไทด์ในทางเดินอาหารได้ รวมทั้งเพิ่มการหลั่งของ glucagon-like peptide 1 (GLP-1) และ peptide YY (PYY) จากเซลล์ enteroendocrine และ leptin จากเนื้อเยื่อไขมัน ส่งผลให้ความอยากอาหารลดลงในที่สุด และ 2) SCFAs สามารถควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมัน เมแทบอลิซึมของไขมัน และการควบคุมพลังงาน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ AMP-activated protein kinase (AMPK) และ peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Shen et al., 2022 อ้างจาก Evans et al., 2004; Hong et al., 2005; Lu et al., 2016; Stefanovic-Racic et al., 2008) Linoleic acid และสารเมแทบอลิต์ของ linoleic acid

แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้สามารถเปลี่ยน linoleic acid (LA) ให้เป็นกรดไขมันที่จำเพาะต่างๆ ผ่านปฏิกิริยา hydrogenation ได้ เช่น hydroxy fatty acids, conjugated fatty acids และ oxo fatty acids เป็นต้น (Shen et al., 2022 อ้างจาก Kishino et al., 2013)

มีการศึกษากรดไขมัน 12 ชนิด ที่ได้จาก linoleic acid ในการกระตุ้น PPARs พบว่า 10-oxo-12(Z)- octadecenoic acid (KetoA) มีศักยภาพสูงที่สุดในการกระตุ้น PPAR $\gamma$  pathway ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของ lipoprotein lipase ใน messenger RNA (mRNA) เพื่อควบคุมการเผาผลาญพลังงานของไฮสแต แสดงให้เห็นว่า oxo fatty acids มีผลต่อโรคอ้วนและสภาวะสมดุลของพลังงานของไฮสแต (Shen et al., 2022 อ้างจาก Goto et al., 2015; Kim et al., 2017) และยังมีการศึกษาอื่นพบว่า conjugated linoleic acid (CLA) จากแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถต้านโรคอ้วนในหนูได้โดยมีการควบคุม UCP-2 การยับยั้ง TNF- $\alpha$  และยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน (Shen et al., 2022 อ้างจาก Lee et al., 2006)



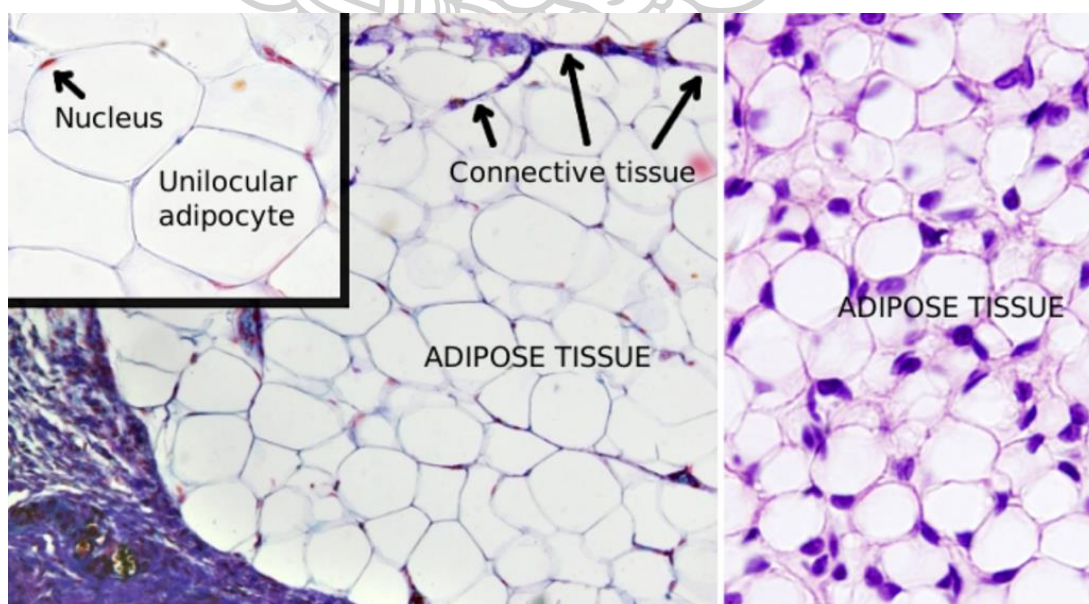
## 2.) Gamma-aminobutyric acid

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสังเคราะห์ Gamma-aminobutyric acid (GABA) ได้จาก glutamic acid ที่เร่งปฏิกิริยาโดย glutamic acid decarboxylase ซึ่ง GABA เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งที่สำคัญที่อาจมีส่วนในการควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมันและการควบคุมความอยากอาหาร (Shen et al., 2022 อ้างจาก Krnjević and Schwartz, 1966; Yadav et al., 2016) และมีการศึกษาผลของ GABA ที่ผลิตโดย *Lactobacillus* ต่อการต้านโรคอ้วนในสัตว์ทดลอง พบว่า GABA สามารถช่วยลดภาวะเมแทบอลิกซินโดรม ลดการสะสมเนื้อเยื่อไขมัน mesenteric และเพิ่มการกำจัดคอเลสเตอรอลในพลาสมาของสัตว์ทดลองได้อีกด้วย (Shen et al., 2022 อ้างจาก Patterson et al., 2019)

## 3. เนื้อเยื่อไขมัน

### 3.1 นิยามของเนื้อเยื่อไขมัน

โรคอ้วนมีลักษณะการเพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) โดยเกิดจากการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ไขมัน ในร่างกายมีเนื้อเยื่อไขมันซึ่งเกิดจากเซลล์ไขมันที่เรียกว่า อดิโพไซต์ (adipocyte) สะสมกันเป็นจำนวนมากและก่อตัวเป็นเนื้อเยื่อไขมัน (รูปที่ 1) เนื้อเยื่อไขมันเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและสร้างชั้นใต้ผิวหนังที่ทำหน้าที่คล้ายฉนวนซึ่งช่วยในการควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นโครงสร้างยึดติดผิวหนังกับเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ผิวหนัง ช่วยรองรับและปกป้องส่วนต่างๆของร่างกาย (Ali et al., 2013)

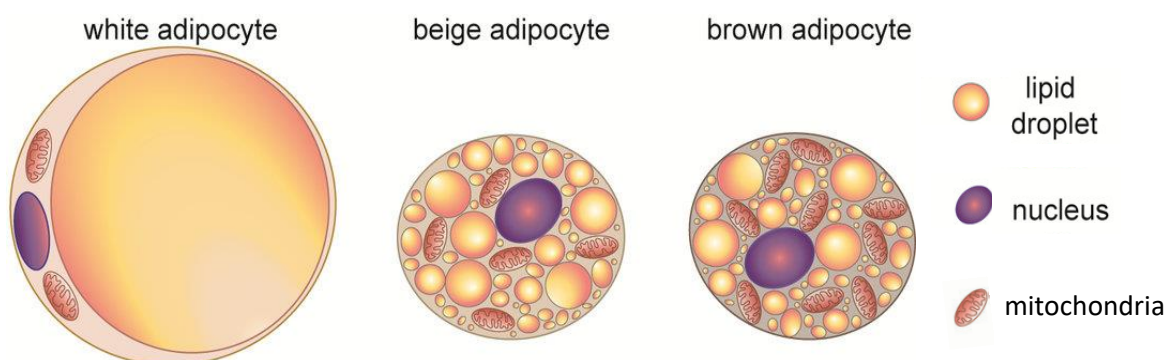


รูปที่ 1 เนื้อเยื่อไขมันของหนู

ที่มา: Atlas of plant and animal histology, 2021

### 3.2 ประเภทของเซลล์ไขมัน

เซลล์ไขมันสามารถแยกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ เซลล์ไขมันสีขาว (white adipocytes) และ เซลล์ไขมันสีเบจ (beige adipocyte) และเซลล์ไขมันสีน้ำตาล (brown adipocytes) ดังรูปที่ 2 (Paul, 2018)



รูปที่ 2 ชนิดของเซลล์ไขมัน

ที่มา: Paul, 2018

3.2.1 เซลล์ไขมันสีขาว (white adipocytes) เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อไขมันสีขาว เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลม ภายในมีหยดไขมันขนาดใหญ่ มีไมโทคอนเดรียจำนวนน้อย (รูปที่ 2) มีหน้าที่สำคัญ คือ เป็นแหล่งสะสมพลังงานในรูปของไตรกลีเซอไรด์ และสามารถรักษาอุณหภูมิร่างกายไว้ได้

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ใหญ่ที่มีภาวะน้ำหนักเกินหรือเป็นโรคอ้วนจะมีเซลล์ไขมันสีขาวเป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อไขมัน เนื่องจากโรคอ้วนมีสาเหตุมาจากพลังงานที่ร่างกายได้รับเข้ามา (energy intake) มีมากกว่าพลังงานที่ถูกใช้ออกไป (energy expenditure) จึงทำให้เกิดภาวะเกินดุลพลังงาน (positive energy balance) พลังงานส่วนเกินจึงถูกสะสมอยู่ในรูปเซลล์ไขมันสีขาว ซึ่งมักสะสมอยู่บริเวณสะโพก ต้นแขน ต้นขา และที่สำคัญคือบริเวณช่องท้อง (visceral fat) ที่ทำให้เกิดภาวะอ้วนลงพุง (Longo et al., 2019)

3.2.2 เซลล์ไขมันสีเบจ (beige adipocyte) เป็นเซลล์ไขมันที่พัฒนามาจากเซลล์ไขมันสีขาว โดยการเพิ่มจำนวนของไมโทคอนเดรียมากขึ้นจึงทำให้มีหน้าที่การทำงานคล้ายคลึงกับเซลล์ไขมันสีน้ำตาล ดังนั้นการกระตุ้นให้มีจำนวนเซลล์ไขมันสีน้ำตาล หรือเซลล์ไขมันสีเบจมากขึ้นจะช่วยให้มีการเผาผลาญพลังงานที่ดี ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำหนักเกินและโรคอ้วน

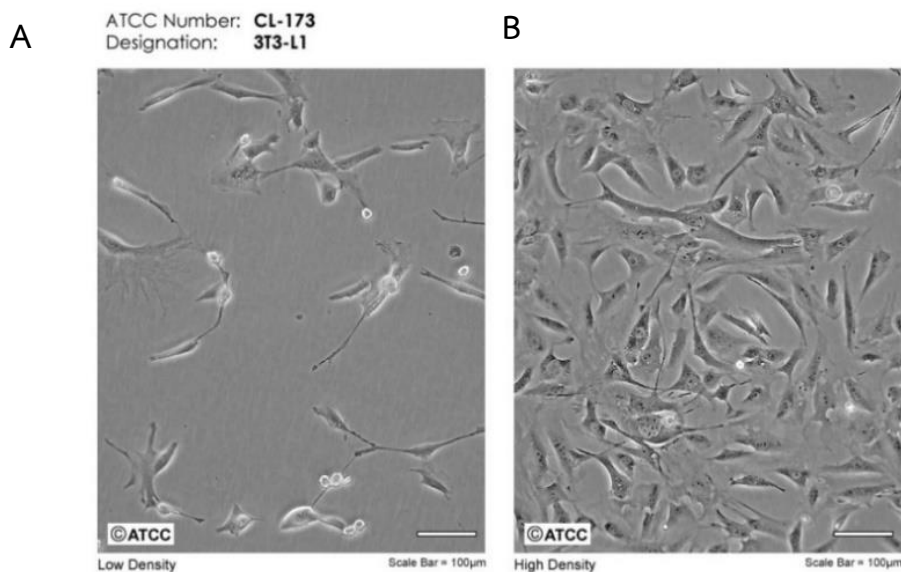
3.2.3 เซลล์ไขมันสีน้ำตาล (brown adipocytes) ประกอบอยู่ในเนื้อเยื่อไขมันสีน้ำตาล ซึ่งเซลล์ไขมันสีน้ำตาลมักพบเป็นจำนวนมากในเด็กแรกเกิด และจะมีจำนวนลดลงเมื่อร่างกายเจริญเติบโต เซลล์มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ไขมันสีขาว มีหยดไขมันขนาดเล็กภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก (multilocular lipid droplets) และมีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก (รูปที่ 2) ทำหน้าที่ในการสร้างความร้อนทำให้ร่างกายสลายไขมันที่สะสมไว้และเปลี่ยนเป็นพลังงาน (Cherdchom et al., 2019)

หากเซลล์ไขมันสีน้ำตาลมีปริมาณเพิ่มขึ้น หรือมีการทำงานมากขึ้นจะสามารถนำไปสู่การลดโรคอ้วน และโรคที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนได้ เนื่องจากจะไปช่วยกระตุ้นกระบวนการ thermogenesis และโปรตีน uncoupling protein1 (UCP1) ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ไขมันสีน้ำตาล เมื่อโปรตีนนี้ถูกกระตุ้นจะช่วยปล่อยอิเล็กตรอนทำให้เกิดความร้อน และทำให้ร่างกายมีการเผาผลาญมากขึ้น มีการใช้พลังงานมากขึ้นจึงนำไปสู่ภาวะขาดดุลพลังงาน (negative energy balance) คือการที่ร่างกายมีการใช้พลังงานออกไปมากกว่าพลังงานที่ได้รับเข้ามา จึงส่งผลให้น้ำหนักตัวลดลง นอกจากนี้เซลล์ไขมันสีน้ำตาลยังช่วยให้ระดับน้ำตาลในเลือดและไขมันในเลือดลดลง และเพิ่มความไวต่ออินซูลิน ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งโรคเบาหวานและภาวะไขมันในเลือดสูง (Kim and Plutzky, 2016)

### 3.3 เซลล์ไขมันชนิด 3T3 L-1

เซลล์ 3T3-L1 คือ เซลล์ไขมันที่แยกได้จากตัวอ่อนของหนู mouse (*Mus musculus*) มีรูปร่างเป็น fibroblast cell นิยมใช้เป็นแบบจำลองเพื่อการวิจัยเมแทบอลิซึม และโรคอ้วน เซลล์ไขมัน 3T3-L1 สามารถเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ได้โดยแบ่งการเจริญได้เป็น 3 ระยะ โดยระยะแรก คือ การเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ไขมัน (preadipocyte) ระยะที่สอง เป็นการเปลี่ยนแปลงเซลล์เริ่มต้นเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte) และระยะที่สาม การเปลี่ยนเป็นเซลล์ไขมันเต็มตัว (mature adipocyte) (Rabalert et al., 2016)

การศึกษาเซลล์ไขมัน 3T3-L1 มักนิยมศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ไขมัน (differentiation) จาก preadipocyte เปลี่ยนเป็น mature adipocyte โดยกลไกการสะสมไขมัน เมื่อนำเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และกระตุ้นด้วย dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) และ insulin จะสามารถทำให้เกิดกระบวนการ adipogenesis เปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ adipocyte (Ruiz et al., 2016)

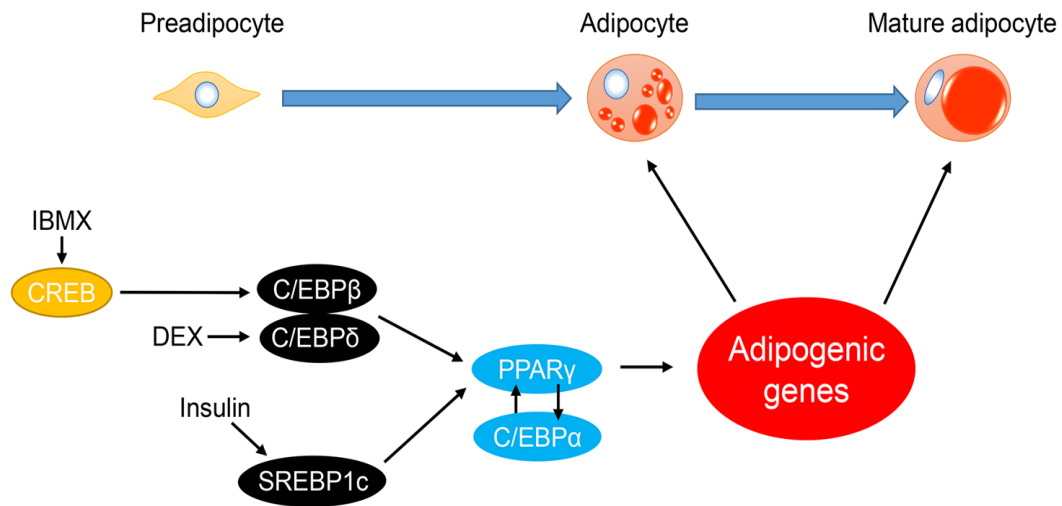


**รูปที่ 3** ลักษณะของเซลล์ 3T3-L1 ในสภาวะ low density (A), และสภาวะ high density (B)  
ที่มา: American Type Culture Collection (ATCC), 2021

#### 3.4 กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน

กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน (adipogenesis หรือ adipocyte differentiation) เป็นกระบวนการเปลี่ยน preadipocyte ให้เป็น adipocyte (Kim et al., 2020) โดยเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ได้รับการกระตุ้นด้วย 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone และ Insulin โดย 1) IBMX จะไปกระตุ้น cAMP response element binding protein (CREB) ทำให้เกิดการแสดงออกของ CCAA/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) ส่วน 2) dexamethasone จะมีผลไปกระตุ้น C/EBP $\delta$  และ 3) Insulin จะไปกระตุ้น Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) โดย C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  และ SREBP1c เป็น transcription factor ที่ส่งผลต่อ Peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) และ PPAR $\gamma$  มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ C/EBP $\alpha$  ด้วย ซึ่ง PPAR $\gamma$  และ C/EBP $\alpha$  จะออกฤทธิ์ร่วมกันควบคุม final phase of adipogenesis โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน adipocyte-specific ส่งผลให้มีการสร้าง fat droplet ขึ้นภายในเซลล์และมีการสะสมของไขมันทำให้เซลล์มีลักษณะกลม ซึ่งจะเรียกเซลล์ที่มีลักษณะดังกล่าวนี้ว่า adipocyte (Sugimoto et al., 2018)



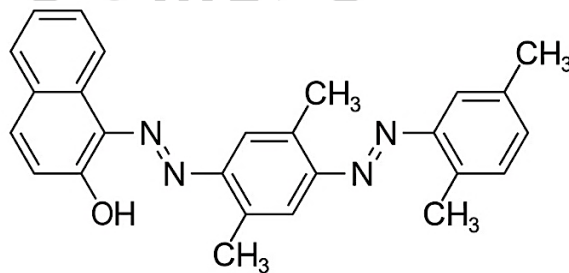


รูปที่ 4 กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน (adipogenesis)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sugimoto et al, 2018

### 3.5 การวิเคราะห์ไขมันสะสมในเซลล์ไขมัน ด้วยวิธี Oil Red O (ORO) staining

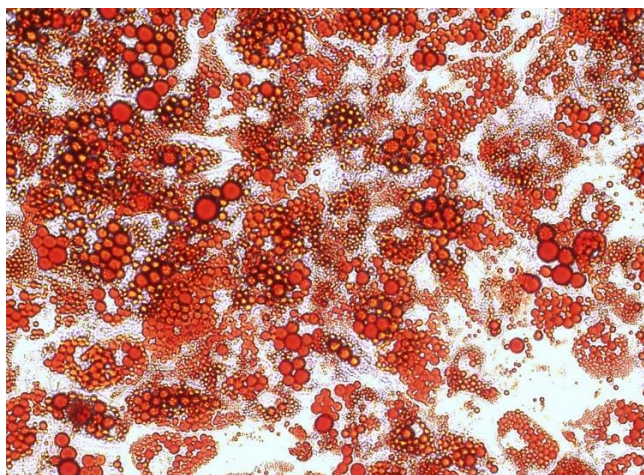
Oil red O หรือเรียกได้อีกชื่อว่า azo dye เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ azo สองหมู่ที่ยึดกับวงแหวนอะโรมาติกสามวง ซึ่งยากต่อการแตกตัวเป็นไอออนทำให้ละลายได้ดีในไขมัน สีของมันสีแดงและสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 518 นาโนเมตร



รูปที่ 5 โครงสร้างของ Oil Red O

ที่มา: MilliporeSigma, 2023

Oil Red O เป็นสีย้อมที่สามารถย้อม neutral lipid, cholesteryl ester และ lipoprotein ได้ มีราคาไม่แพงและไม่เป็นอันตราย เป็นเทคนิคที่นิยมใช้เพื่อตรวจหาปริมาณไขมันหรือวิเคราะห์ adipocyte differentiation ในเซลล์ไขมัน โดยอาศัยความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ (cellular permeability) สามารถย้อม neutral fat ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นสีแดงส้ม (รูปที่ 6) ซึ่งการย้อมติดสี Oil red O ที่มากขึ้นจะบ่งบอกถึงปริมาณไขมัน หรือการเกิด adipogenesis ที่มากขึ้น (Du et al., 2023; Kraus et al., 2016)



รูปที่ 6 differentiated human adipocyte ที่ย้อมด้วย Oil Red O ในหลอดทดลอง  
ที่มา: Boston university school of medicine, 2023

มีรายงานการศึกษา anti-adipogenesis ของสารสกัดจากเซลล์โพรไบโอติกแบคทีเรีย *L. plantarum* KY1032 (KY1032-CE) ต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 ในหลอดทดลอง จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี AdipoRed ผลการทดลองพบว่า KY1032-CE สามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 โดยขึ้นกับปริมาณของสารสกัดจากเซลล์ และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Oil red O staining พบว่า KY1032-CE สามารถลดจำนวนไขมันลงได้ (Park et al., 2011) และยังมีการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LG42 ที่มีผลลดการสะสมไขมันในเซลล์ differentiated 3T3-L1 โดยลดการแสดงออกของยีน PPAR $\gamma$  และ C/EBP $\alpha$  ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ adipogenesis ซึ่งสามารถยับยั้งการสะสมไขมันใน differentiated adipocyte ได้ (Park et al., 2014)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการใช้โพรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติก เช่น สารสกัดจากทับทิม และใช้โพรไบโอติกในการหมักร่วมกับไบซา ต่อการลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์และการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 และยังสามารถควบคุม adipocyte differentiation โดยมีการแสดงออกของ mRNA ของ transcriptional factor น้อยมาก ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการ adipogenesis ในระดับ

หลอดทดลอง และอาจมีผลต่อการพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาโรคอ้วน (Sorrenti et al., 2019; Wang et al., 2018)

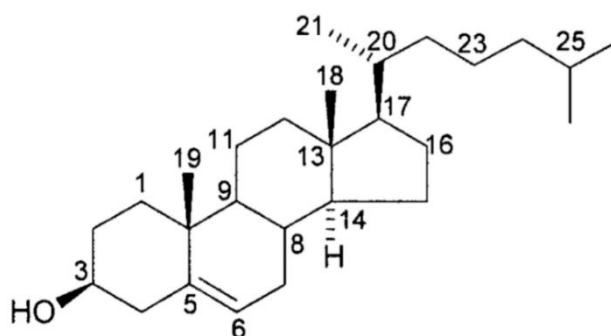
#### 4. คอเลสเตอรอล

##### 4.1 นิยามของคอเลสเตอรอล

คอเลสเตอรอล (cholesterol) คือไขมันชนิดหนึ่ง que พบได้ในส่วนผนังเซลล์ของร่างกาย และมีบทบาทสำคัญในการขนส่งสารภายในเซลล์ การส่งสัญญาณ และการนำกระแสประสาท นอกจากนี้คอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นของกรดน้ำดี วิตามินดี และฮอร์โมนสเตียรอยด์ (Tanwi et al., 2013) ดังนั้นการสังเคราะห์และการนำคอเลสเตอรอลไปใช้ในการผลิตสารต่างๆ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับร่างกาย โดยปกติร่างกายจะสามารถสังเคราะห์คอเลสเตอรอลเองจากตับประมาณ 80% และได้รับจากอาหารที่รับประทานอีก 20% โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีกรดไขมันอิ่มตัวในปริมาณที่สูง เช่น เครื่องในสัตว์ และไข่แดง เป็นต้น ดังนั้นหากรับประทานอาหารที่มีคอเลสเตอรอลมากเกินไปจะกลายเป็นส่วนเกินที่สะสมในร่างกาย

##### 4.2 โครงสร้างของคอเลสเตอรอล

คอเลสเตอรอลเป็นสารประกอบ carbon จำนวน 27 อะตอม มีโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะคือมีส่วน tail ที่เป็น hydrocarbon และส่วน center sterol nucleus เกิดจากวงแหวน hydrocarbon 4 วง กับกลุ่ม hydroxyl ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น steroid hormones โดยทั้งส่วน tail ที่เป็น hydrocarbon และส่วน center sterol nucleus ไม่มีขั้วจึงไม่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นคอเลสเตอรอลจึงจับอยู่กับโปรตีนที่เรียกว่า lipoprotein ซึ่ง lipoprotein แต่ละชนิดก็จะทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลผ่านระบบไหลเวียนโลหิตไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย (Craig M., 2022)



รูปที่ 7 โครงสร้างของคอเลสเตอรอล

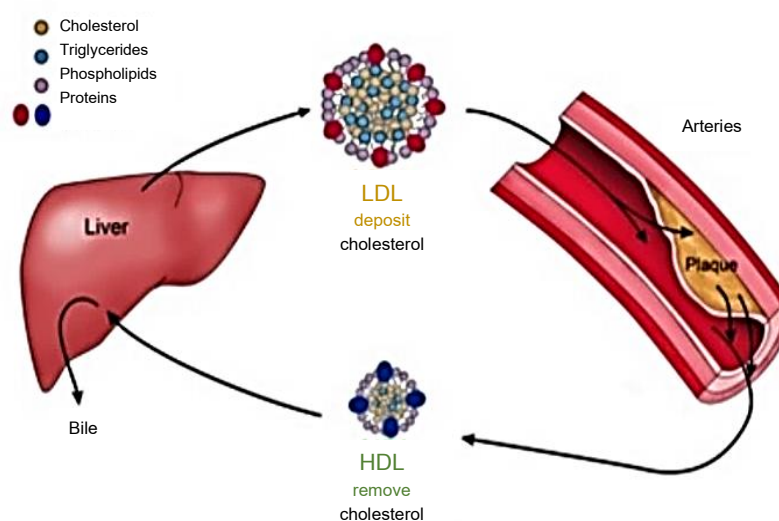
ที่มา: Kim et al, 2006



### 4.3 ประเภท และหน้าที่ของคอเลสเตอรอล

4.3.1 เอชดีแอลคอเลสเตอรอล (high density lipoprotein cholesterol: HDL-C) เป็นไขมันชนิดดี เกิดจากคอเลสเตอรอลจับกับ lipoprotein ที่ชื่อ HDL (high density lipoprotein) แล้ว HDL จะทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลจากเซลล์ต่าง ๆ กลับเข้าสู่ตับและกำจัดออกทางน้ำดี

4.3.2 แอลดีแอลคอเลสเตอรอล (low density lipoprotein cholesterol: LDL-C) เป็นไขมันชนิดร้าย เกิดจากคอเลสเตอรอลจับกับ LDL (low density lipoprotein) แล้ว LDL ทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลไปให้แก่เซลล์หรืออวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ต่อมหมวกไต กล้ามเนื้อโต และ lymphocytes เป็นต้น ซึ่งการมี LDL ในเลือดสูงจะแสดงให้เห็นถึงการมีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Dominiczak and Caslake, 2011) นอกจากนี้ LDL ยังสามารถไปสะสมที่ผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดแดงตีบและแข็ง จึงเป็นสาเหตุการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary Artery Disease: CAD/Coronary Heart Disease: CHD) อีกด้วย (Eisenberg, 1998)



รูปที่ 8 เอชดีแอลคอเลสเตอรอล และแอลดีแอลคอเลสเตอรอล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Harvard university, 2014

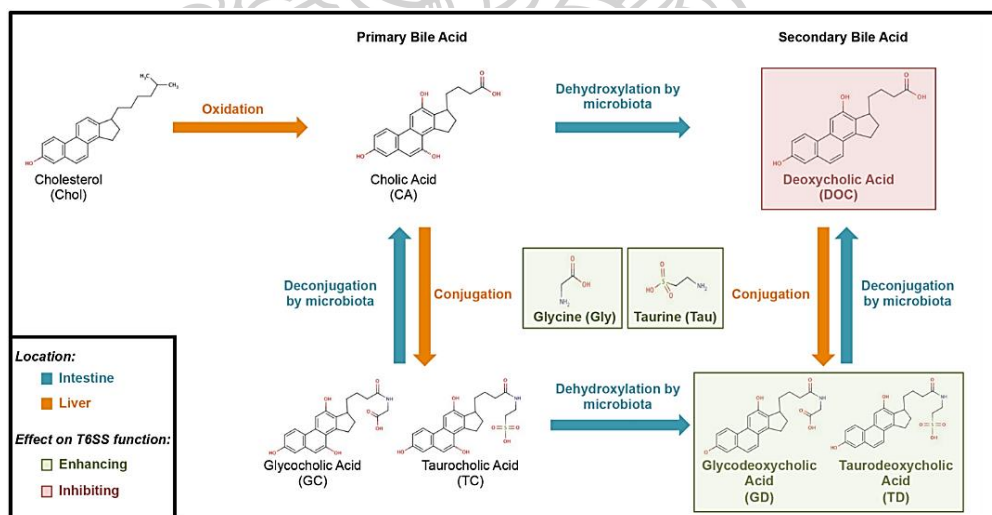
#### 4.4 การลดคอเลสเตอรอลโดยโพรไบโอติก

จากรายงานการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการลดคอเลสเตอรอลที่ผ่านมา พบว่าโพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีความสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ โดยสรุปกลไกของโพรไบโอติกที่เกี่ยวข้องกับการลดคอเลสเตอรอลได้ดังนี้

##### 1.) การสลายตัวของเกลือน้ำดีโดยเอนไซม์ bile salt hydrolase

น้ำดี (bile) มีองค์ประกอบหลักคือ กรดน้ำดี (bile acid) คอเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และรงควัตถุในน้ำดี (bile pigment) น้ำดีถูกสังเคราะห์ขึ้นที่เซลล์ตับ แล้วถูกนำไปเก็บไว้ที่ถุงน้ำดี และถูกปล่อยสู่ลำไส้เล็ก หลังจากนั้นเมื่อมีอาหารเข้าไปคอเลสเตอรอลในตับจะถูกเปลี่ยนเป็น cholic acid และ chenodeoxycholic acid ซึ่งจะทำปฏิกิริยา conjugation กับกรดอะมิโน glycine หรือ taurine ได้เป็น glycocholic acid และ taurocholic acid (รูปที่ 9)

โพรไบโอติกที่สามารถสร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ bile salt hydrolase ที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีได้ จะไปสลายพันธะส่วนกรดอะมิโนของเกลือน้ำดี แล้วเปลี่ยน conjugated bile acid เป็น deconjugated bile acid ทำให้ได้กรดอะมิโน glycine หรือ taurine และกรดน้ำดีอิสระ สามารถถูกขับออกทางอุจจาระได้ ทำให้ร่างกายดึงคอเลสเตอรอลมาสังเคราะห์เป็นเกลือน้ำดีทดแทน จึงส่งผลให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Bachmann et al., 2015)



#### รูปที่ 9 การย่อยสลายกรดน้ำดี (Bile acid metabolism)

ที่มา: Bachmann et al, 2015

## 2.) การตกตะกอนของคอเลสเทอรอลกับ deconjugated bile salt

คอเลสเทอรอลสามารถตกตะกอนร่วมกับ deconjugated bile salt ได้ที่ pH ต่ำ (pH < 6.0) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ที่ผลิตกรดออกมา จึงทำให้เกิดการกำจัดคอเลสเทอรอลในลำไส้ได้ มีการศึกษาการลดระดับคอเลสเทอรอลของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. acidophilus*, *S. thermophilus* และ *Bifidobacterium* sp. ในหลอดทดลอง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วย เกลื่อน้ำดี 0.2% ได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เสริมด้วยเกลื่อน้ำดี ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าคอเลสเทอรอลจำนวนมากจะตกตะกอนร่วมกับเกลื่อน้ำดี แต่อย่างไรก็ตามผลการลดระดับคอเลสเทอรอลโดยการตกตะกอนร่วมกับ deconjugated bile salt นั้นขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของ bile salt ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (Babaoğlu Aydaş and Aslim, 2016 อ้างจาก Al-Saleh et al., 2006; Grill et al., 2000; Li, 2012)

## 3.) การดูดซึมคอเลสเทอรอล (cholesterol assimilation) โดยโพรไบโอติก

จากการศึกษา *Lactobacillus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยคอเลสเทอรอล พบว่า *Lactobacillus* สามารถดูดซึมคอเลสเทอรอลในระหว่างการเจริญ โดยสามารถนำคอเลสเทอรอลไปใช้ในการสร้างเซลล์ ซึ่งอาจดึงคอเลสเทอรอลไปใช้ในการร่วมสร้างเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) และใช้ในการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ความสามารถของโพรไบโอติกในการจับกับโมเลกุลของคอเลสเทอรอลนั้นอาจขึ้นอยู่กับการเจริญและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของลักษณะทางเคมีและโครงสร้างที่แตกต่างกันของ peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Babaoğlu Aydaş and Aslim, 2016 อ้างจาก Noh et al., 1997; Usman and Hosono, 1999; Li et al., 2012)

## 4.) การยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในตับโดย SCFAs

มีรายงานว่า SCFAs ที่โพรไบโอติกสร้างขึ้นสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งโรคมะเร็งหัวใจและหลอดเลือด ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร และสามารถลดระดับคอเลสเทอรอลได้ โดยโพรไบโอติกที่สามารถใช้พรีไบโอติกในการเจริญ และผลิต SCFAs ออกมาซึ่งส่วนใหญ่เป็น acetate, propionate และ butyrate มีรายงานว่าเมแทบอลิต์ของ SCFA ที่โพรไบโอติกสร้างขึ้น เช่น propionate และ butyrate เป็นต้น มีผลต่อการลดคอเลสเทอรอลในหนู ซึ่งอาจไปยับยั้งความสามารถในการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในตับ ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) (Babaoğlu Aydaş and Aslim, 2016 อ้างจาก Cho and Finocchiaro, 2009; Fukushima et al., 1999; Kumar et al., 2012)

##### 5.) การเปลี่ยนคอเลสเทอรอลเป็น coprostanol

มีรายงานว่าเอนไซม์ dehydrogenase/isomerase ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กสามารถเปลี่ยนคอเลสเทอรอลเป็น coprostanol ได้ โดยเริ่มจากเปลี่ยนคอเลสเทอรอลให้เป็น 4-cholesten-3-one และ coprostanone หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น coprostanol เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย และ coprostanol จะถูกขับออกทางอุจจาระโดยตรง จึงทำให้การดูดซึมคอเลสเทอรอลลดลง และลดความเข้มข้นของคอเลสเทอรอลในร่างกาย (Babaoğlu Aydaş and Aslim, 2016 อ้างจาก Chiang et al., 2008; Ooi and Liong, 2010)

#### 5.แบคทีเรียกรดแลคติก

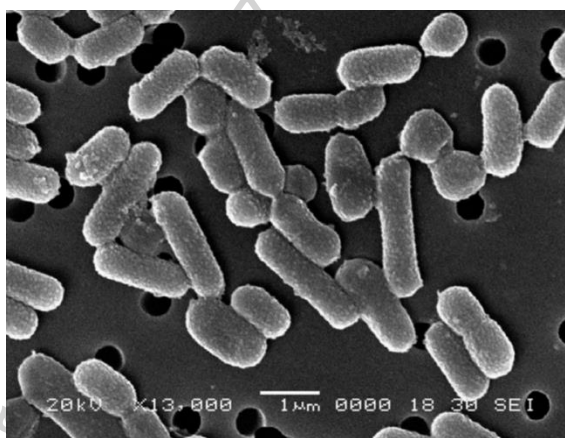
##### 5.1 นิยามของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase negative) มีทั้งรูปร่างท่อน (rod) และรูปร่างทรงกลม (cocci) ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerobic bacteria) หรือบางชนิดเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ (Strict anaerobe) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโทส ได้เป็น กรดแลคติก (lactic acid) กรดแอซิติก (acetic acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และยังสามารถสังเคราะห์สารอื่น ๆ ได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และไดอะซิติก (diacetyl) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดกลิ่นและรสของอาหารหมัก นอกจากนี้ยังสามารถสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic bacteria) และทำให้อาหารเน่าเสียได้ (spoilage bacteria)

##### 5.2 สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก

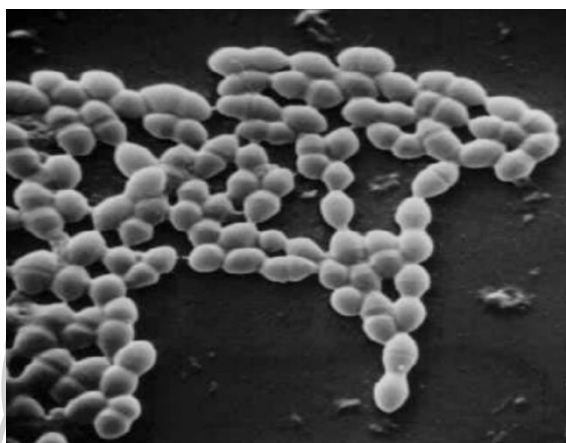
สามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติก รวมถึงข้อมูลด้านพันธุกรรม ได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* (สมคิด และอรุณี, 2556; มุขัมหมัดริฎวาน, 2557) โดยสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต ได้แก่ *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* และ *S. thermophilus* และนมเปรี้ยว เช่น *L. acidophilus* และ *L. bifidus* เป็นต้น (Schrezenmeir and de Vrese, 2001)

สกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด ส่วนใหญ่พบได้ในอาหารที่เกิดจากการหมัก เช่น นม เนื้อสัตว์ ผักและผลไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบตามธรรมชาติในอวัยวะภายใน เช่น ทางเดินอาหารและช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลล์ของ *Lactobacillus* มีรูปร่างเป็นท่อน ส่วนมากเรียงตัวเป็นสาย ติดสี แกรมบวก และสามารถติดสีแกรมลบได้เมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เจริญได้ดีที่ pH 5.5-6.2 อุณหภูมิประมาณ 37°C ยกเว้นบางชนิดที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า เช่น *L. bulgaricus* เจริญที่อุณหภูมิ 40-45°C โดย *Lactobacillus* ที่พบได้บ่อย ได้แก่ *L. plantarum* (รูปที่ 10), *L. rhamnosus* GG และ *L. casei* เป็นต้น



รูปที่ 10 ลักษณะสัณฐานของ *L. plantarum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน  
ที่มา: Arasu et al, 2016

สกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่มีเซลล์รูปร่างกลม หรือรูปร่างกลมรี มีขนาด 0.5–2.0  $\mu\text{m}$  เซลล์เรียงตัวเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ที่อุณหภูมิ 24–45°C พบได้ในช่องปากและระบบทางเดินหายใจตอนบน บางชนิดสามารถก่อโรคในคนและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังได้ สปีชีส์ที่มีความสำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่ *S. lactis*, *S. cremoris* และ *S. thermophilus* (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ลักษณะสำคัญของ *Streptococcus thermophilus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: Belarbi, 2011

### 5.3 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแลคติกเป็น normal flora ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งส่งผลที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์หลายประการ เช่น รักษาสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด รักษาระดับอินซูลินในเลือดให้เป็นปกติ รักษาการแพ้แลคโตส และการดูดซึมบกพร่อง ลดการเกิดโรคท้องร่วง เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อราหรือโรคที่เกิดจากเชื้อรา และช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งมีประโยชน์และส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคได้ (Masood et al., 2011)



## 6. โพรไบโอติก

### 6.1 นิยามของโพรไบโอติก

Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization (FAO-WHO) นิยามโพรไบโอติก (Probiotic) ว่า “เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพของ host” (Hotel and Cordoba, 2001) ซึ่งโพรไบโอติกที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันมากที่สุด ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต แหนม กิมจิ เป็นต้น ประโยชน์ของโพรไบโอติกที่สำคัญ เช่น ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ช่วยย่อยอาหารที่มนุษย์ย่อยไม่ได้ สร้างวิตามินที่เป็นประโยชน์ และช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอลในร่างกาย เป็นต้น (Oelschlaeger, 2010)

### 6.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

6.2.1 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อเจ้าบ้านหรือโฮสต์ แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องเป็นแหล่งที่มีความปลอดภัย เป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัยหรือเป็นสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่น ไม่สร้างสารพิษ และเป็นประโยชน์ต่อโฮสต์

แบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS และ Qualified Presumption of Safety, QPS) ที่กำหนดโดย European Food Safety Authority (EFSA) แม้ว่าความกังวลเกี่ยวกับความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่สามารถถ่ายโอนทางพันธุกรรมไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ แต่สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ให้ประโยชน์ทั้งในระบบทางเดินอาหารและร่างกาย แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจึงถือว่าไม่เป็นอันตรายต่อโฮสต์ (Korhonen, 2010) และมีกลไกการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถรอดชีวิตได้

*Lactobacillus* มีการต้านทานยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) ต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดรวมถึง gentamycin และ vancomycin (Sharma et al., 2014) การต้านทานต่อยา vancomycin ใน *L. plantarum* เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ vancomycin binding site ที่ peptidoglycan โดยในแบคทีเรีย vancomycin จะจับกับ D-alanine terminus ของ peptidoglycan แต่ใน *L. plantarum* จะแทนที่ D-alanine ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น ได้แก่ D-lactate เนื่องจากใน *L. plantarum* มีการผลิตเอนไซม์ D-Ala-D-Lac ligase (DdLLp) ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ depsipeptide และมีเอนไซม์ D-lactate dehydrogenase ที่ผลิต D-lactate ซึ่งทำให้ D-lactate มีความสามารถในการจับกับ vancomycin ได้น้อยลง 1,000 เท่า ดังนั้นกลไกนี้จึงช่วย



ป้องกันการจับกันระหว่าง vancomycin กับ peptidoglycan ของแบคทีเรียกรดแลคติก ส่งผลให้เกิดการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (Deghorain et al., 2007; Gueimonde et al., 2013; Zhang et al., 2018) แต่ *Lactobacillus* ส่วนใหญ่พบว่ามีความไวต่อยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์หลายชนิด เช่น ampicillin เป็นต้น เนื่องจากยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (Sharma et al., 2014)

6.2.2) สามารถทนต่อน้ำดี ความเป็นกรด และสารคัดหลั่งภายในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ เนื่องจากการที่โพรไบโอติกจะให้ผลที่เป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ได้นั้นต้องสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะอาหาร และลำไส้ และมีปริมาณเพียงพอที่จะไปถึงลำไส้ใหญ่ ดังนั้นโพรไบโอติกจึงจำเป็นต้องสามารถอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรด และน้ำดีได้

เมื่อ *Lactobacillus* อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะมีการสร้างกลไกเพื่อปรับตัวให้มีชีวิตรอด ซึ่ง *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์จะมีกลไกการทนต่อกรดต่างกัน (รูปที่ 12) ได้แก่ 1)  $F_0F_1$ -ATPase proton pump อาศัยเอนไซม์  $H^+$ -ATPase เช่น  $K^+$ -ATPase ทำหน้าที่รักษาสภาวะสมดุลของค่า pH โดยแลกเปลี่ยน  $K^+$  ทำให้ที่บริเวณเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียมีค่า pH สูงขึ้น ส่งผลทำให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Macpherson et al., 2005) 2) Decarboxylation and deamination เป็นกลไกที่เร่งปฏิกิริยา decarboxylation โดยอาศัยเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) เพื่อเปลี่ยน glutamate ให้เป็น  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) และคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) นอกจากนั้นยังมี arginine deaminase (ADI) system เป็นกลไกการทนต่อกรดอีกกลไกหนึ่งที่แตกโมเลกุลของ arginine โดยอาศัยเอนไซม์ carbamate kinase (CK) ได้เป็นแอมโมเนีย ( $NH_3$ ) และคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) กลไกทั้งสองนี้มีการดึงโปรตอนมาใช้ในปฏิกิริยาโดยขับโปรตอนออกผ่าน  $H^+$ -ATPase pump จึงทำให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวให้มีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรด (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Guan et al., 2013; Reeve and Reid, 2016) 3) Cell membrane modification เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของ  $H^+$ -ATPase pump โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันและขนาดของ channel ทำให้  $H^+$ -ATPase pump สามารถขับโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมได้ดีขึ้น ส่งผลให้สามารถทนต่อกรดได้ดีขึ้นด้วย (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Yang et al., 2014) 4) Macromolecule protection and repair เนื่องจาก DNA และโปรตีนมีบทบาทสำคัญต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในสภาวะที่เป็นกรด โดยอาศัย periplasmic chaperone เช่น HdeA และ HdeB เป็นต้น เพื่อป้องกันการรวมตัวของโปรตีน และอาศัย UvrABCD, DNA polymerase และ DNA ligase เพื่อซ่อมแซมความเสียหายของ DNA ที่เกิดจากกรด (Guan and Liu, 2020 อ้างจาก Das et al., 2015) นอกจากนั้นความสามารถในการทนต่อกรด



al., 2013) ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำดีได้ 3) Bile efflux pump ใน lactobacilli จะอาศัย multidrug transporter (MDR) ทำหน้าที่ขับเกลือ น้ำดีและกรดน้ำดีออกจากไซโตพลาสซึม ตัวอย่างเช่นใน *L. acidophilus* NCFM อาศัย transporter ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อการทนเกลือ น้ำดีของแบคทีเรีย ได้แก่ major facilitator superfamily (LBA1429 และ LBA1446) และ ABC transporter (LBA1679 และ LBA1680) (Pfeiler and Klaenhammer, 2009)

4) General stress response protein แบคทีเรียส่วนใหญ่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี มีการตอบสนองโดยการสร้าง heat shock protein ขึ้นมา เพื่อช่วยส่งเสริมความแข็งแรงของโปรตีนและดีเอ็นเอให้เสถียร เช่น DnaK, GroEL และ GroES ((Bustos et al., 2018) อ้างจาก (Ruiz-Ojeda et al., 2016; Siciliano and Mazzeo, 2012)) ใน *L. fermentum* และ *L. reuteri* จะพบ GroEL (Bustos et al., 2018 อ้างจาก Bustos et al., 2015) และ 5) bile salt hydrolase (BSH) แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase ได้ โดยเอนไซม์นี้จะไปสลายเกลือ น้ำดีให้กลายเป็นกรดน้ำดีอิสระผ่านกระบวนการ bile salt deconjugation ซึ่งกรดน้ำดีอิสระมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยลงทำให้เกิดการตกตะกอนและขับออกทางอุจจาระ ช่วยให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถรอดชีวิตได้

6.2.3 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยจะไปยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวลำไส้เพื่อแย่งพื้นที่และสารอาหารกับแบคทีเรียก่อโรค ทำให้สามารถลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อลำไส้ได้ (Campana et al., 2017) และแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ได้ เช่น กรดอะซิติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ สามารถลดค่า pH ในลำไส้ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Reis et al., 2012) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังผลิตสารเมแทบอลิต์ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น เอทานอล กรดไขมัน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ซึ่งแบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร (Prabhurajeshwar and Chandrakanth, 2019) ตัวอย่างของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยโพรไบโอติก เช่น *Lactococcus lactis* ผลิต nisin และ *L. acidophilus* ผลิต lactacin B แบคทีเรียโอซินเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด รวมทั้ง *S. Typhimurium* SL1344 และ *E. coli* C1845 (Śliżewska et al., 2021)

6.2.4 สามารถยึดเกาะกับลำไส้ของโฮสต์ได้ โดยโพรไบโอติกจะไปช่วยแย่งพื้นที่ในการจับกับผนังลำไส้จากเชื้อก่อโรคทำให้เชื้อก่อโรคยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ลดลง นอกจากนี้การยึดเกาะกับลำไส้ของโพรไบโอติกจำเป็นต่อการรวมกลุ่มและการเพิ่มจำนวนโพรไบโอติกส่งผลให้มีการย่อยอาหาร

และดูดซึมเป็นปกติ และยังช่วยซ่อมแซมผนังทางเดินอาหารอีกด้วย ซึ่งการยึดเกาะระหว่างแบคทีเรียกับพื้นผิวของลำไส้เกี่ยวข้องกับ hydrophobic interaction และองค์ประกอบของผิวเซลล์แบคทีเรีย เช่น โพรตีนและเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่แตกต่างกันในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (Monteagudo-Mera et al., 2019)

6.2.5 โพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีการรายงานว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 1) radical scavenging โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อทำให้อนุมูลอิสระเสถียรมากขึ้น 2) singlet oxygen quenching โดยสารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยน singlet oxygen (ที่เป็นพิษและก่อให้เกิดโรค) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น carotenoid 3) metal chelation โดยสารต้านอนุมูลอิสระจับกับโลหะที่สามารถเร่ง oxidation ได้ ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  และ  $Cu^{2+}$ ) จึงช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น flavonoid 4) chain-breaking สารต้านอนุมูลอิสระจะไปรบกวนการรับอะตอมไฮโดรเจนของ peroxy ในขั้น propagation ป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จาก lipid peroxidation ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น vitamin E 5) synergism เป็นการทำงานร่วมกันของสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่าง vitamin E กับ ascorbic acid และ 6) enzyme inhibitor สารประกอบ phenolic บางชนิด เช่น flavonoid, phenolic acid และ gallate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (Phansawan, 2013)

6.2.6 มีการรายงานว่าโพรไบโอติกบางสายพันธุ์ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกาย โดยการย่อยสลายกรดน้ำดี (bile acid metabolism) ผ่านกระบวนการ bile salt hydrolase (BSH) activity เนื่องจากการผลิตน้ำดีในตับของคนและสัตว์ใช้คอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต เมื่อน้ำดีถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ bile salt hydrolase ที่ผลิตจากโพรไบโอติกจะส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอลลดลง

มีการศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมหมักจำนวน 54 ไอโซเลท เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก พบว่า RM11 และ RM28 สามารถยับยั้งการเจริญของ food borne pathogen ได้แก่ *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* และสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มี pH 2.5 และในเกลือน้ำดี 0.3% นอกจากนี้ทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง สามารถต้านทานต่อยา kanamycin และสามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene สามารถระบุชนิด RM11 และ RM28 ได้เป็น *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus fermentum* ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าทั้งสองสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (Thirabunyanon et al., 2009)

มีรายงานการศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ของโพรไบโอติกเพื่อประเมินศักยภาพในการใช้ลดระดับคอเลสเตอรอล พบว่าโพรไบโอติกที่สร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase สามารถลดคอเลสเตอรอล และตกตะกอนคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ (Kumar et al., 2012b) นอกจากนี้จากการทดสอบในสัตว์ทดลอง พบว่าโพรไบโอติกสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และตับของหนูทดลองที่ได้รับอาหารเสริมด้วยโพรไบโอติกอีกด้วย (Huang et al., 2013)





### บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### เชื้อจุลินทรีย์ เซลล์ และสารเคมี

1. แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้
  - 1.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
  - 1.2 แบคทีเรียก่อโรค
    - 1.2.1 *Bacillus subtilis* TISTR 008
    - 1.2.2 *Escherichia coli* TISTR 887
    - 1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287
    - 1.2.4 *Staphylococcus aureus* TISTR 885
    - 1.2.5 *Salmonella* Typhimurium TISTR 292
2. เซลล์ไขมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้
  - 2.1 เซลล์ 3T3-L1 preadipocyte (ATCC CL-173)
3. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย
  - 3.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Medium (Himedia)
  - 3.2 Nutrient broth (NB) (Himedia)
  - 3.3 Nutrient agar (NA)
4. อาหารเลี้ยงเซลล์
  - 4.1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ATCC)
5. ชุดทดสอบสำเร็จรูป
  - 5.1 GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)
  - 5.2 PCR Enzymes and Master Mixes (Thermo Scientific)
  - 5.3 PCR Purification Kit (Favorgen)
6. ไพรเมอร์
  - 6.1 Forward primer 27F: (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
  - 6.2 Reverse primer 1492R: (5'-TACGGYTACCGTTACGACTT-3')
7. สารเคมีที่ใช้ทดสอบแบคทีเรีย



7.1 ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ vancomycin, tetracyclin, penicillin, ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamycin, sulfamethoxazol (Oxoid™ Antimicrobial susceptibility discs)

7.2 1% Agarose gel

7.3 Bile Salts (HIMEDIA)

7.4 Distilled water

7.5 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (DAEJUNG)

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

7.7 50% Ethanol

7.8 98% (v/v) Ethanol

7.9 Formaldehyde (Ajax Finechem)

7.10 Glacial acetic acid (QReC)

7.11 15% Glycerol (Fisher Scientific)

7.12 Gram crystal violet

7.13 Gram iodine

7.14 Gram safranin

7.15 Hexane (RCL Labscan)

7.16 Isopropanol (Ajax Finechem)

7.17 O-phthalaldehyde reagent (Alfa Aesar)

7.18 OX gall (Bile bovine) (Sigma-Aldrich)

7.19 PEG-600 Cholesterol (Sigma-Aldrich)

7.20 1X TAE buffer

7.21 Potassium Hydroxide (KOH)

7.22 Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

7.23 Taurodeoxycholic acid sodium salt (TDCA) (Millipore)

8. สารเคมีที่ใช้ทดสอบเซลล์

8.1 Fetal bovine serum (Sigma-Aldrich)

8.2 MTT Formazan powder (Sigma-Aldrich)

8.3 Oil Red O color solution (Sigma-Aldrich)

8.4 10X Phosphate buffered saline (PBS) (cytiva)

- 8.5 Penicillin 100 mg/ml (Appliedchem)
- 8.6 Simvastatin (Sigma-Aldrich)
- 8.7 Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich)
- 8.8 Streptomycin 100mg/ml (Sigma-Aldrich)
- 8.9 0.25% (w/v) Trypsin-EDTA (Hyclone)
- 8.10 Triton-X (Merck)
- 8.11 Ultrapure water
- 9. สารกระตุ้นในขั้นตอน adipocyte differentiation
  - 9.1 Dexamethasone (Sigma-Aldrich)
  - 9.2 Insulin (Sigma-Aldrich)
  - 9.3 3-Isobutyl-1 Methylxanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich)

#### เครื่องมือ อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. เครื่องมือ
  - 1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope: Olympus DP72)
  - 1.2 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) (Microscope: Invitrogen, EvosXL Core)
  - 1.3 เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis: Bio-rad, Horizon)
  - 1.4 เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ (Evaporation, IKA RV8)
  - 1.5 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation: Bio-Rad)
  - 1.6 เครื่องปั่นแยก (Centrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5427 R)
  - 1.7 เครื่องปั่นแยก (Centrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5408 R)
  - 1.8 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometer: Thermo, 2000C)
  - 1.9 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter: Metrohm, 730)
  - 1.10 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer: Vision Scientific, KMC-13000V)
  - 1.11 เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader: Thermo Scientific)
  - 1.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer: PG Instruments T70 UV/VIS Spectrophotometer)
  - 1.13 ตู้แช่แข็ง  $-20^{\circ}\text{C}$  (Freezer: SANYO)
  - 1.14 ตู้แช่แข็ง  $-80^{\circ}\text{C}$  (Freezer: Thermo Scientific)
  - 1.15 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator: SANYO, MIR-253)

- 1.16 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet: LABOGENE, Scanlaf Mars)
- 1.17 ตู้เย็น (Refrigerator) (Panasonic)
- 1.18 ตู้อบแห้ง (Hot air oven: Memmert)
- 1.19 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave: Hirayama)
- 1.20 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath: Fisher Scientific, ISOTHEMP 228)
- 1.21 ตู้บ่มเชื้อแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 5% H<sub>2</sub>: Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI)
- 1.22 ตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (CO<sub>2</sub> Incubator: Heracell™ VIOS 160i CO<sub>2</sub> Incubator Dual Chamber)
- 1.23 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine: Eppendorf™ Mastercycler™ Nexus Gradient)
- 1.24 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW)
- 1.25 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW)
2. อุปกรณ์และเครื่องแก้ว
  - 2.1 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman)
  - 2.2 กระดาษกรองเบอร์ 2 (Whatman)
  - 2.3 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture Flasks) (Corning)
  - 2.4 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
  - 2.5 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
  - 2.6 ช้อนตักสาร (Spatula)
  - 2.7 แผ่นกรองสารและเชื้อ (0.22 μM filter) (FilterBio® PES Sterile Syringe Filter)
  - 2.8 แผ่นกรองสารและเชื้อ (0.45 μM filter) (FilterBio® PES Sterile Syringe Filter)
  - 2.9 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
  - 2.10 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
  - 2.11 ไมโครเพลท ชนิด 24 หลุม (Nunclon™ Delta Surface)
  - 2.12 ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม (Nunclon™ Delta Surface)
  - 2.13 รางใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)
  - 2.14 หัวงเย็บเชื้อ (Loop)
  - 2.15 หลอดทดลอง (Test tube)
  - 2.16 หลอดปั่นแยก (Microcentrifuge tube)

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จำนวนทั้งหมด 7 ตัวอย่าง มาเจือจางด้วยวิธี serial dilution ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% และ spread ลงบนอาหาร de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 5% H<sub>2</sub>, COY Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA) จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความแตกต่างของลักษณะโคโลนีมา streak ลงบนอาหาร MRS agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการตรวจสอบการติดสีแกรม (Gram staining) ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อที่บริสุทธิ์บนอาหาร MRS agar มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการตรวจสอบการติดสีแกรม (Gram staining) ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 โคโลนี ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้ออยู่ smear ให้เชื้อกระจายบนหยดน้ำกลั่นปล่อยให้แห้งแล้วนำแผ่นสไลด์ผ่านความร้อน (Heat fixed) 2-3 ครั้ง แล้วย้อมสีด้วย Crystal violet จนท่วมสไลด์เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำประปา และย้อมต่อด้วย Gram iodine เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยประปา จากนั้นหยด 95% (v/v) ethanol และล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำประปาทันที จากนั้นย้อมต่อด้วย Safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปาอีกครั้ง และนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

### 3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

#### 3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการสกัด Genomic DNA ด้วยชุดน้ำยาสกัด GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ดังกล่าวปริมาณ 1.5 ml ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม Gram positive bacteria lysis buffer ปริมาตร 180 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติม lysis solution ปริมาตร 200 µl และ Proteinase K

ปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  บ่มใน water bath อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที เติม RNase A Solution ปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม 50% ethanol ปริมาตร 400  $\mu\text{l}$  จากนั้นย้าย cell lysate ลงใน GeneJET Genomic DNA Purification Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 x g เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash Buffer I ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 x g เป็นเวลา 1 นาที และเติม Wash Buffer II ปริมาตร 500  $\mu\text{l}$  นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 x g เป็นเวลา 3 นาที แล้ว ปั่นเหวี่ยง GeneJET Genomic DNA Purification Column ที่ 12000 x g เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง ย้าย GeneJET Genomic DNA Purification Column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม Elution Buffer ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บ DNA ที่สกัดได้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rRNA gene ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.1 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene โดยใช้ forward primer 27F: (5'-AGAGTTTGATCMT GGCTCAG-3') และ reverse primer 1492R: (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3') (Tajabadi et al., 2011) โดยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์แสดงดังตารางที่ 2 และสภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังตารางที่ 3 (Dubernet et al., 2002) โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler: Eppendorf™)

**ตารางที่ 2** สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	1 reaction ( $\mu\text{l}$ )
Nanopure water	6.5
27F (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2.5
1492R (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2.5
PCR master mix	12.5
DNA	1.0
Total volume	25.0

### ตารางที่ 3 สภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	95	2.0
Denaturation	95	0.5
Annealing	50	1.0
Extension	72	2.0
Final extension	72	10.0

} 35 cycles

#### 3.3 วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์จากข้อ 3.2 ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้ 1% agarose gel เปรียบเทียบกับ 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 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.) จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อวิเคราะห์ระบุ species ของเชื้อที่คัดแยกได้

### 4. การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

#### 4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 1. มาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

#### 4.2 การเตรียมสารละลายส่วนใส (supernatant)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากข้อ 4.1.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนสารละลายใสไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป



#### 4.3 การเตรียมตะกอนเซลล์ (cell pellet)

นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากข้อ 4.1.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

### 5.การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

#### 5.1 การทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี

นำ cell pellet จากข้อ 4.3 มาแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลาย PBS (pH 2.5) สำหรับทดสอบการทนกรด และแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ที่มี 0.3% bile salt สำหรับทำการทดสอบทนเกลือน้ำดี โดยให้มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^8$ – $10^9$  CFU/ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C แล้วเก็บผลทุกชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวิธี spread plate บน MRS agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต (CFU/ml) (Haghshenas et al., 2014) รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยคำนวณดังสมการ

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

โดยที่  $N_0$  คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น

$N_1$  คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ชั่วโมงสุดท้าย

#### 5.2 การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion โดยนำเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 4.1 ปรับให้มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^8$ – $10^9$  CFU/ml จากนั้นนำมา swab ลงบนอาหาร MRS agar และทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด ได้แก่ gentamycin (10 µg), sulfamethoxazole (23.75 µg), vancomycin (30 µg), penicillin (10 unit), clindamycin (2 µg), tetracycline (30 µg), erythromycin (15 µg), chloramphenicol (30 µg) และ ampicillin (10 µg) (Oxoid™ Antimicrobial Susceptibility discs) โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น negative control บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วตรวจสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ดัดแปลงวิธีทำจาก Nami และคณะ (2014) และนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ตามเกณฑ์ของ Charteris ละคณะ (1998) และ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S28)

### 5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

นำ supernatant ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.2 มากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  และเก็บไว้ใช้ในการทดสอบ จากนั้นเตรียมแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287, *Staphylococcus aureus* TISTR 885 และ *Salmonella Typhimurium* TISTR 292 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับให้มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU/ml จากนั้นใช้ไม้พันสำลี swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคลงบนอาหาร Nutrient agar และเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เติม supernatant ที่กรองไว้ลงในหลุมละ 100  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วทำการตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) (Bao et al., 2010) รายงานผลขนาดของ clear zone (mm) โดยคำนวณดังสมการ

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

### 5.4 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical scavenging activity)

นำ supernatant ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.2 ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ผสมกับสารละลาย DPPH (0.4 mM DPPH ใน 95% ethanol) ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 35 นาทีในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐาน 0.5% (w/v) L-ascorbic acid ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity (%)) ดังสมการ ดัดแปลงวิธีทำจาก (Rajoka et al., 2019)

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

โดยที่  $A_{\text{sample}}$  คือ absorbance ของ supernatant + DPPH solution

$A_{\text{blank}}$  คือ absorbance ของ 95% ethanol + น้ำกลั่น

$A_{\text{control}}$  คือ absorbance ของ DPPH solution + น้ำกลั่น

## 6. การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคอเลสเทอรอล

### 6.1 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1. มา streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่เสริมด้วย 0.5% (w/v) taurodeoxycholic acid sodium salt (TDCA) และ  $\text{CaCl}_2$  (0.37 g/l) โดยใช้ MRS agar ที่

ไม่เสริมด้วย TDCA และ  $\text{CaCl}_2$  เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการตกตะกอนที่โคโลนีหรือการเกิดโคโลนีสีขาวขุ่น และ/หรือเกิดการตกตะกอนบนอาหารบริเวณรอบโคโลนีให้บันทึกผลเป็นบวก (Kumar et al., 2012)

## 6.2 การทดสอบการลดระดับคอเลสเตอรอล

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 4.1 ( $10^8$  CFU/ml) จากนั้นเติมเชื้อ 1% inoculum ลงในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ Cholesterol-PEG 600 (ความเข้มข้นสุดท้าย  $100 \mu\text{g/ml}$ ) และใช้อาหาร MRS ที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง  $9,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วน supernatant มาวิเคราะห์ปริมาณของคอเลสเตอรอลด้วยวิธี *O*-phthalaldehyde โดยเติม 95% ethanol ปริมาตร 2 ml, 33% (w/v) potassium hydroxide (KOH) ปริมาตร 1 ml และ supernatant ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้น vortex ให้เข้ากัน 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม hexane ปริมาตร 3 ml และน้ำกลั่น 2 ml แล้วนำไป vortex ให้เข้ากัน 1 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หลังจากนั้นเก็บชั้นของ hexane ที่อยู่ชั้นบนปริมาตร 1 ml ไประเหยที่อุณหภูมิ  $60^\circ\text{C}$  จากนั้นเติม *O*-phthalaldehyde ปริมาตร 2 ml (*O*-phthalaldehyde  $0.5 \text{ mg/ml}$ ) (ภาคผนวก ข.) และ 98% sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาตร 0.5 ml vortex 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับ standard curve เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล แล้วนำมาคำนวณ Cholesterol removal (%) ดังสมการ (Shehata et al., 2016; Majeed et al., 2019)

$$\text{Cholesterol reduction (\%)} = 100 - [(\text{Cholesterol}_{24\text{h}} / \text{Cholesterol}_{0\text{h}}) \times 100]$$

โดยที่  $\text{Cholesterol}_{0\text{h}}$  คือ ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลที่ชั่วโมงเริ่มต้น

$\text{Cholesterol}_{24\text{h}}$  คือ ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลที่ชั่วโมงสุดท้าย

โดยในการทดลองนี้จะคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ผลในการกำจัดคอเลสเตอรอลได้สูงสุดจากการศึกษาในหัวข้อ 6.2 มาทดสอบ 1) การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก 2) ปริมาณของคอเลสเตอรอลในอาหาร (supernatant) 3) ปริมาณคอเลสเตอรอลที่เซลล์แบคทีเรีย (cell pellet) โดยเก็บตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ Cholesterol-PEG 600 (ความเข้มข้นสุดท้าย  $100 \mu\text{g/ml}$ ) ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24

ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วน supernatant และ cell pellet นำส่วน cell pellet แขนวลอยเซลล์ด้วยน้ำกลั่นในปริมาณเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม จากนั้นนำส่วน supernatant และ cell pellet มาวิเคราะห์ปริมาณของคอเลสเตอรอลด้วยวิธี *O*-phthalaldehyde วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับ standard curve เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล แล้วนำมาคำนวณ Cholesterol (%) ดังสมการ (Al-Saleh et al., 2006)

$$\text{Cholesterol (\%)} = (\text{Cholesterol}_{\text{th}} / \text{Cholesterol}_{\text{oh}}) \times 100$$

โดยที่  $\text{Cholesterol}_{\text{oh}}$  คือ ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลที่ชั่วโมงเริ่มต้น

$\text{Cholesterol}_{\text{th}}$  คือ ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลที่เวลาต่าง ๆ

## 7. การทดสอบผลของโพรไบโอติกต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1

### 7.1 การเตรียม lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลการทดสอบลดระดับคอเลสเตอรอลสูงสุดจากข้อ 6.2 มาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นปรับให้มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU/ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำให้แห้งด้วยการแช่แข็ง (lyophilization) และนำ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) มาละลายใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) จากนั้นกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

### 7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไขมัน 3T3-L1

เพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin/streptomycin ในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนเข้าระยะ post-confluence (100% confluency) (Fang et al., 2018)

### 7.3 adipocyte differentiation

เพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes ตามขั้นตอนข้อ 7.2 ใน 24-well cell culture plate ( $\sim 2 \times 10^4$  cells/well) บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte differentiation) โดยเมื่อบ่มเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ครบ 48 ชั่วโมง จนเข้าระยะ post-confluence (วันที่ 0) กระตุ้นเซลล์ด้วยอาหาร adipogenesis inducers (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone (DEX) และ 10  $\mu$ g/ml insulin) เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (วันที่ 2) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin และ 10  $\mu$ g/ml insulin เพาะเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (วันที่ 4) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเช่นเดียวกับวันที่ 2 บ่มต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (วันที่ 6) เซลล์ 3T3-L1 preadipocytes จะเปลี่ยนเป็น adipocyte โดยทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จากการทดสอบในข้อ 7.4 ทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหาร และใช้เซลล์ 3T3-L1 ที่ไม่ได้ทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) เป็นชุดควบคุม (control)

### 7.4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ตามขั้นตอนข้อ 7.2 ใน 96-well cell culture plate ( $\sim 10^5$  cells/ml) บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหาร DMEM ที่ประกอบด้วย lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของแบคทีเรียจากข้อ 7.1 ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu$ g/ml บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เติมสารละลาย 5 mg/ml MTT (10  $\mu$ l/100  $\mu$ l DMEM) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารละลายออก และเติมสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100  $\mu$ l ลงในแต่ละหลุม ผสมให้เข้ากันเพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability (%)) ดังสมการ (ธารทิพย์, 2559; Kim et al., 2020) นอกจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เวลา 6 วันหลังการ



กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte differentiation) ตามขั้นตอนข้อ 7.3 ด้วยวิธี MTT assay เช่นเดียวกัน

Cell viability (%) =  $(100 \times OD_{540} \text{ of treated cells}) / OD_{540} \text{ of cells without treatment}$

#### 7.5 การตรวจสอบการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1

วัดการสะสมไขมันโดยการย้อมด้วยสี Oil Red O นำเซลล์ที่ทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบ 6 วัน ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง จากนั้น fix ด้วย 4% formaldehyde ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที และล้างออกด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง เติม 60% isopropanol ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นย้อมด้วย Oil Red O ปุ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 - 5 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออก และนำไปถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเติม 100% isopropanol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดสี Oil Red O แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้ microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte (lipid accumulation (%)) ดังสมการ (ดัดแปลงจาก Harjadi et al., 2022)

Lipid accumulation (%) =  $(OD_{540} \text{ of treated cells} / OD_{520} \text{ control}) \times 100$

### 8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้ทุกการทดสอบจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean)  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติแบบ One Way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's test และ Dunnett's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Version 23.0



## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในการหมักผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดเพื่อผลิตอาหารหมัก เช่น ผลิตภัณณ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณณ์เสริมอาหารต่างๆ เพื่อส่งเสริมสุขภาพ (Granato et al., 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณณ์นมและผลิตภัณณ์เสริมอาหารทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง โดยผลิตภัณณ์นม ได้แก่ โยเกิร์ต โยเกิร์ตพร้อมดื่ม นมผงพร้อมมันเนยสำหรับสตรีมีครรภ์และให้นมบุตร ในการทดลองนี้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณณ์นมได้จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ MD-1, MD-2, MD-3, MD-4, MD-6, MD-9 และ MD-11 และคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณณ์เสริมอาหารได้จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ MD-5, MD-7, MD-8 และ MD-10 แหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 11 ไอโซเลทแสดงดังตารางที่ 4

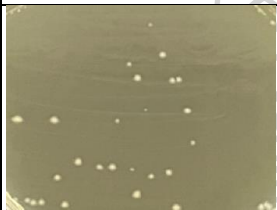
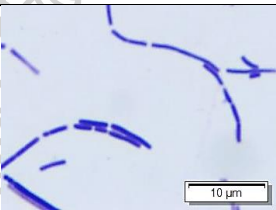

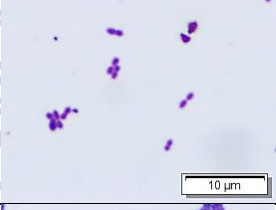

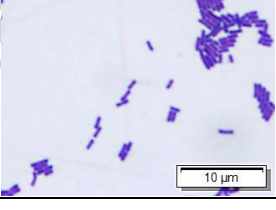
ตารางที่ 4 แหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้

No.	isolate	source
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	ผลิตภัณณ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 1
6	MD-6	โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ตัวอย่างที่ 1
7	MD-7	ผลิตภัณณ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 2
8	MD-8	ผลิตภัณณ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 2
9	MD-9	นมผงพร้อมมันเนยสำหรับสตรีมีครรภ์และให้นมบุตร
10	MD-10	ผลิตภัณณ์เสริมอาหาร ตัวอย่างที่ 1
11	MD-11	โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ตัวอย่างที่ 2


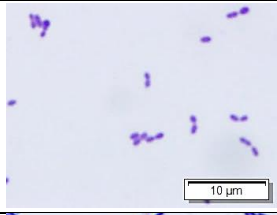


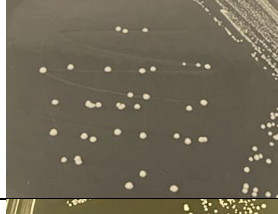
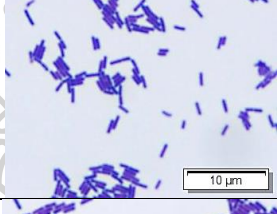

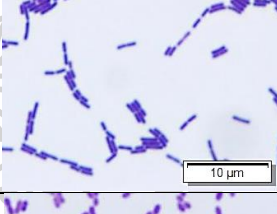

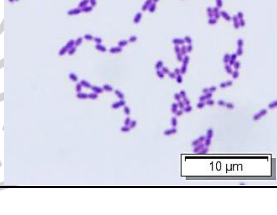
## 2.ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกมีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทั้งรูปร่างแท่ง และรูปร่างทรงกลม (Khalid, 2011) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในงานวิจัยนี้ โดยศึกษาการติดสีแกรม และศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลท ติดสี crystal violet ซึ่งเป็นแกรมบวก จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไอโซเลท MD-1, MD-3, MD-5, MD-6, MD-7, MD-9, MD-10 และ MD-11 เซลล์มีลักษณะรูปร่างท่อน และไอโซเลท MD-2, MD-4 และ MD-8 เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมรี โดยลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังตารางที่ 5


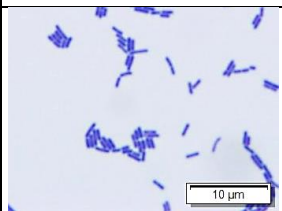



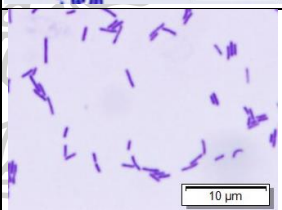
**ตารางที่ 5** ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000X)

isolate	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar		สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
MD-1		กลม สีขาว ตรงกลางนูนมากกว่าขอบ (umbonate) ลักษณะขอบเป็นแบบคลื่น (undulate)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.48 x 9.85 μm
MD-2		กลม สีขาว ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 0.84 x 0.92 μm
MD-3		กลม สีครีม ด้านข้างโค้งนูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.31 x 1.54 μm

ตารางที่ 5 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000X) (ต่อ)

isolate	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar		สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
MD-4		กลม สีขาว ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 0.69 x 0.72 $\mu\text{m}$
MD-5		กลม สีครีม ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.50 x 1.93 $\mu\text{m}$
MD-6		กลม สีขาว ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.34 x 1.34 $\mu\text{m}$
MD-7		กลม สีครีม ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.34 x 1.60 $\mu\text{m}$
MD-8		กลม สีขาว ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)		ติดสีแกรมบวก ลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 0.71 x 0.98 $\mu\text{m}$

ตารางที่ 5 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar และสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000X) (ต่อ)

isolate	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar	สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
MD-9	 <p>กลม สีครีม ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)</p>	 <p>ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.29 x 1.28 μm</p>
MD-10	 <p>กลม สีครีม ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)</p>	 <p>ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.46 x 1.97 μm</p>
MD-11	 <p>กลม สีขาว ด้านข้างโค้ง นูนต่ำ (low convex) ผิวมันวาว ขอบเรียบ (entire)</p>	 <p>ติดสีแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.38 x 1.85 μm</p>

หมายเหตุ: บันทึกลักษณะโคโลนีตาม Biology reader, (2023)

### 3. ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rRNA gene เป็นที่นิยมสำหรับการจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากบริเวณ 16S rRNA gene สามารถพบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด เป็นบริเวณที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่พอสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล (1,500 bp) (Janda and Abbott, 2007) ในงานวิจัยนี้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จำนวน 11 ไอโซเลท โดยนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rRNA gene วิเคราะห์ขนาดด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 6

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 11 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท MD-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.80 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท MD-3 และ MD-7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lacticaseibacillus rhamnosus* 442 และ 2795 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 100.00 และ 99.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ชื่อเดิม *Lactobacillus rhamnosus* reclassified ใหม่เป็น *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Zheng et al., 2020)) ไอโซเลท MD-5 และ MD-10 มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *L. plantarum* 3335 และ YLL-03 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.79 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลท MD-6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lacti. paracasei* W1-D-5 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ (ชื่อเดิม *Lactobacillus paracasei* reclassified ใหม่เป็น *Lacticaseibacillus paracasei* (Zheng et al., 2020)) ไอโซเลท MD-9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *L. rhamnosus* HDB1311 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ไอโซเลท MD-11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *L. casei* F4S1 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท MD-2, MD-4 และ MD-8 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Streptococcus thermophilus* 3284, 3504 และ 4079 มีค่า Pairwise Similarity เท่ากับ 99.65, 94.26 และ 99.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Lactobacillus* จำนวน 5 ไอโซเลท (99.79-100.00 % similarity) *Lacticaseibacillus* จำนวน 3 ไอโซเลท (99.93-100.00 % similarity) และ *Streptococcus* จำนวน 3 ไอโซเลท (94.26-99.93 % similarity) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Gad et al, (2014) ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 244 ไอโซเลท จากผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์ยา จำนวน 180 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าสามารถระบุชนิดได้เป็น *Lactobacillus* spp. มากที่สุด จำนวน 138 ไอโซเลท รองลงมาได้แก่ *Streptococcus* spp. จำนวน 65 ไอโซเลท และ Haghshenas และคณะ (2015) ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากโยเกิร์ต เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA gene พบว่าสามารถระบุสายพันธุ์ได้เป็น *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* และ *L. casei* นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Li และคณะ (2019) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม จำนวน 72 ตัวอย่าง พบว่าสามารถระบุสายพันธุ์ได้เป็น *L. bulgaricus* จำนวน 21 ไอโซเลท *L. casei* จำนวน 8 ไอโซเลท *L. rhamnosus* จำนวน 6 ไอโซเลท *L. paracasei* จำนวน 3 ไอโซเลท *L. acidophilus* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *S. thermophilus* จำนวน 47 ไอโซเลท

**ตารางที่ 6** ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ 16S rRNA gene

isolate	Description	Strain	Accession No.	Pairwise Similarity	Length (bp)
MD-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CH 2	MW820921.1	99.80	1470
MD-2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	3284	MT613593.1	99.65	1421
MD-3	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	442	MT573091.1	100.00	1440
MD-4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	3504	MT538404.1	94.26	1472
MD-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3335	MT613628.1	99.79	1435
MD-6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	W1-D-5	OK272160.1	100.00	1494
MD-7	<i>Lacticaseibacillus 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. ผลการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

##### 4.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรด

สภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากภายในกระเพาะอาหารมีค่า pH ค่อนข้างต่ำ โดยช่วงก่อนรับประทานอาหารมีค่า pH 1.5-3.5 และช่วงรับประทานอาหารมีค่า pH 4.3-5.4 (Park et al., 2011) ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่จำลองสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร โดยใช้ MRS broth หรือ buffer ที่ปรับ pH 2.0-3.0 (Ayyash et al., 2021 อ้างจาก Kim and Plutzky, 2016; Lee et al., 2016; Vera-Pingitore et al., 2016) เพื่อศึกษาคุณสมบัติการทนต่อกรดของแบคทีเรียซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของโพรไบโอติก ในงานวิจัยนี้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) โดยทดสอบการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดผลโดยนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต คำนวณหา log CFU/ml จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Tukey's test แสดงผลดังตารางที่ 7

ผลการทดสอบความสามารถทนต่อกรด พบว่าแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท และ *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงได้ โดย *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ได้ดีที่สุดในเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 85.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 58.31 และ 54.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ 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

จากผลการทดสอบความสามารถทนต่อกรดในงานวิจัยนี้ พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* และ *Streptococcus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถทนกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงได้ จากการทดสอบที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.20-9.54 log CFU/ml เมื่อผ่านไป 2 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 1.46-7.35 log CFU/ml ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 16.35-

85.77 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) และ *L. curvatus* TISTR 938

จากงานวิจัยนี้ พบว่า *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดได้ดีที่สุดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 85.77 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลทอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bujnakova and Strakova (2017) ที่คัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 4 ไอโซเลท จากโยเกิร์ต และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร พบว่า *L. acidophilus* สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 87 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Nivoliez et al. (2012) ที่คัดแยก *L. rhamnosus* จำนวน 2 ไอโซเลท จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร พบว่า *L. rhamnosus* Lcr Restituo<sup>®</sup> packet และ Lcr Restituo<sup>®</sup> capsule สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 65.50 และ 60.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และงานวิจัยของ Ghatani and Tamang (2017) ได้คัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 16 ไอโซเลท จากผลิตภัณฑ์นมหมัก พบว่า *L. plantarum* YD5S และ *L. plantarum* YD9S สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 54.29 และ 49.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ความสามารถในการทนต่อกรดของ *Lactobacillus* เนื่องจากในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด *Lactobacillus* จะมีกลไกเพื่อปรับตัวให้มีชีวิตรอด ได้แก่ 1) การรักษาภาวะสมดุลของค่า pH บริเวณเซลล์ เมมเบรนของแบคทีเรียโดยอาศัยเอนไซม์ H<sup>+</sup>-ATPase เช่น K<sup>+</sup>-ATPase 2) การเร่งปฏิกิริยา decarboxylation โดยอาศัยเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) และการแตกโมเลกุลของ arginine โดยอาศัยเอนไซม์ carbamate kinase (CK) ซึ่งกลไกทั้งสองนี้มีการดึงโปรตอนมาใช้ในปฏิกิริยา โดยขับโปรตอนออกผ่าน H<sup>+</sup>-ATPase pump 3) การปรับเปลี่ยนโครงสร้างเซลล์เมมเบรน โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันและขนาดของ channel ทำให้สามารถขับโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมได้ดีขึ้นและ 4) การป้องกันโปรตีนถูกทำลาย และการซ่อมแซมความเสียหายของ DNA ที่เกิดจากกรด เป็นต้น ส่วนความสามารถในการทนต่อกรดของ *Streptococcus* เท่าที่มีการรายงานพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับกลไก 1) การรักษาภาวะสมดุลของค่า pH โดยอาศัยเอนไซม์ H<sup>+</sup>-ATPase และ 4) การป้องกันโปรตีนถูกทำลาย และการซ่อมแซมความเสียหายของ DNA เท่านั้น (Guan and Liu, 2020)

ตารางที่ 7 ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

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

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ a-h แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P<0.05)

#### 4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี

ในร่างกายมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้เฉลี่ย 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Prasad et al., 1998 อ้างจาก Gilliland et al., 1984; Sjoval, 1959) น้ำดีมีผลต่อแบคทีเรียโดยจะไปทำลายเซลล์เมมเบรนที่มีส่วนประกอบหลักคือ ไขมันและกรดไขมัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมมเบรนนี้อาจส่งผลต่อการซึมผ่านของสารและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (Succi et al., 2005) ในงานวิจัยนี้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) โดยทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดผลโดยนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิต คำนวณหา log CFU/ml จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Tukey's test แสดงผลดังตารางที่ 8

ผลการทดสอบทนต่อเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงได้ โดย MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 99.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 97.12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ ไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F4S1), 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 91.77, 67.07, 67.02, 65.91, 61.09, 46.79, 41.77 และ 8.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบการรอดชีวิตของไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504)

จากผลการทดสอบทนต่อเกลือน้ำดีในงานวิจัยนี้ พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* และ *Streptococcus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงได้ จากการทดสอบที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.20-9.32 log CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 0.83- 8.53 log CFU/ml ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 8.86-99.50 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504)

จากงานวิจัยนี้ พบว่าไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 99.50 เปอร์เซ็นต์ และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P > 0.05$ ) กับไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 97.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Faghfoori และคณะ (2017) รายงานว่าคัดแยก *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* และ *L. rhamnosus* จากโยเกิร์ตและชีสของอิหร่านได้ทั้งหมด 56 สายพันธุ์ พบว่ามี 25 สายพันธุ์ที่สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) ได้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้แก่ *L. plantarum* จำนวน 9 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 88-94 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. plantarum* AH-1 สามารถทนต่อเกลือ น้ำดีได้ดีที่สุด เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์, *L. casei* จำนวน 10 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 85-91 เปอร์เซ็นต์, *L. paracasei* จำนวน 3 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 85-91 เปอร์เซ็นต์ และ *L. rhamnosus* จำนวน 3 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 87-92 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Motey et al. (2021) ได้คัดแยก *L. plantarum*, *L. fermentum*, *E. faecium* และ *P. acidilactici* จากผลิตภัณฑ์นมหมักพื้นเมืองของกานาทั้งหมด 30 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถทนต่อเกลือ น้ำดี (0.3% w/v) ได้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 93.1-109.1 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. plantarum* NL27 และ PA27 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 93.1 และ 101.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากนี้รายงานของ Li et al. (2017) ได้ศึกษา *L. plantarum* CY2 และ CY3 ที่คัดแยกจากนม พบว่า *L. plantarum* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถทนต่อเกลือ น้ำดีได้ดี จากการทดสอบที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.32 และ 8.49 log CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 7.92 และ 8.53 log CFU/ml ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 95.19 และ 100.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดีของ *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์อาจเนื่องมาจากกลไกต่าง ๆ ได้แก่ 1) แบคทีเรียในลำไส้ที่มีชั้นของ exopolysaccharide (EPS) ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม 2) การใช้ transporter ขับเกลือ น้ำดี และกรด น้ำดี ออกจากไซโตพลาสซึม (Pfeiler and Klaenhammer, 2009) 3) การสร้าง heat shock protein เพื่อช่วยส่งเสริมความแข็งแรงของโปรตีนและดีเอ็นเอให้เสถียร 4) การสลาย glucose เพิ่มมากขึ้นเพื่อเพิ่มการผลิตพลังงาน และนำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ และ 5) แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถผลิต



เอนไซม์ bile salt hydrolase ได้ ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (Bustos et al., 2018)

**ตารางที่ 8** ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการทนต่อเกลือน้ำดี (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

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

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ a-f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P<0.05)



#### 4.3 ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

เมื่อร่างกายได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน (6-8 สัปดาห์) ยาปฏิชีวนะจะไปรบกวนและส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในลำไส้ ส่งผลให้เชื้ออื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นเชื้อที่ก่อโรค (pathogenic bacteria) เพิ่มจำนวนขึ้นทำให้เกิดการอักเสบของทางเดินอาหารส่วนต้น หรือทำให้เกิดท้องเสียได้ ซึ่งการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเป็นคุณสมบัติหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Aputinan, 2020) ในงานวิจัยนี้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) โดยทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ ได้เป็นกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้แก่ vancomycin, penicillin และ ampicillin ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ gentamycin, clindamycin, tetracycline, erythromycin และ chloramphenicol และยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ sulfamethoxazole โดยทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลขนาด clear zone ของ *Lactobacillus* เปรียบเทียบกับเกณฑ์ตามวิธีของ Charteris et al., 1998 แสดงผลดังตารางที่ 9 และ *S. thermophilus* เปรียบเทียบกับเกณฑ์ตามวิธีของ CLSI M100-S28 แสดงผลดังตารางที่ 6

ผลการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus* จำนวน 8 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า

ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้มากที่สุด 6 ชนิด โดยสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (resistant) 4 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole, vancomycin และ penicillin และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ในระดับปานกลาง (intermediate) 2 ชนิด ได้แก่ clindamycin และ tetracycline แต่มีความไวต่อยา (susceptible) 3 ชนิด ได้แก่ erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

ไอโซเลท MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) และ MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด โดยสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (resistant) 3 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ในระดับปานกลาง (intermediate) 1 ชนิด ได้แก่ penicillin แต่มีความไวต่อ ยา (susceptible) 5 ชนิด ได้แก่ clindamycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-11 (*L. casei* F4S1) และ *L. curvatus* TISTR 938 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (resistant) 3 ชนิด ได้แก่ gentamycin,

sulfamethoxazole และ vancomycin ได้ แต่มีความไวต่อยา (susceptible) 6 ชนิด ได้แก่ penicillin, clindamycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

*L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (resistant) 3 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole และ clindamycin ได้ แต่มีความไวต่อยา (susceptible) 6 ชนิด ได้แก่ vancomycin, penicillin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

ไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (resistant) 2 ชนิด ได้แก่ gentamycin และ sulfamethoxazole แต่มีความไวต่อยา (susceptible) 7 ชนิด ได้แก่ vancomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin

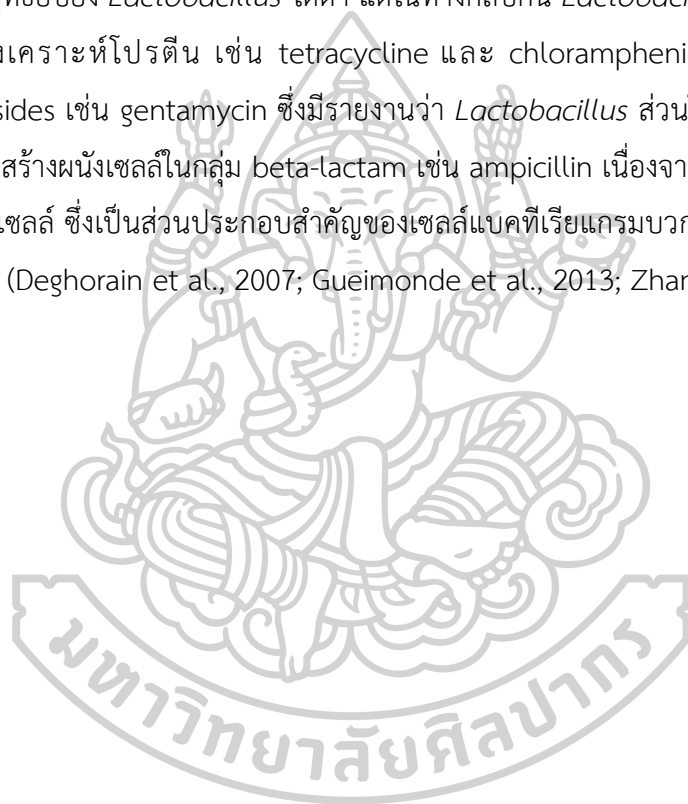
ผลการทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของ *S. thermophilus* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504) และ MD-8 (*S. thermophilus* 4079) ต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด แล้ววิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เกณฑ์ตามวิธีของ CLSI M100-S28 พบว่า *S. thermophilus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีความไวต่อยา (susceptible) 5 ชนิด ได้แก่ vancomycin, clindamycin, tetracycline, erythromycin และ chloramphenicol

จากผลทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด ในงานวิจัยนี้ พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Lactocaseibacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin ได้ ยกเว้น MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) และ *L. acidophilus* TISTR 2365

จากงานวิจัยนี้ พบว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ดีกว่าทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ โดยสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ 6 ชนิด จากยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole, vancomycin, penicillin, clindamycin และ tetracycline ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2017) ที่คัดแยก *Lactobacillus* จำนวน 31 สายพันธุ์ จากตัวอย่างนม และผลิตภัณฑ์นม พบว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ gentamycin และ vancomycin ได้ แต่มีความไวต่อยา erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin โดย *L. plantarum* D7 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้มากที่สุดถึง 18 ชนิด จากยาปฏิชีวนะทั้งหมด 26 ชนิด รวมถึง gentamycin, vancomycin, penicillin, clindamycin และ tetracycline นอกจากนี้ Yadav และคณะ (2016) ได้ศึกษา *L. plantarum* RYPR1 ที่คัดแยกจากอาหารหมักของอินเดีย (Rabadi) พบว่า

*L. plantarum* RYPR1 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ 7 ชนิด จากยาปฏิชีวนะทั้งหมด 10 ชนิด รวมถึง gentamycin, vancomycin, penicillin และ tetracycline

ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดรวมถึง gentamycin และ vancomycin ใน *Lactobacillus* เป็นแบบ intrinsic resistance (Sharma et al., 2014) โดย *Lactobacillus* สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ vancomycin binding site ที่ peptidoglycan มีผลทำให้ความสามารถในการจับกันระหว่าง vancomycin กับ peptidoglycan ลดลง 1,000 เท่า นอกจากนี้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เช่น sulfamethoxazole ส่วนใหญ่จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *Lactobacillus* ได้ต่ำ แต่ในทางกลับกัน *Lactobacillus* มักไวต่อยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น tetracycline และ chloramphenicol ยกเว้นยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น gentamycin ซึ่งมีรายงานว่า *Lactobacillus* ส่วนใหญ่มีความไวต่อยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ในกลุ่ม beta-lactam เช่น ampicillin เนื่องจากจะไปออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกทำให้มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Deghorain et al., 2007; Gueimonde et al., 2013; Zhang et al., 2018)



ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ Lactobacillus จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ Charteris et al., 1998

isolate	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-3	<i>Lacti. rhamnosus</i> 442	R	R	R	I	S	S	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-1	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CH 2	R	R	S	S	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> F4S1	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
TISTR 938	<i>L. curvatus</i> TISTR 938	R	R	R	S	S	S	S	S	S

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

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ขนาด clear zone ของ *S. thermophilus* จากการเปรียบเทียบกับเกณฑ์ CLSI M100-S28

isolate	strain	Gentamycin	Sulfamethoxazole	Vancomycin	Penicillin	Clindamycin	Tetracycline	Erythromycin	Chloramphenicol	Ampicillin
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	*	*	S	*	S	S	S	S	*
MD-4	<i>S. thermophilus</i> 3504	*	*	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),

\*ไม่มีรายงานใน CLSI M100-S28

#### 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีแบคทีเรียที่ดีและแบคทีเรียที่ก่อโรค ตัวอย่างแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคภายในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงอาศัยคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อรักษาสมดุลของแบคทีเรียภายในลำไส้ และควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคไม่ให้เจริญจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ในงานวิจัยนี้จึงทดสอบ supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ แบ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 885 และแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Tukey's test รูปผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แสดงดังตารางที่ 11 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone แสดงดังตารางที่ 12

ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) มี clear zone ขนาด 11.00 mm และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P > 0.05$ ) กับไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) มี clear zone ขนาด 10.33, 10.33, 10.00, 10.00 และ 9.00 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ ไอโซเลท MD-11 (*L. casei* F4S1), *L. curvatus* TISTR 938, MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), *L. acidophilus* TISTR 2365, MD-2 (*S. thermophilus* 3284) และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504) มี clear zone ขนาด 8.67, 6.33, 5.00, 4.67, 3.00 และ 3.00 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท MD-8 (*S. thermophilus* 4079) ไม่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มี clear zone ขนาด 9.00 mm และให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P > 0.05$ ) กับไอโซเลท MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-5



(*L. plantarum* 3335), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) มี clear zone ขนาด 8.33, 8.33, 8.33, 8.33 และ 8.00 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), *L. curvatus* TISTR 938, *L. acidophilus* TISTR 2365 และ MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) มี clear zone ขนาด 7.67, 5.00, 3.33 และ 1.67 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504) และ MD-8 (*S. thermophilus* 4079) ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) มี clear zone ขนาด 9.67, 9.33, 9.33, 9.00 และ 9.00 mm ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลทอื่น ได้แก่ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-11 (*L. casei* F4S1) และ *L. curvatus* TISTR 938 มี clear zone ขนาด 7.33, 7.00 และ 2.67 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504), MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795) มี clear zone ขนาด 9.33, 9.00, 9.00, 9.00 และ 8.33 mm ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลทอื่น ได้แก่ ไอโซเลท MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-11 (*L. casei* F4S1) และ *L. curvatus* TISTR 938 มี clear zone ขนาด 6.67, 6.67 และ 2.33 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504), MD-8 (*S. thermophilus* 4079) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ไม่สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทมี clear zone ขนาด 7.00 mm ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

นัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลทอื่น ได้แก่ ไอโซเลท MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-6 (*Lacti. Paracasei* W1-D-5) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) มี clear zone ขนาด 6.33, 6.00, 5.67 และ 5.00 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), *L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938 ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในงานวิจัยนี้ พบว่า *Lactobacillus* และ *Lacticaseibacillus* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), 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* 3335), และ MD-11 (*L. casei* F4S1) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและ แกรมลบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์

จากงานวิจัยนี้ พบว่าไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* 3335) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้ดีที่สุดใน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abo-Amer (2007) ได้คัดแยก *L. plantarum* AA135 จากโยเกิร์ต พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 15442 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ได้ดีที่สุดใน และ Haghshenas et al. (2015) ได้ศึกษา *Lactobacillus* จำนวน 17 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากโยเกิร์ตและตัวอย่างนม ได้แก่ *L. casei* จำนวน 5 ไอโซเลท *L. paracasei* จำนวน 4 ไอโซเลท *L. rhamnosus* จำนวน 4 ไอโซเลท *L. plantarum* จำนวน 3 ไอโซเลท และ *L. delbrueckii* จำนวน 1 ไอโซเลท พบว่า *L. plantarum* 17C และ *L. plantarum* 13C สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Shigella flexneri* นอกจากนี้ De Giani et al. (2019) ได้ศึกษา *L. plantarum* PBS067 ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า *L. plantarum* PBS067 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทดสอบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 2922

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์อาจมีผลเนื่องมาจากแบคทีเรียสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ได้ เช่น กรดอะซิติกที่สามารถลดค่า pH ในลำไส้ ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *S. aureus* และ

*Listeria monocytogenes* (Reis et al., 2012 อ้างอิงจาก De Vuyst and Leroy, 2007; Oliveira et al., 2008; Vasiljevic and Shah, 2008) และยังสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน เช่น nisin และ lactacin B เป็นต้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร (Prabhurajeshwar and Chandrakanth, 2019)

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

pathogen	antimicrobial resistance (clear zone)		
<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-1: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2, (2) MD-2: *S. thermophilus* 3284, (3) MD-3: *Lacti. rhamnosus* 442, (4) MD-4: *S. thermophilus* 3504, (5) MD-5: *L. plantarum* 3335, (6) MD-6: *Lacti. paracasei* W1-D-5, (7) MD-7: *Lacti. rhamnosus* 2795, (8) MD-8: *S. thermophilus* 4079, (9) MD-9: *L. rhamnosus* HDB1311, (10) MD-10: *L. plantarum* YLL-03, (11) MD-11: *L. casei* F4S1, (12) *L. acidophilus* TISTR 2365, (13) *L. curvatus* TISTR 938 และ (C) Control: MRS broth

**ตารางที่ 12** ผลการทดสอบแบบคที่เรียกรวดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 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. Typhimurium</i> TISTR 292	<i>S. aureus</i> TISTR 885
MD-1	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CH 2	5.00±1.00 <sup>b</sup> <sup>c</sup>	1.67±0.58 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	3.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
MD-3	<i>Lacti. rhamnosus</i> 442	11.00±0.00 <sup>e</sup>	8.33±0.58 <sup>ef</sup>	9.00±0.00 <sup>d</sup>	9.00±0.00 <sup>d</sup>	7.00±0.00 <sup>e</sup>
MD-4	<i>S. thermophilus</i> 3504	3.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
MD-5	<i>L. plantarum</i> 3335	10.33±0.58 <sup>de</sup>	8.33±0.58 <sup>ef</sup>	9.33±0.58 <sup>d</sup>	9.33±0.58 <sup>d</sup>	7.00±0.00 <sup>e</sup>
MD-6	<i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5	9.00±0.00 <sup>de</sup>	7.67±0.58 <sup>e</sup>	7.33±0.58 <sup>c</sup>	6.67±0.58 <sup>c</sup>	5.67±0.58 <sup>c</sup>
MD-7	<i>Lacti. rhamnosus</i> 2795	10.00±0.00 <sup>de</sup>	8.33±0.58 <sup>ef</sup>	9.00±0.00 <sup>d</sup>	8.33±0.58 <sup>d</sup>	6.33±0.58 <sup>d</sup>
MD-8	<i>S. thermophilus</i> 4079	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
MD-9	<i>L. rhamnosus</i> HDB1311	10.00±0.00 <sup>de</sup>	8.33±0.58 <sup>ef</sup>	9.33±0.58 <sup>d</sup>	9.00±0.00 <sup>d</sup>	6.00±0.00 <sup>cd</sup>
MD-10	<i>L. plantarum</i> YLL-03	10.33±0.58 <sup>de</sup>	9.00±0.58 <sup>f</sup>	9.67±0.58 <sup>d</sup>	9.00±0.00 <sup>d</sup>	7.00±0.00 <sup>e</sup>
MD-11	<i>L. casei</i> F4S1	8.67±1.53 <sup>d</sup>	8.00±0.00 <sup>ef</sup>	7.00±0.00 <sup>c</sup>	6.67±0.58 <sup>c</sup>	5.00±0.00 <sup>b</sup>
TISTR 2365	<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	4.67±1.53 <sup>bc</sup>	3.33±0.58 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
TISTR 938	<i>L. curvatus</i> TISTR 938	6.33±1.53 <sup>c</sup>	5.00±0.00 <sup>d</sup>	2.67±1.15 <sup>b</sup>	2.33±0.58 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
 สัญลักษณ์ a-f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P<0.05)



#### 4.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มี unpaired electron ทำให้สารนั้นไม่เสถียรและไวต่อปฏิกิริยา โดยอนุมูลอิสระตั้งอิเล็คตรอนจากสารอื่น ๆ เพื่อทำให้เกิดความเสถียร เมื่ออนุมูลอิสระมีมากเกินไปจนสมดุลจะไปทำลายส่วนประกอบของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน รวมทั้งเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง อัลไซเมอร์ และลำไส้อักเสบ เป็นต้น จึงมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase เป็นต้น และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามิน และ glutathione เป็นต้น และ 2) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่มีผลข้างเคียงและอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น BHT (butylated hydroxytoluene) เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งต่อมไทรอยด์ (Kulawik et al., 2013) ทำให้มีงานวิจัยที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทน ในงานวิจัยนี้จึงทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) ด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-Hydrazyl radical scavenging activity) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity (%)) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Dunnett's multiple range test โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5% (w/v) L-ascorbic acid แสดงผลดังตารางที่ 13

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด เท่ากับ 91.81 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-11 (*L. casei* F4S1), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), *L. curvatus* TISTR 938, MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), *L. acidophilus* TISTR 2365 และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504) สามารถต้านอนุมูลอิสระได้เท่ากับ 90.30, 89.30, 88.96, 88.92, 88.50, 88.17, 87.92, 87.90, 87.82, 87.79, 86.97 และ 83.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารมาตรฐาน 0.5% (w/v) L-ascorbic acid สามารถต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 94.21 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในงานวิจัยนี้ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 83.76-91.81 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-), MD-8

(*S. thermophilus* 4079), MD-11 (*L. casei* F4S1), และ *L. curvatus* TISTR 938 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P>0.05$ ) เมื่อเทียบกับ control (0.5% (w/v) L-ascorbic acid) โดย MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (91.81 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ MD-6 *Lacti. paracasei* (90.30 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งได้ผลการทดสอบสูงกว่างานวิจัยของ Shi et al. (2019) ที่รายงานว่าคัดแยก *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Weissella paramesenteroides*, *Enterococcus faecium* และ *Pediococcus pentosaceus* จากชีสแบบดั้งเดิมของจีน เมื่อนำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า *L. plantarum* subsp. *plantarum* W2/KX261527.1 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คิดเป็น 39.30 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *L. paracasei* 154 และ 039 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ คิดเป็น 27.27 และ 19.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และงานวิจัยของ Riane et al. (2021) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของ *L. plantarum*, *L. viridescens*, *L. delbrueckii* ssp *lactis*, *L. helveticus* และ *Lactobacillus* sp. ที่คัดแยกจากนม พบว่า *L. plantarum* 15 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 72.21 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจมีผลเนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เช่น glutathione, catalase และ NADH oxidase เป็นต้น (Zhang et al., 2013) ในกรณีที่ทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวบนอะตอมของไนโตรเจน สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจะไปทำปฏิกิริยากับ DPPH เกิดการทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Zhang et al., 2011) ซึ่งจะเรียกสารที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ว่าเป็น radical scavenger หรือเรียกสารต้านออกซิเดชันตามกลไกการยับยั้งชนิดที่เกิดการทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระว่าเป็น scavenging antioxidant สารต้านอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่มีต่อโมเลกุลอื่น เป็นสารที่สามารถทำลายอนุมูลอิสระในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid membrane peroxidation) เป็นต้น



ตารางที่ 13 ผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี DPPH

isolate	strain	DPPH scavenging activity (%)
MD-1	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CH 2	87.92±5.67*
MD-2	<i>S. thermophilus</i> 3284	87.90±0.49*
MD-3	<i>Lacti. rhamnosus</i> 442	88.17±1.45*
MD-4	<i>S. thermophilus</i> 3504	83.76±1.52*
MD-5	<i>L. plantarum</i> 3335	91.81±3.33
MD-6	<i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5	90.30±1.86
MD-7	<i>Lacti. rhamnosus</i> 2795	87.79±0.75*
MD-8	<i>S. thermophilus</i> 4079	88.96±1.95
MD-9	<i>L. rhamnosus</i> HDB1311	88.50±2.10*
MD-10	<i>L. plantarum</i> YLL-03	87.82±2.29*
MD-11	<i>L. casei</i> F4S1	89.30±0.70
TISTR 2365	<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	86.97±1.37*
TISTR 938	<i>L. curvatus</i> TISTR 938	88.92±1.06
Ascorbic (control)	0.5% (w/v) L-ascorbic acid	94.21±1.67

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัญลักษณ์ \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับ control



## 5. ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการลดระดับคอเลสเทอรอล

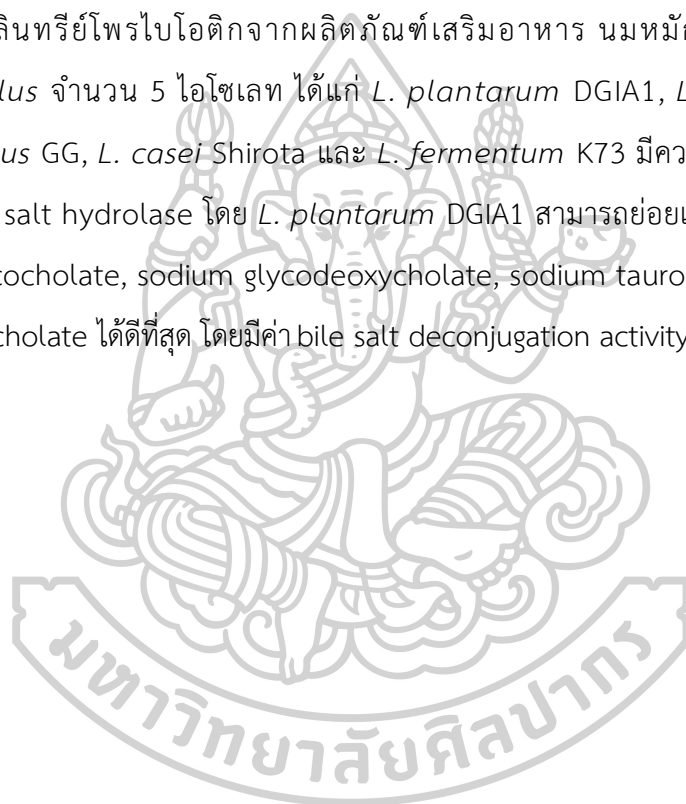
### 5.1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase

การสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase สามารถใช้เป็นคุณสมบัติสำหรับการคัดเลือกโพรไบโอติก ในการศึกษาการลดคอเลสเทอรอลได้ (Majeed et al., 2019) เนื่องจากคอเลสเทอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เกลือน้ำดี เมื่อเกลือน้ำดีถูกย่อยโดยเอนไซม์ bile salt hydrolase จะกลายเป็นกรดน้ำดีอิสระ และถูกขับออกทางอุจจาระ ส่งผลให้มีการดึงคอเลสเทอรอลมาใช้เพื่อสร้างเกลือน้ำดีมากขึ้น ทำให้ระดับคอเลสเทอรอลในร่างกายลดลง (Kumar et al., 2012b) งานวิจัยนี้จึงทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) ในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase บนอาหาร MRS agar ที่เสริมด้วย 0.5% (w/v) taurodeoxycholic acid sodium salt (TDCA) และ  $\text{CaCl}_2$  (0.37 g/l) และใช้ MRS agar ที่ไม่เสริมด้วย TDCA และ  $\text{CaCl}_2$  เป็นชุดควบคุม (control) และสังเกตการตกตะกอนที่โคโลนีหรือการเกิดโคโลนีสีขาวขุ่น และ/หรือเกิดการตกตะกอนบนอาหารบริเวณรอบโคโลนี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar (control) เทียบกับ MRS agar ที่เสริมด้วย TDCA และ  $\text{CaCl}_2$  แสดงดังรูปที่ 13 และผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase แสดงดังตารางที่ 14

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase พบว่าไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ส่วนไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-4 (*S. thermophilus* 3504), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-11 (*L. casei* F4S1), *L. curvatus* TISTR 2365 และ *L. acidophilus* TISTR 938 ไม่พบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase

จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ในงานวิจัยนี้ พบว่าเกิดการตกตะกอนและโคโลนีมีสีขาวขุ่น รวมถึงพบการตกตะกอนบนอาหารบริเวณรอบโคโลนีของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) บนอาหาร MRS agar ที่เสริมด้วย TDCA และ  $\text{CaCl}_2$  เมื่อเทียบกับชุดควบคุม บ่งบอกถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase เนื่องจากการตกตะกอนรอบ ๆ โคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เสริมด้วย TDCA และ

CaCl<sub>2</sub> (ดั่งลูกศรชี้ในรูปที่ 13) เกิดจากเอนไซม์ bile salt hydrolase ไปสลายพันธะที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนและกรดน้ำดีอิสระของ taurodeoxycholic acid ซึ่งเป็น conjugated bile acid ได้กรดอะมิโน taurine และ กรดน้ำดีอิสระ deoxycholic acid ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อย ทำให้เกิดการตกตะกอนที่โคโลนีและบริเวณรอบโคโลนี (Dashkevicz et al., 1989) โดยงานวิจัยของ Cho และคณะ (2006) ได้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 120 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง *L. plantarum* จำนวน 5 ไอโซเลท เท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ได้แก่ *L. plantarum* CK 101, CK 102, CK 103, CK 104 และ CK 105 นอกจากนี้ Hernandez-Gomez และคณะ (2021) ได้คัดแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร นมหมัก และครีมชีส พบว่า *Lactobacillus* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ *L. plantarum* DGIA1, *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota และ *L. fermentum* K73 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase โดย *L. plantarum* DGIA1 สามารถย่อยเกลือน้ำดี 4 ชนิด ได้แก่ sodium glycocholate, sodium glycodeoxycholate, sodium taurocholate และ sodium taurodeoxycholate ได้ดีที่สุด โดยมีค่า bile salt deconjugation activity 69–100 เปอร์เซ็นต์





รูปที่ 13 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar (A) เทียบกับ MRS agar ที่เสริมด้วย TDCA และ CaCl<sub>2</sub> (B)

หมายเหตุ: กำหนดให้ MD-1: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2, MD-2: *S. thermophilus* 3284, MD-3: *Lacti. rhamnosus* 442, MD-4: *S. thermophilus* 3504, 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, MD-11: *L. casei* F451, *L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase

isolate	bile salt hydrolase activity
MD-1 ( <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CH 2)	-
MD-2 ( <i>S. thermophilus</i> 3284)	-
MD-3 ( <i>Lacti. rhamnosus</i> 442)	-
MD-4 ( <i>S. thermophilus</i> 3504)	-
MD-5 ( <i>L. plantarum</i> 3335)	+
MD-6 ( <i>Lacti. paracasei</i> W1-D-5)	-
MD-7 ( <i>Lacti. rhamnosus</i> 2795)	-
MD-8 ( <i>S. thermophilus</i> 4079)	-
MD-9 ( <i>L. rhamnosus</i> HDB1311)	-
MD-10 ( <i>L. plantarum</i> YLL-03)	+
MD-11 ( <i>L. casei</i> F4S1)	-
<i>L. curvatus</i> TISTR 2365	-
<i>L. acidophilus</i> TISTR 938	-

หมายเหตุ: + หมายถึง มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase

- หมายถึง ไม่พบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase





## 5.2 ผลการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอล

คอเลสเตอรอล เป็นไขมันที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย แต่หากร่างกายมีระดับคอเลสเตอรอลสูงมากเกินไป สามารถเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตส่วนใหญ่ในหลายประเทศทั่วโลก และมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของโรคอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงมีโอกาเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหัวใจวายมากกว่าผู้ที่มีระดับคอเลสเตอรอลที่อยู่ในเกณฑ์ปกติถึง 3 เท่า ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการใช้ยาในกลุ่ม statin ในการรักษาภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง แต่พบว่ายาค่อนข้างมีราคาแพง และมีผลข้างเคียงต่อร่างกายได้ (Kumar et al., 2012) ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จำนวน 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) ในการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลอง โดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) ox gall และ cholesterol-PEG 600 (100 µg/ml) และใช้อาหาร MRS broth ที่ไม่มีการเติมเชื้อเป็นชุด control หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง นำส่วน supernatant มาวิเคราะห์ปริมาณของคอเลสเตอรอลด้วยวิธี O-phthalaldehyde แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดคอเลสเตอรอล (cholesterol reduction (%)) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Tukey's test แสดงดังรูปที่ 14

ผลการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลอง พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีที่สุด เท่ากับ 82.70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้เท่ากับ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ส่วน ไอโซเลทที่เหลือ ได้แก่ MD-7 (*Lacti. rhamnosus* 2795), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5), MD-11 (*L. casei* F4S1), MD-8 (*S. thermophilus* 4079), *L. acidophilus* TISTR 938, MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), *L. curvatus* TISTR 2365, MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), และ MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ 43.52, 41.35, 35.91, 34.82, 33.73, 33.73, 32.64, 27.20, 26.11, 22.85 และ 14.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมงในงานวิจัยนี้ พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีที่สุด 2 อันดับแรก จึงนำมาศึกษา 1) การเจริญในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ cholesterol-PEG 600 (100 µg/ml) ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD<sub>600</sub>) 2) ปริมาณของคอเลสเตอรอลในอาหาร (supernatant) 3) ปริมาณคอเลสเตอรอลที่เซลล์แบคทีเรีย



(cell pellet) โดยนำส่วน supernatant และ cell pellet มาวิเคราะห์ปริมาณของคอเลสเตอรอล ด้วยวิธี *O*-phthalaldehyde แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์คอเลสเตอรอล (cholesterol (%)) แสดงดังรูปที่ 15

ผลการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีค่า OD<sub>600</sub> เพิ่มขึ้นจาก 0.026 เป็น 1.005, 1.592, 1.735 และ 1.752 ตามลำดับ และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีค่า OD<sub>600</sub> เพิ่มขึ้นจาก 0.025 เป็น 0.918, 1.586, 1.731 และ 1.749 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของคอเลสเตอรอลในอาหารที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถลดคอเลสเตอรอลในอาหารจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 91.70, 75.11, 44.36 และ 20.45 เปอร์เซ็นต์ และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดคอเลสเตอรอลในอาหารจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 88.20, 71.68, 50.92 และ 31.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอลที่เซลล์แบคทีเรีย (cell pellet) ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีการสะสมคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 10.65, 37.90, 67.17 และ 81.77 เปอร์เซ็นต์ และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีการสะสมคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 11.46, 48.99, 72.72 และ 83.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ อยู่ในช่วง 14.92–82.70 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีที่สุด (82.70 เปอร์เซ็นต์) ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลทอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nami และคณะ (2019) ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 53 ไอโซเลท จาก โยเกิร์ต, ซีส, curd และ tarkhineh พบว่า *L. plantarum* YS5 สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ดีที่สุด โดยเซลล์ในระยะ growing มีเปอร์เซ็นต์การลดคอเลสเตอรอล เท่ากับ 84.47 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Lee และคณะ (2022) ที่ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 61 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ โดย *L. plantarum* MA2 สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้สูงที่สุด นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ยังพบว่าไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้เท่ากับ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีรองลงมาจาก MD-5 (*L. plantarum* 3335) และให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลทที่เหลือ

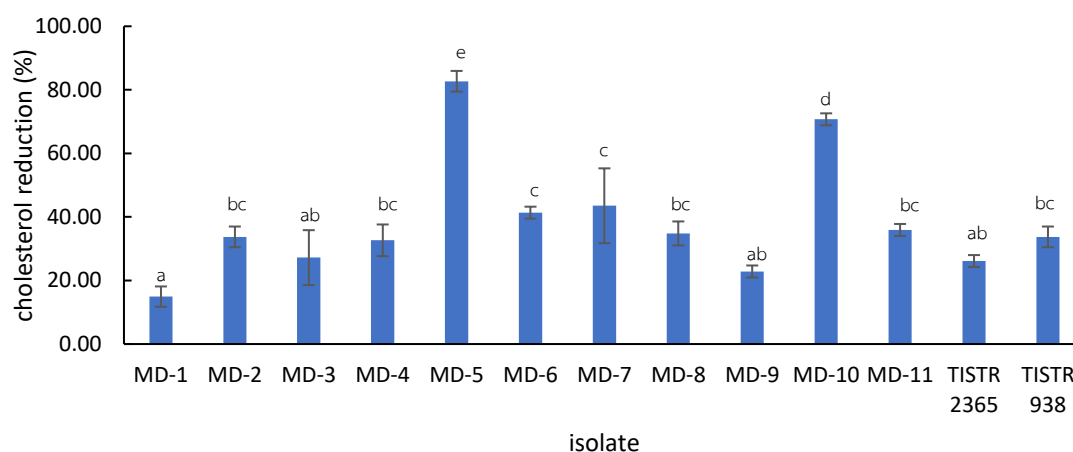
จากผลการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ทดสอบ และมีค่าสัมพัทธ์เชิงลบกับเปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอลในหลอดทดลอง (supernatant) โดยเมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองจะลดลงตามลำดับเวลา เช่นเดียวกับรายงานของ Miremadi และคณะ (2014) ที่ทดสอบการลดคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. zaeae*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium longum* และ *B. bifidum* ที่เวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถลดคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้ โดยมีการลดระดับคอเลสเทอรอลได้มากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น และเมื่อวัดการเจริญพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเจริญสัมพันธ์เชิงลบกับระดับคอเลสเทอรอลในอาหาร ซึ่งรูปแบบการลดคอเลสเทอรอลนี้บ่งชี้ว่าการลดคอเลสเทอรอลนั้นเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย และแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อมีคอเลสเทอรอลบ่งชี้ได้ว่าคอเลสเทอรอลอาจส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอลที่เซลล์แบคทีเรีย (cell pellet) เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีการสะสมคอเลสเทอรอลเพิ่มขึ้นตามลำดับเวลาที่ทดสอบ ซึ่งมีค่าสัมพัทธ์เชิงบวกกับการเจริญของแบคทีเรีย แต่มีค่าสัมพัทธ์เชิงลบกับเปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอลในหลอดทดลอง (supernatant) ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้บ่งชี้ว่า MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีความสามารถ assimilate คอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้ ดังรายงานของ Al-Saleh และคณะ (2006) ที่ได้ศึกษาการลดระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองของ *L. acidophilus* จำนวน 3 ไอโซเลท *Bifidobacterium* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *S. thermophilus* จำนวน 1 ไอโซเลท ที่เวลา 20 ชั่วโมง พบว่า *L. acidophilus* ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 49.57-55.43 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *Bifidobacterium* สามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้อยู่ในช่วง 41.93-44.19 เปอร์เซ็นต์ และ *S. thermophilus* สามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้น้อยที่สุด 36.07 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอลที่เซลล์แบคทีเรีย (cell pellet) พบว่า *L. acidophilus* DSM 20079 มีการสะสมคอเลสเทอรอลสูงที่สุด 45.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าสัมพัทธ์เชิงลบกับเปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอลในหลอดทดลอง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถ uptake คอเลสเทอรอลไว้ที่เซลล์เมมเบรน

ความสามารถในการลดคอเลสเทอรอลของโพรไบโอติกเกิดได้จากกลไกหลายประการ เช่น การสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ที่สามารถลดคอเลสเทอรอลในร่างกายได้ผ่านการย่อยเกลือน้ำดี การสร้าง SCFAs เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในตับ และการเปลี่ยนคอเลสเทอรอลเป็น

coprostanol แล้วขับออกทางอุจจาระ จึงส่งผลให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกายได้ นอกจากนี้ กลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองเกิดจาก lactobacilli สามารถ assimilate คอเลสเตอรอลในหลอดทดลองระหว่างการเจริญได้โดยการ absorption (การดูดซึม) หรือ adsorption (การดูดซับ) (Ho ráčková et al, 2018) และคอเลสเตอรอลยังสามารถตกตะกอน ร่วมกับ deconjugated bile salt ในหลอดทดลองได้อีกด้วย (Baoglu Aydas and Aslim, 2016)

ดังนั้นจากการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในการทดลองนี้ สรุปได้ว่า ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ดีกว่าทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ จึงคัดเลือกไปศึกษาความเป็นพิษ และการยับยั้งการสะสมไขมันต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ต่อไป



**รูปที่ 14** เปอร์เซ็นต์การลดลงของคอเลสเตอรอลเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ Cholesterol-PEG 600 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

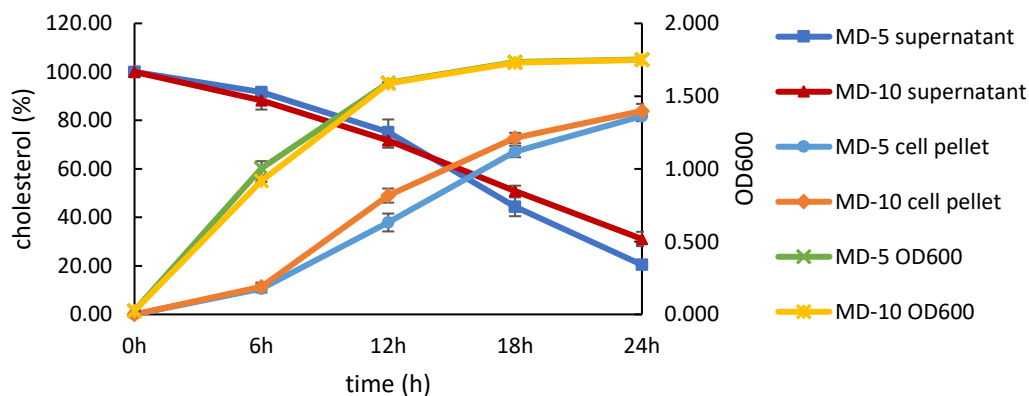
**หมายเหตุ:** สัญลักษณ์ a-e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ )

กำหนดให้ MD-1: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2, MD-2: *S. thermophilus* 3284, MD-3:

*Lacti. rhamnosus* 442, MD-4: *S. thermophilus* 3504, 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, MD-11: *L. casei* F4S1, *L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938



**รูปที่ 15** เปอร์เซ็นต์ของคอเลสเตอรอลในอาหาร MRS broth (supernatant) และ cell pellet เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) Ox gall และ Cholesterol-PEG 600 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง

**หมายเหตุ:** MD-5 supernatant และ MD-10 supernatant คือ เปอร์เซ็นต์คอเลสเตอรอลใน supernatant ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ตามลำดับ; MD-5 cell pellet และ MD-10 cell pellet คือ เปอร์เซ็นต์คอเลสเตอรอลที่ cell pellet ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ตามลำดับ และ MD-5 OD<sub>600</sub> และ MD-10 OD<sub>600</sub> คือค่า OD<sub>600</sub> ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ตามลำดับ

## 6. ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte

### 6.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte

คุณสมบัติเบื้องต้นของโพรไบโอติกคือเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อโฮสต์ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึงถึง ได้แก่ ปริมาณโพรไบโอติกที่ได้รับ ควรได้รับในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของโฮสต์ (Sanders M E, 2009) ในงานวิจัยนี้ทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ก่อนและหลังการกระตุ้นให้เป็นเซลล์ไขมันเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ก่อนนำไปทดสอบผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ต่อไป โดยได้ทดสอบ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และเซลล์ 3T3-L1 adipocyte หลังการกระตุ้นให้เป็นเซลล์ไขมันที่เวลา 6 วัน โดยมีเซลล์ที่ไม่เติม lyophilized cell-free supernatant (LCFS) เป็นชุด control จากนั้นวิเคราะห์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Dunnett's multiple range test เปรียบเทียบกับชุด control โดยผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 24 48 ชั่วโมง และ 6 วัน แสดงดังรูปที่ 16

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 104.18, 101.77, 102.10, 109.95, 99.09, 98.09, 99.19, 98.10 และ 94.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 103.53, 103.96, 105.96, 107.63, 108.41, 110.40, 106.37, 99.87 และ 96.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) จากแบบที่เรียกรวดแลคติกที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 100.43, 104.20, 103.90, 104.99, 103.17, 104.74, 100.63., 98.59 และ 97.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 107.52, 106.19, 106.94, 105.74, 118.07, 111.50, 108.92, 96.40 และ 97.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) จากแบบที่เรียกรวดแลคติกที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 94.11–109.95 เปอร์เซ็นต์ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 96.40–118.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด control จึงคัดเลือกความเข้มข้นสูงสุด 5 อันดับที่ไม่ได้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ ได้แก่ ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน ต่อไป

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) จากแบบที่เรียกรวดแลคติกที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 94.72, 97.48, 98.85, 94.42 และ 91.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น



31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 108.28, 102.68, 98.82, 97.43 และ 94.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

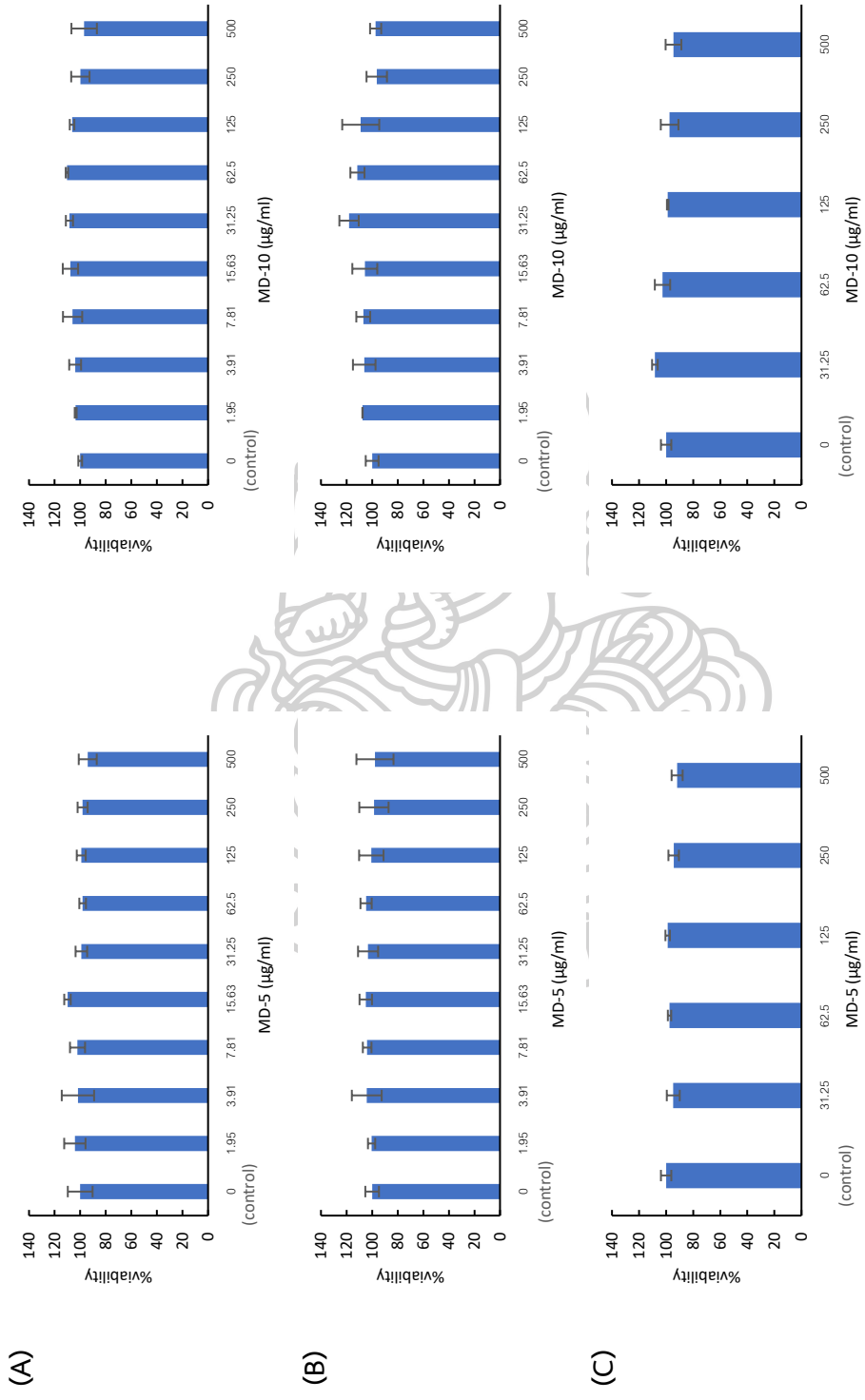
จากผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 91.88–98.85 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 94.56-108.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P>0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control

ที่ผ่านมา มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ก่อนนำไปทดสอบผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ดังรายงานของ Rahman และคณะ (2021) ที่ได้ศึกษาผลของ *B. longum* subsp. *infantis* YB0411 (YB) ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ด้วยวิธี MTT ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า cell-free supernatant ของ YB ที่ความเข้มข้น 1 และ 5  $\mu\text{l/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte และเพิ่มการเจริญของเซลล์เมื่อเทียบกับชุด control (เซลล์ที่ไม่เติม cell-free supernatant) ดังนั้นจึงนำ cell-free supernatant ของ YB ที่ความเข้มข้น 1 และ 5  $\mu\text{l/ml}$  ไปใช้ในศึกษาการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte นอกจากนี้ Kim และคณะ (2020) ได้รายงานการศึกษาผลของ cell-free extract ของ *L. fermentum* MG4231 และ MG4244 ที่ความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ด้วยวิธี MTT ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า cell-free extract ของ *L. fermentum* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ทดสอบที่ความเข้มข้น 10 25 และ 50  $\mu\text{g/ml}$  มีผลไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดยให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P>0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control (เซลล์ที่ไม่เติม cell-free supernatant) ส่วนความเข้มข้น 75 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์โดยให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P<0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control ดังนั้นจึงคัดเลือก cell-free extract ของ

*L. fermentum* MG4231 และ MG4244 ที่ความเข้มข้น 10 25 และ 50  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไปศึกษาการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมัน

ดังนั้นในการทดลองนี้จากการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ด้วยวิธี MTT ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และ 6 วัน ในงานวิจัยนี้ พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ที่ใช้ในการทดสอบ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte โดยให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P>0.05$ ) จึงนำความเข้มข้นดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ต่อไป





**รูปที่ 16** เปรียบเทียบการรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ที่เวลา 24 ชั่วโมง (A); และ 48 ชั่วโมง (B); และเปรียบเทียบกับเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน (C) เมื่อทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไลโอไฟล์ MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03)

## 6.2 ผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte

โรคอ้วน เป็นปัจจัยเสี่ยงหรือสาเหตุของโรคต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อสุขภาพ ซึ่งโรคอ้วนมีสาเหตุหลักมาจากการสะสมไขมันของเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น (Kim et al., 2009 อ้างจาก Kawada et al. 2001; Sharma, 2002) ปัจจุบันมีวิธีการรักษาโรคอ้วนหลากหลายวิธี รวมถึงการใช้ยาสังเคราะห์ซึ่งมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย (กรมการแพทย์, 2553) จึงมีการศึกษาการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ทดแทน โดยในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ภายหลังจากกระตุ้นด้วยการเติม adipogenesis inducers (IBMX, dexamethasone และ insulin) เป็นเวลา 6 วัน โดยมีเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่ไม่เติม lyophilized cell-free supernatant (LCFS) เป็นชุด control และมีเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เติม simvastatin 0.5 และ 1.0  $\mu\text{M}$  เป็นชุด positive control หลังจากการกระตุ้นเซลล์ เซลล์จะมีลักษณะกลมขึ้นและมีเม็ดไขมันสะสมภายในเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ไขมัน (adipocyte) วิเคราะห์การสะสมไขมันในเซลล์ไขมันด้วยวิธีการย้อมด้วยสี Oil Red O วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การลดไขมันสะสม และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Tukey's test โดยเซลล์ 3T3-L1 adipocyte หลังการกระตุ้นด้วย adipogenesis inducers (control) แสดงดังตารางที่ 15 ผลการทดสอบผลของ simvastatin (positive control) แสดงดังตารางที่ 16 และการทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) แสดงดังตารางที่ 17 และ 18 ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ของไขมันสะสมในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte แสดงดังรูปที่ 17

ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลือ 85.01, 69.57, 69.45, 42.45 และ 40.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลือ 64.94, 64.89, 60.37, 48.45 และ 42.08

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0  $\mu\text{M}$  พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลือ 70.29 และ 46.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ในการทดลองนี้ พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  มีเปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลืออยู่ในช่วง 40.96–69.57 เปอร์เซ็นต์ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  เปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลืออยู่ในช่วง 42.08–64.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control

จากงานวิจัยนี้ พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบสามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้ดีที่สุด โดยเปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลือ 40.96 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P > 0.05$ ) กับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  เปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลือ 42.08 เปอร์เซ็นต์ และ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ที่ความเข้มข้น 250  $\mu\text{g/ml}$  เปอร์เซ็นต์ไขมันสะสมมีค่าลดลงเหลือ 42.45 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ Huang และคณะ (2019) ที่คัดแยก *L. plantarum* TCI378 จากกิมจิ พบว่า cell-free metabolites (หรือ cell-free supernatant) จาก *L. plantarum* TCI378 สามารถช่วยลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte ได้ 14 เปอร์เซ็นต์ และลดการแสดงออกของ adipocyte-specific gene ได้ และยังพบว่า TCI378 สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ 48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุด control จากผลการทดสอบเหล่านี้สามารถบ่งชี้ว่า TCI378 อาจมีผลช่วยยับยั้งโรคอ้วน และจากรายงานของ Soundharajan และคณะ (2020) ได้คัดแยก *L. plantarum* A29 จาก alfalfa เมื่อศึกษา cell-free metabolite ของ *L. plantarum* A29 ที่ความเข้มข้น 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ด้วยวิธี MTT ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า cell-free metabolite ของ *L. plantarum* A29 ที่ความเข้มข้น 7.81, 15.63, 31.25 และ 62.5  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดย



ให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P>0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control ส่วนความเข้มข้น 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์โดยให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P<0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control ดังนั้นจึงคัดเลือก cell-free metabolite ของ *L. plantarum* A29 ที่ความเข้มข้นในช่วง 7.81-62.5  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไปศึกษาการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte พบว่า cell-free metabolite ของ *L. plantarum* A29 ที่ความเข้มข้น 12.5 25.0 และ 50  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P<0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control โดยที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบสามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้ดีที่สุด สามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P<0.05$ ) กับความเข้มข้นอื่นและยังสามารถลด adipogenic transcriptional factors (PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  และ C/EBP- $\beta$ ) ที่สำคัญในเซลล์ไขมันได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษา cell-free supernatant ของ *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่น ต่อการลดระดับไขมันในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ดังการศึกษาของ Rahman และคณะ (2021) ที่ได้ศึกษา *B. longum* subsp. *infantis* YB0411 (YB) ต่อการลดระดับไขมันในเซลล์ไขมัน พบว่า cell-free supernatant ของ YB ที่ความเข้มข้น 1 และ 5  $\mu\text{l/ml}$  สามารถลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P<0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุด control

โดยสาเหตุที่ *Lactobacillus* สามารถยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้อาจเนื่องมาจากสารเมแทบอลิต์ที่ *Lactobacillus* สร้างขึ้น ได้แก่ 1) Linoleic acid และสารเมแทบอลิต์ของ linoleic acid ที่มีผลต่อโรคอ้วนและสภาวะสมดุลของพลังงานของโฮสต์ ผ่านการกระตุ้น PPAR $\gamma$  pathway 2) Gamma-aminobutyric acid (GABA) ที่สามารถลดการสะสมเนื้อเยื่อไขมันได้ และ 3) short-chain fatty acids (SCFAs) ที่สามารถควบคุมการสังเคราะห์ไขมันได้ผ่าน AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway โดยไปยับยั้งการทำงานของ transcriptional factors ในกระบวนการ adipogenesis (Shen et al., 2022 อ้างจาก Lu et al., 2016; Goto et al., 2015; Patterson et al., 2019)

ตารางที่ 15 เซลล์ไขมัน 3T3-L1 หลังการกระตุ้นด้วยสารเติม adipogenesis inducers (control) และเซลล์ไม่ได้รับการกระตุ้น (undifferentiated) ที่เวลา 6 วัน

	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Oil red O staining
control					
undifferentiated					

ตารางที่ 16 การทดสอบผลของ simvastatin (positive control) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1

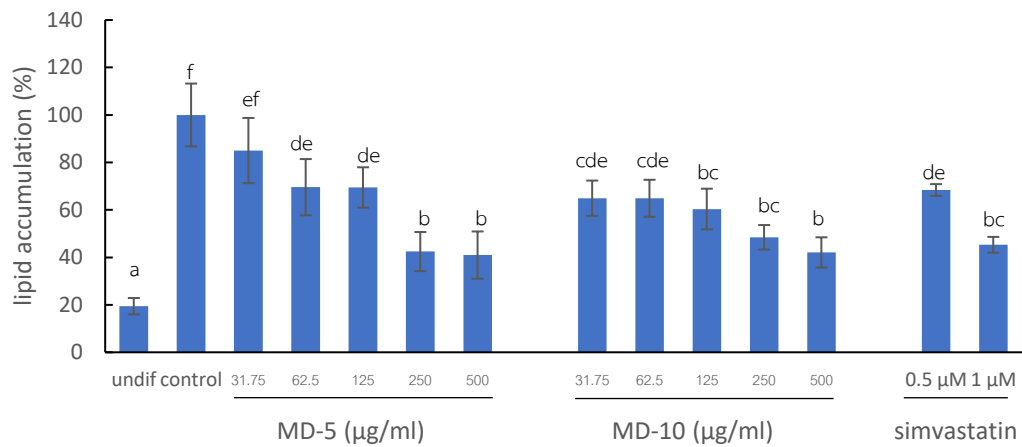
	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Oil red O staining
simvastatin					
0.5 $\mu$ M					
1.0 $\mu$ M					

ตารางที่ 17 การทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1

MD-5	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Oil red O staining
31.75 µg/ml					
62.5 µg/ml					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					

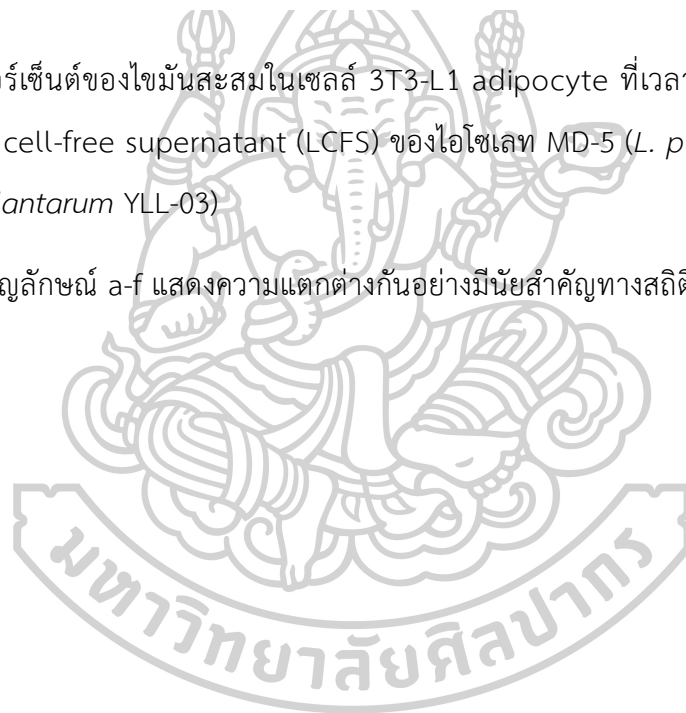
ตารางที่ 18 การทดสอบผลของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1

MD-10	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Oil red O staining
31.75 µg/ml					
62.5 µg/ml					
125 µg/ml					
250 µg/ml					
500 µg/ml					



รูปที่ 17 เปอร์เซ็นต์ของไขมันสะสมในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่เวลา 6 วัน เมื่อทดสอบกับ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03)

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ a-f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $P < 0.05$ )





## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งหมดจำนวน 7 ตัวอย่าง และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างท่อน และรูปร่างกลมรี เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene สามารถระบุสายพันธุ์ได้เป็น *Lactobacillus* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2), MD-5 (*L. plantarum* 3335), MD-9 (*L. rhamnosus* HDB1311), MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) และ MD-11 (*L. casei* F4S1) *Lacticaseibacillus* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), MD-6 (*Lacti. paracasei* W1-D-5) และ (*Lacti. rhamnosus* 2795) และ *Streptococcus* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ MD-2 (*S. thermophilus* 3284), MD-4 (*S. thermophilus* 3504) และ MD-8 (*S. thermophilus* 4079) จากนั้นเพื่อให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก จึงนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียอ้างอิง 2 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* TISTR 2365 และ *L. curvatus* TISTR 938) โดยทดสอบความสามารถทนต่อกรดและเกลือแร่ เนื่องจากกรดที่โพรไบโอติกจะให้ผลที่เป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ได้นั้นต้องสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะอาหารและลำไส้ และมีปริมาณเพียงพอที่จะไปถึงลำไส้ใหญ่จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถทนกรดที่ pH 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 16.35-85.77 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) และ *L. curvatus* TISTR 938 โดย *L. acidophilus* TISTR 2365 สามารถทนต่อกรดได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 85.77 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการทดสอบทนต่อเกลือแร่ พบว่า *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* และ *Streptococcus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถทนต่อเกลือแร่ (0.3% w/v) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 8.86-99.50 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นไอโซเลท MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH2), MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442) และ MD-4 (*S. thermophilus* 3504) โดย MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถทนต่อเกลือแร่ (0.3% w/v) ได้ดีที่สุดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 99.50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดและเกลือซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะมีกลไกต่าง ๆ เพื่อปรับตัวให้มีชีวิตรอด นอกจากกรดและเกลือแร่ในระบบทางเดิน



อาหารแล้ว ยาปฏิชีวนะที่ร่างกายได้รับเข้าไปยังมีส่วนส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในลำไส้อีกด้วย จึงศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole, vancomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ ampicillin พบว่า *Lactobacillus* และ *Lactocaseibacillus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ gentamycin, sulfamethoxazole และ vancomycin ได้ ยกเว้น MD-1 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CH 2) และ *L. acidophilus* TISTR 2365 โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ดีกว่าทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ 6 ชนิด ได้แก่ gentamycin, sulfamethoxazole, vancomycin, penicillin, clindamycin และ tetracycline ทั้งนี้การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจเนื่องมาจาก แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์มีการต้านทานยาปฏิชีวนะแบบ intrinsic resistance หรือมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ผนังเซลล์เพื่อลดการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะได้ จากนั้นศึกษาประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า supernatant ของ MD-3 (*Lacti. rhamnosus* 442), 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* 3335), และ MD-11 (*L. casei* F451) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 1287, *S. aureus* TISTR 885 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* 3335) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้ดีที่สุดใน อาจเนื่องมาจากสารเมแทบอลิไตใน supernatant ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้ supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถต้านอนุมูลอิสระได้โดยมีค่า DPPH scavenging activity (%) อยู่ในช่วง 83.76-91.81 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้เท่ากับ 91.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกรณีที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ โดยใช้กลไก radical scavenging ที่สามารถทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

จากการศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ร่วมกับแบคทีเรียอ้างอิง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก จึงนำมาทดสอบผลต่อการลดระดับ

คอเลสเทอรอล โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ซึ่งโพรไบโอติกที่สร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ได้จะสามารถลดคอเลสเทอรอลในร่างกายได้ผ่านการย่อยเกลือน้ำดี เนื่องจากคอเลสเทอรอลเป็นสารตั้งต้นของเกลือน้ำดี จึงส่งผลให้ลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือดได้ โดยจากการศึกษาพบว่า มีเพียงไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) เท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase ได้ และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้อยู่ในช่วง 14.92–82.70 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) สามารถลดระดับคอเลสเทอรอลได้ดีที่สุด (82.70 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดระดับคอเลสเทอรอลได้เท่ากับ 70.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการลดลงของระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองอาจเกิดจาก *lactobacillus* สามารถ assimilate คอเลสเทอรอลในหลอดทดลองระหว่างการเจริญได้ จึงคัดเลือก MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ไปศึกษาเพิ่มเติมพบว่าทั้งสองไอโซเลทสามารถเจริญในอาหาร MRS ที่เสริมด้วย 0.3% (w/v) ox gall และ cholesterol-PEG 600 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอลในอาหาร MRS ลดลง แต่พบเปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอลสะสมที่เซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้น อาจกล่าวได้ว่า cell pellet ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบมีความสามารถในการ assimilate คอเลสเทอรอลได้

จากผลการทดสอบความสามารถในการลดระดับคอเลสเทอรอลข้างต้น พบว่า ไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) สามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในหลอดทดลองได้ดีกว่าทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ จึงคัดเลือกมาศึกษาความเป็นพิษและการยับยั้งการสะสมไขมันต่อเซลล์ไขมัน 3T3-L1 preadipocyte โดยการทดสอบหาความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่เวลา 24 48 ชั่วโมง และ 6 วัน พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของทั้งสองไอโซเลทที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte และเมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบผลต่อไขมันสะสมในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte พบว่า lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ของไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) มีผลในการลดไขมันสะสมลงเหลือ 40.96–69.57 เปอร์เซ็นต์ และ 42.08–64.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไขมันสะสมมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ lyophilized cell-free supernatant (LCFS) ที่เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากสารเมแทบอลิต์ ใน cell-free supernatant ที่

*Lactobacillus* สร้างขึ้นสามารถควบคุม transcriptional factors ภายในเซลล์ได้ ซึ่งจะไปยังยั้งการแสดงออกของ adipocyte-specific gene ส่งผลให้มีการสร้าง fat droplet ภายในเซลล์ลดลง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท MD-5 (*L. plantarum* 3335) และ MD-10 (*L. plantarum* YLL-03) ที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติโปรไบโอติก มีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลในหลอดทดลอง และสามารถลดไขมันสะสมในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ได้

#### ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นแนวทางในการนำไปศึกษาต่อไป เช่น ศึกษาการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ (anti-adipogenesis) ร่วมกับพรไบโอติก ศึกษาการลดไขมันในเซลล์ (thermogenesis) และศึกษาในสัตว์ทดลอง เป็นต้น เพื่อพัฒนาในการใช้ร่วมกับยาสังเคราะห์สำหรับภาวะเมแทบอลิกซินโดรมต่อไป



## รายการอ้างอิง

กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2553). แนวทางเวชปฏิบัติการป้องกันและดูแลรักษาโรคอ้วน.

กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ธารทิพย์ บุญส่ง. (2559). ผลของสารสกัดจากข้าวกล้องงอกต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 ของหนู. กรุงเทพฯ: ฐานข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานภาครัฐด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

ปานทิพย์ จีวีรี, พูลสุข หิงคานนท์ และดวงพร ปิยะคง. (2559). บทควมวิจัยการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการปฏิบัติการดูแลตนเองของกลุ่มเสี่ยงเมตาบอลิกซินโดรมและผู้ป่วยกลุ่มอาการเมตาบอลิกซินโดรม. *วารสารการพยาบาลและสุขภาพ*, 10(3), 159-167.

มาลัย ทวีโชติภักดิ์. (2553). โพรไบโอติกและการติดเชื้อในทางเดินอาหาร. *Journal of Science and Technology*, 2(4), 25-38.

มูฮัมหมัดริฎวาน สมานูร์ตัน. (2557). การยับยั้งแบคทีเรียของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทอนอุมหมิต่า. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 88 หน้า

สมคิด ดีจริง และอรุณี คงดี. (2556). การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรงเพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ. รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่. 91 หน้า.

อรรถเกียรติ และคณะ. (2562). รายงานสถานการณ์โรค NCDs เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้อง พ.ศ. 2562. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนดดีไซน์.

Abo-Amer, A. E. (2007). Characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made yogurt. *ScienceAsia*, 33(3), 313-319.

Al-Saleh, A., Metwalli, A., and Abu-Tarboush, H. (2006). Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Saudi Society for Food and Nutrition*, 1, 1-17.

Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., and Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 92(6-7), 229-236.

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.
- American Type Culture Collection (ATCC). (2021). 3T3-L1. Accessed December 20,2021. Available from <https://www.atcc.org/products/cl-173>
- Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., and Sriganesh, S. (2016). In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S6-S10.
- Atlas of plant and animal histology. (2021). Unilocular adipocyte. Accessed January 15, 2022. Available from <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/adipocito-blanco.php>
- 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.
- Ayyash, M. M., Abdalla, A. K., AlKalbani, N. S., Baig, M. A., Turner, M. S., Liu, S.-Q., and Shah, N. P. (2021). Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products-Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8363-8379.
- Baoglu Aydas, S. S., and Aslim, B. (2015). The cholesterol-lowering effects of probiotic bacteria on lipid metabolism. *Probiotics Prebiotics and Synbiotics Bioactive Foods in Health Promotion* (pp.701-722), Elsevier.
- Bachmann, V., Kostiuik, B., Unterweger, D., Diaz-Satizabal, L., Ogg, S., and Pukatzki, S. (2015). Bile salts modulate the mucin-activated type VI secretion system of pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0004031.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., and Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-701.
- Belarbi, F. (2011). *Isolement et selection des souches de bacteries lactiques productrices des metabolites antibacteriens* (Doctoral dissertation). Oran 1 University, Es Seni.
- Biology reader (2023). Colony Morphology of Bacteria. Accessed April 20, 2023.



- Available from <https://biologyreader.com/colony-morphology-of-bacteria.html>
- Budreviciute, A., Damiani, S., Sabir, D. K., Onder, K., Schuller-Goetzburg, P., Plakys, G., Katileviciute, A., Khoja, S., and Kodzius, R. (2020). Management and prevention strategies for non-communicable diseases (NCDs) and their risk factors. *Frontiers in Public Health*, 788.
- 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.
- 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.
- Cherdchom, S., Sereemasapun, A., and Kongruttanachok, N. (2019). Emerging knowledge of beige adipocyte biology. *Chulalongkorn Medical Bulletin*, 1(1), 93-111.
- Chiang, Y.-R., Ismail, W., Heintz, D., Schaeffer, C., Van Dorselaer, A., and Fuchs, G. (2008). Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 905-914.
- Cho, J.-K., Lee, C.-H., Chai, Y.-G., Ha, Y.-A., and Shin, S.-H. (2006). Cholesterol lowering effect of Lactobacillus plantarum isolated from human feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16(8), 1201-1209
- Cho, S. S., and Finocchiaro, T. (2009). *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients* (1<sup>st</sup> ed.). Boca Raton: CRC press.

- Choi, W. J., Dong, H. J., Jeong, H. U., Ryu, D. W., Song, S. M., Kim, Y. R., Jung, H. H., Kim, T. H., and Kim, Y.-H. (2020). *Lactobacillus plantarum* LMT1-48 exerts anti-obesity effect in high-fat diet-induced obese mice by regulating expression of lipogenic genes. *Scientific Reports*, 10(1), 869.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eighth Informational Supplement. CLSI Document M100-S28.
- Craig M., Yarrarapu S. N. S., and Dimri M. (2021). Biochemistry, Cholesterol. Accessed January 10, 2022. Available from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>
- 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.
- Dashkevicz, M. P., and Feighner, S. D. (1989). Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 11-16.
- De Giani, A., Bovio, F., Forcella, M., Fusi, P., Sello, G., and Di Gennaro, P. (2019). Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. *AMB Express*, 9(1), 1-11.
- De Vuyst, L., and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Microbial Physiology*, 13(4), 194-199.
- Deghorain, M., Goffin, P., Fontaine, L., Mainardi, J.-L., Daniel, R., Errington, J., Hallet, B., and Hols, P. (2007). Selectivity for D-lactate incorporation into the peptidoglycan precursors of *Lactobacillus plantarum*: role of Aad, a VanX-like D-alanyl-D-alanine dipeptidase. *Journal of Bacteriology*, 189(11), 4332-4337.
- Dominiczak, M. H., and Caslake, M. J. (2011). Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annals of Clinical Biochemistry*, 48(6), 498-515.
- Du, J., Zhao, L., Kang, Q., He, Y., and Bi, Y. (2023). An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. *Adipocyte*, 12(1), 2179334.
- 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.
- Eisenberg, D. A. (1998). Cholesterol lowering in the management of coronary artery disease: the clinical implications of recent trials. *The American Journal of Medicine*, 104(2), 2S-5S.
- Evans, R. M., Barish, G. D., and Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, 10(4), 355-361.
- Faghfoori, Z., Gargari, B. P., Saber, A., Seyyedi, M., and Khosroushahi, A. Y. (2017). The investigation of the diversity of *Lactobacilli* spp. and assessment their some probiotic properties in traditional dairy products in East Azerbaijan province in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16(4), 1538.
- Fang, C., Kim, H., Noratto, G., Sun, Y., Talcott, S. T., and Mertens-Talcott, S. U. (2018). Gallotannin derivatives from mango (*Mangifera indica* L.) suppress adipogenesis and increase thermogenesis in 3T3-L1 adipocytes in part through the AMPK pathway. *Journal of Functional Foods*, 46, 101-109.
- Fukushima, M., Yamada, A., Endo, T., and Nakano, M. (1999). Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on  $\delta 6$ -desaturase activity in the livers of rats fed a fat-and cholesterol-enriched diet. *Nutrition*, 15(5), 373-378.
- 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.
- Ghatani, K., and Tamang, B. (2017). Assessment of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from fermented yak milk products of Sikkim, India: Chhurpi, Shyow, and Khachu. *Food Biotechnology*, 31(3), 210-232.
- Gilliland, S., Staley, T., and Bush, L. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67(12), 3045-3051.
- Goto, T., Kim, Y.-I., Furuzono, T., Takahashi, N., Yamakuni, K., Yang, H.-E., Li, Y., Ohue, R., Nomura, W., Sugawara, T., Rina, Y., Kitamura, N., Park, S. B., Kishino, S., Ogawa, J.,

- and Sugawara, T. (2015). 10-oxo-12 (Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR $\gamma$  and stimulates adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(4), 597-603.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. d. A. F., and Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455-470.
- Grill, J., Cayuela, C., Antoine, J., and Schneider, F. (2000). Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 31(2), 154-156.
- Grundy, S. M. (2004). Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2595-2600.
- Grundy, S. M., Brewer Jr, H. B., Cleeman, J. I., Smith Jr, S. C., and Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109(3), 433-438.
- Guan, N., and Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 51-65.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C., and Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 202.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., and Khosroushahi, A. Y. (2014). Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac 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.
- Harjadi, K. R., Ishida, M., Nishi, K., Sugahara, T., and Putra, A. B. N. (2022). Water and ethanol extracts of tamarind (*Tamarindus indica*) suppress lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Canrea Journal: Food Technology, Nutritions, and Culinary*

*Journal*, 1-11.

- Harvard University. (2014). Fat vs. sugar: who will break your heart. Accessed January 15, 2022. Available from <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2014/fat-vs-sugar-who-will-break-your-heart/>
- Hernández-Gómez, J. G., López-Bonilla, A., Trejo-Tapia, G., Ávila-Reyes, S. V., Jiménez-Aparicio, A. R., and Hernández-Sánchez, H. (2021). *In vitro* bile salt hydrolase (BSH) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods*, 10(3), 674.
- Hong, Y.-H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., Tsuzuki, H., Miyahara, H., Gotoh, C., Choi, K. C., Feng, D. D., Chen, C., Lee, H. G., Katoh, K., Roh, S. G., and Sasaki S. (2005). Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*, 146(12), 5092-5099.
- Horáčková, Š., Plocková, M., and Demnerová, K. (2018). Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction. *Biotechnology Advances*, 36(3), 682-690.
- Hosono, A. (1999). Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasserii* strains. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 243-248.
- Hotel, A. C. P., and Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10.
- Huang, C.-H., Ho, C.-Y., Chen, C.-T., Hsu, H.-F., and Lin, Y.-H. (2019). Probiotic BSH activity and anti-obesity potential of *Lactobacillus plantarum* strain TCI378 isolated from Korean Kimchi. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(4), 434.
- Janda, J. M., and Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Kawada, T., Takahashi, N., and Fushiki, T. (2001). Biochemical and physiological characteristics of fat cell. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47(1), 1-12.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.



- Khamchata, L., Dumrongpakapakorn, P., and Theeranut, A. (2018). Metabolic syndrome: Dangerous signs required management. *Srinagarind Medical Journal*, *33*(4), 386-395.
- Kim, E. J., Kang, Y. I., Bang, T. I., Lee, M. H., Lee, S. W., Choi, I. S., Song, C. S., Lee, J. B., and Park, S. Y. (2016). Characterization of *Lactobacillus reuteri* BCLR-42 and *Lactobacillus plantarum* BCLP-51 as novel dog probiotics with innate immune enhancing properties. *Korean Journal of Veterinary Research*, *56*(2), 75-84.
- Kim, H. J., Lee, I.-S., and Kang, S. S. (2006). Cholesterol biosynthesis inhibitors of microbial origin. *Studies in Natural Products Chemistry*, *33*, 751-784.
- Kim, M., Furuzono, T., Yamakuni, K., Li, Y., Kim, Y. I., Takahashi, H., Ohue-Kitano, R., Jheng, H. F., Takahashi, N., Kano, Y., Yu, R., Kishino, S., Ogawa, J., Uchida, K., Yamazaki, J., Tominaga, Makoto, T., Kawada, T., and Goto, T. (2017). 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. *The FASEB Journal*, *31*(11), 5036-5048.
- Kim, M.-J., Chang, U.-J., and Lee, J.-S. (2009). Inhibitory effects of fucoidan in 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Marine Biotechnology*, *11*, 557-562.
- Kim, S., Choi, S.-I., Jang, M., Jeong, Y., Kang, C.-H., and Kim, G.-H. (2020). Anti-adipogenic effect of *Lactobacillus fermentum* MG4231 and MG4244 through AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Food Science and Biotechnology*, *29*, 1541-1551.
- Kim, S. H., and Plutzky, J. (2016). Brown fat and browning for the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Diabetes and Metabolism Journal*, *40*(1), 12-21.
- Kishino, S., Takeuchi, M., Park, S.-B., Hirata, A., Kitamura, N., Kunisawa, J., Kiyono, H., Iwamoto, R., Isobe, Y., Arita, M., Arai, H., Ueda, K., Shima, J., Takahashi, S., Yokozeki, K., Shimizu, S., and Ogawa, K. (2013). Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(44), 17808-17813.
- Kongjarern, S. (2017). Obesity: silent killer in the digital era. *EAU Heritage Journal Science and Technology*, *11*(3), 22-29.

- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635-643.
- Korhonen, J. (2010). *Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria*. Joensuu: Eastern Finland University Library.
- Kraus, N. A., Ehebauer, F., Zapp, B., Rudolphi, B., Kraus, B. J., & Kraus, D. (2016). Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*, 5(4), 351-358.
- Krnjević, K., and Schwartz, S. (1966). Is  $\gamma$ -aminobutyric acid an inhibitory transmitter? *Nature*, 211, 1372-1374.
- 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.
- Kumar, A., Kumar, M., Ghosh, M., and Ganguli, A. (2013). Modeling in vitro cholesterol reduction in relation to growth of probiotic *Lactobacillus casei*. *Microbiology and Immunology*, 57(2), 100-110.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., and Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
- Kumar, R., Grover, S., and Batish, V. K. (2012). Bile salt hydrolase (Bsh) activity screening of Lactobacilli: in vitro selection of indigenous Lactobacillus strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 162-172.
- Lee, C. S., Park, M. H., and Kim, S. H. (2022). Selection and characterization of probiotic bacteria exhibiting antiadipogenic potential in 3T3-L1 preadipocytes. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 72-86.
- Lee, H.-Y., Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., Kim, D. J., Lee, K. E., Park, K. S., Lee, Y. and Park, J. H. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus*

- PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(7), 736-744.
- Lee, J., Yang, W., Hostetler, A., Schultz, N., Suckow, M. A., Stewart, K. L., Kin, D. D., and Kim, H. S. (2016). Characterization of the anti-inflammatory *Lactobacillus reuteri* BM36301 and its probiotic benefits on aged mice. *BMC Microbiology*, 16(1), 1-13.
- Li, G. (2012). Intestinal probiotics: interactions with bile salts and reduction of cholesterol. *Procedia Environmental Sciences*, 12, 1180-1186.
- Li, P., Gu, Q., Yang, L., Yu, Y., and Wang, Y. (2017). Characterization of extracellular vitamin B12 producing *Lactobacillus plantarum* strains and assessment of the probiotic potentials. *Food Chemistry*, 234, 494-501.
- Li, Y., Li, L., Kromann, S., Chen, M., Shi, L., and Meng, H. (2019). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus thermophilus* isolated from Chinese fermented milk products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(3), 221-228.
- Lim, P., Loke, C., Ho, Y., and Tan, H. (2020). Cholesterol homeostasis associated with probiotic supplementation *in vivo*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1374-1388.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., and Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2358.
- Lu, Y., Fan, C., Li, P., Lu, Y., Chang, X., and Qi, K. (2016). Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating G protein-coupled receptors and gut microbiota. *Scientific Reports*, 6(1), 37589.
- Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M. G., and Davies, J. M. (2005). Plasma membrane H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology*, 151(6), 1995-2003.
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., and Ali, F. (2019). Evaluation of the *in vitro* cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856. *International Journal of Food Science and*

*Technology*, 54(1), 212-220.

- 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.
- Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., and Khan, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 91-98.
- MilliporeSigma. (2023). Oil Red O. Accessed April 15, 2023. Available from <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sial/o0625>
- Miremadi, F., Ayyash, M., Sherkat, F., and Stojanovska, L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Journal of Functional Foods*, 9, 295-305.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., and Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 6463-6472.
- Motey, G. A., Owusu-Kwarteng, J., Obiri-Danso, K., Ofori, L. A., Ellis, W. O., and Jespersen, L. (2021). *In vitro* properties of potential probiotic lactic acid bacteria originating from Ghanaian indigenous fermented milk products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-13.
- 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* 5BL. *Microbiology and Immunology*, 58(9), 492-502.
- Nami, Y., Bakhshayesh, R. V., Manafi, M., and Hejazi, M. A. (2019). Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic *Lactobacillus plantarum* YS5 isolated from yogurt. *Food Science and Technology*, 111, 876-882.
- Nicolucci, A. C., Hume, M. P., Martínez, I., Mayengbam, S., Walter, J., and Reimer, R. A. (2017). Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. *Gastroenterology*, 153(3), 711-722.
- Nivoliez, A., Camares, O., Paquet-Gachinat, M., Bornes, S., Forestier, C., and Veisseire, P.

- (2012). Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Journal of Biotechnology*, 160(3-4), 236-241.
- Noh, D., Kim, S. H., and Gilliland, S. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3107-3113.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- Oliveira, R. B., Oliveira, A. d. L., and Glória, M. B. A. (2008). Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 368-374.
- Ooi, L.-G., and Liong, M.-T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2499-2522.
- Org, E., Blum, Y., Kasela, S., Mehrabian, M., Kuusisto, J., Kangas, A. J., Soininen, P., Wang, Z., Ala-Korpela, M., Hazen, S. L., Laakso, M., and Lusi, A. (2017). Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biology*, 18, 1-14.
- Park, D.-Y., Ahn, Y.-T., Huh, C.-S., Jeon, S.-M., and Choi, M.-S. (2011). The inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* KY1032 cell extract on the adipogenesis of 3T3-L1 Cells. *Journal of Medicinal Food*, 14(6), 670-675.
- Park, J. E., Oh, S. H., and Cha, Y. S. (2014). *Lactobacillus brevis* OPK-3 isolated from kimchi inhibits adipogenesis and exerts anti-inflammation in 3T3-L1 adipocyte. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2514-2520.
- Patterson, E., Ryan, P. M., Wiley, N., Carafa, I., Sherwin, E., Moloney, G., Franciosi, E., Mandal, R., Wishart, D. S., Tuohy, K., Ross, R. P., Cryan, J. F., Dinan, T. G., and Stanton, C. (2019). Gamma-aminobutyric acid-producing lactobacilli positively affect metabolism and depressive-like behaviour in a mouse model of metabolic syndrome. *Scientific Reports*, 9(1), 16323.
- Paul, A. (2018). *Adipose Tissue Heterogeneity-Development and Application of*



- Nonlinear Microscopy Methods*. Sweden: Chalmers University of Technology.
- 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.
- 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.
- Rabalert, J., Munkong, N., Parklak, W., and Lerdvuthisophon, N. (2016). Effects of rice bran oil on lipid accumulations on 3T3-L1 cells. *Thammasat Medical Journal*, 16(3), 447-455.
- Rahayu, E., Rusdan, I., Athennia, A., Kamil, R., Pramesi, P., Marsono, Y., Utami, T., and Widada, J. (2019). Safety assessment of indigenous probiotic strain *Lactobacillus plantarum* Dad-13 isolated from dadih using sprague dawley rats as a model. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 14, 38-47.
- Rahman, M. S., Kang, I., Lee, Y., Habib, M. A., Choi, B. J., Kang, J. S., Park, D. S., and Kim, Y. S. (2021). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* YB0411 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes and reduces high-fat-diet-induced obesity in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(21), 6032-6042.
- Rajoka, M. S. R., Zhao, H., Mehwish, H. M., Li, N., Lu, Y., Lian, Z., Shao, D., Jin, M., Li, Q., Zhao, L., 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.
- 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., Paula, A., Casarotti, S., and Penna, A. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4, 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-Miguez, A., Lourenco, A., Sanchez, 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.
- Ruiz-Ojeda, F. J., Rupérez, A. I., Gomez-Llorente, C., Gil, A., and Aguilera, C. M. (2016). Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1040.
- Sanders, M. E. (2009). How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Functional Food Reviews*, 1(1), 3-12.
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361s-364s.
- Shabayek, S., and Spellerberg, B. (2017). Acid stress response mechanisms of group B streptococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 395.
- Sharma, A. (2002). Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *International Journal of Obesity*, 26(4), S5-S7.
- Sharma, C., Gulati, S., Thakur, N., Singh, B. P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S. K., Puniya, A. K., Gill, J. P. S., and Panwar, H. (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech*, 7, 1-14.
- 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.

- Shehata, M., El Sohaimy, S., El-Sahn, M. A., and Youssef, M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.
- Shen, Y. L., Zhang, L. Q., Yang, Y., Yin, B. C., Ye, B. C., and Zhou, Y. (2022). Advances in the role and mechanism of lactic acid bacteria in treating obesity. *Food Bioengineering*, 1(1), 101-115.
- 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.
- Sjovall, J. (1959). On the concentration of bile acids in the human intestine during absorption. Bile acids and steroids 74. *Acta Physiologica Scandinavica*, 46, 339-345.
- Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć, P., and Śliżewska, W. (2021). The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers*, 13(1), 20.
- Sorrenti, V., Randazzo, C. L., Caggia, C., Ballistreri, G., Romeo, F. V., Fabroni, S., Timpanaro, N., Raffaele, M. L., and Vanella, L. (2019). Beneficial effects of pomegranate peel extract and probiotics on pre-adipocyte differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 660.
- Soundharajan, I., Kuppusamy, P., Srisesharam, S., Lee, J. C., Sivanesan, R., Kim, D., and Choi, K. C. (2020). Positive metabolic effects of selected probiotic bacteria on diet-induced obesity in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *The FASEB Journal*, 34(9), 12289-12307.
- Stefanovic-Racic, M., Perdomo, G., Mantell, B. S., Sipula, I. J., Brown, N. F., and O'Doherty, R. M. (2008). A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(5), E969-E977.

- 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.
- Sugimoto, R., Ishibashi-Ohgo, N., Atsuji, K., Miwa, Y., Iwata, O., Nakashima, A., and Suzuki, K. (2018). Euglena extract suppresses adipocyte-differentiation in human adipose-derived stem cells. *PLoS One*, 13(2), e0192404.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M. Y., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., and Nateghi, L. (2011). Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, 42, 642-649.
- Tanwi, P., Sashank, M., and Kishwar Hayat, K. (2013). Cholesterol: genetic, clinical and natural implications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
- 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, 571-576.
- Vasiljevic, T., and Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M. E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., Wright, A. V., Vignolo, G., and Plumed-Ferrer, C. (2016). Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 288-294.
- Wang, L.-C., Pan, T.-M., and Tsai, T.-Y. (2018). Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 973-984.
- Wen, H., and Park, K. (2011). *Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice*. New Jersey: John Wiley and Sons.
- WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (2000). Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. World Health Organization. 252p.
- Yadav, R., Puniya, A. K., and Shukla, P. (2016). Probiotic properties of *Lactobacillus*

*plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1683.

- Yang, Y., Kadim, M. I., Khoo, W. J., Zheng, Q., Setyawati, M. I., Shin, Y. J., Lee, S. C., Yuk, H., 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.
- Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., and Lv, J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 5(29), 5194-5201.
- Zhang, S., Oh, J.-H., Alexander, L. M., Özçam, M., and van Pijkeren, J.-P. (2018). d-Alanyl-d-alanine ligase as a broad-host-range counterselection marker in vancomycin-resistant lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 200(13), e00607-00617.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandame, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Ganzle, M. G., and Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus bejerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.



## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเซลล์

#### 1. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

##### 1.1 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

##### 1.2 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

MRS broth media	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 เขย่าภาชนะที่ใส่อาหารเพื่อให้วุ้นที่ตกตะกอนกระจาย

ตัวก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20-25 มิลลิลิตร รอนอาหารแข็งตัว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 MRS agar เสริมด้วย 0.5% (w/v) taurodeoxycholic acid sodium salt (TDCA)

และ  $\text{CaCl}_2$

MRS broth media 16.54 กรัม

TDCA 1.50 กรัม

$\text{CaCl}_2$  0.11 กรัม

Agar 4.50 กรัม

น้ำกลั่น 300.00 มิลลิลิตร

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

1.4 MRS broth เสริมด้วย 0.3% (w/v) ox gall และ cholesterol-PEG 600 (100

$\mu\text{g/ml}$ )

Freshly MRS broth 100.00 มิลลิลิตร

Ox gall 0.30 กรัม

cholesterol-PEG 600 0.01 กรัม

ละลายส่วนประกอบของอาหาร จากนั้นนำไปกรองด้วยแผ่นกรองสาร (0.45  $\mu\text{m}$  filter)

ควรเตรียมและใช้ทันที

1.5 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

## 1.6 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 รอจนอาหารแข็งตัวจากนั้น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2. อาหารเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte

2.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic (penicillin/streptomycin)

DMEM (ละลายใน ultrapure water)	180.00 มิลลิลิตร
Fetal bovine serum (FBS)	20.00 มิลลิลิตร
Penicillin [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	0.20 มิลลิลิตร
Streptomycin [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	0.20 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าด้วยกัน แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.6 ด้วย Sodium bicarbonate จากนั้นกรองด้วยตัวกรองที่มีกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 Adipogenesis inducers (อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1  $\mu\text{M}$  dexamethasone (DEX) และ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin)

DMEM (FBS+antibiotic)	100 มิลลิลิตร
IBMX [0.5 M]	0.10 มิลลิลิตร
DEX [1 mM]	0.10 มิลลิลิตร
Insulin [10 mg/ml]	0.10 มิลลิลิตร

**ภาคผนวก ข**  
**การเตรียมสารเคมี**

**1. สารเคมีสำหรับแบคทีเรีย**

1.1 *O*-phthalaldehyde (0.5 mg/ml)

O-phthalaldehyde	0.05 กรัม
Glacial acetic acid	100 มิลลิลิตร

ละลาย *O*-phthalaldehyde ในน้ำ Glacial acetic acid ผสมให้เข้ากันและควรใช้ทันที

1.2 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

1.3 PBS buffer ที่เสริมด้วย 0.3% bile salt

PBS buffer	100.00 มิลลิลิตร
Bile salt	0.3 กรัม

ละลาย Bile salt ลง ใน PBS buffer ผสมให้เข้ากันและเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง

1.4 33% (w/v) Potassium Hydroxide (KOH)

Potassium Hydroxide (KOH)	33.00 กรัม
น้ำกลั่น	100.00 มิลลิลิตร

ละลาย Potassium Hydroxide ในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน และเก็บสารเคมีที่

อุณหภูมิห้อง

1.5 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 (ทำขั้นตอนนี้ในตู้ดูดควัน) ผสมให้เข้ากันและปรับให้มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารเย็นลง เก็บสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง

## 2. สารเคมีสำหรับเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte

### 2.1 DEX (dexamethasone) [0.5 M]

DEX	0.0333 กรัม
98% Ethanol	0.10 มิลลิลิตร
DMEM	0.90 มิลลิลิตร

ละลาย DEX ลงใน 98% Ethanol ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม DMEM และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง เก็บสารเคมีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2.2 4% formaldehyde

37% formaldehyde	10.81 มิลลิลิตร
Ultrapure water	89.19 มิลลิลิตร

เจือจาง 37% formaldehyde ลงใน Ultrapure water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง

### 2.3 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) [0.5 M]

IBMX	0.0333 กรัม
DMSO	0.30 มิลลิลิตร

ละลาย IBMX ลงใน DMSO ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2.4 60% isopropanol

100% isopropanol	60.00 มิลลิลิตร
Ultrapure water	40.00 มิลลิลิตร



เจือจาง 100% isopropanol ลงใน Ultrapure water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง

2.5 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [5 mg/ml]

MTT	0.05 กรัม
1XPBS	10.00 มิลลิลิตร

ละลาย MTT ลงใน PBS ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วยแผ่นกรองสาร (0.22  $\mu\text{M}$  filter) และเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเก็บเกิน 1 สัปดาห์)

2.6 Oil Red O staining

Oil Red O	6.00 มิลลิลิตร
Ultrapure water	4.00 มิลลิลิตร

เจือจาง Oil Red O ลงใน Ultrapure water ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman) ควรเตรียมและใช้ทันที (ใช้ภายใน 20 นาที)

2.7 Penicillin [100  $\mu\text{g/ml}$ ]

Penicillin	0.50 กรัม
Ultrapure water	5.00 มิลลิลิตร

ละลาย Penicillin ลงใน Ultrapure water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วยแผ่นกรองสาร (0.22  $\mu\text{M}$  filter) และเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.8 Simvastatin [10 mM]

Simvastatin	0.0013 กรัม
DMSO	0.30 มิลลิลิตร

ละลาย Simvastatin ลงใน DMSO ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บสารเคมีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.9 Streptomycin [100  $\mu\text{g/ml}$ ]

Streptomycin	0.50 กรัม
Ultrapure water	5.00 มิลลิลิตร

ละลาย Streptomycin ลงใน Ultrapure water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วย  
แผ่นกรองสาร (0.22  $\mu\text{M}$  filter) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.10 0.4% Trypan blue

Trypan blue 0.012 กรัม

1X PBS 3.00 มิลลิลิตร

ละลาย Trypan blue ลงใน PBS ผสมให้เข้ากัน แช่ใน water bath ประมาณ 5 นาที  
จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 (Whatman) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ไอลดา ชุนอินทร์
วัน เดือน ปี เกิด	3 กุมภาพันธ์ 2540
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2558-2562 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยา เขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2562-ปัจจุบัน ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	283/2 บางกะปิคอนโดA ซ.นวมินทร์1 ถ.นวมินทร์ แขวง คลองจั่น เขต บาง กะปิ กรุงเทพฯ 10240
ผลงานตีพิมพ์	Kunin A., and Thongaram T. 2022. Antibiotic resistance 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.

