การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากกิมจิ

Screening of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Kimchi

ปุญญิศา วัฒนะชัย[1*] และ ธันยพร มงคล[1]

Punyisa Wattanachai[1*] and Tanyaporn Mongkhon[1]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

Received : June 19, 2023

Revised : July 13, 2023

Accepted : Aug 28, 2023.

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิสไตล์โฮมเมด ที่จำหน่ายบริเวณตลาดนัดรอบมหาวิทยาลัยบูรพา และทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท มีแบคทีเรียแลคติก 1 ไอโซเลท ได้แก่ CN331 แสดงคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกที่ดี คือ สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 3, 4 และ 5 โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ระหว่าง 7-8 log cfu/มิลลิลิตร ส่วนในเกลือน้ำดีร้อยละ 0.3, 0.6 และ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีปริมาณเซลล์ 8 log cfu ต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไอโซเลท CN331 มีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์เพื่อการค้าต่อไป

คำสำคัญ : การคัดเลือก, แบคทีเรียแลคติก, โพรไบโอติก, กิมจิ

Abstract

The objective of this study was to screen and preliminarily select for the properties of probiotic lactic acid bacteria from homemade-style kimchi in Burapha university's local market. After screening 10 isolates, one in particular, CN331 demonstrated potential probiotic properties including survival in acid conditions at pH levels of 3, 4 and 5 with a viability of cell count ranging from 7-8 log cfu/ml and bile salt conditions of 0.3%, 0.6% and 1% (w/v) of 8 log cfu/ml. Additionally, CN331 demonstrated antibacterial activity against 3 pathogenic bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The results showed that CN331 could be developed in the future to be a pure culture as a probiotic strain.

Keywords : Screening, Lactic Acid Bacteria, Probiotic, Kimchi

***Corresponding author. E-mail :** punyisa@go.buu.ac.th

บทนำ

กิมจิ (kimchi) เป็นอาหารประเภทผักดอง ที่นิยมรับประทานเป็นเครื่องเคียงในอาหารเกาหลี และสามารถนำไปปรุงเป็นอาหารอื่น ๆ ได้อีก อาทิเช่น ซุป ข้าวผัด กิมจิเกิดจากการหมักดองผัก โดยวัตถุดิบหลัก คือ ผักกาดขาว ต้นหอม กระเทียม หมักร่วมกับพริกป่น น้ำปลา และน้ำตาล ทำให้กิมจิมีรสชาติเผ็ด เปรี้ยวและมีกลิ่นเป็นเอกลักษณ์ วัฒนธรรมการกินกิมจิของเกาหลีมีอิทธิพลอย่างมากในประเทศไทยผ่านละครและซีรีส์เกาหลี ทำให้กิมจิเป็นที่รู้จักและคนไทยหันมาบริโภคมากขึ้นจนสามารถหาซื้อได้ตามร้านสะดวกซื้อ ซุปเปอร์มาร์เก็ต ตลาด และร้านค้าออนไลน์ ไปจนถึงสามารถหมักรับประทานเป็นกิมจิสไลต์โฮมเมด กิมจิเป็นอาหารที่มีไฟเบอร์สูงเนื่องจากมีส่วนประกอบจากผัก ส่งผลดีต่อระบบการย่อยอาหาร ช่วยป้องกันมะเร็ง และยังประกอบไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลากหลายชนิด เช่น วิตามินเอ บีหนึ่ง บีสอง ไนอะซิน แคลเซียม โปแตสเซียม เหล็ก กิมจิถูกจัดเป็นหนึ่งในห้าอาหารเพื่อสุขภาพ (functional foods) ของโลกจากการจัดอันดับในนิตยสาร Health ของประเทศสหรัฐอเมริกา (ลักษณารีย์ ภัทรทวีสิน, 2562) กระบวนการหมักกิมจิมีจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) พวก *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ *Leu. mesenteroides*, *Leu. cremoris, Leu. paremesenteroides, Leu. dextranicum*, *Streptococcus raffinolactis*, *L. sake*, *L. fructosus*, *L. leichmanni* และ *L. plantarum* โดยแบคทีเรียแลคติกจัดเป็นโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560)

โพรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคพบอยู่ในอาหาร เช่น ผักดอง เนยแข็ง โยเกิร์ต แหนม เทมเป้ ซีอิ๊ว เป็นต้น (วิภาดา มุนินทร์นพมาศ, 2561) เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค ช่วยปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย กระตุ้นการเคลื่อนตัวของลำไส้ ช่วยให้อุจจาระอ่อนตัวและขับถ่ายได้ง่ายขึ้น ลดภาวะท้องเสีย ช่วยย่อยและดูดซึมสารอาหารและยา เสริมสร้างกระบวนการวิตามินในร่างกาย กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (ประกานต์ ฤดีกุลธำรง และจารุณี ควรพิบูลย์, 2555) มีรายงานการศึกษาการคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากกิมจิ ในประเทศเกาหลีใต้ พบว่า แบคทีเรียแลคติก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Limosilactobacillus fermentum* MG5489, *Lactococcus lactis* MG5542, *Lacticaseibacillus paracasei* MG559, *Lactilactobacillus sakei* MG5468 และ *Lactilactobacillus curvatus* มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการชักนำให้เกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และกระตุ้นการหลั่งสารไซโตคายน์ (cytokines) เพื่อยับยั้งการอักเสบ (Lee, Kim & Kang, 2023) นอกจากนี้ยังพบว่า โพรไบโอติกบางสายพันธุ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ ลดคอเลสเทอรอลในเลือด เป็นต้น (สุภัสสร วันสุทะ และลัดดาวัลย์ ยืนยาว, 2561) มีรายงานการคัดแยกและศึกษาสมบัติการเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์ผัก พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากหน่อไม้ดองมีคุณลักษณะเป็นโพรไบโอติก โดยพบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* DSM799 เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถรอดชีวิตทั้งในสภาวะที่เป็นกรดต่ำ (pH 2.0) และเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.45 รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านทานยาปฏิชีวนะ streptomycin และ kanamycin (จินตนา ต๊ะย่วน และชื่นจิต จันทจรูญพงษ์, 2559)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากกิมจิ ซึ่งเป็นอาหารหมักประเภทผักดอง ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกและต่อยอดในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์สำหรับผลิตภัณฑ์ผักดองเพื่อการค้า รวมถึงเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคอีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิ

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์กิมจิชนิดผักกาดขาวจากตลาดนัดรอบมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างด้วยการชั่งน้ำหนักตัวอย่างกิมจิ 10 กรัม เจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือ (NaCl) ปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 90 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ (stomacher bag) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (stomacher) ได้ตัวอย่างความเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นเจือจางเป็นลำดับขั้นจนได้ระดับความเจือจางที่10^{-2} และ 10^{-3} นำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 (MRS-$CaCO_3$) บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ คัดเลือกโคโลนีที่เกิดโซนใส (clear zone) ล้อมรอบและมีลักษณะแตกต่างกัน ขีดเชื้อ (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบสัณฐานวิทยา รูปร่างและการจัดเรียงตัว ด้วยการย้อมสีแกรม คัดเลือกแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปกลม รูปท่อน และรูปไข่ มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test) และการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จะเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS broth ที่เติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกต่อไป

2. การคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 1. นำมาทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ ทดสอบความสามารถในการทนสภาวะเป็นกรด และเกลือน้ำดี ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยมีลำดับขั้นตอนดังนี้

2.1 ทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรด

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารมาตรฐาน McFarland (McFarland standard) ให้มีค่า 0.5 (ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยสารละลาย 1N NaOH และ สารละลาย 4N HCl ให้มีค่า pH 2, 3, 4 และ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยวิธีดรอบเพลต (drop plate) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์ และคณะ, 2565)

2.2 ทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อโดยปรับความขุ่นเริ่มต้นด้วยสารมาตรฐาน McFarland ให้มีค่า 0.5 ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่า pH ด้วยสารละลาย 1N NaOH และสารละลาย 4N HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 8 และผสมด้วยเกลือน้ำดี (bile salt) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.6 และ 1.0 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยมีอาหารที่ไม่เติมเกลือน้ำดีและค่า pH เท่ากับ 6.5 เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ที่สภาวะไม่มีออกซิเจน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตของทุกความเข้มข้นโดยวิธีดรอบเพลต

2.3 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน และเตรียมเชื้อทดสอบโดย เพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความขุ่นของแบคทีเรียก่อโรค โดยนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (OD_{625}) ให้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.10 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อทดสอบแล้วนำมาป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA agar ให้ทั่ว ใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะลงบนผิวหน้าอาหาร MHA agar นำแบคทีเรียแลคติกไปปั่นเหวี่ยง ที่ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมที่เจาะ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition) ในหน่วยมิลลิเมตร (สุภัสสร วันสุทะ, 2561 ; Reuben *et al*., 2020) จากนั้นนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ดังนี้

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (มิลลิเมตร)

= ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี – ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ cork borer

ทำการแปลงค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเป็น 4 ระดับ (Makras & Vuys, 2006) ดังนี้คือ

(-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (0 มิลลิเมตร),

(+) คือ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคต่ำ (1-8 มิลลิเมตร),

(++) คือ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคปานกลาง (9-12 มิลลิเมตร)

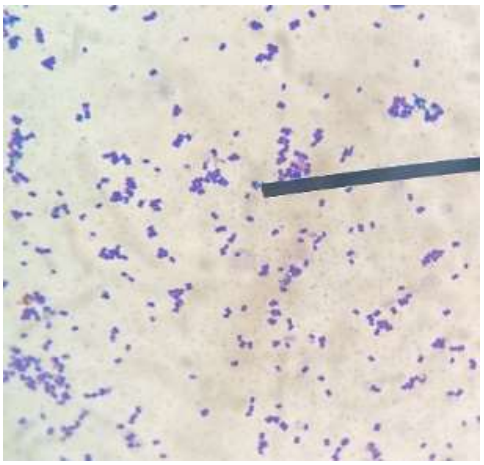
(+++) คือ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคสูง (มากกว่า 12 มิลลิเมตร)

ผลและวิจารณ์ผล

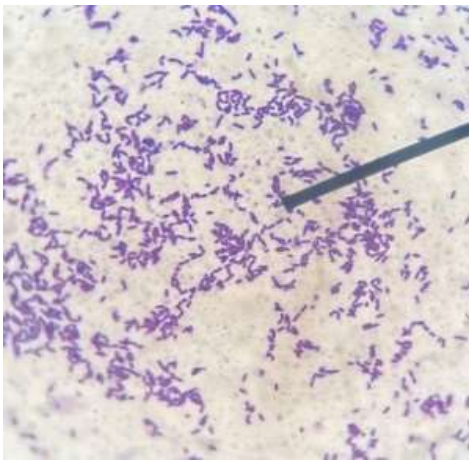
1. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิสไตล์โฮมเมดชนิดผักกาดขาวที่ได้จากตลาดนัดรอบมหาวิทยาลัยบูรพา จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลท โดยทั้ง 10 ไอโซเลท มีการสร้างวงใส (clear zone) บนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์เชิงซ้อนของ $Ca(C_3H_6O_3)_2$ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดเป็นวงใสบนอาหารแข็ง เมื่อนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยการย้อมสีแกรม พบว่าทั้ง 10 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเซลล์รูปกลม (cocci) 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท AN611, AN621, BN631 และ DN332 รูปท่อน (rod) 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท AN311, BN632, CN331, CN631 และ DN631 และเซลล์รูปไข่ (oval) จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ BN331 โดยมีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือสายโซ่สั้นและสายโซ่ยาว ไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ออกซิเดส ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของแบคทีเรียแลคติก แสดงตัวอย่างของแบคทีเรีย ดังภาพที่ 1 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirisha และคณะ (2021) ที่คัดเลือกและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก จากอาหารหมักในตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ต ประเทศอินเดีย พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ท่อน

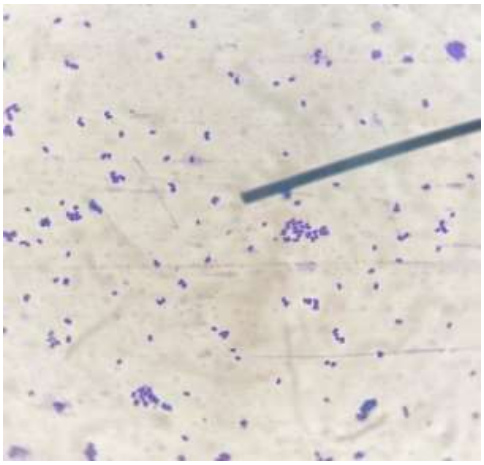
และให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pheng และคณะ (2020) พบแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกิมจิเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยแบคทีเรียแลคติกที่พบในกิมจิมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักกิมจิ ได้แก่ กะหล่ำปลี กระเทียม ขิง พริกแดง และต้นหอม วัตถุดิบเหล่านี้เป็นแหล่งของแบคทีเรียแลคติกที่สำคัญสำหรับการเริ่มต้นการหมัก (Lee *et al*., 2015) นอกจากนี้ความเข้มข้นของเกลือยังเป็นปัจจัยสำคัญในการหมัก เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้น แบคทีเรียแลคติกจะสร้างกรดแลคติก กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง (Cheigh & Park, 1994) ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากกระบวนการหมักทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนมากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดียิ่งขึ้น



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 1 ลักษณะเซลล์และรูปร่างของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกิมจิ (กำลังขยายภาพ 1000X) (ก) รูปกลม (ข) รูปท่อนสั้น และ (ค) รูปไข่

2. การคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก จะต้องมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการทนต่อสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสภาวะเป็นกรด ทนทานต่อสภาวะเกลือน้ำดี และมีความสามารถในการต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรค (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2563) ดังนั้น จึงได้ทำการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกโดยทดสอบความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี โดยดูจากการรอดชีวิตในสภาวะดังกล่าว และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

2.1 ทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรด

จากการทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของแบคทีเรียแลคติกโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกทั้ง 10 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่า pH เท่ากับ 2, 3, 4 และ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจนและนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก ด้วยวิธีดรอบเพลต (drop plate) พบว่าเพียง 1 ไอโซเลท คือ CN331 สามารถรอดชีวิตได้ที่ค่า pH 3-5 จำนวนการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 7-8 log cfu ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 1 ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่เป็นกรด-ด่าง อย่างน้อยที่ค่า pH 3 และมีปริมาณการรอดชีวิตมากกว่า 6 log cfu ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของโพรไบโอติกและมีปริมาณที่เพียงพอต่อการเกิดผลดีต่อสุขภาพ จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข มาตรา 5 และมาตรา 6 แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 (พระราชบัญญัติอาหาร, 2522)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างกัน

ไอโซเลท	จำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง (log cfu/มิลลิลิตร)			
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)			
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5
AN311	-	-	8.31±0.20	8.48±0.01
AN611	-	-	8.16±0.12	8.88±0.01
AN621	-	-	8.53±0.08	8.87±0.00
BN331	-	-	8.89±0.00	8.59±0.01
BN631	-	-	8.81±0.00	8.96±0.00
BN632	-	-	8.29±0.01	8.86±0.05
CN311	-	7.20±0.03	7.97±0.03	8.77±0.01
CN631	-	-	-	-
DN332	-	-	-	8.95±0.00
DN631	-	-	8.25±0.03	8.99±0.01

หมายเหตุ : ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

โพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในทางตรงและทางอ้อม แต่การที่จะได้มาซึ่งโพรไบโอติกที่ดีและมีประสิทธิภาพนั้น จะต้องมีการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก โดยเกณฑ์หลักในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารนั้น ได้แก่ ความสามารถ

ในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด ความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของแบคทีเรียแลคติกเป็นคุณสมบัติสำคัญของโพรไบโอติก การที่โพรไบโอติกจะทำงานได้ดีและก่อประโยชน์ให้กับโฮสต์ได้นั้น จะต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านทางเดินอาหารที่มีความเป็น pH 2-5 (Nardone & Compare, 2015) โพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง อย่างน้อยที่ค่า pH 3 เนื่องจากเป็นมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของโพรไบโอติก (Jung *et al*., 2019)

เมื่ออาหารเดินทางมาถึงกระเพาะอาหาร ในกระเพาะอาหารจะมีน้ำย่อยหลั่งออกมาทำให้มีค่าความเป็นกรดลดลง จากนั้นจะเกิดการย่อยเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง อาหารบางส่วนจะเดินทางไปยังลำไส้เล็กที่มีเกลือน้ำดีเป็นองค์ประกอบ (ณัฐวุฒิ ปัฐวีกานต์ และคณะ, 2563) จากการทดลองการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของแบคทีเรียแลคติก พบว่ามี 8 ไอโซเลท ที่สามารถรอดชีวิตที่ค่า pH 4-5 และมีเพียง 1 ไอโซเลท คือ CN331 สามารถรอดชีวิตที่ค่า pH ตั่งแต่ 3-5 โดยมีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วงอยู่ในช่วง 7-8 log cfu/มิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Jeong *et al.* (2021) ที่ทดสอบความสามารถในการทนกรดโดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับกระเพาะอาหารโดยใช้ 1N HCl ที่มีค่า pH 2, 3 และ 6.5 ที่เป็นชุดควบคุม พบว่า *Lactiplantibacillus plantarum* Wikim0112, *Lpb. plantarum* WCFS1 และ *Lpb. plantarum* KACC11451 สามารถรอดชีวิตได้ที่ค่า pH 2 โดยมีจำนวนเชื้อ 8.14 log cfu/มิลลิลิตร, 8.01 log CFU/มิลลิลิตร และ 7.91 log cfu/มิลลิตร ตามลำดับ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Sohn *et al.* (2020) ที่ทดสอบความสามารถในการทนกรด โดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับกระเพาะอาหาร ที่มีค่า pH เท่ากับ 2.5 พบว่า *Lactiplantibacillus plantarum* LB5 สามารถรอดชีวิตที่ค่า pH 2.5 โดยมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตถึง 7.04 log cfu/มิลลิตร

2.2 ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt)

การทดสอบความสามารถในการทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดี โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก 1 ไอโซเลท คือ CN331 ในอาหาร MRS broth ที่ผสมด้วย bile salt powder ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยมีอาหารที่ไม่เติม bile salt powder เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ที่สภาวะไม่มีออกซิเจนและนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีดรอบเพลต พบว่าไอโซเลท CN331 มีความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3-1 เปอร์เซ็นต์ สามารถรอดชีวิตได้ถึง 8 log cfu/มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีต่างกัน

ไอโซเลท	จำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีต่างกัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง (log cfu/ml)			
	ร้อยละความเข้มข้นของเกลือน้ำดี			
	ชุดควบคุม	0.3	0.6	1
CN331	8.34±0.01	8.14±0.05	8.13±0.03	8.58±0.03

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติของโพรไบโอติก เกลือน้ำดีสร้างจากคอเลสเตอรอลในตับซึ่งถูกปล่อยออกสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นทำหน้าที่ในการย่อยสลายไขมัน (Schubert *et al*., 2017) เกลือน้ำดีจึงเป็นสารอันตรายต่อแบคทีเรีย เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมันจึงง่ายต่อการถูกทำลาย (Urdaneta & Casadesús, 2017) แบคทีเรียแลคติกสามารถรอดชีวิตจากเกลือน้ำดีได้นั้น เนื่องจากโพรไบโอติก

แบคทีเรียแลคติกนำเอาคอเลสเตอรอลไปใช้โดยตรงเพื่อสังเคราะห์เซลล์เมมเบรนและร่วมสร้างผนังเซลล์ส่งผลให้เพิ่มความแข็งแรงต่อเซลล์แบคทีเรียในขณะเจริญ และช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือดอันเป็นอีกหนึ่งบทบาทสำคัญของโพรไบโอติกต่อสุขภาพผู้บริโภค จากการทดลองการทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดี พบว่า ไอโซเลท CN331 สามารถรอดชีวิตได้ถึง 8 log cfu/มิลลิลิตร ในความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3-1 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Jeong และคณะในปี 2021 (Jeong *et al.,* 2021) ได้รายงานว่า *Lactiplantibacillus plantarum* Wikim0112, *Lpb. plantarum* WCFS1 และ *Lpb. plantarum* KACC11451 สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 8.28 log cfu/มิลลิลิตร, 8.25 log cfu/มิลลิลิตร และ 7.93 log cfu/มิลลิตร ตามลำดับ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Sohn *et al.* (2020) ได้รายงานว่า *Lactiplantibacillus plantarum* LB5 สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 8.24 log cfu/มิลลิลิตร

2.3 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยแบคทีเรียแลคติก ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า CN331 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ปานกลาง บริเวณการยับยั้ง (inhibition zone) 9.67 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 สูงสุด บริเวณการยับยั้ง 13.33 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลคติก

แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลคติก						
ไอโซเลท	*Escherichia coli* ATCC 25922		*Salmonella* Typhimurium ATCC 13311		*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	
	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ประสิทธิภาพการยับยั้ง
CN331	9.67±0.58	++	13.33±1.52	+++	9.67±2.08	++

หมายเหตุ : ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) จากการทดลอง 3 ซ้ำ
+ (1-8 มิลลิเมตร) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคต่ำ,
++ (9-12 มิลลิเมตร) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคปานกลาง,
+++ (>12 มิลลิเมตร) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคสูง

ในระบบทางเดินอาหารของคนที่มีสุขภาพดีต้องมีสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สูง เนื่องจากโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เจริญจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ จากการทดลองความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรค โดยมี *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และมี *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกิมจิ ไอโซเลท CN331 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยสามารถยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 ได้สูงสุด (strong inhibition) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Escherichia coli*

ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ปานกลาง (intermediate inhibition) ซึ่งผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาจเกิดจากฤทธิ์ของสารประกอบที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดแลคติก (lactic acid) กรดแอซีติก (acetic acid) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไดแอซีทิล (diacetyl) และรอยเทอริน (reuterin) เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจมีกลไกอื่น ๆ ในการควบคุมเชื้อก่อโรค เช่น การแข่งขันเพื่อแย่งอาหาร การกีดขวางการยึดเกาะ และการปรับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เป็นต้น (ญาณิกา วัชรเทวินทร์กุล และ จีรนันท์ สวนชูโต, 2564) มีรายงานการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลคติก *Leuconostoc mesenteroides* QZ1178 ต่อแบคทีเรีย *Gallibacterium anatis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อโรคในในสัตว์ปีก (Zhang *et al*., 2021) มาจากการสร้างกรดแลคติก ซึ่งเป็นกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว (undissociated) และมีคุณสมบัติเป็น lipophilic แพร่ผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายสมดุลย์ของเซลล์เมมเบรนเกิดการรั่วของไอออน ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญต่อไปได้ นอกจากนี้กรดแลคติกที่สร้างขึ้น ไปทำลายชั้นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ปกคลุมชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีองค์ประกอบของเปปดิโดไกลแคนน้อยกว่าผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ทำให้กรดเข้าไปทำลายได้ง่าย สำหรับการทดลองนี้ พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ มีประสิทธิภาพในการทำลาย *S*. Typhimurium ATCC13311 มากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Ren และคณะ (2022) ที่ศึกษาการยับยั้ง *S*. Typhimurium ATCC13311 ของ *Lactiplantibacillus plantarum* 1201 โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งบนอาหารแข็ง MRS agar ที่มีการปรับค่า pH 3 และ 7 (ชุดควบคุม) กับส่วนใส (probiotic filtrates) ที่มีการปรับค่า pH เท่ากับ 3 พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดเกิดที่ probiotic filtrates อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งอาจเกิดจากกรดที่แบคทีเรียผลิตขึ้นร่วมกับสารเมตาบอไลท์อื่น นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกิมจิ ในประเทศเกาหลีใต้ พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งชนิดที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบได้ อาทิเช่น *Escherichia coli* ATCC 35150, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, *Salmonella choleraesuis* KCCM40763, *Shigella boydii* KCCM41649, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Yersinia enterocolitica* KCCM41657 และ *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 12539 (Sohn *et al*., 2020 ; Jeong *et al*., 2021)

สรุปและข้อเสนอแนะ

โพรไบโอติกที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างกรดแลคติกและสารเมตาบอไลท์ (metabolites) อื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิ ซึ่งเป็นอาหารหมักประเภทผักดอง ที่ได้จากตลาดนัดรอบมหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 4 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 10 ไอโซเลท มี 1 ไอโซเลท คือ CN331 ที่มีแนวโน้มที่เป็นโพรไบโอติกที่ดี นั้นคือมีความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี โดยสามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 7-8 log cfu/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 อย่างไรก็ดี แม้ว่าตัวอย่างกิมจิเป็นชนิดสไตล์โฮมเมดที่มีการทำและจำหน่ายไม่มาก แต่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้ ยิ่งในปัจจุบันตลาดอาหารสุขภาพมีการเติบโตขึ้นอย่างมาก มีการนำแบคทีเรียแลคติกไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติก เมื่อต้องการพัฒนาต่อเพื่อใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม จำเป็นต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม มีการรอดชีวิตได้เมื่อผ่านกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา รวมทั้งต้องระบุหาสายพันธุ์โพรไบโอติกเพื่อประโยชน์ในการใช้สายพันธุ์ รวมถึงทดสอบความปลอดภัย เช่น ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การก่อโรค และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ทุนสนับสนุน รวมทั้งอนุเคราะห์ จุลินทรีย์ อุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่ทำการทดลอง จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จินตนา ต๊ะย่วน และชื่นจิต จันทจรูญพงษ์. (2559). การประเมินศักยภาพการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์ผักดอง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 47(2) : 97-100.

ญาณิกา วัชรเทวินทร์กุล และจีรนันท์ สวนชูโต. (2564). การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในโคนม. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*, 13(2) : 294.

ณัฐวุฒิ มีศิลป์ ปัฐวีกานต์ ไวยเนตร และกฤษณะพงษ์ กุลกานนท์. (2563). ผลของน้ำย่อยเทียมต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* ในเม็ดเจลชีวภาพ. *วารสารวิจัยราชมงคลกรุงเทพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ,* 14(1) : *160-162.*

ประกานต์ ฤดีกุลธำรง และจารุณี ควรพิบูลย์. (2555). พรีไบโอติกอาหารส่งเสริมสุขภาพ. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 12(2) : 362-367.

ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์. (2560). *กระบวนการและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตอาหารหมัก*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พระราชบัญญัติอาหาร. (2522). พระราชบัญญัติอาหาร พร้อมกฎกระทรวงและประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับปรับปรุง). 25 กรกฎาคม 2566, เข้าถึงได้จาก https://mnfda.fda.moph.go.th/food/wp-content/uploads/2021/08/อ1.law_food.pdf.

วิภาดา มุนินทร์นพมาศ. (2561). การถนอมและแปรรูปอาหารด้วยการหมักดอง. ใน รุ้งลาวัณย์ จันทรัตนา (บรรณาธิการ). *หลักการแปรรูปและถนอมอาหาร* (หน้า 140-142). กรุงเทพฯ : สหมิตรพัฒนาการพิมพ์ (1992).

สำนักกรรมการอาหารและยา. (2563). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. 25 กรกฎาคม 2566, เข้าถึงได้จาก : http://www.ratchakitcha.sac.go.th/DATA/PAGE/2554/E/086/21.PDF.

สุภัสสร วันสุทะ และลัดดาวัลย์ ยืนยาว. (2561). คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของจุลินทรีย์โพรไบโอติก. *วารสารหมอยาไทยวิจัย,* 4(1) : 3-5.

ลักษณารีย์ ภัทรทวีสิน. (2562). กิมจิ : คุณค่าทางวัฒนธรรมและมูลค่าทางเศรษฐกิจทศวรรษที่ 1960-ปัจจุบัน. บทความวิจัย คณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์ ปุญญิศา วัฒนะชัย และสราวุธ แสงสว่างโชติ. (2565). การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักพื้นบ้านเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำที่ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียน. *วารสารคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*, 7(2) : 60-63.

Cheigh, H.S. and Park, K.Y. (1994). Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 34(2) : 175-203.

Jeong, C.H., Sohn H., Hwang H., Lee, H.J., Kim T.W., and Kim, D.S. (2021). Comparison of the probiotic potential between *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from kimchi and standard probiotic strains isolated from different source. *Foods*, 10(9). https://doi:10.3390/food10092125.

Jung, S.H., Park. J.W., Cho. I.J., Lee, N.K., Yeo, I.-C. and Kim, B.Y. (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from sauce-type of kimchi. *Prevention Nutrition and Food Science*, 17(3) : 217-222.

Korpela, K., Salonen, A., Vepsäläinen, O., Suomalainen, M., Kolmeder, C., Varjosalo, M., and De Vos, W.M. (2018). Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. *Microbiome*, 6(1) : 182.

Lee, J., Kim, S. and Kang, C.H. (2023). Screening and probiotic properties of lactic acid bacteria with potential immunostimulatory activity isolated from kimchi. *Fermentation,* 9(1) : 4-13.

Lee, S.H., Jung, J.Y., and Jeon, C.O. (2015). Source tracking and succession of kimchi lactic acid bacteria during fermentation. *Journal of Food Science*, 80(8) : 1871-1877.

Makras, L. and Vuys, L.D. (2006). The *in vitro* inhibition of gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal,* 16(9) : 1049-1057.

Nardone, G., and Compare, D. (2015). The human gastricmicrobiota: is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases. *United European Gastroenterology Journal*, 3(1) : 255-260.

Pheng, S., Han, H.L., Park, D.S., Chung, C.H and Kim, S.G. (2020). *Lactococcus kimchi* sp. NOV., a new lactic acid bacterium isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70 : 505-510.

Reuben, R.C., Roy, P.C., Sarkar, S.L., Rubayet, A.S. and Jahid, I.K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, 103(2) : 1224.

Ren, Z., Peng, L., Chen, S., Pu, Y., Lv, H., Wei, H. and Wan, C. (2022). *Lactiplantibacillus plantarum* 1201 inhibits intestinal infection of *Salmonella enterica* subsp. enterica Serova Typhimurium strain ATCC 1331 in mice with high-fat diet. *Foods,* 11 : 1-14.

Sirisha, A., Lakshmi, J., Lakshmi, K. and Vijaya Gopal, A. (2021). Isolation and Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermentation Foods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,* 10(10) : 584-600.

Schubert, K., Steven, W.M., Bergen, D.M. and Schaap, F.G. (2017). Interactions between bile salts, gut microbiota, and hepatic innate immunity. *Immunological Reviews*, 275(1) : 23-35.

Sohn, H., Chang, Y.H., Yune, J.H., Jeong, J.H., Shin, D.M., Kwon, C.H., Kim, D.H., Hong, S.W., Hwang, H., Jeong, J.Y. and Han, S.G. (2020). Probiotic properties of *Lactiplantibacillus plantarum* LB5 isolated from kimchi based on nitrate reducing capability, *Foods*, 9 : 1777. https//doi:10.3390/foods9121777.

Urdaneta, V. and Casadesús, J. (2017). Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers In Medicine*, 4(1) : 1-13.

Zhang, H., HuangFu, H., Wang, X., Zhao, S., Liu, Y., Lv, H., Qin, G. and Tan, Z. (2021). Antibacterial activity of lactic acid producing *Leuconostoc mesensteroides* QZ1178 against pathogenic *Gallibacterium anatis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8 : 1-10.