สำหรับผู้วิจัย

รหัสโครงการ สสอ.(3) 34/2552
(เฉพาะเจ้าหน้าที่ สกอ.)

ปกปิด

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยและพัฒนาภาครัฐร่วมเอกชนในเชิงพาณิชย์
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย): การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแลคโตบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับผู้ป่วยท้องเสียเรื้อรัง

(ภาษาอังกฤษ): Strain Selection of *Lactobacillus* spp. Probiotic for Chronic Diarrhea Patients

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. ธีระพล	ศรีชนะ
รศ. ดร. เสน่ห์	แก้วนพรัตน์
รศ. ดร. พรอนงค์	อร่ามวิทย์
ดร. สมพงศ์	โอทอง

เอกชนที่ร่วมโครงการ

บริษัท ไทยธรรม อัลไลน์แอนซ์ จำกัด

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ	รศ. ดร. ธีระพล ศรีชนะ
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์ 074-428-148 โทรสาร 074-428-148 โทรศัพท์เคลื่อนที่ 0869645510 e-mail: teerapol.s@psu.ac.th

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยและพัฒนาภาครัฐร่วมเอกชนในเชิงพาณิชย์
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

1) ข้อมูลของโครงการ

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย): การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแลคโตแบซิลลัสเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับผู้ป่วยท้องเสียเรื้อรัง

(ภาษาอังกฤษ): Strain Selection of *Lactobacillus* spp. Probiotic for Chronic Diarrhea Patients

ระยะเวลาของโครงการ	1	ปี
งบประมาณรวม	1,032,800	บาท

งบประมาณจากสกอ 712,800 บาท (คิดเป็นร้อยละ 69.02)
งบประมาณจากภาคเอกชน 320,000 บาท (คิดเป็นร้อยละ 30.98)

โปรดระบุ ☑ รายละเอียดโครงการนี้
☑ เป็นโครงการใหม่

การยื่นขอรับการสนับสนุนจากหน่วยงานอื่น สำหรับโครงการนี้
☑ ไม่ได้ยื่นขอหรือได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงานอื่น

2) บทคัดย่อ

เชื้อโปรไบโอติก คือเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่เชื้ออาศัยอยู่ โดยมีกระบวนการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้จากการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ในการคัดเลือกเชื้อเพื่อพัฒนาเป็นโปรไบโอติกจำเป็นต้องมีการทดลองในระดับ *in vitro* และ *in vivo* ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อแลคโตบาซิลัส จากอุจจาระของอาสาสมัครที่เป็นผู้สูงอายุสุขภาพดี จากนั้นศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่แยกได้ จำแนกสปีชีส์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก ศึกษาความสามารถของเชื้อดังกล่าวในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ ศึกษาการทนกรดและทนด่างในระบบทางเดินทางอาหาร ศึกษาการเกิดการเกาะกลุ่มกันของเชื้อแลคโตบาลิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร ศึกษาการยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคบนเซลล์ผนังลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cell line) ศึกษาความสามารถในการปลอดปล่อยตังเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล และศึกษาความคงทนของเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล จากการศึกษาพบว่า 169 โคโลนีที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสและ 6 ไอโซเลท (T12/4, T13/1, T13/3, T13/5, T17/4 และ T23/3) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 จากการทดลองเชื้อที่แยกไอโซเลท (T23/3) มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลัสไอโซเลท T23/3 มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารซึ่งได้แก่ เชื้อ *S.aureus*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *E.coli* และ *V. cholera* พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถยับยั้งการ

เจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิด และเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อ *Lactobacillus* สปีชีส์ *plantarum* นอกจากนี้ในการศึกษาพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดแลคติก กรดไขมันสายสั้น เป็นต้น เชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) แสดงคุณสมบัติดื้อต่อยา erythromycin doxycycline penicillin G neomycin และ tetracycline ในขณะเดียวกันเชื้อดังกล่าวจะไวต่อยา ampicillin และ chloramphenicol เมื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 4 ชั่วโมงเมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรดที่พีเอชเท่ากับ 4.0 สภาวะความเป็นด่างที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และ 0.3% กรดน้ำดี นอกจากนี้พบว่าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติการเกาะกลุ่มกันเองของตัวเชื้อ และสามารถเข้าไปเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูงและสามารถยึดเกาะกับเซลล์ของผนังลำไส้ใหญ่ได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร พบว่าแคปซูลที่เคลือบด้วยสาร Eudragit® L-100 สามารถป้องกันไม่ให้ตัวแคปซูลแตกในสภาวะเป็นกรดในบริเวณกระเพาะอาหารแต่ตัวแคปซูลสามารถแตกออกและปลดปล่อยตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสได้อย่างสมบูรณ์เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นด่างในบริเวณลำไส้ เมื่อศึกษาความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในรูปแบบแคปซูลเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 12 เดือน เชื้อแลคโตบาซิลัสดังกล่าวสามารถมีชีวิตรอดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเดือนแรกที่เก็บเชื้อดังกล่าว

3) ข้อมูลของหัวหน้าโครงการ

ชื่อหัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ

หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-428-148

โทรสาร 074-428-148

โทรศัพท์เคลื่อนที่ . 086-964-5510

E-mail: teerapol.s@psu.ac.th

ลายมือชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

4) คณะผู้วิจัย

1. ชื่อผู้ร่วมโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์
คุณวุฒิ (สาขาความชำนาญ)	จุลชีววิทยา
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์	074-288-840
โทรสาร	074-428-148
โทรศัพท์เคลื่อนที่	089-876-1789
E-mail:	sanae.k@psu.ac.th

ลายมือชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์)

2. ชื่อผู้ร่วมโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์
คุณวุฒิ (สาขาความชำนาญ)	เภสัชกรรมและเภสัชกรรมคลินิก
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พญาไท กทม. 10330
โทรศัพท์	02-218-8409
โทรสาร	02-218-8403
โทรศัพท์เคลื่อนที่	089-921-7255
E-mail:	aramwit@gmail.com

ลายมือชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์)

3. ชื่อผู้ร่วมโครงการ	ดร. สมพงศ์ โอทอง
คุณวุฒิ (สาขาความชำนาญ)	เทคโนโลยีชีวภาพของกระบวนการหมัก
หน่วยงานต้นสังกัด	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อ.ปาพะยอม จ.พัทลุง 93110
โทรศัพท์	074-693-992
โทรสาร	074-693-992
โทรศัพท์เคลื่อนที่	08-7795-0406
E-mail:	sompong.o@gmail.com

ลายมือชื่อ.....สมพงศ์ โอทอง.....

(ดร. สมพงศ์ โอทอง)

5) วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก
2. เพื่อระบุชนิดของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ใช้ในการศึกษา
3. เพื่อศึกษาสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ใช้ในการศึกษา
4. เพื่อศึกษาวิธีการในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกให้มีปริมาณมากเพียงพอที่สามารถผลิตเป็นแคปซูลได้ครั้งละไม่ต่ำกว่า 5,000 แคปซูล
5. เพื่อตั้งสูตรตำรับโปรไบโอติกในรูปแบบแคปซูลที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับรักษาอาการท้องเสีย
6. เพื่อศึกษาความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัสหลังจากบรรจุในรูปแบบแคปซูล

6) หลักการและเหตุผล

โรคทางเดินอาหารเป็นปัญหาพื้นฐานของประชากรในประเทศไทยและประชากรของโลก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา การเกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Vibrio cholerae, Salmonella typhimurium, Shigella, Escherichia coli และ Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Jisun และคณะ, 2010) ในการป้องกันและรักษาโรคเหล่านี้อาจรักษาตามอาการหรือให้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายเชื้อซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อยาตามมา ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้หันมาใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาใช้ในการรักษาโรคดังกล่าวมากขึ้น ซึ่งโปรไบโอติกมีคำนิยามคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่เชื้อนั้นอาศัยอยู่ โดยมีกระบวนการการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้โดยการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Tannock และคณะ, 2000; Bayane และคณะ,

2010) เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมีทั้งเชื้อแบคทีเรียได้แก่เชื้อ *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp. และเชื้อยีสต์บางชนิด เช่น *Saccharomyces boulardii* (Morelli, 2007) ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเชื้อ *Lctobacillus* spp. ซึ่งเชื้อแลคโตบาซิลัสจัดอยู่ในกลุ่ม lactic acid bacteria เชื้อแลคโตบาซิลัสนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานานโดยเฉพาะอาหารจำพวกนม เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว และอาหารจำพวกหมักดอง เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าทั้งตัวเชื้อและสารเมแทบอไลต์ที่เชื้อแลคโตบาซิลัสสร้างขึ้นไม่ก่อให้เกิดโรคใด ๆ จึงได้จัดเชื้อดังกล่าวให้อยู่ในกลุ่ม Generally recognized as safe (GRAS) (Harsharnjit, 2003; Bayane และคณะ, 2010) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งได้แก่ กรดแลคติก, short chain fatty acids, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารเพปไทด์ที่เรียกว่า bacteriocin (Reid และคณะ, 2004; Pangsomboon และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามมีเชื้อแลคโตบาซิลัสเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติที่ดีและสร้างสารเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพพอที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้ ปัจจุบันพบว่านิยมนำเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาใช้พัฒนาในเภสัชภัณฑ์และอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น (Pan และคณะ, 2009)

Lactobacillus spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่ง เป็น facultative anaerobe หรือ anaerobe (Holzapfel และคณะ, 2001) เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในร่างกายของคนและสัตว์ ได้แก่ ในช่องปาก ระบบทางเดินอาหาร และช่องคลอด เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบในอาหารหมักดอง เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสช่วยกำจัดสารพิษจากแบคทีเรียที่ก่อโรคในร่างกาย และช่วยทำให้คนมีชีวิตที่ยืนยาวขึ้น (Bayane และคณะ, 2010) นับตั้งแต่นั้นมาได้มีการศึกษาประโยชน์จากเชื้อแลคโตบาซิลัสอย่างจริงจังและมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสมีประโยชน์ต่อร่างกายหลายด้าน เช่น

1. ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร จากการศึกษาของ Carter และ Collin (1978) แสดงให้เห็นว่าเชื้อประจำถิ่นสามารถช่วยป้องกันและทำลายเชื้อก่อโรคได้และพบว่าสารที่เชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ GG ที่แยกได้จากอุจจาระของคนสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิดเช่น *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. และเชื้อในตระกูล *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. แต่ไม่ยับยั้งเชื้อแลคบาซิลัสด้วยกัน ในขณะเดียวกัน Guandalini และคณะ (2000) ได้ใช้เชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ GG ผสมกับน้ำเกลือเพื่อรักษาอาการท้องเสียอย่างรุนแรงในทารก จากการศึกษาพบว่าเด็กที่ได้รับเชื้อแลคโตบาซิลัสผสมกับน้ำเกลือมีระยะเวลาที่เกิดอาการท้องเสียและระยะเวลาที่อยู่โรงพยาบาลสั้นกว่าเด็กทารกที่ได้รับน้ำเกลือเพียงอย่างเดียวซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ GG ช่วยลดอาการท้องเสียในเด็กทารกได้ นอกจากนี้ Pagnini และคณะ (2010) ได้นำเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ acidophilus มาเลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรคซึ่งได้แก่เชื้อ *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E.coli* และ *C. Perfringens* พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส มีกลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้โดยสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคซึ่งสารดังกล่าวได้แก่

1.1 กรดแลคติก (lactic acid) เป็นสารที่เชื้อแลคโตบาซิลัสทุกสายพันธุ์ผลิตขึ้นโดยจะผลิตสาร lactic acid ออกมานอกเซลล์ส่งผลให้ค่าพีเอชในอาหารลดต่ำลงส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Reid

และคณะ, 2004) นอกจากนี้กรดแลคติก สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้หลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และยังช่วยสร้างความสมดุลในระบบนิเวศของลำไส้ใหญ่อีกด้วย

1.2 กรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acids, (SCFAs)) ได้แก่สาร acetic acid, butyric acid, propionic acid, *N*-butyric acid, isobutyric acid และ isovaleric acid สารเหล่านี้เป็นสารที่เชื้อแลคโตบาซิลัสทุกสายพันธุ์ผลิตขึ้น สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้เนื่องจากกรดอินทรีย์เหล่านี้ซึ่งอยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค เกิดการสะสมภายในเซลล์ และแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออนเป็นจำนวนมาก ทำให้พีเอชภายในเซลล์ของเชื้อก่อโรคต่ำกว่าภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ไฮโดรเจนอิออนจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น กระบวนการ translocation และ oxidative phosphorylation เป็นต้น ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Reid และคณะ, 2004)

1.3 Hydrogen peroxide (H_2O_2) เนื่องจากเชื้อแลคโตบาซิลัสและแบคทีเรียในกลุ่มที่ผลิตสาร lactic acid ไม่มีฮีม (heme) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ระบบ cytochrome เพื่อเปลี่ยนออกซิเจนให้เป็นน้ำในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ แต่จะใช้ flavoproteins ซึ่งจะเปลี่ยนออกซิเจนเป็นสาร hydrogen peroxide และเนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ catalase จึงไม่สามารถทำลายสาร hydrogen peroxide จึงได้ปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งสาร hydrogen peroxide เป็นพิษต่อแบคทีเรียเพราะจะทำให้เกิดออกซิเดชันกับโมเลกุลต่าง ๆของเชื้อก่อโรคส่งผลให้กระบวนการเมแทบอไลต์ในเซลล์เปลี่ยนแปลงทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Tomas และคณะ, 2003)

1.4 Bacteriocin เป็นสารที่เชื้อแลคโตบาซิลัสบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ผลิตขึ้น เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน (Arici และคณะ, 2004) มีกลไกการออกฤทธิ์โดยสาร bacteriocin ซึ่งมีคุณสมบัติแสดงประจุบวกจะเข้าไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรคซึ่งมีประจุลบ แล้วแทรกตัวเข้าไปในเซลล์ส่งผลให้บริเวณของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นรู ทำให้สารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกนอกเซลล์ทำให้เซลล์ของเชื้อก่อโรคตาย สาร bacteriocin ซึ่งสร้างจากเชื้อในกลุ่มที่ผลิตสาร lactic acid แบ่งออกเป็น 4 class คือ

- Class I lantibiotics เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก มีขนาดน้อยกว่า 5 kDa เช่น nisin, lacticin 481, carnocin U149, และ lactocin S

- Class II เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก มีขนาดน้อยกว่า 10 kDa มีคุณสมบัติที่ไม่ทนความร้อน เช่น pediocin PA-1, lactococcin A, B, M, leucocin A, sakacin A, curvacin A, sakacin P และ lactacin F

- Class III เป็นโปรตีนที่มีขนาดมากกว่า 30 kDa เช่น helveticin J, helveticin V-1828, acidophilucin A, lactacin A และ B

- Class IV เป็นโปรตีนที่ซับซ้อน อาจมีไลปิดหรือคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบด้วย เช่น plantaricin S, leuconocin S, lactocin 27, pediocin SJ-1

2. ช่วยลดอาการท้องเสียจากการกินยาปฏิชีวนะ การกินยาปฏิชีวนะนอกจากจะฆ่าหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคในร่างกายแล้ว ยังทำลายเชื้อประจำถิ่นในร่างกายให้มีจำนวนลดน้อยลงด้วย ทำให้เสียสมดุลในระบบทางเดินอาหาร มีผลให้เชื้อบางชนิดที่ดื้อยาเพิ่มจำนวนขึ้นมากผิดปกติ จนมีโอกาสก่อโรคได้ เช่น เชื้อ *Candida* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดอาการ stomatitis, ท้องเสีย หรือติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ พบว่าการกินยา cephalosporins, clindamycin, penicillin จะทำให้เกิดการเจริญของเชื้อ *Clostridium difficile*

สูงกว่าปกติ ทำให้เกิดท้องเสียชนิด colitis หรือ pseudomembranous colitis (Graul และคณะ, 2009) และพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสในระบบทางเดินอาหารและเชื้อประจำถิ่นอื่นๆ ลดลง 2-3 log cycles เมื่อกิน celphalosporin และ chloramphenicol (Parkes และคณะ, 2009) นอกจากนี้การกินยา clindamycin, neomycin หรือการกินยา neomycin ร่วมกับ metronidazole จะลดจำนวนเชื้อแลคโตบาซิลัสลงอย่างมาก (Graul และคณะ, 2009) จากการศึกษาของ Arici และคณะ (2004) พบว่าการกินเชื้อแลคโตบาซิลัสในระหว่างหรือหลังจากให้ยาปฏิชีวนะช่วยทำให้ปริมาณของเชื้อประจำถิ่นไม่เปลี่ยนแปลงนอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคที่ผนังลำไส้ได้เป็นอย่างดี

3. ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในนม ในคนบางคนไม่มีเอนไซม์แลคเตส เพื่อย่อยน้ำตาลแลคโตสจึงทำให้เกิดอาการท้องอืดหรือไม่สบายท้องเมื่อรับประทานอาหารประเภทนม ซึ่งแลคเตสเป็นเอนไซม์ที่พบในลำไส้ซึ่งจะช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกลูโคสและกาแลคโตส การขาดเอนไซม์ดังกล่าวจะก่อให้เกิดอาการท้องเสีย ท้องขึ้น และปวดท้องหลังจากการย่อยนมและผลิตภัณฑ์นม จากการรวบรวมงานวิจัยโดย Soomro และคณะ ในปี 2002 พบว่า เมื่อเติมเชื้อและน้ำตาลแลคโตสลงในโยเกิร์ตทำให้ในระหว่างการหมักโยเกิร์ตเชื้อนี้จะย่อยน้ำตาลแลคโตสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ทำให้คนที่ขาดเอ็นไซม์แลคเตส สามารถกินโยเกิร์ตได้โดยไม่เกิดอาการไม่สบายท้อง

4. ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เนื่องจากคอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดน้ำดี ดังนั้นถ้าเพิ่มการขับออกของน้ำดีก็จะกระตุ้นให้มีการนำเอาคอเลสเตอรอลมาใช้ในการสังเคราะห์น้ำดีเพิ่มขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดมีเอนไซม์ที่สามารถจับกับกรดน้ำดี และทำให้กรดน้ำดีถูกขับออกทางอุจจาระเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ หรืออาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถนำเอาคอเลสเตอรอลไปใช้ได้โดยตรง ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง ซึ่งจากการรายงายของ Naidu และคณะ (1999) พบว่าเมื่อให้หนูกินโยเกิร์ตธรรมดาและโยเกิร์ตที่มีเชื้อ *Lactobacillus aciphilus* ร่วมกันการตรวจระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและจำนวนของเชื้อแลคโตบาซิลลัสในอุจจาระของหนู ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับโยเกิร์ตธรรมดาและโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลลัส จะมีน้ำหนักมากกว่าหนูที่ไม่ได้รับโยเกิร์ต ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นคอเลสเตอรอลในเซรั่มและคอเลสเตอรอลที่ไม่ดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่กินโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลัส และจากการศึกษาพบว่าทั้งโยเกิร์ตธรรมดาและโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลัสไม่ส่งผลต่อคอเลสเตอรอลที่ดีและไตรกลีเซอไรด์ ในขณะเดียวกันปริมาณของเชื้อแลคโตบาซิลลัสจะมีปริมาณสูงในอุจจาระของหนูที่กินโยเกิร์ตที่มีเชื้อแลคโตบาซิลัส

5. ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากการทดลองนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria มาใช้ศึกษาในหลอดทดลองเพื่อการชักนำให้ผลิตสารไซโตไคน์ (cytokines) ซึ่งเป็นสารที่ร่างกายตอบสนองต่อสารพิษหรือจุลินทรีย์ จะเป็นโมเลกุลที่ช่วยให้เกิดการทำงานร่วมกันของปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต่าง ๆ โดยจะเกิดเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร (Miettinen และคณะ, 1998) ผลชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้อาจจะเข้ามาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกันแต่ยังคงมีรายงานเพียงเล็กน้อยที่กล่าวว่าเกิดอะไรขึ้นในระบบทางเดินอาหาร โดยความจริงการเข้าไปอาศัยของโปรไบโอติกอาจกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารต่อต้านเชื้อโรต้าไวรัสที่มีความจำเพาะ (Azizpour และคณะ, 2009) ซึ่งโปรไบโอติกน่าจะสามารถช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้ มีการศึกษาที่ประสบความสำเร็จในการใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* GG ในการรักษาเด็กที่เป็นโรคภูมิแพ้เรื้อรัง (Isolauri และคณะ, 2000) และแพ้อาหาร (Kalliomki และคณะ, 2001) โดยผลชี้ให้เห็นว่าโปรไบโอติกอาจเข้าไปพัฒนาและสร้าง

เครื่องป้องกันในระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในมนุษย์บางคนพบว่าโปรไบโอติกอาจเข้าไปเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันได้ในรูปแบบของการเพิ่มระดับการขับสารต่อต้านเชื้อก่อโรคในร่างกาย (Marteau และคณะ, 1997)

6. การดูดซึมสารอาหาร ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่มีความซับซ้อนและมีเมแทบอลิซึมต่าง ๆ กัน หน้าที่เริ่มต้นของจุลินทรีย์คือการสร้างพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน ซึ่งจะทำให้เกิดการหมักและการดูดซึมผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น คือกรดไขมันสายสั้น โดยกรดไขมันสายสั้นซึ่งได้แก่ lactic acid, butyric acid และ propionic acid ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานในลำไส้ (บิวทิเรต) ตับ (โพรพิโอเนต) และกล้ามเนื้อ (อะซิเตท) Naidu และคณะ (1999) แสดงให้เห็นว่ากรดไขมันสายสั้น จะเป็นผลพลอยได้ในการสร้างพลังงานสะสมและแสดงกิจกรรมทางชีววิทยาของแลคติกเอซิดแบคทีเรีย การหมักของโปรตีนและไขมันในลำไส้ใหญ่จะช่วยเสริมสร้างปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ปลายลำไส้ใหญ่ เนื้อเยื่อเมือกของปลายลำไส้ใหญ่จะทำการดูดซึมกรดไขมันสายสั้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก ซึ่งอาจจะไปช่วยสนับสนุนการสร้างพลังงานให้แก่ผู้ถูกอาศัย ในขณะเดียวกันกรดไขมันสายสั้นบางตัวอาจจะช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อเยื่อเมือกของลำไส้ เช่น การที่กรดบิวทีริกแสดงผลในการช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอกในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้

ในการเลือกเชื้อแลคโตบาซิลัสเพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกต้องคำนึงถึงสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

1. เชื้อแลคโตบาซิลัสสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร การนำเชื้อแลคโตบาซิลัสมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้นั้น เชื้อดังกล่าวจำเป็นต้องมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ความเป็นด่างในลำไส้เล็ก และสามารถทนต่อน้ำดีได้ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสให้เชื้อสามารถมีชีวิตไปยังบริเวณลำไส้ใหญ่ (Begley และคณะ, 2005; Del Piano และคณะ, 2006)

2. ความไวต่อยาปฏิชีวนะ การทนต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแลคโตบาซิลัสมีความสำคัญในการเป็นโปรไบโอติก เพราะในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินอาหารโดยทั่วไปจำเป็นต้องให้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งส่วนใหญ่ยาดังกล่าวนอกจากจะไปทำลายเชื้อก่อโรคแล้วยังทำลายเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในร่างกาย แต่ถ้าหากเราได้รับเชื้อโปรไบโอติกที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ นอกจากเชื้อดังกล่าวจะมีชีวิตอยู่แล้วยังสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคซึ่งอาจส่งผลให้ความจำเป็นในการใช้ยาปฏิชีวนะลดลง (Danielsen และ Wind, 2003)

3. สามารถเกิด auto-aggregation และสร้าง surface hydrophobicity คุณสมบัติที่มีความจำเป็นของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาเป็นโปรไบโอติกได้ เชื้อต้องสามารถเกิด auto-aggregation ได้ เพราะการเกิด auto-aggregation ของเชื้อดังกล่าวทำให้เชื้อสามารถไปยึดเกาะกับเซลล์บริเวณลำไส้ใหญ่ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถแย่งพื้นที่บริเวณผนังลำไส้ในการจับของเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย ส่วนคุณสมบัติความเป็น surface hydrophobicity พบว่าเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวจะเข้าไปยึดเกาะกับเซลล์บริเวณลำไส้ใหญ่แล้วสร้างสาร biofilm เคลือบบริเวณดังกล่าวส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถมายึดเกาะกับเซลล์บริเวณลำไส้ใหญ่ได้ การเกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารก็จะลดลง (Dunne และคณะ, 2001; Vesterlund และคณะ, 2005)

4. สามารถเกิด co-aggregation กับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร การที่เชื้อมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนั้นจำเป็นต้องสามารถเกิด co-aggregation โดยไปจับกับเชื้อก่อโรคป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคจับกับผนังลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Zhou และคณะ, 2004) และเชื้อโปร

ไบโอติกมีความสามารถในการต่อต้านการเกาะ (antiadhesion) ของเชื้อก่อโรคบนผนังลำไส้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า competitive exclusion ซึ่งเป็นกลไกการต่อต้านการเกาะของเชื้อก่อโรคโดยเชื้อโปรไบโอติก นอกจากจะขัดขวางการเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารโดยตรงแล้ว เชื้อโปรไบโอติกยังผลิตสารซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารที่เข้าไป เช่น ก๊าซไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, กรดแลคติก, กรดไขมันสายสั้น และสารจำพวกแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Liliana และคณะ, 2008)

5. อัตราการรอดชีวิตที่เพียงพอและเหมาะสม การรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บผลิตภัณฑ์มีความสำคัญ เนื่องจากการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกมีผลต่อการป้องกันและรักษาโรค ซึ่งอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกจะต้องมีจำนวนเชื้อที่ตำแหน่งเป้าหมายปริมาณเพียงพอและเหมาะสม (Ljungh และ Wadstrom, 2006) การใช้เทคโนโลยีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) ในการเก็บรักษาเชื้อให้มีชีวิตอยู่ได้ในรูปแบบของผงแห้ง ซึ่งต้องอาศัยสารที่เป็น cryoprotectant และ lyoprotectant ในปริมาณที่เหมาะสมร่วมกับการออกแบบ product temperature cycle ของการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นกระบวนการผลิตที่ทำให้มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่ตำแหน่งเป้าหมายที่เพียงพอและเหมาะสม นอกจากนี้ต้องมีการบรรจุเชื้อในแคปซูลที่มีการเคลือบด้วยพอลิเมอร์ ซึ่งจะควบคุมให้สามารถปลดปล่อยได้ในลำไส้ใหญ่ (Sonaje และคณะ, 2010) โดยแคปซูลจะถูกเคลือบด้วยสารเคลือบที่ทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี แต่สามารถละลายในสภาพเป็นด่างได้ จึงทำให้เชื้อโปรไบโอติกไม่ถูกทำลายในสภาพกรดในกระเพาะอาหารก่อนเข้าสู่ลำไส้ (Wilding และ Bruce 2000) การเคลือบแคปซูลมีการใช้สารเคลือบพอลิเมอร์ร่วมกับสารพลาสติไซเซอร์ (plasticizer) พอลิเมอร์ที่นิยมใช้มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ เช่น polymethylmethacrylates (Eudragit®), อนุพันธ์พอลิเมอร์จากเซลลูโลส เช่น cellulose acetate phthalate (Aquateric®) หรืออนุพันธ์ของ polyvinyl เช่น polyvinyl acetate phthalate (Coateric®) เป็นต้น (Ewart และคณะ, 2002)

ถึงแม้ว่าในต่างประเทศจะมีการผลิตเภสัชภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปของผลิตภัณฑ์แคปซูลอย่างแพร่หลาย แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการพัฒนากระบวนการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างจริงจัง เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโปรไบโอติกมักจะประกอบด้วยหลากหลายสายพันธุ์ บริษัทผู้ผลิตเภสัชภัณฑ์ดังกล่าวมักจดสิทธิบัตรสายพันธุ์ที่ใช้ กระบวนการผลิตสายพันธุ์ต่าง ๆ ให้ได้มาตรฐาน รวมถึงจดสิทธิบัตรเทคโนโลยีในการผลิตและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วย เนื่องจากเชื้อดังกล่าวจำเป็นต้องมีชีวิต (live cell) จึงจะสามารถออกฤทธิ์ได้และจำเป็นต้องมีปริมาณมากพอในการออกฤทธิ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวจากสายพันธุ์ในประเทศไทย

<u>การสืบค้นตรวจสอบสิทธิบัตร</u>

1.ในประเทศ

จากการสืบค้นสิทธิบัตรไทย มีผู้ได้รับสิทธิบัตรเกี่ยวกับ probiotic, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* เป็นชาวต่างชาติเป็นส่วนใหญ่ โดยสามารถแบ่งการใช้ประโยชน์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ การเติม probiotic ลงในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณประโยชน์ (เลขที่สิทธิบัตรไทย 17943, 17944 และ 23388) การเตรียมแลคโตบาซลัสเป็นแบคทีเรียช่วยป้องกันอุจาระร่วงจากแบคทีเรียก่อโรค (เลขที่คำขอ 0001000704 และ 0001000705) และผลิตภัณฑ์ที่มี Lactic acid bacteria และ *Bifidobacterium* อยู่ในรูปผงแห้ง และพบสิทธิบัตรที่เป็นของคนไทยเพียง 1 เรื่อง

เกี่ยวกับ *Lactobacillus sakei* (เลขที่คำขอ 0601003687) ซึ่งระบุวิธีการกระบวนการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ดังนั้นนับว่าสิทธิบัตรเกี่ยวกับ probiotic ของประเทศไทยยังมีน้อยมาก

2. ต่างประเทศ

ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการจดสิทธิบัตรในเรื่องของจุลินทรีย์โปรไบโอติกอย่างแพร่หลาย ส่วนใหญ่จะเป็นการอ้างถึงคุณสมบัติของเชื้อโปรไบโอติกในการรักษาภาวะท้องเสีย ท้องร่วงอันเนื่องมาจากเชื้อกลุ่ม *Salmonella* (Patent number: 5308615, 5604127) รวมถึงมีจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับกระบวนการผลิตเชื้อโปรไบโอติกใน Genus ต่างๆ เช่น *Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Propionibacterium, Brevis bacterium, Penicillium* และ *Saccharomyces* (Patent number: 6080401, 6468525) ซึ่งแม้ว่าเชื้อโปรไบโอติกดังกล่าวจะมีจีนัส (genus) เหมือนกันแต่สายพันธุ์ (species) ในประเทศไทยอาจมีความแตกต่างกันซึ่งไม่มีผลต่องานวิจัยนี้ ในด้านกระบวนการผลิตที่ได้มีการจดสิทธิบัตรการผลิตโปรไบโอติกในลักษณะของ microencapsulated หรือ enteric coat ที่จะแตกตัวและออกฤทธิ์ในลำไส้ (Patent number: 6706287 และ 7101565) แต่อย่างไรก็ดี ส่วนประกอบอื่นๆ รวมถึงกระบวนการที่ใช้ในการผลิต enteric coat ก็ยังมีอีกหลายวิธี ซึ่งทำให้ไม่มีข้อจำกัดต่องานวิจัยนี้

7) วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อแลคโตบาซิลัสโดยวิธี spread plate (Mirlohi และคณะ, 2008)

1. แยกเชื้อแลคโตบาซิลัสจากอุจจาระของอาสาสมัครมีอายุระหว่าง 70-90 ปี มีสุขภาพแข็งแรงไม่มีประวัติการรับยาปฏิชีวนะและไม่เคยมีประวัติการเจ็บป่วยด้วยโรคทางเดินอาหารเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โดยเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบนอาหารแข็งเฉพาะที่ใช้เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัส (ROGOSA, Merck, USA) โดยวิธีกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. เลือกโคโลนีที่มีรูปร่างกลม สีขาวมาศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นโดยการย้อมแกรมซึ่งจะติดสีแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่ง และทดสอบการเกิดคะตะเลสเป็นลบกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน โดยวิธี overlay assay (Magnusson และ Schnüver, 2001)

1. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง ROGOSA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เขี่ยโคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสลงบนอาหารแข็ง Brain Heart Infusion (BHI, Difco, USA) (มีน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์) ให้เป็นวงกลมประมาณ 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานซึ่งได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ในอาหารเหลว BHI แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4. นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3 ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Difco, USA) ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว (10 มิลลิลิตร) ผสมกับอาหารเหลว BHI (100 มิลลิลิตร)

5. ดูดเชื้อที่ผสมกับอาหารคิดเป็นปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7CFU/ml เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่เลี้ยงไว้ จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

6. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานของแลคโตบาซิลัสจากขนาดของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

3. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร โดยวิธี overlay assay (Magnusson และ Schnüver, 2001)

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกบนอาหารแข็ง ROGOSA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เขี่ยโคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสลงบนอาหารแข็ง BHI (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์) ให้เป็นวงกลมประมาณ 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. เลี้ยงเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารซึ่งได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* และ *Vibrio cholerae* ในอาหารเหลว BHI แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4. นำเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารที่ได้ไปปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว (10 มิลลิลิตร) ผสมกับอาหารเหลว BHI (100 มิลลิลิตร)

5. ดูดเชื้อที่ผสมกับอาหารคิดเป็นปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 CFU/ml เทลงบนบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่เลี้ยงไว้ แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

6. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของเชื้อก่อโรคของแลคโตบาซิลัสจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น

4. การจำแนกของเชื้อแลคโตบาซิลัสโดย API 50 CHL kit

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสในอาหารเหลว de Man Rogosa Sharpe broth (MRS, Difco, USA) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อจากข้อ 1 ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 2.0 McFarland ด้วย PBS ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6×10^8 CFU/ml

3. เติมเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วลงใน API 50 CHL kit จากนั้นปิดทับด้วย mineral oil เพื่อให้เชื้อแลคโตบาซิลัสอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนแล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. สังเกตสีที่เกิดขึ้นซึ่งจะให้ผลเป็นบวกเมื่อ API 50 CHL kit เปลี่ยนสีจากม่วงเป็นสีเหลือง

5. การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสโดยใช้ identification software database (version 5.0, https://apiweb.biomeriueux.com)

5. ตรวจวิเคราะห์หาสปีชีส์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสโดยเทคนิก 16s rRNA (Kaewsrichan และคณะ, 2006)

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่เลี้ยงได้จากข้อที่ 1 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

3. นำตัวเชื้อ (cell pellet) ที่ได้จากข้อที่ 2 กระจายตัวในสารละลายตัวที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris pH 8 และ 50 mM EDTA จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที

4. เติมสารละลายตัวที่ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (250 mM Tris pH 8) จากนั้นนำไปละลายที่อุณหภูมิห้องและนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที

5. เติมสารละลายตัวที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (0.5 % SDS, 50 mM Tris 7.5 และ 0.4 M EDTA) และเติมเอนไซม์ protenase K เพื่อย่อยโปรตีน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. เติมสารละลายที่ประกอบด้วย Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 ตามลำดับ ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่างและนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที

7. นำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่

8. เติมสาร sodium acetate (3 M) ปริมาตร 0.1 เท่าของตัวอย่างในข้อ 7 และเติม absolute alcohol ปริมาตร 1.5 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า

9. นำตัวอย่างที่ได้จากข้อที่ 9 ไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 45 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

10. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ultra-pure water ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร

11. ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 มิลลิเมตร

12. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์:

LacAII-F(5'-TGCCTAATACATGCAAGTC-3')

และ

LacAII-R (5'-CCTTGTTACGACTTCACC-3')

โดยใช้เครื่อง Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 9600 จำนวน 35 รอบ ตั้งโปรแกรม PCR running condition ดังนี้

Initial denature	94°C	เป็นเวลา	5	นาที
Denature	94°C	เป็นเวลา	45	วินาที
Annealing	50°C	เป็นเวลา	1	นาที
Extension	72°C	เป็นเวลา	2	นาที
Final extension	72°C	เป็นเวลา	7	นาที

13. ตรวจสอบขนาดสายดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี electrophoresis ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ 200 โวลท์ กระแสไฟฟ้า 50 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 60 นาที โดยมี 1% agarose gel ทำหน้าที่เป็นตะแกรงคัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,500 base pair และใช้ 1 Kb DNA ladder เป็น marker นำแผ่นเจลไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation ภายหลังจากย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำเป็นเวลา 5 นาที

14. นำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ GFXTM Purification Kit (Amersham Biosciences, USA)

15. เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดชุด p-GEM โดยใช้ Specific primer T7 และ Sp6

T7 5' –AAT ACG ACT CAC TAT AGG– 3'

และ

Sp6 5' – GAT TTA GGT GAC ACT ATA G– 3'

16. นำ sequence ที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

17. วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างและความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการ BLAST Search ในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank

6. ศึกษาความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกบนอาหารแข็ง ROGOSA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เขี่ยโคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่เลี้ยงไว้ในข้อที่ 1 จำนวนหนึ่งโคโลนี streak ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีส่วนผสมของสารอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.01 mg/ml horseradish peroxidase และ 0.25 mg/ml tetramethyl benzidine แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าววางให้สัมผัสอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. สังเกตการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสได้จากการเปลี่ยนสีของโคโลนีจากสีขาวเป็นสีน้ำเงินจนถึงสีดำ

7. ศึกษาชนิดและปริมาณของ lactic acid และ short chain fatty acid

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

3. นำสารละลายส่วนใส (cell suspension) ที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสาร lactic acid และสาร short chain fatty acid ซึ่งได้แก่ acetic acid, propionic acid และ butyric acid โดยวิธี gas chromatography (HP 6850) ซึ่งใช้สภาวะดังนี้

3.1 Flame ionization detector (FID); Innowax capillary column (Restex Packard 10623, USA.) (length: 30 m, internal diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm)

3.2 Carrier gas; Nitrogen (30 ml/min), air (30 ml/min)

3.3 Flammable gas mixture; Hydrogen (30ml/min)

โดยตั้งค่าอุณหภูมิของ Injection port, column และ detector temperatures ที่ 300, 250 และ 250°C ตามลำดับ

8. ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี agar diffusion (Klare และคณะ, 2007)

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อจากข้อ 1 ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

3. นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วมา streak บนอาหารแข็ง MRS ให้ทั่ว

4. นำ antibiotic disc ซึ่งได้แก่ penicillin G (10 units), ampicillin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), erythromycin (15 μg), neomycin (30 μg), tetracycline (30 μg) และ doxycycline (30 μg) วางบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3 จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแลคโตบาซิลัสจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นโดยเทียบค่าวงใสกับค่ามาตรฐาน

9. ศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

9.1 ศึกษาการทนกรดและทนด่างในระบบทางเดินทางอาหารโดยใช้ upper gastrointestinal tolerance assay (Huang และ Adams, 2004)

9.1.1 การทนต่อ Simulated gastric fluid (SGF)

1. ละลายเอนไซม์ pepsin (8,000 unit) ด้วย PBS (pH 7.4) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3 g/l จากนั้นปรับพีเอสให้ได้ 2, 3 และ 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (0.1 M)

2. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

4. นำตัวเชื้อ (cell pellet) กระจายตัวใน PBS (pH 7.4) จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

5. ดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมลงในเอนไซม์ pepsin ปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่พีเอชต่าง ๆที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°Cในสภาวะปราศจากออกซิเจน และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

5. ศึกษาดูการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS

9.1.2 การทนต่อ Simulated intestinal fluid (SIF)

1. ละลาย pancreatin (USP) ด้วย PBS (pH 7.4) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 g/l จากนั้นปรับพีเอชให้เท่ากับ 8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M)

2. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

4. นำตัวเชื้อกระจายใน PBS (pH 7.4) จากนั้นนำไปปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

5. ดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมารต 1 มิลลิลิตร เติมลงในเอนไซม์ pancreatin ปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่พีเอชต่าง ๆที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

6. ศึกษาดูการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS

9.1.3 การทนต่อกรดน้ำดี

1. ละลายกรดน้ำดี (oxgall) ใน PBS (pH 7.4) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.3% (w/v)

2. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

4. นำตัวเชื้อกระจายใน PBS (pH 7.4) จากนั้นนำไปปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

5. ดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายกรดน้ำดีปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

6. ศึกษาดูการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS

9.2 ศึกษาการเกิด auto-aggregation (Alander และคณะ, 1999)

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่ อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

3. นำเชื้อที่ตกตะกอน (cell pellet) กระจายตัวใน PBS (pH 7.4) จากนั้นนำไปปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

4. นำสารละลายส่วนใส (cell suspension) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์

5. ดูการเกิด auto-aggregation ของเชื้อแลคโตบาซิลัสภายใน 2 นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อแลคโตบาซิลัสจะมีความสามารถในการรวมตัวกันได้ดีเมื่อเทียบกับเชื้อที่ไม่สามารถเกาะกลุ่มกันได้เป็น control ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เชื้อ *L. cellobiosus* เป็นเชื้อ negative control

9.3 ศึกษาการเกิด surface hydrophobicity (Alander และคณะ, 1999)

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวเชื้อ (cell pellet) กระจายตัวด้วย 0.02 M sodium phosphate

3. นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อที่ 2. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ ammonium sulfate ในปริมาตรเท่ากัน (0.5 มิลลิลิตร) โดยความเข้มข้นของ ammonium sulfate เท่ากับ 0.5, 1.5, 2.0 และ 4.0 M ตามลำดับ

4. นำเชื้อที่ผสมกับ ammonium sulfate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หยดลงบนแผ่นสไลด์

5. ดูการเกิด auto-aggregation ของเชื้อแลคโตบาซิลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า เพื่อดูการเกิด surface hydrophobicity ของเชื้อแลคโตบาซิลัส ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่มโดยใช้ความเข้มข้นของ ammonium sulfate ในการเกิด auto-aggregation ดังนี้

กลุ่มที่ 1 High surface hydrophobicity ที่ความเข้มข้น ammonium sulfate < 0.9 M

กลุ่มที่ 2. Intermediate hydrophobicity ที่ความเข้มข้น ammonium sulfate 0.9 -1.5 M

กลุ่มที่ 3. Hhydrophilic ที่ความเข้มข้น ammonium sulfate >1.5 M

9.4 ศึกษาการเกิด co-aggregation กับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร (Alander และคณะ, 1999)

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เลี้ยงเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E.coli, S. typhimurium, S. sonnei, S. aureus* และ *V.cholerae*) ในอาหารเหลว BHI และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

4. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารกระจายตัวใน PBS (pH 7.4) จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย PBS ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

5. นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วของเชื้อแลคโตบาซิลัสผสมกับเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

6. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 5 ย้อมสีแกรม

7. ดูการเกาะกลุ่มกันของเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายเท่ากับ 100 เท่า ซึ่งเชื้อแลคโตบาซิลัสจะเข้าไปจับกับเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้

9.5 ศึกษาความสามารถในการเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของเชื้อแลคโตบาซิลัส

9.5.1 การเตรียม Caco-2 cell line

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 epithelial cell line ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's minimal essential medium (MEM, Gibco, USA) ที่มีส่วนผสมของ 15% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) และ 100 unit/ml penicillin G และ streptomycin sulfate จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ 5% CO_2

2. กระจายเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว ด้วย 0.5% trypsin จากนั้นปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 1,250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

3. นำเซลล์เดี่ยว ที่เตรียมได้จากข้อ 2 จำนวน $4.5x10^5$ cells/well มาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ 5%CO_2 เป็นเวลา 14 วัน

9.5.2 การเตรียมเชื้อแลคโตบาซิลัส

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้จากข้อ 1 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

3. นำตัวเชื้อที่ได้จากข้อ 2 กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งได้ปริมาณของเชื้อเท่ากับ 10^6 CFU/ml

9.5.3 ศึกษาการยึดเกาะของเชื้อแลคโตบาซิลัส

1. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ Caco-2 ที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. ดูดเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ทิ้งแล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเซลล์ Caco-2 ด้วย 0.05% Triton X-100 แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที

3. ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสบนเซลล์ Caco-2 โดยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS

4. การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อ *L. casei* TITR 1463 เป็น positive control และใช้เชื้อ *L. cellobiosus* เป็น negative control

5. ดูลักษณะเซลล์แลคโตบาซิลัสเมื่อเกาะอยู่บนเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

9.6 ศึกษาการยับยั้งการเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารโดยเชื้อแลคโตบาซิลัส

9.6.1 การเตรียมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

1. เลี้ยงเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E.coli* และ *V. cholera*) ในอาหารเหลว BHI และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2. นำเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารที่ได้จากข้อ 1 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

3. นำตัวเชื้อที่ได้จากข้อ 2 กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วยอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งได้ปริมาณของเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml

9.6.2 ศึกษาการยับยั้งการเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารโดยเชื้อ แลคโลบาซิลัส

ในการศึกษาได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 กลุ่มดังต่อไปนี้

1. ศึกษาการเกิด Exclusion

1. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

2. เติมเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. ดูดเชื้อที่ไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ทิ้งแล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเซลล์ Caco-2 ด้วย 0.05% Triton X-100 แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที

4. ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารบนเซลล์ Caco-2 โดยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลัสและบนอาหารแข็ง BHI สำหรับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร

5. ดูลักษณะเซลล์แลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารบนเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

2. ศึกษาการเกิด Competition

1. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารที่ปรับความขุ่นแล้วเติมลงไปในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ที่เตรียมไว้ซึ่งจะเติมลงไปพร้อมกันทั้งสองเชื้อ จากนั้นนำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ข้างต้นไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. ดูดเชื้อที่ไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ทิ้งแล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเซลล์ Caco-2 ด้วย 0.05% Triton X-100 แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที

3. ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารบนเซลล์ Caco-2 โดยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลัสและบนอาหารแข็ง BHI สำหรับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร

4. ดูลักษณะเซลล์แลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารบนเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

3. ศึกษาการเกิด Displacement

1. นำเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

2. เติมเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ข้างต้นไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. ดูดเชื้อที่ไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ทิ้งแล้วล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นย่อยเซลล์ Caco-2 ด้วย 0.05% Triton X-100 แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที

4. ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารบนเซลล์ Caco-2 โดยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลัสและบนอาหารแข็ง BHI สำหรับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร

5. ดูลักษณะเซลล์แลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารบนเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

10. ศึกษาความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล

10.1 การเตรียมเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปผงแห้ง

1. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือกในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

3. กระจายตัวเชื้อในสารละลาย 8% น้ำตาลแลคโตส

4. นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3 ทำให้แห้งโดยวิธี Freeze dry โดยลดอุณหภูมิลงจนทำให้น้ำที่เป็นองค์ประกอบแข็งตัวกลายเป็นน้ำแข็ง ซึ่งอุณหภูมิจะต่ำถึง -40°C จากนั้นน้ำแข็งระเหิดกลายเป็นไอน้ำโดยการลดความดันลงเพื่อดึงเอาน้ำจากน้ำแข็งออก ซึ่งน้ำแข็งจะระเหิดไปหมด และจากนั้นดูดความชื้นหรือน้ำที่จับอยู่กับสารตัวอย่างเพื่อลดปริมาณความชื้น ซึ่งจะได้เป็นตัวอย่างที่แห้งและมีรูพรุน

5. ดูอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสก่อนและหลังการทำแห้งโดยวิธีวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS

10.2 การเตรียมเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล

1. นำเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ผ่านกระบวนการ Freeze dry มาบรรจุใส่ลงในแคปซูลเบอร์ 1 แคปซูลละ 125 มิลิกรัม ด้วยเครื่อง Capsule Filling Machine-Model (Prolabo, France) จำนวน 5,000 แคปซูล

2. นำแคปซูลที่มีเชื้อแลคโตบาซิลัสไปเคลือบผิวโดยเทคนิค Enteric coat ด้วย Eudragit® L-100 ซึ่งสูตรในการเคลือบประกอบด้วย ดังนี้

Eudragit® L-100	12 %
Propylene glycol	3 %
Sorbitan monooleate	1 %
Ethyl alcohol	45 %
Acetone	39 %

3. เคลือบแคปซูลด้วยเครื่อง spray gun ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวฉีดเท่ากับ 1.0 มิลลิเมตร (Walther Pilot, Germany) ที่อัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที ในเครื่อง convention coating pan

4. นำสาร Acetone ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สเปรย์ลงไปในเครื่องเคลือบเพื่อให้แคปซูลแวววและมีความเรียบ จากนั้นเป่าด้วยความลมร้อนที่อุณหภูมิ 40°C เพื่อให้แคปซูลแห้งเป็นเวลา 10 นาที

5. เก็บแคปซูลที่ผ่านการเคลือบผิวแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทดสอบความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัสต่อไป

10.3 ศึกษาความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัส

1. นำแคปซูลที่บรรจุเชื้อแลคโตบาซิลัส และเคลือบผิวด้วย 12% Eudragit®L-100 จำนวน 100 แคปซูล บรรจุในขวดที่ทึบแสง

2. เก็บขวดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. ดูอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสในแคปซูลที่เก็บไว้โดยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS ที่เวลา 0, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน

10.4 ศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล

การศึกษาความสามารถในการป้องกันแคปซูลไม่ให้ปลดปล่อยตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสในสภาวะเป็นกรดในกระเพาะอาหารแต่สามารถปลดปล่อยตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสดังกล่าวออกจากแคปซูลได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะเป็นด่างในระบบลำไส้เมื่อเคลือบแคปซูลด้วย 12%Eudragit®L-100 ในการศึกษาการปลดปล่อยเชื้อแลคโตบาซิลัสในครั้งนี้ใช้เทคนิค dissolution method ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำแคปซูลบรรจุตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสและเคลือบผิวด้วย12% Eudragit®L-100 จำนวน 900 แคปซูลใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสภาวะกรดในกระเพาะอาหารที่พีเอช 1.2 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C และหมุนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. นำแคปซูลบรรจุตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสและเคลือบผิวด้วย12% Eudragit®L-100 จำนวน 900 แคปซูลใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสภาวะด่างในลำไส้ที่พีเอช 7.4 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C และหมุนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

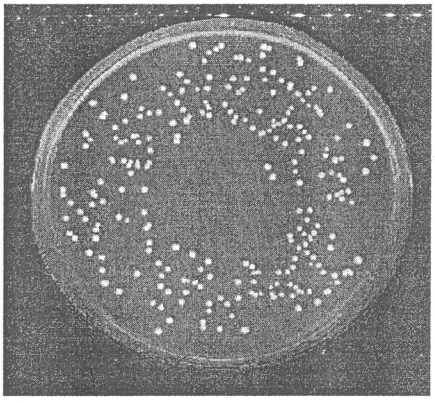
3. สังเกตการแตกตัวและการละลายของตัวแคปซูลในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารซึ่งตัวแคปซูลจะต้องไม่มีการแตกตัวและละลายในสภาวะดังกล่าวเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงเพื่อป้องกันตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสจากสภาวะกรด ส่วนในสภาวะความเป็นด่างในลำไส้ตัวแคปซูลจะต้องสามารถแตกตัวและละลายเพื่อปลดปล่อยตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสออกมาจากแคปซูลได้อย่างสมบูรณ์

4. ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่สภาวะต่างๆ ด้วยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS

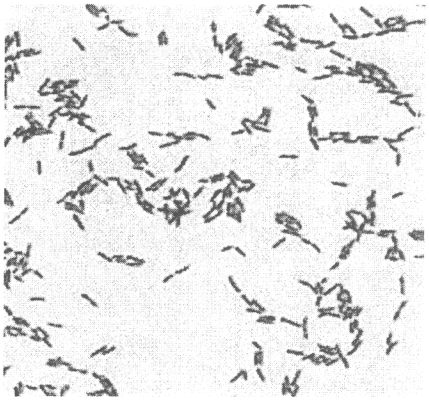
8) ผลการดำเนินงานตลอดโครงการ

1. ผลการแยกเชื้อแลคโตบาซิลัส

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกเชื้อแลคโตบาซิลัสจากอุจจาระของอาสาสมัครที่เป็นผู้สูงอายุ และมีสุขภาพดี จำนวน 30 คน นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง ROGOSA พบว่าโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวมีลักษณะกลมนูนและมีสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 1 (ก) เมื่อทำการสุ่มเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันของแต่ละคนมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อแลคโบซิลัสหรือไม่ โดยนำเชื้อดังกล่าวมาย้อมแกรม และทดสอบการเกิดคะตะเลส (catalase) พบว่าจากโคโลนีที่ได้รับการคัดเลือกจำนวน 169 โคโลนี ติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (รูปที่ 1 (ข)) และให้ผลคะตะเลสเป็นลบ



ก



ข

รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแลคโบซิลัสที่แยกได้จากอุจจาระของผู้สูงอายุสุขภาพดีบนอาหารแข็ง ROGOSA (ก) และลักษณะของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ติดสีแกรมบวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (ข)

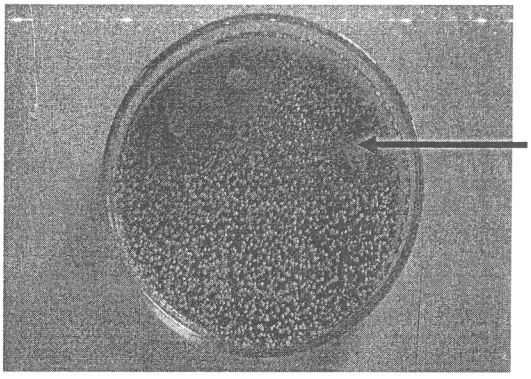
2. ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3)

นำโคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานซึ่งได้แก่เชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 โดยวิธี overlay assay พบว่า เชื้อที่แยกได้ไอโซเลท T12/4, T13/1, T13/3, T13/5, T17/4 และ T23/3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 ซึ่งมีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 9 - 20 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 ในขณะที่รูปที่ 2 แสดงลักษณะการเกิด inhibition zone ของเชื้อแลคโตบาซิลัสกับเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 ส่วน 163 โคโลนีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่มีค่า inhibition zone น้อยกว่า 6.5 mm และโคโลนีที่

ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากการทดลองข้างต้นทางผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลัสไอโซเลท T23/3 เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกด้านอื่น ๆ ต่อไป

ตารางที่ 1 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานของโคโลนีที่มีคุณลักษณะเป็นเชื้อแลคโตบาซิลัส

Isolates on.	Inhibition zone (mm) (mean ± sd), n = 4	
	S. aureus ATCC25923	*E. coli* ATCC25922
T13/4	13.2 ± 0.1	9.9 ± 0.1
T13/1	13.5 ± 0.1	10.2 ± 0.1
T13/3	13.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2
T13/5	13.2 ± 0.1	10.0 ± 0.1
T17/4	10.5 ± 0.2	9.0 ± 0.2
T23/3	20.0 ± 0.2	17.8 ± 0.5



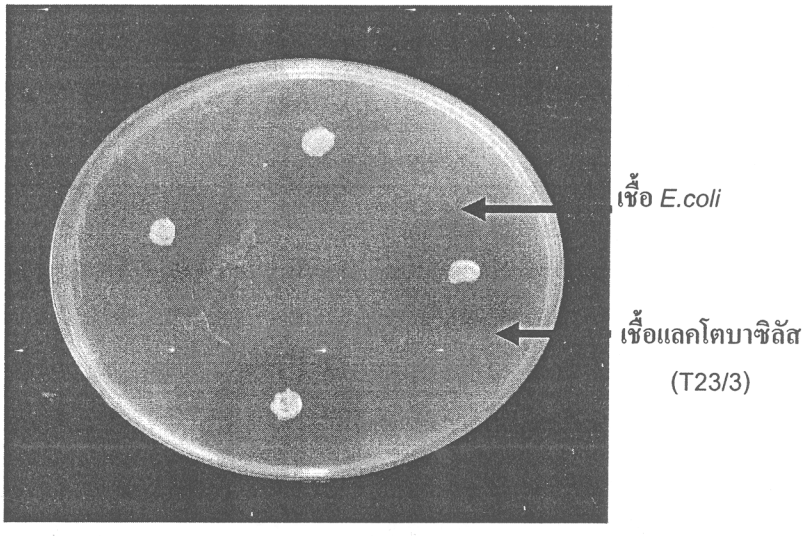
รูปที่ 2 ลักษณะการเกิด inhibition zone ของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่แยกได้จากอุจจาระของผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดีโดยวิธี overlay assay

เชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่ได้รับการคัดเลือกมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารซึ่งได้แก่ เชื้อ *S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *E. coli* และ *V. cholerae* โดยวิธีการ overlay assay จากการศึกษาพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิดได้เป็นอย่างดีโดยได้ค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 36-38 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3 เป็นลักษณะการเกิด inhibition zone ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่ได้รับการคัดเลือกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดิน ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) มีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้ดีทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อแลคโตบาซิลัสจะมีกระบวนการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ

เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้กลไกการลดลงของพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสารดังกล่าวได้แก่ lactic acid, short chain fatty acids (acetic acid, butyric acid และ propionic acid) ทำให้เชื้อก่อโรคที่เจริญในสภาวะเป็นกลางหยุดการเจริญเติบโต นอกจากนี้เชื้อแลคโตบาซิลัสสามารถรบกวนการผ่านเข้าออกของสารในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งสารดังกล่าวได้แก่สาร bacteriocin และอีกกลไกคือ เชื้อแลคโตบาซิลัสสามารถผลิตสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ซึ่งได้แก่สาร hydrogen peroxide เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาข้างต้นมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Liliana และคณะ (2008) พบว่าเชื้อ *L. rhamnosus* L60 ที่แยกได้จากช่องคลอดของคน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Reid และคณะ (2004) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสมีกลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร โดยผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคซึ่งได้แก่สาร lactic acid, short chain fatty acid, hydrogen peroxide และ bacteriocin เป็นต้น

ตารางที่ 2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) โดยวิธี overlay assay

Gastrointestinal pathogens	Inhibition zone (mean ± sd), n=4
S. typhimurium	**38.0 ± 0.7**
S. sonnei	**36.6 ± 0.8**
S.aureus	**37.8 ± 0.4**
E.coli	**38.8 ± 0.8**
V. cholerae	**37.8 ± 0.8**



รูปที่ 3 ลักษณะการเกิด inhibition zone ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3)ที่ได้รับการคัดเลือกกับเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E.coli*) โดยวิธี overlay assay

3. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลัส

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสเบื้องต้นจะใช้วิธีการย้อมแกรม การทำลายสารกลุ่มไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญอยู่บนอาหารที่จำเพาะต่อเชื้อแลคโตบาซิลัส ซึ่งเชื้อแลคโตบาซิลัสจะมีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง ROGOSA เมื่อย้อมแกรมจะพบว่าติดสีแกรมบวก รูปแท่งให้ผลคะตะเลสเป็นลบแต่จากคุณสมบัติข้างต้นสามารถบอกสายพันธุ์ของเชื้อได้ในระดับจีนัสเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากในจีนัสของเชื้อแลคโตบาซิลัส ประกอบไปด้วยเชื้อ *Lactobacillus* หลากหลายสายพันธุ์ (specics) (Balcazer และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคที่มีความจำเพาะมากกว่าในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวโดยใช้หลักการทางด้านชีวเคมี ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธี API 50 CHL assay ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการหมักน้ำตาลของเชื้อแลคโตบาซิลัสโดยจะเปลี่ยนสีของน้ำตาลที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์จากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองซึ่งจะอ่านผลเป็นบวกดังแสดงในภาคผนวก ก จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่ได้รับการคัดเลือกเป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ plantarum (*L. plantarum*) ที่ระดับความเชื่อมั่น 93.0 เปอร์เซ็นต์ แต่วิธีดังกล่าวมีปัญหาในการแปรผลเนื่องจากความไม่เสถียรในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อแลคโตบาซิลัสเอง รวมทั้งความแตกต่างทางคุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการและต้องอาศัยการควบคุมตัวแปรทางสิ่งแวดล้อมอาทิ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อทำให้การแปรผลเกิดความแปรปรวน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเทคนิคการวิเคราะห์ระดับยีนมาทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันสปีชีส์ของเชื้อแลคโตบาซิลัส ซึ่งเทคนิคที่เลือกใช้คือ 16S rRNA ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสโดยใช้ NCBI GenBank เป็นฐานข้อมูลในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาสปีชีส์ของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้ว่าในสปีชีส์จะมีความใกล้ชิดกันและมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่เทคนิคดังกล่าวที่มีความสูงแม่นยำ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว (Dickson และคณะ, 2005; Teanpaisan และ Dahlen, 2006) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) เมื่อเทียบกับข้อมูล BLAST Search ในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank เป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ plantarum (*L. plantarum*) (GenBank accession no. HM 051157) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.0 เปอร์เซนต์ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแลคโตบาซิลัสดังแสดงในภาคผนวก ข ซึ่งจากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสรหัส T23/3 ดังกล่าวเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล

4. ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเชื้อแลคโตบาซิลัส

สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่เชื้อแลคโตบาซิลัสบางสปีชีส์เท่านั้นที่สามารถผลิตได้ จากการศึกษาของ Maria และคณะ (2006) พบว่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เชื้อแลคโตบาซิลัสผลิตขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้เป็นอย่างดีทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ผลิต lactic acid จะไม่มีฮีม (heme) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ระบบ cytochrome เพื่อเปลี่ยนออกซิเจนให้เป็นน้ำในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ แต่จะใช้ flavoproteins เปลี่ยนออกซิเจนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แทนดังนั้นเนื่องจากเชื้อในกลุ่มดังกล่าวไม่มีเอนไซม์ catalase จึงไม่สามารถทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ สารดังกล่าวจึงถูกปล่อยออกมานอกเซลล์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียอื่น ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Tomas และคณะ, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้โดยโคโลนีของเชื้อเป็นสีม่วงเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีส่วนประกอบของ tetramethylbenzidine (TMB) และ horseradish peroxidase โดย horseradish peroxidase จะออกซิไดซ์กับสาร TMB ทำให้โคโลนีของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่สามารถผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีม่วง

5. ความสามารถในการผลิต lactic acid และ short chain fatty acid ของเชื้อแลคโตบาซิลัส

ในการศึกษาความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่ได้รับการคัดเลือกในการผลิตสาร lactic acid และสารในกลุ่ม short chain fatty acid ซึ่งได้แก่ acetic acid, butyric acid และ propionic acid โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าวพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถผลิตสาร lactic acid, acetic acid, butyric acid และ propionic acid ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 162.49, 149.26, 5.77 และ 16.16 mmol/mol ของกลูโคส ตามลำดับดังแสดงเป็นโครมาโตแกรมในภาคผนวก ค ซึ่งจากการศึกษาข้างต้นพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบได้เป็นอย่างดีทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถผลิตสาร lactic acid และสารในกลุ่ม short chain fatty acid ซึ่งสารดังกล่าวมีกลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกจะได้กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กโดยเกิดควบคู่กับการลดลงของค่าพีเอช ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค การสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อเชื้อก่อโรคชนิดอื่นทั้งนี้เนื่องจากกรดอินทรีย์ทั้งกรดอะซิติกและกรดแลคติกเมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรคในส่วนของฟอสโฟลิพิดได้ส่งผลให้ภายในเซลล์ของเชื้อก่อโรคมีค่าพีเอชสูงกว่าภายนอกและเกิดการแตกตัวของกรดให้ไอออนลบและโปรตอนซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นเช่น substrate translocation และ oxidative phosphorylation เป็นต้น (Gill และ Rowland, 2002)

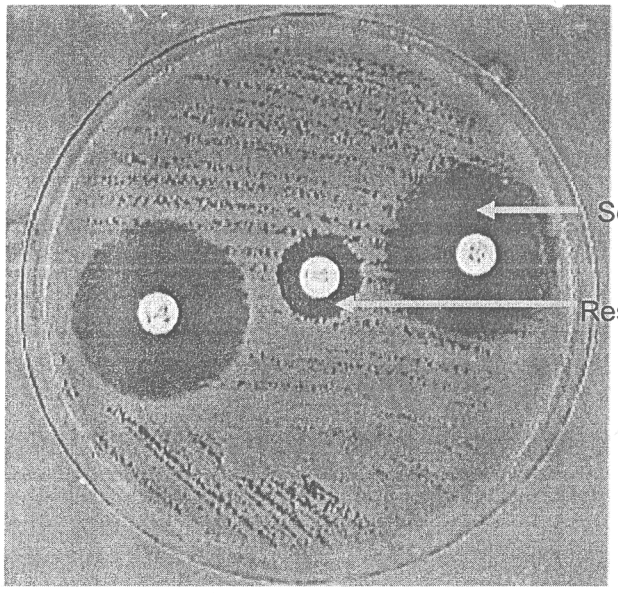
6. ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแลคโตบาซิลัส

การทนต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแลคโตบาซิลัสมีความสำคัญในการเป็นโปรไบโอติก เพราะในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินอาหารโดยทั่วไปจำเป็นต้องให้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งส่วนใหญ่ยาดังกล่าวนอกจากจะไปทำลายเชื้อก่อโรคแล้วยังทำลายเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในร่างกาย แต่ถ้าหากเราได้รับเชื้อโปรไบโอติกที่ทนต่อยาปฏิชีวนะนอกจากเชื้อดังกล่าวจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้แล้วยังสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคซึ่งส่งผลให้การใช้ยาปฏิชีวนะลดลง (Danielsen และ Wind, 2003) การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีพื้นฐานมาจาก 2 ปัจจัยด้วยกันคือ การมียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และการปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ ซึ่งยีนต้านทานยาปฏิชีวนะที่มีอยู่เองของแบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะโดยไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่น ๆได้ ส่วนความต้านทานยาปฏิชีวนะที่แบคทีเรียได้รับมาอาจมีการถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นได้ ความต้านทานที่ได้รับมาช่วยให้แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้เนื่องจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ

จีโนม หรือการได้รับยีนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะช่วยให้เกิดการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียได้เนื่องจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการเข้าจับของยาปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid ไปสู่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (Mathur และ Singh, 2005) เชื้อแลคโตบาซิลัสบางสายพันธุ์มียีนต้านทานที่มีอยู่เองซึ่งสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเช่น bacitracin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim หรือ sulphamethoxazole และ vancomycin (Danielsen และ Wind, 2003) นอกจากนี้หลาย ๆ สายพันธุ์ของเชื้อ *L. salivarius* มียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นยีนที่มีอยู่เอง และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin (Elisha และ Courvalin, 1995) และ D'Aimmo และคณะ (2007) รายงานว่า ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อโปรไบโอติก เป็นความสามารถของเชื้อในการที่จะอยู่รอดได้เมื่อเจ้าบ้านได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ จากการศึกษาความไวของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 7 ชนิดโดยวิธี disk diffusion assay พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ดื้อต่อยา erythromycin, doxycycline, penicillin G, neomycin และ tetracycline ในขณะที่เชื้อดังกล่าวไวต่อยา ampicillin และ chloramphenicol (ตารางที่ 3) และลักษณะการเกิด inhibition zone แบบไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Graul และคณะ (2009) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสส่วนใหญ่ไวต่อ ampicillin และ chloramphenicol และมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Maria และคณะ (2006) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* (LP-A22) ดื้อต่อยา Tetracycline และมีความไวต่อยา Ampicillin

ตารางที่ 3 การศึกษาความไวของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion assay

Antibiotics	Susceptibility
Ampicillin (10 µg)	**S**
Chloramphenicol (30 µg)	**S**
Erythromycin (15 µg)	**R**
Doxycycline (30 µg)	**R**
Penicillin G (10 units)	**R**
Neomycin (30 µg)	**R**
Tetracycline (30 µg)	**R**



รูปที่ 4 ลักษณะการเกิด inhibition zone ของยาปฏิชีวนะแบบ resistant และแบบ sensitive กับเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) โดยวิธี disc diffusion method

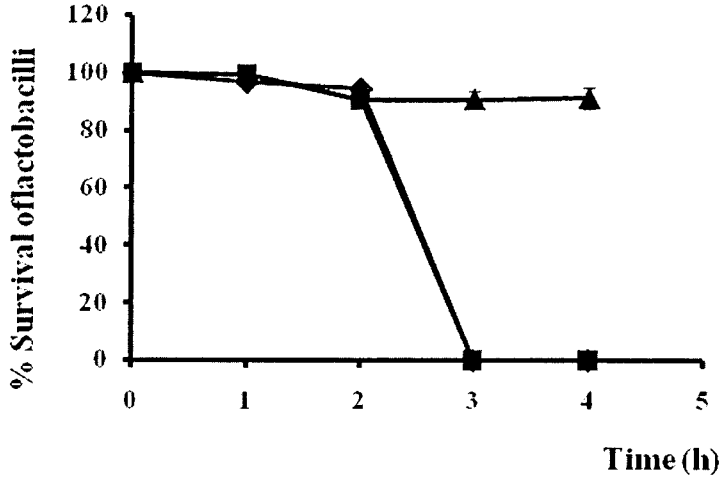
7. คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

7.1. การทนกรดและทนด่าง ในระบบทางเดินอาหาร

7.1.1 การทนต่อ Simulated gastric fluid (SGF) และ Simulated intestinal fluid (SIF)

การนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้เป็นโปรไบโอติกได้นั้น เชื้อดังกล่าวจำเป็นต้องมีชีวิตอยู่ในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและความเป็นด่างในลำไส้เล็กได้ ทั้งนี้เพื่อจะได้ไปออกฤทธิ์ที่บริเวณลำไส้ใหญ่โดยอาศัยกลไกในการรักษาระดับพีเอชของเชื้อแบคทีเรียโดยการปล่อยโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ H^+- ATPase และใช้พลังงานจาก ATP โดยค่าพีเอชที่ต่ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียต้องใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นเพื่อรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ให้อยู่ในภาวะสมดุล (Huang และ Adams, 2004) ในขณะเดียวกันที่บริเวณลำไส้เล็กประกอบด้วยเกลือน้ำดีและ pancreatin ซึ่งในบริเวณนี้มีค่าพีเอชประมาณ 8.0 ซึ่งเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็วเป็นเหตุให้โปรตีนแทรกที่เยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) แยกออกมาส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาและเซลล์ตายไปในที่สุด (Begley และคณะ, 2005) ซึ่งในการศึกษาการทนอยู่ใน SGF ที่พีเอชเท่ากับ 2.0, 3.0 และ 4.0 และการทนอยู่ใน SIF ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) พบว่าในสภาวะ SGF ที่พีเอชเท่ากับ 2.0 และ 3.0 เชื้อดังกล่าวสามารถมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 2 ชั่วโมง ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 4.0 เชื้อดังกล่าวมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 5 ส่วนการทดสอบการทนในสภาวะ SIF ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 3 ชั่วโมง (รูปที่ 6) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและความเป็นด่างในลำไส้เล็กได้ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Begley และคณะ (2005) และการศึกษาของ Del Piano และคณะ (2006) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะ

ความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และความเป็นด่างในลำไส้เล็ก ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสมีชีวิตที่บริเวณลำไส้ใหญ่เพื่อออกฤทธิ์ที่บริเวณดังกล่าว

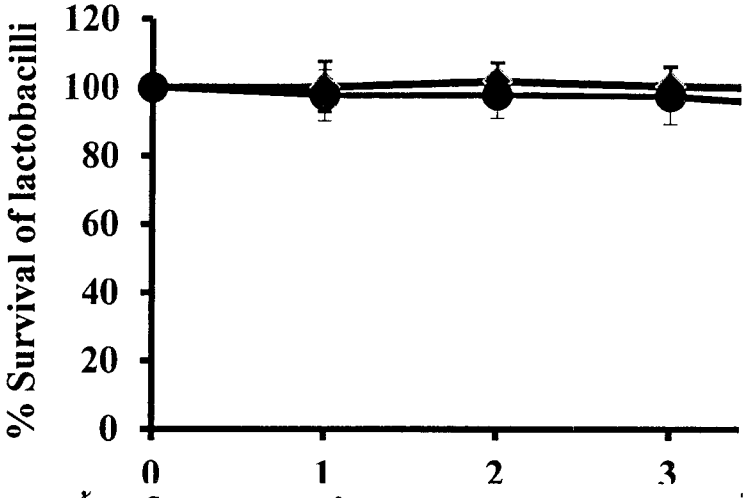


รูปที่ 5 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในสภาวะ simulated gastric fluid ที่พีเอชเท่ากับ 2.0 (◆), 3.0 (■) และ 4.0 (▲) (mean ± sd, n = 6)

7.1.2 การทนต่อกรดน้ำดี

การทนต่อกรดน้ำดีในระบบทางอาหารเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาพัฒนาเป็นโปรไบโอติกได้ต้องสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีกรดน้ำดีในบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นทั้งนี้เพื่อให้ไปออกฤทธิ์ที่บริเวณลำไส้ใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากกรดน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ (Taranto และคณะ, 2006) น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Wu และคณะ, 2009) ซึ่งในคนปกติมีเกลือน้ำดีชนิด glycine conjugated โดยมี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 16-27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกลือน้ำดีชนิดนี้จะมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) จึงส่งผลให้ผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปทำลายส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียตาย (Oomen และคณะ, 2004) เนื่องจากเชื้อในกลุ่มแลคติกแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase) (Knarreborg และคณะ, 2003) ทำให้น้ำดีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปทำลายเซลล์ได้น้อยลง ส่งผลให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทนต่อกรดน้ำดีได้ (Erkkilä และ Petäjä, 2000) การศึกษาความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในการทนต่อกรดน้ำดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3% (w/v) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะกรดน้ำดีในระบบทางเดินอาหารเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง (รูปที่ 6) จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถมีชีวิตอยู่ในบริเวณลำไส้เล็กได้และสามารถไปออกฤทธิ์ยังบริเวณลำไส้ใหญ่ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Farnworth (2001) พบว่าคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่เหมาะสม ต้องทนทานต่อสภาวะของกรดจากกระเพาะอาหาร น้ำดี เอนไซม์ และ

สามารถคงเหลืออยู่ได้ในลำไส้ ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นยืนยันได้ว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้

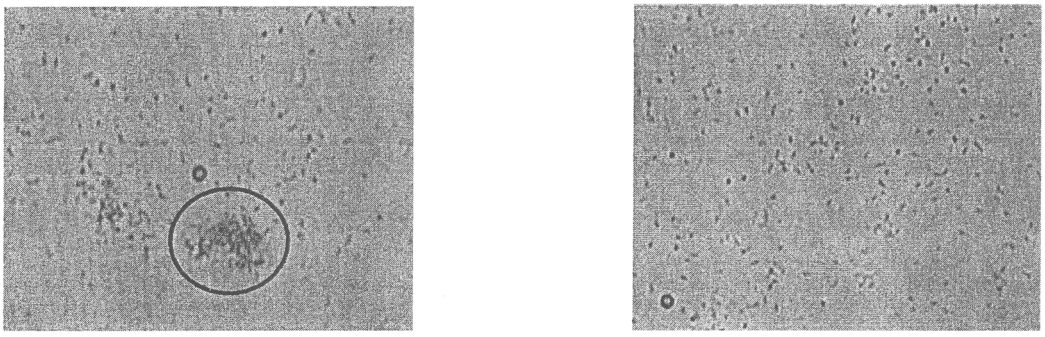


รูปที่ 6 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัส T23/3 ในสภาวะ simulated intestinal fluid ที่ pH 8.0 (◆) และสภาวะที่มีกรดน้ำดี (●) (mean ± sd, n = 6)

7.2 การเกิด auto-aggregation และ surface hydrophobicity

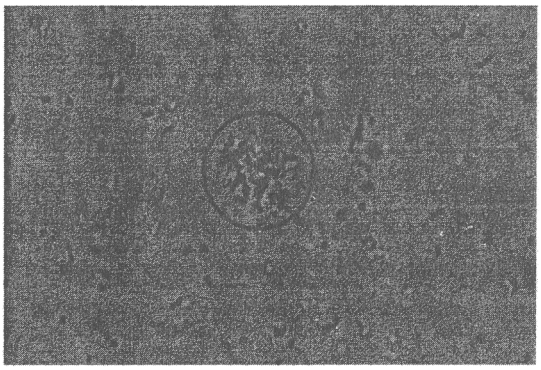
คุณสมบัติที่มีความจำเป็นของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาเป็นโปรไบโอติกจะต้องสามารถเกิด auto-aggregation ต้องมีความเป็น surface hydrophobicity และต้องสามารถเกิด co-aggregation กับเชื้อก่อโรค ทั้งนี้เพราะการเกิด auto-aggregation และ co-aggregation ของเชื้อดังกล่าวทำให้เชื้อสามารถไปยึดเกาะกับเซลล์บริเวณผนังลำไส้ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถแย่งพื้นที่ในการจับของเชื้อก่อโรคได้ดีอีกด้วย ส่วนคุณสมบัติความเป็น surface hydrophobicity พบว่าเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็น surface hydrophobicity จะเข้าไปยึดเกาะกับเซลล์บริเวณลำไส้แล้วจะสร้างสารไบโอฟิล์ม (biofilm) เคลือบบริเวณดังกล่าวส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะกับเซลล์บริเวณผนังลำไส้ได้ส่งผลให้การเกิดโรคทางเดินอาหารลดลง (Vesterlund และคณะ, 2005) ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเกิด auto-aggregation โดยวิธีศึกษาการเกาะกลุ่มของเชื้อ และการเกิด surface hydrophobicity โดยวิธี Salt Aggregation Test (SAT) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ซึ่งพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถเกิด auto-aggregation โดยการเกาะกลุ่มกันเองของเชื้อได้ภายในเวลา 2 นาทีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 7ก) เมื่อเทียบกับลักษณะของตัวเชื้อ *L. cellobiosus* ที่ไม่มีคุณสมบัติการเกิด auto-aggregation ซึ่งใช้เป็น negative control (รูปที่ 7ข) และสามารถเกิด surface hydrophobicity ชนิด high hydrophobicity ทั้งนี้เพราะเกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อเมื่อผสมกับ ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 0.5 M ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ใช้ในการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 8 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) มีคุณสมบัติในการเกิดการเกาะกลุ่มด้วยตัวเชื้อเองสูงจึงใช้ SAT ในความเข้มข้นของ ammonium sulfate ในความเข้มข้นที่ต่ำ จากการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Liliana และคณะ (2008) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสสามารถเกิด auto-aggregation และสามารถเกิด surface hydrophobicity ชนิด high hydrophobicity เมื่อผสมกับ ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 0.5 M ในขณะเดียวกันเมื่อศึกษาการเกิด co-aggregation ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) กับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 5 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่เชื้อ *E.coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. sonnei* และ *V. cholera* พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถเข้าไปจับกับเชื้อโรคได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ดังที่กล่าว

ข้างต้นได้อย่างสมบูรณ์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) เมื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสามารถจับเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อมีคุณสมบัติการเกิด auto-aggregation, co-aggregation และ surface hydrophobicity ของเชื้อดังกล่าวสามารถเข้าไปจับกับเชื้อก่อโรคแล้วสร้างเป็นไบโอฟิล์มเคลือบผนังลำไส้เพื่อไม่ให้มีเชื้อก่อโรคเข้าไปจับกับผนังลำไส้จากนั้นปล่อยสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคออกมาส่งผลให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโต



ก ข

รูปที่ 7 การเกิด auto-aggregation ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) (ก) และเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ cellobiosus (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า

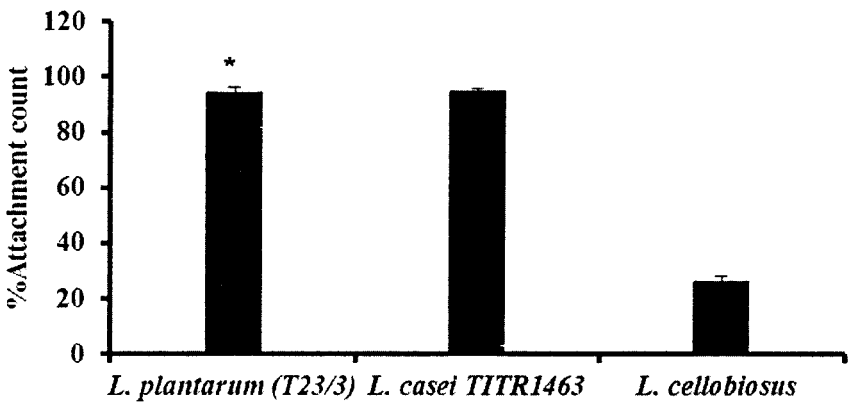


รูปที่ 8 การเกิด surface hydrophobicity ชนิด high hydrophobicity เมื่อใช้ความเข้มข้น ammonium sulfate < 0.9 M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 50 เท่า

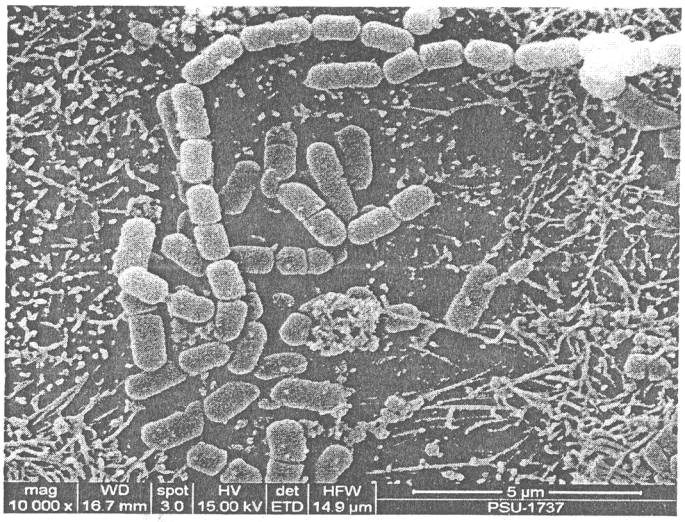
7.3 ความสามารถในการเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของเชื้อแลคโตบาซิลัส

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกที่ดีนั้น จะต้องมีกระบวนการคัดเลือกเพื่อหาเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีและมีคุณสมบัติการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ได้ดีที่สุด ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการมีคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่จะไปยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผิว (epithelial cell) ของลำไส้นั้นเป็นเทคนิคที่สำคัญมากอีกวิธีการหนึ่งในการคัดเลือกเชื้อโปรไบโอติก (Tuomola และ Salminen, 1998) ซึ่งเมื่อเชื้อโปรไบโอติกถูกนำเข้าสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์แล้ว เชื้อเหล่านี้จะแสดงบทบาทตามหน้าที่ได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้เป็นประเด็นสำคัญ (Printo และคณะ, 1983; Blay และคณะ, 2004)

และนอกจากนั้นโอกาสที่เชื้อก่อโรคจะมีพื้นที่เกาะกับเนื้อเยื่อบุผิวในลำไส้ได้ก็มีโอกาสน้อยตามไปด้วยหากเชื้อโปรไบโอติกเกาะกับเยื่อบุผิวได้ดี (Greene และ Klaenhammer,1994; Bibiloni และคณะ, 1999) การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) พบว่าอัตราการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) เท่ากับ 94.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราการยึดเกาะดังกล่าวเป็นค่าสูงเมื่อเทียบกับอัตราการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของเชื้อ *L. casei* TITR1463 ที่ใช้เป็น positive control ซึ่งมีอัตราในการยึดเกาะกับผนังลำไส้เท่ากับ 94.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันอัตราการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) มีอัตราการยึดเกาะที่สูงกว่าเชื้อ *L. cellobiosus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งใช้เป็นเชื้อ negative control (25.95 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในรูปที่ 9 ในขณะที่รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ยึดเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนที่กำลังขยาย 10,000 เท่า ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Maragkoudakis และคณะ (2006) ได้ศึกษาอัตราการยึดเกาะโปรไบโอติกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *L. casei* Shirita ACA-DC 6002, *L. paracasei* subsp. tolerans ACA-DC 4037 และ *L. plantarum* ACA-DC 146 คัดเลือกจากผลิตภัณฑ์นมจากเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด 29 สายพันธุ์ โดยที่ทั้ง 3 สายพันธุ์มีอัตราการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 เท่ากับ 2.4, 0.8 และ 25.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อ *L. gasseri* K7 มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ประมาณ 6.5 log cfu/ml ในขณะที่ใช้เชื้อเริ่มต้นมีประมาณ 8.6 log cfu/ml (Matijasic และคณะ, 2006)



รูปที่ 9 อัตราการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3)



รูปที่ 10 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) บนเซลล์ลำไส้ (Caco-2 cell line) ภายใต้กล้องจุลทรรน์ศอิเล็คตรอนที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

7.4 การยับยั้งการเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารโดยเชื้อแลคโตบาซิลัส

คุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อก่อโรคนั้นต้องมีความสามารถในการเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ดังนั้นบริเวณที่เชื้อก่อโรคเข้ามาสัมผัสบริเวณแรกซึ่งก็คือเยื่อบุผิวบริเวณลำไส้จึงมีความสำคัญต่อการติดเชื้อของเชื้อก่อโรค ซึ่งขั้นตอนในการติดเชื้อของเชื้อก่อโรคนั้นจะเริ่มจากเชื้อก่อโรคเข้ายึดเกาะกับ epithelial cell ของลำไส้ จากนั้นก็จะบุกรุกเข้าสู่เซลล์และเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (Darwin และ Miller, 1999; Blay และคณะ, 2004) การศึกษาถึงการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อก่อโรคนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่จะศึกษาถึงวิธีการป้องกันการติดเชื้อของเชื้อโปรไบโอติก (Golowczyc และคณะ, 2007)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ต่อการยับยั้งการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E. coli* และ *V. cholera*) ทั้ง 3 สภาวะดังนี้

1. การศึกษาการแย่งกันจับบนผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัสและเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (competition) ซึ่งเมื่อเติมเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) พร้อมกับเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารพบว่าอัตราการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สูงกว่าเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 2 ชนิดซึ่งได้แก่เชื้อ *E. coli* และ *V. cholera* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยมีอัตราการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3), *E. coli* และ *V. cholera* เท่ากับ 97.29, 74.31 และ 75.93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

2. การศึกษาความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลัสในการป้องกันการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (exclusion) เมื่อเติมเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) แล้วนำไปบ่มเพาะเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารซึ่งได้แก่เชื้อ *E.coli* และ *V.cholerea* พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถป้องกันการเข้าจับกับเซลล์บนผนังลำไส้ของก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 2 ชนิด (*E.coli* และ *V. cholera*) ได้เป็นอย่างดี ซึ่งสามารถสังเกตได้จากอัตราการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell

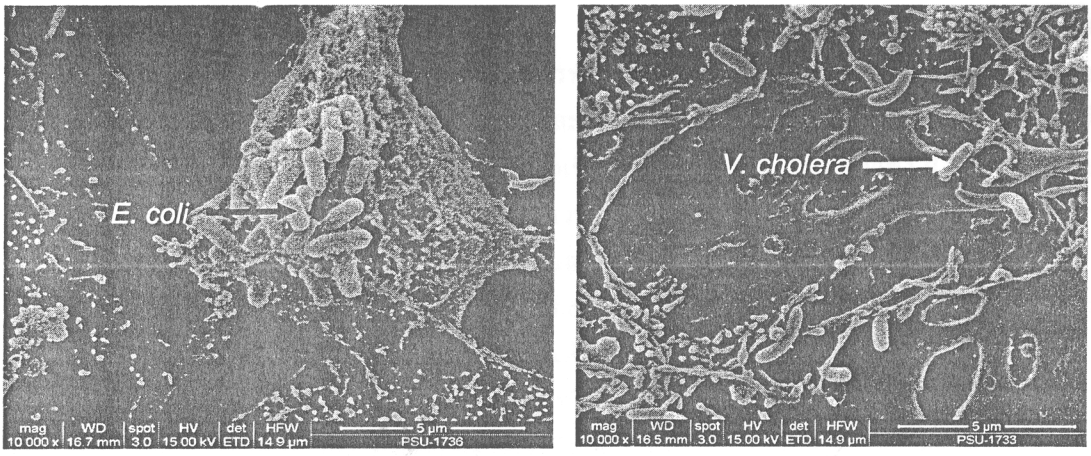
line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สูงกว่าเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 2 ชนิดซึ่งได้แก่*เชื้อ E. coli* และ *V. cholera* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยมีอัตราการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3), *E. coli* และ *V. cholera* เท่ากับ 98.31, 70.31 และ 73.52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

3. การศึกษาความสามารถของเชื้อแลคโตบาซิลัสในการไปเกาะแทนที่เชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (displacement) ที่เกาะอยู่บนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) เมื่อเติมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E.coli* และ *V. cholera*) แล้วนำไปบ่มเพาะเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติมเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถเข้าไปแทนที่การเกาะของเชื้อ *E.coli* และ *V. cholera* ที่เกาะอยู่บนเซลล์ผนังลำไส้ได้เป็นอย่างมีประสิทธิภาพ สามารถสังเกตได้จากอัตราการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สูงกว่าเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 2 ชนิดซึ่งได้แก่เชื้อ *E. coli* และ *V. cholera* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยมีอัตราการเกาะบนเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3), *E. coli* และ *V. cholera* เท่ากับ 98.89, 80.25 และ 79.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้นยืนยันได้ว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถป้องกันการเกาะของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารและมีความสามารถในการแย่งจับกับเซลล์บริเวณลำไส้ได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคนอกจากนี้ยังสามารถเข้าไปเกาะเซลล์บริเวณผนังลำไส้แทนที่เชื้อก่อโรคซึ่งมีการเกาะอยู่ก่อนแล้วได้เป็นอย่างดี โดยสามารถเห็นได้จากรูปที่ 11 และ 12 แสดงลักษณะการยั้บยั้งการการเกาะกับเซลล์บริเวณผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรคโดยเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) จากผลทดลองแสดงว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) มีหลายวิธีการที่สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E.coli* และ *V. cholera*) อาทิเช่น ผลิตสารต่อต้านเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ เช่น กรดน้ำดีอิสระ (deoxycholic acid) ซึ่งสารดังกล่าวช่วยป้องกันการเข้าเกาะและเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร หรือสามารถแย่งพื้นที่เกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ (Liliana และคณะ, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Tsai และคณะ (2005) พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ LAP5 และ LF33 สามารถยับยั้งการบุกรุกของเชื้อ *E.coli* และ *V. cholera* เข้าสู่เซลล์ชนิด epithelial ของลำไส้มนุษย์ นอกจากนั้นยังมีรายงานพบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียหลายชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคกับเซลล์ Caco-2 (Matijasic และคณะ, 2006; Golowczyc และคณะ, 2007) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ Caco-2 ของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (*E.coli* และ *V. Cholera*) ได้

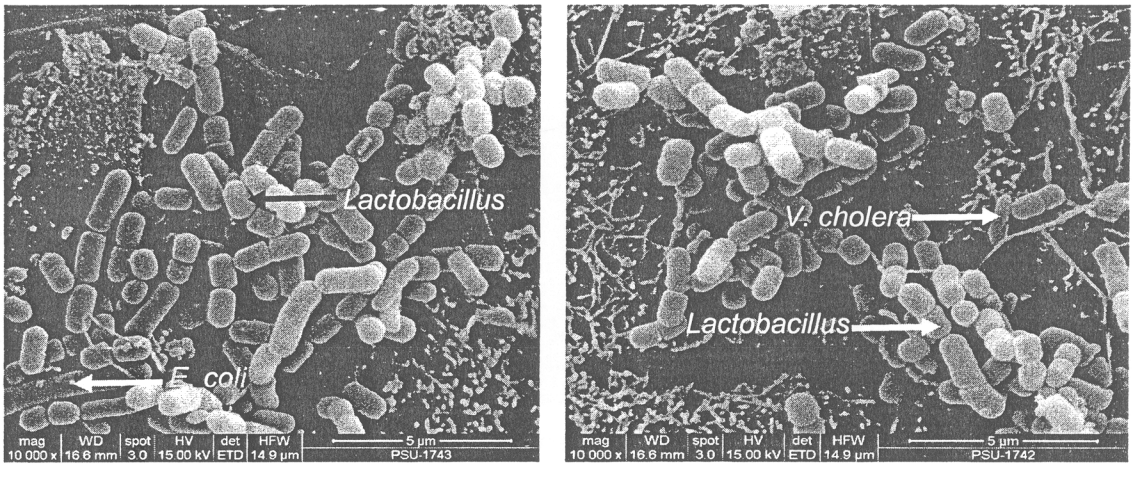
ตารางที่ 4 อัตราการยึดเกาะบนผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *V. cholera*

GI pathogens	Control	% Pathogen attachment (mean ± SD, n=6) under the following condition		
		Competition	Exclusion	Dispiacement
***L. plantarum* (T23/3)**	**100 ± 0.8**	**97.29 ± 1.5**	**98.31 ± 0.9**	**98.89 ± 0.3**
E. coli	**100 ± 0.2**	**74.31 ± 0.5**	**70.31 ± 0.2**	**80.25 ± 0.2**
V. cholera	**100 ± 1.1**	**75.93 ± 1.1**	**73.52 ± 0.3**	**79.53 ± 0.2**



ก ข

รูปที่ 11 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *E. coli* (ก) และเชื้อ *V. cholera* (ข) บนเซลล์ลำไส้ (Caco-2 cell line) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนที่กำลังขยาย 10,000 เท่า



ก ข

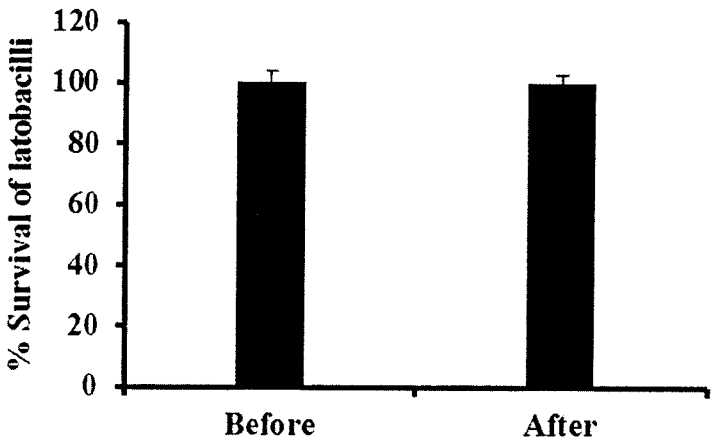
รูปที่ 12 ลักษณะการยึดเกาะบนเซลล์ลำไส้ (Caco-2) ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) กับเชื้อ *E. coli* (ก) และเชื้อ *V. cholera* (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

9. ความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล

9.1 อัตราการมีชีวิตของเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปผงแห้ง

การมีชีวิตรอดของเชื้อที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บผลิตภัณฑ์มีความสำคัญมาก ซึ่งอัตราการอยู่รอดของเชื้อโปรไบโอติกจะต้องมีจำนวนเชื้อที่ตำแหน่งเป้าหมายในปริมาณที่

เพียงพอและเหมาะสม (Ljungh และ Wadstrom, 2006) ซึ่งกระบวนการที่ทำให้เชื้อโปรไบโอติกมีชีวิตรอดในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บผลิตภัณฑ์คือวิธีการทำแห้งเชื้อโปรไบโอติก ซึ่งผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปแบบผงแห้งมีข้อดีคืออายุการเก็บรักษานาน การขนส่งสะดวกซึ่งการทำแห้งจะทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์หยุดลง ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการทำแห้งเชื้อโปรไบโอติกแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ซึ่งเป็นวิธีการทำให้เชื้อจุลินทรีย์แห้งด้วยการใช้อุณหภูมิและความดันต่ำ วิธีนี้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถทำแห้งได้ด้วยความร้อนหรือเสื่อมเสียได้ง่าย (Gardiner และคณะ, 2002) แต่การทำแห้งด้วยวิธีการนี้ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการรอดชีวิตน้อยดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสาร cryoprotectant ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้เพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการทำลายจากกระบวนทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นสาร cryoprotectant ซึ่งช่วยป้องกันเซลล์จุลินทรีย์จากกระบวนการทำแห้งโดยสารดังกล่าวช่วยทำให้เกิดน้ำอิสระน้อยในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (Carvolho และคณะ, 2004) การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ก่อนทำแห้งและหลังผ่านกระบวนการทำแห้งโดยวิธี freeze dry โดยใช้ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำตาลแลคโตสเป็นสาร cryoprotectant พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ก่อนและหลังการทำแห้งมีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 100.00 และ 99.83 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 13

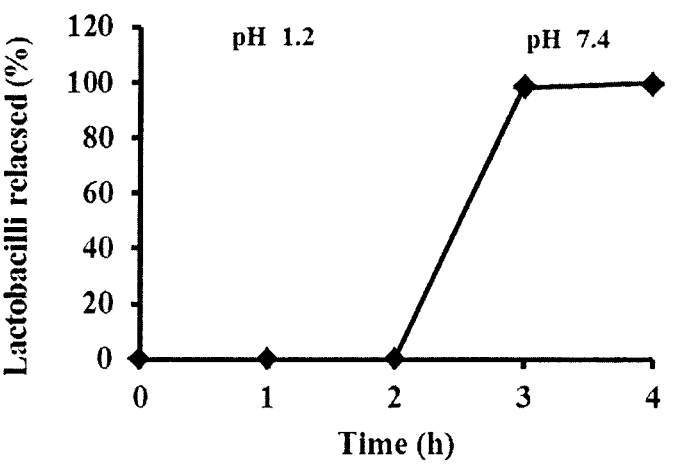


รูปที่ 13 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัส T23/3 ก่อนทำแห้งและหลังผ่านกระบวนการทำแห้งโดยวิธี freeze drying (mean ± sd, n = 6)

9.2 ความสามารถในการปลดปล่อยเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล

ในการเตรียมเชื้อโปรไบโอติกในรูปแบบแคปซูลนั้นต้องเลือกใช้สารเคลือบแคปซูลที่สามารถป้องกันการถูกทำลายด้วยกรดในบริเวณกระเพาะอาหารและสามารถปลดปล่อยตัวเชื้อโปรไบโอติกในสภาวะเป็นด่างในบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นเพื่อออกฤทธิ์ยังตำแหน่งที่บริเวณลำไส้ใหญ่ ซึ่งสารเคลือบที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นสารเคลือบพอลิเมอร์ร่วมกับสารพลาสติไซเซอร์ (plasticizer) ซึ่งพอลิเมอร์ที่นิยมใช้มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ เช่น polymethylmethacrylates (Eudragit®), อนุพันธ์พอลิเมอร์จากเซลลูโลส เช่น cellulose acetate phthalate

(Aquateric®) หรืออนุพันธ์ของ polyvinyl เช่น polyvinyl acetate phthalate (Coateric®) เป็นต้น (Ewart และคณะ, 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ 12% Eudragit®L100 เป็นสารเคลือบแคปซูลที่บรรจุผงแห้งของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) และศึกษาการปลดปล่อยตัวเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) จากแคปซูลดังกล่าวโดยวิธี dissolution ในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (pH 1.2) และในสภาวะความเป็นด่างในระบบลำไส้ (pH 7.4) จากการศึกษาพบว่า ที่สภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารแคปซูลที่เคลือบด้วย 12% Eudragit®L100 สามารถป้องกันไม่ให้แคปซูลเกิดการพองตัวหรือแตกในสภาวะดังกล่าวส่งผลให้ตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสไม่ถูกปลดปล่อยออกมานอกแคปซูลเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ขณะเดียวกันที่สภาวะความเป็นด่างในระบบลำไส้แคปซูลที่เคลือบด้วย 12% Eudragit®L100 ตัวแคปซูลค่อยพองตัวแตกออกส่งผลให้ตัวเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ถูกปลดปล่อยออกมานอกแคปซูลได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 14 จากการศึกษาทำให้มั่นใจได้ว่าการนำเทคนิคการเคลือบแคปซูลด้วยสารเคลือบ 12% Eudragit®L100 จะสามารถป้องกันสภาวะความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหารได้ เนื่องจากพบว่าเมื่อเม็ดแคปซูลตกลงสู่กระเพาะอาหารเชื้อแลคโตบาซิลัสที่บรรจุอยู่ในแคปซูลดังกล่าวจะไม่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแคปซูล เนื่องจาก Eudragit®L100 จะคงตัวได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด แต่จะละลายเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชเป็นกลางหรือด่าง (Annan และคณะ, 2008) ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Changsan และคณะ (2010) พบว่าสาร 12% Eudragit® L100 ที่เคลือบแคปซูลสามารถทนกรดในกระเพาะอาหาร และสามารถละลายในสภาพเป็นด่างในลำไส้จึงทำให้เชื้อโปรไบโอติกไม่ถูกทำลายในสภาพกรดในกระเพาะอาหารก่อนเข้าสู่ลำไส้

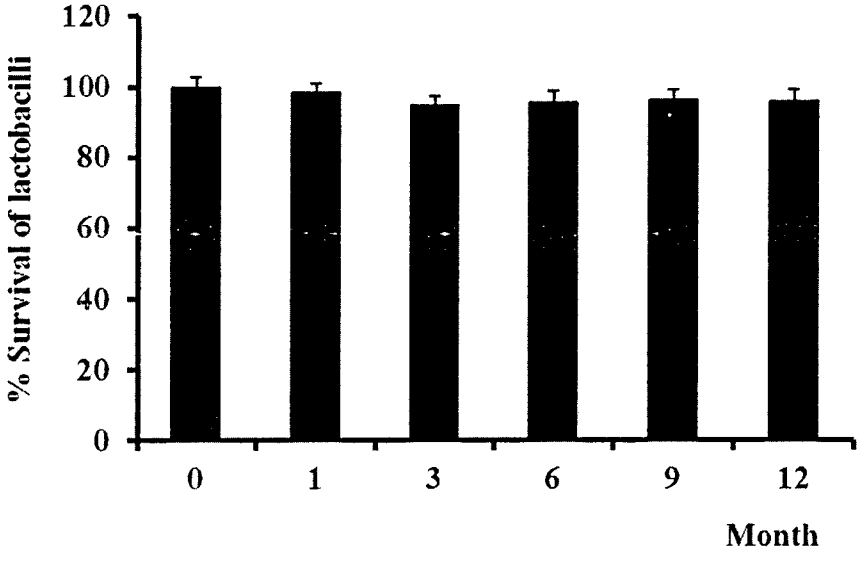


รูปที่ 14 อัตราการปลดปล่อยเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่บรรจุอยู่ในรูปแบบแคปซูลที่เคลือบด้วย12% Eudragit®L100 ในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (pH 1.2) และในสภาวะความเป็นด่างในลำไส้ (pH 7.4) (mean ± sd, n = 6)

10. ความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัสในรูปแบบแคปซูล

การศึกษาความคงตัวของเชื้อที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมีความสำคัญมากเพราะเมื่อพัฒนาโปรไบโอติกดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์สู่ท้องตลาดจำเป็นที่เชื้อโปรไบโอติกดังกล่าวต้องมีชีวิตอยู่ในระยะเวลาที่นานพอ โดยส่วนใหญ่แล้วอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของเชื้อโปรไบโอติกในรูปแบบผงแห้งที่อุณหภูมิ 4°C

ประมาณ 12 เดือน แต่อย่างไรก็ตามการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกอาจลดลงได้ระหว่างระยะเวลาเก็บรักษา นอกจากนี้จำนวนเชื้อโปรไบโอติกที่บรรจุอยู่ในผลิตภัณฑ์ต้องมีจำนวนคงที่ตลอดอายุการใช้ซึ่งโดยทั่วไปในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เชื้อโปรไบโอติกต้องมีชีวิตไม่น้อยกว่า 10^7 cfu/ml จนกระทั่งบริโภคผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เพื่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาหรือส่งเสริมสุขภาพ (Lori, 2001) ดังนั้นในการศึกษาครั้งจึงได้ศึกษาความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในรูปแบบแคปซูล โดยเก็บแคปซูลที่บรรจุเชื้อดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในเดือนที่1, 3, 6, 9 และเดือนที่ 12 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 เดือน พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่บรรจุอยู่ในแคปซูลสามารถมีชีวิตรอดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเดือนแรกที่เก็บเชื้อดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งจากการศึกษาจะเห็นได้ว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในรูปแบบแคปซูลสามารถมีชีวิตรอดมากกว่า 10^7 cfu/ml แสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคทางเดินและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ ต่อไปได้



รูปที่ 15 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่บรรจุอยู่ในรูปแบบแคปซูลที่เคลือบด้วย 12%Eudragit®L100 เมื่อเก็บไว้อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 เดือน (mean ± sd, n = 6)

สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อแลคโตบาซิลัสจากอุจจาระของอาสาสมัครที่เป็นผู้สูงอายุสุขภาพดี พบว่า 169 โคโลนีที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นเชื้อแลคโตบาซิลัส เมื่อนำโคโลนีดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานซึ่งได้แก่เชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 พบว่า เชื้อที่แยกได้ T12/4, T13/1, T13/3, T13/5, T17/4 และ T23/3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 9-20 มิลลิลิตร และเชื้อที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด คือเชื้อไอโซเลท T23/3 ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้แก่เชื้อ *S.aureus*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *E.coli* และ *V. cholera* พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิดได้เป็นอย่างดีโดยมีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 36-38 มิลลิลิตร ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3)โดยใช้วิธี API 50 CHL assay และ16S rRNA พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) เป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ *plantarum* จากการศึกษาพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดแลคติก และกรดไขมันสายสั้น นอกจากนี้เชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) แสดงคุณสมบัติดื้อต่อยา erythromycin doxycycline penicillin G neomycin และ tetracycline ในขณะเดียวกันเชื้อดังกล่าวไวต่อยา ampicillin และ chloramphenicol เมื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 4 ชั่วโมงเมื่ออยู่ในสภาวะ SGF พีเอชเท่ากับ 4 SIF พีเอชเท่ากับ 8 และ 0.3% กรดน้ำดี นอกจากนี้พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเกิด auto-aggregation มี surface hydrophobicity ชนิด high hydrophobicity เกิด co-aggregation กับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 5 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์และสามารถยึดเกาะกับเซลล์ของผนังลำไส้ใหญ่ได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร เมื่อศึกษาความคงตัวของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในรูปแบบแคปซูล พบว่าเชื้อดังกล่าวมีชีวิตรอดหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งและเมื่อนำเชื้อดังกล่าวบรรจุในแคปซูลที่เคลือบด้วย 12%Eudragit®L100 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารแคปซูลที่เคลือบด้วย 12%Eudragit®L100 สามารถป้องกันไม่ให้ตัวเชื้อถูกปลดปล่อยออกมานอกแคปซูลได้ในขณะเดียวกันในสภาวะความเป็นด่างในลำไส้แคปซูลจะแตกตัวและปลดปล่อยตัวเชื้อได้อย่างสมบูรณ์และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 เดือนเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ในรูปแบบแคปซูลมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเดือนแรกที่เก็บเชื้อที่อุณภูมิ 4°C

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) สามารถนำมาพัฒนาเป็นโปรไบโอติก อีกทั้งยังสามารถควบคุมคุณภาพให้เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบแคปซูลเพื่อนำไปใช้ในการรักษาอาการท้องเสียและในด้านอื่นๆต่อไป

ตารางสรุปผลงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	แผนงานวิจัย	นักวิจัยที่รับผิดชอบ	ผลงานตลอดโครงการ
1. เพื่อคัดเลือกเชื้อโปรไบโอติกและเพิ่มปริมาณให้เหมาะสม	1. คัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลัสที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร	1. รศ. ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์ 2. ดร.สมพงศ์ โอทอง	1. ได้เชื้อแลคโตบาซิลัสที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (*S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922) จำนวน 6 ไอโซเลทได้แก่ T13/1, T13/3, T13/4, T13/5, T17/4 และ T23/3 2. คัดเลือกเชื้อแลคโตบาซิลัสไอโซเลท T23/3 เพื่อใช้ศึกษาความสามารถในการใช้เป็นเชื้อโปรไบโอติก
1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย (bacterial strain identification)	1. Identification เชื้อแลคโตบาซิลัสทั้ง 6 ไอโซเลทได้แก่ T13/1, T13/3, T13/4, T13/5, T17/4 และ T23/3 ด้วยวิธี API 50 CHL kit 2. Identification เชื้อแลคโตบาซิลัสไอ โซเลท T23/3 ด้วยวิธี 16s rRNA	1. รศ. ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์	1. เชื้อแลคโตบาซิลัสไอโซเลท T13/1, T13/3, T13/4 และ T13/5 เป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ cellobiosus (*L. cellobiosus*) ที่ระดับความเชื่อมั่น 82.5, 97.6, 97.6 และ 97.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะเดียวกันเชื้อแลคโตบาซิลัสไอโซเลท T17/4 และT23/3 เป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ brevis (*L. brevis*) และสายพันธุ์ plantarum (*L. plantarum*) ที่ระดับความเชื่อมั่น 77.3 และ 93.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

			2. เชื้อแลคโตบาซิลัสไอโซเลท T23/3เป็นเชื้อแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์ plantarum (*L. plantarum*) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.0 เปอร์เซ็นต์ โดยเทคนิค 16S rRNA
3. เพื่อดูคุณสมบัติและความเหมาะสมของเชื้อต่อการรักษาภาวะท้องเสีย	1. ศึกษาความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 2. ศึกษาชนิดและปริมาณของ lactic acid และ short chain fatty acid 3. ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4. ศึกษาการทนกรดและทนด่างในระบบทางเดินทางอาหาร 5. ศึกษาการเกิด aggregation 6. ศึกษาความสามารถในการเกาะผนังลำไส้ 7. ศึกษาการยับยั้งการเกาะผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารโดยเชื้อแลคโตบาซิลัส	1. รศ. ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์ 2. รศ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ 3. รศ. ดร. ธีระพล ศรีชนะ	1. เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก (T23/3) สามารถผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2), lactic acid และสาร short chain fatty acid (acetic acid, butyric acid และ propionic acid) 2. เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก (T23/3) ดื้อต่อยา erythromycin, doxycycline, penicillin G, neomycin และ tetracycline ในขณะที่เชื้อดังกล่าวไวต่อยา ampicillin และ chloramphenicol 3. เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก (T23/3) สามารถมีชีวิตมีชีวิตรอดในทางเดินอาหารได้โดยสามารถทนอยู่ในสภาวะ Simulated gastric fluid (SGF) ของกระเพาะอาหารและสามารถทนอยู่ในสภาวะ Simulated intestinal fluid (SIF) และทนกรดน้ำดีของระบบลำไส้

			4. เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก (T23/3) สามารถเกิด auto-aggregation และเกิด co-aggregation กับเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ซึ่งได้แก่ *E.coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. sonnei*. และ *V. cholera* 5. เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก (T23/3) สามรถยึดเกาะกับผนังลำไส้ (Caco-2 cell line) ได้เป็นอย่างดี 6. เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก (T23/3) สามารถยับยั้งการยึดเกาะบนผนังลำไส้ (Caco-2 cell line)ของเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ซึ่งได้แก่ *E.coli* และ *V. cholera*
4. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเก็บรักษาเชื้อโปรไบโอติกที่ผลิตขึ้นในรูปแบบแคปซูล	1. ศึกษาความคงตัวของเชื้อโปรไบโอติกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา	1. ดร.สมพงศ์ โอทอง	1. สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก(T23/3) มีปริมาณมากพอในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม 2. สามารถหาสภาวะที่เหมาะเพื่อให้เชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก(T23/3) มีชีวิตรอดหลังจากระบวนการทำแห้งด้วยวิธี Freeze dry
5. เพื่อเตรียมเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบแคปซูล	1. ตั้งสูตรตำรับโปรไบโอติกในรูปแบบแคปซูลที่เหมาะกับผู้ป่วยโรคท้องเสียเรื้อรัง	1. รศ. ดร. ธีระพล ศรีชนะ	1. ได้สูตรตำรับที่มีเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก(T23/3)เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคท้องเสียเรื้อรัง

6. เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อรับประทานเข้าสู่ร่างกาย	1. ศึกษาการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบแคปซูลด้วยวิธี dissolution	1. รศ. ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์ 2. รศ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ 3. รศ. ดร. ธีระพล ศรีชนะ	1. แคปซูลที่บรรจุเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก(T23/3) และเคลือบด้วย 12%Eudragit®L100 สามารถป้องกันตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสไม่ให้ถูกปลดปล่อยจากแคปซูลในสภาวะเป็นกรดในกระเพาะอาหารในขณะเดียวกันที่สภาวะความเป็นด่างในบริเวณลำไส้แคปซูลสามารถแตกออกและปลดปล่อยตัวเชื้อแลคโตบาซิลัสได้อย่างสมบูรณ์
7. เพื่อกำหนดวันหมดอายุของเภสัชภัณฑ์	1. ทดสอบความคงตัวของยาแคปซูลและวันหมดอายุของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์	1. รศ. ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์ 2. รศ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ 3. รศ. ดร. ธีระพล ศรีชนะ	1. แคปซูลที่บรรจุเชื้อแลคโตบาซิลัสที่ได้รับการคัดเลือก(T23/3) สามารถรอดชีวิตคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 12 เดือน

เอกสารอ้างอิง

Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin M., Salmela, T.V., Sandholm, T.M. and Wright, A.V. 1999. Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. Appl. Environ. Microbiol. 65: 351–354.

Annan, N.T., Borza, A.D. and Hansen, L.T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Res. Int. 41: 184-193.

Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O. and Ozdemir, C. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolated from infant faces. Food Microbiol. 21: 19-24.

Azizpour, K., Bahrambeygi, S., Mahmoodpour, S., Azizpour, A., Mahmoodpour, S. and Bahrambeygi, S. 2009. History and basic of probiotics. Res. J. Biol. Sci. 4: 409-426.

Balcazer, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O. and Muzquiz, J.L. 2007. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 30: 111–118.

Bayane, A., Diawara, B., Duboid, R.D., Destain, J., Roblain, D. and Thonart, P. 2010. Isolation and characterization of new spore-forming lactic acid bacteria with prospects of use in food fermentations and probiotic preparations. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 1016-1025.

Begley, M., Gahan, C.G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol. Rev. 29: 625-651.

Bibiloni, R., Perez, F.P. and Antoni, D.L.G. 1999. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia. Anaerobe. 5: 519-524.

Blay, L.G., Fliss, I. and Lacroix, C. 2004. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cell with ELISA, radioactivity and plate count methods. J. Microbiol. Meth. 59: 211-221.

Carter, P.B. and Collins, F.M. 1978. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. Infect. Immun. 24: 41-47.

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X and Gibbs, P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int. Dairy. J. 14: 835-847.

Changsan, V., Buaking, K. and Srichana, T. 2010. Preliminary study of enteric coat of gelatin capsule containing lactose. The 1st current drug development international conference. Woraburi phuket resort and spa, Phuket, Thailand, 6-8 May 2010.

D'Aimmo, M.R., Modesto, M. and Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. Int. J. Food Microbiol. 115: 35-42.

Danielsen, M. and Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 82: 1-11.

Darwin, K.H. and Miller, V.L. 1999. Molecular basic of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol Rev. 12: 405-428.

Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G.P., Allesina, S., Barba, M. and Deidda, F. 2006. Probiotics: from research to consumer. Dig. Liver Dis. 38: 248-55.

Dickson, E.M., Riggio, M.P. and Macpherson, L. 2005. A novel species specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. J. Med. Microbiol. 54: 299–303.

Dunne, C.O., Mahony, L., Thornton, G., Feeney, M., Daly, C. and Collins, J.K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. Am. J. Clin. Nutr. 73: 389-392.

Elisha, B.G. and Courvalin, P. 1995. Analysis of genes encoding d-alanine: d-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. Gene. 152: 79–83.

Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat. Sci. 55: 297-300.

Ewart, T.C., Robert, A.S., Alyson, L.C., Ian, R.W., Hans, U.P., Carsten, S., Thomas, B. and Dominique, C. 2002. Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting. Int. J. Pharm. 231: 83–95.

Farnworth, E.R. 2001. Probiotics and prebiotics, in Handbook of nutraceuticals and functional foods. Wildman, REC, Ed., CRC Press, USA. 407-422.

Gardiner, G.E., Oisullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K. 2002. A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. Int. Daily J. 12: 749-756.

Gill, C.I.R. and Rowland, I.R. 2002. Diet and cancer: assessing the risk. Br. J. Nutr. 8: 73-87.

Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Abraham, A.G. and Antoni, D. 2007. Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Int. J. Food Microbiol. 118: 264-273.

Graul, T., Cain, A.M. and Karpa, K.D. 2009. *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* combinations: A strategy to reduce hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhea incidence and mortality. Med. Hypotheses. 73: 194-198.

Greene, J.D. and Klaenhammer, T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cell. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4487- 4494.

Guandalini, S., Pensabene, L. and Zikri, M. A. 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. J. Pediatr Nutr. 30: 54-60.

Harsharnjit, S.G. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 17: 55-73.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73: 365–373.

Huang, Y. and Adams, M.C. 2004. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. Int. J. Food Microbiol. 91: 253-260.

Isolauri, E., Arvola, T., Stas, Y. and Salminen, S. 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. Clin. Exp. Allergy. 30: 1065-1610.

Jisun, J., Jaejin, L., Joonkyu, K., Kyounghak, H., Taemun, H., Joonhong, P. and Younkyoo, C. 2010. The study of pathogenic microbial communities in graywater using membrane bioreactor. Desalination. 250: 568–572.

Kaewsrichan, J., Peeyananjarassi, K. and Kongprasertkit, J. 2006. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 48: 75–83.

Kalliomki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koshinen, P. and Isolauri, E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. Lancet. 357: 1076-1079.

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. 2007. Antimicrobiol susceptibilities of *Lactobacillus, Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and culture intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrobiol. Chemotherap. 5: 1-7.

Knarreborg, A., Jensen, S.K. and Engberg, R.M. 2003. Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured *in vitro* and *in vivo*. J. Nutr. Biochem. 14: 259-265.

Liliana, M.P., Maria, B.D., Francisco, R., Walter, G., Cristina, P. and Lucila, B. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 141-148.

Ljungh, A. and Wadstrom, T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. Curr. Int. Microbiol. 7: 73–89.

Lori, K. 2001. Prophylactic and therapeutic use of probiotic: A review. J. Am. Diet. Assoc. 101: 229-238.

Magnusson, J. and Schnüver, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1-5.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. 16:189-199.

Maria, C.O., Maria, E. and Nader-Macias. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2 producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Animal Reprod. Sci. 96: 35–46.

Marteau, P., Vaerman, J.P., Dehennin, J.P., Bord, S., Brassart, D., Pochart, P., Desjeux, J.F. and Rambeau, J.C. 1997. Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobcillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. Gastroenterol. Clin. Biol. 21: 293-8.

Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria : a review. Int. J. Food Microbiol. 105 : 281-295.

Matijasic, B.B., Narat, M., Peternael, M.Z. and Rpgelj, I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on Caco-2 cell and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue. Int. J. Food Microbiol. 107: 92-96.

Miettinen, M., Alander, M., von Wright, A., Voupio-Varkila, J., Marteau, P., Huis in't Veld, J.H.J. and Mattila-Sandholm, T. 1998. The survival of and cytokine induction by lactic acid bacteria after passage through a gastrointestinal model. Microb. Ecol. Health Dis. 10: 141-147.

Mirlohi, M., Soleimanian-Zad, S., Sheikh-Zeiondin, M. and Fazeli, H. 2008. Enumeration of lactobacilli in the fecal flora of infant using two different modified de-Man Rogosa media under aerobic and anaerobic incubation. Pakistan J. Biol. Sci. 11: 876-881.

Morelli, L. 2007. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. Int. Dairy J. 17: 1278-1283.

Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. 1999. Probotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Rev. Food Sci. Nutr. 38: 13-126.

Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Van de Kamp, E. D., Pereboom, L.L. and Sips, A.J. 2004. Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46:183-188.

Pan, X., Fenqin, C., Tianxing, W., Honggang, T.A. and Zhanyu, Z.A. 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food Control. 20: 598–602.

Pangsomboon, K., Bansal, S., Martin, G.P., Suntinanalert, P., Kaewnopparat, S. and Srichana, T. 2009. Further characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. J. Appl. Microbiol. 106: 1928–1940.

Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Aresneau, K.O., Pizarro, T.T. and Cominelli, F. 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. PNAS. 107: 454–459.

Parkes, G.C., Sanderson, J.D. and Whelan, K. 2009. The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile* associated diaarhoea. Lancet. Infect. Dis. 9: 237-244.

Printo, M., Robineleon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simonassmann, P., Haffen, K., Fogh, J. and Zweibaum, A., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. Biol. Cell. 47: 323-330.

Reid, G., Burton, J. and Devillard, E. 2004. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. Med. Gen. Med. 6: 49-63.

Soomro, A.H., Masud, T. and Kiran, A. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservative and human health-A review. Pakistan J. Nutr. 1: 20-24.

Sonaje, K., Chen, Y.J., Chen, H.L., Wey, S.P., Juang, J.H., Nguyen, H.N., Hsu, C.W., Lin, K.J., Sung, H.W. 2010. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly (γ-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. Biomater. 31: 3384-3394.

Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Smart, J. and Gopal, P.K. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2578-2588.

Taranto, M.P., Perez-Martinez, G. and de Valdez, G.F. 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Res. Microbiol. 157: 720-725.

Teanpaisan, R. and Dahlen, G. 2006. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral lactobacillus species. Oral Microbiol. Immunol. 21: 79-83.

Tomas, M.S.J., Bru, E. and Nader-Macias, M.E. 2003. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. Am. J. Obster. Gynecol. 188: 35-44.

Tsai, C.C., Hsih, H.Y., Chiu, H.H., Lai, Y.Y., Liu, J.H., Yu, B. and Tsen, H.T. 2005. Antagonistic activity against Salmonella infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. Int. J. Food Microbiol. 102: 185-194.

Tuomola, M.E. and Salminen, J.S. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. Int. J. Food Microbiol. 41: 45-51.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M. and Ouwehand, A.C. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. Res. Microbiol. 156: 238–244.

Wilding, N.B. and Bruce, A.D. 2000. Freezing by Monte Carlo Phase Switch. Phys. Rev. Lett. 85: 5138-5141.

Wu, R., Wang, L., Wang, J., Li, H., Menghe, B. and Wu, J. 2009. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in inner Mongolia. J. Basic Microbiol. 49: 1–9.

Zhou, X., Stephen, J.B., Maria, G.S., Catherine, C.D., Mohammed, R.I. and Larry, J.F. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiol. 150: 2565-2573.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1. การหมักน้ำตาลของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่แยกจากอุจจาระผู้สูงอายุสุขภาพแข็งแรง

Sugar	Isolates					
	T13/1	T13/3	T13/4	T13/5	T17/4	T23/3
Control	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-
Erythriotol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
β-Methyl-D-xyloside	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	-	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	-	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	-	-	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	+
α-Methyl-D-Mannoside	-	-	-	-	-	+
α-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	+
Amydalin	-	-	-	-	-	+
Arbutin	-	-	-	-	-	+
Esculin	-	-	-	-	-	+
Salicin	-	-	-	-	-	+

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1. การหมักน้ำตาลของเชื้อแลคโตบาซิลัสที่แยกจากอุจจาระผู้สูงอายุสุขภาพแข็งแรง (ต่อ)

Sugar	Isolates					
	T13/1	T13/3	T13/4	T13/5	T17/4	T23/3
Cellobiose	-	-	-	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+
Melibiose	+	+	+	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	-	+
Inulin	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	+
D-Raffinose	+	+	+	+	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	-	-	-	-	-	+
D-Turanose	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-
D-Fuccose	-	-	-	-	-	-
L-Fuccose	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+
2-Keto-glucotate	-	-	-	-	-	-
5-Keto-gluconate	+	+	+	+	-	-

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) โดยทำการ BLAST Search ในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession no. HM 051157) โดยมีค่า base count เท่ากับ 331a 435c 324g 396t (bases 1 to 1486)

ORIGIN

1 ccttgttacg acttcaccct aatcatctgt cccaccttag gcggctggtt cctaaaaggt

61 taccccaccg actttgggtg ttacaaactc tcatggtgtg acgggcggtg tgtacaaggc

121 ccgggaacgt attcaccgcg gcatgctgat ccgcgattac tagcgattcc gacttcatgt

181 aggcgagttg cagcctacaa tccgaactga gaatggcttt aagagattag cttactctcg

241 cgagttcgca actcgttgta ccatccattg tagcacgtgt gtagcccagg tcataagggg

301 catgatgatt tgacgtcatc cccaccttcc tccggtttgt caccggcagt ctcaccagag

361 tgcccaactt aatgctggca actgataata agggttgcgc tcgttgcggg acttaaccca

421 acatctcacg acacgagctg acgacaacca tgcaccacct gtatccatgt ccccgaaggg

481 aacgtctaat ctcttagatt tgcatagtat gtcaagacct ggtaaggttc ttcgcgtagc

541 ttcgaattaa accacatgct ccaccgcttg tgcgggcccc cgtcaattcc tttgagtttc

601 agccttgcgg ccgtactccc caggcggaat gcttaatgcg ttagctgcag cactgaaggg

661 cggaaaccct ccaacactta gcattcatcg tttacggtat ggactaccag ggtatctaat

721 cctgtttgct acccatactt tcgagcctca gcgtcagtta cagaccagac agccgccttc

781 gccactggtg ttcttccata tatctacgca tttcaccgct acacatggag ttccactgtc

841 ctcttctgca ctcaagtttc ccagtttccg atgcacttct tcggttgagc cgaaggcttt

901 cacatcagac ttaaaaaacc gcctgcgctc gctttacgcc caataaatcc ggacaacgct

961 tgccacctac gtattaccgc ggctgctggc acgtagttag ccgtggcttt ctggttaaat

1021 accgtcaata cctgaacagt tactctcaga tatgttcttc tttaacaaca gagttttacg

1081 agccgaaacc cttcttcact cacgcggcgt tgctccatca gactttcgtc cattgtggaa

1141 gattccctac tgctgcctcc cgtaggagtt tgggccgtgt ctcagtccca atgtggccga

1201 ttaccctctc aggtcggcta cgtatcattg ccatggtgag ccgttacccc accatctagc

1261 taatacgccg cgggaccatc caaaagtgat agccgaagcc atctttcaag ctcggaccat

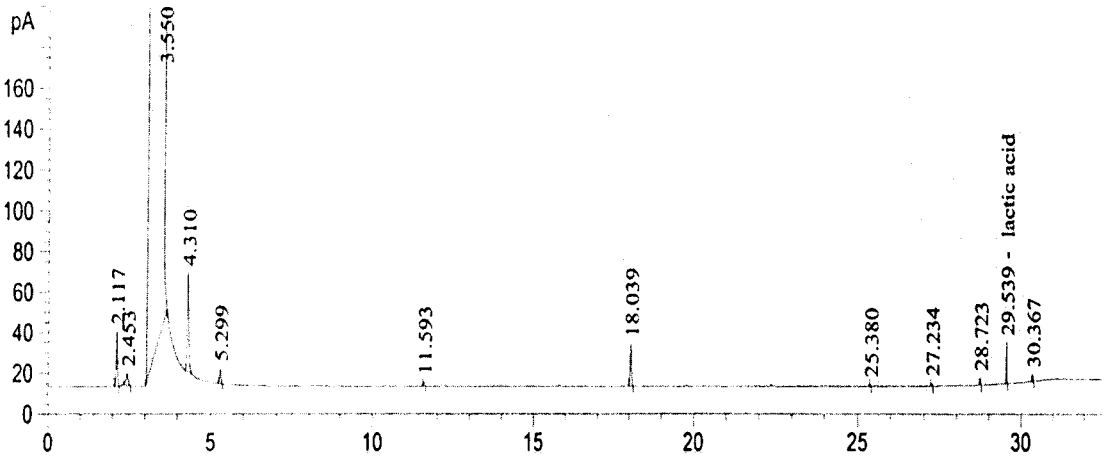
1321 gcggtccaag ttgttatgcg gtattagcat ctgtttccag gtgttatccc ccgcttctgg

1381 gcaggtttcc cacgtgttac tcaccagttc gccactcact caaatgtaaa tcatgatgca

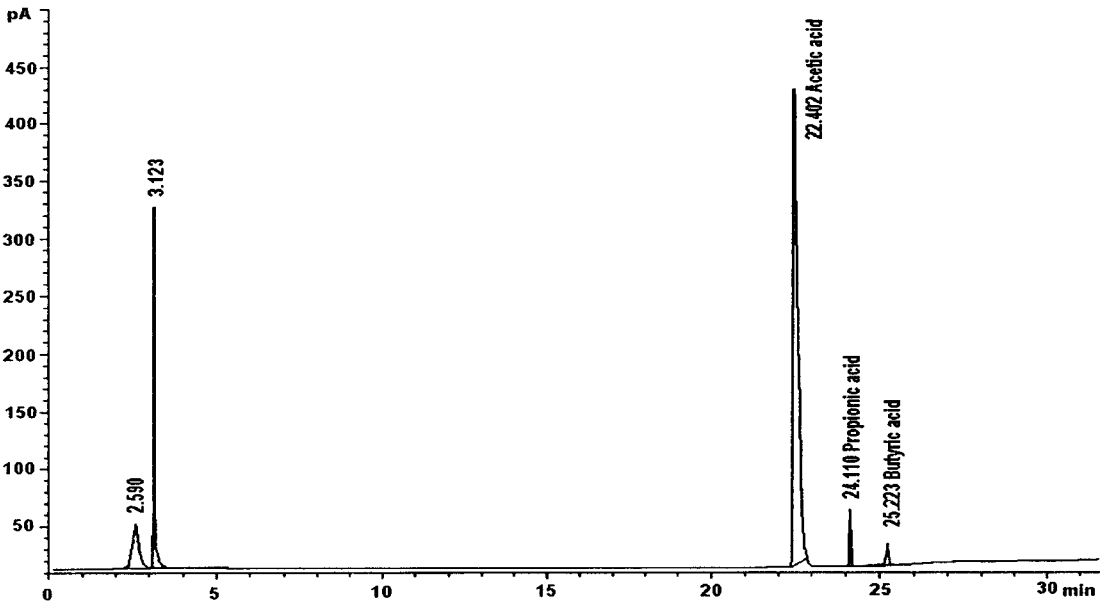
1441 agcaccaatc aataccagag ttcgttcgac ttgcatgtat taggca

อ้างอิงจาก: **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez**

ภาคผนวก ค



รูปที่ 1. โครมาโตแกรมของสาร lactic acid ที่ผลิตโดยเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC



รูปที่ 2. โครมาโตแกรมของสาร acetic acid, butyric acid และ propionic acid ที่ผลิตโดยเชื้อแลคโตบาซิลัส (T23/3) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

ภาคผนวก ง

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลลินทรีย์

1. อาหาร Brain Heart Infusion Broth (BHI, Difco, USA)

Calf brains	7.7	g
Beef heart	9.8	g
Proteose peptone	10.0	g
Dextrose	2.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Disodium phosphate	2.5	g

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (MERCK, Germany)

Peptone from casein	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
D(+) Glucose	20.0	g
Sodium acetate	15.0	g
Magnesium sulfate	0.575	g
Iron(II) sulfate	0.034	g
Potassium dihydrogen phosphate	6.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Tween 80	1.0	g
Manganese sulfate	0.12	g
Agar	15.0	g

ภาคผนวก ง

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลลินทรีย์ (ต่อ)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS, Difco, USA)

Proteose peptone No.3	10.0	g
Beef extract	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Dextrose	20.0	g
Polysorbate 80	1.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Dipotassium phosphate	2.0	g

Properties of Probiotic *Lactobacillus Planturum* (T23/3) as Potential Anti-gastrointestinal Pathogens

Rosainee Kha[1], Titpawan Nakpheng[2], Kholeeyoh Jehtae[2], Sanea Kaewnopparat[1,2], Teerapol Srichana[1,2]

[1]Department of the Pharmaceutical Technology, [2]Drug Delivery System Excellence Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University. Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
**Corresponding author: sainee_kha@hotmail.com*

Abstract Probiotics are live microbial food supplements which beneficially affect the host by improving the intestinal microbial balance. The selection of probiotics before incorporation in diet requires close scrutiny in the form of *in vitro* as well as *in vivo* tests. The present study was undertaken to investigate *in vitro* characteristics of *Lactobacillus plantarum* (T23/3) strain. The characterization included identification of lactobacilli strain, anti-gastrointestinal pathogens, susceptibility to antibiotics, simulated gastrointestinal juice and aggregation tests. The results showed that this isolate identified a *L .plantarum* (99%). The strain showed antagonistic effect against gastrointestinal pathogens (*E.coli, S. typhimurium, S. aureus, S. sonnei and V. cholera*) and was sensitive to ampicillin (30 μg) and chloramphenicol (30 μg), while it was resistant to erythromycin (15 μg), doxycycline (30 μg), neomycin (30 μg), penicillin (10 units) and tetracycline (30 μg). The strain could not survival after 3 h of incubation in simulated gastric fluid at pH 2 and 3. However, this strain was not affected by simulated intestinal fluid at pH 8 and bile tolerance for at least 4 h. The results showed that this strain was self-aggregated from macroscopic granules and has high surface hydrophobicity property with a maximal ammonium sulfate concentration of 0.5 mol/l and showed co-aggregation with five strains of gastrointestinal pathogens. This study suggests that *L. plantarum* (T23/3) has a potential application in gastrointestinal infection.

Keywords: probiotic, *Lactobacillus*, antibiotic

Introduction

Probiotics are live microbial food supplements which beneficially affect the host by improving the intestinal microbial balance (1). Selection of suitable probiotic candidates is the principle basis for improving the bio-therapeutic action and functional properties of probiotic food and pharmaceutical products (2). Probiotics have become a major topic of lactic acid bacteria (LAB). The representative species include *Lactobacillus* spp. because the lactobacilli are a Generally Recognized As Safe (GRAS) and have been used in food and fermented products for long history (3). The essential characteristics for lactobacilli as probiotics are such as acid and bile salt tolerance in gastrointestinal tract (4). They also need to survive in the products with sufficient numbers during production and storage (5). Furthermore, anti-biotic susceptibilities of potential probiotic strains is necessary although rare lactobacilli associated infection (6). The strains inhibited growth of potential pathogens by producing compounds such as hydrogen peroxide (H_2O_2), lactic acid, short chain fatty acid and bacteriocin (7). Other functions of probiotics include competitive exclusion of pathogens from the cell surface, co-aggregation with certain pathogenic bacteria, adherence to epithelial cells and biofilm formation based on auto-aggregation and surface hydrophobicity (8). Previous studies indicated that auto-aggregation of probiotic strains is necessary for adherence to gastrointestinal epithelial cells and co-aggregation leads to formation of a barrier that prevents colonization by pathogens (9).

Adhesion to Caco-2 cell lines has been used frequently because it exhibits, in vitro, the characteristics of a mature enterocyte. Because association with, and invasion of, the cultured cell lines have been reported to mimic the in vivo conditions of adhesion and infection of pathogenic bacteria (2).

The objective of the present study was to characterize the potential probiotics of *Lactobacillus plantarum* (T23/3) strain for anti-gastrointestinal pathogens. This strain was investigated for *Lactobacillus* strain identification, anti-gastrointestinal pathogens, susceptibility to antibiotics, simulated gastrointestinal juice and aggregation assay.

Materials and Methods

Identification of Lactobacillus strain by 16s rRNA gene sequencing

Extraction of chromosomal DNA was achieved using the protocol of Leenhouts et al ., (1990)(10). The primers LacAll-F (5'-TGCCTAATACATGCAAGTC-3') and LacAll-R (5'-CCTTGTTACGACTTCACC-3') were used to amplify nearly the full length of the 16S rRNA gene, corresponding to the conserved 16S rRNA gene regions of *L. plantarum* (T23/3). PCR amplification was performed with a Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 9600. An amplicon of about 1500 bp in size was excised from a 1%agarose gel after electrophoresis, purified using the GFXTM Purification Kit (Amersham Biosciences,USA), and cloned into pGEM-T Easy using the procedures recommended by the manufacturer (Promega, USA). The 16S rRNA gene was sequenced directly using the recombinant plasmids as DNA template, an ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA), T7 and SP6 universal primers, and primers designed by a walking strategy (11). Analysis of alignment and homology for the sequences obtained was performed by BIOEDIT and BLAST programs.

Antimicrobial activity

The indicator strains of gastrointestinal pathogens included *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *V. cholera* and *S. aureus* which were cultured in Brain Heart Infusion (BHI, Diffco, USA) broth under aerobic condition at 37°C for 18 h. Inhibitory activity of *L. plantarum* (T23/3) was measured by agar overlay diffusion method (6). The inoculum of lactobacilli to be tested were spotted onto BHI agar plates and incubated under anaerobic condition at 37°C for 72 h. The cell pellet of indicator pathogens were resuspended in PBS to final concentration of 1×10^8 cfu/ml. Four ml of inoculated in soft medium was overlain on the top of the plates of lactobacilli. After incubation at 37°C for 18 h, the plates were observed for clear zone of inhibition around lactobacilli colonies with antibiotic zone reader.

Susceptibility to antibiotics

Antibiotic susceptibility testing of *L. plantarum* (T23/3) was determined by agar diffusion method (12). The antibiotic discs (Oxoid, UK) were ampicillin (30 μg), chloramphenicol (30 μg), doxycycilline (30 μg), erythromycin (15 μg), neomycin (30 μg), penicillin (10 unit) and tetracycline (30 μg). The cell pellet of this strain was resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/ml. The adjusted cultures were streaked with sterile cotton swab onto surface of MRS agar plates. The antibiotics discs were placed onto the surface of the agar. After incubation under anaerobic condition at 37°C for 24 h, the plates were observed for clear zone of inhibition around lactobacilli colonies with antibiotic zone reader.

Preparation of simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid

Simulated gastric fluids (SGF) were prepared by suspending pepsin (1:10000, ICN, Sigma, USA) in the phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) to a final concentration of 3 g/l and adjusted the pH to 2.0, 3.0, and 4.0 with concentrated HCl.

Simulated small intestinal fluids (SIF) were prepared by suspending pancreatin USP (P-1500, Sigma, USA) in the PBS to a final concentration of 1 g/l and adjusted the pH to 8.0 with sterile 0.1 mol/l NaOH.

Upper gastrointestinal transit tolerance assay

The cell pellet was suspended in SGF and SIF before incubating under anaerobic condition at 37°C. Resistance was assessed in terms of viable colony counts and enumerated on MRS agar plate after incubation at 37°C for 1, 3 and 4 h with SGF, and 1, 2, 3, 4 and 5 with SIF, reflecting the transit time in the stomach and small intestine, respectively.

Bile tolerance assay

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended in PBS to final concentration of 1×10^8 cfu/ml. The cells were then inoculated in PBS with 0.3% w/v oxgall (Oxoid, Sigma, USA) and incubated under anaerobic condition at 37°C at 1, 2, 3 and 4 h of incubation. Viable numbers were estimated on MRS agar plates.

Autoaggregation test

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/ml. A drop was placed on a glass slide and examined microscopically. Autoaggregation was determined as the ability to form aggregates within 2 min (13).

Surface hydrophobicity

Surface hydrophobicity of this strain was studied by the salt aggregation test (SAT). The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended in 0.02 mol/l of sodium phosphate. Solutions of ammonium sulfate (0.5, 1.5, 2.0 and 4.0 mol/l) were mixed with an equal volume of cell suspension on a glass slide and examined microscopically. The lowest concentration of ammonium sulfate causing the bacteria to aggregate was defined as the SAT value.

Co-aggregation assay of pathogens with lactobacilli

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) and indicator pathogens (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *V. cholera* and *S. aureus*.) were resuspended in PBS to final concentration of 1×10^8 cfu/ml. Aliquots of *L. plantarum* (T23/3) were mixed with an equal volumn of indicator pathogens and shaked at 37°C, 100 rpm for 4 h. Suspensions were Gram-strained and observed under a microscope. A co-aggregation assay was positive if *L. plantarum* (T23/3) formed aggregated with others strain (14).

Results and discussion

Identification of Lactobacillus strain

The identification of lactobacilli has been based on colony morphology, Gram-stain reaction, sugar fermentation profiles and enzyme activities. To ensure the identification results, it is needed to be confirmed with other methods such as rRNA sequencing or DNA-DNA hybridization. These methods have been developed to improve the knowledge on generic and supra generic relationship of lactic acid bacteria (15). From previous study of Titpawan (2007)(16), the this strain (T23/3) was identified to species level using API 50 CHL. This isolate was identified as *L. plantarum* with 99% possibility. In this study, This strain was confirmed to be *L. plantarum* by genetic methods based on the 16s rRNA gene sequences. It was able to identify this species with 99% accuracy (GenBank accession no. HM 051157, data not shown).

Antimicrobial activity

The inhibition to five gastrointestinal pathogens of *L. plantarum* (T23/3) strain is showed antibacterial ability against *E. coli, S. typhimurium, S. aureus, S. sonnei V. cholera* with inhibition zone as28.8±0.8, 28.0±0.7, 36.6±0.8, 37.8±0.4, 38.0±0.7, respectively. This result suggests that *L. plantarum* (T23/3) has high inhibitory against both Gram positive and Gram negative bacteria. Generally, the effect of lactobacilli in controlling the proliferation of pathogenic bacteria by producing a wide range of antibacterial compounds such as organic acids (e.g., lactic acid and acetic acid), hydrogenperoxide, bacteriocins and fatty acid (17).

Antibiotic resistant

This strain was tested for antibiotics susceptibilities. The result revealed that it was resistant to erythromycin, doxycycline, neomycin, penicillin and tetracycline but it was sensitive to ampillin and chloramphenicol. The high intrinsic resistance and susceptibility of lactobacillus strains to a range of antibiotics is

important. Since these strains survive during a specific antibiotic treatment. In the treatment of gastrointestinal tract infections, better management is obtained when concurrent therapy was made with probiotic lactobacilli and antibiotics to which they are intrinsically resistant. By doing so, intestinal microflora can recover more quickly (18).

Simulated gastrointestinal fluid

This study compared the effect of different pH of SGF on the viability of *L. plantarum* (T23/3) strain as shown in Figure 1A. *L. plantarum* (T23/3) stayed viable at pH 4.0, while no viability at pH 2.0 and 3.0 after 2 h of incubation compared to the initial inoculum. Before reaching the distal part of intestinal tract and exert their probiotic effect these bacteria must survive during transition through the stomach tract. The pH value in human stomach range from 1.5 during fasting to 4.5 after a meal and food ingestion can take up to 3 h (19). From this observation, it can be survived in gastric condition providing it can be delivered to the intestine in high number and preferably as part of a buffer in the final product or encapsulated delivery system.

In SIF at pH 8.0, the total number of *L. plantarum* (T23/3) was no loss of viability after incubation as shown in Figure 1B. This strain demonstrated high level of survival in SIF. SIF is essential for probiotic strains to colonise the small intestine. This result indicates that *L. plantarum* (T23/3) can colonize and survive in the small intestine for exertion a positive effect on the health and well being of host.

Bile tolerance

Since bile salts disorganize the structure of the cell membrane, it is toxic for living cells (20). Therefore, bile tolerance is considered as an important characteristic of the bacteria which enables it to survive, grow, and exert its action in gastrointestinal transit. In the human gastrointestinal tract, the mean bile concentration is believed to be 0.3% (w/v) and it is considered as critical and high enough to screen for resistant probiotic strains (21). In this study, growth capacity of *L. plantarum* (T23/3) in the presence of bile salt was evaluated. After 4 h, it is able to grow in the PBS containing 0.3% (w/v) oxgall (Fig. 1B). This result indicates that this strain can survive and colonize in the small intestine. This property may constitute an important defense mechanism against infection in the gastrointestinal tract.

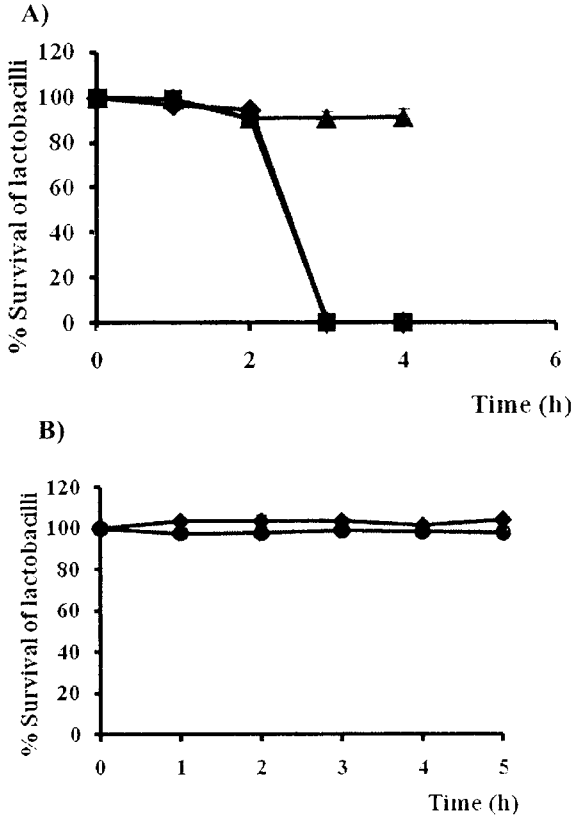


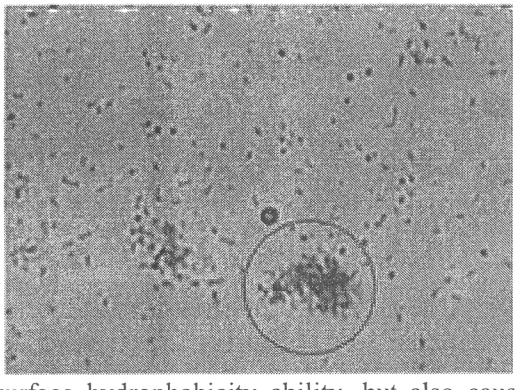
Figure 1 Survival of *L. plantarum* T23/3 in A) simulated gastric fluid at pH 2 (◆), pH 3 (■), pH 4 (▲) and B) simulated intestinal fluid at pH 8 (◆) in bile (oxgall) at 0.3% w/v (●)

Aggregation activity

The result of auto-aggregation and surface hydrophobicity assay of *L. plantarum* (T23/3) showed self-aggregation producing macroscopic granules the phenomenon was clearly observable under the light microscope as shown in Figure 2 and this strain showed high surface hydrophobicity by SAT with ammonium sulfate concentration of 0.5 mol/l, repectively. This result indicates that the *L. plantarum* (T23/3) possess high potential ability to inhibit growth of

pathogens by competitive exclusion of pathogens from the cell surface and produce biofilm formation that prevents colonization by pathogens (9).

The result of co-aggregation assay of *L. plantarum* (T23/3) showed co-aggregation and adhesion with five strains of gastrointestinal pathogens were *E.coli, S. typhimurium, S. aureus, S. sonnei and V. cholera* observable under the light microscope. Such co-aggregation could be an important factor in maintaining gastrointestinal health because it produces an area around the pathogen where the concentration of antimicrobial substances produced by the lactobacilli is increased (22). Bacterial aggregation between microorganisms of the same strain or between genetically diverent strains is of considerable importance in several ecological niches, especially in the human gut. Therefore, the selected strains were not only exhibited for their auto-aggregation and



surface hydrophobicity ability, but also caused co-aggregation.

Figure 2 *L. plantarum* (T23/3) showed self-aggregation producing macroscopic granules the phenomenon was clearly observable under the light microscope

Conclusion

Lactobacillus (T23/3) strain used in this study revealed lactobacilli isolate T23/3 was identified as *L. plantarum*. This strain possessed inhibiting ability against five gastrointestinal pathogens and resistance to antibiotics commonly prescribed for infection caused by these pathogens. The strain has an ability to survive during gastric and intestinal transit (pH>3) at least 2 h. It displayed self-aggregation from macroscopic granules and has high surface hydrophobicity property with a maximal ammonium sulfate concentration of 0.5 mol/l and showed co-aggregation with five strains of gastrointestinal pathogens. According to the obtained results *L. plantarum* (T23/3) was a promising strain as probiotics.

Acknowledgments

Department of the Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University and Drug Delivery System Excellence Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University.

Reference

1. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Appl. Environ. Microbiol 2000; 66: 2578-2588.
2. Xiaodon Pan AB, Fenin C, Tianxing W, Honggang TA, Zhanyu ZA. The acid, bile tolerance and animicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food Control 2009; 20: 598–602.
3. Harsharnjit SG. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol 2003; 17: 55-73.
4. Del Piano M, Morelli L, Strozzi GP, Allesina S, Barba M, Deidda. Probiotics: from research to consumer. Dig. Liver Dis 2006; 38: 248-255.
5. Ljungh A, and Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics. Curr. Int. Microbiol 2006; 7: 273–89.
6. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. Food Prot 1998; 61: 1636-1643.
7. Reid G, Burton J, Devillard E. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. Med. Gen. Med 2004; 6: 49-63.
8. Dunne CO, Mahony L, Thornton G, Feeney M, Daly C, Collins JK. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. Am J. Clin. Nutr 2001; 73: 389-392.
9. Zhou X, Stephen JB, Maria GS, Catherine CD, Mohammed RI, Larry JF. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy

women using cultivation-independent methods. Microbiol 2004; 150: 2565-2573.
10. Leenhouts KJ, Kok J, Venema G. Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol 1990; 56: 2726–2736.
11. Kaewsrichan J, Peeyananjarassi K, Kongprasertkit J. Selectionand identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS. Immunol. Med. Microbiol 2006; 48: 75–83.
12. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Muller-Bertling S, Witte W, Goossens H. Antimicrobiol susceptibilities of *Lactobacillus, Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and culture intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrobiol. Chemotherap 2007; 5: 1-7.
13. Andreu A, Stapleton AE, Fennell CL, Hillier SL, Stamm WE. Hemagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. J. Infect. Dis 1995; 171: 1237-1243.
14. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl. Environ. Microbiol 1999; 65: 763-766.
15. Schleifer KH, Schmidhuber S, Ludwig W. Construction of a DNA probe for the specific identification of *Streptococcus oralis*. J. of Clin. Microbiol 1987; 26: 1042-1044.
16. Titpawan N. Selection and characterization of *Lactobacllus* spp. against gastrointestinal pathogens. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of pharmacy in pharmaceutical sciences. Prince of Songkla University, 2007.
17. Lefteris M, Vagelis T, Domitille F, Tom A, Georgia Z, Effie T. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica serovar Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol 2006; 157: 241–247.
18. Aysum C, and Candan G. Properties of potential *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiod 2003; 20: 511-518.
19. Jacobsen CN, Rosenfeldt NV, Hayford AE, Moller PL, Michaeisen KF. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. By *in vitro* techniques and evaluation of colonization ability of five selected strains in human. Appl. Environ Microbiol 1999; 11: 4949-4956.
20. Margolles A, Garcia L, Sanchez B, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilan CG. Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate-A preliminary study. Int. J. Food Microb 2003; 82: 2191–198.
21. Noriega L, Gueimonde M, Sanchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilan CG. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. Int. J. Food Microb 2004; 94: 179–86.
22. Liliana MP, Maria BD, Francisco R, Walter G, Cristina P, Lucila B. *Lactobacillus rhamnosus* L60 a potential probiotic isolated from the human vagina. J. Gen. Appl. Microbiol 2008; 54: 141-148.

Journal of
MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: http://mc.manuscriptcentral.com/jmfkorea

Lactobacillus plantarum as a probiotic potential bacterium for controlling gastrointestinal pathogens

Journal:	*Journal of Medicinal Foods*
Manuscript ID:	JMF-2012-2170
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	26-Jan-2012
Complete List of Authors:	Nakpheng, Titpawan; Prince of Songkla University, Drug Delivery System Excellence Center Kha, Rosainee; Prince of Songkla University, Pharmaceutical Technology Jehtae, Kholeeyoh; Prince of Songkla University, Drug Delivery System Excellence Center Balekar, Neelam; Prince of Songkla University, Pharmaceutical Technology Kaewnopparat, Sanae; Prince of Songkla University, Pharmaceutical Technology Srichana, Teerapol; Prince of Songkla University, Pharmaceutical Technology
Keywords:	probiotics, Lactobacillus (Acidophilus, Bulgaricus and others), Caco-2cells, antimicrobial, adhesion

SCHOLARONE™

Lactobacillus plantarum as a probiotic potential bacterium for controlling gastrointestinal pathogens

Titpawan Nakpheng[1], Rosainee Kha[2], Kholeeyoh Jehtae[1], Neelam Balekar[1,2], Sanae Kaewnopparat[1,2], Teerapol Srichana[1,2]

[1]*Drug Delivery System Excellence Center; and* [2]*Department of the Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla, 90112, Thailand.*

Address correspondence to: Teerapol Srichana, Department of the Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla, 90112, Thailand. Tel.: +66 74288842; fax: +66 74288148. E-mail address: teerapol.s@psu.ac.th

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

ABSTRACT Probiotics have been encouraged for the prevention and treatment of a wide range of diseases, and it is found to be efficacious in some clinical practice. The present study was undertaken to evaluate the potential probiotic properties of newly isolated *Lactobacillus* strain. The *L. plantarum* (T23/3) was originally isolated from the feces of healthy elderly volunteer and identified by 16S rRNA sequence homology. The *L. plantarum* (T23/3) showed better tolerance property to bile acid, simulated gastric and intestinal fluid and exhibited strong antimicrobial activity against tested enteropathogens. It formed macroscopic granules with high surface hydrophobicity and co-aggregated with tested microbial strain. It was resistant to some antibiotics used for treatment of diarrhea so there is possibility to co-administer *L. plantarum* as probiotic with antidiarrheal therapy. Furthermore, good adhesion and significant potential for decreasing adhesion of pathogens (*E.coli* and *V. cholera*) to Caco-2 cells were observed in these experiments. The stability profile of *L. plantarum* (T23/3) reflected high viability (upto12 months) in enteric coated capsules containing lactose. Our study provides evidence that *L. plantarum* (T23/3) has a promising future to protect humans from gastrointestinal infections and affirms to serve as a probiotic.

KEY WORDS: •***Probiotic*** •***Antimicrobial activity*** • ***Adhesion*** •***Survival*** • ***Stability***

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

INTRODUCTION

The incidence of illnesses that may be caused by microflora, such as gastrointestinal tract infections, constipation, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis), food allergies, antibiotic induced diarrhoea and certain cancers is of great concern.[1] The World Health Organization has currently advocated implementation of alternative strategies for controlling such gastrointestinal problems by exploiting the prophylactic and therapeutic potential of probiotic bacteria.[2] Intestinal microflora have metabolic, trophic, and protective functions, and the exogenous administration of probiotics can modify these functions to protect individuals against such pathological gastrointestinal conditions. Probiotics are live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host. These benefits can include such functions as providing a microbial barrier against gastrointestinal pathogens, through competitive exclusion of pathogen binding, modulation of the host's immune system, production of inhibitory compounds and even the provision of some vitamins including vitamin B_{12}. Cocktails of various microorganisms, particularly species of *Lactobacillus* and *Streptococcus*, have been used to produce fermented dairy products that traditionally have been associated with promoting human health. Lactobacilli are generally recognized as safe (GRAS), are natural inhabitants of the healthy human intestinal tract and also have a long history of use in foods and fermented products.[3] Lactobacilli produce a wide range of antibacterial compounds including organic acids during growth, hydrogen peroxide in the presence of oxygen, proteinaceous compounds such as bacteriocins.[4, 5] In order to survive in and colonize the gastrointestinal tract, probiotic bacteria should express high tolerance to acid and bile and have an ability to adhere to intestinal surfaces.[6] Enterocyte like Caco-2 cells have been successfully used for *in vitro* studies on the mechanism of cellular adhesion of nonpathogenic lactobacilli.[7] Although many potentially probiotic strains are currently available for

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

commercial use either in the form of fermented foods or pure cultures in powdered, tablet or capsule form, many of these bacteria may not have all the above characteristics.[7]

The objective of the present study was to characterize the potential probiotic properties of *L. plantarum* (T23/3) for its preventive and therapeutic action in gastrointestinal infections. In addition any potential probiotic microbe must be stable over a period of 12 months during storage in gelatin capsules.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth condition

The *L. plantarum* (T23/3) strain used in this study was isolated from feaces of healthy elderly volunteers who had not taken antibiotics and had no recent history of gastrointestinal complaints for at least 3 months prior to the sampling date. The selected isolate was stored at -80°C in de Man Rogosa Sharpe broth (MRS, Difco, USA), supplemented with 20% (v/v) glycerol until used. For routine analysis the isolate was sub-cultured twice in MRS broth, each for 24 h at 37°C.

Identification of Lactobacillus strain by 16S rRNA gene sequencing

Extraction of chromosomal DNA was achieved using the protocol of Kaewsrichan et al.[8] The primers LacAll-F (5`-TGCCTAATACATGCAAGTC-3') and LacAll-R (5`-CCTTGTTACGACTTCACC-3`) were used to amplify nearly the full length of the 16S rRNA gene, corresponding to the conserved 16S rRNA gene regions of *L. plantarum* spp. PCR amplification was performed with a Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 9600, programmed for 35 cycles, comprising denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 50°C for 1 min and elongation at 72°C for 2 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min. An amplicon of about 1500 bp in size was excised from a 1% agarose gel after electrophoresis,

purified using the GFX^{TM} Purification Kit (Amersham Biosciences, USA), and cloned into pGEM-T Easy using the procedures recommended by the manufacturer (Promega, USA). The 16S rRNA gene was sequenced directly using the recombinant plasmids as the DNA template, an ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA), T7 and SP6 universal primers, and primers designed by a walking strategy. Analysis of the alignment and homology for the sequences obtained was performed by BIOEDIT and BLAST programs.

Antimicrobial activity

The inhibitory activity of *L. plantarum* (T23/3) against potential bacterial pathogens was measured by an agar overlay diffusion method. Briefly the isolate was cultured in MRS broth and incubated anaerobically at 37°C for 24 h. Lactobacilli culture pellets were collected by centrifugation (5,000 rpm, 10 min, 4°C). The cell pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Difco, USA) to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. Ten μL of lactobacilli cell pellet was spotted onto Brain Heart Infusion (BHI, Difco, USA) agar plates containing 1% of glucose using a template guide and incubated anaerobically at 37°C for 4 days.

The potential pathogenic test strains of clinical origin used for this study were: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Vibrio cholera* and *Staphylococcus aureus*. They were kindly provided by the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University. Gastrointestinal pathogens were routinely grown at 37°C for 18 h. Culture pellet of the pathogens were collected by centrifugation (5,000 rpm, 10 min, 4°C). The cell pellet of indicator pathogens were resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. Four mL of inoculum in soft agar medium was overlain on the top of the plates of lactobacilli. After incubation at 37°C for 18 h, the plates were

observed for clear zones of inhibition around lactobacilli colonies with an antibiotic zone reader.

Susceptibility to antibiotics

The antibiotic susceptibility testing of *L. plantarum* (T23/3) was determined by an agar diffusion method. The antibiotic discs (Oxoid, UK) were ampicillin (30 μg), chloramphenicol (30 μg), doxycycline (30 μg), erythromycin (15 μg), neomycin (30 μg), penicillin (10 units) and tetracycline (30 μg). The cell pellet of this strain was resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. The adjusted cultures were streaked with a sterile cotton swab onto the surface of MRS agar plates. The antibiotics discs were placed onto the surface of the agar. After incubation under anaerobic condition at 37°C for 24 h, the plates were observed for a clear zone of inhibition around antibiotic discs with an antibiotic zone reader.

Upper gastrointestinal transit tolerance assay

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. One mL of this suspension was added to 9 mL of SGF (containing pepsin (1:10000, ICN, Sigma, USA) in PBS to a final concentration of 3 g/L and adjusted to pH 2.0, 3.0, and 4.0) and SIF (containing pancreatin USP (P-1500, Sigma, USA) in PBS to a final concentration of 1 g/L and adjusting the pH to 8.0) before incubating under anaerobic condition at 37°C. Resistance was assessed in terms of viable colony counts and enumerated on MRS agar plates after incubation at 37°C for 1, 2 and 3 h with SGF, and 1, 2, 3 and 4 h with SIF, to reflect the transit time in the stomach and small intestine, respectively.

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

Bile tolerance assay

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. One mL was then added to 9 mL of PBS containing 0.3% w/v oxgall (Sigma, USA) and incubated under anaerobic conditions for 1, 2, 3 and 4 h at 37°C. Tolerance was assessed in terms of the viable colony counts enumerated on MRS agar plates.

Autoaggregation test

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended and dispersed in PBS to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. One drop was placed on a glass slide and examined microscopically. Autoaggregation was determined as the ability to form aggregates within 2 min. *L. cellobiosus* that had also been isolated from the feaces of a healthy elderly human was used as a negative control.[9]

Surface hydrophobicity

Surface hydrophobicity was studied using the salt aggregation test (SAT). The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was resuspended in 20 m*M* of sodium phosphate buffer (pH 6.8) (Merck, Germany) to a final concentration of 1×10^7 cfu/mL. Solutions (500 μL) of ammonium sulfate (Merck, Germany) (0.5, 1.5, 2.0 and 4.0 mol/L) were mixed with an equal volume of cell suspension on a glass slide and examined microscopically. The lowest concentration of ammonium sulfate that caused the bacteria to aggregate was defined as the SAT value. The isolate was classified into one of three groups: high surface hydrophobicity (SAT < 0.9 mol/L), intermediate hydrophobicity (SAT 0.9-1.5 mol/L) and hydrophilic (SAT >1.5 mol/L).[9]

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

Co-aggregation assay of pathogens with lactobacilli

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) and indicator pathogens (*E. coli*, *S. aureus*, *S. sonnei*, *S. typhimurium*, and *V. cholera*) were resuspended in PBS, each to a final concentration of 1×10^8 cfu/mL. Aliquots (500 μL) of the lactobacilli isolate were mixed with an equal volume of each indicator pathogen. The co-cultures were shaken in anaerobic conditions at 37°C, 100 rpm for 4 h. After incubation, the suspensions were smeared on a glass slide, Gram-stained and observed microscopically. A co-aggregation assay was positive if *L. plantarum* (T23/3) formed aggregates with the other pathogenic strains. [9]

In vitro adherence assay

The adherence of *L. plantarum* (T23/3) to enterocyte like Caco-2 cells (ATCC HTB-37, Rockville, USA) was examined. Caco-2 cells were routinely grown in Eagle's minimal essential medium (MEM, Gibco, USA) supplemented with 15% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA), antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin; Gibco, USA). Monolayers were prepared in 12-well tissue culture plates (Corning, USA) seeded (1 mL) at a concentration of 4.5×10^5 cell/well into the wells and incubated at 37°C in 5% CO_2 for 15 days with the culture medium changed daily.

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) was washed twice with PBS and resuspended in complete MEM without antibiotics to a final concentration of 1×10^7 cfu/mL. For the adherence assay, Caco-2 monolayers in the wells of the tissue culture plates were washed twice with PBS and pre-incubated with 500 μL complete medium without antibiotics for at least 30 min before inoculation with the lactobacilli isolate. A bacterial MEM suspension (500 μL) was transferred onto the Caco-2 monolayers. The plate was incubated at 37°C in 5% CO_2 for 1 h. After incubation, the wells were washed four times with PBS to release unbound bacteria. The washed monolayer was then treated with 1 mL of 0.05% Triton X-100 and

incubated at 37°C for 5 min to lyse the cells. The adhesion of the lactobacilli strain to Caco-2 cells was expressed as a percentage of the viable bacteria compared to their initial population. *L. casei* TITR 1463 strain was used as a positive control, while *L. cellobiosus* weak adhesive strain was used as a negative control (reference strain previously isolated in our laboratory).

Inhibition of pathogen adhesion to Caco-2 cells

To study the effect of lactobacilli on the binding of pathogens to enterocyte-like Caco-2 cells monolayers. Caco-2 cells were prepared as described before. The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) and pathogens (*E. coli* and *V. cholera*) were resupended in MEM without antibiotic to provide 1×10^7 cfu/mL of each culture. Aliquots (500 μL) of the lactobacilli strain and equal volumes of each indicator pathogens were added in a Caco-2 monolayers well plate. After incubation at 37°C for 1 h, Caco-2 cells were solubilized and the adhered pathogen populations were enumerated as described.

Preparation of lactobacilli enteric coated capsules

The cell pellet of *L. plantarum* (T23/3) were resuspended in 8% lactose (Fluka, Germany). The suspensions obtained with a cell density of about 1×10^8 cfu/mL were lyophilized for 24 h (Dura-Stop and Dura-Dry, FTS system, USA). The lyophilized powder of lactobacilli was filled into hard gelatin capsules (size No. 1). Each batch of the capsules was coated with a coating solution containing 12% Eudragit®L-100, 3% propylene glycol, 1% polysorbate 80, 45% ethyl alcohol and 39% acetone by spray gun with nozzle diameter of 1.0 mm (Walther Pilot, Germany) at a flow rate of 3 mL/min. The coating process was carried out using conventional coating pan. The film was allowed to dry with the help of dryer with an inlet temperature of 35-40°C for 10 min. The capsules were kept in airtight light resistant bottles containing silica-gel desiccants and stored at 4°C in the refrigerator. Viability

of lactobacilli was determined at defined time intervals throughout a storage period of 12 months.

Viability of lactobacilli

The number of viable lactobacilli before and after freeze-drying and storage was determined by a plate count method. Lyophilized powders were rehydrated in 1 mL of PBS and these suspensions were serially two fold diluted in MRS broth. All dilutions were dropped into MRS agar and colonies were enumerated after incubation of plates anaerobically at 37°C for 48 h. Results were expressed as %viability of the initial lyophilized powder.

In vitro release studies

Release of the lactobacilli from capsules was carried out to assess the ability of the coating materials to protect the capsules at the physiological pH of the stomach and intestine at 37 ± 0.5°C using a USP Dissolution Apparatus I rotating at 100 rpm. The coated capsules were tested initially in SGF pH 1.2 containing 0.1*N* hydrochloric acid (900 mL). This was followed by replacing the dissolution medium with 900 mL SIF pH 7.4 and the dissolutions were continued for another 3 h. At regular time intervals, the number of viable lactobacilli in the dissolution medium was determined by the normal plate count method.

Statistical analysis

All data were expressed as a mean ± SD. The student's *t* test was used for statistical analysis by comparing treatment groups versus control groups. Results were regarded as statistically significant at $p < 0.01$.

Results and discussion

Identification of Lactobacillus strain

The identification of lactobacilli was initially based on colony morphology, Gram-stain reaction, sugar fermentation profiles and enzyme activities. The isolated strain was identified as *L. plantarum* by biochemical tests and the API 50 CHL system (bioMe riueux, France) with 93.0% confidence. This result was confirmed with rRNA sequencing. 16S rRNA and 32S rRNA sequence probes suggested the use of their specificities, which are highly conserved and give results with a high degree of confidence. rRNA sequences are one of the quickest ways to identify lactic acid bacteria species used in fundamental and applied research.[10, 11] In this study, this isolate was confirmed by 16S rRNA sequence system (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) under accession number HM051157 (1,486). The 16S rRNA of the isolate was 99.0% identical with that of other *L. plantarum* strains registered in the GenBank database system. It was named *L. plantarum* (T23/3).

Antimicrobial activity

One important property of a functional probiotics is its anti-pathogenic activity. The antimicrobial ability of *L. plantarum* (T23/3) against five potential gastrointestinal pathogens was assayed. This isolate showed strong inhibitory action on the selected pathogens after an overnight incubation period (Table 1). *L. plantarum* (T23/3) inhibited both Gram positive (*S. aureus*) and Gram negative bacteria (*E. coli, S. typhimurium, S. sonnei* and *V. cholera*) with a range of 36-38 mm. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria may be due to a number of factors. Generally, the effect of lactobacilli in controlling the proliferation of pathogenic bacteria is by producing a wide range of antibacterial compounds such as organic acids (e.g., lactic acid and acetic acid), hydrogen peroxide, bacteriocins and fatty acid.[12] In fact, the production of lactic acid was enough to inhibit certain bacterial strains. This is because the unionized form of lactic acid triggers a lowering of the internal pH of the cells that causes a

collapse in the electrochemical proton gradient in sensitive bacteria, hence having a bacteriostatic or bactericidal effect.[13]

Antibiotic resistance

Antibiotics resistance has become a serious problem in treatment of infections caused by a variety of microorganisms due to the indiscriminate use of antibiotics in human medicine. Detection rate of multi-antibiotic resistant bacteria has increased and resistance is common among strains belonging to the gastrointestinal tract of humans. In this study, *L. plantarum* (T23/3) was sensitive to ampicillin and chloramphenicol. However, it was resistant to erythromycin, doxycycline, penicillin G, neomycin and tetracycline. One of desirable properties of lactobacilli to be used as probiotic is the resistant to antibiotics. The lactobacilli can effectively protect the natural balance of intestinal microflora during and after therapy by the antibiotics to which they were proved resistant. This strain is also useful in the bio-agents and dairy product manufacture if antibiotics were present in the milk due to antibiotic use in growth promotion and gastrointestinal therapy. The high intrinsic resistance and susceptibility of lactobacillus strains to a range of antibiotics is important. Since these strains survive during a specific antibiotic treatment. In the treatment of gastrointestinal tract infections, better management is obtained when concurrent therapy is made with probiotic lactobacilli and antibiotics to which they are intrinsically resistant. By doing so, intestinal microflora can recover more quickly.[14]

Survival gastrointestinal transit

In probiotic selection, this strain needs to clearly demonstrate that acid sensitive strains can colonize and survive in the small intestine.[15] In this study, the effects of different pH values of SGF and SIF on the viability of *L. plantarum* (T23/3) were studied (Fig. 1). This isolate remained viable at pH 4.0 for 4 h, but it did not survive at pH 2.0 and 3.0 after 2 h of

incubation in SGF conditions (Fig.1A). In the SIF condition, the total number of *L. plantarum* (T23/3) showed no loss of viability after incubating at pH 8.0 for 4 h (Fig. 1B). For bile tolerance study, growth capacity of *L. plantarum* (T23/3) in the presence of bile salt was evaluated. After incubation for 4 h, it was able to grow in the PBS containing 0.3% (w/v) oxgall as shown in Figure 1B. This result indicated that this strain could survive in gastric conditions for up to 2 h so when it is moved to the small intestine, at a more neutral pH, it is expected that it will grow, become attached to the epithelium, and eventually start to provide health benefits.

Aggregation activity

Cell adhesion is a complex process involving contact between the bacterial cell membrane and interacting surfaces. The ability to adhere to epithelial cells and mucosal surfaces has been suggested to be an important property of many bacterial strains used as probiotics. A variety of surface structures of bacteria are involved in adherence mechanisms including bacterial aggregation between microorganisms of the same strain (auto-aggregation) or between genetically different strains (co-aggregation) and hydrophobic properties is of considerable importance in several ecological niches, especially in the human gut, where probiotics are to be active.[16] In the gastrointestinal tract, aggregation can allow lactobacilli to form a mucosal biofilm and thus prevent the attachment of pathogens.[17] In the autoaggregation assay, *L. plantarum* (T23/3) did show self-aggregation to produce macroscopic granules. This phenomenon was clearly observed with a light microscope (Fig. 2A.). Aggregation was not observed with the *L. cellobiosus* isolate used as a negative control (Fig. 2B).

The cell surface hydrophobicity assay was performed to confirm the auto-aggregation characteristic. The property of hydrophobicity is an important mechanism in bacterial

adherence. In this study, the results revealed that this strain had a high surface hydrophobicity. In general, lactobacilli strain with that highly negative charged, hydrophilic cell surface adhered minimally whereas lactobacilli strains with a slightly negative charged, hydrophobic cell surface adhered strongly.[18] As the salt concentration increased, some of water molecules are attracted by the salt ions, which decreases the number of water molecules available to interact with the charged part of the bacterial cell wall. As a result of increased demand for solvent molecules, the bacterial cell wall cell wall interactions are stronger than the solvent-bacteria cell wall interactions, the bacterial cell wall then coagulates by forming hydrophobic interactions with each other.

Co-aggregation could be an important factor in maintaining gastrointestinal health because it produces an area around the pathogen where the concentration of antimicrobial substances produced by the lactobacilli is increased.[18] The result obtained showed that *L. plantarum* (T23/3) showed co-aggregation and adhesion with five strains of gastrointestinal pathogens (*E. coli, S. typhimurium, S. aureus, S. sonnei and V. cholera*) as observed with a light microscope (data not shown). Bacterial aggregation between microorganisms of the same strain or between genetically divergent strains is of considerable importance in several ecological niches, especially in the human gut and many authors have reported that the co-aggregation abilities of lactobacilli species might enable it to form a barrier that prevents colonization by pathogenic bacteria.[17] Therefore, the selected strains not only exhibited auto-aggregation and surface hydrophobicity ability, but also caused co-aggregation.

Adhesion to Caco-2 cells

The adhesion of probiotic strains to intestinal epithelial cells is considered as a prerequisite feature for attachment and proliferation in the intestinal environment. Adhesion has also been cited as important for transient colonization, enhanced healing of the damaged

gastric mucosa, modulation of the immune system and antagonism against pathogens. Thus, the ability to adhere to epithelial cells and mucosal surfaces has been suggested to be an important property of many probiotic bacterial strains.[18] The binding ability of isolates was evaluated using the Caco-2 cells. This cell line has been used as an *in vitro* model for intestinal epithelium and used to screen for adhesive strains.[17] In this study, *L. plantarum* (T23/3) was proved to be the most adhesive strain since approximately 90% of added bacteria were bound to Caco-2 cell cultures (Fig. 3). This result showed that *L. plantarum* (T23/3) was able to bind to Caco-2 epithelial cells as did the positive *L. casei* TITR 1463 control. Whereas, this strain bound with much higher numbers than that of the negative control of *L. cellobiosus* ($p<0.01$).

Cell adhesion is a multistep process involving contact of the bacterial cell membrane and interacting surface. In this study, we investigated the competitive binding, exclusion and displacement inhibition of adherence of pathogenic bacteria to Caco-2 cell by adhering *L. plantarum* (T23/3). The table 2 represents the inhibition of pathogens adhesion in presence of *L. plantarum* (T23/3). All the numbers of adherent pathogens were obviously reduced by co-culture with *L. plantarum* (T23/3). The reduction of *E. coli* and *V. cholera* adhesion to Caco-2 cells by the lactobacilli was more than 70% when compared to the control ($p<0.01$). However, *L. plantarum* (T23/3) showed good adhesion and inhibition of pathogen binding and is thereby proving as a suitable probiotic strain.

Evaluation of the enteric coated capsules

The freeze-drying process is commonly used for the preservation and storage of microorganisms for industrial applications. The optimal performance of certain strains should guarantee their potential to survive and for stabilization of their metabolic activity.[19] The survival rate of microorganisms varies among the strains and the agents used as the

suspending media. In the present studies, lactose was used as a protecting agent to enhance their survival during freeze drying and subsequent storage. Lactose can also promote the delivery of microorganisms because lactose is used as a carbon source. In this study, *L. plantarum* (T23/3) strain survived after freeze drying and the data show no significant differences before and after the process (Fig. 4A). This assured that the lyophilized process did not kill *L. plantarum* (T23/3). This strain remained viable upto 100% in capsules after 12 months of storage at 4°C (Fig. 4B).

Enteric coated capsules are designed to remain intact in a highly acidic environment of the stomach but dissolves rapidly in the neutral environment of the small intestine.[19] Eudragit®L-100 was used to coat the hard gelatin capsules for the delivery *of L. plantarum* (T23/3) dry powder form to the small intestine. Eudragit®L-100 is an anionic copolymer of methacrylic acid and acrylates which is resistant to the acidic environment present in the stomach but dissolves rapidly in the small intestine.[20] The *in vitro* release profiles of *L. plantarum* (T23/3) from the freeze dried enteric-coated capsules are shown in Figure 5. The freeze-dried lactobacilli loaded into the Eudragit®L-100 coated capsule did not release the bacterial content in SGF pH 1.2 over 2 h but dissolved, released the *L. plantarum* (T23/3) instantly in the SIF at pH 7.4. The results demonstrated that Eudragit®L-100 coated capsule were successful for intestinal delivery of lactobacilli.

CONCLUSION

The *Lactobacillus* isolate T23/3 used in this study was identified as *L. plantarum*, presented interesting probiotic features, especially good resistance to acid and bile conditions, as well as good adhesion capacity to Caco-2 cells. This strain showed antagonistic effects against enteric bacterial pathogens and interference with pathogens adhesion to Caco-2 cells. These characteristics may enable them to have antibacterial activity and establish themselves

in the intestinal tract and to compete with other bacterial groups. A freeze dried powder of the isolate in capsules survived up to 12 months after storage at 4°C. Overall *L. plantarum* reflects to be promising strain as a probiotic.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Office of Higher Education of Thailand and Thai Tham Alliances. Thanks to Dr. Brian Hodgson for assistance with the English.

REFERENCES

1. Oliver MM: Administration of *Lactobacillus GG* to hospitalised children reduces the risk of gastrointestinal and respiratory tract infections. *Evid Based Nurs* 2011; 14: 8-9.
2. Cencic A, Chingwaru W: The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutr* 2010; *2*: 611-625.
3. Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR: Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Lett Appl Microbiol* 2010; 50: 419–424.
4. Pangsomboon K, Bansal S, Martin GP, Suntinanalert P, Kaewnopparat S, Srichana T: Further characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1928–1940.
5. Mori YK, Orihashi T, Kanai Y, Sato M, Sera K, Hagiwara K: Fermentation Metabolites from *Lactobacillus gasseri* and *Propionibacterium freudenreichii* exert bacteriocidal effects in mice. *J Med Food* 2010; 13: 1460–1467.
6. Del Piano M, Morelli L, Strozzi GP, Allesina S, Barba M, Deidda F, Lorenzini P, Ballaré M, Montino F, Orsello M, Sartori M, Garello E, Carmagnola S, Pagliarulo M, Capurso L: Probiotic: from research to consumer. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 248-255.

Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

7. Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z: The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Cont* 2009; 20: 598-602.

8. Kaewsrichan J, Peeyananjarassi K, Kongprasertkit J: Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS* 2006; 48: 75–83.

9. Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Salmela TV, Sandholm TM, Wright AV: Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 351–354.

10. Dickson EM, Riggio MP, Macpherson L: A novel species specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *J Med Microbiol* 2005; 54: 299–303.

11. Reid G, Burton J, Hammond JA, Bruce AW: Nucleic acid-based diagnosis of bacterial vaginosis and improved management using probiotic lactobacilli. *J Med Food* 2004; 7: 223-228.

12. Makras L, Triantafyllou V, Messaoudi DF, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Servin A, Vuyst LD: Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica serovart typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol* 2006; 157: 241-247.

13. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H: Antimicrobiol susceptibilities of *Lactobacillus, Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and culture intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrobiol Chemother* 2007; 59: 900-912.

14. Kotsou MG, Mitsou, EK, Oikonomou IG, Kyriacou AA: In vitro assessment of probiotic properties of *Lactobacillus* strains from infant gut microflora. *Food Biotechnol* 2008; 22: 1-17.

15. Wu R, Wang L, Wang J, Li H, Menghe B, Wu J, Guo M, Zhang H: Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J Basic Microbiol* 2009; 49: 1-9.

16. Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang Y, Zhang H: Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food cont* 2010; 21: 695-701.

17. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S: Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* 2008; 226: 1065-1073.

18. Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pájaro C, Barberis L: *Lactobacillus rhamnosus* L60 a potential probiotic isolated from the human vagina. *J Gen App Microbiol* 2008; 54: 141-148.

19. Otero MC, Espeche MC, Macías MEN: Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. delbrueckii for veterinarian probiotic applications. *Proc Biochem* 2007; 42: 1406–1411.

20. Sonaje K, Chen YJ, Chen HL, Wey SP, Juang JH, Nguyen HN, Hsu CW, Lin KJ, Sung HW: Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly (γ-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomater* 2010; 31: 3384-3394.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

Table 1. Inhibition zone of *L. plantarum* (T23/3) against gastrointestinal pathogens

Gastrointestinal pathogens	Inhibition zone (mm) (n=5, mean ± SD)
Escherichia coli	38.8 ± 0.8
Salmonella typhimurium	38.0 ± 0.7
Shigella sonnei	36.6 ± 0.8
Staphylococcus aureus	37.8 ± 0.4
Vibrio cholera	38.0 ± 0.7

Table 2. Percent attachment of *E. coli* and *V. cholera* to Caco-2 cell line under competition, exclusion and displacement condition with *L. plantarum* (T23/3)

GI pathogens	Control	% Pathogen attachment (mean ± SD, n=5) under the following condition		
		Competition	Exclusion	Displacement
E. coli	100 ± 0.2	74.31 ± 0.5	70 31 ± 0.2	80.25 ± 0.2
V. cholera	100 ± 1.1	75.93 ± 1.1	73.52 ± 0.3	79.53 ± 0.2

All values are significantly lower than the control at $p < 0.01$

figure legends

Fig. 1. Percent survival of *L. plantarum* (T23/3) in simulated gastric fluid at pH 2 (◆), pH 3 (■), pH 4 (▲) (A). simulated intestinal at pH 8 (◆) and bile (oxgall) at 0.3% (w/v) (●) (B) (mean ± SD, n=6)

Fig. 2. Microscopic observation of *L. plantarum* (T23/3) showing granules self-aggregation (A) and no aggregation of *L. cellobiosus* used as a negative control (B) (50X)

Fig. 3. Percent attachment of *L. plantarum* (T23/3) on the Caco-2 cells (mean ± SD, n=6)

Fig. 4. Survival of *L. plantarum* (T23/3) before and after freeze drying (A) and storage as a freeze-dried powder into 12% Eudragit®L-100 coated capsule during 12 months at 4°C (B) (mean ± SD, n=6)

Fig. 5. Dissolution profiles of *L. plantarum* (T23/3) from the freeze-dried in 12% Eudragit®L-100 coated capsule to delay release of probiotic during 2 h in SGF pH 1.2 and immediately release in SIF pH 7.4 (mean ± SD, n=6)

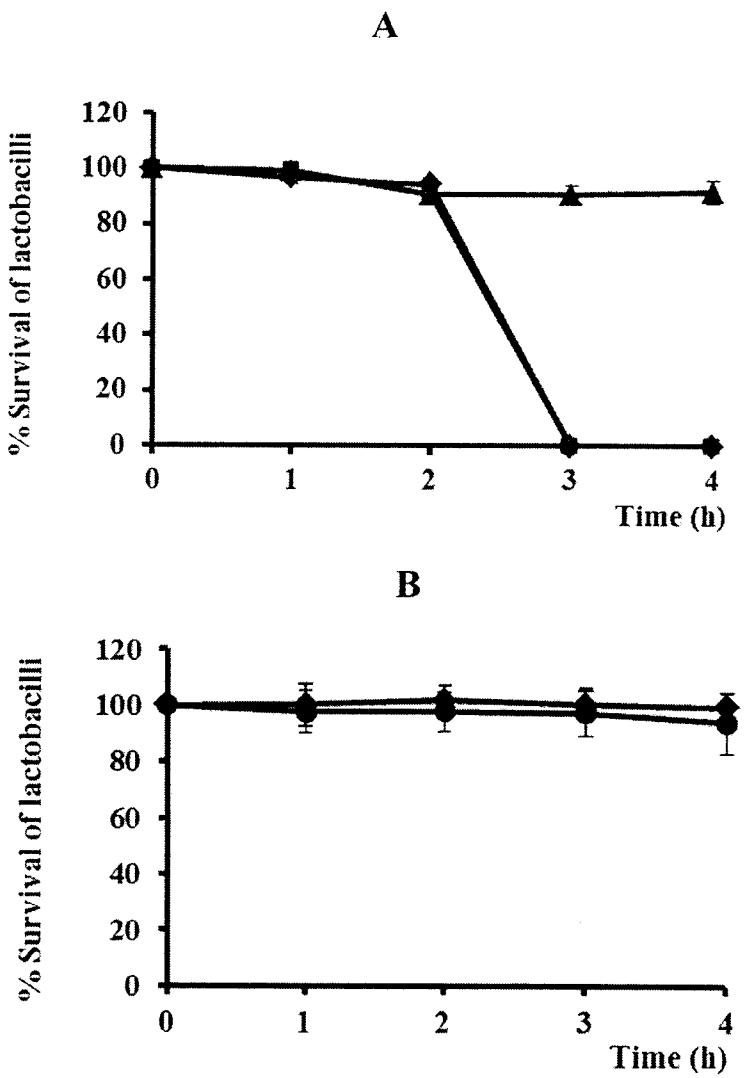


Fig. 1. Percent survival of L. plantarum (T23/3) in simulated gastric fluid at pH 2 (diamond), pH 3 (square), pH 4 (triangle) (A), simulated intestinal at pH 8 (diamond) and bile (oxgall) at 0.3% (w/v) (circle) (B) (mean ± SD, n=6)
119x159mm (600 x 600 DPI)

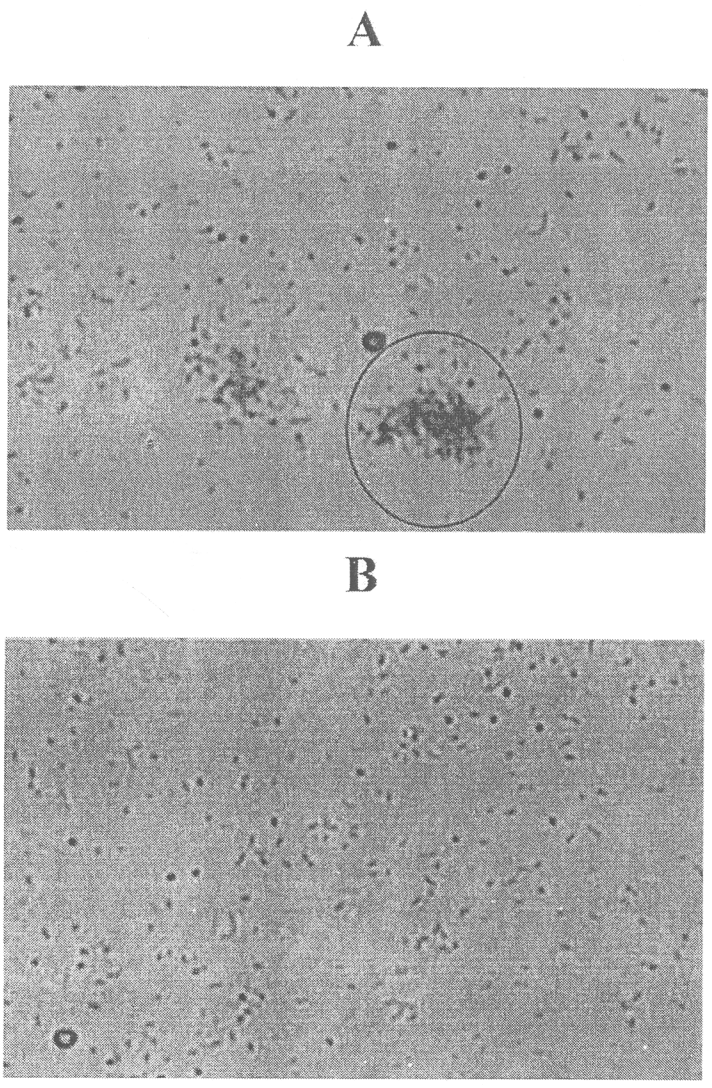


Fig. 2. Microscopic observation of L. plantarum (T23/3) showing granules self-aggregation (A) and no aggregation of L. cellobiosus used as a negative control (B) (50X)
90x137mm (600 x 600 DPI)

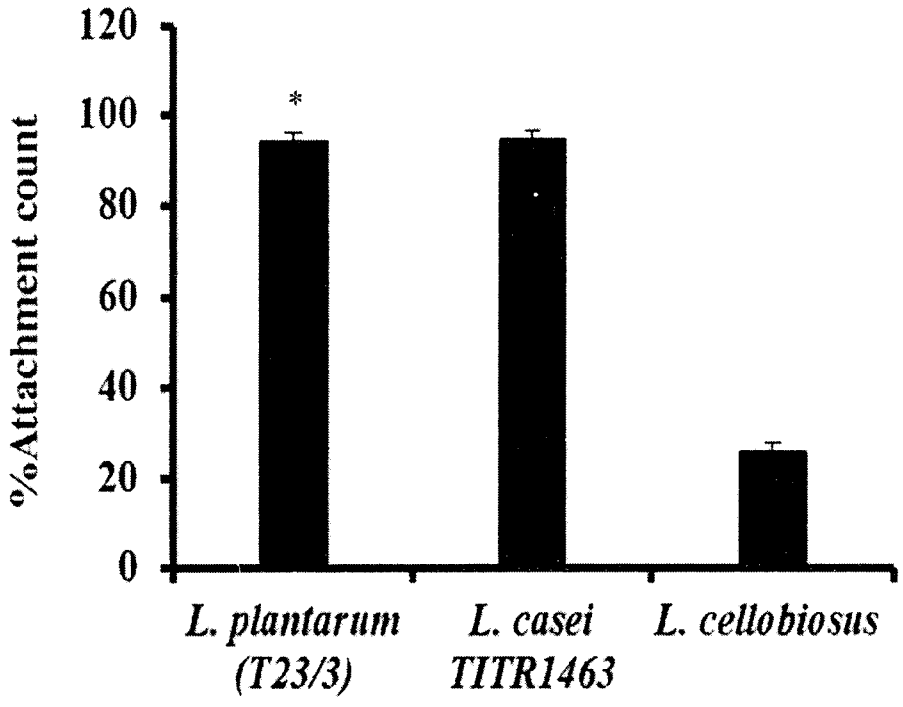


Fig. 3. Percent attachment of L. plantarum (T23/3) on the Caco-2 cells (mean ± SD, n=6)
118x94mm (600 x 600 DPI)

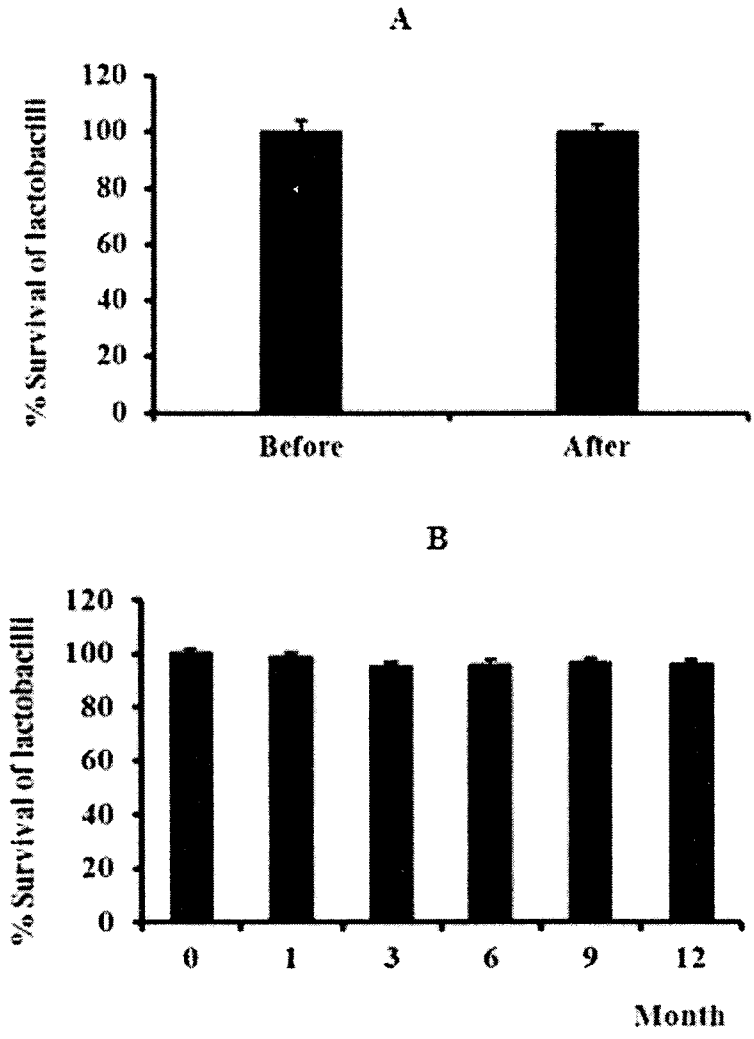


Fig. 4. Survival of L. plantarum (T23/3) before and after freeze drying (A) and storage as a freeze-dried powder into 12% Eudragit®L-100 coated capsule during 12 months at 4°C (B) (mean ± SD, n=6)

118x155mm (600 x 600 DPI)

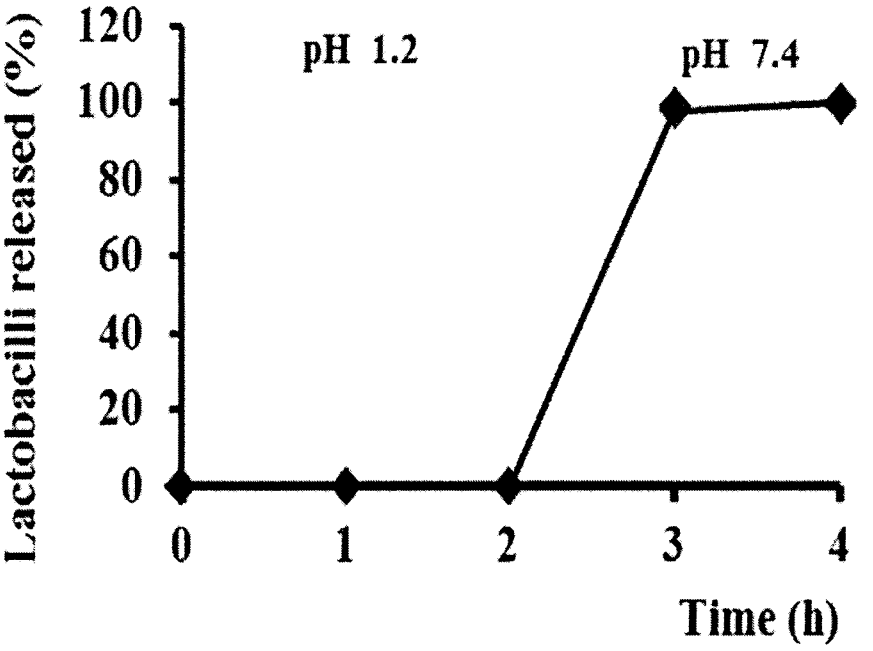


Fig. 5. Dissolution profiles of L. plantarum (T23/3) from the freeze-dried in 12% Eudragit®L-100 coated capsule to delay release of probiotic during 2 h in SGF pH 1.2 and immediately release in SIF pH 7.4 (mean ± SD, n=6)
39x31mm (600 x 600 DPI)

หนังสือแสดงความเห็นเกี่ยวกับความก้าวหน้าโครงการจากผู้ประกอบการภาคเอกชน

วันที่ 13 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

เรื่อง ความเห็นเกี่ยวกับความก้าวหน้าของโครงการ การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแลคโตแบซิลลัสเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับผู้ป่วยท้องเสียเรื้อรัง

เรียน ประธานคณะอนุกรรมการส่งเสริมงานวิจัยเชิงพาณิชย์เพื่อการบ่มเพาะวิสาหกิจและการจัดการทรัพย์สินทางปัญญา

ข้าพเจ้า เภสัชกรหญิง อาริยา สาริกะภูติ ตำแหน่ง กรรมการบริษัท บริษัท ไทยธรรม อัลไลแอนซ์ จำกัด ในฐานะเอกชนผู้เข้าร่วมโครงการมีความคิดเห็นเกี่ยวกับผลการดำเนินของโครงการดังนี้ มีความก้าวหน้าดี ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี น่าจะมีโอกาสในเชิงพาณิชย์สูง

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

(ลงชื่อ).....

(เภสัชกรหญิง อาริยา สาริกะภูติ)

(ตำแหน่ง) กรรมการบริษัท

ThaiDham Allianze Ltd