



Srinakharinwirot University Journal of Sciences and Technology



Volume 17, Issue 1, January - June 2025, Pages 1 – 13 ISSN 2985-2641 (Online)

Research Article

การประเมินสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้

Evaluation of primary probiotic properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Southern Thailand fermented foods

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล*, น้อมจิตต์ แก้วไทย อันเดร, เสาวณีย์ ชัยเพชร, ธนิกันต์ ธรสินธุ์

Sirinath Srionnual*, Nomchit Kaewthai Andre, Saowanee Chaipetch, Tanikarn Torasin

สาขาวิชาการจัดการอาหารและบริการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

Department of Food and Service Management, Faculty of Agro-Industry, Rajamangala University
of Technology Srivijaya.

*Corresponding author, e-mail: sirinat.s@rmutsv.ac.th

Received: 7 October 2024; **Revised:** 6 December 2024; **Accepted:** 17 December 2024

บทคัดย่อ

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน 6 สายพันธุ์ (PPD90 PS113 KS173 HSD392 HSD398 และ PPD444) ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ พบว่าแบคทีเรียที่มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกดีที่สุดคือ สายพันธุ์ PS113 กล่าวคือ มีการรอดชีวิตที่ pH 3.0 ได้ 84.02% ทนต่อกรดและน้ำดี 0.3% (w/v) ในการทดสอบแบบต่อเนื่องกัน ทนต่อน้ำดี เติบโตในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ดี และทนต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ tetracycline รองลงมาคือ สายพันธุ์ PPD90 KS173 และ HSD392 เนื่องจากการอยู่รอดในสภาวะที่ทดสอบแตกต่างกันไป จึงเลือกแบคทีเรียแลกติก 4 สายพันธุ์นี้ไปจัดจำแนกถึงระดับสกุลและชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน 16S rDNA โดยพบว่า แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PPD90 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus pentosus* 99.15% สายพันธุ์ PS113 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* 100% สายพันธุ์ KS173 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus pentosus* 100% และสายพันธุ์ HSD392 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus faecium* 99.79%

คำสำคัญ: โปรไบโอติก; แบคทีเรียแลกติก; อาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้

Abstract

The 6 strains (PPD90 PS113 KS173 HSD392 HSD398 and PPD444) of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from southern Thailand fermented foods were evaluated their primary probiotic properties. Among the selected strains, PS113 showed the best probiotic potential with survival at pH 3.0 (84.02%), high tolerance to acid followed by 0.3% (w/v) bile salt, high tolerance to bile salt, survived well in aerobic and anaerobic conditions and resistant to penicillin and tetracycline, as following by PPD90 KS173 and HSD392 because the different of their survive in test conditions. By analysis of their 16S rDNA gene sequences, PPD90 was identified as *Lactobacillus pentosus* with 99.15% similarity, PS113 was identified as *Lactobacillus plantarum* with 100% similarity, KS173 was identified as *Lactobacillus pentosus* with 100% similarity and HSD392 was identified as *Enterococcus faecium* with 99.79% similarity.

Keywords: Probiotic; Lactic Acid Bacteria; Southern Thailand Fermented Foods

บทนำ

ในแต่ละปีพบผู้ป่วยโรคทางเดินอาหารจำนวนมากที่เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำดื่มที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของหลายประเทศ ในประเทศที่พัฒนาแล้วโรคที่เกิดจากอาหารมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากการสูญเสียเวลาปฏิบัติงานของผู้ป่วยจำนวนมาก [1] ทำให้ในปัจจุบันผู้บริโภคได้เพิ่มความสนใจในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนช่วยส่งเสริมสุขภาพกันมากขึ้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจคือผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกได้มีการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe – GRAS) [2] นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหารเนื่องจากสามารถหมักคาร์โบไฮเดรตในอาหารได้เป็นกรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่น ๆ ทำให้ค่า pH ของวัตถุดิบลดลงซึ่งมีส่วนช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ช่วยเพิ่มรสชาติ เนื้อสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการ แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ และยังมีสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้มีการให้คำจำกัดความจากองค์การเกษตรและอาหารแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) ว่าหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยต้องมีสมบัติต่าง ๆ เช่น สามารถอยู่รอดบริเวณที่ยืดเกาะในระบบทางเดินอาหาร ทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี ทนต่อน้ำดีได้ดี และควรที่จะสร้างสาร เช่น แบคทีเรียโอซิน ไดอะซีทิล รูทีริน ที่ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยหลังจากปี ค.ศ. 2002 มีการศึกษาบทบาทของโปรไบโอติกต่อสุขภาพ รวมทั้งมีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่พบว่าการศึกษาบางกรณียังมีความเข้าใจคลาดเคลื่อนถึงขอบเขตของคำว่าโปรไบโอติก ดังนั้นในปี ค.ศ. 2013 ผู้เชี่ยวชาญด้านโปรไบโอติก และพรีไบโอติกจากสมาคม ISAAP (The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) จึงได้จัดประชุมร่วมกับ FAO/WHO เพื่อตรวจสอบและทบทวนขอบเขตและคำจำกัดความของคำว่าโปรไบโอติก ได้มีมติจากที่ประชุมให้ยังคงใช้นิยามของโปรไบโอติกตามเดิมที่ FAO/WHO กำหนดไว้ แต่ได้เน้นย้ำถึงขอบข่ายของการใช้คำว่าโปรไบโอติก (probiotic framework) ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ว่าต้องมีการระบุชนิดและสายพันธุ์ มีการประเมินความปลอดภัย และการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการกล่าวอ้างทางสุขภาพ [3]

มีหลายงานวิจัยที่พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ ช่วยให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร [4-5] จึงได้มีการนำแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อส่งเสริมให้ผู้บริโภค

มีสุขภาพดีขึ้น โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีชีวิตจะสามารถเพิ่มจำนวนในลำไส้และให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน ซึ่งได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ทั้งในหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง และการศึกษาในมนุษย์มาอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถแบ่งบทบาทของโปรไบโอติกตามหน้าที่ ได้แก่ ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยโปรไบโอติกสามารถส่งเสริมให้เกิดความสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และจำเป็นต่อร่างกายกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เพื่อลดผลเสียที่เกิดจากกลุ่มเชื้อก่อโรคโดยโปรไบโอติกสามารถเข้าครอบครองหรือแทนที่เชื้อก่อโรค หรือเกิดการแย่งสารอาหารที่เป็นของเชื้อก่อโรคได้ และโปรไบโอติกยังช่วยปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ซึ่งไหลเวียนไปตามหลอดเลือดให้เคลื่อนมายังตำแหน่งที่เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย จากนั้นโมโนไซต์จะพัฒนาเป็นแมคโครฟาจเพื่อจับกินเชื้อโรคนั้น นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น สามารถสังเคราะห์วิตามิน K และ วิตามิน B12 สร้างสารเมตาบอไลต์ที่ช่วยป้องกันเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร เช่น อาร์จินีน กลูตามีน กรดไขมันชนิดสายสั้น และกรดคอนจูเกตเลโนเลอิก (conjugated linoleic acid; CLA) หรือสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีผลต่อภาวะโภชนาการ เช่น เอนไซม์แลคเตส (lactase) เพื่อช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสซึ่งพบมากในนมวัว ทำให้ผู้ที่ร่างกายไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวซึ่งจะมีอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ หรือปวดท้องเมื่อร่างกายได้รับน้ำตาลแลคโตสมีอาการดีขึ้น [3] ในปัจจุบันมีการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกจำนวนมาก เช่น การศึกษาของ Kuasuwan และคณะ [6] ที่แยกแบคทีเรียแลคติกจากผักสดและอาหารหมัก พบว่าเชื้อที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แยกได้จากอาหารหมักประเภทผักดอง ปลาหมัก และเนื้อสัตว์หมัก จำนวน 5 สายพันธุ์ และแยกได้จากผักสด จำนวน 1 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่สำคัญ ได้แก่ ต้องสามารถอาศัยและเจริญเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค และต้องมีปริมาณสูงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ ส่วนมากแยกได้จากอาหารหมักหลากหลายประเภท ทั้งเนื้อหมัก นมหมัก หรือผักดอง [7-9] แต่ยังไม่พบการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากสัตว์น้ำหมักพื้นบ้านภาคใต้ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ ได้แก่ ปลาแป้งแดง ปลาไหลสุก กุ้งส้ม หอยเสียบดอง จากงานวิจัยก่อนหน้า [10] เพื่อจะได้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ และมีสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคต่อไป เช่น นำไปใช้เป็นกล้ำเชื้อในการผลิตอาหารหมัก เสริมเชื้อโปรไบโอติกในอาหารของมนุษย์และสัตว์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ ทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ทดสอบการทนต่อกรดและเกลือแร่ โดยการศึกษาทดสอบต่อเนื่องกัน ทดสอบการทนต่อเกลือแร่ ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ จากงานวิจัยก่อนหน้า [10] จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ PPD90 PSS113 KS173 HSD392 HSD398 และ PPD444 ซึ่งคัดแยกได้จากปลาแป้งแดง ปลาไหลสุก กุ้งส้ม หอยเสียบดอง หอยเสียบดอง และปลาแป้งแดง ตามลำดับ และพิสูจน์จำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติก จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ PPD90 PSS113 KS173 HSD392 HSD398 และ PPD444 ที่คัดแยกและเก็บไว้ใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำได้โดยนำแบคทีเรียแลคติกจาก glycerol stock จำนวน 0.5 มล. ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน จากนั้นดูดเชื้อ 1 มล. ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน และนำไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ ในข้อ 1 และ 2 แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

1. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ [6]

1.1 ทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

เตรียมสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate-buffer saline (PBS) กับ pepsin (0.3%, w/v) ปริมาตร 10 มล. ซึ่งปรับสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีค่าความเป็นกรดที่ pH 2.0, 3.0 และ 6.2 (ชุดควบคุม) ด้วย 1N HCl นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแลคติกที่มีความเข้มข้นของหัวเชื้อตั้งต้น 10^9 โคโลนี/มล. ใส่ในสารละลายดังกล่าว บ่ม 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อนับจำนวนเชื้อที่เหลืรอดโดยวิธีการ spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน นำผลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ

1.2 ทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกัน

นำเซลล์แบคทีเรียแลคติกล้างด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง หลังจากนั้นแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้โดยใช้สารละลาย 0.85% NaCl ที่ปรับ pH เป็น 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin อยู่ด้วย 3 มก./มล. ปริมาตร 1 มล. แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธีการ spread plate บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน แล้วนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่บ่มในสภาวะกรดครบ 2 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl 2 ครั้ง แล้วจึงเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มก./มล. และมีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3% (w/v) อยู่ด้วยปริมาตร 1 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิต่ออีก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาการรอดชีวิตโดยคำนวณการรอดชีวิตตามวิธีการ ดังนี้

$$\text{Log survival (\%)} = (N/N_0) \times 100$$

เมื่อ N = log number of viable cells survived (โคโลนี/มล.)

N_0 = log number of initial viable cells inoculated (โคโลนี/มล.)

1.3 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

เตรียมสารละลายเกลือน้ำดีด้วย Bile salt powder ที่มีความเข้มข้น 0.3% (w/v) ปริมาตร 10 มล. ในหลอดทดลอง โดยมีน้ำกลั่นที่ไม่เติมเกลือน้ำดี (pH 6.2) เป็นชุดควบคุมและเติมเซลล์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น 10^9 โคโลนี/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อที่เหลืรอดโดยวิธีการ spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน นำผลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ

1.4 ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมาเลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ถ่ายเซลล์ลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอด แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดการทดลองที่ 1 เก็บใน Anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน 24 ชั่วโมง

ตรวจดูการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สภาวะ

1.5 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกที่เจริญใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 - 10^7 โคโลนี/มล. ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเทหับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวาง Antibiotic discs ได้แก่ chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), penicillin (10 µg) และ tetracycline (30 µg) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดการยับยั้งเป็นวงใส (Inhibition zones) เปรียบเทียบผลกับตารางมาตรฐานเพื่อดูความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ [11] แปลผลเป็น resistant (R), moderately susceptible (MS) และ susceptible (S)

2. จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

แบ่งกลุ่มแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PPD90 PSS113 KS173 และ HSD392 จากการย้อมสีแกรม ดูรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ หลังจากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ออกซิเดส การเคลื่อนที่ การเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ กัน การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API (API test kit) และใช้เทคนิคการหาลำดับเบสบน 16S rDNA ในการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติก

ผลการวิจัย

ในการวิจัยได้ใช้แบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ PPD90 PSS113 KS173 HSD392 HSD398 และ PPD444 ซึ่งคัดแยกได้จากปลาแป้งแดง ปลาไหลสุก กุ้งส้ม หอยเสียบดอง หอยเสียบดอง และปลาแป้งแดง ตามลำดับ

1. สมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่เลือก

1.1 ผลการทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดซึ่งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเติบโตได้ที่ค่า pH เป็นกรด การนำเชื้อแบคทีเรียมาใช้เป็นโปรไบโอติกต้องใช้เชื้อที่สามารถทนต่อสภาพที่เป็นกรดตลอดจนต้องมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะกรดในกระเพาะอาหาร [7] ดังนั้นจึงมีการศึกษาความสามารถในการเติบโตในสภาวะค่า pH 2.0 3.0 และ 6.2 แบคทีเรียที่สามารถเติบโตในสภาวะเป็นกรดบ่งบอกถึงความสามารถในการรอดชีวิตในกระเพาะอาหารได้ เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ มาศึกษาความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยการเตรียมสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหารพบว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ ไม่พบการอยู่รอดที่ pH 2.0 แต่พบการอยู่รอดที่ pH 3.0 และ pH 6.2 โดยสายพันธุ์ PPD90 และ PS113 มีการอยู่รอดที่ pH 3 สูงถึง 75.92 % และ 84.02 % ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ KS173 HSD392 HSD398 และ PPD444 มีอัตราการอยู่รอดคิดเป็น 11.43 % 7.21 % 10.19 % และ 8.12 % ตามลำดับ และพบว่าเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดที่ pH 6.2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การอยู่รอดของแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

แบคทีเรียแลกดิก ที่คัดเลือก	การอยู่รอดที่ pH ต่าง ๆ (%)		
	pH 2.0	pH 3.0	pH 6.2
PPD90	0	75.92	78.01
PS113	0	84.02	85.56
KS173	0	11.43	12.24
HSD392	0	7.21	7.72
HSD398	0	10.19	11.09
PPD444	0	8.12	9.09

หมายเหตุ : เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ และใช้ % การอยู่รอดได้สูงมาเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเชื้อที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้ดี

1.2 ผลการทดสอบการทนต่อกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกัน แบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกควรมีความสามารถในการทนต่อกรดและน้ำดีได้ดี โดยเมื่อทำการทดสอบแบบต่อเนื่องด้วยสภาวะกรด pH 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin อยู่ด้วย 3 มก./มล. (เป็นการจำลองระบบภายในกระเพาะอาหาร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อด้วยสภาวะที่มีเอนไซม์ pancreatin 1 มก./มล. และมีน้ำดีความเข้มข้น 0.3% ปริมาตร 1 มล. (เป็นการจำลองลำไส้เล็กตอนต้น) พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 60.36 – 85.25 % จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 7-8 log โคโลนี/มล. แต่เมื่อผ่านการทดสอบการทนต่อกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกัน จะมีจำนวนแบคทีเรียแลกดิกลดลง 1-2 log โคโลนี/มล. ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทนต่อกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกันของแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือก

แบคทีเรีย แลกดิกที่คัดเลือก	จำนวนแบคทีเรียแลกดิกที่รอดชีวิต (log โคโลนี/มล.)			การรอดชีวิต (%)
	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	
		(pH 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin)	(pH 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin และน้ำดี)	
PPD90	8.43	7.42	7.10	84.22
PS113	8.41	7.18	7.17	85.25
KS173	8.40	6.16	5.07	60.36
HSD392	7.35	6.20	6.09	82.86
HSD398	7.37	7.04	6.12	83.04
PPD444	8.36	6.99	5.40	64.59

หมายเหตุ : เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ และใช้ % การรอดชีวิตได้สูงมาเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเชื้อที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้ดี

1.3 ผลการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี จากการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จำนวน 6 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3% (w/v) โดยมีน้ำกลั่นที่ไม่เติมเกลือน้ำดีเป็นชุดควบคุม และมีเซลล์แขวนลอยของเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^9 โคโลนี/มล. พบว่า มีแบคทีเรียแลกดิก จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ PS113 และ HSD 392 ที่มีการรอดชีวิต 63.82 และ 45.34 % ตามลำดับ ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ คือ PPD90 KS173 HSD398 และ PPD444 ไม่สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การอยู่รอดของแบคทีเรียแลกดิกในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3% (w/v)

แบคทีเรีย แลกดิกที่คัดเลือก	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (log โคโลนี/มล.)			การรอดชีวิต (%)
	เชื้อเริ่มต้น	ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	12 ชั่วโมง ในน้ำดี 0.3%	
PPD90	8.71	7.08	0	0
PS113	8.78	8.11	5.18	63.82
KS173	8.76	6.03	0	0
HSD392	8.78	6.86	3.11	45.34
HSD398	8.78	7.85	0	0
PPD444	8.68	5.70	0	0

หมายเหตุ : เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ และใช้ % การรอดชีวิตได้สูงมาเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเชื้อที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้ดี

1.4 ผลการทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน จากการนำแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่าแบคทีเรียแลกดิกทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถเติบโตได้ดีทั้ง 2 สภาวะ โดยมีการเติบโตในสภาวะไม่มีออกซิเจนดีกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนเห็นได้จากในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะมีค่า OD 660 nm ที่สูงกว่า (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนของแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือก

แบคทีเรีย แลกดิกที่คัดเลือก	OD 660 nm	
	สภาวะที่มีออกซิเจน	สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
PPD90	6.86	7.06
PS113	6.23	6.83
KS173	7.28	7.76
HSD392	3.76	4.55
HSD398	4.17	4.31
PPD444	6.84	6.98

1.5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ chloramphenicol, erythromycin, penicillin และ tetracycline โดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งการเติบโตเพื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ [11] พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ chloramphenicol มี 4 สายพันธุ์ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ erythromycin และ 2 สายพันธุ์ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ erythromycin ได้ปานกลาง มี 5 สายพันธุ์ ที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และมี 1 สายพันธุ์ ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin ในขณะที่แบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความสามารถในการต้านทานหรือไวต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทดสอบความไวของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกต่อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือก	การตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ (มม.)			
	Chloramphenicol (C30)	Erythromycin (E15)	Penicillin (P10)	Tetracycline (Te30)
PPD90	24 S	23 S	16.5 R	15 MS
PS113	22 S	22 S	14 R	14 R
KS173	20.5 S	24 S	13 R	14 R
HSD392	20 S	14 MS	19 R	22 S
HSD398	19 S	14 MS	18 R	23 S
PPD444	25 S	25 S	28.5 S	25.5 S

หมายเหตุ : R (Resistant) = ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ, MS (Moderately susceptible) = ไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง, S (Susceptible) = ไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากการประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ PS113 มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุด คือ มีการอยู่รอดที่ pH 3.0 ได้ดี ทนต่อน้ำดีและกรดในการทดสอบแบบต่อเนื่องกัน ทนต่อน้ำดีเติบโตในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ดี และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ tetracycline รองลงไปคือเชื้อ PPD90 KS173 และ HSD392 เนื่องจากมีการอยู่รอดในสภาวะที่ทดสอบแตกต่างกันไป จึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดี ไปจัดจำแนกถึงสกุล และชนิดของเชื้อต่อไป ส่วนเชื้อ อีก 2 สายพันธุ์ คือ HSD398 และ PPD444 มีสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกต่ำจึงไม่ได้เลือกไปจัดจำแนก

2. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติก

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่เลือก จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยแบ่งกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจากการย้อมสีแกรม รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ หลังจากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และทางชีวเคมีโดยใช้ระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยวิธีการทดสอบชีวเคมี โดยใช้ชุดทดสอบ API และใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน 16S rDNA ในการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติก ผลการทดสอบโดยวิธีการทดสอบชีวเคมี พบว่า สายพันธุ์ PPD90 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (99.2 % identification) สายพันธุ์ PS113 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus brevis* (99.8 % identification) สายพันธุ์ KS173 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (92.8 % identification) และสายพันธุ์ HSD392 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* (96.7 % identification) ผลการทดสอบ

โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน 16S rDNA พบว่า เชื้อ PPD90 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus pentosus* (99.15 % similarity) *Lactobacillus plantarum* (99.08 % similarity) และ *Lactobacillus paraplantarum* (99.08 % similarity) PS113 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (100 % similarity) KS173 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus pentosus* (100 % similarity) และ HSD392 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus faecium* (99.79 % similarity) มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus durans* (99.44% similarity) และมีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus hirae* (99.49 % similarity) ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการจำแนกจาก 2 วิธีมีความแตกต่างกัน แต่ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ผลของ 16S rDNA ที่มี % similarity สูงสุด ในการตัดสินใจแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เป็นเชื้อในสกุล และชนิดใด เนื่องจากวิธี 16S rDNA เป็นวิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน ซึ่งมีความน่าเชื่อถือกว่าการใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมี [12] จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า สายพันธุ์ PPD90 คือ *Lactobacillus pentosus* สายพันธุ์ PS113 คือ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ KS173 คือ *Lactobacillus pentosus* และ สายพันธุ์ HSD392 คือ *Enterococcus faecium*

ตารางที่ 6 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก

แบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือก	วิธีการทดสอบชีวเคมี (API)		การวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน 16S rDNA	
	มีความคล้ายคลึงกับ	% identification	มีความคล้ายคลึงกับ	% similarity
PPD90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.15
			<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.08
			<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	99.08
PS113	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
KS173	<i>Lactobacillus plantarum</i>	92.8	<i>Lactobacillus pentosus</i>	100
HSD392	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	96.7	<i>Enterococcus faecium</i>	99.79
			<i>Enterococcus durans</i>	99.44
			<i>Enterococcus hirae</i>	99.44

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ ไม่พบการอยู่รอดที่ pH 2.0 แต่พบการอยู่รอดที่ pH 3.0 และพบการอยู่รอดที่ pH 6.2 ได้สูงสุด บ่งบอกถึงความสามารถในการรอดชีวิตในกระเพาะอาหารได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งผลการศึกษาการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของสายพันธุ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Sahadeva และคณะ [13] ที่ทดสอบการทนต่อกรด โดยทดลองในสภาวะคล้ายกับกระเพาะอาหารที่ค่า pH 1.5 3.0 และ 7.2 พบว่าโปรไบโอติกที่นำมาทดสอบไม่มีสายพันธุ์ใดมีชีวิตรอดที่ pH 1.5 แต่จะมีชีวิตรอดได้ที่ pH 3.0 และ pH 7.2 โดยมีชีวิตรอดมากที่สุดที่ pH 7.2

แบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตในกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกันอยู่ในช่วง 60.36 – 85.25 % การรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบการทนต่อกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกัน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถอาศัยอยู่ได้ ความสามารถในการทนกรดมีผลต่อการนำมาเป็นโปรไบโอติก เนื่องจากการนำจุลินทรีย์ไปใช้เพื่อผลิตเป็นโปรไบโอติก จุลินทรีย์จะต้องมีชีวิตรอดผ่านท้องทางเดินอาหารส่วนต้นและขยายจำนวนในท้องทางเดินอาหารส่วนท้ายได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จะต้องมีความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็ก จากผลการทดลองจึงบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้น่าจะสามารถผ่านสภาวะในกระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วนคูโอดินัม และมีผลยังลำไส้ส่วนท้ายได้ [14] สำหรับอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาที่เชื้อผ่านระบบทางเดินอาหาร และการใช้ตัวนำส่งสำหรับใช้ผสมกับเชื้อเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งถ้าโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ อาจใช้วิธีการผสมเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยการผสมกับอาหาร เช่น ในผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว [15]

น้ำดีมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอมเขียว ประกอบไปด้วยสารสำคัญ คือ เกลือน้ำดี โคเลสเตอรอล ฟอสโฟไลปิด และสารสีบิลิเวอร์ดิน (biliverdin) มีความสำคัญต่อการย่อยอาหารประเภทไขมัน [16] น้ำดีเป็นอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีไขมันเป็นส่วนประกอบทำให้ถูกทำลายโดยน้ำดีได้ง่าย ความสามารถในการทนต่อกรดจึงเป็นลักษณะสำคัญของแบคทีเรียโปรไบโอติก เนื่องจากสามารถกำหนดการอยู่รอดในลำไส้เล็ก ความทนทานต่อน้ำดีโดยธรรมชาติจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่พบว่าสามารถปรับตัวให้ทนต่อเกลือน้ำดีได้ดี คือ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* โดยจะสามารถขับเกลือน้ำดีที่สะสมในไซโทพลาซึมของแบคทีเรียได้ดี [17] จากการทดลองการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีแตกต่างกัน เช่น จากการทดลองของ Shehata และคณะ [18] พบว่า แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม จำนวน 9 สายพันธุ์ สามารถอยู่รอดในเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3% ได้อยู่ในช่วง 69.8 – 85% เช่นเดียวกับการทดลองของ Kuasawan และคณะ [6] ที่พบว่าแบคทีเรียแลคติก 42 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้จากผักสดและอาหารหมักมีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 % โดยมีอัตราการอยู่รอด $\geq 40\%$ จำนวน 14 สายพันธุ์ คิดเป็น 33.33% และพบว่า สายพันธุ์ AR25 มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 87.89 % และในงานวิจัยนี้แบคทีเรียแลคติก PS113 และ HSD 392 มีการอยู่รอดในเกลือน้ำดี 0.3% คิดเป็นอัตราการอยู่รอด 63.82 และ 45.34% ตามลำดับ ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ คือ PPD90 KS173 HSD398 และ PPD444 ไม่สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3%

ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ในสภาพที่กลืนไปจะมีออกซิเจนอยู่น้อยหรือไม่มีออกซิเจนอยู่เลย ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต ดังนั้นการที่เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเติบโตได้ทั้งสภาวะที่ไม่มีและออกซิเจนจะเป็นผลดี กล่าวคือการเติบโตได้ในที่ไม่มีออกซิเจนจะทำให้เชื้อแบคทีเรียอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร และการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนก็จะทำให้ง่ายและสะดวกต่อการเลี้ยงเชื้อให้ได้จำนวนมากรวมถึงการเก็บรักษาด้วย ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกส่วนใหญ่สามารถเติบโตได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน [19-20]

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะมีความสำคัญเนื่องจากแบคทีเรียโปรไบโอติกควรทนต่อยาปฏิชีวนะได้ เพราะบางครั้งเมื่อมนุษย์หรือสัตว์ที่มีการนำโปรไบโอติกไปใช้มีการเจ็บป่วยที่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา หากโปรไบโอติกทนต่อยาปฏิชีวนะได้ก็จะช่วยเสริมการเป็นโปรไบโอติกที่ดียิ่งขึ้น และการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะอาจมีส่วนช่วยในการฟื้นฟูจุลินทรีย์ในลำไส้หลังการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะได้ โดยในงานวิจัยนี้มีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ PPD90 PS113 KS173 HSD392 และ HSD398 ที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ มี 2 สายพันธุ์ คือ PS113 และ KS173 ที่ทนต่อ

ยาปฏิชีวนะ tetracycline ซึ่งยาปฏิชีวนะ penicillin และ tetracycline เป็นกลุ่มของยาที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการบำบัดและควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในมนุษย์และสัตว์

จากลักษณะของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดี คือ ต้องสามารถอาศัยและเจริญเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ และต้องมีปริมาณสูงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ เมื่อพิจารณาสมบัติด้านต่าง ๆ พบว่า แบคทีเรียที่มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้ คือ สายพันธุ์ PS113 กล่าวคือ มีการอยู่รอดที่ pH 3 ได้ดี ทนต่อน้ำดีและกรดในการทดสอบแบบต่อเนื่องกัน ทนต่อน้ำดี เติบโตในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ดี และทนต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ tetracycline รองลงมาคือสายพันธุ์ PPD90 KS173 และ HSD392 เนื่องจากมีการอยู่รอดในสภาวะที่ทดสอบแตกต่างกันไป และเมื่อทำการจัดจำแนกสกุล และชนิดของแบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์ ที่มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดี พบว่า เชื้อสายพันธุ์ PPD90 คือ *Lactobacillus pentosus* เชื้อสายพันธุ์ PS113 คือ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ KS173 คือ *Lactobacillus pentosus* และสายพันธุ์ HSD392 คือ *Enterococcus faecium* สำหรับอาหารหมักส่วนมากจะเป็นแหล่งของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดี โดยแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ เช่น *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus plantarum* ได้รับการแยกอย่างกว้างขวางจากแหล่งอาหารหมัก เช่น ไข่รอกหมัก ผลิตภัณฑ์นม และผักดอง [7-9] โดยพบว่า แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* มักถูกเลือกให้เป็นโปรไบโอติกเนื่องจากมีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการ เช่น ทนทานต่อกรดและน้ำดีได้ดี สามารถเกาะติดกับผิวลำไส้ได้ ทนต่อค่า pH ต่ำ ทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ยับยั้งแบคทีเรียที่อาจทำให้เกิดโรคได้ และต้านทานยาปฏิชีวนะ [21-22] สำหรับ *Enterococcus faecium* มีประวัติการใช้เป็นโปรไบโอติกมายาวนาน [23] โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการป้องกันโรคท้องร่วงที่เกี่ยวข้องกับยาปฏิชีวนะ แต่สายพันธุ์บางสายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่เป็นแหล่งสะสมของยีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะและก่อโรคได้ ดังนั้นจึงมักไม่ถือว่าเป็นปลอดภัย (GRAS) สำหรับมนุษย์ แต่เป็นโปรไบโอติกที่สำคัญสำหรับสัตว์ [24, 25]

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561 ต่อเนื่อง 2562

เอกสารอ้างอิง

- [1] Chanchaichavivat, A., Panvilai, S., Prajanban, J., and Phornphisutthimas, S. (2020). Important pathogenic microorganisms causing intestinal diseases. *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, 11(1), 188-206. (in Thai)
- [2] Gueimonde, M., Frias, R., and Ouwehand, A. C. (2006). Assuring the continued safety of lactic acid bacteria used as probiotics. *Biologia*, 61(6), 755-760. <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0153-2>
- [3] La-ongkham, O. (2019). Probiotics: The selected microorganism for human health. *Food Journal*, 49(4), 29-38. (in Thai)
- [4] Dicks, L. M. T., and Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: Health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*, 1(1), 11-29.
- [5] Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., and Gírbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765-1775.

- [6] Kuasuwan, P., Charernjitrakul, W., and Kantachote, D. (2014). Selection of probiotic lactic acid bacteria to be used as starter culture for pickles production. In L., Manmart, U., Tattawasart and D. Ayuwat (Eds.), *Graduate Research Conference 2014* (pp. 667-676). Khon Kaen University. (in Thai)
- [7] Pennacchia, C., Vaughan, E. E., and Villani, F. (2006). Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science*, 73(1), 90-101.
- [8] Hoque, M. Z., Akter, F., Hossain, K. M., Rahman, M. S. M., Billah, M. M., and Islam, K. M. D. (2010). Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurt. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 5(1), 39-46.
- [9] Kim, Y. G., Choi, S.-I., Jeong, Y., and Kang, C.-H. (2022). Evaluation of safety and probiotic potential of *Enterococcus faecalis* MG5206 and *Enterococcus faecium* MG5232 isolated from kimchi, a Korean fermented cabbage. *Microorganisms*, 10(10), 1-15.
- [10] Srionnual, S. (2019). *Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from southern Thailand traditional fermented seafood products for growth inhibition of foodborne pathogens* [Research report]. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat Campus.
- [11] Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636-1643.
- [12] Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., and Yuen, K. -Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing or bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 149(10), 908-934.
- [13] Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V., Wong, S. Y. W., and Chan, H. K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4), 1515-1522.
- [14] Khempaka, S. (2020). *Evaluation of the efficacy of Lactobacillus and Bifidobacterium strains from broiler gastrointestinal tract for use as probiotics in broiler diets* [Research report]. Academy of Science, Suranaree University of Technology.
- [15] Marutpong, P., Lulitanon, W., Rattanachaiakunsopon, P., Sriwaramat, T., Chaiwong, T., and Tinbanmai, T. (2014). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from infant feces. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*, 16(3), 38-45. (in Thai)
- [16] Begley, M., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- [17] Ruiz, L., Margolles, A., and Sanchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 396(4), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>
- [18] Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., and Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.

- [19] Rastall, R. A. (2004). Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *The Journal of Nutrition*, 134(8), 2022-2026.
- [20] Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745-4767.
- [21] Campana, R., Hemert, S., and Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut pathogens*, 9, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>
- [22] Bu, Y., Liu, Y., Liu, Y., Wang, S., Liu, Q., Hao, H., and Yi, H. (2022). Screening and probiotic potential evaluation of bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* in vitro. *Foods*, 11(11), Article 1575. <https://doi.org/10.3390/foods11111575>
- [23] Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 125-140.
- [24] Bednorz, C., Guenther, S., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Pieper, R., Hartmann, S., Tedin, K., Semmler, T., Neumann, K., Schierack P., Bethe, A., and Wieler L. H. (2013). Feeding the probiotic *Enterococcus faecium* strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of *Escherichia coli* pathotypes that adhere to the gut mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 7896-7904.
- [25] Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang L., Xiao, Y. P., and Yang C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science*, 92, 2949-2955.