

การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตผักดอง

Selection of Probiotic Lactic acid Bacteria to be Used as Starter Culture for Pickles Production

ภณิดา เกื้อสุวรรณ (Phanida Kuasuwan)* วิลาวรรณ เจริญจิระตระกูล (Wilawan Charernjitrakul)**

ดร.ดวงพร กันธิ์ โชติ (Dr.Duangporn Kantachote)***

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อคัดเลือกและประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผักสดและอาหารหมัก โดยทดสอบความสามารถในการหมักและทดสอบสมบัติโปรไบโอติกในหลอดทดลอง ได้แก่ ทดสอบการเจริญ การทนน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค การทนเกลือ น้ำดี ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ อีกทั้งทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัย ได้แก่ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวน 6 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการหมักที่ดี มีความปลอดภัย และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จึงเป็นตัวแทนที่ดีที่จะนำไปทดลองใช้เป็นก้ำเชื้อโปรไบโอติกในกระบวนการหมักผักดอง

ABSTRACT

The aim of the present work was to select and evaluate *in vitro* the function activity of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) that isolated from fresh vegetables and fermented foods. The isolates were investigated for ability of *fermented* and preliminary probiotic properties *in vitro* test such as ability of growth, tolerance to simulated gastric juice, growth with both aerobic and anaerobic conditions, antimicrobial activity, bile salt tolerance, ability to utilize protein fat and starch, antibiotic susceptibility assay were also considered. In addition, some of safety profiles including hemolytic activity and biogenic amine production. Six isolated LAB was high ability of fermented, safety and activity of preliminary probiotic properties. These selected bacteria may be used in the future as potential probiotic starter cultures for fermented vegetables.

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก โปรไบโอติก ผักดอง

Key Words: Lactic acid bacteria, Probiotic, Fermented vegetables

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

***รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทนำ

ปัจจุบันโลกมีการเปลี่ยนแปลงไป มีวิวัฒนาการใหม่ๆ เกิดขึ้นมากมาย วิธีการดำเนินชีวิตของมนุษย์ก็เปลี่ยนไป มีการแข่งขันกับเวลาจึงทำให้วัฒนธรรมการบริโภคอาหารของมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลง โดยมนุษย์ได้ใช้เวลาอย่างเร่งรีบในการใช้ชีวิตประจำวัน ซึ่งต้องการอาหารที่เร่งด่วนและเก็บไว้ได้เป็นเวลานานๆ อีกทั้งมีความพิถีพิถันในการเลือกรับประทานอาหารลดน้อยลง รวมทั้งเกิดภาวะเครียดมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อ ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลต่างๆ ภายในร่างกายถูกรบกวน ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าสู่ร่างกาย เพื่อเป็นการรักษาสุขภาพสมดุลของจุลินทรีย์ภายในร่างกาย ทำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพและช่วยให้ดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ (วิเชียร, 2534) โดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายนี้คือ โพรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่บริโภคเสริมเข้าไปแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค โดยจะช่วยปรับปรุงสมดุลของแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ (Fuller, 1993) นอกจากนี้ปัจจุบันอาหารมากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ตามท้องตลาดทั่วโลกมีโพรไบโอติกเป็นองค์ประกอบ (Agrawal, 2005) โดยมีผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคเนื่องจากโพรไบโอติกจะไปเจริญและเกาะติดที่ลำไส้เล็ก ซึ่งจะช่วยป้องกันและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ ได้ นอกจากนั้นยังช่วยลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe bacteria; GRAS status) นิยมใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (Starter culture) เติมนลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะรสชาติ เนื้อสัมผัสและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารทำให้มีบทบาทสำคัญในการถนอม

อาหาร ทำให้เกิดการปรับค่า pH ของวัตถุดิบ ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญในการรักษาผลิตภัณฑ์และเพิ่มรสชาติของอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก (Mishra *et al.*, 2005) จึงมีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกในอุตสาหกรรมอาหารหมักที่มีวัตถุดิบ เช่น เนื้อและผัก (Di Cagno *et al.*, 2013) ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ผลิตจากผักเป็นอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก เนื่องจากผักมีสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามิน เส้นใยอาหารและแร่ธาตุสูง ดังนั้นท่ามกลางเทคโนโลยีทางเลือกที่หลากหลายในปัจจุบัน การหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกเป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่ง่าย มีคุณค่าทางโภชนาการ มีความปลอดภัย พร้อมทั้งยืดอายุการเก็บรักษาผักและคงสภาพรสสัมผัสของอาหารไว้ได้ (Hector *et al.*, 2009) ซึ่งในทวีปเอเชียผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทผักดองเป็นการหมักแบบหมักธรรมชาติด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังนอกของพืช ซึ่งเป็นวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาผักที่สำคัญและเป็นวิธีที่ง่าย (Wang *et al.*, 2010) แต่เนื่องจากการผลิตโดยอาศัยเชื้อแบบธรรมชาตินี้ จะสามารถควบคุมคุณภาพของผักดองให้มีความคงที่สม่ำเสมอได้ยาก จุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบอาจเหลือรอดหลังการหมัก ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาความปลอดภัยกับผู้บริโภค ดังนั้นหากใช้เชื้อแลคติกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก โดยเฉพาะเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มทั้งคุณภาพและความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผักและอาหารหมักที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติกและสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้

วิธีการวิจัย

1. แยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติก

นำผักและอาหารหมักดองอย่างมาผสมกับ NaCl 0.85% เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Stomacher Lab-Blender ณ อุณหภูมิห้อง (Di Cagno *et al.*, 2008) นำ Serial dilutions มา pour-plated บนอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS agar ที่เติม Bromocresol purple (BCP) ร้อยละ 0.04) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48-72 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยทดสอบการติดสีแกรม และทดสอบการผลิตเอนไซม์ คีตาเลส

2. ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียแลกติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียแลกติกโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร พร้อมทั้งวัดค่าพีเอช

3. ทดสอบความสามารถในการหมัก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง ตรวจสอบค่าความเป็นกรด่างของ Culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) และหาเปอร์เซ็นต์กรดด้วยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH 0.1 M (Zhang *et al.*, 2007)

4. ทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

เตรียมสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate-buffer saline (PBS) กับ pepsin (0.3%, w/v) ซึ่งปรับสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีค่า pH 2.0, 3.0 และ 6.2 (control) ด้วย 1N HCl นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแลกติกมีเชื้อ 10^8 CFU/ml ใส่ในสารละลายดังกล่าว บ่ม 3 ชั่วโมง นำมา นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่อุณหภูมิ 37 °C 72 ชั่วโมง (Wang *et al.*, 2010)

5. ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

โดยเตรียมสารละลายเกลือน้ำดีด้วย Bile salt powder ที่มีความเข้มข้น 0.3% โดยมีน้ำกลั่นที่ไม่เติม Bile salt powder (pH 6.2) เป็นชุดควบคุมและเติมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ 10^8 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 6-12 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่อุณหภูมิ 37 °C 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งเกิดกิจกรรม Bile salt hydrolase (BSH) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจาก Wang *et al.*, 2010)

6. ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงใน MRS broth 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอด แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่ 1 เก็บใน Anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มที่ 37 °C ภายใต้อากาศที่มีออกซิเจน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะ

7. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

โดยใช้วิธี Agar spot (Spellhaug & Harlander, 1989) ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงปรับ 0.05 McFarland มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml หยดเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS เชื้อละ 5 μ l บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเททับด้วยอาหาร Brain heart infusion (BHI) soft agar (วุ้น 0.7%) ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารประมาณ 10^6 CFU/ml แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งด้วยการวัด

ขนาดวงใสการยับยั้ง (clear zone) และรายงานผลเป็นประสิทธิภาพการยับยั้ง

8. ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนไขมันและแป้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกดกลงในอาหาร MRS broth จนมีอายุครบ 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมันและแป้งบนอาหาร MRS agar ที่มี Skim milk 2%, อาหาร MRS agar ที่เติม 1% Tributyrin (Michael & Pelezar, 1995) และอาหาร MRS agar ที่ใช้ Soluble starch 2% ตามลำดับ (Mitidieri *et al.*, 2006)

9. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

โดยวิธี Agar overlay diffusion method (Cebeci & Gurakan, 2003) นำเชื้อที่เจริญใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมงที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 - 10^7 CFU/ml ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเททับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวาง Antibiotic discs: cephalixin, chloramphenicol, clindamycin, enrofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, polymyxin, rifampicin, streptomycin และ tetracycline บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง เกิดการยับยั้งเป็นวงใส Inhibition zones ตรวจผลเป็น resistant (R), moderately susceptible (MS) และ susceptible (S) (ดัดแปลงจาก Wang *et al.*, 2010)

10. ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

นำแบคทีเรียแลกดกลงที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง นำเชื้อมา streak ลงบนจานอาหาร Columbia agar ที่ผสม human blood บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารว่าเป็นกลุ่ม Beta-hemolysis มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ กลุ่ม Alpha-hemolysis เกิดวงใสสี

เขียวรอบโคโลนีของเชื้อหรือกลุ่ม Gramma-hemolysis โคโลนีของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง (Argyri *et al.*, 2013)

11. ทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine production)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกดกลงที่คัดแยกได้ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ที่มีไทโรซีน (Tyrosine) 0.1%, Bromocresol purple 0.004% และ Pyridoxal-5-phosphate, B₆ 0.005% บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 72 ชั่วโมง นำเชื้อมาเชย (streak) บนอาหารวุ้น (Improved medium) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-10 วัน ตรวจสอบการสร้างไบโอเจนิคเอมีน โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ □ รอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกดกลที่นำมาทดสอบ (Bover-Cid & Holzapfel, 1999)

ผลการวิจัย

1. แยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกดกล

จากตัวอย่างผักและอาหารหมักรวมจำนวน 32 ตัวอย่างสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกดกลได้ทั้งหมด 109 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง หรือกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Table 1)

2. ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียแลกดกล

ความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกดกล 109 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ที่ 24 ชั่วโมงพบว่าจำนวน 52 ไอโซเลทมีการเจริญดีมาก มีค่า OD >1.0-1.5 คิดเป็น 47.71% และที่ 48 ชั่วโมงพบว่าจำนวน 54 ไอโซเลทมีการเจริญดีเยี่ยมคือ มีค่า OD>1.5 คิดเป็น 49.54% (Table 2) การคิดเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทไม่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับชนิดของตัวอย่าง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนไอโซเลทเปรียบเทียบจากจำนวนไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้ในแต่ละการทดลอง

3. ทดสอบความสามารถในการหมัก

ภายหลังการหมักเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาล เพื่อสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย จากเชื้อแบคทีเรียแลคติก 109 ไอโซเลทพบว่า มีจำนวน 45 ไอโซเลทที่มีปริมาณกรดแลคติก 1.00-1.50% คิดเป็น 41.28%, 34 ไอโซเลทที่มีปริมาณกรดแลคติก 1.51-2.00% คิดเป็น 31.19%, 25 ไอโซเลทที่มีปริมาณกรดแลคติก 2.01-2.50% คิดเป็น 22.94%, 4 ไอโซเลทที่มีปริมาณกรดแลคติก <1.00% คิดเป็น 3.67% และมี 1 ไอโซเลท AR45 ที่มีปริมาณกรดแลคติกสูง >3.00% คิดเป็น 0.92% (Table 3) ส่งผลทำให้ค่าพีเอชลดลง โดยมีค่าพีเอชเฉลี่ย 4.45

4. ทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ 109 ไอโซเลท ทนต่อกรดได้ในสภาวะความเป็นกรด เช่นเดียวกับกระเพาะที่ pH 3 หรือต่ำกว่า พบว่ามีจำนวน 42 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การรอด $\geq 40\%$ คิดเป็น 38.53% (จากการทดลองที่ pH 3) โดยไอโซเลท HA303 มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 97.96%

Table1. Lactic acid bacteria from fresh vegetables and fermented foods.

Food origins	No. of collected samples	No. of isolates
Fresh vegetables		
Cucumbers	3	8
Cabbage	2	7
Red Cabbage	4	13
Cabbage	1	4
Carrot	5	13
Leaf lettuce	3	14
Broccoli	1	2
Fermented food		
Fermented fish	2	9
Fermented tea leaves	3	14
Fermented pork	2	10
Fermented vegetables	6	15
Total	32	109

5. ทดสอบการทนต่อเกลือ

แบคทีเรียแลคติก 42 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ร้อยละ 0.30 จำนวน 14 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การรอด $\geq 40\%$ คิดเป็น 33.33% และพบว่า AR25 มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 87.89%

6. ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ 42 ไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญได้ทั้งสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน โดยพบว่ามีจำนวน 40 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันในทุก 2 สภาวะโดยมีการเจริญดีมากที่สุด มีค่า OD >1.0

7. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ 42 ไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ได้แตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ได้ 54.76%, *Staphylococcus aureus* ได้ 30.95%, ยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ 28.57% และยับยั้ง *Salmonella enterica* ได้ 14.29% (Table 4) และแบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลทสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้มากกว่า 2 สายพันธุ์

Table2. Ability of lactic acid bacteria growth at 24 and 48 h.

Growth at OD 660 nm	Level of growth	24 h		48 h	
		No. of isolates	% (Percent)	No. of isolates	% (Percent)
>1.5	++++	35	32.11	54	49.54
>1.0-1.5	+++	52	47.71	51	46.79
0.5-1.0	++	14	12.84	4	3.67
<0.5	+	8	7.34	-	-
Total		109	100	109	100

8. ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนไขมันและแป้ง

แบคทีเรียแลคติก 42 ไอโซเลทที่คัดแยกได้มีจำนวน 28 ไอโซเลทคิดเป็น 66.67% ที่มีความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่คือ โปรตีนและ 4 ไอโซเลทคิดเป็น 9.52% ที่สามารถย่อยแป้ง ไม่พบไอโซเลทที่สามารถย่อยไขมันได้

จากสมบัติข้างต้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวน 7 ไอโซเลท เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาสมบัติอื่นๆ ต่อไป

9. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ 7 ไอโซเลทคือต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ vancomycin คือต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ kanamycin, gentamycin, streptomycin และคือต่อยาในกลุ่มยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ polymycin นอกจากนี้เชื่อมีความไวต่อการตอบสนองต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ chloramphenicol และ erythromycin ซึ่งขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตปกติ (Protein synthesis) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) ส่งผลดีต่อการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ

Table3. Titratable acidity of LAB isolated from fresh vegetables and fermented foods.

Titratable acidity (%)	No. of isolates	Percentage (%)
<1.00	4	3.67
1.00-1.50	45	41.28
1.51-2.00	34	31.19
2.01-2.50	25	22.94
2.51-3.00	0	0
>3.00	1	0.92
Total	109	100

10. ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยก 7 ไอโซเลทพบว่ามี 1 ไอโซเลท HA802 มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจัดอยู่ในกลุ่ม Alpha-hemolysis (α) และ 6 ไอโซเลทไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจัดอยู่ในกลุ่ม Gamma-hemolysis (γ) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์

11. ทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine production)

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ 7 ไอโซเลทไม่มีกิจกรรมการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน ซึ่งพบมากในอาหารหมัก เป็นสารที่เป็นอันตรายส่งผลต่อสุขภาพ ดังนั้นเชื่อแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวจึงมีคุณสมบัติด้านความปลอดภัย

จากคุณสมบัติทั้งหมดที่กล่าวมาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อโปรไบโอติกได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302, AR36, AR45, AR52, AR71 และ AR72 ซึ่งทั้ง 6 ไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญ การหมัก ทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ทนเกลือน้ำดี เจริญได้ทั้ง 2 สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแตกต่างกัน สามารถย่อยโปรตีนและแป้งได้ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ erythromycin ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและไม่มีการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีนจึงมีความปลอดภัย

Table4. Antimicrobial activity of the selected isolates.

Indicator strains	Tested strains	Number of strains	
		Inhibited	% Inhibited pathogens
<i>Escherichia coli</i>	42	12	28.57
<i>Bacillus cereus</i>	42	23	54.76
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	13	30.95
<i>Salmonella enterica</i>	42	6	14.29

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จุลินทรีย์โปรไบโอติกมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม อีกทั้งยังมีประโยชน์มากต่อสิ่งมีชีวิต แต่การที่จะได้มาซึ่งโปรไบโอติกที่ดีมีประสิทธิภาพ จะต้องมีการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพผู้บริโภค ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกและประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก ที่ดีได้จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302, AR36, AR45, AR52, AR71 และ AR72 ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับชนิดของตัวอย่างที่

นำมาวิเคราะห์ชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติก ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการเจริญเติบโต มีค่า OD >1.5 เชื้อสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ มีความสามารถในการหมักโดยผลิตกรดแลคติก ส่งผลให้มีค่าพีเอชลดลง ซึ่งโปรไบโอติกสามารถทำให้สภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่มีสภาพเป็นกรด ทำให้เชื้อก่อโรค ซึ่งมักไม่ทนกรดนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกออกมาได้ในปริมาณสูง >1.00%

Table5. Selected isolates with probiotic potential according to *in vitro* tests; ability of fermented, tolerance to simulated gastric juice, bile salt tolerance and antimicrobial activity.

Isolated no.	Vegetables/ Food origins	Fermentation		Tolerance to simulated gastric juice		Bile salt tolerance		Antimicrobial activity			
		Titratable acidity (%)	pH	Survival rate (%)	Final count (log CFU/ml)	Survival rate (%)	Final counts (log CFU/ml)	Indicator strains			
								Zone of inhibition (mm)			
								Sa	Bs	Ec	Se
NS302	Cabbage	1.26	4.72 ± 0.15	61.90	6.42 ± 0.26	69.19	7.14 ± 0.29	+	-	+	+
AR36	Fermented vegetables	1.35	4.73 ± 0.17	79.76	6.16 ± 0.22	50.00	6.14 ± 0.34	-	+	++	-
AR45	Fermented tea leaves	3.51	3.97 ± 0.12	90.48	6.21 ± 0.36	44.87	6.35 ± 0.42	-	+	++	-
AR52	Fermented pork	2.07	4.00 ± 0.18	93.91	6.23 ± 0.33	67.78	6.14 ± 0.25	-	+	-	+
AR71	Fermented fish	1.89	4.18 ± 0.13	64.29	6.18 ± 0.17	58.72	6.17 ± 0.23	+	+	+	+
AR72	Fermented fish	2.43	3.99 ± 0.15	83.64	6.22 ± 0.21	40.48	6.06 ± 0.31	+	+	+	-

Indicator strains: **Sa-** *Staphylococcus aureus*; **Bs-** *Bacillus cereus*; **Ec-** *Escherichia coli*; **Se-** *Salmonella enterica*.

-: no antimicrobial activity; +: the inhibition zone is less than 10 mm; ++: the inhibition zone is from 10 mm to 20 mm; +++: the inhibition zone is above 20 mm.

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มีการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่มีค่าพีเอช 3 หรือต่ำกว่าและพบปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^6 - 10^7 CFU/ml (Table 5) ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการเกิดผลดีต่อสุขภาพ ทั้งนี้เชื้อสามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าวบ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญรอดชีวิตจากสภาวะในระบบทางเดินอาหาร เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 โดยพบการรอดชีวิต $\geq 40\%$ และพบปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^5 - 10^7 CFU/ml (Table 5) ทั้งนี้จากการรอดชีวิตของเชื้อแสดงให้เห็นความสัมพันธ์กับการหลั่งเกลือน้ำดีของลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารและเป็นแหล่งที่โปรไบโอติกแบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ได้ เชื้อสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยมีการเจริญดีมากมีค่า OD ในช่วง 1.70-2.20 ทั้งนี้เนื่องจากระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ยิ่งลึกลงไปยิ่งมีปริมาณอากาศเบาบางหรือไม่มีอากาศเลย ดังนั้นสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะมีและไม่มีอากาศได้จะเป็นผลดีต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งเชื้อมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่งผลให้เชื้อสามารถช่วยด้านจุลินทรีย์ก่อโรคและป้องกันปัญหาสุขภาพอื่นๆ ที่มีแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าวเป็นสาเหตุได้ อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่จำพวกโปรตีนและแป้ง ซึ่งสามารถช่วยในการส่งเสริมระบบการย่อยอาหาร เพื่อการดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ได้ และเชื่อมีความไวต่อการตอบสนองของกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ erythromycin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย

ความปลอดภัยของโปรไบโอติกไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือส่วนของจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรีย

เมื่อจะนำมาใช้กับมนุษย์จะต้องมีข้อควรคำนึงถึงในเรื่องของความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่นอกเหนือจากประโยชน์ของโปรไบโอติกเพียงอย่างเดียว โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับมนุษย์นั้น มีแนวทางหลักคือ 1) สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ 2) ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค 3) สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ 4) มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7 - 10^9 CFU/ml ของผลิตภัณฑ์) แต่เมื่อจะใช้โปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ สิ่งที่ต้องมุ่งเน้นคือ เรื่องความปลอดภัย วัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งาน และความเหมาะสมกับชนิดของผู้ถูกอาศัยโดยโปรไบโอติกนั้นหรือได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ เช่น องค์การอนามัยโลกได้ให้การรับรองว่าแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความปลอดภัย เนื่องจากสามารถพบในลำไส้มนุษย์ตั้งแต่แรกเกิดจนเจริญเติบโตเป็นผู้ใหญ่ ซึ่งต้องมีการศึกษาและทดลองในเรื่องคุณสมบัติด้านความปลอดภัย ได้แก่ การย่อยสลายเมดเล็อดแดงและการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทพบว่ามีความปลอดภัย เนื่องจากไม่มีการย่อยสลายเมดเล็อดแดง และไม่มีการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนที่ทำให้เกิดโทษต่อร่างกายมนุษย์ และหากมีการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ใช้เป็นกล่าเชื้อในการผลิตผักดอง เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนและช่วยควบคุมคุณภาพของผักดองให้มีความสม่ำเสมอ ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งที่มาของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ความสามารถในการเจริญ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมัก เพื่อให้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเจริญมีปริมาณสูงสุด และผลิตสารสำคัญที่ต้องการ ดังนั้น ในการนำโปรไบโอติกมาใช้งานในรูปแบบใด ควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเป็นอย่างดี เพื่อความปลอดภัยและได้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้เชี่ยวชาญ ที่สละเวลาในการตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ได้ให้ความร่วมมือในการดำเนินการทดลอง และขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้ กราบขอบพระคุณและขอบคุณไว้ในโอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย. โพรซีดดิ้งส์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

Agrawal, R. 2005. Probiotic: An emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnol. 19: 227-246.

Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. Food Microbiology. 33: 282-291.

Bover-Cid, Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 53: 33-41.

Cebeci, A., Gurakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology. 20: 511-8.

Di Cagno, R., Coda, R., Angelis, M.D., Gobbetti, M. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. Food Microbiology. 33: 1-10.

Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., Gobbetti, M. 2008. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. International Journal of Food Microbiology. 127: 220-228.

Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developments. Int. Food Inged. 3: 23-26.

Hector, R., Jose, A.C., Landete, J.M., Rivas, B.D. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 132: 79-90.

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid. In. Laboratory exercises in microbiology. New York: MC GrawHill. 126-188.

Mishra, V., Prasad, D.N. Application of *in vitro* methos for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. 2005. International Journal of Food Microbiology. 103: 109-115.

Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulation. Bioresource Technol. 97: 1217-1224.

Spelhaug, S.R. and Halander, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactic* and *Pediococcus pentasaceous*. J.Food Prot. 52: 856-862.

Wang, C.Y., Lin, P.R., Chang-Chai, N.g., Shyu, Y.T. 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. Clinical Microbiology. Anaerobe. 16: 578-585.

Zhang, J.H., Tatsumi, E., Fan, J.F., Li, L.T. 2007. Chemical components of *Aspergillus*-type *douchi*, a Chinese traditional fermented soybean product, change during the fermentation process. Int. J. Food Sci.Technol. 42(3): 263-268.