

การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากอาหาร

รัชฎาพร สุวรรณรัตน์ นันธิดา ดาว พัสกุล และ นพพร แจ่มใส

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากอาหาร ได้แก่ ผักสด อาหารหมักและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน และรูปร่างกลมได้ 100 โคโลนี ระบุชนิดด้วยวิธีมาตรฐานร่วมกับการยืนยันชนิดโดย 16S rRNA gene sequencing และ BD Phoenix™ M50 จากนั้นประเมินคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ การสร้างเอนไซม์อะไมเลส การย่อยเม็ดเลือดแดง ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน การทนกรด (pH 3.0) การทนเกลือ น้ำดี ความไวต่อ ยาปฏิชีวนะ และการยับยั้งเชื้อก่อโรค ผลการศึกษาพบว่าโคโลนีที่มีคุณสมบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346 ได้แก่ *Lactiplantibacillus plantarum* 21 โคโลนี *Lactocaseibacillus paracasei* 2 โคโลนี และ *Enterococcus faecium* 4 โคโลนี โดย *L. plantarum* และ *L. paracasei* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะและแสดงศักยภาพในการยับยั้ง เชื้อก่อโรค ขณะที่ *E. faecium* ต่อยาปฏิชีวนะและไม่แสดงคุณสมบัติดังกล่าว จึงคัดเลือก *L. plantarum* 2 ไอโซเลต (P10/3 และ P46/2) และ *L. paracasei* 1 โคโลนี (P62/2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติ ความปลอดภัย และเอกลักษณ์ในระดับที่รองรับ การขึ้นทะเบียนโพรไบโอติก ทั้งนี้สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ถูกฝากเก็บในธนาคารชีวภาพเพื่อเป็นฐานข้อมูลโพรไบโอติกของ ประเทศไทย ผลการศึกษาสะท้อนว่าอาหารหมักเป็นแหล่งสำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ ยังเป็นการประเมินในระดับห้องปฏิบัติการ ควรมีการศึกษาระดับจีโนม คุณสมบัติ และความปลอดภัย เพื่อสนับสนุน การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: โพรไบโอติก, แลกติกแอซิดแบคทีเรีย, อาหารหมัก

Corresponding author E-mail: ratchadaporn.s@dmasc.mail.go.th

Received: 20 April 2026

Revised: 25 July 2026

Accepted: 31 July 2026

บทนำ

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ชนิดดีที่มีชีวิต พบได้ตามธรรมชาติในระบบทางเดินอาหาร ลำไส้ใหญ่ และร่างกายมนุษย์ ช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ เสริมภูมิคุ้มกัน ย่อยอาหาร การขับถ่าย และป้องกันโรคในลำไส้ สามารถพบได้ในอาหารหมักดอง เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว กิมจิ นัตโตะ⁽¹⁾ ตัวอย่างของโพรไบโอติก ได้แก่ แบคทีเรียประจำถิ่น ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis* และ *B. longum* เป็นต้น⁽²⁾ คุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดีควรเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดโรคต่อผู้บริโภค ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากมีความสามารถทนต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและสามารถทนต่อกลืนน้ำดีรวมถึงกรดในกระเพาะอาหารได้ดี⁽³⁾ เพื่อให้โพรไบโอติกสามารถผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะกรดสูงได้ โพรไบโอติกสามารถสร้างกรดเพื่อช่วยปรับสภาวะทางเดินอาหารทำให้แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก โพรไบโอติกควรเพิ่มจำนวนได้เร็วและมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง และมีอัตราการรอดชีวิตสูง⁽⁴⁾ สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อโรคในลำไส้ที่โดยปกติจะเข้าเกาะผนังลำไส้และต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ระหว่างการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น การเกาะเคลื่อนของโพรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารจะช่วยให้การเคลื่อนของอาหารเป็นไปได้ดี เกิดการย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ โพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์โดยสามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน แกมมาอินเตอร์เฟอรอน และส่งเสริมกิจกรรมของมาโครฟาจที่ช่วยกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกายและแย่งอาหารของแบคทีเรียก่อโรค⁽⁵⁾

โพรไบโอติกถูกนำมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ จากการศึกษาของ Mach T⁽⁶⁾ พบว่าโพรไบโอติกสามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบของลำไส้ได้ และอาหารที่มีการผสมโพรไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดท้องร่วง

เฉียบพลันในผู้ใหญ่ที่เกิดจาก *Escherichia coli* รวมทั้งยังช่วยป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วง⁽⁷⁾ และการศึกษาของ Reid G⁽⁸⁾ พบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียช่วยบรรเทาอาการไม่ทนต่อน้ำตาลแลกโตส เนื่องจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสเป็นกรดแลกติกได้นอกจากนั้นนมที่มีการหมักด้วยโพรไบโอติกถูกนำมาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เพื่อรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร โรคภูมิแพ้ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง รวมทั้งเป็นอาหารของทารกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง^(9,10)

จากประโยชน์ของโพรไบโอติกทำให้ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกโดยกฎหมายไทยอ้างอิงจาก The International Dairy Federation (IDF) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติก ต้องมีแบคทีเรียที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^6 โคโลนีต่อมิลลิกรัม⁽¹¹⁾ ก่อนวันหมดอายุ สาเหตุเพราะโพรไบโอติกให้ประโยชน์แก่ร่างกายผู้บริโภคเมื่อได้รับโพรไบโอติกในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิต เพื่อสามารถแสดงประสิทธิภาพได้มากที่สุด แต่เนื่องจากภายในกระเพาะอาหารมีสภาพความเป็นกรดสูงและประกอบไปด้วยกลืนน้ำดี ความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้เซลล์โพรไบโอติกบาดเจ็บและตาย ส่งผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารทำให้ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกลดลง การเพิ่มอัตราการอยู่รอดของโพรไบโอติกจึงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารอาหารได้มากขึ้นและเป็นไปตามข้อกำหนดของ IDF โดยโพรไบโอติกที่มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจะทำให้มีประสิทธิภาพการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบย่อยอาหาร จึงช่วยป้องกันร่างกายจากจุลินทรีย์อื่นๆ ในระบบย่อยอาหารที่ทำให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย

การพิจารณาขึ้นทะเบียนจุลินทรีย์โพรไบโอติกในประเทศไทย ประกอบด้วย ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงให้เห็นถึงอัตลักษณ์ของสายพันธุ์ (strain identity) ความปลอดภัย (safety) และประสิทธิผล (efficacy) ของจุลินทรีย์อย่างครบถ้วน โดยการระบุชนิดและสายพันธุ์ควรดำเนินการด้วยเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA การวิเคราะห์

ลำดับจีโนมทั้งหมด (Whole Genome Sequencing; WGS) หรือวิธีทางอณูชีววิทยาอื่นที่ได้รับการยอมรับเพื่อยืนยันความถูกต้องของสายพันธุ์และตรวจสอบการมีถิ่นที่่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคหรือการดื้อยาต้านจุลชีพที่สามารถถ่ายทอดได้ นอกจากนี้การประเมินความปลอดภัยควรครอบคลุมการทดสอบการสร้างสารพิษ การเกิดฮีโมไลซิส ความไวต่อยาต้านจุลชีพตามเกณฑ์มาตรฐาน การไม่สร้างสารเมแทบอลิต์ที่เป็นอันตราย เช่น ไบโอดีเจนามีน รวมถึงการประเมินความปลอดภัยจากข้อมูลการศึกษาในห้องปฏิบัติการและข้อมูลการใช้ในมนุษย์ สำหรับการประเมินคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ควรประกอบด้วยการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะกรดของกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิว ลำไส้หรือการยึดเกาะกับเมือก (mucin adhesion) การสร้างสารต้านจุลชีพ การยับยั้งเชื้อก่อโรค การคงสภาพการมีชีวิตตลอดอายุการเก็บรักษา และการแสดงผลเชิงหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ เช่น การปรับสมดุลจุลชีพในลำไส้ การเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน หรือการลดความเสี่ยงของโรค ซึ่งต้องได้รับการสนับสนุนจากหลักฐานเชิงประจักษ์ ทั้งการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และโดยเฉพาะการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ที่ออกแบบอย่างเหมาะสม ทั้งนี้การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในประเทศไทยตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ภายใต้พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ซึ่งสอดคล้องกับหลักวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

โพรไบโอติกนอกจากจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพแล้วยังสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจมหาศาล ดังนั้นการคัดแยกโพรไบโอติกที่เป็นสายพันธุ์ไทยจึงมีความสำคัญที่ส่งผลต่อการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมและคัดแยกโพรไบโอติก แลกติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารในประเทศไทย ทำการทดสอบคุณสมบัติตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานของการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก เพื่อนำไปขึ้นทะเบียนเป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยในอนาคต ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ เพิ่มประโยชน์และมูลค่าให้กับอาหารไทย

วัสดุและวิธีการ

จุลินทรีย์มาตรฐาน

จุลินทรีย์มาตรฐาน *Escherichia coli* (DMST 4212), *Listeria monocytogenes* (DMST 17303), *Staphylococcus aureus* (DMST 8840), *Clostridium perfringens* (DMST 16637), *Salmonella Typhimurium* (DMST 562), *Bacillus coagulans* (DMST 78664), *Enterococcus faecalis* (DMST 4736), *Enterococcus faecium* (DMST 4743), *Lactiplantibacillus plantarum* (DMST 75672) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ *Lacticaseibacillus paracasei* (BCC 42359) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80°C (DW-86L 728D, Haier, China) อุณหภูมิต่ำกว่า 70°C *Lacticaseibacillus rhamnosus* TRBC 374 และ *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 334 ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Brain heart infusion broth (BHI broth) (Oxoid, England), Tryptic Soy Agar (TSA agar) (Scharlau, Spain), Tryptic soy broth (TSB broth) (Scharlau, Spain), Buffered Peptone Water (BPW) (Scharlau, Spain), Levine eosin methylene blue (L-EMB agar) (Scharlau, Spain), Baird-Parker (BP agar) (Scharlau, Spain), with EDTA (BBL, USA), Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar) (Scharlau, Spain), *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA agar) (Scharlau, Spain), Blood agar (Oxoid, England), de Man, Rogosa and Sharpe (MRS agar) (Scharlau, Spain), de Man, Rogosa and Sharpe (MRS broth) (Scharlau, Spain), Bacteriocin screening medium (BSM agar) (Merck, Germany), KF Streptococcus Agar (KF agar) (BD, USA), *Bacillus coagulans* agar

(BCA agar) (HiMedia, India), Yeast extract (Merck, Germany), Pepsin (Sigma, USA), Bile salts (Oxoid, England) และ Pancreatin (Merck, Germany)

น้ำยาและสารเคมี

Crystal violet (Biotech, Thailand), Safranin-O (Biotech, Thailand), สารละลาย Iodine (Biotech, Thailand), แอลกอฮอล์ 95% (Biotech, Thailand), Kovacs' reagent (Scharlau, Spain), Hydrogen Peroxide (QReC™, New Zealand), สารละลายสำหรับเจือจาง 0.1% peptone water (Oxoid, England), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Merck, Germany) และ Sodium chloride (NaCl) (Carlo erba, Italy)

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (GE L600, Getinge getting group, Sweden) เครื่องนับโคโลนี (3328, Leica, USA), ตู้บเพาะเชื้อ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (MIR 522, SANYO, Japan), ตู้บเพาะเชื้อ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ (MIR 252, SANYO, Japan) ตู้บเพาะเชื้อ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (MIR 553, SANYO, Japan), ตู้บเพาะเชื้อ $40 \pm 1^\circ\text{C}$ (MIR 153, SANYO, Japan), กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (Leica, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ (MEMMERT, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $47 \pm 2^\circ\text{C}$ (MEMMERT, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01–0.1 กรัม (BP2100, Sartorius, Germany), เครื่องผสม vortex mixer (VX100, LABNET, USA), เครื่องให้ความร้อนพร้อมกวนด้วยแม่เหล็ก (Stuart, USA), เครื่อง BD Phoenix™ M50 automated Microbiology system (BD, USA), Anaerobic jar (Oxoid, England), Indicator strip (Merck, Germany), Cotton swab (Bio cotton, Thailand), หลอดทดลอง (Kimble, Mexico), จานเพาะเชื้อ (Micro QA, China), ปิเปต 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (Witeg, Germany), ห่วงถ่ายเชื้อ (Citotest, China), เข็มเขี่ยเชื้อ (Citotest, China),

แผ่นสไลด์แก้ว (Sail, China) และทิป (Axygen, China)

ตัวอย่างอาหาร

เก็บตัวอย่างอาหาร จำนวน 70 ตัวอย่าง ช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2567 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2568 โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะต้องไม่มีเลขสารบบอาหาร ประกอบด้วย ผักสด อาหารหมักและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จัดเก็บจากตลาดสด ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร นนทบุรี) ภาคใต้ (นครศรีธรรมราช ชุมพร) และภาคเหนือ (เชียงใหม่ เชียงราย) ของไทย นำตัวอย่างอาหารมาแยกและคัดเลือกเชื้อหลังได้รับตัวอย่างทันทีหรือดำเนินการในวันถัดไป โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $5-8^\circ\text{C}$ ก่อนนำมาใช้

การแยกแลกดิกแอซิดแบคทีเรียจากอาหาร

ตัวอย่างอาหารถูกนำมาแยกและคัดเลือกเชื้อหลังได้รับตัวอย่าง การแยกแลกดิกแอซิดแบคทีเรียดำเนินการภายใต้เทคนิคปราศจากเชื้อ โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนักรวมแต่ละตัวอย่าง 100 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม เติมสารละลายสำหรับเจือจาง 0.1% peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า ใส่สารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจาง $10^{-1}-10^{-10}$ ตามลำดับ โดยแต่ละระดับความเจือจางดูด 1 มิลลิลิตร ลงใส่ในแต่จานเพาะเชื้อ จำนวน 6 เพลทสำหรับการหาเชื้อ 3 กลุ่ม เทอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดประมาณ 12–15 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้แข็งบ่มตามเวลาและอุณหภูมิของแต่ละวิธี คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar สำหรับการวิเคราะห์หาเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp. (ISO 15214:1998)⁽¹²⁾ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่สภาวะ anaerobe อาหารเลี้ยงเชื้อ KF agar สำหรับการวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม Enterococci (APHA: 2015; Chapter 10)⁽¹³⁾ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะ aerobe และ BCA agar สำหรับการวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม *Bacillus coagulans* (USPC: 2023)⁽¹⁴⁾ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะ aerobe เมื่อครบเวลาอ่านผลสุ่ม 10 โคโลนีของแต่ละวิธี ไปตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก การทดสอบการติดสีแกรมและลักษณะของเซลล์ (cell shape and gram staining)

นำเชื้อที่แยกได้มาคัดเลือกโดยการย้อมสีแกรมและดูรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด 10 โคโลนี มาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบาง ๆ และปล่อยให้แห้ง ทำการตรึงแบคทีเรียบนสไลด์แล้วหยดด้วยสาร crystal violet ให้ทั่วรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารทิ้ง จากนั้นหยดสารละลาย iodine บนรอยเกลี่ยของเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วหยดสาร safranin-o บนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ประมาณ 15–30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อนและรูปร่างกลม

การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

การวิเคราะห์คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส นำห้ว่งถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และรูปร่างกลมป้ายลงแผ่นสไลด์แก้ว หยดสารละลาย 3% (v/v) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิดฟอง ผลบวกจะแสดงการเกิดฟองก๊าซ และผลลบไม่มีฟองเกิดขึ้น⁽¹⁵⁾ คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ให้ผล catalase ลบ สำหรับ *Lactobacillus* spp. และ Enterococci ส่วน *B. coagulans* ให้ผลบวก

การทดสอบความสามารถในการเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ streak บนอาหาร MRS agar 2 เพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะ aerobe 1 เพลท และอีก 1 เพลท ภายใต้สภาวะ anaerobe ผลบวกมีโคโลนีเจริญบนอาหาร MRS agar⁽¹⁶⁾ คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้ง aerobe และ anaerobe

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ streak บนอาหาร blood agar base ที่มีเลือดแกะผสมอยู่ 5% และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวควบคุม อ่านผล ถ้าแบคทีเรียทดสอบสามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้จะเกิดโซนใสรอบ ๆ รอย streak ของแบคทีเรียทดสอบที่มีการเจริญ ซึ่งผลการย่อยเม็ดเลือดแดง แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ การย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (Beta-hemolysis) โดยมีโซนใสเกิดขึ้นรอบเชื้อแบคทีเรีย การย่อยเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ (Alpha-hemolysis) มีลักษณะโซนสีเขียว ๆ รอบเชื้อแบคทีเรีย และการไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (Gamma-hemolysis) ไม่มีโซนรอบ ๆ เกิดขึ้นรอบเชื้อแบคทีเรีย โดยตรวจผลการทดสอบที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่พบการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยไม่มีโซนรอบ ๆ เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเม็ดเลือดแดงได้แบบไม่สมบูรณ์ที่มีลักษณะโซนสีเขียว ๆ รอบเชื้อแบคทีเรีย⁽¹⁷⁾

การตรวจยืนยันเพื่อระบุเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain)

การตรวจยืนยันเพื่อระบุเอกลักษณ์แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน catalase ลบ ตรวจยืนยันด้วยวิธีการหาลำดับเบส 16S rRNA sequencing services โดยหน่วยงานที่ให้บริการ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้รับมาเปรียบเทียบกับชนิดของแบคทีเรียฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank⁽¹⁸⁾ และแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม catalase ลบ ตรวจยืนยันด้วยเครื่อง BD Phoenix™ M50 automated Microbiology system⁽¹⁹⁾ และนำผลที่ได้มาพิจารณาคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346⁽¹¹⁾

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะใช้วิธี Minimum inhibitory concentration (MIC) (ISO 10932:2010)⁽²⁰⁾ โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก streak บน MRS agar บ่มในสภาวะ

anaerobe ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบแบบ direct colony suspension โดยใช้ cotton swab ปราสจากเชื้อแต่ละโคโลนีเดี่ยว ใส่ลงในสารละลาย 0.85% NaCl และปรับความขุ่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อทดสอบเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 เตรียมยาปฏิชีวนะทดสอบให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าจากความเข้มข้นทดสอบตั้งต้นและเจือจางความเข้มข้นให้ได้ในช่วงทดสอบของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในไมโครเพลท โดยเว้น 2 แถวสุดท้ายเป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) และชุดควบคุมผลลบ (negative control) จากนั้นเติมแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบยกเว้นชุดควบคุมผลลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ

37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 334 เป็นเชื้อควบคุม เมื่อครบเวลาบ่ม อ่านค่า MIC โดยดูความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ยืนยันผลทดสอบด้วยชุดควบคุมผลลบซึ่งจะต้องไม่มีการเจริญ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ตรวจได้ไปเปรียบเทียบกับตารางแปรผลตามตารางค่า Microbiological cut-off value ใน Guidance on the characterization of micro-organism used as feed additives or as production organisms ของ European Food Safety Authority (2018)⁽²¹⁾ ว่าจัดอยู่ในเกณฑ์ของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (resistant) หรือเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (susceptible) ดังแสดงในภาพที่ 1

การทดสอบความทนต่อสภาวะความเป็นกรดใน

	Ampicillin	Vancomycin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Tylosin	Ciprofloxacin	Colistin	Fosfomycin
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^(a)	2	2	16	16	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^(b)	2	n.r.	16	64	64	1	4	8 ^(c)	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	4	32	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative ^(d)	4	n.r.	16	64	64	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	4	32	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	n.r.	64	2	2	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Bacillus</i>	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1,024	128	4	4	4	16	4	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Corynebacterium</i> and other Gram-positive	1	4	4	16	8	1	4	2	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Enterobacteriaceae</i>	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	8	n.r.	n.r.	0.06	2	8

n.r.: not required.

(a): Including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*.

(b): Including *L. fermentum*.

(c): For *L. buchneri* the cut-off for tetracycline is 128.

(d): Including the homofermentative species *L. salivarius*.

ภาพที่ 1 ค่ามาตรฐานการแปรผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (ที่มา: European Food Safety Authority (EFSA))⁽²¹⁾

กระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายแบคทีเรียลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ทำการปรับความเป็นกรดด้วย กรดไฮโดรคลอริก (8M HCL) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5N NaOH) ที่ระดับ pH 3 โดยแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลอง ปริมาณ 10^6 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0 นาที และ 180 นาที ด้วยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต⁽²²⁾ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างระยะเวลาที่ 0 นาที กับ 180 นาที ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = (N_T/N_0) \times 100$$

N_0 แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 0 นาที (CFU/mL)

N_T แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 180 นาที (CFU/mL)

การทดสอบความทนต่อเกลือน้ำดีของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (bile salt tolerance to simulated small intestinal fluid)

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเตรียม MRS broth ให้มีค่า pH ใกล้เคียงกับลำไส้เล็ก คือ pH 8 แบ่งอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ดังกล่าว ให้มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salts) 0.3% โดยให้มีแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลองปริมาณ 10^6 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0 นาที และ 180 นาที ด้วยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต⁽²²⁾ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรีย

ระหว่างระยะเวลาที่ 0 นาที กับ 180 นาที ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = (N_T/N_0) \times 100$$

N_0 แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 0 นาที (CFU/mL)

N_T แทน ค่าเฉลี่ยของ Log10 ของปริมาณเชื้อทดสอบที่เวลา 180 นาที (CFU/mL)

การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค (antipathogen activity)

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทำการทดสอบ เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ spot เชื้อปริมาตร 20 μ L บนอาหาร BSM agar บ่มที่ 30°C สภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่จะทำการทดสอบ ประกอบด้วย เชื้อ *E. coli* DMST 4212, *L. monocytogenes* DMST 17303, *S. aureus* DMST 8840, *S. Typhimurium* DMST 562, *S. epidermidis* DMST 15505 เลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิของเชื้อก่อโรคนั้น ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ทดสอบ 10 μ L ลงในหลอดอาหาร TSA soft agar 5 mL ทำการ vortex และเทลงบนเพลทอาหาร BSM agar บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งโดยการวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี⁽²³⁾ และบันทึกผลการทดสอบ อ่านผลโดยการดูโซนใส คัดเลือกแบคทีเรียเฉพาะชนิดที่ให้โซนใสอย่างน้อย 10 มิลลิเมตร

ผล

การคัดแยกแลกดิกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากอาหารพื้นเมืองของไทย ได้แก่ ผักสด อาหารหมักและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จำนวน 70 ตัวอย่าง ตามวิธีมาตรฐาน ISO 15214:1998⁽¹²⁾, APHA: 2015; Chapter 10⁽¹³⁾ และ USPC: 2023⁽¹⁴⁾ สามารถระบุสกุลแบคทีเรียที่ทำการแยกได้ คือ *Lactobacillus* spp., Enterococci และ *B. coagulans* ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น โดยตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์ พิจารณา

คัดเลือกเฉพาะเชื้อแกรมบวก รูปท่อนและกลม การผลิตเอนไซม์ catalase ที่ให้ผลลบ ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ Enterococci ส่วน *B. coagulans* ให้ผลบวก การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ การตรวจสอบความสามารถในการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จากกระบวนการแยกเชื้อและทดสอบ

คุณสมบัติเบื้องต้น สามารถแยกเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ 100 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียรูปร่างท่อน จำนวน 48 ชนิดตัวอย่าง และรูปร่างกลม จำนวน 52 ชนิดตัวอย่าง มาตรวจสอบยืนยันยีนสกุลและชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วย 16S rRNA gene sequencing และ BD Phoenix™ M50 ตามลำดับ สามารถจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ 14 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น

ลำดับ	รูปร่างแบคทีเรีย	สกุลและชนิด	จำนวนไอโซเลท
1	รูปร่างท่อน	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	21
2		<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	2
3		<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	12
4		<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	8
5		<i>Lactobacillus brevis</i>	3
6		<i>Lactobacillus odoratitofui</i>	1
7		<i>Bacillus cereus</i>	1
รวม			48
8	รูปร่างกลม	<i>Enterococcus faecium</i>	9
9		<i>Enterococcus faecalis</i>	4
10		<i>Pediococcus acidilactici</i>	24
11		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	9
12		<i>Pediococcus parvulus</i>	4
13		<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	1
14		<i>Lactococcus garvieae</i>	1
รวม			52
รวมทั้งหมด			100

เมื่อนำผลการคัดเลือกมาพิจารณาเฉพาะสกุลและชนิดที่ตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2554 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555⁽¹¹⁾ พบเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ควรนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก และความปลอดภัยเบื้องต้นของแบคทีเรีย

L. plantarum จำนวน 21 ไอโซเลท *L. paracasei* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *E. faecium* จำนวน 9 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติตามข้อกำหนดขั้นต่ำ (minimum requirement) และหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัย การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร⁽²⁴⁾ ตามคำแนะนำคณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ผลการ

ทดสอบความทนกรด pH 3.0 พบว่า *L. plantarum* จำนวน 12 ไอโซเลต, *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต และ *E. faecium* จำนวน 2 ไอโซเลต สามารถทนกรดที่ pH 3.0 และพบเชื้อ *L. plantarum* จำนวน 11 ไอโซเลต *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต และ *E. faecium* จำนวน 2 ไอโซเลต สามารถทนเกลือ น้ำดี pH 3.0 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า *L. plantarum* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ ในขณะที่ *E. faecium* ทุกไอโซเลตให้ผลดื้อยาปฏิชีวนะ และเมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *S. epidermidis* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *L. paracasei* จำนวน 1 ไอโซเลต

แสดงผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นจึงคัดเลือกแบคทีเรีย ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ *L. plantarum* ไอโซเลตที่ 1 (P10/3 แยกจากถั่วเน่าแผ่นแห้ง) *L. plantarum* ไอโซเลตที่ 2 (P46/2 แยกจากกิมจิผักกาดขาว) และ *L. paracasei* 1 ไอโซเลต (P62/2 แยกจากถั่วเน่าเมะ) ที่มีคุณสมบัติความปลอดภัยเบื้องต้น สำหรับนำไป ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบคุณสมบัติความปลอดภัยโพรไบโอติก โดยศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นอกจากนี้ แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีโอกาสเป็นโพรไบโอติก สายพันธุ์ไทยที่แยกได้เบื้องต้น จำนวน 100 ไอโซเลต ได้ถูกจัดเก็บเข้าระบบในคลังเชื้อมาตรฐานสากล ณ ธนาคารชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

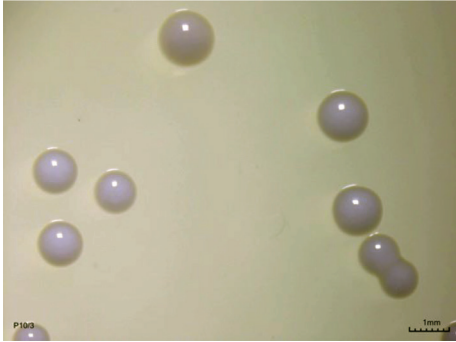
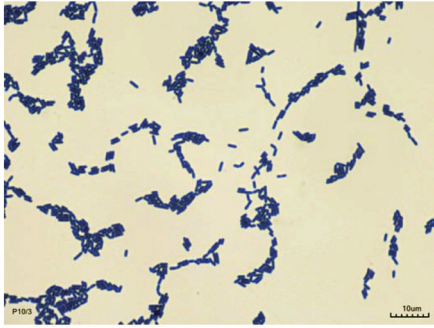
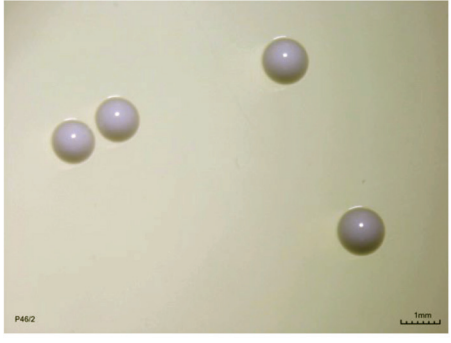
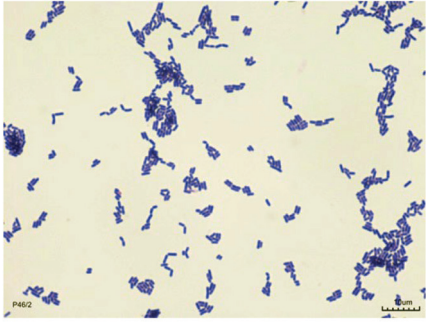
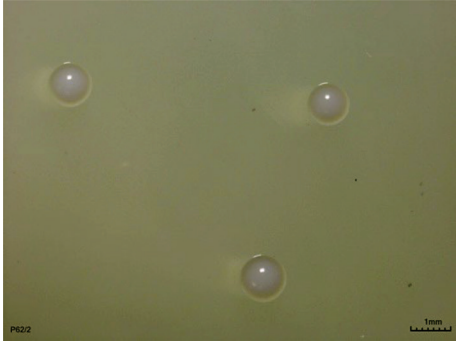
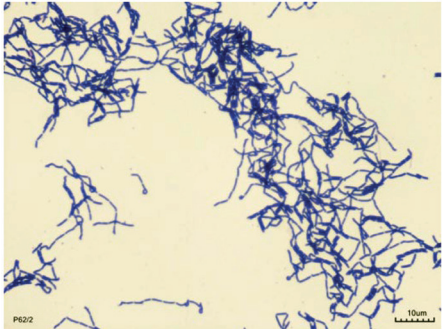
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติและความปลอดภัยต่อความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นและจำนวนสายพันธุ์ ที่คัดเลือกตรงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346

การทดสอบ	จำนวนแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจำแนกตามสายพันธุ์		
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>E. faecium</i>
จำนวนเชื้อที่ทำการทดสอบเริ่มต้น	21	2	3
1) การทนกรด pH 3.0	12	1	2
2) การทนเกลือ น้ำดี pH 3.0	11	1	2
3) ความไวต่อยาปฏิชีวนะ	2	1	0
4) การยับยั้งเชื้อก่อโรค	2	1	0

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย P10/3, P46/2 และ P62/2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ลักษณะโคโลนีทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะกลมขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสงมันวาว

การติดสีย้อมแกรม รูปร่าง และขนาดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าติดสีม่วงของ crystal violet จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 3

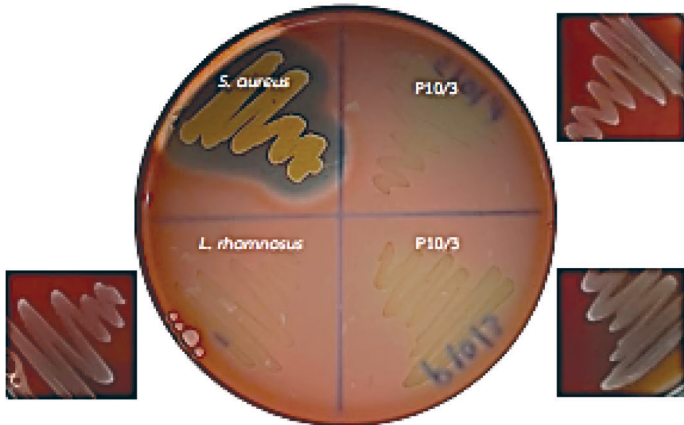
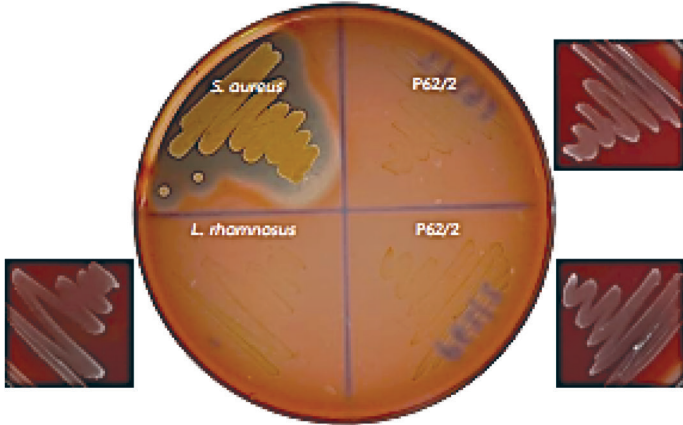
ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแลกดิกแอซิดแบคทีเรีย

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS	ลักษณะการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
P10/3	 ลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสง มันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.25 ± 0.09 มิลลิเมตร	 เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ต่อกันเป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม ขนาดเซลล์เท่ากับ 0.67×1.96 ไมโครเมตร
P46/2	 ลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสง มันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.27 ± 0.07 มิลลิเมตร	 เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ต่อกันเป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม ขนาดเซลล์เท่ากับ 0.67×1.96 ไมโครเมตร
P62/2	 ลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ ผิวหนานูน สีขาวทึบแสง มันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.08 ± 0.09 มิลลิเมตร	 เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ต่อกันเป็นคู่หรือลายสั้นๆ ขนาดเซลล์เท่ากับ 0.65×2.27 ไมโครเมตร

หมายเหตุ: ที่มาของภาพศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของ P10/3, P46/2 และ P62/2 บนอาหาร Sheep Blood agar พบว่าสายพันธุ์ P10/3 และ P46/2 ให้ผลแบบ Alpha-hemolysis คือ มีโซนสีเขียวรอบรอยที่แบคทีเรียเจริญซึ่งเป็นการย่อยเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์

ส่วน P62/2 ให้ผลแบบ Gamma-hemolysis ซึ่งไม่มีโซนรอบรอยการเจริญของแบคทีเรียแสดงถึงการไม่ย่อยเม็ดเลือดบนอาหาร blood agar ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่นำมาใช้พิจารณาคุณสมบัติของโพรไบโอติก ดังแสดงในภาพที่ 2

สายพันธุ์	ผลการทดสอบ	Hemolysis activity
P10/3		Alpha-hemolysis
P46/2		Alpha-hemolysis
P62/2		Gamma-hemolysis

ภาพที่ 2 การย่อยเม็ดเลือดแดง (ที่มา: ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร)

ผลการศึกษาการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร P10/3, P46/2 และ P62/2 ในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับความเป็นกรดต่างที่ระดับ pH 3 โดยให้มีแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลอง ปริมาณ 10^6 CFU/mL ตรวจนับปริมาณเซลล์ที่ระยะเวลา 0 และ 180 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียระหว่างระยะเวลาที่ 0 นาที กับ 180 นาที พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่

นำมาใช้พิจารณาการนำแบคทีเรียมาใช้เป็นโพรไบโอติก และผลการศึกษาการทนต่อเกลือแร่ของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (bile salt tolerance to simulated small intestinal fluid) P10/3, P46/2 และ P62/2 ในอาหารที่มีค่า pH ใกล้เคียงกับลำไส้เล็ก คือ มีค่า pH 8 และมีความเข้มข้นของเกลือแร่ (bile salts) 0.3% โดยให้มีแบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลอง ปริมาณ 10^6 CFU/mL ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0 นาที และ 180 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและการทนต่อเกลือแร่ของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก

สายพันธุ์	ปริมาณแบคทีเรีย (log CFU/mL)		การอยู่รอดของแบคทีเรีย นาทีที่ 180(%)
	นาทีที่ 0	นาทีที่ 180	
การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร			
P10/3	9.54	7.73	81.02
P46/2	8.08	7.83	96.87
P62/2	7.52	6.56	87.20
การทนต่อเกลือน้ำดีของสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก			
P10/3	7.57	6.60	87.23
P46/2	7.86	7.75	98.54
P62/2	7.97	7.89	99.04

การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ ตามมาตรฐาน ISO 10932⁽²⁰⁾ โดยการหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ใช้ *L. paracasei* ATCC 334 เป็นแบคทีเรียควบคุมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ P10/3 และ P46/2 ผลการทดสอบพบว่าสายพันธุ์ P10/3 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) 6 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Tetracycline และ Gentamicin แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Kanamycin และสายพันธุ์ P46/2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) 7 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Kanamycin, Tetracycline และ

Gentamicin ดังแสดงในตารางที่ 5 ในขณะที่สายพันธุ์ P62/2 จัดจำแนกอยู่ในชนิด *Lactocaseibacillus paracasei* สำหรับแบคทีเรีย *L. casei/paracasei* ใน Guidance on the characterization of microorganism used as feed additives or as production organisms ของ European Food Safety Authority (2018)⁽²¹⁾ กำหนดว่าไม่ต้องทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Vancomycin พบว่าสายพันธุ์ P62/2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) 8 ชนิด ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline และ Gentamicin ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *L. plantarum* P10/3 และ *L. plantarum* P46/2

Antibiotics	Test range (mg/L)	<i>L. plantarum</i> P10/3			<i>L. plantarum</i> P46/2		<i>L. paracasei</i> ATCC 334		
		cut off	MIC	Inter-pretation	MIC	Inter-pretation	Valid range of control strain (mg/L)	MIC	Inter-pretation
Ampicillin	0.032–16	2	0.063	S	0.125	S	0.5–2	1	V
Chloramphenicol	0.125–64	8	2	S	2	S	2–8	4	V
Clindamycin	0.032–16	4	0.063	S	0.125	S	0.06–0.25	0.125	V
Erythromycin	0.016–8	1	0.5	S	0.5	S	0.06–0.5	0.25	V
Kanamycin	2–1024	64	256	R	64	S	16–64	32	V
Streptomycin	0.5–256	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	8–32	32	V
Tetracycline	0.125–64	32	16	S	16	S	1–4	2	V
Gentamicin	0.5–256	16	4	S	2	S	1–4	2	V

หมายเหตุ: n.r.: not required, S: susceptible, R: resistance, V: valid, IV: invalid

n.r.: ไม่ต้องการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Vancomycin ในกลุ่ม *L. plantarum/pentosus* (Guidance on the characterization of microorganism used as feed additives or as production organisms ของ European Food Safety Authority (2018)⁽²¹⁾)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *L. paracasei* P62/2

Antibiotics	Test range (mg/L)	<i>L. paracasei</i> P62/2			<i>L. paracasei</i> ATCC 334		
		cut off	MIC	Inter-pretation	Valid range of control strain (mg/L)	MIC	Inter-pretation
Ampicillin	0.032–16	4	0.125	S	0.5–2	1	V
Chloramphenicol	0.125–64	4	2	S	2–8	4	V
Clindamycin	0.032–16	4	0.063	S	0.06–0.25	0.125	V
Erythromycin	0.016–8	1	0.063	S	0.06–0.5	0.25	V
Kanamycin	2–1024	64	16	S	16–64	32	V
Streptomycin	0.5–256	64	16	S	8–32	32	V
Tetracycline	0.125–64	4	1	S	1–4	2	V
Gentamicin	0.5–256	32	2	S	1–4	2	V

หมายเหตุ: S: susceptible, R: resistance, V: valid, IV: invalid

วิจารณ์

การศึกษานี้ได้แยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหาร จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีมาตรฐานสากล ได้แก่ ISO 15214:1998⁽¹²⁾ สำหรับ *Lactobacillus* spp., APHA:2015; Chapter 10⁽¹³⁾ สำหรับ Enterococci ซึ่งเป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการได้รับรองมาตรฐาน ISO 17025:2017⁽²⁵⁾ และ USPC: 2023⁽¹⁴⁾ สำหรับ *B. coagulans* มีการทวนสอบวิธีตาม ISO: 16140-3⁽²⁶⁾ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึง

ความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด สะท้อนถึงความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารหมักพื้นเมืองไทยในฐานะแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ

ตรวจพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* spp. ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในกระบวนการหมักอาหาร พบว่า *L. plantarum* เป็น

สายพันธุ์เด่นในกลุ่มรูปร่างท่อน ขณะที่ *P. acidilactici* เป็นสายพันธุ์เด่นในกลุ่มรูปร่างกลม ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่ระบุว่า *L. plantarum* เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในอาหารหมักจากพืชและมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะกรดและเกลือสูงได้ดี^(27,28) ขณะที่ *P. acidilactici* มีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดแลกดิกและสารต้านจุลชีพ เช่น แบคเทอริโอซิน⁽²⁹⁾ อย่างไรก็ตามการตรวจพบจุลินทรีย์ที่อาจเกี่ยวข้องกับความปลอดภัย เช่น *B. cereus* และ *S. stutzeri* แม้ในปริมาณต่ำ สะท้อนถึงความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมหรือกระบวนการผลิต ซึ่งควรได้รับการควบคุมอย่างเข้มงวดในกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการใช้งานในอาหาร⁽³⁰⁾ เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ของประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 346⁽¹¹⁾ พบว่าสายพันธุ์ที่เข้าเกณฑ์เบื้องต้น ได้แก่ *L. plantarum*, *L. paracasei* และ *E. faecium* ซึ่งถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติด้านโพรไบโอติกเพิ่มเติมโดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นถึงการคัดเลือกที่เข้มงวด โดยจำนวนไอโซเลทลดลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละขั้นตอน โดยเฉพาะการทดสอบความทนกรด (pH 3) และความทนเกลือ น้ำดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของจุลินทรีย์ที่สามารถรอดผ่านระบบทางเดินอาหาร⁽³¹⁾ ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า *E. faecium* มีลักษณะดื้อยาทุกไอโซเลทที่แยกได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ระบุถึงความเสี่ยงของการถ่ายทอดยีนดื้อยาในแบคทีเรียสกุลนี้ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในอาหาร⁽³²⁾ ขณะที่ *L. plantarum* และ *L. paracasei* แสดงความไวต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่และมีเพียงบางไอโซเลทที่ไม่ดื้อยา สะท้อนถึงศักยภาพด้านความปลอดภัยที่ดีกว่า การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคพบว่า *L. plantarum* (P10/3, P46/2) และ *L. paracasei* (P62/2) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอินทรีย์หรือสารต้านจุลชีพ เช่น แบคเทอริโอซิน สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่า *L. plantarum* มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและระบบทางเดินอาหาร

ในด้านความปลอดภัย การทดสอบ hemolysis พบว่าสายพันธุ์ *L. paracasei* (P62/2) ไม่ก่อให้เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นโพรไบโอติก ในขณะที่ *L. plantarum* (P10/3 และ P46/2) แสดง α -hemolysis ซึ่งควรพิจารณาเพิ่มเติมในด้านความปลอดภัย ผลการทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ตามแนวทางของ European Food Safety Authority (EFSA, 2018)⁽²¹⁾ ยืนยันว่าจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์ P46/2 และ P62/2 ซึ่งมีแนวโน้มเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเชิงอุตสาหกรรม โดยภาพรวมการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอาหารในฐานะแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่เหมาะสมทั้งด้านการอยู่รอดในสภาวะทางเดินอาหาร ความปลอดภัยและฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามการพัฒนาต่อยอดแบคทีเรียที่แยกได้จากการศึกษานี้ไปใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีการศึกษาระดับจีโนมและการทดสอบ *in vivo* เพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยในระยะยาว รวมถึงต้องมีการศึกษาเชิงประจักษ์ที่ชัดเจนและครบถ้วนตามข้อกำหนดขั้นต่ำและหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร⁽²⁴⁾ และต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 346 พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารฉบับที่ 2⁽¹¹⁾ ซึ่งเมื่อผลการทดสอบทั้งหมดดังกล่าวผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวข้างต้น จึงจะสามารถขอการรับรองจากคณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารเพื่อขึ้นทะเบียนโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารไทยได้ในอนาคตต่อไป

สรุป

การศึกษานี้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์แลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารได้ จำนวน 100 ไอโซเลท ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด และได้ดำเนินการจัดเก็บในธนาคารชีวภาพ ที่มีรหัสบ่งชี้ตามหลักมาตรฐานสากล ผลการศึกษาเบื้องต้นพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียเด่น ได้แก่ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* สะท้อนถึงความหลากหลายและศักยภาพของแหล่งอาหารหมักไทย เมื่อผ่านกระบวนการคัดเลือกตามเกณฑ์ด้านโปรไบโอติกและความปลอดภัย พบว่าสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูง ได้แก่ *L. plantarum* (P10/3 และ P46/2 แยกจากถั่วเน่าแผ่นแห้งและกิมจิผักกาดขาว) และ *L. paracasei* (P62/2 แยกจากถั่วเน่าเมอะ) ซึ่งมีคุณสมบัติทนเกลือ น้ำดี ไม่ดื้อยาปฏิชีวนะ และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ โดยเฉพาะ P62/2 ที่ไม่แสดง hemolysis จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาต่อยอดเป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ไทย ซึ่งจุลินทรีย์แลคติกแอซิดแบคทีเรียรวมถึงข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการพัฒนาเชิงประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารและสุขภาพ สนับสนุนการใช้ทรัพยากรชีวภาพในประเทศอย่างยั่งยืน โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวอาจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพในอนาคต และใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการ

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์การใช้ภาษา

บทความนี้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ ChatGPT (OpenAI, USA) ช่วยตรวจสอบไวยากรณ์บทความย่อภาษาอังกฤษช่วยตรวจสอบคำที่พิมพ์ไม่ถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณสมภพ วัฒนมณี ข้าราชการบำนาญ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รศ.ดร.อดิสร เสวติวิวัฒน์ ข้าราชการบำนาญ สถาบัน

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษาในการวางแผนการทดสอบ และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหารทุก ๆ ท่าน ที่ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. มาลัย ทวีโชติภัทร์. โปรไบโอติกและการติดเชื้อในทางเดินอาหาร. ว มหวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2553; 2(4): 25-38.
2. Slover CM. Danziger L. Lactobacillus: a review. Clin Microbiol Newsl 2008; 30(4): 23-7.
3. Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A. Lactic acid bacteria: probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health (a review). J Emerg Technol Innov Res 2018; 5(10): 411-24.
4. นวลจันทร์ พารักษา. สารแนรู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก. สุกรสาสน 2533; 16(63): 5-8.
5. Fuller R. Probiotic food: current use and future development. Int Food Ingred 1993; 3: 23-6.
6. Mach T. Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. J Physiol Pharmacol 2006; 57(Suppl 9): 23-33.
7. Yan F, Polk DB. Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2006; 9(6): 717-21.
8. Reid G. Probiotics and prebiotics-progress and challenges. Int Dairy J 2008; 18 (10-11): 969-75.
9. Guzel-Seydim Z, Seydim AC, Greene AK. Organic acid and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. J Dairy Sci 2000; 83(2): 275-7.
10. Beshkova DM, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov ZN. Pure cultures for making kefir. Food Microbiol 2002; 19(5): 537-44.
11. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 346 พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร ฉบับที่ 2. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129 ตอนพิเศษ 189 ง (วันที่ 18 ธันวาคม 2555).

12. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria—Colony-count technique at 30°C (ISO 15214:1998). Geneva, Switzerland: ISO; 1998.
13. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: APHA; 2015.
14. United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP–NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2023.
15. Thongwai N, Futui W, Ladpala N, Sirichai B, Weechan A, Kanklai J, et al. Characterization of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter maltaceti* P285 isolated from contaminated honey wine. Microorganisms 2022; 10(3): 528 (18 pages).
16. Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 11th ed. New York: Pearson; 2017.
17. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Blandino G, Stefani S. A novel δ -hemolysis screening method for detecting heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-intermediate *S. aureus*. J Clin Microbiol 2012; 50(5): 1742–4.
18. National Center for Biotechnology Information. GenBank: NIH genetic sequence database. Bethesda, MD: National Library of Medicine; 2023.
19. BD Diagnostics. BD Phoenix™ M50 automated microbiology system: operator's manual. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company; 2021.
20. International Organization for Standardization. Milk and milk products—Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB) (ISO 10932:2010). Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
21. European Food Safety Authority. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA J. [serial online] 2018; [cited 2026 Apr 14]; 16(3): e05206. [24 screens]. Available from: URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5206>.
22. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. J Appl Microbiol 1998; 84(5): 759–68.
23. Kazemipoor M, Wan Mohamed Radzi CWJ, Begum K, Yaze I. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens. Archives des Sciences 2012; 65(6): 1–10.
24. คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. ข้อกำหนดขั้นต่ำและหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร. ปทุมธานี; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ; 2565.
25. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: ISO; 2017.
26. International Organization for Standardization. ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain—Method validation—Part 3: protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva, Switzerland: ISO; 2021.

27. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: CRC Press; 2004. p. 1-66.
 28. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 85-101.
 29. Papagianni M, Anastasiadou S. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 3. (16 pages).
 30. Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 157(2): 223-8.
 31. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: FAO/WHO; 2002.
 32. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106(1): 1-24.
-

Selection of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Properties from Foods

Ratchadaporn Suwannarat, Nunthidadao Phatsakul, and Nopporn Jamsai

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT This study aimed to isolate and screen lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential from 70 food samples, including fresh vegetables, fermented foods, and ready to eat products. A total of 100 Gram positive rod and coccus shaped bacterial colonies were isolated and identified using conventional microbiological methods, followed by species confirmation through 16S rRNA gene sequencing and the BD Phoenix™ M50 automated identification system. The isolates were subsequently evaluated for preliminary probiotic characteristics, including catalase activity, hemolytic activity, growth under aerobic and anaerobic conditions, acid tolerance (pH 3.0), bile salt tolerance, antimicrobial susceptibility, and antagonistic activity against foodborne pathogens. The results showed that isolates meeting the criteria specified in the Thai Ministry of Public Health Notification No. 346 comprised 21 isolates of *Lactiplantibacillus plantarum*, two isolates of *Lacticaseibacillus paracasei*, and four isolates of *Enterococcus faecium*. *L. plantarum* and *L. paracasei* were susceptible to the tested antimicrobial agents and exhibited antagonistic activity against pathogenic bacteria, whereas *E. faecium* showed antimicrobial resistance and lacked antagonistic activity. Consequently, two *L. plantarum* isolates (P10/3 and P46/2) and one *L. paracasei* isolate (P62/2) were selected for further characterization of their probiotic properties, safety, and strain identity to support probiotic strain registration. The selected strains were deposited in a biological resource repository to establish a national probiotic strain database for Thailand. These findings indicate that fermented foods are an important source of LAB with probiotic potential. However, this study represents only a preliminary laboratory-based evaluation. Further investigations, including whole genome analysis and comprehensive assessments of probiotic functionality and safety, are required to support probiotic strain registration and facilitate future applications in the functional food industry.

Keywords : Probiotics, Lactic acid bacteria, Fermented foods