PBRU SCIENCE JOURNAL
2021.18(2) : 62-72

คุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Meats

จินตนา ต๊ะย่วน* วรรณา ฮุ่งหวล ธิดารัตน์ มณีนพ และ เสาวคนธ์ ต่วนเทศ

Chintana Tayuan*, Wanna Hunghoul, Thidarat Maneenop and Sowvakon Tuanted

คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร อ.เมือง สกลนคร 47000

Faculty of natural resources and agro-industry, Kasetsart university,

Chalermphrakiat sakonnakhon province campus, Sakon Nakhon, Thailand, 47000

***Corresponding author; E-mail:** fnacnt@ku.ac.th

Received: 06 April 2021 /Revised: 28 April 2021 /Accepted: 08 June 2021

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ได้แก่ แหนมหมู แหนมวัว ไส้กรอกหมูและไส้กรอกวัว ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค การทนต่อสภาวะกรด การทนต่อเกลือน้ำดีและความไวต่อยาปฏิชีวนะ จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 4 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 9 และ 8 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* DSMZ799 และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ตามลำดับ แต่ทุกไอโซเลทไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* DSMZ682 ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับกรดอินทรีย์และสารที่มีสมบัติคล้ายโปรตีน เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 ระยะเวลา 240 นาที และทนต่อเกลือน้ำดี 0.45% ระยะเวลา 180 นาที พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิต ระหว่าง 0 ถึง 52.97 และ 82.17 ถึง 98.41 ตามลำดับ ความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่ทดสอบมีความแตกต่างกัน มีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท NHB05-01 ที่คัดแยกได้จากแหนมวัวที่มีแนวโน้มว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โพรไบโอติก

Abstract

This study was to isolate lactic acid bacteria (LAB) from fermented meats: Thai fermented pork (pork nham), Thai fermented beef (beef nham), fermented pork sausage, fermented beef sausage. Their morphology, physiological characteristics and probiotic properties based on antibacterial activity against pathogenic bacteria, low pH tolerance, bile salt tolerance, and antibiotic susceptibility were evaluated. A total of 30 lactic acid bacterial isolates were isolated from 4 fermented meat samples. Nine and 8 isolates had antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* DSM799 and *Bacillus cereus* ATCC11778, respectively, while all isolated LAB had no inhibitory effect on *Escherichia coli* DSMZ682. Antimicrobial activity was likely due to organic acid and protein-like substances. Lactic acid bacterial isolates with antibacterial activity were evaluated their acid and bile tolerance. Tested isolates tolerated to pH 2 for 240 min, and 0.45% bile salt for 180 min which survival rates of 0 to 52.97% and 82.17 to 98.41%, respectively. LAB isolates displayed varying sensitivity to different antibiotics. Only isolate NHB05-01 isolated from beef nham had desirable characteristics to be considered as a promising probiotic candidate.

Keywords: Lactic acid bacteria, fermented meats, probiotics

บทนำ

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อสัตว์ เช่น แหนม และไส้กรอกเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากในกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ที่มีการสร้างสารเมตาบอไลท์ เช่น กรดอินทรีย์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวและมีรสชาติเฉพาะ แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded As Safe หรือ GRAS) และช่วยควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของอาหารเสื่อมเสียด้วยการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น กรดอินทรีย์และแบคเทอริโอซิน (1) อีกทั้งบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* (2) โพรไบโอติก (probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะมีประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภค โดยช่วยปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหาร (3) ลดค่าพีเอชของลำไส้และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดที่ก่อโรคได้ (2) อีกทั้งมีรายงานถึงประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อผู้บริโภค เช่น ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย รักษาโรคภูมิแพ้ ลดระดับไขมันในกระแสเลือด ลดการอักเสบ ป้องกันโรคมะเร็ง เป็นต้น (4) อย่างไรก็ตามในการนำโพรไบโอติกไปใช้ประโยชน์จะต้องมีกระบวนการคัดเลือกโพรไบโอติกเพื่อให้เกิดความปลอดภัยและสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โดยจะพิจารณาจากคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ แหล่งที่มาของจุลินทรีย์โพรไบโอติก จุลินทรีย์จะต้องไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก สามารถมีชีวิตและคงจำนวนอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ สามารถเกาะติดบนผิวเยื่อบุในระบบทางเดินอาหารได้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร มีความคงตัวทางพันธุกรรม ป้องกันหรือลดระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง ช่วยสร้างภูมิคุ้มกัน และต้องพิจารณาถึงความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะด้วย (2, 5, 6)

ก่อนหน้านี้แม้จะมีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากอาหารหมักและผลไม้ของไทยมาบ้างแล้ว (7, 8, 9) อย่างไรก็ตาม เพื่อเพิ่มโอกาสในการได้โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ดีและมีความหลากหลายมากขึ้น การวิจัยนี้จึงได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่จะเป็นประโยชน์และนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

วิธีวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ แหนมหมู แหนมวัว ไส้กรอกหมูและไส้กรอกวัว นำตัวอย่างมาเจือจางด้วย 0.1% peptone water นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี spread plate บนอาหาร MRS agar ที่เติม 1.0% $CaCO_3$ บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเซลล์

ทดสอบการติดสีแกรม (Gram's stain) ศึกษาลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, Carl Zeiss, Germany) ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% H_2O_2) ลงบนแผ่นสไลด์ นำลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์สเมียร์ลงบนหยด H_2O_2 แล้วตรวจผลโดยสังเกตการเกิดฟองแก๊ส แบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลสจะไม่พบฟองแก๊ส และศึกษารูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลจากการสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส โดยกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria จะพบการสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส ส่วน homo- fermentative lactic acid bacteria จะไม่พบการสร้างแก๊ส

3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion (ดัดแปลงจาก Schillinger และ Lücke (10)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดสอบเป็น

แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้แก่ *Staphylococcus aureus* DSMZ799, *Bacillus cereus* ATCC11778 และ *Escherichia coli* DSMZ682 เตรียมเชื้อทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเชื้อทดสอบโดยปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard แล้วปิเปตเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร (µl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA soft agar (0.75% agar) ปริมาตร 15 ml จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบประมาณ 10^6 Colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร (ml) จากนั้นเจาะวุ้นให้เป็นวงกลมขนาด 6 มิลลิเมตร (mm) โดยใช้ cork borer ปลอดเชื้อ นำสารละลายส่วนใสที่เตรียมไว้ปริมาตร 45 µl เติมลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบเปรียบเทียบผลการทดลองกับส่วนใสที่มีการปรับค่าพีเอช เท่ากับ 6.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4. การศึกษาศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (ดัดแปลงจาก Martirani และคณะ (11))

นำสารละลายใสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ย่อยโปรตีน Proteinase K ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำลายฤทธิ์ของเอนไซม์โดยแช่ในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี swab-paper disc โดยการ swab เชื้อ *B. cereus* ATCC11778 ลงบนผิวหน้าอาหาร TSA จากนั้นนำ paper disc ที่มีขนาด 6 mm วางไว้บนผิวหน้าอาหาร TSA agar แล้วนำสารละลายส่วนใส ปริมาตร 10 µl หยดลงบนกระดาษกรองขนาด 6 mm ที่วางไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดบริเวณยับยั้งเปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

5. การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี (ดัดแปลงจาก Michida และคณะ (12))

เตรียมเซลล์ซัสเพนชั่น (Suspension cells) ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีจำนวนเซลล์ 10^6 CFU/ml นำไปศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด โดยเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่ปรับค่าพีเอชให้ได้ 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก การทดสอบทำโดยเติมเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 0.5 ml ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีพีเอช 2.0 ปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 240 นาที ส่วนการทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี เตรียมสารละลายเกลือน้ำดี โดยเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ให้มี bile salt (Sigma) 0.45 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาปรับพีเอชให้ได้ 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปทดสอบโดยเติมเซลล์ซัสเพนชั่นปริมาตร 0.5 ml ลงในสารละลายเกลือน้ำดี ปริมาตร 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 180 นาที นับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากการบ่มโดยวิธี drop plate (13)

คำนวนเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดย

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต = (จำนวนของแบคทีเรียหลังการทดสอบ/จำนวนของแบคทีเรียเริ่มต้น) x 100

6. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก Goderska และ Czarnecki (14))

ปิเปตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 100 µl ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar เกลี่ยเชื้อให้ทั่ว วางแผ่นยาปฏิชีวนะ oxytetracycline 30 ไมโครกรัม (µg), penicillin G 10 หน่วย (unit; U), streptomycin 10 µg และkanamycin 30 µg (Oxoid) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเซลล์

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในแหนมหมู แหนมวัว ไส้กรอกหมูและไส้กรอกวัวมีจำนวน 8.0x 10^9, 7.95x10^9, 9.70x10^9 และ9.35x10^9CFU/g ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มี จำนวน 30 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทย้อมติดสีแกรมบวก โดยมีรูปร่าง 3 แบบ คือ รูปร่างกลม (Cocci) รูปไข่ (Oval) และรูปท่อน (Rod) จำนวน 16, 2 และ 12 ไอโซเลท ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีการหมักน้ำตาลกลูโคสทั้งแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดโดยมีค่าพีเอช ระหว่าง 3.8 ถึง 4.6

2. ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *S. aureus* DSMZ799, *B. cereus* ATCC11778 และ *E. coli* DSMZ682 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 9 ไอโซเลทให้ผลยับยั้งการเจริญ *S. aureus* DSMZ799 ได้ โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งระหว่าง 7.07±0.32 ถึง 9.0±0.26 mm และแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 8 ไอโซเลทมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC11778 ได้ โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งระหว่าง 6.53±0.25 ถึง 8.0±0.26 mm (Figure 1) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* DSMZ682

Table 1. Morphological and physiological characteristics of selected lactic acid bacterial isolates

Isolate no.	Fermented meat products	Shape	Fermentation of glucose		
			Medium pH*	Gas production	Fermentation pattern
NHB04-02	Beef nham	Short rod	4.6	+	Heterofermentative
NHB05-01	Beef nham	Short rod	4.2	-	Homofermentative
NHP07-01	Pork nham	Short rod	4.1	-	Homofermentative
NHP08-01	Pork nham	Coccus	4.2	-	Homofermentative
SSP01-01	Sour pork sausage	Coccus	4.6	+	Heterofermentative
SSP05-01	Sour pork sausage	Coccus	4.3	-	Homofermentative
SSP08-01	Sour pork sausage	Short rod	4.2	-	Homofermentative
SSB09-01	Sour beef sausage	Rod	4.2	-	Homofermentative
SSB09-02	Sour beef sausage	Rod	4.2	-	Homofermentative

*The pH of culture medium after cultivation under anaerobic condition at 37°C for 48 h

3. สมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อนำสารละลายส่วนใสมากำจัดฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ด้วยการปรับค่าพีเอชของสารละลายส่วนใสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้เท่ากับ 6.5 ก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ พบว่าสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* DSMZ799

แต่อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลท ได้แก่ NHB05-01, NHP08-01, SSB09-01 และ SSB09-02 ที่ยังพบฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778 ได้ แต่เมื่อเติมเอนไซม์ Proteinase K ในสารละลายส่วนใส พบว่ามีผลให้ฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778 ของไอโซเลท NHB05-01 ลดลงจนตรวจไม่พบบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ (Figure 1)

4. ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* DSMZ799 และ *B. cereus* ATCC11778 ได้จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ NHB05-01, NHP08-01, SSB09-01 และ SSB09-02 มาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 2.0) เป็นเวลา 240 นาที และการรอดชีวิตหลังจากการบ่มในเกลือน้ำดีเป็นเวลา 180 นาที พบว่ามีร้อยละของการรอดชีวิตระหว่าง 0 ถึง 52.97 และระหว่างร้อยละ 82.17 ถึง 98.41 ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NHB05-01 มีร้อยละการรอดชีวิตในสภาวะกรดสูงที่สุด คือ 52.97 และมีร้อยละการรอดชีวิตในเกลือน้ำดี เท่ากับ 96.56 (Table 2)

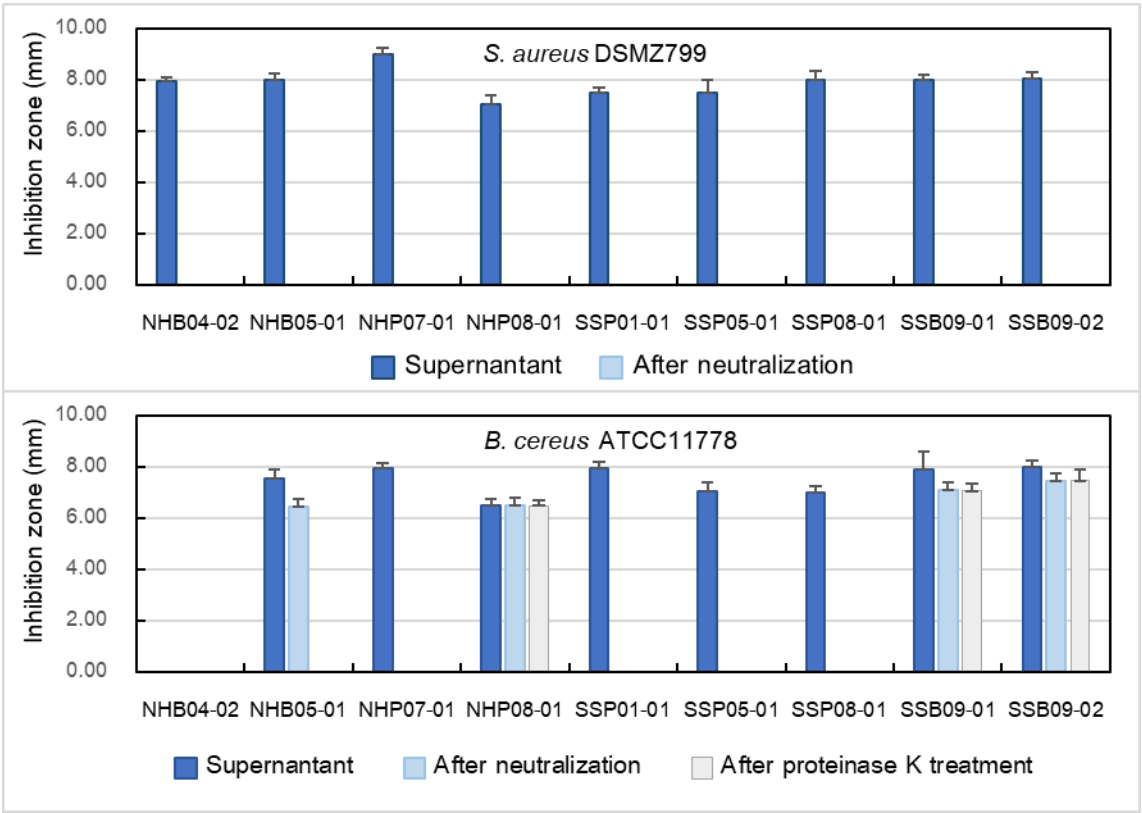

Figure 1. Antimicrobial activity of lactic acid bacterial supernatants against *S. aureus* DSMZ799 and *B. cereus* ATCC11778 using agar well diffusion method

Table 2. Survival rate (%) of selected lactic acid bacteria under acidic and bile salt condition

Isolate no.	Viable counts (log CFU/ml)					
	Tolerance to low pH		Survival rate (%)	Bile salt tolerance		Survival rate (%)
	0 min	240 min		0 min	180 min	
NHB05-01	7.89±0.05	4.18±0.12	52.97	8.74±0.19	8.44±0.19	96.56
NHB08-01	9.93±0.09	-	0	8.09±0.12	7.96±0.04	98.39
SSB09-01	6.45±0.13	-	0	10.07±0.04	9.91±0.12	98.41
SSB09-02	11.31±0.02	3.31±0.50	29.27	9.42±0.16	7.74±0.11	82.17

5. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เมื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท มีความไวต่อยา penicillin G และ oxytetracycline แต่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ streptomycin และ kanamycin ดังแสดงใน Table 3

Table 3. Antibiotic susceptibility of selected lactic acid bacteria

Isolate no.	Diameter of inhibition zone (mm)			
	OT	PG	S	K
NHB05-01	17.60±0.69	22.20±0.69	0	0
NHB08-01	19.60±3.85	33.60±5.49	0	0
SSB09-01	20.80±2.77	29.60±1.83	0	0
SSB09-02	16.80±1.20	23.60±0.69	0	0

OT, Oxytetracycline 30 µg; PG, Penicillin G 10 U; S, Streptomycin 10 µg; K, Kanamycin 30 µg

อภิปรายผล

แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อผลิตภัณฑ์จากนม ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ อาหารหมักดองต่าง ๆ รวมทั้งผักและผลไม้ (7, 8, 9, 15, 16) โดยในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจะมีแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ (17) การศึกษานี้แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก มีจำนวนระหว่าง 7.95×10^9 ถึง 9.70×10^9 CFU/g

เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* สอดคล้องกับการศึกษาของ Mezaini และคณะ (18) ที่รายงานฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Listeria innocua, Enterococcus faecalis, B. cereus* และ *B. subtilis* ได้ แต่ไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *Salmonella typhimurium* นอกจากนี้เมื่อทดสอบสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเป็นผลจากฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น โดยพบว่าค่าพีเอชของซับสเตรตลดลง มีค่าระหว่าง 4.1 ถึง 4.6 และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวถูกสลายได้ด้วยการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยสารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายโปรตีนในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NHB05-01 โดยเมื่อเติมเอนไซม์ Proteinase K ลงในสารละลายส่วนใส พบว่าสามารถทำลายฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NHB05-01 มีสารประกอบประเภทโปรตีนจึงถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน นอกจากนี้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อาจเกี่ยวข้องกับสารเมตาบอไลท์ชนิดอื่นที่แบคทีเรียกรดแลคติคผลิตขึ้นด้วย เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NHP08-01, SSB09-01 และ SSB09-02 ไม่ถูกสลายด้วยการทำให้เป็นกลางและด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน การยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก และ กรดอะซิติก กรดอินทรีย์ในรูปของกรดอ่อนที่ไม่แตกตัวเมื่อแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วจะเกิดการแตกตัวในไซโตพลาสซึมทำให้สามารถยับยั้งกระบวนการ

เมแทบอลิซึมและการเจริญของจุลินทรีย์ได้ นอกจากกรดอินทรีย์แล้วการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกยังเกี่ยวข้องกับการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล รูเทอรินและแบคเทอริโอซิน (15, 19, 20) การนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องสามารถมีชีวิตรอดและทนต่อกรดและน้ำดีในทางเดินอาหารได้ แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NHB05-01 สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะกรดและเกลือน้ำดีที่ทดสอบจึงมีแนวโน้มที่จะเจริญและรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ต้องคำนึงความสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโพรไบโอติกด้วย เนื่องจากมีความเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์จะถ่ายทอดลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไปยังจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ดังนั้นการนำโพรไบโอติกที่มียีนส์ดื้อยาปฏิชีวนะจึงยังเป็นข้อกังวลสำหรับการนำโพรไบโอติกไปใช้ประโยชน์ แต่อย่างไรก็ตามการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโพรไบโอติกอาจช่วยในการฟื้นฟูจุลินทรีย์ในลำไส้หลังการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะได้ (21)

สรุป

แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NHB05-01 ที่คัดแยกจากแหนมวัวมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *B. cereus* ได้และมีคุณลักษณะที่มีแนวโน้มว่าเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ ความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งความไวต่อยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามในการศึกษาขั้นต่อไปควรมีการระบุชนิดและศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติคให้ครบถ้วนทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนครที่สนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือและสถานที่สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Swetwiwathana A, Visessanguan W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. Meat Science 2015;09:101-5.
2. Williams NT. Probiotics. American Journal of Health-System Pharmacy 2010;7(6):449-58.
3. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? Trends in Food Science & Technology 1999;10(3):107-10.
4. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. Health benefits of probiotics: a review. International Scholarly Research Notices nutrition 2013;481651. doi:10.5402/2013/481651.
5. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety,

functional and technological properties. Journal of Biotechnology 2000;84(3):197-215.

6. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology 1998;41(2):85-101.

7. ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. การตรวจแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2563;39(2):206-12.

8. นนทพร รัตนจักร์. การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากกล้วยน้ำว้าดิบในเขตจังหวัดพิษณุโลก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2563;22(2):50-7.

9. Botthoulath V, Upaichit A, Thumarat U. Identification and in vitro assessment of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* SKI19, a bacteriocinogenic strain isolated from Thai fermented pork sausage. Journal of Food Science and Technology 2018;55: 2774-85.

10. Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology. 1989;55(8):1901-6.

11. Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, De Felice M. Purification and partial characterization of bacillocin 490 a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. Microbial Cell Factories 2002;1(1):1.

12. Michida H, Tamalampudi S, Pandiella SS, Webb C, Fukuda H, Kondo A. Effect of cereal extracts and cereal fibre on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochemical engineering journal 2006;28(1):73-8

13. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Microbiological Methods. UK: Butterworth-Heinemann, Oxford; 1989.

14. Goderska K, Czarnecki Z. Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. African Journal of Microbiology Research 2007;1(6):65-78.

15. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Food science and technology-New York-Marcel-Dekker.

16. Liu W, Pang H, Zhang H, Cai Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria: Springer; 2014.

17. Hammes WP, Bantleon A, Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiology Reviews 2004;7(1-2):165-73.

18. Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, Nedjar-Arroume N, Hornez JP. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. Journal of

environmental and public health 2009;78495. doi:10.1155/2009/678495.

19. Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS microbiology reviews 1990;7(1-2):149-63.

20. Ouwehand AC, Vesterlund S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. Food science and technology-New York-Marcel-Dekker; 2004.

21. Sharma P, Tomar SK, Goswami P, Sangwan V, Singh R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. Food Research International 2014;57:176-95