

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ที่หมักด้วยคีเฟอร์เกรนเสริมโปรไบโอติก

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF KEFIR FERMENTED WITH KEFIR GRAIN ENHANCED PROBIOTIC

พิรวัส สอนทุ่ง ศิริวรรณ อินทรอยู่ นนทพร รัตนจักร และ มนตรา ศรีษะแย้ม*

Phirawat Sonthung, Siriwan Inyou, Nontaporn Rattanachak, and Montra Srisayam*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

*corresponding author e-mail: srisayam_ssy@psru.ac.th

(Received: 23 February 2024; Revised: 11 June 2024; Accepted: 12 June 2024)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ในการเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ การทดสอบทำการเปรียบเทียบระหว่างคีเฟอร์ที่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 และคีเฟอร์ที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Salmonella Typhimurium* Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ คีเฟอร์ที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 นมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10^8 CFU/ml) คีเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (3×10^8 CFU/ml) และคีเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10^8 CFU/ml) สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด โดยคีเฟอร์ที่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ปริมาณ 6×10^8 CFU/ml ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับคีเฟอร์ที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในระดับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 6×10^8 CFU/ml อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 6×10^8 CFU/ml เป็นระดับความเข้มข้นที่แนะนำให้มียอยู่ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และมีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ

คำสำคัญ: คีเฟอร์ แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ยับยั้งแบคทีเรีย

Abstract

The objective of this research is to study the effect of lactic acid bacteria isolate NR27 on enhanced the antibacterial activity of kefir. The experiment was performed by comparing the antibacterial activity of kefir samples, kefir added with lactic acid bacteria isolate NR27 and kefir without lactic acid bacteria isolate NR27 to inhibit *Salmonella* Typhimurium, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli*. Antibacterial activity was investigated using Agar well diffusion method. The results showed that the tested samples, kefir without lactic acid bacteria isolate NR27, milk fermented with lactic acid bacteria isolate NR27 (6×10^8 CFU/ml) and kefir added with lactic acid bacteria isolate NR27 (3×10^8 CFU/ml and 6×10^8 CFU/ml) inhibited all four types of bacteria. Kefir added with lactic acid bacteria isolate NR27 at a concentration of 6×10^8 CFU/ml against the tested bacteria was no significant difference ($P < 0.05$) when compared to kefir without lactic acid bacteria isolate NR27. Therefore, the lactic acid bacteria isolate NR27 did not enhance the inhibition of bacteria at the tested concentration of 6×10^8 CFU/ml. However, lactic acid bacteria isolate NR27 at concentration of 6×10^8 CFU/ml is recommended to remain in the product. Because, it has antibacterial activity and probiotic properties that promote health benefits.

Keywords: Kefir, Lactic acid bacteria isolate NR27, Antibacterial activity

บทนำ

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อทางเดินอาหารเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา แนวทางหนึ่งที่เป็นทางเลือกในการแก้ปัญหา คือ การใช้โปรไบโอติก (Probiotics) เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อทางเดินอาหารโดยเฉพาะในเด็กเล็กและผู้สูงอายุ ซึ่งโปรไบโอติกคือ จุลินทรีย์มีชีวิตที่ให้ประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหาร โปรไบโอติกมีส่วนสำคัญที่ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อการรักษาและป้องกันภาวะลำไส้อักเสบ ไม่ว่าจะเป็นอาการท้องเสีย โรคลำไส้แปรปรวน ภาวะลำไส้อักเสบจากการที่รับประทานยาปฏิชีวนะ แม้กระทั่งภาวะท้องผูกเรื้อรังก็พบว่าการใช้โปรไบโอติกมีส่วนทำให้ภาวะต่างๆ ดีขึ้น (มัลลีย์, 2553) และในการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกได้มีการใช้พรีไบโอติก (Prebiotic) ซึ่งเป็นสารอาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยหรือดูดซึมได้ในระบบทางเดินอาหาร เมื่อผ่านเข้าไปถึงบริเวณลำไส้ใหญ่จะกลายเป็นอาหารของโปรไบโอติก ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้โปรไบโอติกทำงานได้ดีขึ้น โดยสารพรีไบโอติกสามารถพบได้ในพืชผักต่างๆ เช่น พืชตระกูลถั่ว หอม กระเทียม กล้วย ธัญพืช (รุสมัน, 2557)

นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า การเติมพรีไบโอติกจากเปลือกทุเรียนร่วมกับแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักในอาหารเลี้ยงปลาตะเพียนขาวช่วยส่งเสริมให้น้ำหนักของปลาเพิ่มสูงขึ้น (หยาดรุ้ง และคณะ, 2565) ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของโปรไบโอติกและพรีไบโอติก เรียกว่า ผลิตภัณฑ์ซิมไบโอติก (Symbiotic)

คีเฟอร์ (Kefir) เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีการบริโภคยาวนานในประเทศโซเชียนิสต์ และยังคงได้รับความนิยมจนถึงปัจจุบัน คีเฟอร์มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ประกอบด้วย แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) แบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ (The Food and Drug Administration; FDA, 2013) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า คีเฟอร์มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย และฤทธิ์ดังกล่าวเกิดจากจุลินทรีย์องค์ประกอบของคีเฟอร์สร้างขึ้น เช่น คีเฟอร์รัน (Kefiran) แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin) และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ (Cleveland et al., 2001; Da Silva Malheiros et al., 2010) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของคีเฟอร์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาการศึกษาคีเฟอร์ในประเทศเกาหลี โดยการนำคีเฟอร์เกรนที่มีความแตกต่างกัน 4 ชนิด มาหมักกับนมวัวและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า คีเฟอร์ทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *E. coli* บางชนิด สามารถยับยั้ง *S. aureus* (Kim et al., 2016) และเมื่อนำคีเฟอร์เกรนมาหมักกับนมแกะ นมวัว และนมแพะ นำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า คีเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* (Azizkhani et al., 2020) นอกจากนี้คีเฟอร์จากนมข้าวกล้องงอกยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ จากการทดสอบกับเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *S. Typhimurium* *S. aureus* *B. cereus* และ *E. coli* (ไพรินทร์ และคณะ, 2562) นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลือง และนมงาคั่วมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว (มนตรา และคณะ, 2560)

ในการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกล้วยน้ำว้าดิบ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 เป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงสุดในการเป็นโปรไบโอติก และยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ได้ดี (นนทพร และคณะ, 2563) เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพของคีเฟอร์ให้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ต่อการเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้มาจากการมหาวิทยาลัยการแพทย์ มี 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus* DMST 5040 *Escherichia coli* DMST 4212 *Salmonella Typhimurium* DMST 562 และ MRSA DMST 20651

2. แบคทีเรียกรดแลคติก NR27

แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ได้รับการอนุเคราะห์จาก นนทพร รัตนจักร ซึ่งแยกมาจากกล้วยน้ำว้าดิบ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (นนทพร และคณะ, 2563)

3. หัวเชื้อคีเฟอร์

หัวเชื้อคีเฟอร์สายพันธุ์ผสม มาจาก My mom made (<https://shp.ee/gyzdcg4>)

4. การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์

นำหัวเชื้อคีเฟอร์ (Kefir grains) สายพันธุ์ผสม 5% มาผสมให้เข้ากับนมพาสเจอร์ไรส์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแยกหัวเชื้อคีเฟอร์ และนำคีเฟอร์ที่ได้จากการกรองไปใช้ในการทดสอบ

5. การเตรียมหัวเชื้อคีเฟอร์ผสมเชื้อ NR27

นำหัวเชื้อคีเฟอร์ (Kefir grains) สายพันธุ์ผสม 5% มาผสมให้เข้ากับนมพาสเจอร์ไรส์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อ NR 27 ให้ได้เท่ากับความเข้มข้นมาตรฐาน McFarland No.1 และ 2 (3×10^8 CFU/ml) และ (6×10^8 CFU/ml) ตามลำดับ ใช้ปิเปตดูดแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ผสมลงในนมที่มีหัวเชื้อคีเฟอร์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแยกหัวเชื้อคีเฟอร์ และนำคีเฟอร์ที่ได้จากการกรองไปใช้ในการทดสอบ

6. การเตรียมนมพาสเจอร์ไรส์ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27

นำนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ให้ได้เท่ากับความเข้มข้นมาตรฐาน McFarland No. 2 (6×10^8 CFU/ml) เนื่องจากตัวอย่างนี้ใช้เป็นการยืนยันผลการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 จึงใช้ความเข้มข้นเดียวที่เท่ากับความเข้มข้นสูงสุดที่ผสมในคีเฟอร์ จากนั้นใช้ปิเปตดูดแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ผสมนมพาสเจอร์ไรส์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างมาใช้ในการทดสอบต่อไป

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอ้างอิงจากวิธีของ มนตรา และคณะ (2560) ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *B. cereus* *E. coli* *S. Typhimurium* และ MRSA ในอาหารแข็ง Tryptic soy agar; TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อทดสอบให้ได้เท่ากับความเข้มข้นมาตรฐาน McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) ทำการผสมเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Tryptic soy agar จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่ผ่านการหมักด้วย

คีเฟอร์ลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร เป็นตัวอย่างควบคุมผลบวก (Positive control) และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุมผลลบ (Negative control) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

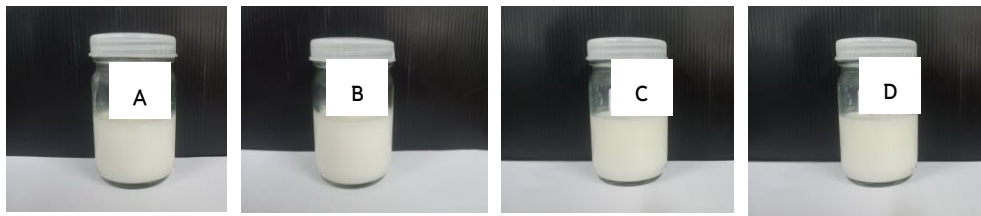
8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และ Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาลักษณะตัวอย่าง

เมื่อนำคีเฟอร์ที่ไม่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 คีเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (3×10^8 CFU/ml และ 6×10^8 CFU/ml) และนมที่มีส่วนผสมของเชื้อ NR27 (6×10^8 CFU/ml) หมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า คีเฟอร์ที่ไม่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 และคีเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 เกิดเคิร์ด (Curd) และสังเกตเริ่มเห็นน้ำเวย์แทรก ในส่วนของนมที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่เกิดเคิร์ด ดังภาพที่ 1 แต่เนื่องจากวัตถุดิบเป็นนมมีสีขาวขุ่น ลักษณะปรากฏในรูปจึงไม่สามารถแยกได้ระหว่างเกิดและไม่เกิดเคิร์ด แต่เมื่อเอียงดูจึงทราบลักษณะดังกล่าว ในส่วนกลั่นของนมที่ผ่านการหมักด้วยคีเฟอร์เกรนเพียงอย่างเดียว และหมักด้วยคีเฟอร์เกรนร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ทั้ง 2 ความเข้มข้น กลิ่นที่ได้เป็นกลิ่นของคีเฟอร์ปกติไม่แตกต่างกัน แต่นมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 เพียงอย่างเดียว มีเพียงกลิ่นกรดอ่อนๆ แตกต่างจากกลิ่นของคีเฟอร์



ภาพที่ 1 ลักษณะของตัวอย่าง A) คีเฟอร์ไม่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 B) คีเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (3×10^8 CFU/ml) C) คีเฟอร์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10^8 CFU/ml) และ D) นมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10^8 CFU/ml)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการทดสอบยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* *B. cereus* *S. Typhimurium* และ MRSA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ที่หมักกับนมสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งหมดเช่นเดียวกับคีเฟอร์ แต่ผลของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่าคีเฟอร์ที่ไม่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ยกเว้นยับยั้ง MRSA ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคีเฟอร์ยับยั้ง MRSA มีโซนยับยั้งเท่ากับ 9.33 ± 2.08 เซนติเมตร ขณะที่นมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10^8 CFU/ml) มีโซนยับยั้งเท่ากับ 7.33 ± 0.58 เซนติเมตร จากผลการนำแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ความเข้มข้นของเชื้อ 3×10^8 CFU/ml และ 6×10^8 CFU/ml มาหมักผสมกับหัวเชื้อคีเฟอร์ และทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียกับคีเฟอร์ พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยยับยั้ง *E. coli* เท่ากับ 8.33 ± 0.58 8.33 ± 0.58 และ 9.33 ± 1.15 เซนติเมตร ตามลำดับ ยับยั้ง *B. cereus* เท่ากับ 10.67 ± 0.58 9.67 ± 0.58 และ 10.00 ± 0.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ยับยั้ง *S. Typhimurium* เท่ากับ 11.33 ± 0.58 10.67 ± 1.54 และ 11.67 ± 0.58 เซนติเมตร ตามลำดับ ยับยั้ง MRSA เท่ากับ 7.33 ± 0.58 9.33 ± 0.58 และ 9.33 ± 2.08 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับคีเฟอร์

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion

ตัวอย่างดีเฟนส์	ค่าเฉลี่ยโซนยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	MRSA
ดีเฟนส์	9.33±1.15 ^b	10.00±0.00 ^b	11.67±0.58 ^b	9.33±2.08 ^b
นมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10 ⁸ CFU/ml)	7.33±0.58 ^c	8.00±1.00 ^c	8.33±0.58 ^c	7.33±0.58 ^b
ดีเฟนส์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (6×10 ⁸ CFU/ml)	8.33±0.58 ^{bc}	9.67±0.58 ^b	10.67±1.54 ^{bc}	9.33±0.58 ^b
ดีเฟนส์ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 (3×10 ⁸ CFU/ml)	8.33±0.58 ^{bc}	10.67±0.58 ^b	11.33±0.58 ^b	7.33±0.58 ^b
Ampicillin (100 µg/ml)	24.33±0.58 ^a	20.33±0.58 ^a	38.33±3.05 ^a	39.67±5.51 ^a

หมายเหตุ a b c d หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับตามแนวดังเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

อภิปรายผล

จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli* *B. cereus* *S. Typhimurium* และ *S. aureus* สอดคล้องกับงานวิจัยของ นนทพร และคณะ (2563) ซึ่งเป็นที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติก จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากเนื้อหมัก 4 ชนิด ได้แก่ หมู หมู หนมวัว ไส้กรอกหมู และไส้กรอกวัว มีฤทธิ์ในยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* (จินตนา, 2564) ในงานวิจัยของ เทพอัปสร และวรรณช (2557) ได้ทำการการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกจากอาหารหมักดองและทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดี ทั้งนี้เป็นผลมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น สารแบคเทอริโอซินและกรดแลคติก (Molecules,

2017) แบคทีเรียโอซินที่มีการผลิตขึ้นในแบคทีเรียกรดแลคติกตามที่มีรายงาน เช่น เมอร์ซาดิน (Mersacidin) ไนซิน (Nisin) สเตรปติน (Streptin) สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการถนอมอาหารในโรงงานอุตสาหกรรม (อรอนงค์, 2550) ดังนั้นจากผลที่พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียโอซินดังกล่าวร่วมกับกรดแลคติกที่เชื้อผลิตขึ้น แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัย พบว่า กรดแลคติก ที่ pH เท่ากับ 3.5 ยับยั้งแบคทีเรียได้บางชนิดเท่านั้น เช่น *B. cereus* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* (Kim et al., 2016) จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 มาผสมในนมแล้วทำการหมักกับหัวเชื้อคีเฟอร์ (Kefir grain) เพื่อเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียให้กับคีเฟอร์ ผลที่ได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียให้สูงขึ้นได้ แม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 มีความสามารถยับยั้งเชื้อทุกชนิดที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งยืนยันผลการยับยั้งจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของนมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ถือเป็นชุดควบคุมและแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ยับยั้งเชื้อที่ใช้ทดสอบได้จริง เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 และนมหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 จะเห็นได้ว่าคีเฟอร์มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่า อาจเป็นไปได้ว่าการนำแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 หมักกับนมเชื้ออาจอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างองค์ประกอบที่ส่งผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ถูกแยกได้จากกล้วยดิบหมัก เมื่อนำมาหมักกับนมอาจทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดีในแหล่งอาหารที่เป็นนม ซึ่งไขมันในนมที่มากเกินไป มีผลต่อกระบวนการหมักและการเจริญได้ โดยเกิดจากการไขมันไม่สมดุลมีผลต่อเซลล์แบคทีเรียบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Kozloski, 2002) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่เจริญยาก (Fastidious microorganisms) ส่วนใหญ่ขาดความสามารถในการสังเคราะห์สารอาหารโดยเฉพาะกรดอะมิโนและเปปไทด์ต้องอาศัยจากแหล่งภายนอก (Isoleucine Leucine Valine Histidine และ Methionine) ซึ่งในนมประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่คือ เคซีน แบคทีเรียจึงจำเป็นต้องมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนมา่อยเคซีน เพื่อให้ได้กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญ (Simova, 2006) ดังเช่นรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า *Leuconostoc* มี Peptidase activity ที่ต่ำ ทำให้สามารถผลิตกรดอะมิโนได้ต่ำเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* และ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Prosekov, 2013) นอกจากนี้อาจเกิดจากผลของปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มเชื้อในคีเฟอร์ร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ซึ่งอาจเป็นในรูปแบบของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ (Antagonistic microorganisms) ต่อกัน หรือเป็นในรูปแบบของภาวะอิงอาศัยหรือเกื้อกูล (Commensalism) แต่ไม่ใช่ภาวะที่ส่งเสริมกัน (Synergism) ในหัวเชื้อคีเฟอร์

มีองค์ประกอบของจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากกระบวนการหมัก นำไปสู่การยับยั้งแบคทีเรียได้ มีรายงานว่า แบคทีเรียโอซินที่มีชื่อว่าโนซิน (Nisin) ผลิตจาก *Lactobacillus lactis* ไปมีผลยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกเช่นเดียวกันได้ (Lindgren & Dobrogosz, 1990) และเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในงานต่อไป ควรมีการติดตามถึงสารเมแทบอลิต์หรือสารออกฤทธิ์ที่เชื่อผลผลิตขึ้นในแต่ละตัวอย่างเพื่อเป็นการยืนยันผลกับฤทธิ์ที่เกิดขึ้น เมื่อพิจารณาถึงผลของลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์ที่ได้จากการเติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 พบว่า การเติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่ส่งผลต่อการเกิดเคิร์ด เวย์ และลักษณะทางกายภาพอื่นๆ ของคีเฟอร์ที่ได้จากการสังเกตได้ด้วยตาเปล่า การตกตะกอนและรสชาติ และการเติมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่ได้ช่วยลดระยะเวลาในการหมัก พิจารณาจากระยะเวลาในการเกิดเคิร์ด อย่างไรก็ตามการที่แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพส่งผลดีต่อผลิตภัณฑ์ในแง่ของความคงตัวที่ดี แต่จากผลที่ไม่เสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์ อาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ ได้ เช่น ฤทธิ์ในการลดระดับคอเลสเตอรอล เป็นต้น ซึ่งควรศึกษาต่อไปในอนาคต แม้แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ไม่ส่งเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย แต่ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถเป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากคีเฟอร์ที่เสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกทำให้เพิ่มชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และไม่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ แต่ควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ต่อไป และพิจารณาถึงปริมาณเชื้อที่ใช้ และสภาวะที่เหมาะสมในการแต่ละการศึกษาในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 6×10^8 CFU/ml มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli* *B. cereus* *S. Typhimurium* และ MRSA มีค่าโซนยับยั้งเท่ากับ 7.33 ± 0.58 8.00 ± 1.00 8.33 ± 0.58 และ 7.33 ± 0.58 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียให้กับคีเฟอร์ได้เนื่องจากคีเฟอร์ และคีเฟอร์หมักผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 3×10^8 CFU/ml และ 6×10^8 CFU/ml ยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต NR27 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 6×10^8 CFU/ml เป็นระดับความเข้มข้นที่แนะนำให้มียูอยู่ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และมีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพได้หลายด้าน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหลักสูตรสาขาวิชาจุลชีววิทยาและศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสถานที่ในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- จินตนา ตะยวน, วรณา ช่างพล, ธิดารัตน์ มณีนิพ, และเสาวคนธ์ ต่วนเทศ. (2564). คุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. **PBRU SCIENCE JOURNAL**, 8(2), 62–72.
- เทพอัปสร แสนสุข, และวรณัฐ ภักดีเดชาเกียรติ. (2557). การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร. **วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์**, 9(2), 40–45.
- นนทพร รัตนจักร, ชัยวินทร์ นวลศรี, มนตรา ศรีษะแย้ม, สิทธิชัย อุดก่า, และอรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์. (2563). การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากกล้วยน้ำว้าดิบในเขตจังหวัดพิษณุโลก. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 22(2), 50–57.
- ไพรินทร์ หละวัน, อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์, และมนตรา ศรีษะแย้ม. (2562). การศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์จากนมข้าวกล้องงอก. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ)**, 50(1), 483 – 488.
- มนตรา ศรีษะแย้ม, เจนจิรา กลิ่นรัตน์, และอรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์. (2561). **ฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงามดำ**. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.
- มาลัย ทวีโชติภักดิ์. (2553). โปรไบโอติกและการติดเชื้อในทางเดินอาหาร. **วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)**, 2(4), 25–38.
- รุสมัน ตะแซสาเมาะ. (2557). **การสกัดและการทำบริสุทธิ์โพลิโอแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรและการประเมินคุณสมบัติการเป็นสารโปรไบโอติก**. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต). สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมใจ ศิริโชค, ประวัติ อังประภาพรชัยจินาญ, โพธิเวชกุล, และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2007). การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.**, 23(2), 92–114.
- หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์, ปญญา วัฒนะชัย, และสรารัฐ แสงสว่างโชติ. (2565). การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักพื้นบ้านเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำที่ผสมโยยอาหารจากเปลือกทุเรียน. **PSRU Journal of Science and Technology**, 7(2), 57–72.
- อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2550). แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.**, 23(9), 145–160.

- Azizkhan, M., Saris, E.P.J., & Baniasadi, M. (2020). An in-vitro assessment of antifungal and antibacterial activity of cow, camel, ewe, and goat milk kefir and probiotic yogurt. **Journal of Food Measurement and Characterization**. Doi.org/10.1007/s11694-020-00645-4
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., & Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, **71**, 1–20.
- Da Silva Malheiros, P., Daroit, D.J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends in Food Science & Technology**, **21**, 284–292.
- Kim, H.D., Jeong, D., Kim, H., Kang, B.I., Chon, W.J., Song, Y.K., & Seo, H.K. (2016). Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. **Korean J. Food Sci. An**, **36**(6), 787–790.
- Kozloski, G.V. (2002). **Biochemistry of ruminants**. Santa Maria: UFSM.
- Lindgren, S.E., & Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews**, **87**, 149–164.
- Mokoena, M.P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, **22**(8), 1255–1267.
- Prosekov, A., Babich, O., Asukhikh, S., Neskova, S., & Dushlyuk, L. (2013). The proteolytic activity research of the lactic acid microorganisms of different taxonomic groups. **World Applied Sciences Journal**, **23**(10), 1284–1290.
- Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z., & Spasov, Z. (2006). Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. **Int. J. Food Microbiol**, **107**(2), 112–123.
- The Food and Drug Administration; FDA. (2013). **Fermented milk**. Retrieved December, 21, 2018, from <https://faolex.fao.org/docs/pdf/tha159846.pdf>