



วารสารอาหารและยา  
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (2567): มกราคม - เมษายน  
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL  
Vol. 31 No. 1 (2024): January - April



## การใช้เทคโนโลยีนาโนพอร์เพื่อบ่งชี้เอกลักษณ์สายพันธุ์และประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติก

วรรัตน์ เครือสุวรรณ<sup>1</sup> นิภา โชคสัจจะวาท<sup>2</sup> จารุวรรณ สิทธิพล<sup>3</sup> ปันณธร ทวีเทพไทกุล<sup>3</sup> ธิดาทิพย์ วงศ์สุวรรณ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร <sup>2</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี <sup>3</sup>ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี

**ที่อยู่ติดต่อ:** วรรัตน์ เครือสุวรรณ ห้องปฏิบัติการ Siriraj Long-read Lab (Si-LoL) หน่วยชีวสารสนเทศทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700 worarat.kru@mahidol.edu

## Utilizing of Nanopore Technology for Species Identification and Safety Evaluation of Probiotics

Worarat Kruasuwan<sup>1</sup>, Nipa Chokesajjawatee<sup>2</sup>, Jaruwan Sitdhipol<sup>3</sup>, Punnathorn Thaveetheptaikul<sup>3</sup>, Thidathip Wongsurawat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok. <sup>2</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Pathum Thani.

<sup>3</sup>Biodiversity Research Centre, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathum Thani, Thailand

**Contact address:** Worarat Kruasuwan, Siriraj Long-read Lab (Si-LoL), Division of Medical Bioinformatics, Research Department, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10700, Thailand, worarat.kru@mahidol.edu

**Received:** 6 October 2023, **Revised:** 13 March 2024, **Accepted:** 14 March 2024

การใช้ประโยชน์จุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์พบมีอุปสงค์ของผู้บริโภคโดยเฉพาะตลาดโพรไบโอติกในเอเชียเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้ผู้ผลิต หรือผู้ประกอบการมีการคิดค้น วิจัย และศึกษาจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ ๆ มากขึ้นเพื่อรองรับความต้องการของผู้บริโภค ทั้งนี้การพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อใช้เป็นอาหารนั้น ต้องมั่นใจว่าจุลินทรีย์นั้นมีความปลอดภัย และได้รับการขึ้นทะเบียนอนุญาต

ให้ใช้อย่างถูกต้องโดยหน่วยงานที่กำกับดูแล สำหรับประเทศไทยมีการกำหนดรายชื่อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่อยู่ในรายการที่ได้รับอนุญาต หรือผ่านการประเมินความปลอดภัยและคุณสมบัติโพรไบโอติกแล้วตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข การที่จะใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกอื่น ๆ จึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และประเมินความปลอดภัยเพิ่มเติม<sup>1</sup>

ปัญหาหนึ่งของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่พบได้ค่อนข้างบ่อยคือ ข้อมูลบนฉลากผลิตภัณฑ์

โพรไบโอติกที่ไม่ตรงกับข้อเท็จจริงของตัวผลิตภัณฑ์ ความผิดพลาดที่สำคัญคือการระบุชนิด (species) ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ไม่ถูกต้อง<sup>2-4</sup> ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการเลือกใช้วิธีการ ฐานข้อมูล และ/หรือ เทคนิคในการวิเคราะห์ที่ล้าสมัย อาทิ การตรวจยีน เป้าหมายเพียง 1–2 ยีน เพื่อใช้ระบุชนิดของ จุลินทรีย์ เป็นต้น ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านการหาลำดับพันธุกรรมมีการพัฒนามากขึ้นทั้งในส่วนของเครื่องมือ วิธีการตรวจ รวมถึงฐานข้อมูลที่ครอบคลุมมากขึ้น ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์มีความรวดเร็ว แม่นยำ และถูกต้องมากขึ้น เช่น เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาวนาโนพอร์ ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมแบบสายยาว ทำให้เพิ่มโอกาสได้ข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ ลดการขาดแหว่งของยีนหรือโครงสร้างของยีนที่สำคัญต่าง ๆ<sup>5</sup> ด้วยข้อได้เปรียบดังกล่าวเป็นผลให้หลาย ๆ ประเทศกำหนดให้ใช้ข้อมูลลำดับจีโนมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีด้านการหาลำดับพันธุกรรมสมัยใหม่ในการระบุสายพันธุ์ และประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมากขึ้น<sup>6</sup>

ทั้งนี้เพื่อส่งเสริมให้มีการใช้เทคโนโลยีด้านการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาวนาโนพอร์ในการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมากขึ้น บทความนี้มีวัตถุประสงค์ให้ผู้อ่านได้เรียนรู้และเข้าใจถึงจุลินทรีย์โพรไบโอติก ทิศทางแนวโน้มตลาดและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในประเทศไทย รวมถึงแนวทางการใช้เทคโนโลยีนาโนพอร์ร่วมกับวิธีการทางชีวสารสนเทศในการบ่งชี้เอกลักษณ์สายพันธุ์และประเมินความปลอดภัย

จุลินทรีย์โพรไบโอติก เพื่อเป็นข้อมูลให้ผู้เกี่ยวข้องทั้งผู้ประกอบการในการเตรียมข้อมูลเพื่อขออนุญาตใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการปรับปรุงแก้ไขข้อกำหนดให้เท่าทันการเกิดขึ้นของเทคโนโลยีและยกระดับมาตรการควบคุมความปลอดภัยของอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก

## จุลินทรีย์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) ตามคำนิยามขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (The Food and Agriculture Organization: FAO) และองค์การอนามัยโลก (The World Health Organization: WHO) ปี ค.ศ. 2012 หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งถ้ามีจำนวนมากพอจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุขภาพได้<sup>7</sup> และตามคำนิยามของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ของประเทศไทย หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งใช้ในอาหารและจะเกิดผลต่อสุขภาพก็ต่อเมื่อผู้บริโภคได้รับในปริมาณที่เพียงพอ<sup>8</sup> โดยจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโพรไบโอติกพบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียผู้ผลิตกรดแลคติกหรือแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria)<sup>9</sup> บิฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacterium) และยีสต์หรือในบางกรณีอาจเป็นแบคทีเรียในสกุลบาซิลลัส (Bacillus) จุลินทรีย์โพรไบโอติกพบมีการใช้กันทั่วโลกด้านการดูแลสุขภาพของมนุษย์และปศุสัตว์ ในรูปของอาหาร เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือใช้ในการรักษาโรค เป็นต้น รายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีคุณสมบัติ

ช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด<sup>10</sup> การป้องกันโรคสำไส้อักเสบเรื้อรัง การป้องกันโรคในช่องปาก และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน<sup>11-12</sup> ส่งผลให้ผู้บริโภคจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีความสามารถในการต้านทานหรือลดความรุนแรงของโรคได้ดีขึ้น จากคุณสมบัติข้างต้นเป็นผลให้ผู้บริโภคสนใจผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและมีการใช้จุลินทรีย์ โพรไบโอติกเป็นอาหารเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

## ทิศทางแนวโน้มตลาดและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสูงอย่างยิ่งในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หรือเป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร รายงานปี ค.ศ. 2022 ของ Grand View Research ระบุว่า ตลาดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีมูลค่าประมาณ 77.12 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยคาดว่าจะมีอัตราการเติบโตที่ 14 เปอร์เซ็นต์ภายในช่วงปี ค.ศ. 2023-2030<sup>13</sup> และในปีเดียวกันนี้ Gut Health Test and Nutrition Market รายงานถึงความต้องการของผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพว่ามีปริมาณเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในตลาดในแถบเอเชียแปซิฟิก มีการคาดการณ์ความต้องการพบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้น 27.2 เปอร์เซ็นต์ ในปี ค.ศ. 2030<sup>14</sup> สำหรับประเทศไทย อัตราการเจริญเติบโตของตลาดโพรไบโอติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 12.2 เปอร์เซ็นต์ ในปี ค.ศ. 2021-2026<sup>15</sup> นั้นแสดงให้เห็นถึงอุปสงค์ของตลาดที่พร้อมซื้อ ซึ่งผู้ประกอบการในปัจจุบัน

ยังผลิตสินค้ามารองรับความต้องการนี้ไม่เพียงพอ ประกอบกับแผนยุทธศาสตร์ของกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ในส่วนของ Food Innopolis และยุทธศาสตร์การพัฒนาอุตสาหกรรมไทย 4.0 ระยะ 20 ปี (ค.ศ. 2017-2036) ของกระทรวงอุตสาหกรรม กำหนดให้อุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมเป้าหมายที่เป็นกลไกขับเคลื่อนเศรษฐกิจเพื่ออนาคต เป็นผลทำให้ตลาดโพรไบโอติกในประเทศไทยยังมีความน่าสนใจต่อไปในอนาคต

จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ครอบคลุมอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ หรือพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายประเภท รวมถึงอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ด้วย การบริโภคจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะได้รับผ่านทางอาหาร เช่น นมเปรี้ยว เป็นต้น หรือบริโภคโดยตรงในรูปแบบอาหารเสริม ไม่ว่าจะเป็นแบบผงบรรจุซองหรือในรูปแบบแคปซูล และปัจจุบันมีการจำหน่ายจุลินทรีย์โพรไบโอติกในหลากหลายรูปแบบ ทั้งแบบอาหารเสริมแบบสายพันธุ์เดียวหรือผสมหลายสายพันธุ์ หรือผสมในอาหารและเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ เพื่อเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค และโอกาสทางธุรกิจของผู้ผลิตอาหาร อย่างไรก็ตาม ความเข้าใจที่คลาดเคลื่อนเรื่องคุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ทำให้ผู้บริโภคมักจะเข้าใจว่าอาหารหมักบางชนิดที่ยังคงมีจุลินทรีย์มีชีวิตอยู่นั้นเป็นอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก อาทิ อาหารหรือเครื่องดื่มบางชนิดที่หมักโดยวิธีการทางธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นกิมจิหรือซาวหมักที่เป็นการหมักที่เกิดขึ้น

โดยจุลินทรีย์ที่มีตามธรรมชาติ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านั้นอาจมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกหรือไม่ก็ได้ จนกว่าจะได้พิสูจน์ทราบแล้วว่าจุลินทรีย์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ในอาหารเหล่านั้นมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก การเรียกอาหารเหล่านั้นว่าเป็นอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงยังไม่ถูกต้องนัก ตัวอย่างที่ค่อนข้างชัดเจนคือ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตซึ่งเกิดจากการหมักนมด้วยจุลินทรีย์ต้นเชื้อสองชนิดคือ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* โดยผู้บริโภคส่วนใหญ่มักเข้าใจว่าเป็นอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก แต่ในความเป็นจริงแล้วจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ส่วนใหญ่มีความสามารถในการอยู่รอดในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้น้อย เช่น ตรวจพบปริมาณของ *S. thermophilus* เท่ากับ  $6.3 \times 10^4$  ซีเอฟยู และ  $7.2 \times 10^4$  ซีเอฟยูสำหรับ *L. delbrueckii* ต่อกรัมของอุจจาระในการผู้อาสาสมัครช่วงอายุ 25 ถึง 45 ปี ที่ได้รับการกินโยเกิร์ตเป็นระยะเวลา 12 วัน อย่างต่อเนื่อง<sup>16</sup> ดังนั้นในกรณีโยเกิร์ตหรืออาหารหมักอื่น ๆ ที่ต้องการโฆษณาว่ามีจุลินทรีย์โพรไบโอติก จึงต้องมีการเติมจุลินทรีย์ที่ได้รับการพิสูจน์ว่ามีคุณสมบัติโพรไบโอติกเพิ่มเติมเข้าไป โดยส่วนมากจะเป็นกลุ่มบิฟิโดแบคทีเรีย เช่น *Bifidobacterium bifidum* *Bifidobacterium breve* *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium animalis* และอาจมีการใช้ร่วมกับแบคทีเรียผู้ผลิตกรดแลคติกอื่น ๆ โดยโพรไบโอติกที่เป็นที่นิยมเช่น *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 เป็นกลุ่มที่มีความสามารถมีชีวิตรอดและคงอยู่ในระบบทางเดินอาหารมนุษย์ได้ดี

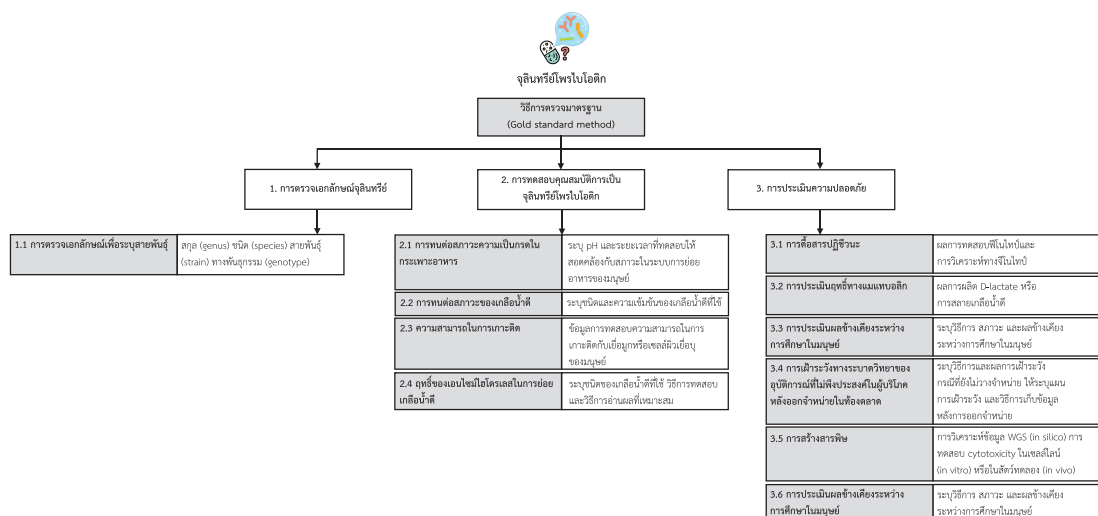
และไม่ทำให้กลืนรสหรือเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนเมื่อใช้ในปริมาณมาก<sup>17</sup>

โดยทั่วไปจุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติที่จำเป็นสองข้อกล่าวคือ 1) มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือแร่ที่ดี ทำให้สามารถมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารได้ และ 2) สามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผิวในลำไส้ (human epithelial cells) ทำให้คงอยู่ในร่างกายได้เป็นระยะเวลาที่เพียงพอที่จะส่งผลประโยชน์ โดยตั้งอยู่บนพื้นฐานว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นต้องมีความปลอดภัยและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ<sup>18-19</sup> แม้ว่าคุณสมบัติด้านความปลอดภัยเป็นคุณสมบัติโดยรวมของจุลินทรีย์นั้น ๆ เช่น กลุ่มแบคทีเรียผู้ผลิตกรดแลคติกที่พบทั่วไปในธรรมชาติ เป็นที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัย และบางชนิดได้รับการยอมรับแล้วว่าเมื่อได้รับในปริมาณที่มากพอสามารถช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้โดยไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ในระดับชนิดหรือสายพันธุ์ แต่ก็ยังมีคุณสมบัติเฉพาะตัวบางอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งแม้จะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่จัดว่ามีความปลอดภัยก็อาจมีบางสายพันธุ์ที่มียีนไม่พึงประสงค์ เช่น ยีนดื้อยาที่ได้รับมาจากภายนอกและอาจส่งต่อให้แก่แบคทีเรียก่อโรคอื่น ๆ ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคต่อไปได้ เพื่อเป็นการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกไปใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพอย่างยั่งยืน การตรวจสอบความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงเป็นหัวใจสำคัญในการพัฒนาและขับเคลื่อนธุรกิจการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ เพื่อสร้างโอกาสทางธุรกิจให้ผู้ประกอบการ และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค

## การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นอาหารให้กับสิ่งมีชีวิตนั้นต้องได้รับการประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกอ้างอิงตามกฎเกณฑ์สากลในการใช้จุลินทรีย์และ/หรือเกณฑ์อ้างอิงของประเทศนั้น ๆ สำหรับประเทศไทยนั้นมีประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องจำนวน 2 ฉบับ ได้แก่ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ลงวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2554 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 25 ตุลาคม พ.ศ. 2555<sup>1,8</sup> ในการดำเนินการตรวจสอบความปลอดภัยก่อนนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะมนุษย์ได้ ซึ่งนอกจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายชื่ออยู่ในรายการที่ได้รับอนุญาต

หรือผ่านการประเมินความปลอดภัยและคุณสมบัติโพรไบโอติกแล้ว ต้องมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 10<sup>6</sup> ซีเอฟยูต่อกรัมอาหาร ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหาร ซึ่งการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกอื่น นอกเหนือจากที่กำหนดไว้ตามประกาศนี้จำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติเพื่อยื่นขออนุญาตการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกตามหลักการใน Guidelines for The Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for The Evaluation of Probiotics in Food ปี ค.ศ. 2002<sup>20</sup> ซึ่งข้อมูลต้องมีรายละเอียดของข้อมูล ได้แก่ การบ่งชี้เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระดับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์<sup>1,8</sup> (ดังรูปที่ 1)



**รูปที่ 1** วิธีการตรวจมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์เพื่อระบุสายพันธุ์และประเมินความปลอดภัยเพื่อขออนุญาตการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก [ดัดแปลงจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2554;2555<sup>1,8</sup>]

ปัญหาหนึ่งที่พบมากในการตรวจประเมินผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารทั่วโลกคือ การระบุฉลากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ไม่ถูกต้อง (mislabelling) ซึ่งพบรายงานในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่จำหน่ายในประเทศแคนาดา เบลเยียม อิตาลี สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา รวมถึงประเทศไทย เป็นต้น โดยมีสาเหตุจากทั้งการระบุชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ไม่ถูกต้อง มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่น รวมถึงมีปริมาณของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่คงเหลือไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด<sup>21-22</sup> การตรวจเอกลักษณ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกอย่างละเอียดถี่ถ้วนถึงในระดับชนิด หรือสายพันธุ์จึงจัดเป็นหนึ่งในหลักฐานแสดงผลการประเมินความปลอดภัยที่มีความจำเป็นในการใช้เป็นข้อมูลประกอบการยื่นขออนุญาตการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก การตรวจเอกลักษณ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อระบุชนิดจุลินทรีย์นั้นสามารถใช้หลากหลายวิธีการ เช่น การตรวจเอกลักษณ์โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย (PCR amplification) เทคนิค pulsed field gel electrophoresis (PFGE) เทคนิค multilocus sequence typing (MLST) หรือเทคนิค ribotyping ทั้งนี้วิธีการเหล่านี้มีความยุ่งยากซับซ้อน ใช้เวลานานสิ้นเปลืองทรัพยากร และอาจมีประสิทธิภาพต่ำ อีกทั้งไม่สามารถนำข้อมูลการตรวจมาวิเคราะห์ต่อด้านอื่น ๆ ได้<sup>23-25</sup> ด้วยความสามารถของเทคโนโลยี หรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจประเมินที่มีความสามารถในการแยกแยะที่ต่ำ (low-resolution) อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้การระบุฉลากของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้อง

รายงานการวิจัยก่อนหน้าของ Merenstein และคณะ<sup>26</sup> ซึ่งเกิดจากการประชุมกันของ International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) ประจำปี พ.ศ. 2565 ได้ให้ความเห็นถึงปัญหาของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่พบทั่วโลกว่าควรมีแนวทางในการปฏิบัติและผ่านการพิจารณาอย่างเข้มข้นในด้านความปลอดภัย โดยให้ความสำคัญกับ 3 ปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วย 1) สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic strains) 2) การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก (probiotic product quality and safety) และ 3) การบริหารจัดการผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก (probiotic product administration) โดยที่ปัจจัยแรกมีผลด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์คือ สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก กล่าวคือ ควรมีข้อมูลลำดับจีโนมที่สมบูรณ์ เพื่อความแม่นยำในการระบุสายพันธุ์และประเมินความปลอดภัยด้านอื่น ๆ ทั้งนี้ข้อมูลลำดับจีโนมของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นหนึ่งในข้อมูลที่จำเป็นในการตรวจประเมินในหลายประเทศทั่วโลก แต่ขึ้นอยู่กับกฎระเบียบ และชนิดของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างออกไปในแต่ละพื้นที่ ตัวอย่างเช่น ข้อมูลลำดับจีโนมของจุลินทรีย์ไม่ถือเป็นข้อมูลจำเป็น (optional required) สำหรับการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ในประเทศอิตาลี ในขณะที่ประเทศบราซิล จีน แคนาดา และสหภาพยุโรป (EU) จำเป็นต้องใช้ข้อมูลลำดับจีโนมของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการตรวจสอบเพื่อใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับเป็นผลิตภัณฑ์<sup>6</sup> ประกอบกับหน่วยงานตรวจสอบความปลอดภัย

ด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority หรือ EFSA) ได้กำหนดให้ใช้ข้อมูลจีโนม (whole-genome sequence) ในการพิสูจน์ยืนยันเอกลักษณ์จุลินทรีย์สำหรับใช้ในห่วงโซ่อาหารสำหรับแบคทีเรียและยีสต์ แต่ยังอนุญาตสำหรับราเส้นใยให้ใช้ข้อมูลจากยีนที่จำเพาะในการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้<sup>27</sup> ข้อยกเว้นนี้อาจเนื่องจากจีโนมของราเส้นใยมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียและยีสต์ ทำให้การหาข้อมูลทั้งจีโนมยังมีข้อจำกัดเนื่องจากทำได้ยากและราคาแพง

สำหรับประเทศไทยคณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ได้จัดทำข้อกำหนดขั้นต่ำและหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารตามแนวทางการตามข้อกำหนดของ EFSA โดยกำหนดให้ข้อมูลจีโนมเป็นหนึ่งในข้อมูลที่ต้องนำเสนอเพื่อขึ้นทะเบียนโพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ที่อยู่นอกเหนือจากรายชื่อโพรไบโอติกที่กำหนดไว้แล้ว รวมถึงการใช้ข้อมูลจีโนมในการวิเคราะห์เอกลักษณ์จุลินทรีย์ หายีนที่เกี่ยวข้องกับสารพิษและสารไม่พึงประสงค์ และการมีอยู่ของยีนดื้อยา<sup>28</sup> สำหรับหลักฐานผลการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบนอกกาย (in vitro) หรือในสัตว์ (in vivo) และการศึกษาในมนุษย์เพื่อประเมินความปลอดภัย รวมถึงปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก

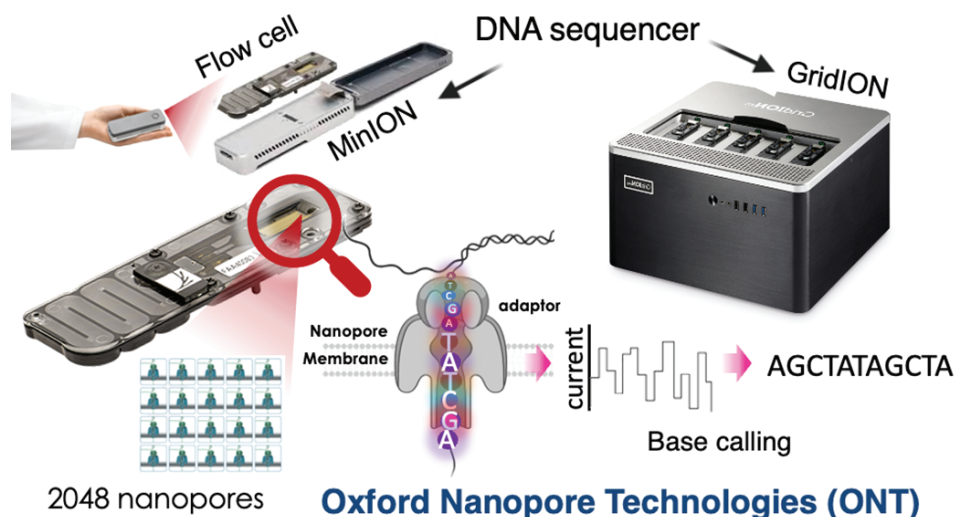
โดยประเมินจากผลการตรวจคุณสมบัติ 6 ประการ ดังแสดงตามรูปที่ 1 ก่อนหน้าการตรวจประเมินดังกล่าวอาศัยการทดสอบในห้องปฏิบัติการตามวิธีการมาตรฐานสากล แต่ทั้งนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการที่ไม่สามารถอธิบายได้ด้วยผลการทดสอบดังกล่าว อาทิ สาเหตุของการดื้อสารปฏิชีวนะในจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่างสายพันธุ์ในสกุล หรือชนิดเดียวกัน เป็นต้น สำหรับการดื้อสารปฏิชีวนะ (ข้อ 3.1 รูปที่ 1) จะอาศัยข้อมูลการตรวจทางด้านฟีโนไทป์ (phenotype) ซึ่งทำให้โดยทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration: MIC) โดยวิธี microdilution method ตามมาตรฐานสากล แต่ทั้งนี้ผลการทดสอบดังกล่าวไม่สามารถใช้อธิบายถึงผลของการเกิดดื้อสารปฏิชีวนะได้ ดังนั้นจึงเป็นเหตุให้ต้องศึกษาเชิงลึกผ่านข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ หรือการตรวจด้านจีโนไทป์ (genotype) ควบคู่กันไปเพื่อใช้อธิบายสาเหตุการเกิด และโอกาสที่จะถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์อื่นที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ นอกจากนี้การได้มาซึ่งข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์นั้นยังใช้ในการประเมินฤทธิ์ทางแม่แบบอลิก (ข้อ 3.2 รูปที่ 1) โดยดูตรวจดูยีนที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการผลิต D-lactate หรือการสลายเกลือน้ำดี หรือการสร้างสารพิษ (ข้อ 3.5 รูปที่ 1) ผ่านการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษและสารไม่พึงประสงค์ เป็นต้น ทั้งนี้ในปัจจุบันเทคโนโลยีการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก สามารถถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนม

ของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว เป็นเหตุให้สามารถนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่มีความจำเพาะกับสายพันธุ์มาใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติเฉพาะตัวของสายพันธุ์ได้อย่างครบถ้วนรอบด้าน ด้วยเหตุนี้ เป็นผลให้คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งได้รับมอบหมายจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ให้เป็นหน่วยประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ไม่อยู่ในรายการจุลินทรีย์โพรไบโอติกของ อย. ส่งเสริมให้มีการใช้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนม ซึ่งไม่เพียงแต่ช่วยยืนยันเอกลักษณ์ ยังสามารถใช้ประกอบการประเมินความปลอดภัยในกระบวนการพิจารณาอนุญาตการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย

## เทคโนโลยีนาโนพอร์กับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติก

เทคโนโลยีนาโนพอร์ (nanopore sequencing technology) เป็นหนึ่งในเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาว (long-read sequencing) เทคโนโลยีนาโนพอร์พัฒนาโดยบริษัท อ็อกซ์ฟอร์ดนาโนพอร์เทคโนโลยี (Oxford Nanopore Technologies: ONT) ประเทศอังกฤษ ซึ่งอาศัยการตรวจวัดหรือทดสอบอัตลักษณ์ของ

สารที่ต้องการ ผ่านการเปลี่ยนแปลงของกระแสไอออนที่ไหลผ่านนาโนพอร์โปรตีนซึ่ง สามารถใช้ถอดรหัสพันธุกรรมของโมเลกุลที่ตรวจวัดได้ (รูปที่ 2) เทคโนโลยีนาโนพอร์เป็นเทคโนโลยีที่ถูกนำมาใช้ในการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาว ซึ่งเป็นข้อดีของเทคโนโลยีนี้ การได้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมสายยาวนั้นทำให้เพิ่มโอกาสได้ข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ ลดการขาดแห่งของยีนหรือโครงสร้างของยีนที่สำคัญต่าง ๆ นอกจากนี้มีขั้นตอนในการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA library) ค่อนข้างง่ายและใช้เวลาสั้นกว่าเทคโนโลยี แบบสายสั้น (short-read) ทำให้ข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียมีความรวดเร็ว และมีความจำเพาะมากกว่าข้อมูลที่อ่านได้ด้วยเทคโนโลยีแบบสายสั้น ส่งผลให้ได้ผลได้อย่างถูกต้อง แม่นยำกว่าในการจำแนกอนุกรมวิธาน ทั้งนี้เพราะเทคโนโลยีแบบสายสั้นนั้นให้ผลการอ่านลำดับพันธุกรรมครอบคลุมบางส่วนของยีน อาทิ ครอบคลุม ~500 คู่เบสของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรีย ในขณะที่เทคโนโลยีนาโนพอร์สามารถอ่านลำดับพันธุกรรมครอบคลุมได้ตลอดทั้งยีน (~1,500 คู่เบส) ซึ่งเมื่อนำลำดับพันธุกรรมมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ และอ้างอิงกับฐานข้อมูลด้านพันธุกรรมที่เก็บรวบรวมข้อมูลจากสิ่งมีชีวิตทั่วโลก (National Center for Biotechnology Information) ทำให้ได้ผลตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์จุลินทรีย์ในระดับชนิดและสายพันธุ์ที่แม่นยำกว่า<sup>29</sup>



รูปที่ 2 เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาวนาโนพอร์ (nanopore sequencing technology) ผ่านการเปลี่ยนแปลงของกระแสไอออนที่ไหลผ่านนาโนพอร์โปรตีน

ปัจจุบันเทคโนโลยีการอ่านลำดับพันธุกรรมแบบสายยาวที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือเทคโนโลยีที่ผลิตโดยบริษัท Pacific Biosciences และบริษัท Oxford Nanopore Technologies โดยที่เทคโนโลยีแพคไบโอ (PacBio) นั้นอาศัยเทคโนโลยีหลักแบบเรียลไทม์โมเลกุลเดี่ยว (SMRT, single molecule real-time) ในการอ่านที่มีความยาวหลายสิบกิโลเบสของลำดับพันธุกรรม การวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมโดยเทคโนโลยีนาโนพอร์ มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาวแพคไบโอประการหนึ่งคือ ข้อมูลที่ได้จากเทคโนโลยีนาโนพอร์จะมีความครบถ้วน สามารถให้ข้อมูลของชิ้นส่วนขนาดเล็กที่อยู่ในจีโนม เช่น พลาสมิดขนาดเล็กได้ ในขณะที่เทคโนโลยีแพคไบโอมีขั้นตอนการกรองคัดเลือกขนาดของดีเอ็นเอที่จะทำการวิเคราะห์ ทำให้โดยทั่วไปจะไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอ

ขนาดเล็กได้ ตัวอย่างเช่น การขาดหายของชุดลำดับพันธุกรรมพลาสมิดขนาด 2.2 กิโลเบส ในต้นกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* BCC9546 จากข้อมูลการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาวโดยใช้เทคโนโลยีแพคไบโอ<sup>30</sup> อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากเทคโนโลยีนาโนพอร์เพียงเทคโนโลยีเดียว ยังมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจากความผิดพลาดในการอ่านค่าลำดับเบสในบางกรณี เช่น ในกรณีที่เบสซ้ำหลาย ๆ เบส ทำให้อ่านค่าได้มากหรือน้อยกว่าความจริง เป็นต้น ทำให้รหัสพันธุกรรมยังไม่ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์<sup>31</sup> ซึ่งสามารถปรับปรุงได้โดยการนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมแบบสายสั้นมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อปรับแต่งข้อมูลจีโนมที่ได้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่ให้ความแม่นยำสูง แต่ได้ความยาวสั้น จึงไม่สามารถใช้เป็นเทคโนโลยีหลักในการประกอบ

จีโนมได้ ซึ่งเทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายสั้นนี้มีหลายเทคโนโลยี เช่น Illumina, Ion Torrent และ BGI เป็นต้น ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลงกว่าการหาลำดับพันธุกรรมแบบสายยาว จึงไม่เป็นการเพิ่มภาระค่าใช้จ่ายมากสำหรับผู้ประกอบการ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังคงมีการพัฒนาเทคโนโลยีนาโนพอร์อย่างต่อเนื่อง โดยคาดว่าในอนาคตความถูกต้องของลำดับพันธุกรรมที่ได้จากเทคโนโลยีนาโนพอร์จะมีการพัฒนาให้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น มีความเป็นไปได้ในการสร้างจีโนมที่มีคุณภาพสูงโดยอาศัยเพียงเทคโนโลยีเดียวตามรายงานของ Sereika และคณะ<sup>5</sup>

ปัญหาของการขึ้นทะเบียนจุลินทรีย์โพรไบโอติกโดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ใหม่ที่อยู่นอกเหนือรายการที่อนุญาตสำหรับผู้พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกในประเทศคือความสามารถในการจัดหาข้อมูลที่จำเป็นในการขึ้นทะเบียน รวมถึงความสามารถของหน่วยบริการวิเคราะห์ทดสอบ เป็นเหตุให้การได้มาของข้อมูลที่สมบูรณ์เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาอนุญาตการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นไปได้ยากมากขึ้น หนึ่งในข้อมูลที่ต้องใช้ประกอบเพื่อขออนุญาตสำหรับจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ไม่อยู่ในรายการของ อย. คือ หลักฐานแสดงผลการประเมินความปลอดภัย ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดข้อกังวลด้านความปลอดภัย เช่น การตรวจหาพิษ สารก่อภูมิแพ้ หรือสารไม่พึงประสงค์ที่อาจพบในจุลินทรีย์ และยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่อาจส่งต่อไปยังเชื้อก่อโรคที่เป็นปัญหา

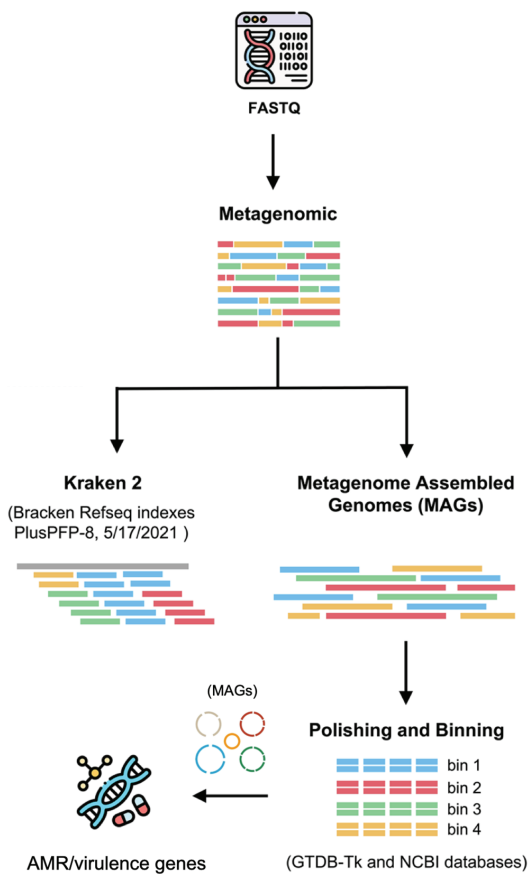
สำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก ตัวอย่างการประยุกต์เทคโนโลยีนาโนพอร์เพื่อตรวจประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้น พบมีรายงานการใช้เทคโนโลยีนาโนพอร์ในการสร้างข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactiplantibacillus plantarum* สายพันธุ์ IS-10506 และประเมินความปลอดภัยผ่านการศึกษาข้อมูลจีโนมไทป์ของยีนดื้อยาปฏิชีวนะและยีนสร้างสารอื่น ๆ ที่เป็นอันตราย (potential harmful) ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ<sup>32</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยการหาข้อมูลจีโนมทั้งหมด (whole genome) ของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจำนวน 7 ผลิตภัณฑ์ ที่วางจำหน่ายในประเทศจีน โดยใช้เทคโนโลยีแบบสายสั้นควบคู่กับเทคโนโลยีนาโนพอร์ ผลการศึกษาพบชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ไม่สอดคล้องกับการติดฉลากผลิตภัณฑ์ และจุลินทรีย์โพรไบโอติกบางสายพันธุ์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์พบยีนสำหรับการผลิตสารเมตาบอไลต์ที่เป็นพิษ (toxin) และยีนของความรุนแรง (virulence) รวมถึงยีนที่แสดงการดื้อยาหลายขนานด้วย ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพได้<sup>33</sup> สำหรับในประเทศไทยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนาโนพอร์สำหรับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติก พบมีการใช้งานมากขึ้นแต่ยังครอบคลุมในกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกบางกลุ่มเท่านั้น ได้แก่ การทำข้อมูลจีโนมของต้นกล้าเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับการผลิตหมั่น<sup>30</sup> หรือจุลินทรีย์โพรไบโอติกสัตว์<sup>34</sup> และใช้ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัย

ของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับสัตว์<sup>22</sup> เป็นต้น เห็นได้ว่าการอ่านลำดับพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยี นาโนพอร์และการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ สามารถให้ข้อมูลเชิงลึกผ่านการวิเคราะห์รหัส พันธุกรรมทั้งในส่วนการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ ได้อย่างแม่นยำในระดับชนิด (ข้อที่ 1 ภาพที่ 1) รวมถึงการประเมินความปลอดภัย (ข้อที่ 3 รูปที่ 1) ด้วย นอกจากนี้ประเด็นด้านความปลอดภัยแล้ว ข้อมูลที่ได้ยังสามารถใช้ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้อง กับคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์หรือน่าสนใจอื่น ๆ เช่นการสร้างวิตามินและโคเอนไซม์ต่าง ๆ หรือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการลดคอเลสเตอรอล เป็นต้น<sup>35</sup>

## ชีวสารสนเทศศาสตร์กับการประเมิน ความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติก

วิธีทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) มีความสำคัญอย่างมากในการวิเคราะห์รหัส พันธุกรรมทั้งจีโนมของจุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยข้อมูลลำดับเบสปริมาณมาก (raw sequences) ที่ได้จากการหาลำดับพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยี นาโนพอร์ จะถูกนำมาคัดกรอง (data filtering) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีคุณภาพดี ซึ่งจะนำไปใช้ใน ขั้นตอนการประกอบจีโนม (genome assembly) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพจีโนมที่ถูกสร้างขึ้น อีกครั้งด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ทางชีวสารสนเทศ หลังจากได้ข้อมูลจีโนมที่มีคุณภาพสูงแล้วจะถูก นำไประบุชนิดจุลินทรีย์ รวมถึงวิเคราะห์อื่น ๆ เพื่อใช้ประกอบการประเมินความปลอดภัยต่อไป

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีแนวโน้ม ที่จะผสมจุลินทรีย์หลากหลายชนิดทั้งในระดับชนิด และสายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยอาจมีมากถึง 7-10 สายพันธุ์ ในผลิตภัณฑ์เดียวกัน ทำให้การ วิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธีการเพาะเลี้ยง หรือการตรวจเฉพาะยีนเป้าหมาย (16S rRNA หรือ ITS) มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการควบคุม ตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ดังนั้น สำหรับผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผสมเหล่านี้ สามารถใช้ เทคโนโลยีการวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบสายยาว ร่วมกับเทคนิคที่เรียกว่าเมตาจีโนม (metagenome) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ ทั้งหมดที่มีในหนึ่งชุมชนเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ ได้<sup>36,37</sup> โดยการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่อยู่ในตัวอย่างและวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรม ทั้งหมดในตัวอย่างโดยตรงโดยไม่มีการเพิ่มปริมาณ (amplification) เป็นผลให้ได้ข้อมูลจุลินทรีย์ ทั้งหมดโดยไม่มี bias จากการเพิ่มปริมาณ ทำให้ ทราบโครงสร้างประชากรที่ถูกต้องมากขึ้น อีกทั้ง การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศผ่านข้อมูลเมตาจีโนม ยังสามารถประกอบข้อมูลจีโนมของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ใน ตัวอย่างนั้น ๆ ทำให้ทราบถึงจำนวนชนิดและ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในตัวอย่างได้ นอกจากนี้ข้อมูลเมตาจีโนมที่ได้จะสามารถใช้ในการ ระบุเอกลักษณ์จุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในผลิตภัณฑ์แล้ว ยังสามารถใช้ในการประเมินความปลอดภัย ผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบในภาพรวม ได้อีกด้วย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การตรวจเอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ผ่านเทคโนโลยีนาโนพอร์และการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ [ดัดแปลงจาก Kruasuwan และคณะ<sup>13]</sup>

ตัวอย่างการนำเทคโนโลยีนาโนพอร์ร่วมกับเทคนิคเมตาจีโนมมาใช้ในการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในรูปแบบผสม ดังแสดงในการศึกษาของ Kruasuwan และคณะ ในปี ค.ศ. 2023 ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์หาลำดับพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับสัตว์ที่วางขายในท้องตลาดในประเทศไทย พบว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

อื่นนอกเหนือจากจุลินทรีย์ชนิดที่ระบุไว้บนฉลากผลิตภัณฑ์ หรือในบางกรณีตรวจไม่พบจุลินทรีย์ชนิดตามที่ระบุบนฉลาก นอกจากนี้ยังตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะอยู่ในจีโนมที่วิเคราะห์ได้ โดยพบยีนดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides [*ant(4)-Ib* และ *aadK*], chloramphenicol (*cat4*), macrolides [*erm(34)*, *erm(D)* และ *mphK*], quinolone (*qnrD1*) และ tetracycline [*tet(L)*] ที่ระดับความเหมือน (identity) 87.3–99.8 เปอร์เซ็นต์ และสัดส่วนความยาวของยีนที่อ้างอิงในฐานข้อมูล (coverage) 98.7–100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงของผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ<sup>22</sup> ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการมีเทคโนโลยีที่เหมาะสมและทันสมัย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้งในระดับการผลิต และการควบคุมดูแลหลังการวางจำหน่าย การใช้เทคโนโลยีนาโนพอร์และวิธีทางชีวสารสนเทศสามารถนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัยทั้งสำหรับตัวจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์บริสุทธิ์ และสำหรับตรวจติดตามคุณภาพและความปลอดภัยผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีการผสมจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ สามารถใช้ในการตรวจสอบควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ทั้งในระดับผู้ผลิต และสำหรับตรวจติดตามหลังการจำหน่ายโดยหน่วยงานที่มีหน้าที่กำกับดูแล เพื่อเป็นการประกันความปลอดภัยของผู้บริโภค เพิ่มความมั่นใจ และเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและความสามารถในการแข่งขันของประเทศได้อีกด้วย

## สถาบันที่ให้ความสนใจร่วมกันพัฒนา วิธีการประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์ โพรไบโอติก

ในประเทศไทย ห้องปฏิบัติการ Siriraj Long-read Lab หรือ Si-LoL ภายใต้หน่วยชีวสารสนเทศทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล นำเทคโนโลยีนาโนพอร์และชีวสารสนเทศมาใช้สำหรับงานทางด้านจุลินทรีย์โพรไบโอติก มีเป้าหมายในการเพิ่มศักยภาพของประเทศไทยให้สามารถวิเคราะห์หารหัสพันธุกรรมของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ยังต่างประเทศ ช่วยลดเวลาการขนส่ง ลดความเสี่ยงของการรั่วไหลของข้อมูล และมีความคุ้มค่าที่ต่ำกว่า ให้ความร่วมมือกับผู้ประกอบการ โดยให้คำปรึกษาเกี่ยวกับวิธีการทดสอบที่เหมาะสม วิธีการแปลผลการวิเคราะห์ หรือข้อสงสัยอื่น ๆ ที่อาจมีความจำเพาะเฉพาะกรณีได้อย่างสะดวกรวดเร็ว

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เป็นหน่วยงานที่รวมผู้เชี่ยวชาญด้านจุลินทรีย์ ได้พัฒนาเทคนิคและกระบวนการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินความปลอดภัยจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีความจำเพาะในระดับสายพันธุ์

ศูนย์นวัตกรรมการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่ออุตสาหกรรม (ICPIM) ภายใต้ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เป็นศูนย์ขับเคลื่อนเทคโนโลยีจุลินทรีย์โพรไบโอติกให้กับ

ผู้ประกอบการแห่งแรกของประเทศ ICPIM ให้บริการสายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติก มากกว่า 50 สายพันธุ์ ให้บริการวิเคราะห์ทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก-โพรไบโอติก เพื่อขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์และการส่งออก บริการทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของจุลินทรีย์ และบริการวิจัยพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหารด้วยระบบการผลิตที่ได้มาตรฐานสากล ซึ่งจัดเป็นศูนย์แห่งการขับเคลื่อนเทคโนโลยีสู่เชิงพาณิชย์อย่างเป็นรูปธรรม

## บทสรุป

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหารมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิต และเพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินความปลอดภัย โดยใช้หลักฐานแสดงผลการประเมินความปลอดภัยที่จะพิสูจน์ทราบได้ทั้งในเรื่องของการบ่งชี้เอกลักษณ์สายพันธุ์ที่แม่นยำและความเสี่ยงด้านความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติก รวมถึงการเฝ้าระวังระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังจากจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภค ดังนั้นจึงควรมีการส่งเสริมให้มีการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ในการอ่านข้อมูลจีโนมควบคู่กันกับวิธีการมาตรฐานในการประเมินความปลอดภัยดังกล่าว ซึ่งเทคโนโลยีนาโนพอร์เป็นเทคโนโลยีการอ่านลำดับพันธุกรรมแบบสายยาว พบว่าช่วยให้ข้อมูลที่ถูกต้อง แม่นยำในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในระดับสกุล ชนิด หรือสายพันธุ์ ใช้เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของการประเมินความปลอดภัยในด้าน

การตรวจยีนดื้อยาปฏิชีวนะ และสารไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ ทั้งในส่วนของจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์และผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่ในรูปแบบผสมได้ ทั้งนี้ความร่วมมือระหว่างภาคอุตสาหกรรมภาครัฐ และผู้เชี่ยวชาญเกี่ยวกับความปลอดภัยในการใช้จุลินทรีย์ ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์จีโนมและชีวสารสนเทศ จะช่วยให้บริษัทผู้ผลิตเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและสามารถแข่งขันได้มากขึ้นในตลาดโพรไบโอติกที่กำลังเติบโตและมีผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล อันจะนำไปสู่การพัฒนาของประเทศในรูปแบบต่าง ๆ ทั้งด้านวิทยาศาสตร์ ด้านเศรษฐกิจชีวภาพ (bioeconomy) และด้านสุขภาพของประชาชนไทย

## เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. (คัดลอกจากราชกิจจานุเบกษา ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 128, ตอนพิเศษ 86ง (ลงวันที่ 3 สิงหาคม 2554).
- Hamilton-Miller JMT, Shah S. Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements. *Int J Food Microbiol* 2002;72:175–76.
- Chen T, Wu Q, Li S, Xiong S, Jiang S, Tan Q, et al. Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China. *J Sci Food Agric* 2014;94:131–38.
- Temmerman R, Pot B, Huys G. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol* 2003;81:1–10.
- Sereika M, Kirkegaard RH, Karst SM, Michaelsen TY, Sørensen EA, Wollenberg RD, et al. Oxford Nanopore R10.4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing. *Nat Methods* 2022;19:823–26.
- Roe AL, Boyte ME, Elkins CA, Goldman VS, Heimbach J, Madden E, et al. Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. *Regul Toxicol Pharmacol* 2022;136:105266. doi:10.1016/j.yrtph. 2022.105266
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:506–14.
- กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. (คัดลอกจากราชกิจจานุเบกษา ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 128, ตอนพิเศษ 86ง (ลงวันที่ 25 ตุลาคม 2555).

9. สิริจินดา ยุ่นฉลาด, สุจิตรา ทนสูงเนิน. การผลิต D-lactic acid โดยแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ. วารสารศูนย์บริการวิชาการ 2552;17(1-4):16–23.
10. Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut CA. Mini-review of human studies on cholesterol-lowering properties of probiotics. *Sci Pharm* 2019;87:26. <https://doi.org/10.3390/scipharm87040026>
11. Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W, Iqbal MW, et al. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Front Microbiol* 2023;14:1216674. doi:10.3389/fmicb. 2023.1216674.
12. Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells* 2023;12:184. doi:10.3390/cells12010184.
13. Grand View Research, Probiotics market size, share & trends analysis report by product (food & beverages, dietary supplements), by ingredient (bacteria, yeast), by distribution channel, by end-use, by region, and segment forecasts, 2023–2030 [Internet]. 2023 [cited 2023 Jan 21]. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>
14. InsightAce Analytic. Human microbiome-based gut health test and nutrition market size, share & trends analysis report by product (D2C gut health test, probiotic supplements, personalized nutrition, microbiome modulators), by end-user, by region, and segment forecasts, 2023–2030 [Internet]. 2023 [cited 2023 May 18]. Available from: <https://www.insightaceanalytic.com/report/global-human-microbiome-based-gut-health-test-and-nutrition-market/1221>
15. Research and Markets. Thailand probiotics market - forecasts from 2021 to 2028. Report No. 5350974 [Internet]. 2023 [cited 2023 Jun 10]. Available from: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5350974/thailand-probiotics-market-forecasts-from-2023>
16. Mater DD, Bretigny L, Firmesse O, Flores MJ, Mogenet A, Bresson JL, et al. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett* 2005;250:185–87.
17. Mättö J, Fondén R, Tolvanen T, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Satokari R, et al. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *Int Dairy J* 2006;16:1174–180.

18. Ganguly NK, Bhattacharya SK, Sesikeran B, Nair GB, Ramakrishna BS, Sachdev HPS, et al. ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian J Med Res* 2011;134:22–25.
19. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:4745–767.
20. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food; 2002 [Internet]. [cited 2023 May 18]. Available from: [https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakusho-kuhinkyoku-Soumuka/000019\\_7343.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakusho-kuhinkyoku-Soumuka/000019_7343.pdf)
21. Fusco V, Fanelli F, Chieffi D. Authenticity of probiotic foods and dietary supplements: A pivotal issue to address. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022;62:6854–871.
22. Kruasuwan W, Jenjaroenpun P, Arigul T, Chokesajjawatee N, Leekitcharoenphon P, Foongladda S, et al. Nanopore sequencing discloses compositional quality of commercial probiotic feed supplements. *Sci Rep* 2003;13:4540. doi:10.1038/s41598-023-31626-4.
23. Briczinski EP, Roberts RF. Technical note: a rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of bifidobacteria. *J Dairy Sci* 2006;89:2424–27.
24. Ramachandran P, Lacher DW, Pfeiler EA, Elkins CA. Development of a tiered multilocus sequence typing scheme for members of the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79:7220–228.
25. Tynkkynen S, Satokari R, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Saxelin M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:3908–914.
26. Merenstein D, Pot B, Leyer G, Ouwehand AC, Preidis GA, Elkins CA, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes* 2023;15:2185034. doi:10.1080/19490976.2023.2185034
27. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen G, Aquilina G, Bastos ML, Christensen H, Dusemund B, et al. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J* 2018; 16:e05206. doi:10.2903/j.efsa.2018.5206.
28. คณะกรรมการประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร. ข้อกำหนดขั้นต่ำ (minimum requirement) และหลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร. [อินเทอร์เน็ต]. 2566 [เข้าถึงเมื่อ 30 มิ.ย. 2566]; เข้าถึงได้จาก: <https://www.biotec.or.th/biosafety/index.php/guideline>

29. Portik DM, Brown CT, Pierce-Ward NT. Evaluation of taxonomic classification and profiling methods for long-read shotgun metagenomic sequencing datasets. *BMC Bioinformatics* 2022;23:541. doi:10.1186/s12859-022-05103-0
30. Chokesajjawatee N, Santiyanont P, Chantarasakha K, Kocharin K, Thammarongtham C, Lertampaiporn S, et al. Safety assessment of a nham starter culture *Lactobacillus plantarum* BCC9546 via whole-genome analysis. *Sci Rep* 2020;10:10241. doi:10.1038/s41598-020-66857-2
31. Weirather JL, de Cesare M, Wang Y, Piazza P, Sebastiano V, Wang XJ, et al. Comprehensive comparison of Pacific Biosciences and Oxford Nanopore Technologies and their applications to transcriptome analysis. *F1000Research* 2017;6:100. doi:10.12688/f1000research.10571.2
32. Umanets A, Surono IS, Venema K. I am better than I look: genome based safety assessment of the probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* IS-10506. *BMC Genomics* 2023;24:518. doi: 10.1186/s12864-023-09495-y
33. Wang Y, Liang Q, Lu B, Shen H, Liu S, Shi Y, et al. Whole-genome analysis of probiotic product isolates reveals the presence of genes related to antimicrobial resistance, virulence factors, and toxic metabolites, posing potential health risks. *BMC Genomics* 2021;22:210. doi: 10.1186/s12864-021-07539-9
34. Dekham K, Jones SM, Jitrakorn S, Charoonnart P, Thadtapong N, Intuy R, et al. Functional and genomic characterization of a novel probiotic *Lactobacillus johnsonii* KD1 against shrimp WSSV infection. *Sci Rep* 2023;13:21610. doi: 10.1038/s41598-023-47897-w
35. Mollova D, Gozmanova M, Apostolova E, Yahubyan G, Iliev I, Baev V. Illuminating the genomic landscape of *Lactiplantibacillus plantarum* PU3-A novel probiotic strain isolated from human breast milk, explored through nanopore sequencing. *Microorganisms* 2023;11:2440. doi: 10.3390/microorganisms11102440
36. Sudjai A, Suriye K, Kruasuwan W, Jenjaroenpun P, Foongladda S, Wongsurawat T, et al. Long-read 16S rRNA amplicon and metagenomic data of swine feed-additive probiotics product. *Microbiol Resour Announc* 2022;11: e0039722. doi:10.1128/mra.00397-22
37. Khongchatee A, Wongsurawat T, Suriye K, Jenjaroenpun P, Leekitcharoenphon P, Kruasuwan W, et al. Full-length 16S rRNA gene amplicon and metagenome taxonomic profiling of beneficial microbes in poultry and swine probiotic product. *Microbiol Resour Announc* 2022;11: e0069022. doi:10.1128/mra.00690-22