

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Propionibacterium arabinosum* ในนมและผลิตภัณฑ์นม

สุนันทา เทพดนตรี, สุภารัตน์ ศรีน้อยเมือง, นพพร แจ่มใส และนันธิดา ดาว พัสกุล
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มุ่งเสริมศักยภาพการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาอาหารของประเทศ ผ่านการพัฒนาและเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์โพรไบโอติก *Propionibacterium arabinosum* (หรือ *Acidipropionibacterium acidipropionici*) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนมหมัก สามารถสังเคราะห์วิตามิน B12 ตลอดจนการผลิตกรดโพรพิโอนิกและสารต้านจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพระบบทางเดินอาหาร เป็นแห่งแรกในประเทศไทย เพื่อรองรับการปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 ว่าด้วยเรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร จึงพัฒนาและทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Propionibacterium arabinosum* ในนมและผลิตภัณฑ์นม ทวนสอบวิธีมาตรฐาน APHA 2015 (Chapter 47) ตามวิธี ISO 16140-3: 2021 ร่วมกับ PCR technique ในรูปแบบ non-validated reference method โดยทวนสอบอาหาร 2 กลุ่ม ได้แก่ ชนิดอาหารที่ไม่ท้าทาย (non-challenging food item) คือ Soft cheeses และอีก 1 กลุ่มอาหารที่ท้าทาย (Challenging food item) ได้แก่ เนยแข็งชนิดแข็งและกึ่งแข็ง (Hard and semi-hard cheeses) ประเมินสมรรถนะของการทวนสอบวิธีด้วยค่า Estimated bias (eBias) และการทดสอบ Inclusivity/Exclusivity ผลการทวนสอบพบค่า Estimated bias (eBias) ระหว่างจำนวนเชื้อในตัวอย่างที่เติมต่อ test portion กับจำนวนเชื้อตั้งต้น (Inoculum) ที่เติมในแต่ละระดับการปนเปื้อนสูง กลาง ต่ำ ของอาหารกลุ่มที่ 1 (0.17, 0.21, 0.21) $\log_{10}$ และกลุ่มที่ 2 (0.01, 0.12, 0.06) $\log_{10}$ สรุปค่า eBias ของแต่ละระดับการปนเปื้อนในทุกกลุ่มอาหารผ่านเกณฑ์ (น้อยกว่า 0.5 $\log_{10}$) การประเมิน Inclusivity/Exclusivity ผลสอดคล้องกับค่าเป้าหมาย ร้อยละ 100 การหาค่าความไม่แน่นอนของการวัดเชิงเทคนิคได้ค่า S_R ของ *Propionibacterium arabinosum* เท่ากับ 0.0531 จากผลการทวนสอบแสดงว่าห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการได้ตามวิธีที่กำหนด และสามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ: *Propionibacterium arabinosum*, *Acidipropionibacterium acidipropionici*, โพรไบโอติก, การทวนสอบวิธีวิเคราะห์, ISO 16140-3

Method Development for Enumeration of *Propionibacterium arabinosum* in Milk and Milk Products

Sunantha Thepdontri, Sudarat Srinoimueang, Nopporn Jamsai, Nunthidadao Phatsakul

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

Abstract

The Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Science, Thailand, developed and implemented the first analytical service in Thailand for the probiotic bacterium *Propionibacterium arabinosum* (syn. *Acidipropionibacterium acidipropionici*) to support compliance with Notification of the Ministry of Public Health (No. 346) B.E 2555(2012) Re: Use of Probiotic Microorganisms in Foods. Method verification for the enumeration of *P. arabinosum* in milk and milk products was performed according to APHA 2015 (Chapter 47) and ISO 16140-3:2021, with PCR used as a non-validated reference method. Two food categories were evaluated: soft cheeses (non-challenging matrix) and hard/semi-hard cheeses (challenging matrix). Method performance was assessed using estimated bias (eBias) and Inclusivity/Exclusivity testing. The eBias values ranged (high medium low) 0.17, 0.21, 0.21 $\log_{10}$ for soft cheeses and 0.01, 0.12, 0.06 $\log_{10}$ for hard/semi-hard cheeses, all meeting the acceptance criterion of $<0.5 \log_{10}$. Inclusivity and Exclusivity results showed 100% agreement with expected outcomes. The Standard Deviation of Intermediate Reproducibility (S_{IR}) was 0.0531. The results demonstrated that the method met the specified performance criteria and is suitable for routine laboratory enumeration of *P. arabinosum* in milk and milk products.

Keywords: *Propionibacterium arabinosum*, *Acidipropionibacterium acidipropionici*, probiotic, method verification, ISO 16140-3

บทนำ

แบคทีเรียกลุ่ม Dairy propionibacteria จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งทั้งในอุตสาหกรรมนมหมักและในฐานะจุลินทรีย์โปรไบโอติกส่งเสริมสุขภาพ [4, 7, 19] *Propionibacterium arabinosum* ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อทางอนุกรมวิธานเป็น *Acidipropionibacterium acidipropionici* เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก รูปท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase และไม่สร้างสปอร์ [1, 7, 15, 18] จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้อากาศไปจนถึงสภาวะที่ทนต่ออากาศ (Anaerobic to aerotolerant) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตประมาณ 30–32 °C [5, 7, 17, 18] กลไกความเป็นโปรไบโอติกที่สำคัญของ *P. arabinosum* ได้แก่ความสามารถในการรอดชีวิตผ่านสภาวะกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก [4, 16, 19] รวมทั้งความสามารถในการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตและแลกเตตผ่านวัฏจักร Wood-Werkman เพื่อผลิตกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก [4, 7, 9] สารเมแทบอลิต์กรดอินทรีย์และสารต้านจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อรา ยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นม [5, 7, 19] และยังมีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 (Cobalamin) และอนุพันธ์โคบาลามิด โคเอนไซม์ ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีคุณค่าสูงต่อร่างกาย [10, 12]

ด้านข้อกำหนดทางกฎหมาย ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการกล่าวอ้างโปรไบโอติกต้องมีปริมาณจุลินทรีย์มีชีวิตคงเหลือไม่น้อยกว่า 10^6 CFU ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษา [13, 14] สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีภารกิจหลักในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เพื่อการกำกับดูแลความปลอดภัยด้านอาหารของประเทศ ทีมผู้วิจัยมีประสบการณ์จากการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์โปรไบโอติกตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขสำเร็จมาแล้วถึง 21 ชนิด การศึกษานี้จึงเป็นการยกระดับการดำเนินงานโดยพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *P. arabinosum* ในนมและผลิตภัณฑ์นมขึ้นเป็นแห่งแรกในประเทศไทย โดยอ้างอิงวิธีทดสอบมาตรฐาน Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA 2015) Chapter 47 [6] และดำเนินการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตามเกณฑ์สากล ISO 16140-3:2021 [21]

เพื่อสร้างระบบการรับรองปริมาณเชือบนฉลาก (Label claim) ที่มีมาตรฐานและมีความน่าเชื่อถือสูงสุดทางกฎหมาย [13, 14]

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องตีผสมอาหาร เครื่องนับโคโลนี เครื่องบันทึกภาพและวิเคราะห์ผล เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ชุดอิเล็กโทรโพรเซสแบบแนวราบ เต้าหุ้มไฟฟ้า ตู้บเพาะเชื้อ 30 - 32 °C ตู้บเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ และ anaerobic jar

autopipette พร้อม pipette tip microbiology Anaerotest® strips micro-centrifuges tube ขวดแก้วฝาเกลียว จานเพาะเชื้อ ขนาด 15x90 มิลลิเมตร หรือ 15x100 มิลลิเมตร ถังตีผสมอาหาร ปิเปต แผ่นกระจก หลอดทดลองพร้อมฝา ห่วงเขี่ยเชื้อ แท่งแก้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Yeast Extract Lactate Agar (YELA), trypticase (tryptic) soy agar (TSA), 0.1% peptone, 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) solution, gram stain reagents, primer, taq polymerase, TE buffer (10mM Tris-1mM EDTA, pH 8.0), Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

ตัวอย่าง

อาหารที่ใช้ประเมินความใช้ได้ของวิธีแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

1. กลุ่มอาหารที่ไม่ท้าทาย (Non-challenging food item): เนยแข็งชนิดนุ่ม (Soft cheeses)
2. กลุ่มอาหารที่ท้าทาย (Challenging food item): เนยแข็งชนิดแข็งและกึ่งแข็ง (Hard and semi-hard cheeses)

สายพันธุ์จุลินทรีย์อ้างอิงสำหรับประเมินความจำเพาะ (Specificity)

- Inclusivity test: *Acidipropionibacterium acidipropionici* ATCC 4875
- Exclusivity test: *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365, *Lactobacillus paracasei* BCC 42359, *Lactobacillus rhamnosus* TBRC 374, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BCC 51139 และ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140

การหาค่าความไม่แน่นอนของการวัดเชิงเทคนิค ใช้ตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่เป็นเนยแข็ง (Cheeses)

วิธีการ

1. วิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Propionibacterium arabinosum* ในนมและผลิตภัณฑ์นม ตาม APHA (2015) Chapter 47^[6] ซึ่งตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ เติมสารละลายสำหรับเจือจาง 0.1% peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมอาหาร ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 หรือการเจือจางอื่นๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน YELA 2 plate (duplicate) ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้น บ่มที่ 30 - 32 °C สภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar 7 วัน นับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ โคโลนีขนาด 2 มิลลิเมตร กลม นูน ผิวเรียบ สีครีม ในช่วง 25 - 250 โคโลนี เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะ 10 โคโลนี ไปตรวจยืนยัน โดยเขี่ยเชื้อลงใน TSA plate บ่มที่ 30 - 32 °C สภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar 48 - 72 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบการย้อมสีแกรม *P. arabinosum* การสร้างเอนไซม์ catalase และตรวจยืนยัน *P. arabinosum* ด้วยวิธี PCR

การสกัดดีเอ็นเอ

เขี่ยเชื้อ ใส่ลงใน TE buffer (10mM Tris-1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่บรรจุในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในเตาหลุมไฟฟ้าที่ 95 °C นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสลงหลอดพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 0.6 มิลลิลิตร เพื่อทำ PCR (DNA template)

Conventional PCR

เตรียม master mix ตารางที่ 1 ปรับปริมาตรตามจำนวนปฏิกิริยา_ปิเปต master mix 9 μ l ใส่หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ตามด้วย DNA template 1 μ l นำหลอด PCR ไป spin down แล้วใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ตั้งสภาวะตาม primer ที่ใช้ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้แต่ละ เตรียม agarose gel 1.7% ที่เติมสีย้อมหยอด DNA ladder (100 bp) ปริมาตร 4 μ l และหยอด PCR product 10 μ l ลงในหลุมถัดๆ ไป run gel electrophoresis ที่ 100 V นาน 30 - 35 นาที อ่านผล gel electrophoresis ด้วยเครื่องบันทึกภาพและวิเคราะห์ผล ในขั้นตอนการทำ PCR ต้องมี negative control และ positive ทุกครั้ง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ mastermix และ DNA template

Reagents		Volume per reaction (μ l)	จำนวน reaction ที่ต้องเตรียม เช่น 12 reaction
mastermix	PCR-grade water	3.6	43.2
	2X KAPA Fast HotStart Ready Mix with dye	5	60
	Forward primer (nM) (10 μ M)	0.2	2.4
	Reverse primer (nM) (10 μ M)	0.2	2.4
DNA template		1	12
ปริมาตรรวม		10	120

ตารางที่ 2 primers สำหรับการตรวจยืนยัน *P. arabinosum*^[20]

Pacl	CTG GAA GCT GGC CGT CG
Pacll	CTT GCA ACA CAA CAC ATT AC

ตารางที่ 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Cycling parameters)

Stage		Temperature	Time	No. of cycles
Pre-heating		95°C	3 min	1
Amplification	Denaturation	95°C	15 sec	28
	Annealing	60°C	15 sec	
	Extension	72°C	10 sec	
Post amplification		72°C	1 min	1

ตารางที่ 4 การควบคุมคุณภาพของวิธี conventional PCR (PCR Controls)

- สกัด DNA เป้าหมาย จากแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงตามตาราง ดังนี้

Function	Target	control strains	Identification	Product size (bp)
specificity	16s-23s intergenic region	<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i> ATCC 4875	<i>Propionibacterium arabinosum</i>	304

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Verification) และการทดสอบ Inclusivity/Exclusivity

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Verification)

ปฏิบัติตามข้อกำหนดสำหรับ non-validated reference method ของมาตรฐาน ISO 16140-3:2021^[14]

1. กลุ่มอาหารที่ไม่ท้าทาย (Non-challenging food item): เนยแข็งชนิดนุ่ม (Soft cheeses)
2. กลุ่มอาหารที่ท้าทาย (Challenging food item): เนยแข็งชนิดแข็งและกึ่งแข็ง (Hard and semi-hard cheeses)

เลี้ยงเชื้อ *A. acidipropionici* ATCC 4875 ด้วย BHI บ่มที่ 30°C 48 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง ละ 50 กรัม จำนวน 2 ถัง (duplicate) สำหรับเติมเชื้อ *A. acidipropionici* ATCC 4875 ทั้งหมด 3 ระดับการเจือจาง สูง กลาง และต่ำ ($1:10^0$, $1:10$, $1:10^3$) หาปริมาณเชื้อในตัวอย่างตามข้อ 1. ประเมินสมรรถนะวิธีวิเคราะห์ด้วยค่า Estimated bias (eBias) โดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้จริงกับค่าเชื้อตั้งต้น โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ eBias ต้องน้อยกว่า $0.5 \log_{10}$ ^[13]

การทดสอบ Inclusivity/Exclusivity ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะสายพันธุ์^[20]

เลี้ยงเชื้อ ด้วย BHI บ่มที่ 30°C 48 ชั่วโมง ชีดเชือบน TSA บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอ และทดสอบด้วยวิธี PCR Inclusivity: *Acidipropionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 Exclusivity: *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365, *Lactobacillus paracasei* BCC 42359, *Lactobacillus rhamnosus* TBRC 374, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BCC 51139 และ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140

3. การหาค่าความไม่แน่นอนของการวัดเชิงเทคนิค (Technical Measurement Uncertainty)

ประเมินความไม่แน่นอนของการวัดเชิงเทคนิคจากการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี spread plate ในตัวอย่างเนยแข็ง คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation of reproducibility: S_R) ตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 19036:2019^[22]

เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบประมาณ 50 กรัม โดยกำหนดให้ 1 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทำทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ปฏิบัติตามวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Propionibacterium arabinosum* ในนมและผลิตภัณฑ์นม คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (S_R)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการทดสอบสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ *P. arabinosum* ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งทั้ง 2 กลุ่มอาหาร แสดงให้เห็นประสิทธิภาพและความแม่นยำสูง ข้อมูลสรุปดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการประเมินค่า Estimated bias (eBias) ของวิธีตรวจวิเคราะห์ *P. arabinosum* ในตัวอย่างเนยแข็ง

กลุ่มอาหาร	ประเภทตัวอย่าง	eBias ระดับสูง (log ₁₀)	eBias ระดับกลาง (log ₁₀)	eBias ระดับต่ำ (log ₁₀)	เกณฑ์ยอมรับ ISO 16140-3
กลุ่มที่ 1 (Non-challenging)	Soft cheeses	0.17	0.21	0.21	< 0.5 log ₁₀
กลุ่มที่ 2 (Challenging)	Hard & semi-hard cheeses	0.01	0.12	0.06	< 0.5 log ₁₀

จากการประเมินค่า Estimated bias (eBias) ชี้ให้เห็นว่า ค่าความเอนเอียงในเนยแข็งชนิดนุ่มอยู่ที่ 0.17 ถึง 0.21 log₁₀ ขณะที่เนยแข็งชนิดแข็งและกึ่งแข็งมีค่า eBias ต่ำมากเพียง 0.01 ถึง 0.12 log₁₀ ซึ่งทุกกลุ่มอาหารมีค่าน้อยกว่าเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ไม่เกิน 0.5 log₁₀ อย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลนี้ยืนยันว่า โครงสร้างและองค์ประกอบไขมันหรือโปรตีนที่หนาแน่นในเนยแข็งชนิดแข็งไม่ได้ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการจำแนกเชื้อและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ผลการทดสอบความจำเพาะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR พบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ค่า Inclusivity กับเชื้อ *A. acidipropionici* ATCC 4875 ผลสอดคล้องกับค่าเป้าหมาย เท่ากับร้อยละ 100^[1, 11, 15]

และให้ค่า Exclusivity ผลสอดคล้องกับค่าเป้าหมาย เท่ากับร้อยละ 100 โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ (Cross-reactivity) กับแบคทีเรียแลกติกและไบฟิโดแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์^[1, 2, 11] นอกจากนี้ ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเชิงเทคนิคตามมาตรฐาน ISO 19036:2019 ได้ค่า S_{IR} ของ *P. arabinosum* เท่ากับ 0.0531 มีค่าต่ำอาจเพราะช่วงเวลาวเคราะห์ไม่ได้แตกต่างกันมาก ซึ่งตามวิธี (APHA 2015) Chapter 47 ไม่มีค่า S_{IR} แสดงไว้ แต่เมื่อเทียบค่ากับข้อมูล AOAC 2023 (997.02) คือ 0.5750^[23] บ่งชี้ว่าห้องปฏิบัติการสามารถควบคุมความแปรปรวนของกระบวนการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประสบความสำเร็จในการพัฒนาและทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Propionibacterium arabinosum* ในนมและผลิตภัณฑ์นมตามวิธีมาตรฐาน APHA (2015) Chapter 47 ผลการทวนสอบสมรรถนะตาม ISO 16140-3:2021 และ ISO 19036:2019 ผ่านเกณฑ์การรับรองสากลทุกพารามิเตอร์^[14] วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีความพร้อมเปิดให้บริการตรวจในนมและผลิตภัณฑ์นม อาหาร และวัตถุเจือปนอาหาร เป็นแห่งแรกในประเทศไทย ช่วยเสริมสร้างความมั่นใจในการตรวจสอบ Label claim ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 และยกระดับการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้มาตรฐานสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. Characterization of the 16S–23S and 23S–5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. Int J Food Microbiol. 2001;68:45-52.
2. Rossi F, Torriani S, Dellaglio F. Genus- and species-specific PCR-based detection of dairy propionibacteria in environmental samples by using primers targeted to the genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 1999;65(9):4241-4.
3. Romanov MN, Bato RV, Yokoyama MT, Rust SR. PCR detection and 16S rRNA sequence-based phylogeny of a novel *Propionibacterium acidipropionici* applicable for enhanced fermentation of high moisture corn. J Appl Microbiol. 2004;97:38-47.

4. de Assis DA, Machado C, Matte C, Ayub MAZ. High cell density culture of Dairy Propionibacterium sp. and Acidipropionibacterium sp.: A review for food industry applications. Food Bioprocess Technol. 2022;15:734-49.
5. Thierry A, Madec MN. Enumeration of propionibacteria in raw milk using a new selective medium. Le Lait. 1995;75(4_5):315-23.
6. American Public Health Association (APHA). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 47: Milk and Milk Products. 5th ed. Washington, D.C.: APHA; 2015.
7. Turgay M, Bachmann HP, Irmeler S, von Ah U, Fröhlich-Wyder MT, Falentin H, et al. Propionibacterium spp. and Acidipropionibacterium spp. Reference Module in Food Science. Elsevier; 2020.
8. Argañaraz-Martínez E, Babot JD, Apella MC, Perez Chaia A. Rapid identification of new isolates of Acidipropionibacterium acidipropionici by fluorescence in situ hybridization. Rev Argent Microbiol. 2022;54(4):263-7.
9. Pomerantz SH. A mass analysis study of the metabolism of propionate by Propionibacterium arabinosum. J Biol Chem. 1958;231:505-17.
10. Perlman D, Barrett JM. Biosynthesis of cobalamin analogues by Propionibacterium arabinosum. Can J Microbiol. 1958;4:9-15.
11. Dasen G, Smutny J, Teuber M, Meile L. Classification and identification of propionibacteria based on ribosomal RNA genes and PCR. Syst Appl Microbiol. 1998;21:251-9.
12. Toohey JI, Perlman D, Barker HA. Purification and properties of cobamide coenzymes obtained from Propionibacterium arabinosum. J Biol Chem. 1961;236(7):2119-27.
13. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 128 ตอนพิเศษ 86 ง (ลงวันที่ 3 สิงหาคม 2554).
14. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 346) พ.ศ. 2555 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ 2 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129 ตอนพิเศษ 189 ง (ลงวันที่ 18 ธันวาคม 2555).
15. ATCC. Product Sheet: Acidipropionibacterium acidipropionici (Orla-Jensen) Scholz et Kilian (ATCC 4965). Manassas, VA: American Type Culture Collection; 2021.

- 16.Mogensen G, Salminen S, O'Brien J, Ouwehand A, Holzapfel W, Shortt C, et al. Food microorganisms — Health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. Bulletin of the International Dairy Federation. 2002;377:4-9.
- 17.Gautier M. Propionibacterium. In: Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd ed. Academic Press; 2014. p. 1850-7.
- 18.Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.
- 19.Rossi F, Santonicola S, Giaccone V, Truant A, Colavita G. Dairy propionibacteria: Probiotic properties and their molecular bases. Biomolecules. 2025;15(6):886.
- 20.Bucher C, Burtscher J, Domig KJ. Propionic acid bacteria in the food industry: An update on essential traits and detection methods. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2021;20:4299-4323.
- 21.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: International Organization for Standardization; 2021.
- 22.International Organization for Standardization. ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain—Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.
- 23.AOAC Official Method 997.02: Yeast and Mold Count in Foods. Dry Rehydratable Method (Petrifilm™ Method). AOAC International, 22nd Edition, 2023. Chapter 17,19-21.