การตรวจแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากอาหารหมัก
Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented foods

ปาริชาติ พุ่มขจร[1], พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ[2]
Parichat Phumkhachorn[1], Pongsak Rattanachaikunsopon[2]
Received: 28 June 2019 ; Revised: 30 July 2019 ; Accepted: 2 September 2019

บทคัดย่อ
แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) หลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งสามารถส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก จากการนำ LAB จำนวน 10 ไอโซเลตที่แยกได้จากอาหารหมักต่าง ๆ ได้แก่ แหนม ปลาส้ม และผักดอง มาทดสอบการทนกรด และเกลือน้ำดี ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติหลักของโพรไบโอติก พบว่า LAB รหัส F1 ซึ่งแยกได้จากปลาส้มสามารถทนกรดที่ pH เท่ากับ 2 และทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2% ได้ดีที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่า LAB ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญ *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ เมื่อนำ LAB รหัส F1 ไปตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ของ LAB ดังกล่าวคล้ายกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 (accession number NR_115605.1) ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายเท่ากับ 99% LAB ที่มีคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อใช้ประโยชน์ในอนาคต

คำสำคัญ: แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โพรไบโอติก อาหารหมัก

Abstract
Many strains of lactic acid bacteria (LAB) have probiotic properties that can promote consumers' health. This study aims to find LAB having probiotic properties. Ten isolates of LAB isolated from fermented foods including Nham, Pla Som and fermented vegetables were tested for their tolerance to acid and to bile salt, considered to be major probiotic properties. It was found that LAB F1, isolated from Pla Som, was the most tolerant isolate to acid at pH 2 and to bile salt at the concentration of 2%. Furthermore, the study showed that the LAB isolate had antimicrobial ability against *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. When LAB F1 was identified using 16S rDNA sequence analysis, it was found that its 16S rDNA sequence showed 99% homology to that of *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 (accession number NR_115605.1). LAB with probiotic properties obtained from this study can be further characterized in order to utilize it in the future.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotics, Fermented foods

[1] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34190*
[2] *ศาสตราจารย์, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34190*
[1] *Assistant Professor, Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190 Thailand. E-mail: scpariph@gmail.com*
[2] *Professor, Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190 Thailand. E-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com*

บทนำ

โพรไบโอติก (probiotics) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เมื่อคน หรือสัตว์รับเข้าสู่ร่างกายแล้วมีประโยชน์ต่อสุขภาพ[1] จุลินทรีย์เหล่านี้มักพบในทางเดินอาหารของของคน และสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในอาหาร คุณสมบัติที่สำคัญที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกว่าจุลินทรีย์ใดเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ความสามารถในการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร เช่น สภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และสภาวะการมีน้ำดีในลำไส้เล็ก ความสามารถในการคงอยู่ในทางเดินอาหาร ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น[1,2] ถึงแม้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก แต่โดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์เหล่านี้มักอยู่ในกลุ่มของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) โดยเฉพาะ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium*[3,4]

ในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหารทางการเกษตร และทางด้านการแพทย์ ตัวอย่างของการนำโพรไบโอติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตอาหารเสริมโพรไบโอติก เพื่อให้อาหารดังกล่าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค[5,6] ส่วนตัวอย่างของการนำโพรไบโอติกมาใช้ในด้านการเกษตร เช่น การนำโพรไบโอติกไปเสริมในอาหารเลี้ยงสัตว์ ไม่ว่าจะเป็น ไก่ วัว หรือปลา เพื่อให้สัตว์มีอัตราการเจริญที่สูงและมีภูมิต้านทานโรคที่ดี[7] นอกจากนี้ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพยังทำให้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของโพรไบโอติกเพื่อให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในทางการแพทย์ เช่น นำมาใช้ในการนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายคน และสัตว์[8,9]

จากประโยชน์ของโพรไบโอติกที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย จากอาหารและทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียดังกล่าว โพรไบโอติกที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ทางการเกษตร หรือทางด้านการแพทย์ในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การศึกษานี้ใช้อาหารหมัก 3 ชนิด ได้แก่ แหนม ปลาส้ม และผักดอง ชนิดละ 1 ตัวอย่างในการแยก แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งใช้ขั้นตอนตามวิธีของ Phupaboon *et al.*[10] โดยชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเฉพาะส่วนน้ำมาเจือจางที่ ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} นำทุกความเจือจางมาทำการ spread plate บนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% (w/v) $CaCO_3$ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony) ที่เจริญบนอาหาร MRS agar ไปเพาะเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่คัดเลือกไว้ไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

การเก็บรักษาแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ในรูป glycerol stock culture ทำโดยนำ culture ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่เลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 600 ไมโครลิตร มาเติม glycerol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. การตรวจสอบความสามารถในการทนกรดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

การตรวจสอบความสามารถในการทนกรดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ทำโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Melia *et al.*[11] ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้ เลี้ยงแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 20 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 2 (ชุดทดลอง) ส่วนชุดควบคุมใช้อาหาร MRS broth ที่มีค่า pH เท่ากับ 7 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของ culture ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตร

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (% survival) คำนวณได้จาก (ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง/ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม) x 100

3. การตรวจสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

การตรวจสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ทำโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Melia *et al.*[11] ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้ เลี้ยงแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 20 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เติม Ox bile powder ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2%

(w/v) (ชุดทดลอง) วิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของ culture ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตร ชุดควบคุมของการทดลองนี้ให้ทำทุกอย่างเหมือนกับชุดทดลองเพียงแต่ในชุดควบคุมไม่มีการเติมเกลือน้ำดีใน MRS broth เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (% survival) คำนวณได้จาก (ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง/ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม) x 100

4. การตรวจสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการตรวจสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทำโดยเลี้ยงแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ culture ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 5,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปทดสอบต่อไป

การตรวจสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคมีขั้นตอนดังนี้ นำจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่เลี้ยงไว้ในอาหาร nutrient broth (NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาป้าย (swab) บนจานอาหาร nutrient agar (NA) นำ paper disc ที่ปลอดเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) มาวางบนผิวหน้าของอาหาร NA หยดส่วนใสที่เตรียมไว้แล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่น paper disc culture นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยให้เครื่องหมาย + เมื่อพบ inhibition zone เกิดขึ้นรอบแผ่น paper disc และให้เครื่องหมาย - เมื่อไม่พบ inhibition zone เกิดขึ้นรอบแผ่น paper disc การทดสอบนี้ใช้อาหาร MRS broth ที่ปลอดเชื้อเป็น control

5. การศึกษาจัดจำแนกชนิดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

การศึกษาจัดจำแนกชนิดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis ทำโดยสกัด genomic DNA ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Extraction Kit Mini (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Real Biotech Corporation, Taiwan) นำ genomic DNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ (template) เพื่อทำ PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ primers 2 ชนิด ได้แก่ FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ RP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3')[10] สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR คือ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที 1 รอบ นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (BioDesign Co., Ltd., Prathumthani. Thailand) แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคลายคลึงหรือความเหมือน (% homology) ระหว่างลำดับเบสของ 16S rDNA ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย กับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ในฐานข้อมูล GENBANK

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การแยกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การทดลองนี้คัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักแบบสุ่มจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน จำนวน 10 ไอโซเลต (isolate) โดยได้จากแหนม 4 ไอโซเลต (N1-N4) ปลาส้ม 3 ไอโซเลต (F1-F3) และผักดอง 3 ไอโซเลต (V1-V3) เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดไปตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ได้แก่ การตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมสีแกรม (Gram's stain) และการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสเซลล์ แบคทีเรียที่แยกได้จากแหนมและผักดองมีลักษณะกลม (coccus) ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาส้มมีลักษณะเป็นแท่ง (bacillus) (Table 1)

Table 1 Morphology of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented foods

Isolate	Source	Morphology
N1	แหนม	coccus
N2	แหนม	coccus
N3	แหนม	coccus
N4	แหนม	coccus
F1	ปลาส้ม	bacillus
F2	ปลาส้ม	bacillus
F3	ปลาส้ม	bacillus
V1	ผักดอง	coccus
V2	ผักดอง	coccus
V3	ผักดอง	coccus

แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้เป็น โพรไบโอติกได้จำเป็นต้องมีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญ คือ ความสามารถในการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร เช่น สภาวะที่เป็นกรดและมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกระเพาะอาหาร และสภาวะที่มีเกลือน้ำดีและเอนไซม์ที่หลั่งจากตับอ่อน (pancreatic juice) ในลำไส้เล็ก[12,13] เนื่องจากแบคทีเรียทุกชนิดที่จะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกจำเป็นต้องมีคุณสมบัติเหล่านี้ มิเช่นนั้นแบคทีเรียก็จะถูกทำลายโดยสภาวะต่าง ๆ ดังกล่าวในระบบทางเดินอาหาร[14] นอกจากนี้แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกได้ยังอาจมีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกอื่น ๆ อีก เช่น ความสามารถในยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรค[15] ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้[16] ความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้[16] ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต[17] และความสามารถในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน[18] เป็นต้น

ในการศึกษานี้ได้นำแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 10 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการทนกรด และเกลือน้ำดี จากนั้นนำไอโซเลตที่ทนกรดและเกลือน้ำดีได้ดีที่สุดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งได้แก่ *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 และ *S. aureus* ATCC 25923

2. การตรวจสอบความสามารถในการทนกรดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

โดยปกติกระเพาะอาหารของคนมีสภาวะเป็นกรด โดยมี pH ประมาณ 2 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีชื่อว่า pepsin ดังนั้นแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกได้จึงจำเป็นที่จะต้องสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดที่ pH 2 ได้ มิเช่นนั้นแล้วแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ก็จะถูกทำลายที่กระเพาะอาหาร และไม่สามารถทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติกได้[19]

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต ในการทนกรดที่ pH 2 ซึ่งได้ผลดังแสดงใน Table 2

Table 2 Acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from fermented foods

Isolate	OD_{600}		% survival
	pH7 (control)	pH2	
N1	1.66	1.36	81.93
N2	1.61	1.03	63.98
N3	1.54	0.76	49.35
N4	1.57	0.89	56.69
F1	1.36	1.11	81.62
F2	1.39	0.82	58.99
F3	1.35	1.04	77.04
V1	1.47	0.77	52.38
V2	1.44	0.63	43.75
V3	1.45	0.72	49.66

ในการทดลองนี้ได้จัดระดับการทนกรด (level of acid tolerance) ออกเป็น 3 ระดับโดยใช้เกณฑ์ คือ

ระดับสูง (high) มีค่า % survival มากกว่า 80%

ระดับปานกลาง (moderate) มีค่า % survival ในช่วง 50%-80%

ระดับต่ำ (poor) มีค่า % survival น้อยกว่า 50%-

จาก Table 2 พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถทนกรดที่ pH 2 ในระดับสูง คือ N1 และ F1 ในระดับปานกลาง คือ N2, N4, F2, F3 และ V1 และในระดับต่ำ คือ N3, V2 และ V3

3. การตรวจสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย

การย่อยไขมันที่เกิดขึ้นในลำไส้เล็กของคนจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ lipase และเกลือน้ำดี โดยในลำไส้เล็กของคนปกติมักมีเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นประมาณ 0.2% ถึง 2%[20] ด้วยเหตุที่เกลือน้ำดีสามารถยับยั้ง

การเจริญของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ได้ ดังนั้นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกได้จึงจำเป็นที่จะต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.2% ถึง 2% ได้ มิเช่นนั้นแล้วแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ก็จะถูกทำลายที่ลำไส้เล็ก และไม่สามารถทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติกได้ ในการทดลองนี้เลือกใช้เกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 2% เพื่อให้มั่นใจว่า แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ได้จากการทดลองนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่พบในลำไส้เล็กได้

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต (isolate) ในการทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 2% ซึ่งได้ผลดังแสดงใน Table 3

Table 3 Bile salt tolerance of lactic acid bacteria isolated from fermented foods

Isolate	OD_{600}		% survival
	0% bile salt (control)	2% bile salt	
N1	1.64	1.06	64.63
N2	1.62	0.77	47.53
N3	1.56	1.03	66.03
N4	1.60	1.32	82.50
F1	1.33	1.14	85.71
F2	1.41	0.54	38.30
F3	1.36	0.67	49.26
V1	1.45	0.98	67.59
V2	1.50	0.83	55.33
V3	1.55	1.21	78.06

ในการทดลองนี้ได้จัดระดับการทนเกลือน้ำดี (level of bile salt tolerance) ออกเป็น 3 ระดับโดยใช้เกณฑ์ คือ

ระดับสูง (high) มีค่า % survival มากกว่า 80%

ระดับปานกลาง (moderate) มีค่า % survival ในช่วง 50%-80%

ระดับต่ำ (poor) มีค่า % survival น้อยกว่า 50%

จาก Table 3 พบว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่สามารถทนเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2% ในระดับสูง คือ N4 และ F1 ในระดับปานกลาง คือ N1, N3, V1, V2 และ V3 และในระดับต่ำ คือ N2, F2 และ F3

จากการทดสอบความสามารถในการทนกรด และเกลือน้ำดีของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่า F1 เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่สามารถในการทนกรด และเกลือน้ำดีในระดับสูง ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย F1 ไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. การตรวจสอบความสามารถของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เมื่อนำแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย F1 มาทดสอบความสามารถในการยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้ง *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 และ *S. aureus* ATCC 25923 (Figure 1)

แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยสารดังกล่าวอาจเป็น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน[21] อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารใดเป็นสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย F1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้

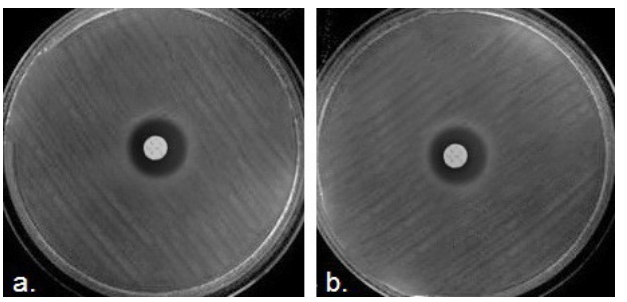

Figure 1 Inhibition zones caused by the inhibiton of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (a) and *S. aureus* ATCC 25923 (b) by lactic acid bacteria F1

5. การจัดจำแนกชนิดของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

เมื่อนำ genomic DNA ของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย F1 มาใช้เป็น template ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสจำนวน 1,435 bp (Figure 2) เมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ที่อยู่ในฐานข้อมูล GENBANK พบว่าลำดับเบสของ PCR product ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 (accession number NR115605.1) ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย F1 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น *Lactobacillus plantarum*

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามี *Lactobacillus plantarum* หลายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก ตัวอย่างเช่น *L. plantarum* WCFS1[18] ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย *L. plantarum* U32[22] ซึ่งช่วยส่งเสริมกระบวนหมักในกระเพาะอาหารส่วนต้น (rumen fermentation) ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง *L. plantarum* ZLP001[23] ซึ่งช่วยป้องกันสุกรจากการติดเชื้อ *E. coli* โดยช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียดังกล่าวยึดเกาะที่ผนังลำไส้ และ *L. plantarum* A7[24] ซึ่งสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Caco-2 cell)

```
tgcaagtcga acgaactctg cgtatagatt ggtgcttgca
tcatgattta catttgagtg agtggcgaac tggtgagtaa
cacgtgggaa acctgcccag aagcggggga taacacctgg
aaacagatgc taataccgca taacaacttg gaccgcatgg
tccgagcttg aaagatggct tcggctatca cttttggatg
gtcccgcggc gtattagcta gatggtgggg taacggctca
ccatggcaat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg
ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag
gcagcagtag gaaatcttcc acaatggacg aaagtctgat
ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaagggtt tcggctcgta
aaactctgtt gttaaagaag aacatatctg agagtaactg
ttcaggtatt gacggtattt aaccagaaag ccacggctaa
ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
gtgtccggat ttattgggcg taaagcgagc gcaggcggtt
ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctc aaccgaagaa
gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca
gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatatg
gaagaacacc agtggcgaag gcggctgtct ggtctgtaac
tgacgctgag gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta
gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat gaatgctaag
tgttggaggg tttccgccct tcagtgctgc agctaacgca
ttaagcattc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
ctcaaaggaa ttgacgggtt cccgcacaag cggtggagca
tgtggtttaa ttcgaagcta cgcgaagaac cttaccaggt
cttgacatac tatgcaaatc taagagatta gacgttccca
tcggggacat ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc
tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc
aacccttatt atcagttgcc agcattaagt tgggcactct
ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg
acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac
gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcg aactcgcgag
agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggattgt
aggctgcaac tcgcctacat gaagtcggaa tcgctagtaa
tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc
caaagtcggt agggtaacct tttaggaacc agccg
```

Figure 2 Nucleotide sequence of 16S rDNA of lactic acid bacteria F1

สรุปและเสนอแนะ

Lactobacillus plantarum F1 เป็นแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ที่แยกได้จากปลาส้ม มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 2 และทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 2% ได้ดี โดยมี % survival ในสภาวะดังกล่าวสูงกว่า 80% นอกจากนี้ *Lactobacillus plantarum* F1 ยังสามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ หากทำการศึกษาต่อเพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังกล่าว รวมทั้งการศึกษาคุณสมบัติอื่น ที่เกี่ยวข้องกับความเป็นโพรไบโอติกของแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย ดังกล่าว เช่น ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยต่าง ๆ ที่พบได้ในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก ก็จะมีประโยชน์ต่อการนำ *Lactobacillus plantarum* F1 ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. Probiotics: A review, Asian Pac J Trop Biomed 2011;1(2):S287-S290.
2. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. Health benefits of probiotics: a review, ISRN Nutrition 2013;2013:481651.
3. Zukiewicz-Sobczak W, Wroblewska P, Adamczuk P, Silny W. Probiotic lactic acid bacteria and their potential in the prevention and treatment of allergic diseases, Cent Eur J Immunol 2014;39(1):104-108.
4. Ljungh A, Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics, Curr Issues Intest Microbiol 2006;7(2):73-89.
5. Parvez S, Malik KA, Ah KS, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, J Appl Microbiol 2006;100(6):1171-1185.
6. El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T. Emerging trends in smart probiotics: functional consideration for the development of novel health and industrial applications, Front Microbiol 2017;8:1889.
7. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production, Int J Food Microbiol 2010;141(Suppl 1):S15-S28.
8. Zimmermann P, Curtis N, 2018. The influence of probiotics on vaccine responses - A systemic review, Vaccine 2018;36(2):207-213.
9. Lei W, Shih PC, Liu SJ, Lin CY, Yeh TL. Effect of probiotics and prebiotics on immune response to influenza vaccination in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, Nutrients 2017;9(11):1175.
10. Phupaboon S, Pudpai N, Punyauppa-path S, Phumkhachorn P, Rattanachaikunsopon P. Isolation of lactic acid bacteria from fermented foods to be

developed as DNA delivery vehicles, J Sci Technol UBU 2016;18(1):21-29.

11. Melia S, Yuherman Y, Jaswandi J, Purwati E. Selection of buffalo milk lactic acid bacteria with probiotic potential, Asian J Pharm Clin Res 2018;11(6):186-189.
12. Hassanzadazar H, Ehsani A, Mardani K, Hesari J. Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese, Vet Res Forum 2012;3(3):181-185.
13. Vizoso Pinto MG, Franz CM, Schillinger U, Holzapfel WH. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products, Int J Food Microbiol 2006;109(3):205-214.
14. Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Mohd Ismail NI, Yin OS. Beneficial Properties of Probiotics, Trop Life Sci Res 2016;27(2):73-90.
15. Lin X, Chen X, Tu , Chen H. Effect of probiotic lactobacilli on the growth of Streptococcus Mutans and multispecies biofilms isolated from children with active caries, Med Sci Monit 2017;23:4175.
16. Wang J, Zeng Y, Wang S, Liu H, Zhang D, Zhang W, Wang Y, Ji H. Swine-derived probiotic *Lactobacillus plantarum* inhibits growth and adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* and mediates host defense, Front Microbiol 2018;9:1364.
17. Suo C, Yin Y, Wang X, Lou X, Song D, Wang X, Gu Q. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality, BMC Vet Res 2012;8:89.
18. van den Nieuwboer M, van Hemert S, Claassen E, de Vos WM. Lactobacillus plantarum WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome, Microb Biotechnol 2016;9:452-465.
19. Merrell DS, Camilli A. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens, Curr Opin Microbiol 2002;5(1):51-55.
20. Kristoffersen SM, Ravnum S, Tourasse NJ, Okstad OA, Kolsto AB, Davies W. Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in Bacillus cereus ATCC 14579. J Bacteriol. 2007;189(14):5302-5313.
21. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins-a viable alternatives to antibiotics. Nat Rev Microbiol 2013;11(2):95-105.
22. Astuti WD, Wiryawan KG, Wina E, Widyastuti Y, Suharti S, Ridwan R. Effects of selected *Lactobacillus plantarum* as probiotic on *in vitro* ruminal fermentation and microbial population, Pak J Nutr 2018;17(3):131-139.
23. Wang J, Ji H, Wang S, Liu H, Zhang W, Zhang D, Wang Y. Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota, Front Microbiol 2018;9:1953.
24. Sadeghi-Aliabadi H, Mohammadi F, Fazeli H, Mirlohi M. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain, Iran J Basic Med Sci 2014;17(10):815-819.