

คุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอุจจาระเด็กแรกเกิด

Probiotic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces

มารุตพงศ์ ปัญญา¹, วีระพงศ์ ลูลิตานนท์², พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ³,
ธัญญากร ศรีวรมาศ¹, ธาวิณี ไชยวงศ์¹ และ ฐาปนีย์ ถิ่นบ้านใหม่²

¹วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตำบลเมืองศรีไค อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

²ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

³ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตำบลเมืองศรีไค อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

*Email: marutpong.p@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 180 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิด คุณสมบัติโปรไบโอติกที่ศึกษา ได้แก่ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคน การทนต่อสภาวะที่พบในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ การทนกรดและเกลือ น้ำดี การตรวจหาพิษที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการก่อโรค และการจำแนกชนิดแบคทีเรีย ผลการศึกษาพบว่า มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จำนวน 4 ไอโซเลต คือ KM1-CMP3, KM2-CMP4, KM2-CMP11 และ KM3-CMP2 โดยทุกไอโซเลตไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคน สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี ซึ่งทุกไอโซเลตมีเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 80 % ผลการตรวจหาพิษที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการก่อโรคพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่มียีน cytolysin A และ gelatinase E ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีการเพิ่มจำนวนและตรวจสอบลำดับเบสของยีน 16S ribosomal RNA พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *Enterococcus faecalis* ดังนั้น เชื้อเหล่านี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบความเป็นโปรไบโอติกในขั้นต่อไป ได้แก่ การทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก โปรไบโอติก เอ็นเทอโรคอคคัส เด็กแรกเกิด

Abstract

This study aimed to characterize the probiotic properties of 180 lactic acid bacteria (LAB) from infant feces. These properties included hemolysis, survival in simulated gastrointestinal tract conditions (acid and bile salt tolerance), detection of virulent-associated genes (cytolysin A and gelatinase E), and bacterial strain identification. The results found that four isolates, KM1-CMP3, KM2-CMP4, KM2-CMP11, and KM3-CMP2, demonstrated good probiotic properties. These four isolates were negative for hemolysis activity and were able to survive in acidic (after 3 h exposure to gastric juice pH3.0) and bile salt conditions (after 24 h exposure to 0.3% Ox gall) with more than 80 percent of cells surviving. The four isolates did not carry any virulent-associated genes. Bacterial strain identification by 16S ribosomal RNA amplification, sequencing, and comparison found that the four isolates were identified as *Enterococcus faecalis*. Therefore, these *E. faecalis* strains can be further used for the probiotic characterization in cell cultures and animal models.

Keywords: Lactic acid bacteria: Probiotic: Enterococci: Infant

บทนำ

โพรไบโอติก (probiotic) คือ จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะก่อประโยชน์ต่อร่างกายได้ [1] โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) ซึ่งประกอบด้วยหลายชนิด ได้แก่ *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* และ *Bifidobacterium* [2] จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายคนหลายประการ เช่น ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ทำลายเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และช่วยปรับสภาวะสมดุลในบริเวณลำไส้หรือในระดับเยื่อเมือก [3], [4] เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้โพรไบโอติกสายพันธุ์ที่ดีตามต้องการนั้น จำเป็นต้องมีการคัดเลือกและศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติโพรไบโอติกที่สำคัญ ได้แก่ ความสามารถของเชื้อในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร (gastric juice) ตลอดจนทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt) ในลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของคน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า แบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากร่างกายหรืออุจจาระของคนจะมีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากอาหารหรือแหล่งอื่นๆ ทั้งนี้ เชื้อ LAB ที่คัดแยกได้จากคนจะมีความสามารถในการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารของคนได้ดี เช่น ทนสภาวะกรดและด่าง ทนต่อการทำลายจากเอนไซม์ ตลอดจนมีความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้ของคนได้ดีกว่า [5] เป็นต้น

การวิจัยก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อ LAB จากอุจจาระเด็กแรกเกิดที่ดื่มนมแม่ ซึ่งเป็นเด็กแรกเกิดอายุระหว่าง 8-10 วัน จำนวน 10 คน ในเขตอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งสามารถแยกเชื้อ LAB ได้จำนวน 300 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มี 180 ไอโซเลตที่มีคุณลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม และติดสีกรัมบวก (gram positive cocci) ซึ่งยังไม่ได้ทำการศึกษาค้นสมบัติโพรไบโอติก ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค้นสมบัติโพรไบโอติกของเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิดที่ดื่มนมแม่และคัดเลือกเชื้อ LAB ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีไปทำการจำแนกเชื้อ ทั้งนี้หากได้เชื้อ LAB ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดี จะสามารถนำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบความเป็นโพรไบโอติกกับเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลองต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาค้นครั้งนี้ ประกอบด้วย LAB จำนวนทั้งหมด 180 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากอุจจาระของเด็กแรกเกิดอายุระหว่าง 8-10 วัน และดื่มนมแม่เท่านั้น ในเขตอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีและที่นำไปใช้กันอย่างแพร่หลายในการเป็นสายพันธุ์อ้างอิง เชื้อ LAB และ *L. plantarum* NCIMB8826เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ deMan, Rogosa and Shape (MRS) ทั้งชนิดเหลว (MRS broth) และชนิดแข็ง (MRS agar)

2. การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงคน

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงคน (hemolysis) โดยการนำเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลตมาทำขีดแบบ simple streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกิด hemolysis ทั้ง 3 ลักษณะ คือ β -hemolysis (ย่อยสลายแบบสมบูรณ์ ซึ่งจะพบ clear zone สีรอบๆ รอยขีดเชื้อ), α -hemolysis (ย่อยสลายบางส่วน) และ γ -hemolysis (ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง) เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดแดงแบบ β -และ α -hemolysis จะไม่นำไปใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบการทนกรดและเกลือน้ำดี

ทดสอบความสามารถของเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลตในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเกลือน้ำดี (Acid and bile salt tolerance test) ซึ่งเป็นสภาวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของคน ตามวิธีการของ Lee *et al.* [6]

การเตรียมเซลล์ ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) จำนวน 2 ครั้ง แล้วปรับปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.1

การทดสอบการทนกรดทำได้โดยนำเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลต ที่ปรับปริมาณเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย synthetic gastric juice (NaCl 2 กรัม, pepsin 3.2 กรัม, ละลายในน้ำ 1 ลิตร, pH 3.0) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยการทำ serial dilu-

tion และ drop plate บนอาหาร MRS agar และคำนวณให้อยู่ในค่า $\log_{10}$ CFU โดยเปรียบจำนวนเซลล์เริ่มต้น (กำหนดเป็น 0h) และจำนวนเซลล์ของชุดทดสอบ (กำหนดเป็น 3h) แล้วคิดเป็นค่าร้อยละเซลล์ที่รอดชีวิต (% of cell survival) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ of cell survival} = (\log \text{cfu}_{3\text{h}} / \log \text{cfu}_{0\text{h}}) \times 100$$

การทดสอบความสามารถของเชื้อ LAB ในการทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salt) โดยนำเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลตที่ปรับความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 0.3% bile salt (Ox gall 30 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร, pH 8.0) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบการทนกรด และคิดเป็นค่าร้อยละเซลล์ที่รอดชีวิต (% of cell survival) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ of cell survival} = (\log \text{cfu}_{24\text{h}} / \log \text{cfu}_{0\text{h}}) \times 100$$

ในการทดสอบความสามารถของเชื้อ LAB ในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเกลือน้ำดี จะคัดเลือกเฉพาะเชื้อ LAB ที่มีค่าการมีชีวิตรอดตั้งแต่ 80% ขึ้นไป เพื่อไปทดสอบในการขั้นตอนต่อไป การทดสอบการทนกรดและเกลือน้ำดีจะใช้เชื้อ *L. plantarum* NCIMB 8826 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

4. การตรวจหายีนเกี่ยวข้องกับปัจจัยรุนแรง

ตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมทำให้เชื้อ LAB สามารถก่อโรคได้ หรือ virulent-associated gene โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ตามวิธีการของ Tan *et al.* [7] ในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย ซึ่งตรวจหายีน 2 ชนิด ได้แก่ cytotoxin A (*cytA*) และ gelatinase E (*gelE*) เริ่มต้นจากการสกัด genomic DNA ของเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลต โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic real DNA extraction จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปทำ PCR ซึ่งใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 1 โดย PCR มีองค์ประกอบ คือ 10x PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl_2 buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 1.25 mM dNTP ปริมาตร 8 ไมโครลิตร, 10 μM forward (F) primer และ 10 μM reverse (R) primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase จำนวน 0.02 ยูนิต ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นชนิด DNase-free water ให้ได้ 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR เป็นจำนวน 30 รอบ และมีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose gel

เท่ากับ 1% ในสารละลาย 1XTAE ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 volt เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละยีน

ยีน	ไพรเมอร์ (ลำดับเบสจากด้าน 5' ถึง 3')	ขนาด (bp)	อ้างอิง
<i>cytA</i>	F TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517	[7]
	R TCTACAGTAAATCTTCGTCA		
<i>gelE</i>	F AATTGCTTTACACGGAACGG	547	
	R AGCCATGGTTTCTGGTTGTC		

หมายเหตุ F และ R คือ forward และ reverse primer ตามลำดับ bp คือ base pair

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละยีน

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Pre-denaturation	95	5
Denaturation	95	0.3
Annealing	48 (สำหรับ <i>cytA</i>) 53 (สำหรับ <i>gelE</i>)	0.3
Extension	72	0.25 (สำหรับ <i>cytA</i> และ <i>gelE</i>)
Final extension	72	7

5. การจำแนกเชื้อโดยวิธี 16S rRNA sequencing

จำแนกเชื้อ LAB ที่ผ่านการคัดเลือกคุณสมบัติไปรีโบโซมิก โดยเทคนิค 16S ribosomal RNA sequencing ใช้ genomic DNA ของเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลตจากการทดลองขั้นตอนที่ 2.4 มาทำการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย คือ 16S ribosomal RNA ด้วยวิธีการ PCR ซึ่งใช้ primer คือ 27F (5'-agagtttgatcctggctcag-3') และ 1492R (5'-gggt-tacctgttacgactt 3') โดยองค์ประกอบ PCR มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2.4 ส่วนสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ คือ Pre-denaturation (94 องศาเซลเซียส, 4 นาที), Denaturation (94 องศาเซลเซียส, 1 นาที), Annealing (48 องศาเซลเซียส, 30 วินาที), Extension (72 องศาเซลเซียส, 2 นาที), Final extension (72 องศาเซลเซียส, 10 นาที) เป็นจำนวน 30 รอบ นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit และทำ DNA sequencing

แล้วเปรียบเทียบความเหมือนลำดับเบสของ 16S rRNA ของเชื้อ LAB แต่ละไอโซเลตกับฐานข้อมูล National center for Biotechnology Information (NCBI data base) เพื่อจำแนกเชื้อต่อไป [8]

6. การขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ณ วันที่ 30 พฤษภาคม 2556 โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (declaration of Helsinki)

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบเชื้อ LAB ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนพบว่า เชื้อ LAB ทั้ง 180 ไอโซเลต ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงคน คือ ผลการทดสอบเป็นลักษณะ γ -hemolysis

การทดสอบความสามารถการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดีของเชื้อ LAB จำนวน 180 ไอโซเลต พบว่า มีเชื้อ LAB เพียง 13 ไอโซเลต จากทั้งหมด 180 ไอโซเลต ที่สามารถทนต่อสารละลาย gastric juice ที่มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งทั้ง 13 ไอโซเลต มีเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 80 % เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และเมื่อเปรียบเทียบค่าเซลล์ที่รอดชีวิตกับสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) คือ เชื้อ *L. plantarum* NCIMB8826 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในระดับห้องปฏิบัติการในการทดสอบเปรียบเทียบกับคุณสมบัติ

โปรไบโอติกของสายพันธุ์อื่นๆ พบว่า เชื้อ LAB ทั้ง 13 ไอโซเลต ในการศึกษาครั้งนี้สามารถอยู่รอดในสภาวะความเป็นกรดได้ใกล้เคียงกันหรือสูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ KM1-CMP7, KM3-CMP3 และ KM3-CMP7 ซึ่งมีเซลล์ที่รอดชีวิตได้ในสภาวะความเป็นกรดได้มากกว่า 90 % ส่วนความสามารถในการทนเกลือน้ำดี (bile salt) ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ในบริเวณส่วนต้นของลำไส้ของคน พบว่า เชื้อ LAB ทั้ง 13 ไอโซเลต มีเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 80 % ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ผลการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยรุนแรงของการก่อโรค ทั้ง 2 ยีน คือ cytolysin A (*cylA*) และ gelatinase E (*gelE*) โดยเทคนิค PCR และ gel electrophoresis พบว่า ในจำนวนเชื้อ LAB ทั้ง 13 ไอโซเลต ที่ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี สามารถตรวจพบยีน *cylA* ซึ่งมีขนาด 517 bp ในเชื้อ LAB จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ KM1-CMP7, KM2-CMP2, KM2-CMP7, KM2-CMP9, KM2-CMP10 และ KM2-CMP12 (รูปที่ 1) ส่วนผลการตรวจหายีน *gelE* ซึ่งมีขนาด 547 bp พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต เท่านั้นที่มียีน *gelE* ได้แก่ KM3-CMP3, KM3-CMP6 และ KM3-CMP7 ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นเชื้อ LAB ที่มียีนเกี่ยวข้องกับปัจจัยรุนแรงของการก่อโรค ทั้ง 2 ยีน ดังกล่าว คือ *cylA* และ *gelE* จึงไม่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นสายพันธุ์โปรไบโอติกต่อไป ดังนั้นมีเชื้อ LAB เพียง 4 ไอโซเลต จากทั้งหมด 180 ไอโซเลต ได้แก่ KM1-CMP3, KM2-CMP4, KM2-CMP11 และ KM3-CMP2 ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ดี

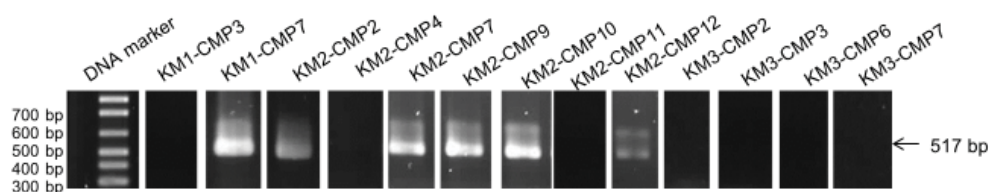
ตารางที่ 3 ความสามารถของเชื้อ LAB ในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด (gastric juice) และสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salt)

ไอโซเลต	เซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)	Gastric Juice Tolerance ระยะเวลา 3 ชั่วโมง		Bile Salt Tolerance ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	
		อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	
		จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml)	% of cell survival	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml)	% of cell survival
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826	5.2×10^7	7.0×10^6	88.71	5.5×10^6	87.36
KM1-CMP3	6.4×10^7	5.5×10^6	86.35	4.0×10^6	84.57
KM1-CMP7	5.2×10^7	9.5×10^6	90.43	7.5×10^6	89.10
KM2-CMP2	5.1×10^7	4.5×10^6	86.32	2.1×10^7	94.86
KM2-CMP4	5.4×10^7	4.5×10^6	86.09	3.0×10^6	83.81
KM2-CMP7	6.3×10^7	7.5×10^6	88.15	1.6×10^7	92.37

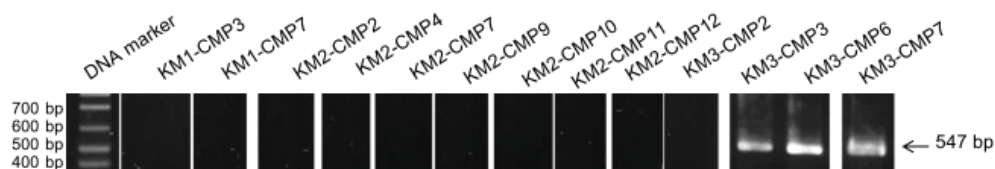
ตารางที่ 3 (ต่อ) ความสามารถของเชื้อ LAB ในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด (gastric juice) และสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salt)

ไอโซเลต	เซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)	Gastric Juice Tolerance ระยะเวลา 3 ชั่วโมง		Bile Salt Tolerance ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	
		อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	
		จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml)	% of cell survival	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml)	% of cell survival
KM2-CMP9	5.6×10^7	6.0×10^6	87.48	1.8×10^7	93.48
KM2-CMP10	4.9×10^7	2.4×10^6	83.01	2.0×10^6	81.98
KM2-CMP11	5.9×10^7	4.8×10^6	85.96	1.1×10^7	90.40
KM2-CMP12	8.5×10^7	9.5×10^6	88.00	1.9×10^7	91.79
KM3-CMP2	5.1×10^7	7.0×10^6	88.81	2.0×10^6	81.75
KM3-CMP3	5.2×10^7	1.1×10^7	91.04	4.5×10^6	86.27
KM3-CMP6	6.0×10^7	3.5×10^6	84.13	4.0×10^6	84.88
KM3-CMP7	5.9×10^7	1.3×10^7	91.59	5.5×10^6	86.78

A. CylA gene



B. GelE gene



รูปที่ 1 ผลการตรวจหายีน CylA และ GelE ในเชื้อ LAB จำนวน 13 ไอโซเลต

DNA marker ประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 300, 400, 500, 600 และ 700 bp.

ผลการจำแนกเชื้อ LAB ทั้ง 4 ไอโซเลต โดยเทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนตรงตำแหน่ง 16S rRNA และตรวจสอบลำดับยีนดังกล่าวด้วยวิธี DNA sequencing และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ DNA ของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต กับยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูล NCBI พบว่ายีนตรงตำแหน่ง 16S rRNA ของเชื้อ LAB ทั้ง 4

ไอโซเลต มีความเหมือน (identity) กับยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Enterococcus faecalis* (ตารางที่ 4) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าเชื้อ LAB ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ KM1-CMP3, KM2-CMP4, KM2-CMP11, และ KM3-CMP2 เป็นเชื้อ *Enterococcus faecalis*

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกเชื้อ LAB โดยเปรียบเทียบความเหมือนของยีน 16S rRNA ของเชื้อ LAB กับเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูล NCBI data base

Isolate	Gene similarity in NCBI data base [*]	% of identity	Identified bacteria
KM1-CMP3	<i>Enterococcus faecalis</i> strain P26-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	<i>Enterococcus faecalis</i>
KM2-CMP4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain SK23.001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98	<i>Enterococcus faecalis</i>
KM2-CMP11	<i>Enterococcus faecalis</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: APUK-20	99	<i>Enterococcus faecalis</i>
KM3-CMP2	<i>Enterococcus faecalis</i> partial 16S rRNA gene, isolate OCL2	72	<i>Enterococcus faecalis</i>

^{*}แสดงผลเฉพาะยีนที่มีความเหมือนมากที่สุด

สรุปและเสนอแนะ

การศึกษครั้งนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกเบื้องต้นของเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิดที่ดื่มเฉพาะนมแม่และเป็นเด็กที่มีอายุระหว่าง 8-10 วัน หลังคลอด โดยใช้เชื้อ LAB ทั้งหมด 180 ไอโซเลต โดยทุกไอโซเลตเป็นแบคทีเรียชนิด gram positive cocci

จากการศึกษการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของคนพบว่าเชื้อ LAB ทุกไอโซเลตไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ-hemolysis) ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกที่โดยทั่วไปจะไม่มีคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วเชื้อ LAB จะไม่สร้างเอนไซม์ที่มีผลทำลายเม็ดเลือดแดง แต่มีรายงานว่า LAB บางชนิด เช่น เชื้อ *Lactobacillus pentosus* บางสายพันธุ์สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-hemolysis แต่ไม่พบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β-hemolysis [9]

โดยทั่วไป แบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร จะต้องสามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมทั้งสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก ทั้งนี้ร่างกายของคนจะสร้างกรด (gastric juice) ประมาณ 2.5 ลิตร และน้ำดี (bile) 1 ลิตร ต่อวัน [10], [11] จากผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ LAB ทั้ง 180 ไอโซเลต ในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ซึ่งการทดสอบนี้ได้เลียนแบบสภาวะที่พบได้ตามระบบทางเดินอาหารของคนพบว่า มีเชื้อ LAB จำนวน 13 ไอโซเลต เท่านั้นที่สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ โดยทั้งหมดสามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดี ซึ่งมีค่าเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 80 % อย่างไรก็ดี การศึกษาพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ

LAB ในระบบทางเดินอาหารของคน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาที่เชื้อเดินทางผ่านระบบทางเดินอาหารและการใช้ตัวนำส่ง (matrices) สำหรับใช้ผสมกับเชื้อ LAB เช่น อาหารกลุ่มผลิตภัณฑ์นม โยเกิร์ต [12] เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ดังนั้น เชื้อ LAB ที่มีค่าการรอดชีวิตต่ำ อาจแก้ไขเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ได้ ซึ่งเป็นจุดที่ควรนำไปทดสอบและพัฒนาต่อไป

เมื่อนำเชื้อ LAB ทั้ง 13 ไอโซเลต ที่สามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดีไปทดสอบตรวจหายีนเกี่ยวกับปัจจัยรุนแรงของการก่อโรค 2 ยีน คือ cytotoxin A (*cytA*) และ gelatinase E (*gelE*) ซึ่งทั้ง 2 ยีน มักพบในเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Enterococcus* sp. [13] โดยยีน *cytA* เป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีนไซโตไลซิน (cytolysin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) และโรคติดเชื้อภายในลูกตา (endophthalmitis) [14] ส่วนยีน *gelE* เป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีนเจลลาติเนส (gelatinase) ซึ่งจะลดประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการติดเชื้อได้ดี [15] ซึ่งผลการตรวจหายีนทั้ง *cytA* และ *gelE* พบว่าในจำนวนเชื้อ LAB ทั้ง 13 ไอโซเลต ที่ผ่านการคัดเลือกการทนกรดและเกลือน้ำดี มีเพียง 4 ไอโซเลต ที่ไม่มียีน *cytA* และ *gelE* ได้แก่ ไอโซเลต KM1-CMP3, KM2-CMP4, KM2-CMP11, และ KM3-CMP2 และเมื่อจำแนกเชื้อ LAB ทั้ง 4 ไอโซเลต โดยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ คือ วิธี PCR และ 16S rRNA sequencing พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตเป็นเชื้อ *Enterococcus faecalis* ดังนั้น เชื้อ *E. faecalis* ทั้ง 4 ไอโซเลตนี้ จึงเหมาะสมนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในขั้นสูงต่อไปได้ เช่น การทดสอบความสามารถในการเกาะติดลำไส้

ในเซลล์เพาะเลี้ยง และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของเชื้อแบคทีเรียที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณ นางสาวมาลัย ศิลารัมย์ และ นางสาวไพเราะ แสนหวั่ง ซึ่งช่วยเหลือในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และอุปกรณ์การทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- [1] Sanders, M.E. 2008. "Probiotics: definition, sources, selection, and uses". **Clin Infect Dis.** 46 (Suppl): 58-61.
- [2] Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. "Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition". **Am J Clin Nutr.** 73 (Suppl): 365-73.
- [3] Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J. and Gopal, P.K. 2000, "Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019)". **Br J Nutr.** 83(2): 167-176.
- [4] De Gregorio, P.R., Juarez Tomas, M.S., Leccese Terraf, M.C. and Nader-Macias, M.E. 2014. "In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections". **J Med Microbiol.** 63(5): 685-696.
- [5] Johansson, M.L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S. and Bengmark, S. 1993. "Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora". **Appl Environ Microbiol.** 59(1): 15-20.
- [6] Lee, D.Y., Seo, Y.S., Rayamajhi, N., Kang, M.L., Lee, S.I. and Yoo, H.S. 2009. "Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces". **J Microbiol.** 47(6): 663-672.
- [7] Tan, Q., Xu, H., Aguilar, Z.P., Peng, S., Dong, S., Wang, B., Li, P., Chen, T., Xu, F. and Wei, H. 2013. Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough". **J Food Sci.** 78(4): 587-593.
- [8] Cai, H., Rodriguez, B.T., Zhang, W., Broadbent, J.R. and Steele, J.L. 2007. "Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity". **Microbiology** 153(8): 2655-2665.
- [9] Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A., Tsakalidou, E., Nychas, G.J., Panagou, E.Z. and Tassou, C.C. 2013. "Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests". **Food Microbiol.** 33(2): 282-291.
- [10] Cotter, P.D. and Hill, C. 2003. "Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH". **Microbiol Mol Biol Rev.** 67(3): 429-453.
- [11] Begley, M., Hill, C. and Gahan, C.G. 2006. "Bile salt hydrolase activity in probiotics". **Appl Environ Microbiol.** 72(3): 1729-1738.
- [12] Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Benito, M.J., Nevado, F.P. and de Guia Cordoba, M. 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifido bacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Sci.** 80(3): 715-721.
- [13] Carlos, A.R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M.T. and Tenreiro, R. 2010. "Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins". **J Appl Microbiol.** 108(5): 1563-1575.

- [14] Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. and Goossens, H. 2004. "Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*". **J Clin Microbiol.** 42(10): 4473-4479.
- [15] Park, S.Y., Kim, K.M., Lee, J.H., Seo, S.J. and Lee, I.H. 2007. "Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. **Infect Immun.** 75(4): 1861-1869.