บทความวิจัย

การลดลงของระดับคอเลสเตอรอลที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Man Rogosa Sharpe ในหลอดทดลองโดยแบคทีเรียกรดแลคติค
An In-Vitro Study of Cholesterol Reduction in Man Rogosa Sharpe Broth by Lactic Acid Bacteria

จีรศักดิ์ ญาติรักษ์[1] วิชญาพร ยืนยั่ง[1] วีรยา เพ็งช่วย[1] และ มณฑล เลิศคณาวนิชกุล[2,3,*]
Jeerasak Yartrak[1], Wichayaporn Yuenyang[1], Weeraya Pengchuay[1] and
Monthon Lertcanawanichakul[2,3,*]

บทคัดย่อ

โปรไบโอติกคือจุลินทรีย์มีชีวิตที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่เข้าไปอาศัยอยู่เมื่อได้รับเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสม และส่วนใหญ่แล้วมักจะกล่าวถึงแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีมากถึง 20 สกุล เช่น Lactobacilli, Leuconostoc, Streptococci และ Lactococci โดยพบเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ซึ่งถูกรายงานว่าสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้ ดังนั้นเพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้นำแบคทีเรียกรดแลคติคจำนวน 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาใช้คือ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), P. *acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactic* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), *L. lactis* C3 (C3), *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) และ *Enterococcus faecium* N15 (N15) มาศึกษาถึงคุณสมบัติเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ ความทนกรด ทนเกลือน้ำดี รวมทั้งการลดระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Man Rogosa Sharpe (MRS) ผลปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ระดับ pH 4 ทั้งที่มีหรือไม่มีเกลือน้ำดี oxgall ความเข้มข้น 0.3% รวมทั้งสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีหรือไม่มีเกลือน้ำดี oxgall ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเฉลี่ยที่ร้อยละ 27.21 ถึง 44.45 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่นำมาศึกษาทั้งหมดสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ได้ จึงน่าจะมีการศึกษาถึงคุณสมบัติดังกล่าวเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกที่แน่ชัดของการลดระดับคอเลสเตอรอลที่เกิดขึ้นในมนุษย์ / สัตว์ เพื่อประโยชน์การนำไปใช้งานได้จริงในการช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : เกลือน้ำดี แบคทีเรียกรดแลคติค โปรไบโอติก ระดับคอเลสเตอรอล

---

[1] นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161
[2] ผศ.ดร., สาขาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161
[3] หน่วยวิจัยชีวเวชศาสตร์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161
* Corresponding author: โทรศัพท์ 0-7567-2180, 0-7567-2104-5

Thaksin.J., Vol.17 (1) January-June 2014

Abstract

Probiotics are live microorganisms, which when administered in adequate amounts can confer a health effect on host. The most widely used probiotic bacteria are lactic acid bacteria (LAB), consist of twenty genera such as Lactobacilli, Leuconostoc, Streptococci and Lactococci. LAB are normal components of the intestinal microflora in both human and animals and have been associated with various health-promoting properties. One beneficial effect that has been suggested to result from human consumption of LAB is a reduction in serum cholesterol levels, as suggested by the results of several human and animal studies. This study evaluated the use of LAB strains as a probiotic with potential hypocholesterolemic properties. Six species of LAB; *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L26), *L. lactis* C3 (C3), *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) and *Enterococcus faecium* N 15 (N15) were studied in terms of their abilities to reduce serum cholesterol as well as tolerate to acids and bile salts. The results showed that all tested LAB could grow in Man Rogosa Sharpe (MRS) broth at pH 4 with or without 0.3% oxgall bile. Although, they reduced the serum cholesterol, ranging from 27.21% to 44.45% in the broth system, but the level of reduction among the tested strains was not significantly different. In this study, all tested LAB were observed as cholesterol reducing agents, thus may be beneficial for reducing serum cholesterol levels. However, a concern on the strains of LAB to be used as hypocholesterolemic agents in human / animals should be considered. Further studies are needed to evaluate the mechanism of cholesterol reduction ability of these of LAB.

Keywords: Bile Salt, Lactic Acid Bacteria, Probiotic, Cholesterol Level

บทนำ

ระดับคอเลสเตอรอลที่มีสูงในเลือดเป็นปัจจัยเสี่ยงทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งสามารถรักษาได้ด้วยยาที่มีราคาแพงและอาจมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ [1-3] จึงได้มีความพยายามหาทางเลือกเพิ่มขึ้นในการช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดโดยใช้โปรไบโอติก (probiotic) ที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria : LAB) ในกลุ่มlactobacilli และ streptococci ในรูปแบบอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร [4-6] โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติคจะมีรูปร่างแท่ง ทรงกลมและกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม ติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระบบไซโตโครม ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ยกเว้นในสกุล *Bacillus* และ *Sporolactobacillus* ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่บางชนิดสร้าง pseudocatalase มีความต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ บางชนิดสามารถเจริญได้ในบริเวณที่ไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันตั้งแต่ 35-37 องศาเซลเซียส (°c) และสามารถทนกรดได้ดี ส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น พบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในท่อทางเดินอาหาร ช่องฟันและช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนั้นยังพบทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะในอาหาร เช่น อาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์นม เนื้อหมัก เครื่องในสัตว์และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น [4, 5] แบคทีเรียกรดแลคติคและนมหมักจากแบคทีเรียกรดแลคติคช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น [6,7] และยังช่วยเพิ่มแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดและช่วยลดน้ำหนักเมื่อร่วมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ [1,5,8] นอกจากนี้ยังพบว่าคนที่ดื่มนมที่มีแบคทีเรีย

กรดแลคติคที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase : BSH) จะไปทำปฏิกิริยาการแตกตัว (deconjugation) ระหว่างคอเลสเตอรอลกับเกลือน้ำดีให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำทำให้คอเลสเตอรอลถูกขับออกทางอุจจาระทำให้ช่วยลดระดับคอเรสเตอรอลได้ [2, 9] จากประโยชน์ที่ได้กล่าวมาทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลคติคโดยเฉพาะความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด อาจใช้เป็นแนวทางเลือกใหม่ในการรักษาผู้ป่วยที่มีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงทดแทนการให้ผู้ป่วยรับประทานยาที่มีราคาแพงและมีผลข้างเคียง [1] อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติคแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้แตกต่างกันออกไป [2] จึงสนใจนำแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactic* ssp. *lactis* 1 L26 (L26) [10], *L. lactis* C3 (C3) [11,12], *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) และ *Enterococcus faecium* N15 (N15) [13] ไปศึกษาการลดระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการนำแบคทีเรียกรดแลคติคมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพและเกิดเป็นแนวทางนำไปใช้ร่วมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

วิธีการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติค

ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L26), *L. lactis* C3 (C3), *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) และ *Enterococcus faecium* N 15 (N15) [10-13] นำมาใช้ศึกษาการลดระดับของคอเลสเตอรอลที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ในหลอดทดลอง

การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

หยดสารแขวนลอยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จาก 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °c ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (มค.ล.) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บริเวณกลางจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °c ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนี จากนั้นนำไปขีดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดิมข้างต้น เพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวและนำไปทดสอบยืนยันเชื้อด้วยการย้อมสีแบบแกรมและทำการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติคจะให้ผลลบ

การศึกษาความสามารถทนต่อกรดและน้ำดี [14]

แยกเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มล. ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x100 มม. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °c ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชม. แล้วแยกนำสารแขวนลอยเชื้อไปทดสอบความสามารถทนต่อกรดหรือทนเกลือน้ำดี ดังนี้

1. การทดสอบความสามารถทนต่อกรด

นำสารแขวนลอยเชื้อสายพันธุ์ละ 10 มค.ล. ในสัดส่วน 1% ไปถ่ายใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มล. ที่ระดับพีเอช (pH) 1 ถึง 7 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 48 ชม. สังเกตความขุ่นในหลอดทดลองแต่ละหลอด

2. การทดสอบความสามารถทนเกลือน้ำดี

นำสารแขวนลอยเชื้อสายพันธุ์ละ 10 มค.ล. ในสัดส่วน 1% ไปถ่ายใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มล. ที่ผสมเกลือน้ำดี oxgall ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 % (w/v) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 48 ชม. สังเกตความขุ่นในหลอดทดลองแต่ละหลอด

ความสามารถการลดระดับคอเลสเตอรอลของแบคทีเรียกรดแลคติค

1. การเตรียมเชื้อตั้งต้น

ปรับเทียบความขุ่นของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์/มล. ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ให้มีค่า OD = 0.5

2. การบ่มเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมต่างๆ

แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุดต่อเชื้อ 1 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อรวม 20 มล. ดังแสดงในตารางที่ 1 แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ / น้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปศึกษาการวัดระดับคอเลสเตอรอลที่หลงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (%R) [%R = (ผลต่างของระดับคอเลสเตอรอล x 100) / คอเลสเตอรอลตั้งต้น]

3. การวัดระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2. ปริมาตร 1 มล. ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกก้นแหลมขนาดบรรจุ 50 มล. เติม 95% ethanol ปริมาตร 6 มล. และเติม 50% KOH ปริมาตร 4 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 °c เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม hexane ลงไปปริมาตร 10 มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมสารที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการแยกชั้น จากนั้นดูดสารละลายในชั้นเฮกเซน (hexane) ไปวัดระดับคอเลสเตอรอลตามวิธีการทดลองของ Rudel และ Morris, 1973 [15].

การวิเคราะห์ข้อมูล

One way ANOVA ใช้ในการทดสอบเพื่อดูว่าแบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 6 สายพันธุ์มีความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีแตกต่างกันหรือไม่ เมื่อผ่านการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมต่างๆ กันเป็นเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °c

Independent t-test ใช้ในการทดสอบเพื่อดูว่าแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์เดียวกันมีความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีแตกต่างกันหรือไม่ เมื่อผ่านการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีหรือไม่มีเกลือน้ำดี oxgall เป็นเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °c

Thaksin.J., Vol.17 (1) January-June 2014

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการลดลงของระดับคอเลสเตอรอล

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	MRS[1] (มล.)	คอเลสเตอรอล[2] (มล.)	สารแขวนลอยเชื้อ[3] (มล.)
1. MRS	20	-	-
2. MRS+LAB	19	-	1
3. MRS+Cholesterol	18	2	-
4. MRS+Cholesterol+LAB	17	2	1
5. MRS+0.3% oxgall	20	-	-
6. MRS+0.3% oxgall+LAB	19	-	1
7. MRS+0.3% oxgall+Cholesterol	18	2	-
8. MRS+0.3% oxgall+Cholesterol+LAB	17	2	1

LAB, แบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactic* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), *L. lactis* C3 (C3), *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) และ *Enterococcus faecium* N15 (N15)

[1] MRS, Man Rogosa Sharpe

[2] ซีรั่มม้าถูกใช้เป็นแหล่งของคอเลสเตอรอลมีความเข้มข้นตั้งต้น 820 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

[3] สารแขวนลอยเชื้อมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ผลการวิจัย

การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ pH 4-7 และที่มีเกลือน้ำดี oxgall ความเข้มข้น 0.3% โดยสังเกตได้จากความขุ่นด้วยสายตา และย้อมติดสีแกรมบวกมีรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปกลม (cocci) ได้แก่ *L. lactis* C3 (C3) และ *Ent. faecium* N15 (N15) รูปกลมคู่สี่ (cocci in tetrad) ได้แก่ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25) และ *L. lactic* ssp. *lactis* 1 L26 (L26) และรูปแท่งเกือบกลม (coccobacilli) ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp)

การลดคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของซีรั่มม้า ที่ใช้เป็นแหล่งคอเลสเตอรอลความเข้มข้นในช่วง 78.00+3.72 ถึง 81.00+1.65 มค.ก./มล. เมื่อบ่มเลี้ยงไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 °s เป็นเวลา 48 ชม. และพบว่ามีระดับความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลที่หลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาศึกษา โดยจะเห็นได้ว่าในสภาวะที่เติมเกลือน้ำดี oxgall ความเข้มข้น 0.3% ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จะมีการลดความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลได้ดีกว่าในหลอดที่มีเฉพาะซีรั่มม้าเพียงอย่างเดียว ยกเว้น *P. acidilactici* L25 (L25), *L. lactis* C3 (C3) และ *Ent. faecium* N15 (N15) ดังแสดงในตารางที่ 2 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาทั้งหมดสามารถลดระดับความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมต่างๆ ที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติค 6 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °c

เชื้อ	ส่วนผสมต่างๆ	ความเข้มข้นของคอเลสเตอรอล* (มค.ก/มล.)		% R
		ก่อนบ่มเลี้ยง	หลังบ่มเลี้ยง	
Lp	MRS+Cho+Lp	79.00±2.65	58.43±2.93	26.04
	MRS+0.3% oxgall+Cho+Lp	80.00±1.65	44.44±9.12	44.45
L14/1	MRS+Cho+L14/1	79.00±6.05	56.03±19.24	29.08
	MRS+0.3% oxgall+Cho+L14/1	78.00±4.65	47.30±4.99	39.36
L26	MRS+Cho+L26	78.00±5.05	56.03±3.06	28.17
	MRS+0.3% oxgall+Cho+L26	79.00±2.65	50.05±1.99	36.65
L25	MRS+Cho+L25	81.00±2.53	56.33±14.55	30.46
	MRS+0.3% oxgall+Cho+L25	76.00±5.05	55.32±11.27	27.21
C3	MRS+Cho+C3	82.00±1.05	50.34±12.65	38.61
	MRS+0.3% oxgall+Cho+C3	81.00±3.65	53.85±17.72	33.52
N15	MRS+Cho+N15	78.00±5.05	48.61 ± 5.15	37.68
	MRS+0.3% oxgall+Cho+N15	79.00±7.65	51.89 ±15.34	34.31

*ระดับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองที่ไม่มีเชื้อภายหลังการบ่มเลี้ยงมีความเข้มข้นระหว่าง 78.00+3.72 ถึง 81.00+1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มค.ก./มล.)

%R, เปอร์เซ็นต์ของคอเลสเตอรอลที่ลดลงหลังจากบ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคไว้ 48 ชม.; Lp, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp); L14/1, *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1); L26, *Lactococcus lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L26); L25, *P. acidilactici* L25 (L25); C3, *L. lactis* C3; N15, *Enterococcus faecium* N 15 (N15); Cho, Cholesterol; MRS, Man Rogosa Sharpe

Thaksin.J., Vol.17 (1) January-June 2014

อภิปรายผลการศึกษา

แบคทีเรียกรดแลคติคที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *L. lactic* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), *L. lactis* C3 (C3), *L. plantarum* TISTR 050 (Lp), *Ent. faecium* N15 (N15) เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติค มีลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ ขาว ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มม. [16] และให้ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างมีทั้งที่เป็นแบบกลม ท่อน ท่อนเกือบกลม [17-19] โดยมีการเรียงตัวที่แตกต่างกันออกไป เช่น กลมเป็นคู่สี่ (cocci in tetrad) ในกลุ่มของ *Pediococcus* [17] ท่อนเกือบกลม (coccobacilli) หรือรูปไข่ในกลุ่มของ *Enterococcus* [19]

แบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มี pH 4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของมณฑลและคณะ (2550) ที่ได้รายงานว่าเชื้อในกลุ่มเดียวกันกับที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ระดับ pH 4-11 และระดับ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลงจากเดิมไปเป็นกรดอันเนื่องมาจากกรดที่เชื้อผลิตออกมาและผลิตสารเมตาบอไลต์ที่ออกฤทธิ์ต้านราได้ [20, 21] นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อกลุ่มที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ผสมเกลือน้ำดี oxgall ความเข้มข้น 0.3% ซึ่งเป็นความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อาจนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกระหว่างการผ่านไปยังระบบทางเดินอาหารในส่วนของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กในร่างกายสิ่งมีชีวิตชั้นสูง [22,23] ซึ่งความทนทานต่อสารเคมีดังกล่าวจะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ และแบคทีเรียโปรไบโอติคที่ดีควรมีความสามารถในการเจริญที่ pH 2 และควรทนเกลือน้ำดีตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 0.1-0.4% [22-26] โดยมีรายงานว่า *L. acidophilus, L. plantarum, P. acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ที่ pH 3 อย่างน้อยเป็นเวลา 3 ชม. [25,27] ดังนั้นโดยสรุปแล้วการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกควรจะคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความทนกรดและเกลือน้ำดีเพื่อให้สอดคล้องกับระบบกระเพาะอาหารและลำไส้ของสัตว์ชั้นสูงที่มีอยู่ในช่วง pH 2-8 [28-30]

มีรายงานการวิจัยในเบื้องต้นเกี่ยวกับการลดลงของระดับของคอเลสเตอรอลที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในหลอดทดลองอย่างมากมาย ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเชื้อที่นำไปใช้ศึกษาส่วนใหญ่โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Lactobacillus* สามารถช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอลในระดับการศึกษาในหลอดทดลองได้เป็นอย่างดี [30] โดยอาจเนื่องมาจากการดูดซับคอเลสเตอรอลด้วยผนังเซลล์ของเชื้อแล้วถูกขับถ่ายออกมาพร้อมอุจจาระซึ่งวิถีการลดระดับคอเลสเตอรอลแบบนี้มักพบมีรายงานอยู่ในสภาพไร้อากาศ [22,31] และเกลือน้ำดีชนิดต่างๆ เช่น oxgall, cholic acid หรือ taurocholic acid ก็จะไปมีผลต่อการลดระดับของคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ที่ทนเกลือน้ำดีได้ดีก็สามารถลดระดับของคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองได้ดี [32] และพบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้แตกต่างกันออกไป [30]

สภาวะในหลอดทดลองมีความแตกต่างกันกับในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ทำให้อาจมีผลต่อการตรวจวัดระดับของคอเลสเตอรอล เช่นการตกตะกอนของเกลือน้ำดีกับคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองกับในร่างกายมนุษย์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนซึ่งเกี่ยวกับค่า pH โดยการตกตะกอนจะเริ่มเกิดขึ้นในหลอดทดลองเมื่อมีระดับ pH เป็นกรด แต่ในร่างกายมนุษย์การตกตะกอนจะเกิดขึ้นที่ระดับ pH ที่สูงกว่า [32,33] นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับสารเคมีที่เป็น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เช่น Tween 80 รวมทั้งไอออนของโลหะต่างๆ ซึ่งอาจทำให้ผลการลดระดับของคอเลสเตอรอลในหลอดทดลองไม่เหมือนกันกับในร่างกายมนุษย์ แต่ถ้าหากไม่คำนึงตรงจุดนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้และแตกต่างกันออกไปในแต่ละ สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับรูปแบบและปริมาณของเซลล์ตั้งต้นที่รับประทานเข้าไปเพื่อให้เซลล์เหลือรอดอยู่ได้ใน

ระบบทางเดินอาหารได้ในปริมาณที่ยังคงมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์หรือสัตว์สูงสุด [2-3, 30] โดยปกติจุลินทรีย์โปรไบโอติกควรมีความทนทาน pH อย่างน้อยที่ pH 2 แต่เชื้อที่นำมาศึกษาทนต่อกรดได้เพียงที่ pH 4 ซึ่งเชื้ออาจจะตายไปทั้งหมดเมื่อเข้าสู่กระเพาะอาหาร ดังนั้นอาจมีแนวทางแก้ไขโดยเพิ่มปริมาณเซลล์ตั้งต้นในการให้รับประทานเข้าไปเพื่อให้มีเซลล์เหลือรอดผ่านลงไปในระบบทางเดินอาหารในปริมาณที่เพียงพอในระดับ 10^8 เซลล์/มล. เป็นอย่างน้อยที่ยังคงทำให้เกิดประโยชน์ของร่างกายในแง่ของการปรับสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร [30]

การลดลงของระดับคอเลสเตอรอลมีกลไกอยู่ด้วยกัน 3 วิถี คือ 1) ถูกดูดซับ (absorp) โดยส่วนของผนังเซลล์ peptidoglycan แล้วจะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระทำให้มีการลดลงของระดับคอเลสเตอรอลในระบบทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียกรดแลคติครูปท่อนจะมีการลดระดับของคอเลสเตอรอลได้ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติครูปกลม อาจเกี่ยวกับพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับคอเลสเตอรอลมากกว่า [1, 2]; 2) แบคทีเรียกรดแลคติคสร้างเอนไซม์ BSH เพื่อแตกตัว เกลือน้ำดี (deconjugate bile salt) โดยเป็นการทำงานร่วมกันกับตับในการเปลี่ยน primary bile salt (conjugated form) ไปเป็น secondary bile acid (unconjugated form) และถูกขับทิ้งไปทางอุจจาระ [2-3, 33-35]; 3) แบคทีเรียนำคอเลสเตอรอลไปใช้ในวิถีเมแทบอลิสม (metabolism) ของเซลล์ จึงทำให้ระดับคอเลสเตอรอลลดลง [1,9] ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาถึงกลไกที่แน่ชัดในการลดระดับคอเลสเตอรอล และควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลองร่วมด้วย โดยคาดว่าน่าจะมีประโยชน์ในการนำแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีคุณสมบัติในการลดระดับคอเลสเตอรอลที่ดีไปใช้ในการพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่มีประโยชน์กับผู้ที่มีดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และพัฒนาคุณภาพชีวิตที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรียกรดแลคติคจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *L. lactic* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), *L. lactis* C3 (C3), *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) และ *Ent. faecium* N15 (N15) แสดงคุณสมบัติในเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก ได้โดยสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ระดับ pH 4 เกลือน้ำดี oxgall ความเข้มข้น 0.3% และเชื้อที่นำมาศึกษาสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีหรือไม่มีเกลือน้ำดี oxgall ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉลี่ยที่ร้อยละ 4.02 ถึง 44.80 ซึ่งมีแนวโน้มที่จะนำเชื้อดังกล่าวไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการลดระดับคอเลสเตอรอลในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5080008) และทุนสนับสนุนบางส่วนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (WU-51109) ขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย

อภิปรายผลการศึกษา

[1] Jain, S., Yadav, H. and Sinha, P.R. (2009). Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures. **J Dairy Res.** 76, 385-391.

[2] Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M.C., Karuthan, C. and Ho, Y.W. (2009). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by Lactobacillus strains used as probiotics in chickens. **J Sci Food Agri.** 90: 65-69.

[3] Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B. and Bai, X. (2009). Effects of Lactobacillus plantarum MA2 isolated from tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. **Appl Microbiol Biotechnol.** 84: 341-347.

[4] เบญจมาศ ถนอมทรัพย์. (2546). โปรไบโอติคและพรีไบโอติค. **เวชสารคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.** 9: 89-94.

[5] ศรัณย์ พรหมสาย. (2549). **แบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria).** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, จังหวัดเชียงใหม่.

[6] อัยรา พันอนุ. (2549). **การเพิ่มปริมาณ conjugated linoleic acid (CLA) ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติค.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, จังหวัดนครราชสีมา.

[7] ศรัณย์ พรหมสาย และ นฤมล ทองไว. (2548). การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน. **วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี** 45, 18-20.

[8] มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (ม.ป.ป.). **แบคเทอริโอซิน.** สืบค้นเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2553 (สารสนเทศออนไลน์) จาก http://dc.oas.psu.ac.th/dcms/files/02356/ 261468_ch1.pdf

[9] Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. (1985) Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. **Appl Environ Microbiol.** 49, 377-381.

[10] มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. (2550). การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการแสดงออกของยีนไคติเนส. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์** 4, 260-277.

[11] Suchira, G. (2002). **Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin C3.** produced by Lactococcus lactis C3. Thesis Mahidol University, Bangkok : 105 p.

[12] Smet, D.I., Boever, P.D. and Verstraete, W. (1998). Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. **Br J Nutr.** 79, 185-194.

[13] Losteinkit, C.H., Uchiyama, K.E., Ochi, S.H., Takaoka, T.O., Nagahisa, K.E. and Shioya, S.U. (2001). Characterization of bacteriocin N15 produced by Enterococcus faecium N15 and cloning of the related genes. **J Biosci Bioeng.** 91, 390-395.

[14] Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H. and Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. **Food Ctrl.** 20, 508-602.

[15] Rudel, L.L. and Morris, M.D. (1973). Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. **J Lipid Res.** 14, 364-366.

[16] Nakagawa A.K. and Kitahara, K. (1959). Taxonomic studies on the genus Pediococcus. **J Appl Microbiol. 5,** 95-126.

[17] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. (2550). **แบคทีเรียกรดแลคติค.** กรุงเทพฯ : หจก. ภาพพิมพ์, 1-25.

[18] ธารารัตน์ ศุภศิริ. (2542). PROBIOTIC : แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. **วารสารวิทยาศาสตร์** 52, 357-360.

[19] วันดี เกตุแก้ว อภิญญา อัศวนิก และ ปิยะนุช บุญคุ้มเกล้า. (2548). การผลิตสารแบคเทอริโอซินจากเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย Enterococcus faecium HF84 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคน. **วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี** 5, 18-20.

[20] มณฑล เลิศคณาวนิชกุล รัชฎาภรณ์ รักหวาน รัสนี อีแต และ รุสนะ ดูดิง. (2550). ความทนทาน พีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตสารต้านรา. **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด** 19, 193-201.

[21] มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. (2548). การแยกและคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต้าน Candida albicans. **วารสารมหาวิทยาลัยวลักษณ์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 2: 179-189.

[22] Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. (1984). Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as dietary adjunct. **J Dairy Sci.** 67, 3045-3051.

[23] Gilliland, S. and Speck, M. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Appl Environ Microbiol.** 33, 15-18.

[24] Chateau, N., Deschamps, A.M. and Hadi, S.A. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. **Lett Appl Microbiol.** 18, 42-44.

[25] Toit, M., Franz, C.M., Dick, L.M., Schilinger, U., Haberer, P., Warlies, B., et al. (1998). Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol level faeces pH and faeces moisture content. **Int J Food Microbiol.** 40, 93–104.

[26] Brennan, M., Wanismail, B. and Ray, B. (1983). Prevalence of viable Lactobacillus acidohilus in dried commercial products. **J Food Prot.** 46, 887-892.

[27] Erkkila, S. and Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Sci.** 55, 297-300.

[28] ปิ่นมณี ขวัญเมือง. (2546). การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

[29] Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y. and Sameshima, Y.T. (1998). Lactobacillus acidophilus group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **J Food Sci.** 63, 544–547.

[30] Lin, S.Y., Ayres, J.W., Winkler, W. Jr, and Sandine, W.E. (1989). Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. **J Dairy Sci.** 72, 2885-2899.

[31] Mott, G.E., Moore, R.W., Redmond, H.E. and Reiser, R. (1973). Lowering of serum cholesterol by intestinal bacteria in cholesterol-fed piglet. **Lipids** 8, 428-431.

[32] Lin, M.Y. and Chen, T.W. (2000). Reduction of cholesterol by Lactobacillus acidophilus in culture broth. **J Food Drug Anal.** 8, 97-102.

[33] Klaver, F.A.M., Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity. **Appl Environ Microbiol.** 59, 1120-1124.

[34] Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. and Mireau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. **J Dairy Sci.** 82, 2530-2535.

[35] Tannock, G.W., Dashkevitz, M.P. and Feighner, S.D. (1989). Lactobacillus and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. **Adv Appl Microbiol.** 55, 1848-1851.