

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารและแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์
Lactobacillus plantarum เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก

Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Foods and
Lactobacillus plantarum Strain Improvement for Using as Probiotic

ศิริรัตน์ เกลยสรพร¹ สุพรรณษา กิ่งเซ่ง^{1,2} และ มณฑล เลิศคนาวณิชกุล^{1,*}
Sirirat Chaleoisap¹, Supansa Gongseng^{1,2} and Monthon Lertcanawanichakul^{1,*}

บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะเป็นกลุ่มที่น่าสนใจสำหรับการนำไปใช้ทดแทนสารเคมีบำบัดการติดเชื้อ จึงได้คัดแยกกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากอาหาร โดยสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากแฮมปลาจำนวน 3 ไอโซเลตที่ออกฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* เมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพิ่มศักยภาพของ *Lactobacillus plantarum* ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีขึ้น ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติก โพรไบโอติก

¹สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ 222 ต.ไทยบุรี นครศรีธรรมราช 80161

²บัณฑิตวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 11400

*Corresponding author : E-mail : lmonthon@wu.ac.th โทรศัพท์/โทรสาร 075672104 / 075672106

Abstract

Antibiotic-producing bacteria are the group of interesting agents for using substitute chemicals to cure infection. For the reason, lactic acid bacteria producing antibiotic substances were isolated from food. Three isolates from fermented fish (Ngam-Pla) showed antibacterial activity inhibited *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, using well diffusion method. Moreover, engineered-*Lactobacillus plantarum* strain improvement by genetic engineering was more antibacterial activity than wild type. It implied that the genetic engineering method can use for improvement Lactic acid bacteria, potentiate use as probiotic.

Keywords : Antimicrobial activity, Lactic acid bacteria, Probiotic

บทนำ

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ และเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษา และคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกนี้อย่างมากมาย เพื่อค้นหาชีวสาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ ที่จะทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) สามารถยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์อื่นได้เนื่องจากไปทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ เสียไป ไดอะซีทิล (diacetyl) เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และเราได้ศึกษาว่าแบคทีเรียแกรมบวกไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่นิยมใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อในการทำความสะดวกภาชนะหรือเครื่องมือ เครื่องใช้ต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร อะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมกชนิดในอาหารได้ เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, รูเทอริน (reuterin) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีริโอซิน (bacteriocin) มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น [1-5] ซึ่งชีวสารเหล่านี้สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน และอาจใช้เป็นทางเลือกหนึ่งที่ปลอดภัย และมีศักยภาพสูงในการผลิตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดังนี้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008), *Candida albicans* DSM 70014 (TISTR 5239), *Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (TISTR 781), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517), *Micrococcus luteus* TISTR 884 และพยายามปรับปรุงสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (TISTR 050) ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. ในการพัฒนาใช้เป็น โปรไบโอติกและ/หรือสารถนอมอาหารจากธรรมชาติ ดังที่ได้เคยมีการรวบรวมรายงานการใช้แบคทีเรีย แลคติกที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมไว้ในปี ค.ศ. 2006 [6]

จากงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 21 ประจำปี 2554

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างอาหารที่ใช้เพื่อแยกไอโซเลตแบคทีเรียแลคติก

ได้แก่ อาหารประเภทแป้ง (เส้นขนมจีน ข้าวหมาก) อาหารประเภทเนื้อสัตว์ (กะปิ กุ้งส้ม ไตปลา ปลาข้าว หนู แหนมปลา แหนมหมู แหนมไก่) อาหารประเภท ผักผลไม้ (ผักกาดคอง หน่อไม้ หัวผักกาดเค็ม กะหล่ำปลี มะม่วงสุก) และผลิตภัณฑ์นม (นมเปรี้ยว)

จุลินทรีย์ดัชนี

ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 050, *B. subtilis* TISTR 008, *C. albicans* TISTR 5239, *E. coli* TISTR 887, *P. aeruginosa* TISTR 781, *S. aureus* TISTR 517 และ *M. luteus* TISTR 884

การคัดเลือกไอโซเลตแบคทีเรียแลคติก

เตรียมตัวอย่างอาหารชนิดละ 25 กรัมไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนทั่ว บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำเจือจางแบบ 10 เท่าตามความเหมาะสม แล้วนำไปกระจายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryticase Soy (TS) และ Mann Rogosa Sharpe (MRS) นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5-10 % CO₂ สุ่มเลือกโคโลนีที่บริเวณรอบๆ ไม่มีเชื้ออื่นเจริญขึ้น จากนั้นนำไปทำหีบรีสุทรีเพื่อจะนำเชื้อไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial spectrum) ด้วยวิธีขีดเชื้อ (cross streak)

การทดสอบ Antimicrobial spectrum ด้วยวิธีขีดเชื้อ

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากอาหาร (เชื้อทดสอบ) ไปขีดเป็นเส้นตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TS แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีของจุลินทรีย์ดัชนีไปขีดเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อทดสอบ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความยาวของรอยเส้นการเจริญของจุลินทรีย์ดัชนี

การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)

เลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR050 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่ จานเพาะเชื้อ นำไปวางไว้ใต้แหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปทำเจือจางแบบ 10 เท่า แล้วนำที่เจือจางระดับ 10⁻⁶ และ 10⁻⁷ ไปกระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5-10 % CO₂ แล้วราดทับโคโลนีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งเหลว Sabouraud Dextrose (SD) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีราดัชนี (*C. albicans* TISTR 5239) ผสมอยู่ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใส (clear zone) ของการยับยั้งเชื้อราดัชนี บันทึกในหน่วยเซนติเมตร

การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการถ่ายยีนไคตินเนสเข้าสู่เชื้อแลคโตบาซิลลัส

เลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วแยกเก็บตะกอนเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเชื้อไปใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host)

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* DH ที่มียีนไคตินเนส pHYB43 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAGEN (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัท จากนั้นนำไปผสมรวมกับเซลล์เจ้าบ้านเพื่อนำเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation [7] คัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มียีนไคตินเนส (transformants) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ผสมยาเตตราซัยคลิน (tetracycline) (LB+Tc)

การทดสอบการแสดงออกของไคตินเนสด้วยวิธียีสเซลล์

นำโคโลนีของ transformants ที่คัดเลือกได้จากงานเพาะเชื้อแข็ง LB+Tc ไปขยี้ด้วยแท่งแก้วแล้วหยดทับด้วยสารละลาย 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose (4-MUG) แล้วนำไปจุดเรืองแสงสีฟ้าสว่าง (light blue fluorescence) ภายใต้เครื่อง UV transilluminator จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ และนำไปยืนยันการมี ดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรส (agarose gel) [8-9]

ทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ของ transformants โดยวิธี well diffusion

แยกบ่มเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR050 (ควบคุมผลลบ) และ transformants ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนใสไปกรองด้วยเยื่อกรองขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี well diffusion โดยนำไปหยดลงในหลุมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TS ที่ได้ป้ายจุลินทรีย์ดัชนีที่มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 0.5 ไว้ก่อนแล้ว นำไปบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อบันทึกในหน่วยเซนติเมตร

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติก

สามารถคัดเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียแลคติกที่มีลักษณะโคโลนี ขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จำนวน 76 ไอโซเลต และย้อมเซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนไม่สร้างสปอร์ แต่พบว่าไอโซเลตทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นดัชนีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TS แต่ถ้านำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จะยังคงพบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นดัชนีเมื่อทดสอบด้วยวิธีซิดเชื้อ และไอโซเลตส่วนใหญ่ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion ยกเว้นไอโซเลต A กับ E ที่แยกได้จากหมนมปลายังคงแสดงฤทธิ์ด้าน *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ดี และที่น่าสนใจคือไอโซเลต G ที่แยกได้จากหมนมปลาแสดงฤทธิ์ด้าน *E. coli* และ *B. subtilis* ได้ดี และสังเกตเห็นว่า *B. subtilis* ถูกด้านการเจริญได้ดีที่สุด แต่เมื่อปรับค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต A E และ G ให้เป็นกลางก่อนนำ

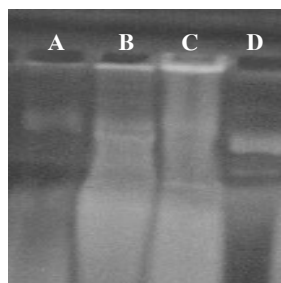
จากงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 21 ประจำปี 2554

ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นดัชนี พบว่าฤทธิ์ดังกล่าวหายไปเมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion เช่นเดิม

แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ซึ่งเป็น selective media สำหรับ *Lactobacillus* spp. [5] จะให้โคโลนีสีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ ให้ผลลบกับการทดสอบ catalase เมื่อนำโคโลนีไปย้อมสีแบบแกรมจะย้อมติดสีแรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ซึ่งตรงกับลักษณะของไอโซเลตที่แยกออกมาได้จากการทดลองในครั้งนี้ แต่ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัชนีของไอโซเลตที่คัดเลือกลูกออกมาได้ยังให้ผลที่ไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion ซึ่งอาจเนื่องมาจากระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ไม่สามารถทดสอบผลการยับยั้งของจุลินทรีย์ดัชนีได้ นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี well diffusion มีข้อจำกัดในด้านการแพร่ของสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดโมเลกุลของสารแบคทีเรียโอซิน ดังนั้นควรทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี broth dilution เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบ [5] อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปรับ pH ยังคงมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดัชนีแต่เมื่อปรับ pH เป็นกลางจะทำให้ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เป็นฤทธิ์ของกรด เพราะโดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียแลคติกสามารถหมักย่อยน้ำตาลแล้วให้กรด โดยเฉพาะในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria จะให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียวสูงถึงร้อยละ 85-95 [2-3]

การปรับปรุงสายพันธุ์ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นดัชนีของ transformants เมื่อทดสอบโดยวิธี well diffusion

L. plantarum TISTR 050 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วย UV เป็นเวลา 10 นาที ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านยีสต์ดัชนีได้เท่าเดิม แต่หากมีการนำยีนไคตินเนสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านตัวเดิม (*L. plantarum* TISTR 050 host) พบว่าในเบื้องต้นสามารถคัดเลือก transformants ได้จำนวน 2 ไอโซเลต ที่สามารถแสดงออกของยีนไคตินเนสเมื่อทดสอบด้วยวิธีซีเชลล์และสังเกตเห็นแถบของดีเอ็นเอได้จาก transformants เมื่อนำไปวิ่งในวุ้นอะกาโรส ดังภาพที่ 1



lane A - ดีเอ็นเอจาก *L. plantarum*
lane B - ดีเอ็นเอจาก transformant 1
lane C - ดีเอ็นเอจาก transformant 2
lane D - ยีนไคตินเนส pHYB43

ภาพที่ 1 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก transformants (lane B และ C). ตำแหน่งลูกศรชี้ () คือยีนไคตินเนส

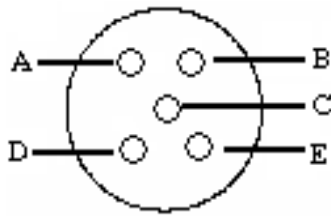
น้ำเลี้ยงเชื้อจาก transformants แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นดัชนีได้ไม่แตกต่างจาก *L. plantarum* TISTR 050 เจ้าบ้าน แต่สังเกตเห็นว่าแสดงฤทธิ์ในการต้าน *M. luteus* TISTR 884 สูงกว่า *L. plantarum* TISTR 050 เจ้าบ้าน (ตารางที่ 1) เมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อ transformants เมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion

ส่วนใสจาก	clear zone (เซนติเมตร)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. plantarum</i>	1.5	1.5	2.0	2.2	-	1.2
transformant 1	1.4	1.4	1.5	2.5	-	1.2
transformant 2	1.4	1.7	1.8	2.4	-	1.2
น้ำกลั่น	-	-	-	-	-	-
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS	-	-	-	-	-	-

L. plantarum, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (TISTR 050); *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517); *B. subtilis*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008); *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (TISTR 781); *M. luteus*, *Micrococcus luteus* TISTR 884 ; *C. albicans*, *Candida albicans* DSM 70014 (TISTR 5239); *E. coli*, *Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887); transformant 1 และ transformant 2, *L. plantarum* TISTR 050 ที่มียีนโคดิเนสไอโซเลตที่ 1 และไอโซเลตที่ 2

จากงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 21 ประจำปี 2554



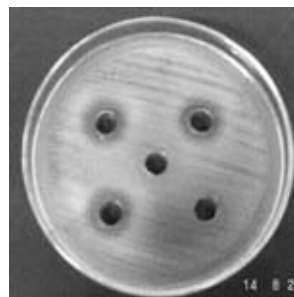
A – *Lactobacillus plantarum* , D – transformant 2

B – transformant 1 , E – น้ำกลั่น

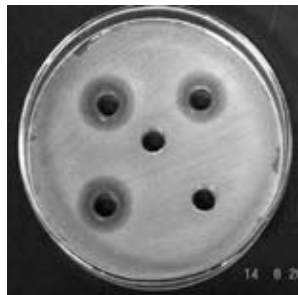
C – อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS



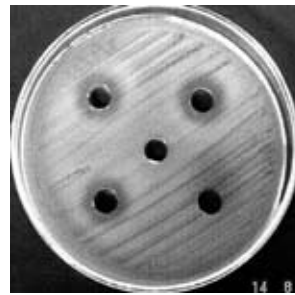
Staphylococcus aureus



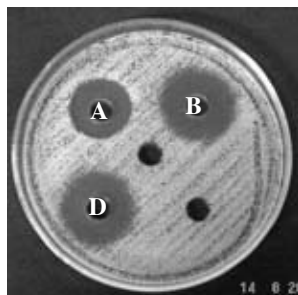
Bacillus subtilis



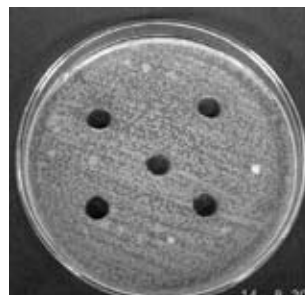
Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



*Micrococcus luteus**



Candida albicans

ภาพที่ 2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อ transformants เมื่อทดสอบด้วยวิธี well diffusion
*น้ำเลี้ยง transformants แสดงฤทธิ์ต้าน *M. luteus* (หลุม B และ D) ได้ดีกว่าเจ้าบ้าน (หลุม A) โดยดูจากขนาดวงใสที่กว้างขึ้น

การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของไอโซเลตที่นำไปผ่าน UV ยังให้ฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกับไอโซเลตดั้งเดิม(เจ้าบ้าน) (*L. plantarum* TISTR 050) แต่เมื่อมีการนำยีนโคตินเนสใส่เข้าไปใน *L. plantarum* TISTR 050 เจ้าบ้าน พบว่า transformants ที่มีการแสดงออกของยีนโคตินเนสแสดงฤทธิ์ด้าน *M. luteus* TISTR 884 ได้ดีกว่าเจ้าบ้านอาจเนื่องมาจากเป็นฤทธิ์ร่วมกันระหว่างกรดและเอนไซม์โคตินเนสที่ transformants ผลิตออกมาสามารถย่อยโคติน [polymer ของ N-acetylglucosamine (NAG) เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง β -1,4) [10] ซึ่งมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับ peptidoglycan [polymer ของ NAG กับ N-acetylmuramic acid (NAM) เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง β -1,4)] ที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย [11] ที่ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ lysozyme เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถทำลายพันธะไกลโคซิดิกได้เช่นเดียวกัน รวมทั้งสามารถถูกชักนำให้มีการผลิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีโคติน ไคโตซาน และ peptidoglycan ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ [12]

สรุปผลการวิจัย

ไอโซเลตแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารแสดงฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นดัชนีได้ไม่ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TS และเมื่อปรับ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อให้เป็นกลางก่อนนำไปทดสอบ แสดงว่าฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ดัชนีน่าจะเป็นฤทธิ์ของกรด และสังเกตเห็นได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ปรับ pH ออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 ที่มีการผลิตเอนไซม์โคตินเนสออกฤทธิ์ด้าน *Micrococcus luteus* TISTR 884 ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ดัชนีอื่นๆ จากงานวิจัยครั้งนี้จะมีประโยชน์ในการคัดเลือก ไอโซเลตของแบคทีเรียแลคติกและแนวทางปรับปรุงสายพันธุ์อย่างเหมาะสมเพื่อพัฒนาใช้เป็นโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5080008) และทุนสนับสนุนบางส่วนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (WU-51109) ขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] ปาริชาติ พุ่มขจร และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. (2542). การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทรีโอซินจากอาหารหมัก. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 11(2), 65-71.
- [2] ปาริชาติ พุ่มขจร และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. (2543). แลคติกแอซิดแบคทีเรีย:สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 12(3), 101-7.
- [3] ปาริชาติ พุ่มขจร พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ยุภารัตน์ เครือวงษา. (2543). ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทรีโอซิน ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 28(1), 22-30.

จากงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 21 ประจำปี 2554

- [4] วิลาวณิชย์ เจริญจิระตระกูล. (2543). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. **สงขลานครินทร์ วทท.** 22(2), 177-89.
- [5] ชูตินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา จันทรวดี โล่เสถียรกิจ และ ศิริมา สุวรรณภู. (2545). สารแบคทีเรียโอสตินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร. **วารสารวิชาการ ม.อบ.** 4(2), 10-20.
- [6] Sybesma, W., Hugenholtz, J., de Vos, W.M. and Smid, E.J. (2006). Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. **Elec J Biotechnol.** 9(4), 424-48.
- [7] Alegre, M.T., Rodriguez, M.C. and Mesas, J.M. (2004). Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA. **FEMS Microbiol Lett.** 241, 73-7.
- [8] ศิริพร สิทธิประณีต. (2531). **พันธุวิศวกรรม: ปฏิบัติการเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ : ส.วิชาการพิมพ์.
- [9] Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbor.
- [10] Bokma, E., van Koningsveld, G.A., Jeronimus-Stratingh, M. and Beintema, J.J. (1997). Hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme. **FEBS Lett.** 441(2-3), 161-3.
- [11] Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-Negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Appl Environ Microbiol.** 66(5), 2001-5.
- [12] Bernasconi, P., Jolles, P. and Pilet, P.E. (1986). Increase of lysozyme and chitinase in *Rubus calli* caused by infection and some polymers. **Plant Sci.** 44(2), 79-83.