การพัฒนาแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักให้มีความสามารถในการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์

ศรีสรรค์ ปูพบุญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

DEVELOPMENT OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED FOOD FOR BEING ABLE TO DELIVER DNA INTO HUMAN BODY

SRISAN PHUPABOON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักให้มีความสามารถในการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์

ผู้วิจัย นายศรีสรรค์ ปูพบุญ

คณะกรรมการสอบ

ดร.อดิเทพชัยย์การณ์ ภาชนะวรรณ	ประธานกรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร	กรรมการ
ดร.ศันสนีย์ ชวนะกุล	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร)

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์) (รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2558

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จและความภาคภูมิใจของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความช่วยเหลือ ความเสียสละ และการเอาใจใส่เป็นอย่างดีจาก ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ด้วยความกรุณาจากท่านอาจารย์ทั้งสองท่านที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและแก้ไขปัญหา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ จึงทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดีตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ตลอดจนให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีรัตน์ ไชยคง ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหา ในการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่านที่คอยดูแล ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวปูพบุญ ที่คอยชี้แนะแนวทาง คอยให้กำลังใจในยามที่ท้อแท้ และให้การสนับสนุนการเรียนต่อระดับมหาบัณฑิตตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ และขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ศรีสรรค์ ปูพบุญ
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การพัฒนาแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักให้มีความสามารถในการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์

ผู้วิจัย : ศรีสรรค์ ปูพบุญ

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร

คำสำคัญ : แลคติกแอสิดแบคทีเรีย, พลาสมิด, *Enterococcus faecium*

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อนำไปพัฒนาเป็นตัวนำดีเอ็นเอเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ จากการแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (LAB) จากปลาส้มและผักดอง ได้ LAB จำนวน 42 ไอโซเลต โดยแยกได้จากปลาส้มจำนวน 22 ไอโซเลต (SF-01 – SF-22) และแยกได้จากผักดองจำนวน 20 ไอโซเลต (SV-01 – SV-20) ในบรรดา LAB ที่แยกได้ทั้งหมดมีเพียง 10 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ทั้ง *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* โดยทั้งหมดเป็น LAB ที่แยกได้จากปลาส้ม (SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-15, SF-17, SF-18, SF-20 และ SF-22) เมื่อนำ LAB ทั้ง 10 ไอโซเลตดังกล่าวไปศึกษาการทนกรด และเกลือน้ำดี พบว่าเฉพาะ LAB รหัส SF-09 เท่านั้นที่สามารถทนกรดที่ pH เท่ากับ 2 และทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.30% ได้ ด้วยเหตุนี้จึงเลือก LAB รหัส SF-09 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป การตรวจสอบสายพันธุ์ของ LAB รหัส SF-09 โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ของ LAB ดังกล่าวคล้ายกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* strain LMG 11423 ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายเท่ากับ 99% ดังนั้นจึงเรียก LAB ดังกล่าวว่า *E. faecium* SF-09 การทดลองสกัดพลาสมิดจาก *E. faecium* SF-09 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด เมื่อทดลองนำ DNA vector pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 โดยวิธี electroporation พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถรับเอา pFLP1 เข้าสู่เซลล์ได้ และพลาสมิดดังกล่าวยังสามารถคงอยู่ภายในเซลล์ของ *E. faecium* SF-09 ได้นานถึง 100 generation จากคุณสมบัติของ *E. faecium* SF-09 ที่เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร สามารถทนกรดที่ pH เท่ากับ 2 และทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3% และยังสามารถรับ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้ *E. faecium* SF-09 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ให้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ต่อไป

ABSTRACT

TITLE : DEVELOPMENT OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED FOOD FOR BEING ABLE TO DELIVER DNA INTO HUMAN BODY

AUTHOR : SRISAN PHUPABOON

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOTECHNOLOGY

ADVISOR : PROF. PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON, Ph.D.

CO-ADVISOR : ASST. PROF. PARICHAT PHUMKHACHORM, Ph.D.

KEYWORDS : LACTIC ACID BACTERIA, PLASMID, *Enterococcus faecium*

This study aims to find a suitable lactic acid bacterium for further development as a vehicle to deliver DNA into human body. From the isolation of lactic acid bacteria (LAB) from Pla Som (fermented fish) and fermented vegetable, 42 LAB isolates were obtained. Among them, 22 (SF-01 – SF-22) and 20 (SV-01 – SV-20) LAB isolates were isolated from Pla Som and fermented vegetable, respectively. Of the isolated LAB, only 10 isolates had antimicrobial ability against both *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. All of them were originated from Pla Som (SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-15, SF-17, SF-18, SF-20 and SF-22). When 10 LAB isolates having antimicrobial activity were tested for their tolerance to acid and to bile salt, it was found that only LAB SF-09 was tolerant to acid at pH 2 and to bile salt at the concentration of 0.3%. Based on the results, LAB SF-09 was selected for further study. The identification of LAB SF-09 by 16S rDNA sequence analysis revealed that its 16S rDNA sequence showed 99% homology to that of *Enterococcus faecium* strain LMG 11423. Therefore, LAB SF-09 was designated *E. faecium* SF-09. Plasmid isolation showed that *E. faecium* SF-09 contained no plasmid. The introduction of DNA vector pFLP1 into *E. faecium* SF-09 cells was successful by electroporation and the vector was found to be stable in the cells for 100 generations. Since *E. faecium* SF-09 was isolated from food, tolerant to acid at pH 2 and to bile salt at the concentration of 0.3% and able to use pFLP1 as

a DNA vector, it had potential for further genetic modification as a vehicle to deliver DNA into human body.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria: LAB)	4
2.2 จุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotics)	13
2.3 วัคซีน (Vaccine)	20
2.4 ดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine)	23
2.5 Genetic engineering และการประยุกต์ใช้กับแลคติกแอสิดแบคทีเรีย	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัตถุดิบ และเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย และยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์	36
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	38
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก	44
4.2 การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย	47
4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก	53
4.4 การตรวจสอบการมีพลาสมิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09	57
4.5 การนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย	57

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของ *E. faecium* SF-09 กับ *E. faecium* SF-09 Transformant	59
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**62**
เอกสารอ้างอิง	**71**
ภาคผนวก	
ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	90
ข วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	95
ค ผลงานทางวิชาการ	97
ประวัติผู้วิจัย	**113**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ข้อดี และข้อจำกัดของดีเอ็นเอวัคซีน	25
2.2	Lactic acid bacteria vaccine	30
4.1	รหัสและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่แยกได้จากอาหารหมัก	45
4.2	ผลการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc	48
4.3	อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับ pH ต่างๆ	51
4.4	อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี เท่ากับ 0.15% และ 0.3%	52
4.5	ผลการทดสอบความสามารถของ *E. faecium* SF-09 (SF-09) และ *E. faecium* SF-09 transformation (SF-09T) ในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc	60
4.6	อัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* SF-09 (SF-09) และ *E. faecium* SF-09 transformation (SF-09T) ที่ระดับ pH ต่างๆ	61
4.7	อัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* SF-09 (SF-09) และ *E. faecium* SF-09 transformation (SF-09T) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3%	61

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	44
4.2	ลักษณะของโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ paper disc จากการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc	47
4.3	อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับ pH ต่างๆ	51
4.4	อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3%	52
4.5	การติดสีแกรม และรูปร่างของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	53
4.6	แผนผังการจำแนกชนิดแลคติกแอสิดแบคทีเรียของ Schilliinger and Lucke (1989)	54
4.7	Agarose gel แสดง PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09; Lane 1 = pGEM DNA marker; Lane 2 = PCR product ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09	55
4.8	ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09	55
4.9	ลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* strain LMG 11423	56
4.10	การวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 โดยวิธี agarose gel; Lane 1 = DNA marker (lambda DNA cut with HindIII); Lane 2 = พลาสมิดที่สกัดได้จาก *L. plantarum* N014-FLP; Lane 3 = พลาสมิดที่สกัดได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09	57
4.11	การเจริญของ *E. faecium* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-Cd agar หลังจากการทำ electrotransformation; a ชุดควบคุม (เป็นการทำ electrotransformation ที่ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทน pFLP1); b ชุดทดลอง (เป็นการทำ electrotransformation ที่ใช้ pFLP1)	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.12	การศึกษาพลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant โดยวิธี agarose gel electrophoresis (แสดงผลของ *E. faecium* SF-09 transformant เพียง 1ตัว); Lane 1 = DNA marker (lambda DNA cut with HindIII); Lane 2 = พลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant; Lane 3 = DNA ที่ได้จากการตัดพลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant ด้วย KpnI และ BamHI	59
4.13	growth curve ของ *E. faecium* SF-09 และ *E. faecium* SF-09 transformant	60
5.1	แผนภาพการสร้าง pFLP1	68
5.2	แผนภาพการสร้าง pHW112	70

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และสามารถสร้างกรดแลคติกได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียหลายจีนัส (genus) ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* ด้วยเหตุที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียมักถูกใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร โดยเฉพาะอาหารหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมักพบได้ทั่วไปในอาหาร และเป็นแบคทีเรียที่มนุษย์รับเข้าสู่ร่างกายอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นแลคติกแอสิดแบคทีเรียจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย หรือเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS)

การให้วัคซีนจัดเป็นวิธีการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง โดยอาศัยหลักการที่ว่าวัคซีนทำหน้าที่เสมือนเป็น antigen ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีความพร้อมในการสร้าง antibody ที่จำเพาะ ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับ antigen ตัวเดิมเข้าไปอีกครั้งหนึ่ง ระบบภูมิคุ้มกันก็จะสามารถตอบสนองต่อ antigen ดังกล่าวได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ (Liu, 2011 (a)) การให้วัคซีนโดยการกิน เป็นวิธีการที่จัดว่าง่าย สะดวก และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการให้วัคซีนโดยวิธีอื่น เช่น วิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง หรือ เข้าไปในกล้ามเนื้อ การป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยการให้วัคซีน ในอดีตที่ผ่านมานิยมใช้แบคทีเรียก่อโรคที่ถูกทำให้หมดความสามารถในการก่อโรคแล้ว หรือที่เรียกว่าแบคทีเรียก่อโรคอ่อนฤทธิ์ (attenuated pathogenic bacteria) เป็นวัคซีน ตัวอย่างเช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) จะใช้ *Salmonella typhimurium* ที่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์แล้วเป็นวัคซีน (Sizemore et al., 1995) หรือ วัคซีนป้องกันโรควัณโรคบีซีจี (BCG tubeculosis) จะใช้ *Mycobacterium bovis* BCG ที่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์แล้วเป็นวัคซีน (Wang et al., 2004) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทำให้แบคทีเรียก่อโรคอ่อนฤทธิ์ และขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียดังกล่าวมีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และไม่สะดวก อีกทั้งการใช้แบคทีเรียก่อโรคอ่อนฤทธิ์เป็นวัคซีนยังเสี่ยงต่อการที่แบคทีเรียก่อโรคเกิดกลายพันธุ์กลับมาก่อโรคได้อีก ซึ่งจะทำให้ผู้ที่รับวัคซีนเข้าไปเกิดโรคได้ (Liu, 2011 (a)) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความสนใจที่จะนำแบคทีเรียที่ปลอดภัย และไม่ก่อโรคมาใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ แบคทีเรียที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากที่จะนำมาใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ คือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในอาหาร หรือ food-grade lactic acid bacteria

เนื่องจากแบคทีเรียประเภทนี้ถูกจัดให้เป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย และมีการรับเข้าสู่ร่างกายมนุษย์อยู่เป็นประจำอยู่แล้ว ข้อดีของการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในอาหารมาใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ นอกจากมีความปลอดภัยแล้ว แลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ยังมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อสารต่าง ๆ ในทางเดินอาหาร เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ และน้ำดี เป็นต้น นอกจากนี้แล้วการที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารได้ก็เป็นปัจจัยสนับสนุนที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ เพราะแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะอยู่ในทางเดินอาหารได้นานพอที่จะผลิตวัคซีนไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ ที่ผ่านมามีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในอาหารมาใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ เช่น *Lactococcus lactis* (Mannam et al., 2004), *Lactobacillus casei* (Wei et al., 2010), *Lactobacillus acidophilus* (Mohammadzadeh et al., 2009) และ *Streptococcus gordonii* (Lee et al., 1999)

ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งของการพัฒนาแลคติกแอสิดแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ คือ การมี expression vector ที่เหมาะสมที่จะทำให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีนที่จะทำหน้าที่เป็นวัคซีนได้ โดย expression vector ดังกล่าวต้องสามารถคงอยู่ และเพิ่มจำนวนได้ในแลคติกแอสิดแบคทีเรีย นอกจากนี้แล้วยังต้องสามารถรับเอายีนที่สนใจเข้าไปอยู่ในตำแหน่งที่ทำให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีนจากยีนดังกล่าวได้ โดยโปรตีนที่สร้างได้จากยีนดังกล่าวก็คือตัวที่จะทำหน้าที่เป็นวัคซีนนั่นเอง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นตัวนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ต่อไป ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวได้แก่ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด การทนต่อน้ำดี และการมี expression vector ภายในเซลล์ เพื่อใช้ในการรับเอายีนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเข้าสู่เซลล์ได้ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาและพัฒนาต่อเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นตัวนำวัคซีนเข้าร่างกายมนุษย์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหารหมัก

1.2.3 เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.2.4 เพื่อตรวจสอบการมีพลาสมิด (plasmid) ในแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.2.5 เพื่อนำ vector DNA ที่เหมาะสมเข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 คัดแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

1.3.2 คัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ดังนี้

1.3.2.1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

1.3.2.2 สามารถการเจริญเติบโตได้ในเกลือน้ำดี

1.3.2.3 สามารถมีชีวิตอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรด (acid tolerance)

1.3.3 จัดจำแนกแลคติกแอสิดแบคทีเรียในระดับจีนัสและสปีชีส์

1.3.3.1 โดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา

1.3.3.2 โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

1.3.4 ตรวจสอบการมี plasmid ภายในแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

1.3.5 นำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย โดยวิธี electroporation

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria: LAB)

จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอาหารหมัก พบทั่วไปในธรรมชาติและพบมากในน้ำนม เนื้อสด ส่วนในผักและผลไม้พบบ้างเล็กน้อย แลคติกแอสิดแบคทีเรียนอกจากจะมีบทบาทในการแปรรูปอาหารหมักดองแล้ว ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียร่วมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคอีกด้วย

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติกแอสิดแบคทีเรียจัดอยู่ใน family *Lactobacillaceae* ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) และรูปร่างแท่ง (bacilli) มีการเรียงตัวแบบคู่ แบบสี่ (tetrad) และแบบโซ่ยาวเป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือด่าง (อัจฉรา หนูเพชร, 2546) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตะบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ตัวอย่างของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบทั่วไป ได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus* และ *Leuconostoc* (Wood and Holzapfel, 1995) แลคติกแอสิดแบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นทำให้ค่า pH ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร อีกทั้งยังพบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีการสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และไดอะซิติล (diacetyl) (Lasen et al., 1993; Brink et al., 1994) หากจัดแบ่งแลคติกแอสิดแบคทีเรียตามการใช้สารอาหาร

และการสร้างสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมัก (Axelsson, 1993; Kandler and Weiss, 1986) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1.1.1 Homofermentative lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่หมักน้ำตาลกลูโคส โดยการเปลี่ยนไพรูเวท (pyruvate) และอาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80% โดยผ่าน glycolysis (Embden-Meyerhof Parnas pathway: EMP) แลคติกแอสิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิดประกอบด้วย *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

2.1.1.2 Heterofermentative lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25%, กรดแลคติก 50%, กรดอะซิติก และเอทานอล 20-25% โดยผ่าน phosphoketolase pathway แลคติกแอสิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus brevis*

2.1.2 การจัดจำแนกแลคติกแอสิดแบคทีเรียตามจีนัส

ในปี ค.ศ. 1919 Orla-Jensen เริ่มจัดอนุกรมวิธานแลคติกแอสิดแบคทีเรีย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดและความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งแลคติกแอสิดแบคทีเรียออกเป็น 7 จีนัส ประกอบด้วย *Betabacterium, Thermobacterium, Streptobacterium, Streptococcus, Betacoccus, Microbacterium* และ *Tetracoccus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Wood and Holzapfel ได้จัดจำแนกแลคติกแอสิดแบคทีเรียออกเป็น 9 จีนัส ประกอบด้วย *Bacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* และ *Sporolactobacillus* ปัจจุบันแลคติกแอสิดแบคทีเรียถูกจัดจำแนกเป็น 12 จีนัส ได้แก่ *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus,* และ *Weissella* (Wood and Holzapfel, 1997) แบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยากระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ และชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติกรวมถึงข้อมูลด้านพันธุกรรม (De Vuyst and Vandamme, 1994) ได้แก่

2.1.2.1 Genus *Streptococcus*

สกุลนี้มีรูปร่างกลมหรือรูปวงรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายชนิดเป็นปรสิตในคน และบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่

อุณหภูมิ 20-41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 ชนิด มีโมเลกุล G+C ระหว่าง 34-36 เปอร์เซ็นต์ (Hardie and Whiley, 1995)

2.1.2.2 Genus *Vagococcus*

เป็นแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *V. flauvalis* ซึ่งเดิมอยู่ใน streptococci กลุ่ม N และ *V. samoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.2.3 Genus *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปวงรีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด *Lc. lactic* subsp. *lactic, Lc. lactic* subsp. *cremoris, Lc lactic* subsp. *hordniae, Lc. garvieae, Lc. pantarum, Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34-43 เปอร์เซ็นต์ (Teuber, 1995)

2.1.2.4 Genus *Enterococccus*

เซลล์มีรูปร่างวงรี จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคสต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *Ent. faecalis*, *Ent. faecium, Ent. avium, Ent. galinarum* และ *Ent. cecorum* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ (Derviese and Pot, 1995)

2.1.2.5 Genus *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่สองในทิศด้านขวามือของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์สี่เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส ในสภาวะไร้อากาศผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางชนิดทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 ชนิดได้แก่ *Pediococcus acidilactici, P. damonosus, P. dextrinicus, P. inopinatus, P. parvulus,* และ *P. pentosaceus* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34-44 เปอร์เซ็นต์ (Simpson and Tagchi, 1995)

18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16S rDNA ใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Simpson and Taguchi, 1995)

2.1.2.7 Genus *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *A. viridans* และ *A. urinae* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์ เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์ (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.2.8 Genus *Leuconostoc*

เซลล์มีสัณฐานวิทยาขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยเพิ่มกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 ชนิด ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides, Leuc. lactis, Leuc. gelidum, Leuc. carnosum, Leuc. psedomesenteroides, Leuc. citreum, Leuc. argentinum* และ *Leuc. fallzx* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ (Dellaglio, Dicks and Torriani, 1995)

2.1.2.9 Genus *Oenococcus*

สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนกรดและเอทานอลปริมาณสูงรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16S rDNA ต่างจากชนิดอื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio, Dicks and Torriani, 1995)

2.1.2.10 Genus *Weissella*

รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลมซึ่งมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* ซึ่งเดิมจัดอยู่ในกลุ่ม *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 7 ชนิด ได้แก่ *Leuconostoc paramesenteroides* (*Weissella* paramesenteroides), *Lactobacillus confuses* (*W. confuses*), *L. halotolerans* (*W. halotolerans*), *L. kandleri* (*W. kandleri*), *L. minor* (*W. minor*), *L. viridescens* (*W. viridescens*) และชนิดใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.2.11 Genus *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ภายในสกุลสูง คือระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) พบในแหล่งต่างๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ พบใน

สัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนกลม (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 ชนิด ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles and Holzapfel, 1997) คือ

1) กลุ่ม obligately homofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลแลคโตส (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโตสและกลูโคเนสไม่ได้

2) กลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโตสได้

3) กลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทได้แลคเตต เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

2.1.2.12 Genus *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส มีทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Carnobacterium divergens, C. piscicola, C. gallinarum, C. mobile, C. funditum* และ *C. alterfunditum* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 31.6 -37.2 เปอร์เซ็นต์ (Schillinger and Holzapfel, 1995)

Salminen and Wright (1998) กล่าวว่าสำหรับ Bifidobacterium มีสารพันธุกรรมที่สัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก Actinomycetaceae มีการหมักน้ำตาลแตกต่างจากกลุ่มของแบคทีเรียข้างต้นจึงไม่จัดอยู่ในกลุ่มของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีหลายรูปร่าง เช่น รูปตัววาย วี โค้ง (bent) กระบอก (club) โดยจะไม่พบเชื้อในลักษณะที่เป็นสายยาว เจริญได้ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (obligately anaerobe) มีลักษณะคล้ายแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำพวก heterofermentative lactic acid bacteria เนื่องจากสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดอะซิติกและกรดแลคติก

2.1.3 สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (อัจฉรา หนูเพชร, 2546)

แลคติกแอสิดแบคทีเรียนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่า

เสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งปนเปื้อนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, C. perfringens, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* เป็นต้น ซึ่งสารที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติก รวมทั้งมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อยกว่ากรด แลคติกและกรดอะซิติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล อะซิโตอิน อะซิทัลดีไฮด์ เบนโซเอต เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และแบคเทอริโอซิน รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (Franz et al., 1998) สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่สร้างโดยแลคติดแอสิดแบคทีเรีย มีดังต่อไปนี้

2.1.3.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

สร้างโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ กรดแลคติก และกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกสามารถยับยั้งได้ดีกว่ากรดแลคติก และมีช่วงการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองพร้อมกันจะให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้ว กรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโทรพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรด จึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Bojana and Irena, 1998)

2.1.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H_2O_2)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ สามารถพบได้ในกลุ่มของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย เนื่องจากไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสทำลายฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิด superoxide radicals (O^{-2}) และ hydroxyl radicals (OH^-) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมเป็นจำนวนมากก็จะมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์อื่นๆ ตลอดจน แลคติกแอสิดกลุ่มรูปร่างกลม และรูปท่อน (Caplice and Fitzgerld, 1999)

2.1.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide: CO_2)

เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสแบบ heterofermentative ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนส่งผลให้ไม่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์และรอบๆเซลล์ลดลง มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย นอกจากนี้ King and Nagel (1975) กล่าวว่า วิถีเมตาบอลิซึมอื่นๆ ก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่น

(decarboxylation) และการสะสมของคาร์บอนไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงๆ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.1.3.4 ไดอะซิทิล (diacetyl หรือ 2,3-butanedione)

เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวทโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แลคติกแอสิดแบคทีเรียทั้ง *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิทิลได้ ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย โดยจะมีการสร้างสารไดอะซิทิลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และบางครั้งอาจเกิดขึ้นจากการใช้ซิเตรต (citrate) โดยซิเตรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวท ไปเป็นสารไดอะซิทิล และอาจอยู่ในรูปรีดิวซ์คือ อะซิโตอิน (acetoin) (Caplice and Fitzgerld, 1999) นอกจากนี้แล้วไดอะซิทิลและแบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (food borne pathogen) (Krier et al., 1998)

2.1.3.5 ริวเทอรีน (reuterine)

มีชื่อทางเคมีว่า 3-hydroxypropanol เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่ pH ปานกลาง สร้างมาจากแบคทีเรียพวก *Lc. ruterin* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา โปรโตซัว ยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella, Staphylococcus, Listeria* และ *Clostridium* (อรวินทร์ เลาหรัชตนันท์, 2532)

2.1.3.6 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

เป็นสารประเภทโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีฤทธิ์ในการยังยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตัวเองสร้างขึ้นมา จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งการเจริญจากแบคเทอริโอซินที่ตัวเองสร้างขึ้น การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียเชื่อว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลากหลายชนิดอยู่ร่วมกัน ทำให้เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ก็ไม่สามารถเจริญเติบโตและถูกทำลายไปในที่สุด (Jack et al., 1995)

แบคเทอริโอซินมักออกฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยผนังเซลล์ ซึ่งมีเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลัก มีลักษณะเป็นร่างแห ทำให้แบคเทอริโอซินเข้าสู่ชั้นของเมมเบรนได้ง่าย ในชั้นนี้แบคเทอริโอซินมักทำให้เกิดรูขึ้นกับเมมเบรน ซึ่งทำให้ของเหลวต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกจากเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย (อรัญญา สังขศรี, 2541)

2.1.4 ประโยชน์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติกแอสิดแบคทีเรียมีประโยชน์ในด้านสุขภาพ เพราะในผลิตภัณฑ์อาหารหมักพบแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ หรือทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ ดังนั้นจึงมีความนิยมที่จะหันมาบริโภคอาหารที่มีแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีชีวิต และแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใกล้เคียง คือ *Bifidobacterium* spp. ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโปรไบโอติก (probiotics) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีประโยชน์หลายด้าน คือ ป้องกันโรคออสทีโอโพโรซิส (โรคกระดูกผุ) การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ความสามารถในการทำลายจุลิรทรีย์ก่อโรค ลดอาการแพ้นม ลดการขาดสารอาหาร การลดความวิตกกังวล การต้านเซลล์มะเร็ง การแก้สิวและฝ้า การขจัดสารพิษจากตับ การลดความผิดปกติในระบบการย่อยอาหาร ลดการแพ้อาหาร เพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมเกลือแร่และธาตุเหล็ก ช่วยในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และลดอาการภูมิแพ้ในร่างกาย (อัจฉรา หนูเพชร, 2546) และยังพบว่า แลคติกแอสิดแบคทีเรียยังมีบทบาทอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น ใช้เป็นจุลชีพทดสอบ (test organisms) ในการวิเคราะห์วิตามิน (จินตลา ลิ้มภักดี, 2544) บางสายพันธุ์ใช้ผสมในอาหารสัตว์แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะกลุ่ม *Lactobacilli* เช่น *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbruekii* ssp. *lactis*, *L. reuteri*, *Bif. bifidum* และ *Ent. faecium* บางชนิดสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งถือว่ามีประโยชน์ต่อระบบดังกล่าว ด้วยเหตุนี้เซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียเหล่านี้จึงถูกเติมในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ในรูปแบบของโปรไบโอติกสำหรับการบริโภค นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacilli* ยังมีประโยชน์ในการเป็น carrier ในระบบภูมิคุ้มกันในช่องปากอีกด้วย (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

2.1.4.1 การผลิตกรดแลคติก เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมการผลิตยาและสารเคมีบางชนิด

2.1.4.2 การผลิตหญ้าหมัก หญ้าหมัก คือ พืชอาหารสัตว์ต่างๆ ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพความชื้นสูงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ซึ่งการเก็บถนอมในลักษณะการหมักแบบนี้สามารถอยู่ได้เป็นเวลานาน โดยส่วนประกอบต่างๆ และคุณค่าทางอาหารไม่เปลี่ยนแปลงสำหรับไว้ใช้เป็นอาหารสัตว์ในช่วงขาดแคลนหญ้าสด แลคติกแอสิดแบคทีเรียทำให้หญ้ามีค่า pH ต่ำ ซึ่งทำให้หญ้าหมักเก็บไว้ได้นานแต่ในหญ้ามีปริมาณน้ำตาลที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้น้อย ดังนั้นจึงต้องมีการเติมยีนแอลฟา- อะไมเลส และเอนโดกลูคาเนส เข้าไปในแลคติกแอสิดแบคทีเรียเพื่อให้เชื้อสามารถผลิตน้ำตาลที่จะใช้เปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้อย่างเพียงพอ

2.1.4.3 การใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียร่วมกับยีสต์เพื่อผลิตไวน์ผลไม้ ในการผลิตไวน์ผลไม้ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสในน้ำผลไม้ให้เป็นเอทานอล จากนั้นแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะ

เปลี่ยนกรดมาลิกที่มีในน้ำผลไม้ให้เป็นกรดแลคติก โดยใช้กระบวนการ malolactic fermentation ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัวและรสชาติที่ดียิ่งขึ้น

2.1.4.4 โปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค โดยช่วยปรับสภาพสมดุลของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร พบได้ในรูปของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต เป็นต้น แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *L. lactis, L. acidophilus, L. crispatus, L. amulovorus* และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น

2.1.4.5 การผลิตสารปฏิชีวนะ แลคติกแอสิดแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ เช่น *L. lactis* ผลิต nisin, *L. cremoris* ผลิต mesenteroicin และ *Ent. faecium* ผลิต enterocin โดยแบคเทอริโอซินเหล่านี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างมากในฐานะที่เป็น biopreservatives ในอาหารหมัก ซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้สารถนอมอาหารที่เป็นสารเคมีและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

Weinberg and Muck (1996) กล่าวถึงการใช้ประโยชน์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์หมัก ซึ่งปัจจุบันได้มีการผลิตเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียแบบเชิงพาณิชย์ได้มีการนำมาใช้เติมเข้าไปในกระบวนการหมักของอาหารสัตว์ เพื่อเป็นการปรับปรุงและรักษาคุณภาพของอาหารสัตว์หมักให้ดีขึ้น โดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นิยมใช้กันจะเป็นพวก homofermentative เช่น *Lc. plantarum, Ent. faecium* และ *Pediococcus* spp. ซึ่งแลคติกแอสิดแบคทีเรียเหล่านี้มีประโยชน์ต่อค่าคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water solution carbohydrates, WSC) ของพืช คือถ้าในพืชอาหารสัตว์มี WSC มากเพียงพอกระบวนการหมักก็จะเกิดขึ้นเร็วและสมบูรณ์ จึงช่วยให้พืชหมักมีคุณภาพดียิ่งขึ้นไปด้วย

Chim-anage et al. (2008) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ โดยศึกษาผลของการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเติมลงไปในอาหารเลี้ยงไก่เนื้อต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ไก่เนื้อ พบว่าสามารถลดปริมาณของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* ภายในลำไส้ของไก่เนื้อได้

2.2 จุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotics)

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติกและสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารหรือกระตุ้นคุณค่าทางโภชนาการทางอาหารให้สูงขึ้น (นวลจันทร์ พารักษา, 2533 และ Marteau et al., 2001)

2.2.1 ความหมายของจุลินทรีย์โปรไบโอติก

โปรไบโอติก มีรากศัพท์มากจากภาษากรีก มีความหมายว่า เพื่อชีวิต ซึ่งคำว่า "โปร" หมายถึง การเตรียม ส่วน "ไบโอติก" หมายถึง ชีวิต Lilly and Stillwel (1965) เป็นผู้ริเริ่มให้ใช้คำว่า "โปรไบโอติก" ซึ่งหมายถึงปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ และได้ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกว่า เป็นสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งมีผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ในเวลาต่อมา Parker (1974) ได้ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นกับสัตว์ พบว่ามีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับยาปฏิชีวนะแต่ไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใด ต่อมา Fuller (1989) ได้ให้ความหมายของจุลินทรีย์โปรไบโอติกว่าเป็นอาหารเสริมซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต เมื่อบริโภคแล้วสามารถเข้าไปยึดเกาะบริเวณผิวหน้าของผนังทางเดินอาหาร สามารถเจริญเติบโตและเอื้อประโยชน์ต่อผู้บริโภค เช่น ปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและให้สารบางอย่างเป็นการทดแทน หรือเป็นการแก่งแย่งกับจุลินทรีย์แปลกปลอมที่เข้ามาสู่ระบบทางเดินอาหาร ส่วน Havenar and Huis (1992) ได้ขยายคำจำกัดความของโปรไบโอติกว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงบริสุทธิ์ หรือเซลล์ผสม ได้มาโดยการพัฒนาคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมและมีผลต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตของเจ้าบ้านและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในสัตว์หรือมนุษย์ นอกจากนี้ยังรวมถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในพืชทั้งทางด้านการพัฒนาความสามารถในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น (Havenar and Huis, 1992) หรือป้องกันและยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุในการก่อโรค เช่น *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas syringae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช เป็นต้น (Visser and Holzapfel, 1992)

2.2.2 คุณสมบัติพื้นฐานของจุลินทรีย์โปรไบโอติก

โปรไบโอติกที่ดีต้องสามารถชักนำให้เกิดความสมดุลทางโภชนาการและสุขภาพที่ดีได้ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ในการทำให้เกิดสมดุลภายนอกเซลล์นั้น จุลินทรีย์โปรไบโอติกทั่วไปจะต้องเกิดกระบวนการหมักอาหารให้ได้สารอาหารมากมายหลายชนิด เช่น สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในโยเกิร์ตทำให้ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์จากสารอาหารนี้ได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารยับยั้งจุลชีพ สารยับยั้งการเกิดมะเร็งและคุณสมบัติอื่นๆ อีกหลายชนิด ส่วนคุณสมบัติภายในเซลล์

ของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ต้องการ คือ สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่รองรับจุลินทรีย์นั้น และยังคงมีคุณสมบัติเฉพาะของโปรไบโอติกอยู่ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีดังต่อไปนี้

2.2.2.1 ไม่ก่อให้เกิดหรือสร้างสารพิษ มีความปลอดภัย (GRAS = Generally Recognized As Safe) (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541)

2.2.2.2 สามารถสร้างกรดแลคติก ทำให้ภายในกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยสลายอาหาร และการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตร, 2544) ช่วยปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2.2.2.3 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula et al., 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* ADH สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway et al., 1987) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อ pH ต่ำดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit et al., 1998) *Lactobacillus sake* RM 10 และ *Pediococcus acidilactici* P2 สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่ pH 3 (Erkkila and Petaja, 2000)

2.2.2.4 สามารถทนต่อน้ำดี โดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี และมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงรักษาโรคที่เกิดจากลำไส้ Erkkila และ Petaja (2000) พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30

2.2.2.5 สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ โดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (Peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

2.2.2.6 เมื่อเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2548) สอดคล้องกับรายงานของ Gilliland และ Speck (1979) ที่รายงานว่า *Lactobacillus* ที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหาร คือ *Lactobacillus acidophilus, L. casei* และ *Bifidobacterium bifidus* ซึ่งสามารถมีชีวิตรอดและสามารถเจริญเติบโตในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้

2.2.2.7 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* sp. ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน

ของ Klila และคณะ (1992) ที่มีการนำ *Lactobacillus* sp. จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp.

2.2.2.8 สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β - galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่าง ๆ ให้ดียิ่งขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

2.2.2.9 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogen peroxide และ bacteriocin (Fuller, 1993) ทำหน้าที่เป็นสารเสริมปฏิชีวนะ เพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์ ต้านทานการเกิดโรคก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (Klein et al., 1998)

2.2.2.10 ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร และเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่าง ๆ ในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

2.2.2.11 สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง และวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงผมและเล็บ (Fuller, 1993)

2.2.2.12 เพิ่มจำนวนได้รวดเร็วและสามารถยังคงมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2.2.2.13 ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร และไม่ตกค้าง หรือหลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

2.2.2.14 สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย และสามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ 20-60 องศาเซลเซียส (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

2.2.2.15 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น β - glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β - glucosidase พบว่านมที่ถูกหมักด้วย *L. casei* จะช่วยกระตุ้นการทำงานของ macrophage ในหนูได้ โดยการทดสอบให้หนูกินนมหมักนี้ หลังจากนั้น 8 วันนำหนูมาฆ่า และตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจาก macrophage ในการทดลองนี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ lactase dehydrogenase (LDH) พบว่าการบริโภคนมที่มีส่วนประกอบของ *L. casei* จะมีผลในการเพิ่มระดับ LDH ทำให้ลดการเพิ่มของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้ (Gilliland et al, 1997)

2.2.2.16 ลดระดับ cholesterol ในเลือด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gilliland และคณะ (1997) โดยมีการใช้เชื้อ *L. acidophilus* ควบคุมระดับ cholesterol ได้เนื่องจากจะช่วยดูดซึม cholesterol ในลำไส้ได้ โดยแยกเชื้อ *L. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัคร 9 คน พบว่า *L. acidophilus* O16 จะดูดซึม cholesterol ได้มากที่สุด คือ 50.9 µg/ml และ D5 จะดูดซึมได้

น้อยที่สุด คือ 28 µg/ml ทดสอบการใช้เชื้อผสมของ *L. reuteri* และเชื้อ *L. johnsonii* เป็นอาหารเสริมโปรไบโอติกแก่ลูกสุกรปริมาณ 2×10^{12} cfu ต่อตัวต่อวัน ปรากฏว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด และช่วยเพิ่มความชื้นในมูลสุกรได้

2.2.3 การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการทดสอบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียใดมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก นิยมทำการทดสอบคุณสมบัติของแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังต่อไปนี้

(1) ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

(2) ความสามารถในการทนกรด-เบส และเกลือน้ำดี

(3) ความสามารถในการเกาะติดเซลล์ผนังลำไส้

2.2.3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อก่อโรคสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

Supayang et al. (2006) ใช้วิธี agar disc diffusion ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากช่องคลอดของผู้หญิงสุขภาพดี วิธีนี้จัดเป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย โดยความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ วัดจากความกว้างของโซนใส (clear zone) เกิดขึ้นบนอาหาร

Jacobson et al. (1999) และ Maragkoudakis et al. (2005) ได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *Lactobacillus* spp. ด้วยวิธี agar spot test โดยหยดสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงที่มีเชื้อก่อโรค แล้วนำอาหารกึ่งแข็งมาเททับ เป็นวิธีทดสอบที่ ไม่สิ้นเปลืองอุปกรณ์ต้นทุนต่ำ แต่ผู้วิจัยไม่สามารถควบคุมขอบเขตของสารที่หยดลงบน plate ซึ่งทำให้แปลผลได้ยาก

Mufandaedza et al. (2006) ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้นมดิบและนมหมัก โดยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งทำโดยการใช้ sterile cork borer เจาะอาหารแข็ง แล้วนำสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มาเติมลงในหลุม วิธีนี้เป็นวิธีที่ผู้วิจัยต้องอาศัยความชำนาญในการเจาะหลุม และควรระวังในเรื่องของการเกิดการปนเปื้อน

2.2.3.3 การทดสอบความสามารถในการทนกรด-เบส และเกลือน้ำดี

ความเป็นกรด-เบสมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย อยู่ในช่วงที่เป็นกรดหรือที่ pH 5.5-6.2 หรือต่ำกว่า ส่วนใน pH ที่เป็นกลางหรือเริ่มเป็นด่างทำให้ระยะแรกของการเติบโต (lag phase) ยาวขึ้นหรือเติบโตลดลง (Suskovic et al., 1976) ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก จึงต้องมีการ

ทดสอบการทนต่อสภาวะคล้ายทางเดินอาหารของร่างการ คือ ที่ pH ต่างๆ และในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกผ่านเข้าไปในร่างกายจะพบสภาวะดังกล่าว คือ ที่ปากมี pH ประมาณ 6.8 ที่กระเพาะอาหารมี pH ประมาณ 1.5-3.8 ซึ่งมีความเป็นกรดค่อนข้างสูง ที่ลำไส้เล็ก มี pH ประมาณ 7.8-8.0 และมีน้ำดี ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำดีในลำไส้เล็กประมาณ 0.3% (w/v) (Gilliland et al., 1984)

Pennacchia et al. (2004) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase ในเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียมากกว่า 300 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophillus* และ *Bifidobacterium* sp. เอนไซม์ดังกล่าวจะทำให้แบคทีเรียทนต่อน้ำดี ซึ่งจากการทดลองพบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 273 สายพันธุ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ส่วนใน *Lactobacillus* sp. พบเพียงบางสายพันธุ์ แต่ไม่พบใน *L. lactis*, *Leu. mesenteroides* และ *S. thermophillus* นอกจากนี้ในเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* sp. ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase สูงกว่าในเชื้อ *Lactobacillus* sp. อีกด้วย

Erkkila and Petaja (2000) ทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการทนต่อสภาวะกรด-เบส ที่ pH 1, 2, 3, 4 และ 5 และเกลือน้ำดี (oxgall powder) ความเข้มข้น 0.15% และ 0.3% โดยใช้เชื้อทดสอบปริมาณ 7.4-7.6 log cfu/ml ทดสอบการรอดชีวิตที่เวลา 0, 0.5, 1, 2.5 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถรอดชีวิตที่ pH 3 และทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3% ที่ pH 6 ได้ดีที่สุด

Huang and Adams (2004) ได้ทดสอบความสามารถในการทนกรด pepsin และน้ำดี ของ *Propionibacterium* spp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ สามารถทนกรด pepsin และน้ำดีได้ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีศักยภาพที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกได้

Guerra et al. (2007) ทดสอบความสามารถของโปรไบโอติกที่ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับหมู โดยการปรับสภาวะคล้ายกระเพาะอาหารที่ pH 1, 2, 3, 4, 5 โดยมีการเติม pepsin และ NaCl และสภาวะคล้ายลำไส้เล็กที่ pH 8 พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตได้ดีที่สุดคือ *Lactobacillus casei subsp. casei* CECT 4043 และ *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627

Toit et al. (1998) ทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดี โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดสอบกับเกลือน้ำดีที่ 0.3% (w/v) แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร พบว่า *L. johnsonii* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 ทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3%

ศรัณย์ พรมสาย (2549) ทดสอบความสามารถของ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ SR36 และ SR37 ในการทนเกลือน้ำดี โดยใช้เกลือน้ำดี 2 % (w/v) ที่ pH 4.5 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง จำนวนของเชื้อดังกล่าว ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2.2.3.4 การทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ผนังลำไส้

เมื่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกผ่านทางเดินอาหารไปถึงบริเวณลำไส้ต้องสามารถเกาะติดเยื่อบุลำไส้และฝังตัวที่เยื่อบุลำไส้ โดยยึดครองเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้เล็กได้ เพื่อให้จุลินทรีย์ทำหน้าที่ในการผลิตสารหรือวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกาย หรือแม้แต่การผลิตกรดซึ่งทำให้ pH ในทางเดินอาหารต่ำลง เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ และแย่งจับกับแบคทีเรียก่อโรคบนผนังลำไส้ โดยเกิดกระบวนการแก่งแย่งเพื่อขจัดออก (competitive exclusion)

ที่ผ่านมามีการศึกษาความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียหลายชนิดในการเกาะติดกับเซลล์ผนังลำไส้ เช่น

Jacobsen et al. (1999) ทำการทดสอบความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของ *Lactobacillus* spp. จำนวน 47 สายพันธุ์ กับ Enterocyte-like Caco-2 cell ซึ่งเป็นเซลล์ลำไส้ ซึ่งการทดลองทำโดยเตรียมจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. ในปริมาณ 10^8 cell/ml ปิเปตจุลินทรีย์ใส่จานเพาะเลี้ยง Caco-2 cell ทิ้งไว้นาน 60 นาที ทำการย้อมสีด้วย Giemsa stain solution (1:20) และล้างจนกระทั่งไม่มีสี ตรวจดูผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ อ่านผลโดยสังเกตการณ์เกาะกลุ่มกันของจุลินทรีย์ในเซลล์ลำไส้ ซึ่งผลการทดลองพบว่า *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ 299 299v DSM 1246 LGG 18911-2 19070-2 CHCC 2329 C:ICC3137 และ BG2FO4 เกาะติดอย่างหนาแน่นกับ Caco-2 cell

Tuomola and Salminen (1998) ทดสอบความสามารถของ *Lactobacillus* spp. จำนวน 12 สายพันธุ์ ในการเกาะติดเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยการนำแบคทีเรียไปติดฉลากเพื่อให้สามารถติดตามได้ จากนั้นนำไปเทบน Caco-2 monolayer แล้วล้างแบคทีเรียที่ไม่เกาะติดกับเซลล์ Caco-2 ออก สังเกตการณ์เกาะติดของแบคทีเรียบนเซลล์ Caco-2 จากสีของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการทดลองพบว่าประมาณ 14 % ของเซลล์แบคทีเรียทดสอบสามารถเกาะติดกับเซลล์ Caco-2 ได้

Gueimonde et al. (2006) นำแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *L. acidophilus* TMC 0356, *L. casei* TMC 0409 และ *L. rhamnosus* TMC 0503 ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์นมมาทำการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และเยื่อบุผนังลำไส้ ซึ่งผลปรากฏว่า แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และเยื่อบุผนังลำไส้ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สปีชีส์ มีความสามารถที่แตกต่างกันในการป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคมายึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ หรือไปแทนที่เชื้อก่อโรคที่เกาะติดอยู่ที่เยื่อบุผนังลำไส้

จากงานวิจัยนี้ทำให้สรุปได้ว่า การที่จะนำแบคทีเรียใดมาใช้เป็นโปรไบโอติกจำเป็นต้องทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ และเยื่อบุผนังลำไส้ก่อน เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ และเยื่อบุผนังลำไส้ที่แตกต่างกัน

2.2.4 การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

ในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.2.4.1 การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร

การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการเพิ่มคุณค่าทางอาหารมักทำโดยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกใส่ลงไปในอาหาร ซึ่งอาจใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเพียง 1 ชนิด หรือมากกว่า 1 ชนิดร่วมกันก็ได้ (Klein et al., 1998) เพื่อให้อาหารมีคุณสมบัติที่ดีขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคมากขึ้น เช่น ทำให้อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น หรือมีรสและกลิ่นที่ดีขึ้น (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Marvin 1981) และช่วยลดคลอเลสเตอรอลในเลือด เป็นต้น จากการวิจัยพบว่าปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารควรมีอย่างน้อย 10^7 cfu ต่อกรัมของอาหาร เพื่อให้ได้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ดังกล่าวสูงสุด (Hertzler and Clancy, 2003) ตัวอย่างของการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เช่น การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติก เช่น *L. casei, L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น มาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยว และโยเกิร์ต ทำให้ผลผลิตที่ได้สามารถช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ของระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภคได้ (Nakazawa and Hosono, 1992)

2.2.4.2 การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์

การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์โดยส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้โดยการที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ด้วยตัวเอง หรืออาจเกิดขึ้นโดยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเป็นพาหะนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายเพื่อไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ เช่น

การใช้โปรไบโอติกในการบำบัดโรค Crohn's disease (CD) และโรค dextran sodium sulfate induced colitis ในหนู และในการลดความรุนแรงของ chronic colitis ในหนูที่ขาด interleukin-10 (IL-10) (Steidler et al., 2000)

การใช้ *L. lactis* และ *L. helveticus* ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งจากการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง interleukin-6 (IL-6) ได้ (Smits et al., 2005)

2.2.4.3 การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร

การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรโดยส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตของสัตว์เศรษฐกิจ เช่น ไก่ หมู กุ้ง วัว เป็นต้น โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกอาจไปช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ เพิ่มภูมิต้านทานโรคในสัตว์ (Guerra et al., 2007) ลดอัตราการติดเชื้อก่อโรคในสัตว์ หรือส่งเสริมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับสัตว์เลี้ยง เช่น ควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำในแหล่งน้ำ (สยามมารีน, 2550) ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร เช่น

การใช้ *Bacillus* sp. ใส่ลงในบ่ออนุบาลช่วยให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตและรอดตายสูงขึ้นกว่าการใช้ benza konium chloride (BKC) (Shivappa and Chanratchakool, 1997)

การใช้ Bacillus sp. มาผสมกับอาหารกุ้งเพื่อให้แก่ลูกกุ้งกุลาดำกิน พบว่า ลูกกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *Vibrio harveyi* สูงถึง 100% โดยกุ้งทดลองมีสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26% และมีอาการผิดปกติในตับ ตับอ่อน และลำไส้ (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2551)

2.3 วัคซีน (Vaccine)

คำว่า "วัคซีน" (vaccine) มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินคำว่า vaccin-us หรือ vacca ซึ่งแปลว่า cow หรือวัว วัคซีนเริ่มต้นเมื่อ ค.ศ. ที่ 1770 โดย Edward Jenner นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ พบว่าคนเลี้ยงวัวที่เคยติดเชื้อฝีดาษวัว (cowpox) จะไม่ป่วยเป็นไข้ทรพิษ (smallpox) เขาจึงลองเอาหนองของคนที่กำลังป่วยด้วยโรคฝีดาษวัว ไปสะกิดที่ผิวหนังของเด็กหนุ่มผู้ที่ไม่เคยป่วยด้วยโรคฝีดาษวัวหรือไข้ทรพิษมาก่อน พบว่าเด็กผู้นั้นไม่ป่วยเป็นไข้ทรพิษ (smallpox) จึงเป็นที่มาของการคิดค้นวัคซีนเพื่อป้องกันโรค (Stern and Markel, 2005)

2.3.1 ความหมายของวัคซีน

วัคซีน (vaccine) เป็นชีววัตถุที่เตรียมขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์หรือส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีกลไกชักนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ กล่าวคือมีฤทธิ์ชักนำการสร้างภูมิคุ้มกันอันจำเพาะกับโรค วัคซีนโดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค (แอนติเจน) ซึ่งถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ลง ตาย หรือการใช้ส่วนที่เป็นพิษที่อ่อนฤทธิ์ลง (toxoid) โดยวัคซีนจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และสามารถจดจำได้ว่าเป็นสารก่อโรคซึ่งจะมีกลไกการทำลายต่อไป คุณสมบัติการจดจำแอนติเจนของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ร่างกายสามารถกำจัดแอนติเจนหากเมื่อได้รับอีกในภายหลังได้รวดเร็วยิ่งขึ้น (Stern and Markel, 2005) ตัวอย่างของชีววัตถุ ได้แก่ สารก่อภูมิแพ้ (allergens) แอนติเจน (antigens) วัคซีน (vaccines)

ฮอร์โมน (hormones) ไซโตไคน์ (cytokines) เอนไซม์ (enzymes) ผลิตภัณฑ์จากเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ผลิตภัณฑ์จากเนื้อเยื่อ (tissues) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเลือดหรือพลาสมาของมนุษย์ (human whole blood and plasma derivatives) เซรุ่ม (immune sera) ที่เตรียมขึ้นจากเลือดของคนหรือม้า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulins) แอนติบอดีที่ได้จากกลุ่มของเซลล์ที่เกิดจากเซลล์เดียว (monoclonal antibodies) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักหรือจากดีเอ็นเอสายผสม (fermentation or recombinant DNA) เป็นต้น (กระทรวงสาธารณสุข, 2549)

2.3.2 ชนิดของวัคซีน (Types of vaccine) (อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์ และคณะ, 2525)

ปัจจุบันแบ่งวัคซีนได้ออกเป็น 2 ชนิด คือ วัคซีนชนิดชีววิทยา (Biological types of vaccine) และวัคซีนชนิดชีวเคมี (Biochemical types of vaccine) มีลักษณะดังต่อไปนี้

2.3.2.1 วัคซีนชนิดชีววิทยา (Biological types of vaccine) แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

1) วัคซีนชนิดเชื้อตาย (inactivated vaccine หรือ killed vaccine) วัคซีนชนิดเชื้อตาย เป็นวัคซีนที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ตายทั้งตัว (whole cell vaccine หรือ whole virion vaccine) หรือส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (subunit vaccine) เช่น แคปซูล ฟิลิ หรือไรโบโซม วิธีที่นิยมใช้ในการทำให้จุลินทรีย์ตาย เช่น การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีความรุนแรงสูงและนำจุลินทรีย์มาฆ่าด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้ความร้อน การใช้แสงอัลตราไวโอเลต และการใช้สารเคมีบางอย่าง ได้แก่ ฟีนอล หรือฟอร์มาลิน ตัวอย่างวัคซีนในกลุ่มนี้ ได้แก่ วัคซีนไอกรน วัคซีนอหิวาตกโรคชนิดฉีด วัคซีนโปลิโอชนิดฉีด วัคซีนพิษสุนัขบ้า วัคซีนตับอักเสบเอ วัคซีนไข้สมองอักเสบเจอีชนิดน้ำ การใช้วัคซีนชนิดนี้ต้องมีขนาดการใช้สูงเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ตายแล้วและไม่อาจเพิ่มปริมาณในร่างกายผู้ให้วัคซีนได้ รวมถึงการออกฤทธิ์ของวัคซีนประเภทนี้จะสั้น ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการใช้สารจำพวกแอดจูแวนต์ (Adjuvant) หรือใช้วิธีการฉีดกระตุ้นให้ระดับแอนติบอดีสูงพอที่จะป้องกันโรคได้

2) ทอกซอยด์ (toxoid) วัคซีนประเภทนี้สามารถจัดอยู่ในกลุ่มของวัคซีนชนิดเชื้อตายได้การผลิตวัคซีนประเภทนี้ทำได้โดยนำสารพิษ (toxin) มาทำให้ความเป็นพิษหมดไปแต่ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโรคได้ การทำให้ทอกซินหมดพิษไปอาจทำได้โดยตั้งทิ้งไว้ช่วงระยะเวลาหนึ่ง หรือการใช้ความร้อน หรือโดยการใช้สารเคมีในเชิงเภสัชอุตสาหกรรม การใช้วิธีการทำให้หมดฤทธิ์วิธีการใดจำเป็นต้องตระหนักถึงความทนสภาพของแอนติเจนที่จะไม่หมดฤทธิ์ตามพิษนั้นไปด้วย ปัจจุบันมีทอกซอยด์ 2 ชนิดเท่านั้น คือ ทอกซอยด์ ป้องกันโรคคอตีบ และโรคบาดทะยัก ซึ่งเมื่อฉีดไปแล้วจะมีไข้หรือปฏิกิริยาเฉพาะที่เล็กน้อย แต่ถ้าเคยฉีดมาแล้วหลายครั้ง หรือร่างกายมีภูมิคุ้มกันสูงอยู่ก่อนแล้ว อาจจะเกิดปฏิกิริยามากขึ้น ทำให้มีอาการบวม แดง เจ็บบริเวณที่ฉีดและมีไข้ได้ร่วมด้วย

3) วัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live Attenuated Vaccine) วัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตแต่ถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ลง ไม่ก่อโรคในร่างกายมนุษย์แต่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ การผลิตวัคซีนประเภทนี้สามารถทำได้โดยการคัดเลือกตัวผ่าเหล่าของจุลินทรีย์ที่มีความรุนแรงต่ำโดยผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การทำให้แห้ง การเลี้ยงในสภาวะผิดปกตินอกโฮสต์ (host) การเลี้ยงจนอ่อนฤทธิ์และการใช้เทคโนโลยีรีคอมบีแนนต์เข้าร่วม ข้อดีของวัคซีนชนิดนี้ประการหนึ่งคือการสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในร่างกายได้ ทำให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายได้เป็นเวลานานและระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าในวัคซีนชนิดตัวตาย สามารถให้ในปริมาณที่น้อยได้และยังเป็นการเลียนแบบการติดเชื้อตามธรรมชาติอีกด้วย อย่างไรก็ตามวัคซีนชนิดตัวเป็นยังมีปัญหาหลายประการ ได้แก่ การทำให้จุลินทรีย์อ่อนฤทธิ์ต้องพอเหมาะไม่ต่ำจนกระทั่งไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ และเชื้อผ่าเหล่าที่ได้รับการคัดเลือกจำต้องมีความคงตัว ตัวอย่างของวัคซีนในกลุ่มนี้วัคซีนโปลิโอชนิดรับประทาน วัคซีนรวมหัด-คางทูม-หัดเยอรมัน วัคซีนอีสุกอีใส วัคซีนวัณโรค วัคซีนทัยฟอยด์ชนิดรับประทาน

2.3.2.2 วัคซีนชนิดชีวเคมี (Biochemical types of vaccine) แบ่งได้ 4 ชนิด คือ

1) Component Vaccines เป็นวัคซีนที่ผลิตจากส่วนประกอบที่สำคัญเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นภูมิต้านทาน ตัวอย่างของวัคซีนในกลุ่มนี้ เช่น surface antigen ของ hepatitis B virus เป็นต้น

2) Subunit Vaccines เป็นวัคซีนที่ผลิตจากส่วนประกอบของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิ ตัวอย่างของวัคซีนในกลุ่มนี้ เช่น Subunit influenza vaccine

3) Synthetic Vaccines เป็นวัคซีนที่ได้จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างของวัคซีนในกลุ่มนี้ เช่น Hepatitis B surface antigen

4) Recombinant Vaccine เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยการใช้เทคนิคทาง genetic engineering โดยการนำยีนหรือแอนติเจนใส่เข้าไปในแบคทีเรีย ตัวอย่างของวัคซีนในกลุ่มนี้ เช่น วัคซีนป้องกันโรค Hepatitis ในคน

2.3.3 วิธีการให้วัคซีน

วิธีการให้วัคซีนในปัจจุบันที่ได้รับความนิยมมีอยู่ 5 วิธี ได้แก่

2.3.3.1 การรับประทาน (oral route) ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันในลำไส้ เช่น วัคซีนโปลิโอ วัคซีนทัยฟอยด์

2.3.3.2 การพ่น ซึ่งอาจพ่นเข้าทางปากหรือทางจมูกก็ได้ ตัวอย่างเช่น วัคซีนไข้หวัดใหญ่ ซึ่งเป็นวัคซีนชนิดพ่นทางจมูก

2.3.3.3 การฉีดเข้าผิวหนัง (intradermal หรือ intracutaneous route) โดยฉีดเข้าในหนัง ให้เป็นตุ่มนูนขึ้น การฉีดวิธีนี้ทำให้แอนติเจนเข้าไปทางระบบน้ำเหลืองได้ดี สามารถกระตุ้น

ภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์เป็นสื่อได้ดี (cell-mediated immune response) เช่น วัคซีนวัณโรค วัคซีนพิษสุนัขบ้า การฉีดวัคซีนวัณโรคในทารกแรกเกิด ควรฉีดที่ต้นแขนเพื่อให้สามารถตรวจสอบแผลเป็นได้ง่าย ไม่ควรฉีดที่สะโพกเพราะอาจเกิดการติดเชื้อซ้ำเติมได้ง่าย เนื่องจากอยู่ใกล้ผ้าอ้อม ซึ่งอาจเปื้อนอุจจาระ ปัสสาวะได้ และตรวจสอบแผลเป็นได้ไม่สะดวกเท่าบริเวณต้นแขน

2.3.3.4 การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) มักจะใช้กับวัคซีนที่ไม่ต้องการให้มีการดูดซึมเร็วเกินไป เพราะอาจเกิดปฏิกิริยารุนแรง เช่น วัคซีนรวมหัด-คางทูม-หัดเยอรมัน วัคซีนทัยฟอยด์ วัคซีนไข้สมองอักเสบเจอี วัคซีนอีสุกอีใส ในเด็กเล็กควรฉีดบริเวณกึ่งกลางต้นขาด้านหน้าค่อนไปทางด้านนอน ส่วนในเด็กโตหรือผู้ใหญ่ ควรฉีดที่ต้นแขน

2.3.3.5 การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular route) เป็นการฉีดลึกลงชั้นกล้ามเนื้อ ควรฉีดบริเวณต้นแขนในเด็กโตและผู้ใหญ่ และบริเวณกึ่งกลางต้นขาด้านหน้าค่อนไปทางด้านนอกในเด็กเล็ก เพราะมีการดูดซึมวัคซีนได้เร็ว เนื่องจากในบริเวณนี้มีไขมันไม่มาก มีเส้นเลือดมาเลี้ยงมาก นอกจากนี้การเคลื่อนไหวของแขนและขาทำให้ดูดซึมดีขึ้น ไม่แนะนำให้ฉีดบริเวณสะโพก เพราะอาจเกิดอันตรายต่อเส้นประสาทไซเอติค (sciatic nerve) หรือเกิดการบวมเฉพาะที่ จนไปกดเส้นประสาทไซเอติต นอกจากนี้บริเวณนี้มีไขมันมาก อาจทำให้ฉีดเข้าไม่ถึงชั้นกล้าเนื้อ (จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา และวีระชัย วัฒนวีระเดช, 2553)

2.4 ดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine)

ดีเอ็นเอวัคซีน คือ วัคซีนที่มีการให้แก่ร่างกายในรูปของดีเอ็นเอ โดยปกติแล้วดีเอ็นเอวัคซีนประกอบด้วยยีนสำหรับโปรตีนที่สามารถทำหน้าที่เป็นแอนติเจนไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้รับได้ ในระยะแรกของการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีน การให้วัคซีนดังกล่าวจะเป็นการให้โดยตรงเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งมีทั้งข้อดี และข้อเสีย ดังนี้

ข้อดีของการให้ดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ได้แก่

(1) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนเกิดขึ้นในร่างกายของผู้รับวัคซีนโดยตรง ทำให้โปรตีนที่สร้างอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อผู้รับวัคซีนมากกว่าวัคซีนเชื้อเป็น และวัคซีนเชื้อตาย

(2) มีความปลอดภัยสูง ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอวัคซีนมักไม่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งต่างจากวัคซีนเชื้อเป็นที่มีโอกาสก่อให้เกิดโรคได้สูง (Wolff et al., 1990)

ข้อเสียของการให้ดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ได้แก่

(1) ระยะเวลาการกระตุ้นสั้น ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอวัคซีนถูกย่อยสลายในร่างกายของผู้รับวัคซีนได้ง่าย

(2) ในกรณีที่โปรตีนที่สร้างจากดีเอ็นเอวัคซีนมีขนาดเล็ก จะทำให้คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนไม่ดี

2.4.1 ลักษณะและคุณสมบัติของดีเอ็นเอวัคซีน

ลักษณะและคุณสมบัติของดีเอ็นเอวัคซีน มีดังนี้

2.4.1.1 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดดั้งเดิม (innate immunity)

2.4.1.2 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งชนิด helper T cells, cytolytic T lymphocytes (CTLs)

2.4.1.3 สามารถสร้างได้โดยตรงจากยีนหรือสายเบสนิวคลิโอไทด์ ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการใช้เชื้อก่อโรคที่เป็นอันตราย

2.4.1.4 สามารถหลีกเลี่ยงการใช้เวกเตอร์ชนิดไวรัส (viral vectors) บางชนิด และ attenuated viruses

2.4.1.5 สามารถให้โดยผ่านทางเยื่อบุ (mucosal delivery)

2.4.1.6 เอื้อต่อการพัฒนาเป็นวัคซีน ได้แก่ ความรวดเร็วในการสร้างและผลิต การผลิตได้ในปริมาณมาก และความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง

2.4.1.7 การนำไปใช้ให้มีประสิทธิภาพอาจต้องอาศัยเทคโนโลยีอื่นๆ ช่วย เช่น เครื่องมือในการนำเข้าสู่ร่างกาย การเพิ่มความแรงหรือความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนโดยใช้วิธีการเสริมอื่นๆ (prime-boost) (Liu, 2011 (b))

2.4.2 ข้อดีและข้อจำกัดของดีเอ็นเอวัคซีน

ถึงแม้ดีเอ็นเอวัคซีนจะมีข้อดีหลายประการ แต่การใช้วัคซีนดังกล่าวก็มีข้อจำกัดหลายประการเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ข้อดี และข้อจำกัดของดีเอ็นเอวัคซีน

ข้อดี	ข้อจำกัด
1) ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด cellular และ humoral	1) ความแรงในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคน
2) ความง่ายในการสร้าง vectors ทั้งชนิดที่มาจากส่วนของไวรัสและแบคทีเรีย	2.) ความจำเป็นในการใช้ packaging cell lines ที่เหมาะสมสำหรับวัคซีนที่ใช้ viral vectors
3) ความง่ายในการวิเคราะห์และคัดกรองในห้องทดลอง	3) การเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อ vectors หลังจากการฉีดวัคซีนที่ใช้ viral vectors เข้าไปในร่างกาย
4) ความปลอดภัยในการนำมาใช้	4) ข้อมูลด้านความปลอดภัยในระยะยาวยังมีน้อย
5) ความแรงในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อในสัตว์บางชนิด	5) ความซับซ้อนในการใช้ vectors มากกว่าหนึ่งชนิดในกรณีที่ใช้วิธี prime-boost
6) การนำมาใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ เพื่อเสริมภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพ	6) ความจำเป็นในการพัฒนากระบวนการผลิตให้ได้ดีเอ็นเอวัคซีนในปริมาณมาก

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Liu (2011 (b))

2.4.3 การนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกาย (Delivery of DNA vaccine)

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่ร่างกาย สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดี และข้อด้อยที่แตกต่างกัน

การนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ซึ่งอาจทำได้โดยการฉีด หรือพ่น ข้อดีของวิธีนี้คือสะดวก และปลอดภัย แต่มีข้อเสียคือ ดีเอ็นเอวัคซีนถูกทำลายได้ง่าย และโอกาสที่ดีเอ็นเอวัคซีนจะเข้าสู่เซลล์ต่ำ บางครั้งมีการแก้ไขข้อเสียดังกล่าวโดยการนำดีเอ็นเอวัคซีนไปเคลือบบน microparticles ซึ่งมีขนาดประมาณ 1-10 ไมครอนก่อน ซึ่งจะทำให้ antigen presenting cells (APCs) สามารถนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น (Little et al., 2004)

การนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายโดยวิธี gene gun ซึ่งทำได้โดยนำดีเอ็นเอวัคซีนไปเคลือบบน gold beads ก่อน จากนั้นจึงนำไปฉีดเข้าสู่ร่างกาย วิธีนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของ helper T cells, cytolytic T lymphocytes และ B lymphocytes (Roy et al. 2000) วิธีการนี้ได้

มีการนำไปทดลองใช้คนที่ไม่มีภูมิต้านทานต่อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อบุคคลดังกล่าวได้รับ hepatitis DNA vaccine (DNA สำหรับ hepatitis B surface antigen, HBsAg) โดยวิธี gene gun ปรากฏว่าสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ HBsAg ได้ (Rottinhaus et al., 2003) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดบางประการ เช่น การเคลือบดีเอ็นเอวัคซีนบน gold bead แต่ละครั้งใช้ดีเอ็นเอวัคซีนได้ในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้ต้องมีการฉีดดีเอ็นเอวัคซีนหลายครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณที่ต้องการ นอกจากนี้ดีเอ็นเอวัคซีนมักไม่เสถียรบน gold beads

การนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายโดยวิธี Biojector วิธีนี้พัฒนามาจากข้อเสียของวิธี gene gun ที่นำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายแต่ละครั้งได้ในปริมาณที่น้อย วิธี Biojector เป็นวิธีการนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ antigen presenting cells ได้โดยตรงโดยไม่ต้องไปเคลือบบน gold beads ก่อน ดังนั้นจึงทำให้สามารถนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายได้ในปริมาณที่มากพอต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Rao et al., 2006)

การนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายโดยใช้แบคทีเรียเป็นพาหะ (delivery vehicle) วิธีการนี้ทำได้โดยการนำดีเอ็นเอวัคซีนไปเชื่อมต่อกับ vector DNA ที่เหมาะสมกับแบคทีเรียที่จะใช้เป็นพาหะ ซึ่งจะทำให้ได้ recombinant DNA จากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้ไปใส่ในแบคทีเรีย การนำแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอวัคซีนอยู่ภายในเข้าสู่ร่างกายคนสามารถทำได้โดยการฉีด หรือพ่น วิธีการนี้ได้มีการทดลองใช้กับดีเอ็นเอวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ (Ozaki et al., 2005) และดีเอ็นเอวัคซีนป้องกันโรค SIV/HIV (Lori et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำวิธีนี้ไปใช้ในการนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายทางเยื่อบุช่องปาก (Takamura et al., 2004) และเยื่อบุจมูก (Kim et al., 2006) ข้อดีของวิธีการนี้คือใช้ดีเอ็นเอวัคซีนในปริมาณที่น้อยมาก เนื่องจากดีเอ็นเอวัคซีนสามารถไปเพิ่มจำนวนในร่างกายของผู้รับวัคซีนไปพร้อม ๆ กับการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียพาหะ แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัด คือ แบคทีเรียที่จะใช้เป็นพาหะนำดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่ร่างกายต้องเป็นแบคทีเรียที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และ vector DNA ที่ใช้ต้องเหมาะสมกับแบคทีเรียพาหะ ซึ่งบางครั้งต้องสร้างขึ้นเอง ซึ่งจะทำให้เสียเวลา และค่าใช้จ่ายมาก

2.4.4 การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอวัคซีนในสัตว์

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีดีเอ็นเอวัคซีนหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ทดลอง โดยทั่วไปแล้วการนำดีเอ็นเอวัคซีนมาใช้ร่วมกับวัคซีนแบบอื่นจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคดีขึ้น ตัวอย่างเช่น

การให้ดีเอ็นเอวัคซีนที่มียีนสำหรับ nucleoprotein ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ร่วมกับการให้ recombinant adenovirus ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นชนิดหนึ่งที่ใช้ป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ จะช่วยให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่เพิ่มขึ้น (Epstein et al., 2005)

การให้ดีเอ็นเอวัคซีนที่มีดีเอ็นเอของ Mycobacterium tuberculosis (ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรควัณโรค) ก่อนการให้วัคซีน BCG (Bacillus of Calmette and Guerin) จะช่วยให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรควัณโรคเพิ่มขึ้น (Ferraz et al., 2004)

การให้ดีเอ็นเอวัคซีนที่มีดีเอ็นเอของ Mycobacterium tuberculosis (ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรควัณโรค) หลังการให้วัคซีน BCG (Bacillus of Calmette and Guerin) แล้ว 15 ถึง 18 เดือนจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรควัณโรคเพิ่มขึ้น (Wang et al., 2004)

ในปัจจุบันมีดีเอ็นเอวัคซีนหลายชนิดที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันการติดเชื้อ infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) ในปลาแซลมอน (Lorenzen and Lapatra, 2005) และวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ West Nile virus ในม้า (Powell, 2004) เป็นต้น การที่ดีเอ็นเอวัคซีนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในสัตว์เลี้ยง ได้จุดประกายความหวังในการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีนให้สามารถใช้ได้ในคน

2.4.5 การใช้ดีเอ็นเอวัคซีนในคน

การนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอวัคซีนมาใช้ในคนยังมีข้อจำกัด โดยเฉพาะในส่วนของความแรง (potency) ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยดีเอ็นเอวัคซีนในคนเปรียบเทียบกับในหนูทดลอง พบว่า การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยดีเอ็นเอวัคซีนในคนมีความแรงที่น้อยกว่า สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากในคนมีสัดส่วนของดีเอ็นเอวัคซีนต่อน้ำหนักตัวน้อยกว่าในหนูทดลอง การเพิ่มความแรงในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของดีเอ็นเอวัคซีนอาจทำได้โดยการปรับปรุง expression vectors เช่น การพัฒนาในส่วนของบริเวณ enhancer หรือ promoter ของ expression vector เพื่อให้การแสดงออกของยีนที่ประกอบอยู่ในดีเอ็นเอวัคซีนเกิดได้ดีขึ้น (Barouch et al., 2005)

2.5 Genetic engineering และการประยุกต์ใช้กับแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

2.5.1 ความหมาย และขั้นตอนของ genetic engineering

Genetic engineering หมายถึง การใช้เทคนิคทางห้องปฏิบัติการในการสร้าง DNA ที่มียีนใหม่ ๆ หรือมีลำดับเบสที่เปลี่ยนไป ซึ่งเมื่อมีการนำ DNA ดังกล่าวเข้าสู่สิ่งมีชีวิต หรือเซลล์ ก็จะทำให้ DNA ดังกล่าวสามารถถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกต่อ ๆ ไปได้ สิ่งมีชีวิต หรือเซลล์ที่รับเอา DNA ที่มียีนใหม่ ๆ หรือมีลำดับเบสที่เปลี่ยนไปเข้าไป จะเป็นสิ่งมีชีวิต หรือเซลล์ที่มีพันธุกรรมที่เปลี่ยนไป ซึ่งเรียกสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ว่า สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified organism หรือ GMO) และเรียกเซลล์เหล่านี้ว่า เซลล์ดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified cell)

ขั้นตอนพื้นฐานของ genetic engineering ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

(1) การสกัด DNA จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (isolation of DNA from living cell)

วิธีการในการสกัด DNA จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ DNA ที่ต้องการสกัดว่าเป็น DNA ทั้งหมด (total DNA) ของเซลล์ หรือเป็น plasmid (DNA ที่อยู่นอกส่วนของ chromosome) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่นำมาสกัดเอา DNA ว่าเป็นเซลล์แบคทีเรีย เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์

(2) การนำ DNA ใส่เข้าไปในดีเอนเอพาหะ (insertion of DNA into vector DNA)

ขั้นตอนนี้เป็นการเชื่อมต่อ DNA ที่ต้องการนำเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเข้ากับ vector DNA (ดีเอนเอพาหะ) หรือ vector ซึ่งทำให้ได้ recombinant DNA หรือ DNA ที่ประกอบด้วย DNA ที่มาจากหลายแหล่ง (ในที่นี้ recombinant DNA ประกอบด้วย DNA ที่สกัดจากเซลล์ กับ vector DNA) โดย vector DNA จะช่วยให้ DNA ที่ต้องการนำเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตสามารถอยู่ และเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ การเชื่อมต่อ DNA กับ vector DNA เกี่ยวข้องกับวิธีการทางห้องปฏิบัติการหลายวิธี เช่น การตัด DNA อย่างจำเพาะด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease และ การเชื่อมต่อ DNA เข้าด้วยกัน (DNA ligation)

(3) การนำ recombinant DNA เข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต (introduction of DNA into living cell)

วิธีการนำ DNA เข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า host cell (หรือเซลล์เจ้าบ้าน) มีหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ vector DNA ที่ใช้ในการสร้าง recombinant DNA และชนิดของ host cell เนื่องจากการนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell เกิดขึ้นแบบสุ่ม (random) ดังนั้นในการนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell จึงต้องนำเอา recombinant DNA จำนวนมากมาผสมกับ host cell จำนวนมาก และ host cell เพียงจำนวนหนึ่งเท่านั้นที่รับเอา recombinant DNA เข้าไป ดังนั้นหลังจากการนำ recombinant DNA เข้าสู่ host cell แล้วจึงต้องทำการคัดเลือก host cell ที่รับเอา recombinant DNA เข้าไป เพื่อนำเซลล์ดังกล่าวไปใช้ต่อไป

2.5.2 การนำ genetic engineering มาประยุกต์ใช้กับแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

ในปัจจุบันมีการนำ genetic engineering มาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียเพื่อให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ เช่น มีความทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี มีความสามารถในการนำสารต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายสัตว์ และมนุษย์ เป็นต้น

ตัวอย่างของการใช้ genetic engineering ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียเพื่อให้มีความทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี เช่น

การปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Lactobacillus paracasei* NFBC338 ให้สามารถสร้างโปรตีน GROESL ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยให้แบคทีเรียทนต่อความร้อน และตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนั้น

Lactobacillus paracasei สายพันธุ์ใหม่ที่ได้จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นโปรไบโอติก เพราะมีความทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ในทางเดินอาหารได้ดี อีกทั้งยังทนต่อสภาวะต่าง ๆ ของการผลิตอาหารได้ด้วย (Desmond et al., 2005)

การปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Pediococcus parvulus* ให้สามารถสร้างเอนไซม์ 2, 6-glycosyltransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง β-glucan สารดังกล่าวจะช่วยทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อความร้อน น้ำดี กรด และน้ำย่อยในกระเพาะอาหารได้ดี ดังนั้น *Pediococcus parvulus* สายพันธุ์ใหม่ที่ได้จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นโปรไบโอติก เพราะมีความทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ในทางเดินอาหารได้ดี (Stack et al., 2010)

นอกเหนือจากการนำ genetic engineering มาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้ทนต่อสภาวะต่าง ๆ แล้ว ยังได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้สามารถนำสารต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายของคน และสัตว์ โดยเฉพาะการนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์

2.5.3 การนำ genetic engineering มาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้สามารถนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกาย

การนำ genetic engineering มาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้สามารถนำวัคซีนเข้าสู่ร่างกาย เป็นการนำ DNA สำหรับแอนติเจนมาเชื่อมต่อกับ vector DNA เพื่อให้ได้เป็น recombinant DNA จากนั้นจึงนำ recombinant DNA ใส่เข้าไปในแลคติกแอสิดแบคทีเรีย เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มียีนสำหรับแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งอาจทำได้โดยการกิน หรือโดยพ่นเข้าทางปาก หรือจมูก หรือโดยการฉีด แลคติกแอสิดแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนในร่างกายพร้อมทั้งผลิตแอนติเจนออกมาเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้ร่างกายสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคต่าง ๆ ได้

ในปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการใช้ genetic engineering ในการนำยีนสำหรับแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย แล้วทำให้ร่างกายมีภูมิต้านทานต่อเชื้อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 Lactic acid bacteria vaccine

Target infective agent	Antigen	Antigen carrier (antigen cellular location)	Immunization route	Ref.
Bacterial targets				
Streptococcus pyogenes	CRR of M protein	*Lactococcus lactis* (cell surface associated)	Nasal, subcutaneous	Mannam et al., 2004
Streptococcus agalactiae	Pilin island 1	*L. lactis* (cell surface associated)	Nasal, subcutaneous	Buccato et al., 2006
Streptococcus pneumoniae	PspA (N-terminal region)	*Lactobacillus casei* (cytoplasmic)	Nasal	Campos et al., 2008
S. pneumoniae	PspA (N-terminal region)	*L. lactis* (cytoplasmic)	Nasal	Hannify et al., 2007
S. pneumonia	PsaA	*L. lactis, L. casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus helveticus* (cell surface associated)	Nasal	Oliviera et al., 2006
Helicobacter pylori	UreB	*L. lactis* (secreted)	Oral	Gu et al., 2009

ตารางที่ 2.2 Lactic acid bacteria vaccine (ต่อ)

Target infective agent	Antigen	Antigen carrier (antigen cellular location)	Immunization route	Ref.
S. pneumoniae	PppA	*L. lactis* (cell surface associated)	Nasal	Medina et al., 2008
H. pylori	UreB	*L. plantarum*, alanine racemase mutant of *L. plantarum* (cytoplasmic)	Oral	Corthesy et al., 2005
Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)	STLTB	*Lactobacillus reuteri* (secreted)	Oral	Wu et al., 2007
ETEC K99	K99	*L. casei* (cell surface associated)	Oral, nasal	Wei et al., 2010
ETEC K99	K99	*L. acidophilus* (secreted and cell associated)	None performed	Chu et al., 2005
ETEC	F41	*L. casei* (cell surface associated)	Oral	Liu et al., 2009

ตารางที่ 2.2 Lactic acid bacteria vaccine (ต่อ)

Target infective agent	Antigen	Antigen carrier (antigen cellular location)	Immunization route	Ref.
F18 fimbrial *E. coli*	FedF	*L. lactis* (secreted, cell surface associated)	None performed	Lindholm et al., 2004
ETEC K88	F4	*L. lactis* (secreted and cell associated)	Oral	Hu et al., 2009
Salmonella enteritidis	Flagellin	*L. casei* (cell surface associated)	Oral	Kajikawa et al., 2007
Listeria monocytogenes	LLO	*L. lactis* (secreted)	Intraperitoneal, Oral	Bahey-El-Din et al., 2008
Yersinia pseudotuberculosis	LcrV	*L. lactis* (secreted)	Nasal, oral	Daniel et al., 2009
Proteus mirabilis	MrpA	*L. lactis* (secreted, cell surface associated)	Nasal	Scavone et al., 2007
Erysipelothrix rhusiopathia	SpaA	*L. lactis* (secreted)	Oral, nasal	Cheun et al., 2004

ตารางที่ 2.2 Lactic acid bacteria vaccine (ต่อ)

Target infective agent	Antigen	Antigen carrier (antigen cellular location)	Immunization route	Ref.
Bordetella pertussis	S1 subunit of PT (N-terminal region)	*Streptococcus gordonii* (cell surface associated)	Subcutaneous, intraperitoneal	Lee et al., 1999
Bacillus anthracis	PA	*Lactobacillus acidophilus* (secreted)	Oral	Mohammadz a-deh et al., 2009
Borrelia burgdorferi	OspA, OspAα	*L. plantarum* (cell associated)	Oral	Rio et al., 2008
Viral targets				
Human immunodeficien cy virus (HIV)	V2–V4 loop of HIV envelop protein	*L. lactis* (cell surface associated)	Oral	Xin et al., 2003
Human apillomavirus (HPV-16)	L1	*L. casei* (cytoplasmic)	Subcutaneous	Aires et al., 2006
HPV-16	E7	*L. lactis* (cell surface associated)	Nasal	Bermudez-Humaran et al., 2005

ตารางที่ 2.2 Lactic acid bacteria vaccine (ต่อ)

Target infective agent	Antigen	Antigen carrier (antigen cellular location)	Immunization route	Ref.
Severe acute respiratory syndrome (SARS)	S protein (B-cell epitope and N-terminal receptor binding domain)	*L. casei* (cell surface associated)	Nasal, oral	Lee et al., 2006
Rotavirus	VP4, VP4-LTB	*L. casei* (cell surface associated)	Oral	Qiao et al., 2009
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)	S protein (N-terminal globular domain)	*L. lactis* (cell surface associated)	Oral	Tang and Li, 2009
TGEV	S protein	*L. casei* strain Shirota (secreted)	Oral	Ho et al., 2005
Porcine parvovirus (PPV)	VP2	*L. casei* (secreted, cell surfaced associated)	Oral	Yigang and Yijing, 2007
Dengue virus	EDIII	*L. lactis* (cytoplasmic)	Oral, nasal	Sim et al., 2008

ตารางที่ 2.2 Lactic acid bacteria vaccine (ต่อ)

Target infective agent	Antigen	Antigen carrier (antigen cellular location)	Immunization route	Ref.
HPV-16	E7	*L. casei* (cell surface associated)	Oral	Poo et al., 2006
Porcine epidemic diarrheal virus (PEDV)	Nucleocapsid protein of PEDV	*L. casei* (cell surfaced associated)	Oral, nasal	Hou et al., 2007
Rotavirus	VP7	*L. lactis* (secreted)	Oral	Perez et al., 2005
Rotavirus	VP4	*L. lactis* (cell surface associated)	Oral	Li et al., 2010
Parasiticn targets				
Rodent malaria	Msp1 (C-terminal fragment)	*L. lactis* (cytoplasmic)	Oral	Zhang et al., 2005
Giardia lamblia	CWP2	*L. lactis* (cell surface associated)	Oral	Lee and Faubert, 2006

ที่มา: Tarahomjoo (2012)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 อาหารหมักที่ใช้ในการแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง และปลาส้ม จากตลาดวารินเจริญศรี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 19115

3.1.3 ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

ยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค ประกอบด้วย Penicillin (10 ไมโครกรัม/disc) และ Tetrecycline (30 ไมโครกรัม/disc)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 Lactobacillus MRS broth (MRS broth) (Himedia, India)

3.2.1.3 Casein peptone (Himedia, India)

3.2.1.3 Meat extract (Himedia, India)

3.2.1.4 Agar (Himedia, India)

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 Calcium carbonate ($CaCO_3$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.2 Sodium chloride (NaCl) (Carlo erba, Italy)

3.2.2.3 Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Carlo erba, Italy)

3.2.2.4 Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany)

3.2.2.5 Glycerol (Sigma, USA)

3.2.2.6 Crystal violet (Sigma, USA)

3.2.2.7 Saflanine O (Sigma, USA)

3.2.2.8 Gram's iodine (Sigma, USA)

3.2.2.9 Ox bile powder (Himedia, India)

3.2.2.10 Agarose (GENEPure™LE)

3.2.2.11 DNA marker (Hind III digested λ DNA) (Invitrogen, Australia)

3.2.2.12 Primer FD1 (Invitrogen, Australia)

3.2.2.13 Primer RP2 (Invitrogen, Australia)

3.2.2.14 Tris base (Sigma, USA)

3.2.2.15 Acetic acid (Sigma, USA)

3.2.2.16 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, USA)

3.2.2.17 Ethidium bromide (Fluka, Switzerland)

3.2.2.18 Bromophenol blue (Sigma, USA)

3.2.2.19 Sucrose (Merck, Germany)

3.2.2.20 Absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)

3.2.2.21 GelStar (GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain)

3.2.2.22 Sorbitol (Fluka, Switzerland)

3.2.2.23 DL-threonine (Sigma, USA)

3.2.2.24 Dipotassium phosphate (K_2HPO_4) (Carlo erba, Italy)

3.2.2.25 Magnesium chloride (MgCl) (Carlo erba, Italy)

3.2.2.26 Calcium chloride ($CaCl_2$) (Merck, Germany)

3.2.3 วัสดุและอุปรณ์

3.2.3.1 DNA extraction kit (Real Biotech Corporation, Taiwan)

3.2.3.2 Plasmid extraction kit (NucleoSpin® Plasmid QuickPure, MACHEREY NAGEL GmbH & Co. KG, Germany)

3.2.3.3 Autoclave (Cikachi, Taiwan)

3.2.3.4 Automatic pipette (Gilson, France)

3.2.3.5 Incubator (Lab companion, Korea)

3.2.3.6 Centrifuge (Scilogex, Canada)

3.2.3.7 Vortex mixer (Minishaker, Malaysia)

3.2.3.8 pH meter (Cyberscan, Austria)

3.2.3.9 Microwave (Sharp, Thailand)

3.2.3.10 Water bath (Memmert, Germany)

3.2.3.11 Spectrophotometer (Metertech SP-830+, Taiwan)

3.2.3.12 Hot air oven (Heraeus, Canada)

3.2.3.13 Balance (Mettler Toledo, Switzerland)

3.2.3.14 Hot plate (Thermolyne Cimarec 3 Hot Plate Stirrer, Canada)

3.2.3.15 Stomacher (AES laboratories, France)

3.2.3.16 Microscope (Nikon, Japan)

3.2.3.17 PCR machine (Px2 Thermal cycler, Canada)

3.2.3.18 electrophoresis (Mini Horizontal Electrophoresis system, Taiwan)

3.2.3.19 Dark reader transilluminator (Benchtop UV Transilluminators, UK)

3.2.3.20 Refrigerator (Misubichi, Australia)

3.2.3.21 Sonicator (Ultrasonic cleaner, China)

3.2.3.22 Hybaid celljet Pro (Hybaid Ltd., UK)

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมัก (ดัดแปลงวิธีมาจาก AOAC, 1990) โดยมีวิธีการดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ละลายตัวอย่างใน 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher ทำ serial dilution ให้ได้ที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} จากนั้นปิเปตเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวของตัวอย่างอาหารที่ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} เติมลงบนผิวหน้าของอาหาร MRS agar ที่เติม 1% (w/v) $CaCO_3$ โดยใช้เทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำโคโลนีที่มีลักษณะสร้างโซนใสรอบโคโลนีไป streak plate จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการทดสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นเก็บรักษาแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth ที่เติม 30% (v/v) glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

3.3.2.1 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมส่วนใส (cell free supernatant) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ทำได้โดยเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญ

ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก จากนั้นเก็บส่วนใสไว้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี swab-paper disc

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc (ดัดแปลงมาจาก Rattanachaikunsopon และ Phumkhachorn, 1998) โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 ที่เลี้ยงไว้ในอาหาร nutrient broth (NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาป้าย (swab) บนจานอาหาร nutrient agar (NA) นำแผ่น paper disc ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นหยด cell free supernatant ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหาร MRS broth ที่ปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะมาตรฐานประกอบด้วย Penicillin (10 ไมโครกรัม/disc) และ Tetracycline (30 ไมโครกรัม/disc) disc เป็นตัวควบคุมผลบวก อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งซึ่งเกิดเป็นวงใส (clear zone) ขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc

3.3.2.2 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนกรด

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนกรดและเบส (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jin et al., 1998) ทำโดยถ่ายเชื้อ 1 loop จาก stock culture ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขี่ยบนอาหาร MRS agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ 1 โคโลนีในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ให้มีค่าต่างๆ คือ 2, 3, 4 และ 7 โดยใช้ 5 M HCl หรือ 5 M NaOH วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีการ plate count แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดซึ่งสามารถคำนวณโดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง (Log CFU/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง (Log CFU/ml)}} \qquad (1)$$

3.3.2.3 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนเกลือน้ำดี

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนเกลือน้ำดี (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jacobsen et al., 1999; Erkkila and Petaja, 2000) ทำโดยเพาะเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม Ox bile powder ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.15% และ 0.3% (w/v) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีการ plate count แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น)

3.3.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก

3.3.3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติต่างๆ ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

1) การตรวจการติดสีแกรม (Beisheier, 1991)

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด 95% แอลกอฮอล์ เพื่อทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) ทดสอบการเคลื่อนที่ (Johnson and Case, 1989)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์แล้วแทงลงบนอาหาร MRS agar ที่มีผงวุ้นความเข้มข้น 0.8% (w/v) แทงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเคลื่อนที่โดยสังเกตที่รอยแทง หากมีการกระจายของเชื้อออกจากรอยที่แทง แสดงว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้

3) ทดสอบคะตะเลส (Johnson and Case, 1989)

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ จากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

4) การตรวจสอบการสร้างก๊าซ (Johnson and Case, 1989)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS broth ที่มีหลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

5) ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (Siliker et al., 1980)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 10, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6) ทดสอบความทนเกลือ (Siliker et al., 1980)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5% และ 18% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

7) ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดด่างต่างๆ (Wistreich and Lechtman, 1980)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS broth ที่ปรับ pH เป็น 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3.3.2 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

สกัด genomic DNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปโดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Real Biotech Corporation, Taiwan) นำ genomic DNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ (template) เพื่อทำ PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ primer 2 ชนิด ได้แก่

FD1 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'

RP2 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3'

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 แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคลายคลึงหรือความเหมือน (% identity) ระหว่างลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในฐานข้อมูล GENBANK

3.3.4 การทดสอบการมีพลาสมิด (plasmid) ในแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

3.3.4.1 การสกัด plasmid จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การสกัดพลาสมิดจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียทำโดยนำแลคติดแอสิดแบคทีเรียมาเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด plasmid ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin® Plasmid QuickPure, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) โดยทำตามวิธีของผู้ผลิต จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.3.4.2 การตรวจวิเคราะห์พลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis

หลอมวุ้น agarose 1% (w/v) ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้อบไมโครเวฟ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วางหวีสำหรับทำช่องใส่ตัวอย่างในเจลลงในถาดเตรียมเจลแล้วเทวุ้น agarose 1% (w/v) ที่หลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันดีแล้วลงในถาดเตรียมเจล ปล่อยให้วุ้นเย็นและแข็งตัวประมาณ 20 นาที แล้วจึงดึงหวีสำหรับทำช่องใส่ตัวอย่างออก นำชิ้นวุ้นออกจากถาดเจลและวางเจลลงในอ่างสำหรับทำอิเล็กโทรโพรีซีส แล้วเทสารละลาย Tris-acetate buffer (1x TAE) ให้ท่วมแผ่นเจล จากนั้นผสมตัวอย่างดีเอ็นเอ 12 ไมโครลิตร กับ loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่างพร้อมกับหยอด DNA marker (Hind III digested λ DNA) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในช่องตัวอย่าง ปิดฝาครอบและต่อขั้วไฟกับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าเปิดกระแสไฟฟ้า เพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลไปย้อมสีด้วย GelStar ทำการย้อมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปศึกษาด้วยเครื่อง dark reader แล้วบันทึกภาพ DNA

3.3.5 การนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียวิธีทรานสฟอร์เมชั่น (transformation) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.3.5.1 การเตรียมอิเลคโตรคอมพิเทนต์เซลล์ (electrocompetent cell)

Electrocompetent cell คือ เซลล์ที่ผ่านการเตรียมเพื่อให้พร้อมสำหรับการ transformation โดยวิธีอิเลคโตรโพเรชั่น (electroporation)

การเตรียมอิเลคโตรคอมพิเทนต์เซลล์ โดยเพาะเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 0.5 M sorbitol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ (inoculation) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ growth medium (MRS broth, 0.5 M sorbitol, 3% glycerol, 40 mM DL-threonine) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเข้าสู่ระยะ mid log phase แล้วเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ดังกล่าวสองครั้งด้วยสารละลาย washing solution

(0.5 M sorbitol, 10% glycerol) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และแขวนลอย (suspend) เซลล์แบคทีเรีย ในสารละลาย electroporation buffer (0.5 M sorbitol, 1 mM K_2HPO_4, 1 mM MgCl, pH 7.0) ปริมาตรเท่ากับ 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดละ 80 ไมโครลิตร จากนั้น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.5.2 การนำ vector DNA เข้าสู่อิเลคโตรคอมพิเทนต์เซลล์

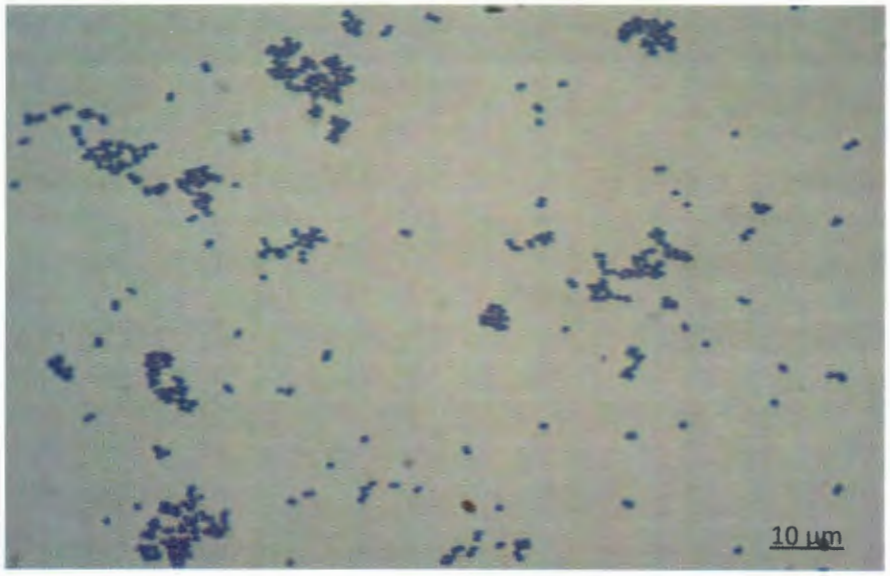
การนำ vector DNA เข้าสู่อิเลคโตรคอมพิเทนต์เซลล์ทำโดยนำอิเลคโตรคอมพิเทนต์เซลล์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ vector DNA ประมาณ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด electroporation cuvette ที่มีขนาดของ electrode gap เท่ากับ 1 มิลลิเมตร ความกว้าง 2 มิลลิเมตร electricalfield 12.5 kv/cm จากนั้นนำหลอด electroporation cuvette ดังกล่าวไปใส่ในเครื่อง Hybaid celljet Pro (Hybaid Ltd., UK) ซึ่งตั้งค่าสำหรับการทำ electroporation ดังนี้ ค่าความต้านทานเท่ากับ 200 Ω ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) เท่ากับ 25 μF ค่า Voltage เท่ากับ 2,500 V และเวลาเท่ากับ 5 ms หลังจากนั้นนำหลอด electroporation cuvette ออกจากเครื่อง Hybaid celljet Pro และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ recovery medium (MRS broth, 0.5 M sorbital, 20 mM MgCl, 2 mM $CaCl_2$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด electroporation cuvette ดังกล่าว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งโคโลนีดังกล่าวจะเป็นเซลล์ที่ได้รับ vector DNA เรียกแบคทีเรียที่ได้ในขั้นตอนนี้ว่า “transformant” ซึ่งจะนำไปสกัด plasmid เพื่อตรวจสอบว่ามี vector DNA อยู่จริงต่อไป

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การทดลองนี้เป็นการแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากปลาส้ม และผักเสี้ยนดองบนอาหาร MRS agar ที่มีการเติม 1% (w/v) $CaCO_3$ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยเลือกเฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างโซนใสได้

จากการทดลองนี้สามารถคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาส้มจำนวน 22 ไอโซเลต และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากผักเสี้ยนดองจำนวน 20 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมดไปตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ได้แก่ การทดสอบการติดสีแกรม (Gram's stain) การทดสอบคะตะเลส (Catalase test) การตรวจสอบรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ซึ่งพบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างของเซลล์เป็นแบบกลม (cocci) (ภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 4.1 รหัสและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะเซลล์	Gram's stain	Catalase test
ปลาส้ม	SF-01	coccus	positive	negative
	SF-02	coccus	positive	negative
	SF-03	coccus	positive	negative
	SF-04	coccus	positive	negative
	SF-05	coccus	positive	negative
	SF-06	coccus	positive	negative
	SF-07	coccus	positive	negative
	SF-08	coccus	positive	negative
	SF-09	coccus	positive	negative
	SF-10	coccus	positive	negative
	SF-11	coccus	positive	negative
	SF-12	coccus	positive	negative
	SF-13	coccus	positive	negative
	SF-14	coccus	positive	negative
	SF-15	coccus	positive	negative
	SF-16	coccus	positive	negative
	SF-17	coccus	positive	negative
	SF-18	coccus	positive	negative
	SF-19	coccus	positive	negative
	SF-20	coccus	positive	negative
	SF-21	coccus	positive	negative
	SF-22	coccus	positive	negative

ตารางที่ 4.1 รหัสและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก (ต่อ)

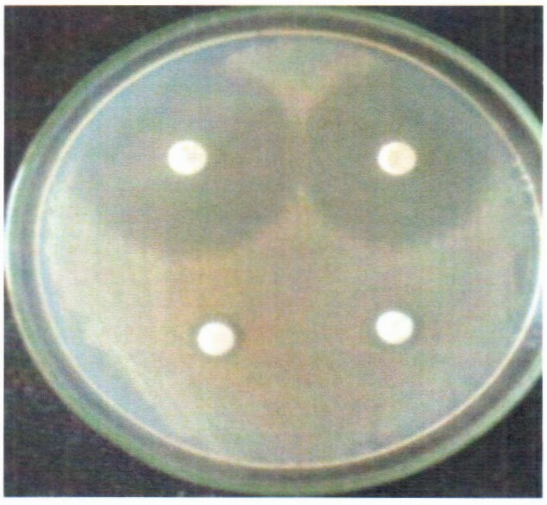
ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะเซลล์	Gram's stain	Catalase test
ผักเสี้ยนดอง	SV-01	coccus	positive	negative
	SV-02	coccus	positive	negative
	SV-03	coccus	positive	negative
	SV-04	coccus	positive	negative
	SV-05	coccus	positive	negative
	SV-06	coccus	positive	negative
	SV-07	coccus	positive	negative
	SV-08	coccus	positive	negative
	SV-09	coccus	positive	negative
	SV-10	coccus	positive	negative
	SV-11	coccus	positive	negative
	SV-12	coccus	positive	negative
	SV-13	coccus	positive	negative
	SV-14	coccus	positive	negative
	SV-15	coccus	positive	negative
	SV-16	coccus	positive	negative
	SV-17	coccus	positive	negative
	SV-18	coccus	positive	negative
	SV-19	coccus	positive	negative
	SV-20	coccus	positive	negative

4.2 การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

4.2.1 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก ทั้งหมดจำนวน 42 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 โดยวิธีการ swab-paper disc พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบได้ทั้งหมดจำนวน 27 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 64.29 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด) ซึ่งแบ่งเป็นแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 2 ชนิด จำนวน 10 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 23.81 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด) และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้เพียงชนิดเดียวจำนวน 17 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 40.48 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด) ส่วนแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 35.71 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.2)

ในการทดลองต่อไปจะใช้เฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 2 ชนิด



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ paper disc จากการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc

LAB isolate	Diameter of inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	E. coli O157:H7	*L. monocytogenes*
SF-01	ND	ND
SF-02	22.5	21
SF-03	24	24
SF-04	ND	ND
SF-05	ND	26
SF-06	ND	ND
SF-07	ND	ND
SF-08	ND	ND
SF-09	21.5	21.5
SF-10	21.5	20.5
SF-11	ND	28
SF-12	21.5	21.5
SF-13	ND	ND
SF-14	ND	ND
SF-15	22	26
SF-16	ND	24
SF-17	21	22
SF-18	21.5	23
SF-19	ND	22
SF-20	23.5	22

หมายเหตุ: ND = ไม่สามารถวัดขนาดโซนใสได้เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง < 7 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc (ต่อ)

LAB isolate	Diameter of inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	E. coli O157:H7	*L. monocytogenes*
SF-21	ND	ND
SF-22	23.5	30
SV-01	ND	11.5
SV-02	ND	10.75
SV-03	ND	13.5
SV-04	ND	ND
SV-05	ND	13.25
SV-06	ND	12
SV-07	ND	11.25
SV-08	ND	14
SV-09	ND	12
SV-10	ND	10.75
SV-11	ND	ND
SV-12	ND	ND
SV-13	ND	10.5
SV-14	ND	10.5
SV-15	ND	13
SV-16	ND	ND
SV-17	ND	ND
SV-18	ND	ND

หมายเหตุ: ND = ไม่สามารถวัดขนาดโซนใสได้เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง < 7 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc (ต่อ)

LAB isolate	Diameter of inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	E. coli O157:H7	*L. monocytogenes*
SV-19	ND	ND
SV-20	ND	11
Penicillin	ND	30.5
Tetracycline	22.5	24.5

หมายเหตุ: ND = ไม่สามารถวัดขนาดโซนใสได้เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง < 7 มิลลิเมตร

4.2.2 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนกรด

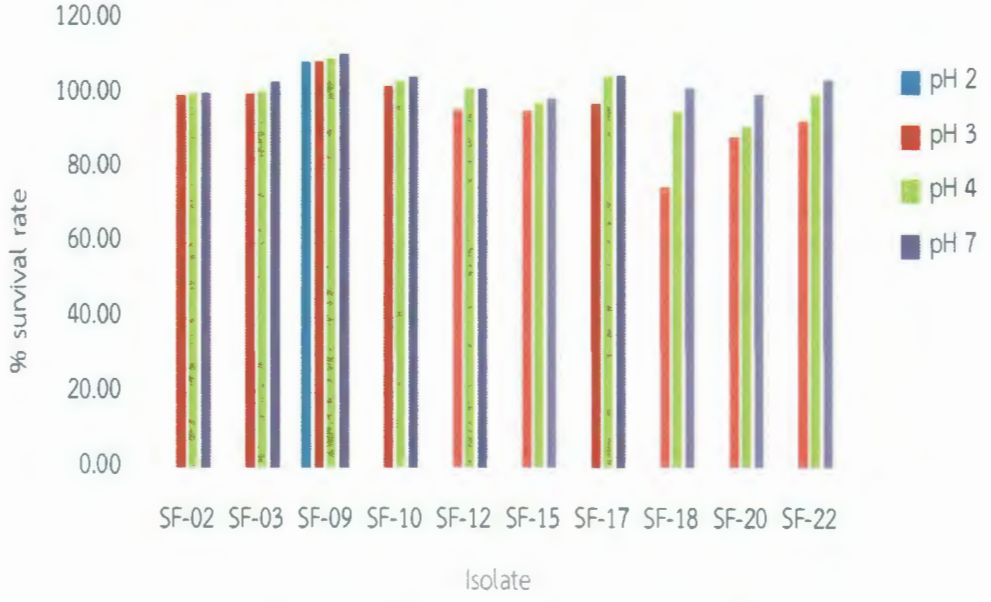
เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการทนกรดที่ pH 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีเฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 เท่านั้นที่สามารถทนกรดได้ทั้งที่ pH 2, 3, 4 และ 7 และหากสังเกตอัตราการรอดชีวิต (% survival rate) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ที่ pH 2, 3, 4 และ 7 จะพบว่ามีค่ามากกว่า 100% ซึ่งหมายความว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ไม่เพียงแต่ทนกรดได้ที่ pH 2, 3, 4 และ 7 เท่านั้น แต่ยังสามารถเจริญได้ที่ pH ดังกล่าวด้วย (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3)

4.2.3 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนเกลือน้ำดี

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตที่สามารถทน และเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีทั้งสองความเข้มข้น (สังเกตจากการที่มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100%) ซึ่งได้แก่ แลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-15, SF-17, SF-18, SF-20 และ SF-22 (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ pH ต่างๆ

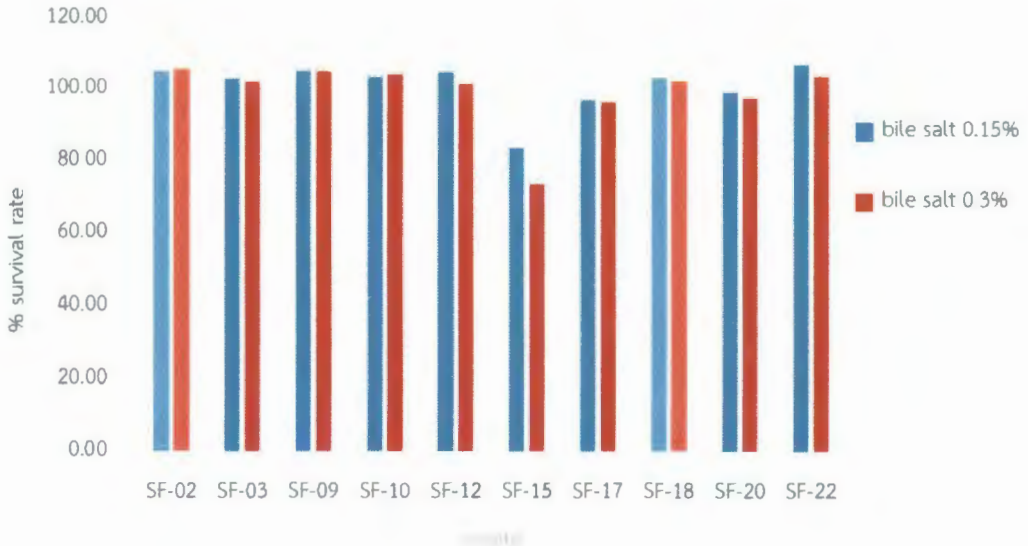
LAB isolate	(% survival rate)			
	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 7.0
SF-02	0	100.00	100.17	100.65
SF-03	0	100.25	100.95	103.45
SF-09	108.80	108.85	109.47	110.82
SF-10	0	102.23	103.41	105.02
SF-12	0	95.99	101.41	101.50
SF-15	0	95.44	97.62	98.80
SF-17	0	97.44	105.00	105.31
SF-18	0	74.65	95.35	101.68
SF-20	0	88.51	91.28	100.00
SF-22	0	92.88	100.00	104.07



ภาพที่ 4.3 อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ pH ต่างๆ

ตารางที่ 4.4 อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี เท่ากับ 0.15% และ 0.3%

LAB isolate	(% survival rate)	
	0.15% bile salt	0.3% bile salt
SF-02	105.50	105.95
SF-03	103.06	102.09
SF-09	105.73	105.47
SF-10	103.56	104.26
SF-12	104.96	101.24
SF-15	83.79	73.75
SF-17	96.87	96.43
SF-18	103.00	102.11
SF-20	99.03	97.56
SF-22	107.39	103.53



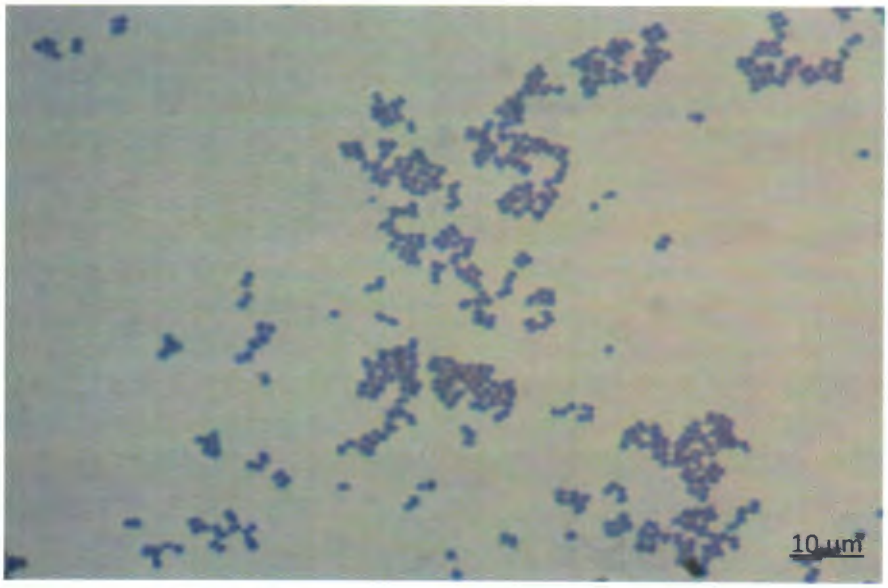
ภาพที่ 4.4 อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี เท่ากับ0.15% และ 0.3%

จากผลการทดลองที่ผ่านมาเห็นได้ว่ามีเพียงแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ทั้ง *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 2, 3 และ 4 และมีความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3% ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

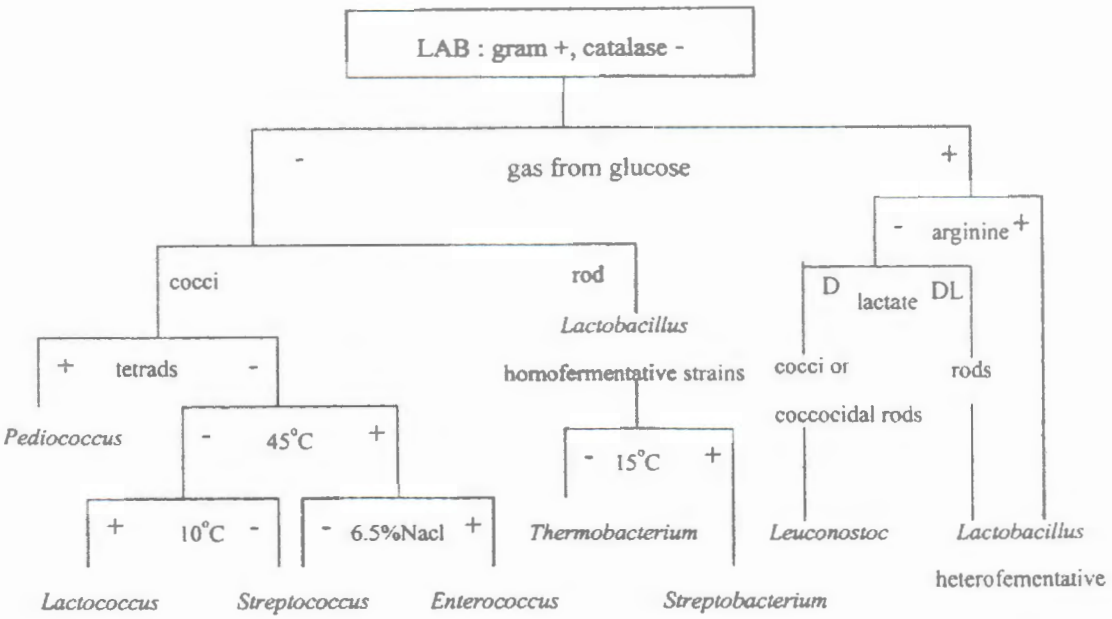
4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก

4.3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติต่างๆ ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติต่าง ๆ ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวติดสีแกรมบวก มีรูปร่าง coccus (ภาพที่ 4.5) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างก๊าซจากการหมักด้วยน้ำตาลกลูโคส สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในอาหาร MRS broth ที่เติม NaCl 6.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำผลการทดสอบที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแผนผังการจำแนกชนิดแลคติกแอสิดแบคทีเรียของ Schilliinger and Lucke (1989) (ภาพที่ 4.6) ทำให้ทราบว่า แลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มีคุณลักษณะเหมือนกับ *Enterococcus*



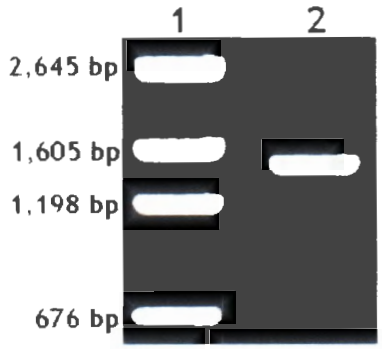
ภาพที่ 4.5 การติดสีแกรม และรูปร่างของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 4.6 แผนผังการจำแนกชนิดแลคติกแอสิดแบคทีเรียของ Schilliinger and Lucke (1989)

4.3.2 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มาสกัดเอา genomic DNA เพื่อใช้เป็น template DNA ในการทำ PCR โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ FD1 และ RP2 ซึ่งเป็น primer ที่จำเพาะต่อ 16S rDNA พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.7) เมื่อนำ PCR product ไปตรวจหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสจำนวน 1,512 bp ดังแสดงในภาพที่ 4.8 และเมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ที่อยู่ในฐานข้อมูล GENBANK พบว่าลำดับเบสของ PCR product ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* strain LMG 11423 (accession NR NR_042054.1) (ภาพที่ 4.9) ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* ดังนั้นจึงให้ชื่อแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Enterococcus faecium* SF-09



ภาพที่ 4.7 agarose gel แสดง PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09; Lane 1 = pGEM DNA marker; Lane 2 = PCR product ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

agagtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgaacgcttctttttccaccggagcttg
ctccaccggaaaaagaggagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggtaacctgcccatcagaaggggataacacttggaa
acaggtgctaataccgtataacaatcgaaaaccgcatggttttgatttgaaaggcgctttcgggtgtcgctgatggatggacc
cgcggtgcataagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggccacgatgcatagccgacctgagagggtgatcggccaca
ttgggactgagacacggcccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatcttcggcaatggacgaaagtctgaccgagca
acgccgcgtgagtgaagaaggttttcggatcgtaaaactctgatgttagagaagaacaaggatgagagtaactgttcatccct
tgacggtatctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttgtccggatt
tattgggcgtaaagcgagcgcaggcggtttcttaagtctgatgtgaaagccccgggctcaaccgggggagggtcattggaaact
gggagacttgagtgcagaagaggagagtggaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtagatatatggaggaacaccagtggc
gaaggcggctctctggtctgtaactgacgctgaggctcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccac
gccgtaaacgatgagtgctaagtgttggagggtttccgcccttcagtgctgcagctaacgcattaagcactccgcctggggag
tacgaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacg
cgaagaaccttaccaggtcttgacatcctttgaccactctagagatagagcttcccggtcgggggcaaagtgacaggtggtg
catggttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttattgttagttgccatcattcag
ttgggcactctagcaagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatcatgccccttatgacctgg
gctacacacgtgctacaatgggaagtacaacgagttgcgaagtcgcgaggctaagctaatctcttaaagcttctctcagttcg
gattgcaggctgcaactcgcctgcatgaagccggaatcgctagtaatcgcggatcagcacgccgcggtgaatacgttcccgg
gccttgtacacaccgcccgtcacaccacgagagtttgtaacacccgaagtcggtgaggtaacctttttggagccagccgccta
aggtgggatagatgattggggtaaagtcgtaa

ภาพที่ 4.8 ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

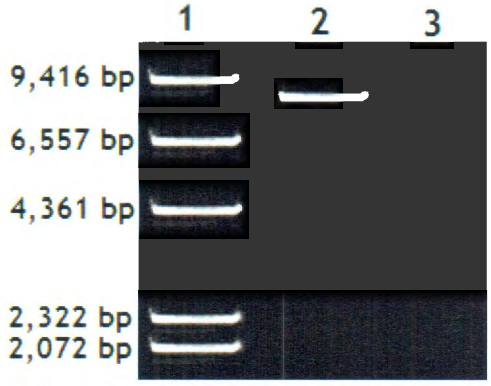
agagtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctatacatgcaagtcgaacgcttcttttccaccggagcttg
ctccaccggaaaaagaggagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggtaacctgcccatcagaaagggataacacttgga
aacaggtgctaataccgtataacaaatcaaaaccgcatggttttgatttgaaaggcgctttcgggtgtcgctgatggatgga
cccgcggtgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggccacgatgcatagccgcacctgagagggtgatcggc
cacattgggactgagacacggcccaaactctacgggaggcagcagtagggaatcttcggcaatggacgaaagtctgaccg
agcaacgccgcgtgagtgaagaaggttttcggatcgtaaaactctgttgttagagaagaacaaggatgagagtaactgttc
atcccttgacggtatctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttgt
ccggatttattgggcgtaaagcgagcgcaggcggttcttaagtctgatgtgaaagccccgggctcaaccggggagggtcatt
ggaaactgggagacttgagtgcagaagaggagagtggaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtagatatatggaggaaca
ccagtggcgaaggcggctctctggtctgtaactgacgctgaggctcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctg
gtagtccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttggagggtttccgcccttcagtgctgcagctaacgcattaagcactcc
gcctggggagtacgaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaatt
cgaagcaacacgaagaaccttaccaggtcttgacatcctttgaccactctagagatagagcttcccccttcgggggcaaag
tgacaggtggtgcatggttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttattgttagt
tgccatcattcagttgggcactctagcaagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatcatgc
cccttatgacctgggctacacacgtgctacaatgggaagtacaacgagttgcgaagtcgcgaggctaagctaatctcttaa
agcttctctcagttcggattgcaggctgcaactcgcctgcatgaagccggaatcgctagtaatcgcggatcagcacgccgc

ภาพที่ 4.9 ลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* strain LMG 11423

4.4 การตรวจสอบการมีพลาสมิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มาทำการสกัดพลาสมิด แล้วนำไปศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด ดังแสดงในภาพที่ 4.10

ในการทดลองนี้ได้ใช้ *Lactobacillus plantarum* N014-FLP ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pFLP1 (ขนาด 8.1 kb) เป็น positive control เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดพลาสมิดที่ใช้สามารถสกัดพลาสมิดจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้



ภาพที่ 4.10 การวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 โดยวิธี agarose gel; Lane 1 = DNA marker (lambda DNA cut with *Hin*dIII); Lane 2 = พลาสมิดที่สกัดได้จาก *L. plantarum* N014-FLP; Lane 3 = พลาสมิดที่สกัดได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

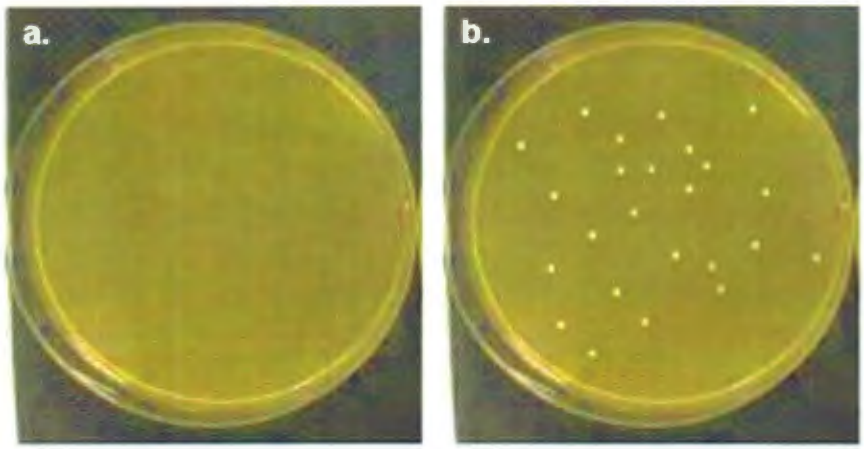
4.5 การนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

หลังจากที่ทำการทดลองนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 โดยวิธี electroporation แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร selective medium (MRS-Cd agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหาร selective medium ดังกล่าวได้ (ภาพที่ 4.11) ด้วยเหตุที่แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-Cd agar เป็น *E. faecium*SF-09 ที่ได้มาจากการทำ electrotransformation ดังนั้นจึงเรียก *E. faecium* SF-09 transformant

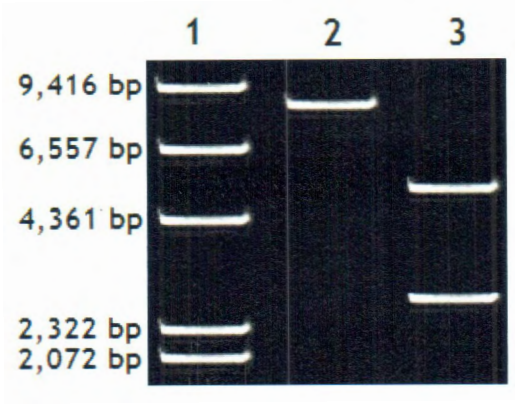
การตรวจสอบว่าโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหาร selective medium ดังกล่าวมี pFLP1 หรือไม่ทำโดยการเลือกโคโลนีของ *E. Faecium* SF-09 transformant แบบสุ่มจำนวน 3 โคโลนี มาสกัดพลาสมิด และนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

2 ชนิด คือ *Kpn*I และ *Bam*HI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัด pFLP1 ให้ได้เป็น DNA 2 ชิ้น ที่มีขนาด 5.2 kb และ 2.9 kb

จากการสกัดพลาสมิดพบว่า *E. faecium* SF-09 transformant ทั้ง 3 โคโลนีมีพลาสมิดที่มีขนาดประมาณ 8.1 kb (ซึ่งเป็นขนาดของ pFLP1) (ภาพที่ 4.12) และเมื่อทำการตรวจสอบว่าพลาสมิดที่สกัดได้เป็น pFLP1 หรือไม่ โดยการตัดพลาสมิดที่สกัดได้ด้วย *Kpn*I และ *Bam*HI พบว่าพลาสมิด ดังกล่าวสามารถถูกตัดได้เป็น 2 ชิ้น มีขนาดเท่ากับ 5.2 kb และ 2.9 kb ซึ่งเป็นผลการทดลองที่ยืนยันว่าพลาสมิดที่สกัดได้เป็น pFLP1



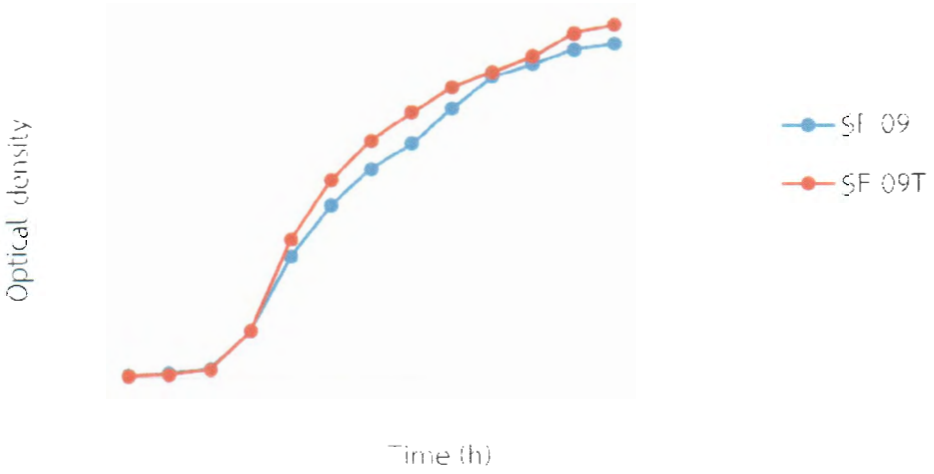
ภาพที่ 4.11 การเจริญของ *E. faecium* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-Cd agar หลังจากการทำ electrotransformation; a ชุดควบคุม (เป็นการทำ electrotransformation ที่ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทน pFLP1); b ชุดทดลอง (เป็นการทำ electrotransformation ที่ใช้ pFLP1)



ภาพที่ 4.12 การวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant โดยวิธี agarose gel electrophoresis (แสดงผลของ *E. faecium* SF-09 transformant เพียง 1 ตัว); Lane 1 = DNA marker (lambda DNA cut with *Hin*dIII); Lane 2 = พลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant; Lane 3 = DNA ที่ได้จากการตัด พลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant ด้วย *Kpn*I และ *Bam*HI

4.6 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของ *E. faecium* SF-09 กับ *E. faecium* SF-09 transformant

จากการนำ *E. faecium* SF-09 transformant มาศึกษาการเจริญเติบโต ความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2, 3 และ 4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกับผลที่ได้ของ *E. faecium* SF-09 (ภาพที่ 4.13 ตารางที่ 4.5, 4.6 และ 4.7) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 ไม่มีผลต่อคุณสมบัติดังกล่าวของแบคทีเรีย กล่าวคือ *E. faecium* SF-09 transformant ยังคงมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2, 3 และ 4 และความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3%



ภาพที่ 4.13 growth curve ของ *E. faecium* SF-09 และ *E. faecium* SF-09 transformant

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความสามารถของ *E. faecium* SF-09 (SF-09) และ *E. faecium* SF-09 transformant (SF-09T) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธี swab-paper disc

LAB isolate	Diameter of inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	E. coli O157:H7	*L. monocytogenes*
SF-09	22	20.6
SF-09T	22	20.2

ตารางที่ 4.6 อัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* SF-09 (SF-09) และ *E. faecium* SF-09 transformant (SF-09T) ที่ pH ต่างๆ

LAB isolate	(% survival rate)			
	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 7.0
SF-09	102.40	103.81	104.76	105.62
SF-09T	102.24	102.69	103.16	105.15

ตารางที่ 4.7 อัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* SF-09 (SF-09) และ *E. faecium* SF-09 transformant (SF-09T) ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3%

LAB isolate	(% survival rate)	
	0.15% bile salt	0.3% bile salt
SF-09	102.62	101.93
SF-09T	104.41	101.57

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ในการพัฒนาแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้มีความสามารถในการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 อย่าง คือ

(1) แบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และสามารถนำเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วมักเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่มนุษย์รับเข้าสู่ร่างกายเป็นประจำอยู่แล้ว

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร และมีการนำมาพัฒนาเป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ เช่น

(1.1) *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งแยกได้จากโยเกิร์ต (Roberfroid, 2000)

(1.2) *Lactococcus lactis* ซึ่งแยกได้จากอาหารหมัก (Pontes et al., 2011)

(1.3) *Lactococcus lactis* ซึ่งแยกได้จากอาหารหมัก (Lu et al., 2013)

(2) vector DNA ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และสามารถนำเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ได้ vector DNA เหล่านี้ต้องประกอบด้วย DNA ที่ได้มาจากแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารเท่านั้น ดังนั้นจึงมักเรียก vector DNA เหล่านี้ว่า food grade vector DNA นอกจากนี้ลักษณะที่สำคัญของ food grade vector DNA คือต้องไม่มียีนที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) เป็นส่วนประกอบ ในปัจจุบันมี food grade vector DNA หลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย เช่น

(2.1) pFM011 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* (Froseth and McKay, 1991)

(2.2) pVS40 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* (von Wright and Raty, 1993)

(2.3) pMYL1- β gal ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactobacillus acidophilus* (Lin et al., 1996)

(2.4) pLEB590 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* (Takala and Saris, 2002)

(2.5) pND919 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Streptococcus thermophilus* (Wong et al., 2003)

(2.6) pBSt1, pSLb1 และ pSintA1 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Streptococcus thermophilus* (Sasaki et al., 2004)

(2.7) pND632, pND648, pND969 pND965DJ และ pND965RS ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* (Liu et al., 2005)

(2.8) pFMN30 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* (Jeong et al., 2006)

(2.9) pLEB690 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* (Li et al., 2011)

(2.10) pSIP603R, pSIP603P, pSIP609R และ pSIP609P ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactbacillus plantarum* (Nguyen et al., 2011)

(2.11) pFLP1 ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาเพื่อใช้สำหรับเชื้อ *Lactbacillus plantarum* (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2012)

ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหาร 2 ชนิด คือ ผักดอง และปลาส้ม ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมีรูปร่างกลม และมีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์คล้ายคลึงกัน สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อน้อยไป จึงทำให้ได้แบคทีเรียเฉพาะกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น แต่เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้มุ่งเน้นที่การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบในอาหาร จึงไม่มีความจำเป็นต้องได้เชื้อหลาย ๆ กลุ่ม

จากการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากอาหารมาศึกษาความสามารถในยับยั้งแบคทีเรีย พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียหลาย isolate ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้งแกรมบวก (*Listeria monocytogenase*) และแกรมลบ (*Escherichia coli*) ได้ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารสร้างสารหลายชนิดไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นได้ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น ซึ่งหากต้องการทราบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียใดสร้างสารอะไรไปยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งสองชนิดจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ทำการทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากอาหารในการทนกรด และทนเกลือน้ำดี ในระดับที่มักพบในทางเดินอาหาร เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะทนต่อสภาพแวดล้อมในทางเดินอาหารได้ไปพัฒนาเป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ต่อไป จากการศึกษาพบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียบางชนิดสามารถทนได้เฉพาะกรด แลคติกแอสิดแบคทีเรียบางชนิดสามารถทนได้เฉพาะเกลือน้ำดี แลคติกแอสิดแบคทีเรียบางชนิดสามารถทนได้ทั้งกรด และเกลือน้ำดี จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทนกรด

และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียไม่ได้เป็นความสามารถที่จำเป็นต้องมีพร้อมกันเสมอในแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังนั้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ในทางเดินอาหารจึงจำเป็นต้องทดสอบความสามารถทั้งสองอย่างของแบคทีเรียเสมอ

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ทนกรดที่ pH 2 และทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 0.3% โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวคล้ายกับ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* ที่ระดับความเหมือนเท่ากับ 99% ดังนั้นจึงให้ชื่อแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Enterococcus faecium* SF-09

ความสามารถในการทนกรด และทนเกลือน้ำดี นอกจากจะพบได้ใน *E. faecium* SF-09 แล้วยังสามารถพบได้ใน *E. faecium* สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น

(1) *E. faecium* BDU7 ซึ่งมีความสามารถในการทนกรดสูงสุดที่ pH 3 และเกลือน้ำดีสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 5% (Abdhul et al., 2014)

(2) *E. faecium* AQ71 ซึ่งมีความสามารถในการทนกรดสูงสุดที่ pH 5 และเกลือน้ำดีสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 3% (Ahmadova et al., 2013)

(3) *E. faecium* MMRA ซึ่งมีความสามารถในการทนกรดสูงสุดที่ pH 1 และเกลือน้ำดีสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.3% (Rehaiem et al., 2014)

การนำ *E. faecium* SF-09 มาพัฒนาเพื่อที่จะนำไปใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์จำเป็นต้องมีการนำ vector DNA ใส่เข้าไปในแบคทีเรียดังกล่าว เมื่อต้องการนำ DNA ที่สนใจเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ก็สามารถทำได้โดยนำ DNA ที่สนใจแทรกเข้าไปภายใน vector DNA ที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย และเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ (อาจจะโดยการกิน การฉีด หรือการพ่นก็ได้) DNA ที่สนใจก็จะสามารถเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้

การจะนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจสอบดูว่าแบคทีเรียที่จะนำมาเป็นตัวรับ vector DNA มีพลาสมิดอยู่ภายในเซลล์หรือไม่ หากเซลล์แบคทีเรียมีพลาสมิดอยู่ จะทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ vector DNA กล่าวคือ vector DNA ที่จะนำมาใช้ได้ต้องเข้ากันได้กับพลาสมิดที่เซลล์แบคทีเรียมีอยู่ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ vector DNA ที่ใส่เข้าไปกับพลาสมิดที่มีอยู่เดิมจะต้องสามารถอยู่ด้วยกันได้ภายในเซลล์แบคทีเรีย แต่หากเซลล์แบคทีเรียไม่มีมีพลาสมิดอยู่ จะทำให้ข้อจำกัดในการเลือกใช้ vector DNA น้อยลง เนื่องจากไม่ต้องกังวลถึงการเข้ากันได้ระหว่าง vector DNA ที่ใส่เข้าไปกับพลาสมิดที่มีอยู่เดิม

ตัวอย่างการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่แบคทีเรียมีอยู่เดิมมีผลต่อการเลือกใช้ vector DNA ที่จะนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ การทดลองของ Foley et al. (1993)

Foley และคณะ ได้ทำการทดลองโดยนำ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCI305 มาเป็นตัวรับ vector DNA หลากหลายชนิด ได้แก่ pAM401 pIL253 pGKV110 และ pGKV210 ผลปรากฏว่า *L. lactis* subsp. *lactis* UC317 สามารถรับเอา pGKV110 และ pGKV210 เข้าสู่เซลล์ได้ แต่ไม่สามารถรับเอา pAM401 และ pIL253 เข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อ Foley และคณะศึกษาต่อไปก็พบว่า pCI305 เป็น theta replicating plasmid (พลาสมิดที่เพิ่มจำนวนด้วยกลไกที่เรียกว่า theta type replication) เช่นเดียวกับ pAM401 และ pIL253 ส่วน pGKV110 และ pGKV210 เป็น rolling circle replicating plasmid (พลาสมิดที่เพิ่มจำนวนด้วยกลไกที่เรียกว่า rolling circle replication) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าถ้า vector DNA ที่จะนำมาใส่เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย ใช้กลไกการเพิ่มจำนวนแบบเดียวกับพลาสมิดที่มีอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียอยู่แล้ว vector DNA ดังกล่าวมักถูกปฏิเสธไม่ให้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อป้องกันไม่ให้ไปแย่งชิงปัจจัยต่าง ๆ เช่น โปรตีน หรือเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเพื่อจำนวนพลาสมิด

การทดลองของ Tomita et al. (2003) เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่มีอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถขัดขวางการรับ DNA ชนิดอื่นเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดย Tomita และคณะ ได้นำ *Enterococcus faecium* BM4105RF สองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pMG1 และสายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด pMG1 มาเป็นตัวรับพลาสมิด pHTα pHTβ และ pHTγ พบว่า *E. faecium* BM4105RF สายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด pMG1 สามารถรับพลาสมิดทั้งสามชนิดได้ดีกว่า *E. faecium* BM4105RF สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pMG1

จากการนำ *E. faecium* SF-09 มาตรวจสอบว่ามีพลาสมิดหรือไม่ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด ซึ่งทำให้การเลือกใช้ vector DNA สำหรับนำเข้าสู่ *E. faecium* SF-09 มีข้อจำกัดน้อยลง

เพื่อเป็นการยืนยันว่าการสกัดพลาสมิดจาก *E. faecium* SF-09 แล้วไม่พบพลาสมิด เป็นเพราะแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิดจริง ไม่ได้เป็นผลมาจากสาเหตุอื่น เช่น ชุดสกัดพลาสมิดไม่มีประสิทธิภาพ หรือผู้สกัดพลาสมิดไม่มีความชำนาญ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการสกัดพลาสมิดจาก *Lactobacillus plantarum* N014-FLP ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pFLP1 (ขนาด 8.1 kb) ควบคู่ไปกับการสกัดพลาสมิดจาก *E. faecium* SF-09 ซึ่งจากการทดลองทุกครั้งสามารถสกัดพลาสมิดที่มีขนาด 8.1 kb จาก *L. plantarum* N014-FLP ได้ทุกครั้ง ดังนั้นการที่ไม่สามารถสกัดพลาสมิดได้จาก *E. faecium* SF-09 ในการศึกษานี้ จึงเป็นไปได้อย่างมากว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด

ในการปรับปรุงพันธุกรรมของ *E. faecium* SF-09 ให้สามารถนำ DNA ที่สนใจเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้จำเป็นต้องหา vector DNA ที่เหมาะสมมาใส่เข้าไปเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าว โดยตามทฤษฎีแล้วการเลือก vector DNA เพื่อนำมาใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์มีหลักเกณฑ์ ดังนี้

(1) ต้องเป็น food grade vector DNA หรือ DNA ที่เป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัยต่อผู้ที่รับเอา vector DNA เข้าสู่ร่างกาย โดยส่วนประกอบทุกอย่างของ food grade DNA ต้องมาจากพลาสมิด

ของแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร และต้องไม่มียีนที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) เป็นส่วนประกอบ

(2) ควรสร้างมาจากพลาสมิดของแบคทีเรียชนิดเดียวกับแบคทีเรียที่จะใช้เป็นตัวรับ vector DNA ตัวอย่างเช่น ถ้าแบคทีเรียที่จะใช้เป็นตัวรับ vector DNA เป็น *Enterococcus* vector DNA ที่ใช้ก็ควรสร้างมาจากพลาสมิดของ *Enterococcus*

แต่เนื่องจากในปัจจุบันนี้ยังไม่มี food grade vector DNA ที่สร้างมาจากพลาสมิดของ *Enterococcus* เลย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุกรรมของ *E. faecium* SF-09 ให้สามารถนำ DNA ที่สนใจเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ จึงมี 2 ทางเลือก คือ

(1) สร้าง food grade vector DNA จากพลาสมิดของ *Enterococcus* เอง ทางเลือกนี้ยาก ใช้เวลามาก และโอกาสที่จะประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากการสร้าง food grade vector DNA ต้องอาศัยความรู้ ประสบการณ์ และความชำนาญอย่างมาก

(2) นำ food grade vector DNA ที่มีอยู่แล้ว (ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของแบคทีเรียสกุลอื่นที่ไม่ใช่ *Enterococcus*) มาทดลองนำเข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 ทางเลือกนี้ทำง่าย แต่อาจติดปัญหา คือ food grade vector DNA ที่มีอยู่ในปัจจุบันทุกชนิดไม่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ หากต้องการ ต้องใช้ความสัมพันธ์หรือความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน ในการขออนุญาตใช้ ซึ่งบ่อยครั้งมักติดขัดในเรื่องเงื่อนไขที่ตั้งโดยเจ้าของ food grade vector DNA

ในการศึกษานี้ ทางผู้วิจัยตัดสินใจใช้ทางเลือกที่ 2 คือ ทดลองใช้ pFLP014 (ซึ่งเป็น food grade vector DNA ที่สร้างจากพลาสมิด *Lactobacillus*) กับ *E. faecium* SF-09 ด้วยเหตุผล ดังนี้

(1) pFLP014 เป็น food grade vector DNA ที่สร้างขึ้นโดยทีมวิจัยที่ทำการศึกษานี้ ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเรื่องการขออนุญาตใช้ เรื่องลิขสิทธิ์ และเรื่องเงื่อนไขต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขอใช้

pFLP1 (ภาพที่ 5.1) เป็น food grade cloning vector ที่มีขนาด 8.1 kb พัฒนาโดย Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn ในปี ค.ศ. 2012 เพื่อใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Lactobacillus plantarum* N014 ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ในการหมักแหนม (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2012) ด้วยเหตุที่ส่วนประกอบทั้งหมดของ cloning vector ชนิดนี้ได้มาจากแบคทีเรียที่พบในอาหาร ดังนั้นจึงได้รับการยอมรับให้ใช้ในการบริโภค หรือนำเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย และเหมาะที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของแบคทีเรียที่ต้องมีการนำข้าสู่ร่างกายมนุษย์

pFLP1 ประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนคือ

(1.1) origin of replication (*repA*)

origin of replication นี้ได้มาจาก *Lactobacillus sakei* เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวน pFLP1 ภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา

พบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถใช้ origin of replication ดังกล่าวในการเพิ่มจำนวน pFLP1 ภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ ดังนั้น pFLP1 จึงสามารถใช้เป็น cloning vector ได้กับแบคทีเรียหลายสายพันธุ์

(1.2) cadmium resistance gene (*cadA* และ *cadC*) ยีนนี้ได้มาจาก *Streptococcus thermophilus* ทำหน้าที่เป็น selectable marker ของ pFLP1

(1.3) multiple cloning site เป็นส่วนของ pFLP1 ที่สามารถนำชิ้น DNA ที่สนใจแทรกเข้าไปภายใน pFLP1 ได้ บริเวณนี้มีจุดตัดของ restriction enzyme หลายชนิด เช่น *Eco*RI *Pst*I *Sma*I และ *Bam*HI

(2) มีรายงานความสำเร็จในการนำ vector DNA ที่สร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus* เข้าสู่เซลล์ของ *Enterococcus* ซึ่งได้แก่

(2.1) การนำ vector DNA pLAB1301 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus hilgardii* เข้าสู่เซลล์ของ *Enterococcus faecalis* (Josson et al. 1990, Shareck et al., 2004)

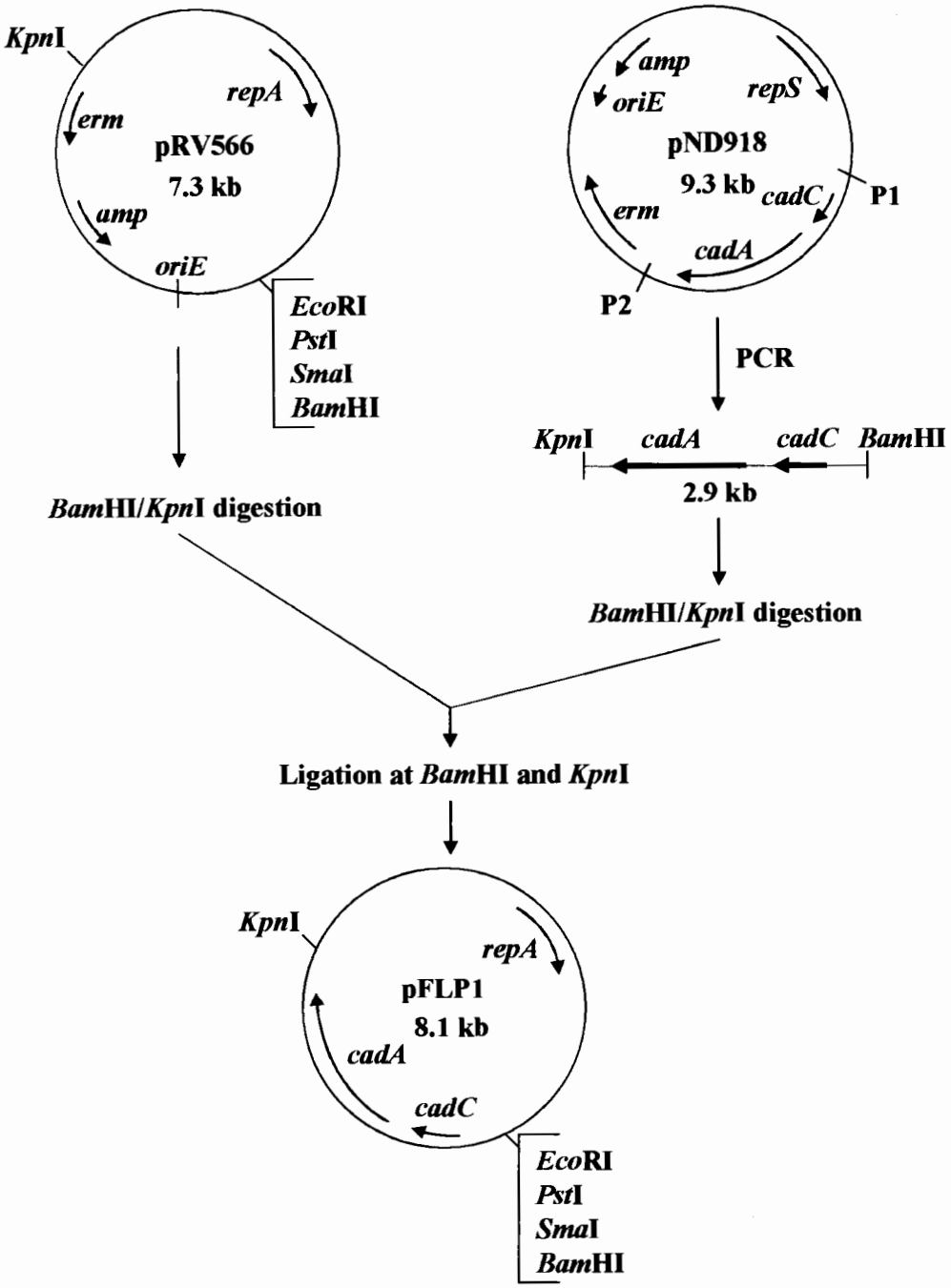
(2.2) การนำ vector DNA pLAB1304 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *L. hilgardii* เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* (Josson et al. 1990, Shareck et al., 2004)

(2.3) การนำ vector DNA pLAB1321 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *L. hilgardii* เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* (Josson et al. 1990, Shareck et al., 2004)

(2.4) การนำ vector DNA pGT633 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus reuteri* เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* (Tannock et al. 1994, Shareck et al., 2004)

(2.5) การนำ vector DNA pLFM2 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus fermentus* เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* และ *E. faecium* (Aleshin et al., 1999)

(3) มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่ายีน *repA* ใน pRV566 (ซึ่งก็คือยีน *repA* ใน pFLP1) สามารถทำให้พลาสมิดเพิ่มจำนวนได้ไม่เฉพาะใน *Lactobacillus* เท่านั้น แต่ยังสามารถทำให้ พลาสมิดเพิ่มจำนวนได้ใน *Enterococcus* ด้วย (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008)

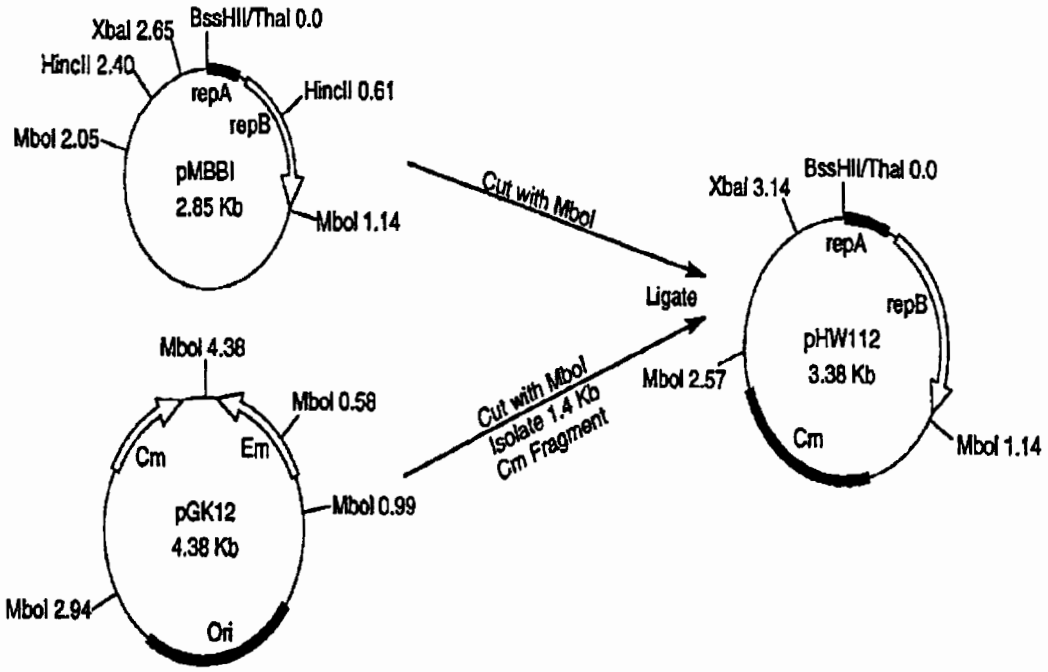


ภาพที่ 14 แผนภาพการสร้าง pFLP1

ที่มา: Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2012)

จากการทดลองนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 โดยวิธี electroporation ในการศึกษานี้ พบว่า *E. faecium* SF-09 สามารถรับเอา pFLP1 เข้าสู่เซลล์ได้ และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของ *E. faecium* SF-09 transformant (*E. faecium* SF-09 ที่มี pFLP1) กับ *E. faecium* SF-09 ในด้านการเจริญเติบโต ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. moncytogenes* และ *E. coli* ความสามารถในการทนกรด และทนเกลือน้ำดี พบว่าเชื้อทั้งสองประเภทมีคุณสมบัติทุกด้านที่ทำการทดสอบไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การรับเอา vector DNA pFLP1 ที่ *E. faecium* SF-09 รับเข้าสู่เซลล์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น รวมทั้งความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่เลียนแบบสภาวะในทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า *E. faecium* SF-09 transformant ที่ได้จากการทดลองนี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์

อย่างไรก็ตามในอนาคตข้างหน้า หากมีการสร้าง vector DNA จากพลาสมิดของ *Enterococcus* ขึ้นมาเพื่อใช้กับ *E. faecium* SF-09 ก็น่าจะทำให้การนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 และการเพิ่มจำนวนของ vector DNA ภายในเซลล์ของ *E. faecium* SF-09 มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการสืบค้นข้อมูล ถึงแม้ไม่พบว่าเคยมีการสร้าง food grade vector DNA สำหรับ *Enterococcus* มาก่อน แต่ก็มีรายงานการสร้าง vector DNA จากพลาสมิดของ *Enterococcus* ซึ่งรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการพบพลาสมิดใน *Enterococcus* และการนำพลาสมิดดังกล่าวมาใช้ในการสร้าง vector DNA สำหรับใช้กับ *Enterococcus* ต่อไป ภาพที่ 5.2 แสดงแผนภาพการสร้าง vector DNA pHW112 จากพลาสมิด pMBBI ที่ได้มาจาก *E. faecium* 226 (Wyckoff et al., 1996)



ภาพที่ 5.2 แผนภาพการสร้าง pHW112

ที่มา: Wyckoff et al. (1996)

จากการศึกษานี้ทำให้สรุปได้ว่า pFLP1 สามารถนำมาใช้เป็น vector DNA ในการปรับปรุงพันธุกรรมของ *E. faecium* SF-09 เพื่อให้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการจะนำ *E. faecium* SF-09 ที่มี pFLP1 ไปใช้งานจริงยังอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก เพื่อให้การใช้งานมีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. ศูนย์วิจัยคุณภาพสัตว์น้ำ: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2544.

กระทรวงสาธารณสุข. **การกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน สำหรับยาชีววัตถุ ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2549**. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549.

จินตลา ลิ้มภักดี. **การคัดเลือกและการศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากผลิตภัณฑ์ประมงซึ่งแปรรูปโดยกระบวนหมักและการนำไปใช้ประโยชน์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544.

จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา และวีระชัย วัฒนวีระเดช. "วัคซีน", ใน **คู่มือวัคซีน 2010-2011**. กรุงเทพฯ: บริษัท บียอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์ จำกัด, 2553.

นวลจันทร์ พารักษา. "สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก", **สุกรสาส์น**. 16(19): 6-13, 2533.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. "การผลิตอาหารหมักจากแลคติคแอสิคแบคทีเรีย", ใน **โปรซีดดิงส์แลคติกแอสิคแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทยครั้งที่ 1 28-29 ตุลาคม 2534.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2534.

_____. "อาหารจากแลคติกแอสิดแบทีเรียในอุตสาหกรรมไทย", **วารสารจาร์พา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** 8(45): 48-52, 2541.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. "คุณสมบัติของเส้นใยอาหารในการเป็น functional foods", **วารสารจาร์พา**. 11(76): 50-54, 2548.

ศรัณย์ พรหมสาย. **การแยกและคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. (2551) "วิจัยโปรไบโอติกเพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ", **โปรไบโอติก** http//www.kunhthai.com/asp11.html. มกราคม, 2257.

สยามมารีน. (2550) "วัคซีนกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากโปรไบโอติก", **วัคซีนโปรไบโอติก** http://www.SiamMarine.com. ธันวาคม, 2557.

อรวินทร์ เลาหรัชตนนันท์. "สารกันเสียอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก", **วารสารอาหาร**. 19(3): 16. 2532.

อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์ และคณะ. "เอกสารคำแนะนำการใช้วัคซีนต่างๆ", **กองผลิตชีวภัณฑ์กรมปศุสัตว์**. กรุงเทพฯ: บัณฑิตการพิมพ์, 2525.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

อัจฉรา หนูเพชร. **การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักของไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2546.

อรัญญา สังขศรี. **การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารโดย *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย**. สงขลา: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2541.

อุทัย คันโธ. "หลักการโปรไบโอติกเชิงอาหารสัตว์", **วารสารสุกรสาสน์**. 18(11): 11-16, 2535.

A. O. A. C. **Official Method of Analysis the Association of Official Analytical Chemisttry.** 15th ed. Washington, D.C., 1990.

Abdhul, K. and et al. "Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari", **International Journal of Biological Macromolecules**. 70: 450-454, 2014.

Ahmadova, A. and et al. "Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safty of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese", **Food Control**. 30: 631-641, 2013.

Aleshin, V. V. and et al. "The broad host range plasmid pLF1311 from *Lactobacillus fermentum* VKM1311", **FEMS Microbiol Lett**. 178: 47–53, 1999.

Aires, K. A. and et al. "Production of human papilomavirus type 16 L1 virus like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells", **Applied and Environmental Microbiology**. 72: 745–752, 2006.

Axelsson, L. J. "Lactic Acid Bacteria: classification and physiology", In **Lactic Acid Bacteria**. 1-64. Cited Salminen, S. and Wright, A. V. eds. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993.

_____. "Lactic acid bacteria: classification and physiology", In **Lactic Acid Bacteria: Microbiololgy and Functional Aspects**. 1-72. Cited Salminen, S. and Wright, A. V. eds. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998.

Bahey-El-Din, M. and et al. "*Lactococcus lactis*-expressing listeriolysin O (LLO) provides protection and specific CD8? T cells against *Listeria monocytogenes* in the murine infection model", **Vaccine**. 26: 5304–5314, 2008.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Barouch, D. H. and et al. "A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates", **J. Virol**. 79: 34-8828, 2005.

Bermudez-Humaran, L. G. and et al. "A novel mucosal vaccine based on live lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors", **Journal of Immunology**. 175: 7297–7302, 2005.

Beisheier, L. **Microbiology in practicr**. 5th ed. New York: Harper Collins publisher, Inc., 1991.

Bojana, B. M. and Irena R. "bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF 221 production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helvticus* ATCC 15009", **Process Biochem**. 33: 345-352, 1998.

Brink, B. T. and et al. "Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of Acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46", **J. Appl. Bacteriol**. 77: 140-148, 1994.

Buccato, S. and et al. "Use of *Lactococcus lactis* expressing pili from group B *Streptococcus* as a broad-coverage vaccine against streptococcal disease", **The Journal of Infectious Diseases**. 194: 331–340, 2006.

Campos, I. B. and et al. "Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein A: Induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge", **Microbes and Infection**. 10: 481–488, 2008.

Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. "Food fermentations: role of microorganism in food product and preservation", **Int. J. Food. Microbiol**. 50: 131-149, 1999.

Cheun, H. I. and et al. "Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection", **Journal of Applied Microbiology**. 96: 1347–1353, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Chim-anage, P. and et al. "Effect of Feed Supplementation of Lactic Acid Bacteria on Microbial Changes in Boiler Intestine", **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 42: 269-276, 2008.

Chu, H. and et al. "*Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*", **Microbiology and Immunology**. 49: 941–948, 2005.

Conway, P. L., Corback, S.L. and Goldin, B.R. "Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell", **J. Dairy Sci**. 70: 1-12, 1987.

Corthesy, B. and et al. "Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* Urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*", **The Journal of Infectious Diseases**. 192: 1441–1449, 2005.

Crutz-Le Coq, A. M. and Zagorec, M. "Vectors for Lactobacilli and other Gram-positive bacteria based on the minimal replicon of pRV500 from *Lactobacillus sakei*", **Plasmid**. 60(3): 212-20, 2008.

Daniel, C. and et al. "Protection against *Yersinia pseudotuberculosis* infection conferred by a *Lactococcus lactis* mucosal delivery vector secreting LcrV", **Vaccine**. 27: 1141–1144, 2009.

De vuyst, L. and Vandamme, E. J. "Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria", In **Blackie Academic and Professional**. London: s.n., 1994.

Delliaglio, F. L., Dicks, M. T. and Torriani, S. "The genus *Leuconostoc*", In **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 235-278. Cited Wood, B. J.B. and Holzapfel, W.H. eds. United Kingdom: Chapman and Hall, Glasgow, 1995.

Desmond, C. and et al. "Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02", **Plasmid**. 54: 160-175, 2005.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Devriese, L. A. And Pot, B. "The genus *Enterococcus*", In **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 327-367. Cited Wood, B.J. B. and Holzapfel, W. H. eds. United kingdom: Chapman and Hall, Glasgow, 1995.

Epstein, S. L. and et al. "Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein", **Vaccine**. 23: 10-5404, 2005.

Erkkila, S. and Petaja, E. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use", **Journal of Meat Science**. 55: 297-300, 2000.

Franz, C. M. A. P. and et al. "Plataricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from read-to-eat salad", **Lett. Appl. Microbiol**. 26: 231-235, 1998.

Ferraz, J. C. and et al. "A heterologous DNA priming-Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice", **Infect Immun**. 72: 50-6945, 2004.

Foley, S., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. "Incompatibility properties of the narrow-host-range lactococcal plasmid pCI305", **Journal of General Microbiology**. 139: 1271-1276, 1993.

Froseth, B. R. and McKay, L. L. "Development and application of pFM011 as a possible food-grade cloning vector", **J. Dairy Sci**. 74: 1445-1453, 1991.

Fuller, R. "Probiotic food current use and future development", **IFI. NA**. 3: 23-26, 1993.

_____. "Probiotics in man and animals", **J. Appl. Bacteriol**. 66: 365-378, 1989.

Gilliland, S. E. and et al. "Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct", **Journal of Diary Science**. 67: 3045-2051, 1984.

Gilliland, S. E. and Speck, M. L. "Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture", **J. Food Prot**. 40: 820-823, 1997.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Gu, Q., Song, D. and Zhu, M. "Oral vaccination of mice against *Helicobacter pylori* with recombinant *Lactococcus lactis* expressing urease subunit B", **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 56: 197–203, 2009.

Guerra, N. P. and et al. "Production of four potentially probiotic lactic bacteria and their evalution as feed additives for weaned piglets", **Animal Feed Science and Technology**. 134: 89-107, 2007.

Gueimonde, M. and et al. "Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathgens by selected lactobacilli", **Food Research International**. 39: 467-471, 2006.

Hannify, S. B. and et al. "Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection", **The Journal of Infectious Diseases**. 195: 185–193, 2007.

Hardie, J. M. And R. A. Whiley. "The genus *Streptococcus*", In **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 75-124. Cited Wood B.J. B. and Holzapfel W. H. eds. United kingdom: Chapman and Hall, Glasgow, 1995.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, M. J. H. "Probiotics: A general view", In Lactic acid bacteria in health and disease. Cited Wood, J.B.J. Vol 1. **Elsevier Applied Science Publishers**, Amsterdam, 1992.

Hertzler, S. R. and Clancy, S. M. "Kefir improves lactosedigestion and tolerance in adults with lactose maldigestion", **Research**. 103(5): 582-586, 2003.

Ho, P. S., Kwang, J. and Lee, Y. K. "Intragstric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced antibody production", **Vaccine**. 23: 1335–1342, 2005.

Hou, X. L. and et al. "Surfacedisplayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria", **Vaccine**. 26: 24–31, 2007.

Hu, C. X. and et al. "Secretory expression of K88 (F4) fimbrial adhesin FaeG by recombinant *Lactococcus lactis* for oral vaccination and its protective immune response in mice", **Biotechnology Letters**. 31: 991–997, 2009.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Huang, Y. and Adams, M. C. "In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria", **International Journal of Food Microbiology**. 91: 253-260, 2004.

Jack, R. W. and et al. "Bacteriocin of Gram-Positive Bacteria", **Microbiol Rev**. 59: 171-200, 1995.

Jacobsen, C. N., and et al. "Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. By in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strain in human", **Applied and Enviromental Microbiology**. 65(11): 4949-4956, 1999.

Jin, L. Z. and et al. "Acid and bile tolerance of *lactobacillus* isolated from chicken intestine", **Appl. Microbiol**. 27: 183-185, 1998.

Jeong, D. W. and et al. "A food-grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an α-galactosidase gene as a selection marker", **Food Microbiol**. 23(5): 468-475, 2006.

Johnson, T. R. and Case, C. L. **Laboratory experiment in microbiology brief**. 2nd ed. Rewood City: Benjamin cumming publisher company, Inc., 1989.

Kaila, M. and et al. "Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain", **J. Int. Pediatr. Res. Found**. 32: 141-144, 1992.

Kajikawa, A. and et al. "Intragastic immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis", **Vaccine**. 25: 3599–3605, 2007.

Kandler, O. and Weiss, N. "Regular, nosporing Gram-positive rod Bergey's Manual Determinative Bacteriology", **Baltimore: William and Wilkins**. 1208-1234, 1986.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Kim, T. W. and et al. "Induction of immunity against hepatitis B virus surface antigen by intranasal DNA vaccination using a cationic emulsion as a mucosal gene carrier", **Mol Cells**. 22: 81-175, 2006.

King, A. D. J. and Nagel, C. W. "Influent of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*", **J. Food sci**. 40: 362-366, 1975.

Klein, G. and et al. "Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria", **International Journal of Food Microbiology**. 41: 103-125, 1998.

Krier, F. and et al. "Influence of temperature and pH on production of two bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR 52 during batch fermentation", **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 50: 359-363, 1998.

Kontula, P. and et al. "The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on emended oat bran product effect on gastrointestinal microbiota", **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 50: 246-256, 1998.

Lasen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephen, J. "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of Bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401", **J. Appl. Bacteriol**. 75: 113-122, 1993.

Lee, S. F. and et al. "Surface expression of a protective recombinant pertussis toxin S1 subunit fragment in *Streptococcus gordonii*", **Infection and Immunity**. 67: 1511–1516, 1999.

Lee, P., and Faubert, G. M. "Expression of the Giardia lamblia cyst wall protein 2 in *Lactococcus lactis*", **Microbiology**. 152: 1981–1990, 2006.

Li, Y.-J. and et al. "Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production", **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2010: 1–9, 2010.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Li, R. and et al. "Nisin-selectable food-grade secretion vector for *Lactococcus lactis*", **Biotechnol Lett**. 33(4): 797-803, 2011.

Lin, M. Y., Harlander, S. and Savaiano, D. "Construction of an integrative food-grade cloning vector for *Lactobacillus acidophilus*", **Appl Microbiol Biotechnol**. 45(4): 484-9, 1996.

Lindholm, A., Smeds, A. and Palva, A. "Receptor binding domain of *Escherichia coli* F18 fimbrial adhesin FedF can be both efficiently secreted and surface displayed in a functional form in *Lactococcus lactis*", **Applied and Environmental Microbiology**. 70: 2061–2071, 2004.

Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. "Probiotics: Growth promoting factors produced by micro-organisms", **Science**. 147: 747-748, 1965.

Little, S. R. and et al. "Poly-beta amino estercontaining microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines", **Proc Natl Acad Sci**. 101: 9-9534, 2004.

Liu, J.-K. and et al. "Induction of immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbrial protein", **Applied and Environmental Microbiology**. 75: 4491–4497, 2009.

Liu, M.A. "DNA vaccines: an historical perspective and view to the future", **Immunol Rev**. 239: 62-84, 2011 (a).

_____. "Gene-based vaccines: Recent developments", **Curr Opin Mol Ther**. 12: 86-93. 2011 (b).

Liu, C. Q. and et al. "Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*", **J. Appl Microbiol**. 98(1): 127-135. 2005.

Lorenzen, N. and LaPatra, S. E. "DNA vaccines for aquacultured fish", **Rev Sci Tech**. 24: 13-201, 2005.

Lori, F. and et al. "A novel HIV immunization technology", **Vaccine**. 23: 4-2030, 2005.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Lu, W. and et al. "Construction and application of a food-grade expression system for *Lactococcus lactis*", **Mol Biotechnol**. 54: 170-176, 2013.

Mannam, P., Jones, K. F. and Geller, B. L. "Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*", **Infection and Immunity**. 72: 3444–3450, 2004.

Maragkoukis, P. A., and et al. "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products", **International Dairy Journal**. 16: 189-199, 2005.

Marteau, P. R. and et al. "Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics", **American J. Clinic. Nutri**. 73: 430-436, 2001.

Marvin, L. S. "Use of microbial culture: Dairy products", **Food Technogology**. 35(1): 79-83, 1981.

Medina, M. and et al. "Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the pnemococcal protective protein A induces protective immunity in mice", **Infection and Immunity**. 76: 2696–2705, 2008.

Mohammadzadeh, M. and et al. "Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge", **Proceedings of the National Academy of Science**. 106: 4331–4336. 2009.

Mufandaedza, J. and et al. "Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains", **International Journal of Food Microbiology**. 108: 147-152, 2006.

Nguyen, T. T and et al. "A food-grade system for inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using an alanine racemase-encoding selection marker", **J. Agr. Food Chem**. 59: 5617-5624, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Oliviera, M. L. S. and et al. "Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A", **Microbes and Infection**. 8: 1016–1024, 2006.

Orla-Jensen, S. "The lactic acid bacteria", **Copenhagen: Andr. Fred Host and Son. Mem. Academic. Roy. Science**. 8(5): 81-197, 1919.

Ozaki, T. and et al. "Cross-reactive protection against influenza A virus by a topically applied DNA vaccine encoding M gene with adjuvant", **Viral Immunol**. 18: 80-373, 2005.

Parker, R. B. "Probiotics the other half of the antibiotic story", **Animal Nutrition and Health**. 29: 4-8, 1974.

Pennacchia, C. and et al. "Selection of *Lactobacillus* strain from fermented sausages for their potential sue as probiotic", **Meat Science**. 67: 309-317, 2004.

Perez, C. A. and et al. "Rotavirus VP7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice", **Journal of Applied Microbiology**. 99: 1158–1164, 2005.

Pontes, D. S. and et al. "*Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems", **Protein Expression and Purification**. 79: 165-175, 2011.

Poo, H. and et al. "Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice", **International Journal of Cancer**. 119: 1702–1709, 2006.

Powell, K. "DNA vaccines-back in the saddle again", **Nat. Biotechnol**. 22: 801-799, 2004.

Qiao, X. and et al. "Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice", **BMC Microbiology**. 9: 249, 2009.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "A simple method for detecting bacteriocin production: swab-paper disc", **The Journal of Science KhonKaen University**. 26(4): 281-288, 1998.

_____. "Construction of food-grade cloning vector for *Lactobacillus plantarum* and its utilization in food model", **Journal of General and Applied Microbiology**. 58(4): 317-324, 2012.

Rao, S. S. and et al. "Comparative evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model", **Vaccine**. 24: 73-367, 2006.

Rehaiem, A. et al. "Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA", **Food Control**. 37: 343-350, 2014.

Rio, B. D. and et al. "Oral immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum* induces a protective immune response in mice with lyme disease", **Clinical and Vaccine Immunology**. 15: 1429–1435, 2008.

Roberfroid, M. B. "Prebiotics and probiotics: are they functional food?", **Am J. Clin. Nutr**. 71: 1682S-1687S (discussion 1688S-1690S), 2000.

Rottinghaus, S. T. and et al. "Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination", **Vaccine**. 21: 8-4604, 2003.

Roy, M. J. and et al. "Induction of antigen-specific CD8+T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of an hepatitis B virus DNA vaccine", **Vaccine**. 19:76478, 2000.

Sasaki, Y., Ito, Y. and Sasaki, T. "thyA as a Selection Marker in Construction of Food-Grade Host-Vector and Integration Systems for *Streptococcus thermophiles*", **Appl. Environ. Microbiol**. 70(3): 1858-1864, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Scavone, P. and et al. "Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* displaying either anchored or secreted forms of *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonization in mice", **Microbes and Infection**. 9: 821–828, 2007.

Shareck, J. and et al. "Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology", **Crit Rev Biotechnol**. 24(4): 155-208, 2004.

Schillinger, V. and Luke, K.K. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat", **Appl. Environ. Microbiol**. 55: 1091-1096, 1989.

Schillinger, U. and Hozapfel, W. H. "The genus *Carrnobacterium*", In **Genera of Lactic Acid Bacteria**. 307-326. Cited Wood, B. J. B. and Hozapfel, W. H. eds. United kingdom: Chapman and Hall, Glasgow, 1995.

Shivappa, R. B. and Chanratchakool, P. "Efficiency of probiotics and disinfectant in controlling *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* larvae under normal and stress conditions", **Proceedings of the seminar on Biotechnology**. NSTDA, Bangkok. 314, 1997.

Smits, H. H. and et al. "Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin", **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 115: 1260-1267, 2005.

Stack, H. M. and et al. "Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli", **Applied and Environmental Microbiology**. 76: 500-507, 2010.

Steidler, L. and et al. "Treatment of murine colitis by *lactococcus lactis* secreting interleukin- IO", **Science**. 289(5483): 1352-1355, 2000.

Stern, A. M. and Markel, H. "The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges", **Health Aff (Millwood)**. 24: 21-611, 2005.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Stiles, M. E. And Holzapfel, W. H. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", **Int. Food Microbiol**. 36: 1-29, 1997.

Salminen, S. and Wright, A.V. "Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Function Aspect", In **Marcel Dekker.** New York: s.n., 1998.

Sim, A. C. N. and et al. "Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen", **Vaccine**. 26: 1145–1154, 2008.

Simpson, W. J. and Taguchi, H. "The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*", In **The genera of Lactic acid bacteria**. 125–172. Cited Wood B. J. B. and Holzapfel W. H. eds. London: s.n., 1995.

Sizemore, D. R., Branstrom, A. A. and Sadoff, J. C. "Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA mediated immunization", **Science**. 270: 299-302, 1995.

Silliker, J. H. and et al. "Microbial Ecology of Foods: Vol. II", **Academic Press**. 350, 1980.

Supayang, V. and et al. "Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vagina lactobacilli", **Anaerobe**. 12: 221-226, 2006.

Suskovic, J. R. and et al. "Bacteriocin of Gram-positive bacteria", **Bacteriology Review**. 40: 722-756, 1976.

Tang, L., and Li, Y. "Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein", **Virus Genes**. 39, 238–245, 2009.

Takala, T. M. and Saris, P. E. J. "A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisI", **Appl Microbiol Biotechnol**. 59: 467-471, 2002.

Takamura, S. and et al. "DNA vaccine encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration", **Gene Ther**. 11: 35-628, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Tannock, G. W. and et al. "Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100–63", **Plasmid**. 31: 60–71, 1994.

Tarahomjoo, S. "Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria", **Mol Biotechnol**. 51: 183-199, 2012.

Teuber, M. "The genus *Lactococcus*", In **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 134-173. Cited. Wood, B.J. B and Holzapfel W. H. eds. United kingdom: Chapman and Hall, Glasgow, 1995.

Toit, M. and et al. "Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels faeces pH and faeces moisture content", **J. Food Microbiol**. 40: 93-104, 1998.

Tomita, H., and et al. "Highly Conjugative pMG1-Like Plasmids Carrying Tn1546-Like Transposons That Encode Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*", **J. Bacteriol**. 185(23): 7024–7028; Dec, 2003.

Tuomala, E. M. and Salminen, S. J. "Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures", **International Journal of Food Microbiology**. 41: 45-51, 1998.

Visser, R., and Holzapfel, W. H. "Lactic Acid Bacteria in the Control of Plant Pathogens", In **The Lactic Acid Bacteria**. Vol. 1. Cited Wood, B. J. B. London: Elsevier Science Publishers, 1992.

Von Wright, A. and Raty, K. "The nucleotide sequence for the replication region of pVS40, a lactococcal food grade cloning vector", **Lett Appl Microbiol**. 17(1): 25-8, 1993.

Wang, J. and et al. "Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis", **J. Immunol**. 173: 65-6357, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Wei, C.-H. and et al. "Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99", **Vaccine**. 28: 4113–4118, 2010.

Weinberg, Z. G. and Muck, R. E. "New trends in development and use of inoculants for silage", **FEMS Microbiol. Rev**. 19: 53i68, 1996.

Wistreich, G. A. and Lechtman, M. D. **Laboratory exercise in microbiology**. 4th ed. New York: Macmillan publishing Co., Inc., 1980.

Wolff, J. A. and et al. "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo", **Science**. 247: 8-1465, 1990.

Wong, W. Y. and et al. "A potential food-grade cloning vector for *Streptococcus thermophilus* that uses cadmium resistance as the selectable marker", **Appl Environ Microbiol**. 69(10): 5767–5771, 2003.

Wood, B. I. B. and Holzapfel, W. H. "The genera of lactic acid bacteria", In **Blackie Academic and Professional**. United Kingdom: Bishopbriggs, Glasgow, 1995.

Wood, B. J. B., and Holzapfel, W. H. "The genera of lactic acid bacteria", In **Blackie Academic and Professional**. United Kingdom: Bishopbriggs, Glasgow, 1997.

Wu, C.-M., and Chung, T.-C. "Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion proteins of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein", **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 50: 354–365, 2007.

Wyckoff, H. A. and et al. "Characterization and sequence analysis of a stable cryptic plasmid from *Enterococcus faecium* 226 and development of a stable cloning vector", **Appl Environ Microbiol**. 62(4): 1481-6; April, 1996.

Xin, K.-Q. and et al. "Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env", **Blood**. 102: 223–228, 2003.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Yigang, X. U. and Yijing, L. I. "Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization", **Immunology**. 124: 68–75, 2007.

Zhang, Z.-H. and et al. "Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP119", **World Journal of Gastroenterology**. 11: 6975–6980, 2005.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Lactobacillus MRS broth

สูตรอาหาร MRS broth 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Proteose peptone	10.00	กรัม
Beef extract	10.00	กรัม
Yeast extract	5.00	กรัม
Dextrose	20.00	กรัม
Polysorbate 80	1.00	กรัม
Ammonium citrate	2.00	กรัม
Sodium acetate	5.00	กรัม
Magnesium sulfate	0.10	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Di-potassium phosphate	2.00	กรัม

ชั่ง MRS broth 55.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Lactobacillus MRS agar

สูตรอาหาร MRS agar 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

MRS broth	55.5	กรัม
Agar	20	กรัม

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Nutrient broth

สูตรอาหาร NB 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone casein	3.00	กรัม
Meat extract	5.00	กรัม

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Nutrient agar

สูตรอาหาร NA 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone casein	3.00	กรัม
Meat extract	5.00	กรัม
Agar	20.00	กรัม

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

2.1 การเตรียมสีย้อมแกรม (Gram's stain)

2.1.1 Crystal violet

Solution A: Crystal violet	2	กรัม
95% alcohol	20.0	มิลลิลิตร
Solution B: Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง 1-2 ครั้ง เก็บไว้ในขวดสีชาที่มี dropper

2.1.2 Iodine solution

Iodine	10.0	กรัม
Potassium	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

นำสาร iodine และ potassium ละลายในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เก็บใส่ในขวดสีชาที่มี dropper

2.1.3 Safranin O

Safranin O	2.5	กรัม
95% ethanol	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ละลายสาร Safranin O ด้วย 95% ethanol ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรอง แล้วเก็บใส่ในขวดสีชาที่มี dropper

2.1.4 Decolorizer

ตวง 95% ethanol 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ในขวดสีชาที่มี dropper

2.2 การเตรียมสารเคมีเพื่อวิเคราะห์พลาสมิดโดยวิธี gel electrophoresis

2.2.1 50X Tris-acetate buffer (50X TAE)

Glacial acetic acid	5.4	กรัม
Tris base	24.2	กรัม
EDTA	3.7	กรัม

ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.2 1X Tris-acetic buffer (1X TAE)

นำสารละลาย 50X TAE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาเติมด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

2.2.3 gel electrophoresis

2.2.3.1 6X loading dye

Bromophenol blue	0.025	กรัม
Sucrose	4	กรัม

ชั่งส่วนผสม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในที่มืด

2.2.3.2 1% agarose gel

ชั่ง agarose 1 กรัม ละลายในสารละลาย 1X TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทนกรด

MRS borth	55.5	กรัม
0.1 N HCl		
0.1 N NaOH		

ชั่งอาหาร MRS borth ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4 **สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดี**

MRS borth	55.5	กรัม
Bile salt	3.00	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

1. ตัวอย่างการคำนวณอัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ pH ต่างๆ

แลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 Log CFU/ml เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.44 Log CFU/ml ดังนี้

จากสมการ $$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง (Log CFU/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง (Log CFU/ml)}}$$

$$= \frac{5.44 \text{ Log CFU/ml} \times 100}{5 \text{ Log CFU/ml}}$$

$$= 108.80 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

2. ตัวอย่างการคำนวณอัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีต่างๆ

แลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.48 Log CFU/ml เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.78 Log CFU/ml ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง (Log CFU/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง (Log CFU/ml)}}$$

$$= \frac{5.78 \text{ Log CFU/ml} \times 100}{5.48 \text{ Log CFU/ml}}$$

$$= 105.50 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

ภาคผนวก ค
ผลงานทางวิชาการ

ผลงานทางวิชาการ

Phupaboon, S. and et al. "Food derived lactic acid bacterium with potential as a human vaccine delivery system", In **The 40th Congress on Science and Technology of Thailand**. p. 711-715. Khon Kaen: Khon Kaen university, 2014.

Pudpai, N. and et al. "การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และพันธุศาสตร์ของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ Escherichia coli ที่สามารถสร้างเอนไซม์ EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE (ESBL)", ใน **ประชุมวิชาการวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข ครั้งที่ 4**. น. 10-13. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2558.

FOOD DERIVED LACTIC ACID BACTERIUM WITH POTENTIAL AS A HUMAN VACCINE DELIVERY SYSTEM

Srisan Phupaboon, Naritsara Pudpai, Sukrita Punyauppa-path, Parichat Phumkhachorn, Pongsak Rattanachaikunsopon*

Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

*e-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com

Abstract: The development of a human live oral vaccine requires an acid and bile tolerant bacterial strain carrying an expression vector that is safe for oral administration to be used as a delivery system. The main focus of this study was to find a food derived lactic acid bacterium having such characteristics. Ten isolates of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Pla Som, a traditional Thai fermented fish, were tested for their acid tolerance and bile tolerance. Of all isolated LAB, the isolate SF-09 was found to be the only LAB isolate that could tolerate and grow at pH 2 and in the condition with 0.30% bile. It was identified by the 16S rDNA sequence analysis as *Enterococcus faecium* and named as *E. faecium* SF-09. The 8.1 kb food-grade vector pFLP1 was successfully introduced into E. faecium SF-09 cells by electroporation indicating that pFLP1 could be used as a DNA vector for *E. faecium* SF-09. Since *E. faecium* SF-09 was derived from food, tolerant to acid and bile and able to carry a food-grade DNA vector, it might be a potential bacterium for further development as a delivery system of a human live oral vaccine.

Introduction: A vaccine is a biological preparation that improves immunity to a particular disease. Most of the traditionally produced human vaccines are often made from attenuated or killed forms of pathogenic bacteria. Although they are effective, their several disadvantages have been reported.[1] For live attenuated vaccines, there is a high risk for attenuated pathogens to undergo reversion to cause diseases. For killed vaccines, great care must be taken to ensure that pathogens are inactivated completely otherwise they may cause diseases. To overcome these disadvantages, recombination technology has been used to produce genetically engineered bacteria that carry genes encoding antigens capable of triggering immunity of recipients.

Among genetically engineered vaccines, the live oral vaccine is one of the most promising vaccines because it is easy to use and causes no pain for recipients. In order to obtain a live oral vaccine, a genetically recognized as safe (GRAS) bacterium with a food-grade expression vector is needed as a vaccine delivery system to ensure that the live oral vaccine are safe for oral administration. Furthermore, it has to be tolerant to acidic condition and to bile in order to survive in human gastrointestinal tract. The objectives of this study are the isolation of lactic acid bacteria (LAB) from food, the selection of a LAB strain tolerant to acid and bile and the examination of the ability of the selected LAB to carry the pFLP1, a food-grade DNA vector. The acid and bile tolerant LAB strain capable of carrying the vector pFLP1 obtained from this study is useful for further development as a delivery system of a human live oral vaccine.

Methodology:

Isolation LAB from food

Lactic acid bacteria were isolated from Pla Som, a traditional Thai fermented food as follows. Twenty five grams of the food sample was homogenized with 225 ml of 0.85% (w/v) sterile physiological saline. The liquid part of the homogenate was tenfold serially diluted in the sterile saline. One hundred ml of the dilutions were plated on MRS agar plates and then incubated at 37°C for 24 h. Separated LAB colonies grown on the plates were selected for acid and bile tolerance tests.

Acid tolerance test

The acid tolerance of the isolated LAB was determined by the method described by Jin et al.[2] with some modifications. LAB were grown in MRS broth at 37°C for 24 h, and subcultured in 5 ml of fresh MRS broth adjusted to pH 2 with 5 M HCl. After incubation for 3 h at 37°C, cells were tenfold serially diluted in phosphate buffer in order to neutralize the medium acidity. The residual viable count was determined by plate count method. The survival percentage was calculated as follows: % survival = [cell concentration after treatment for 3 h (log cfu/ml)/initial cell concentration (log cfu/ml)] x 100.

Bile tolerance test

The bile tolerance of the isolated LAB was determined by the method described by Erkkila and Petaja[3] with some modifications. The LAB cells were harvested from the 24 h LAB cultures by centrifugation at 5,000 x g for 5 min. The cells were washed two times and resuspended in fresh MRS broth. A 50 µl aliquot of bacterial suspension was inoculated into 5 ml of MRS broth with 0.30% of bile prepared from ox bile (HiMedia, India). The residual viable count was determined by plate count method after incubation at 37°C for 3 h. The survival percentage was calculated as follows: % survival = [cell concentration after treatment for 3 h (log cfu/ml)/initial cell concentration (log cfu/ml)] x 100.

Identification of LAB

The acid and bile tolerant LAB isolate was identified by using the 16S rDNA sequence analysis according to the protocol described by Weisburd et al.[4] The genomic DNA of the LAB was isolated by using Genomic DNA extraction kit (Real Biotech Corporation, Taiwan). The conditions used for amplifying the LAB 16S rDNA was described previously by Weisburd et al.4 The sequencing of 16S rDNA was conducted by BioDesign Co.Ltd., Pathumthani, Thailand. The sequence of 16S rDNA was compared to those of bacteria in GENBANK database by using BLASTN (Basic Local Aligment Search Tool).

Plasmid isolation

The presence of plasmid in LAB cells was determined by plasmid isolation using the NucleoSpin® Plasmid QuickPure kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) according to the protocol of the manufacturer.

Transformation of LAB

The introduction of pFLP1, a 8.1 kb food-grade vector, into LAB cells were performed according to the method described previously.[5] The LAB cells were transformed by using electroporation with a CelljecT PRO (Hybaid, UK). LAB transformants were isolated on MRS agar plates containing CdCl2 (0.30 mM). Randomly selected

transformants were subjected to bacterial identification and tested for the presence of pFLP1 by plasmid isolation.

Results and Discussion: Ten separated colonies of LAB isolated from Pla Som on MRS agar were tested for their acid and bile tolerance. When all of the isolated LAB were tested for their acid tolerance at pH 2 (the gastric pH or the pH in human stomach), it was found that the isolate SF-09 was the only LAB isolate that was tolerant to such acidic condition. It survival percentage of 108.80% (Table 1) which is higher than 100% indicated that the isolate SF-09 was not only tolerant at pH 2 but also able to grow at that pH. For the bile tolerance test, 7 isolated LAB (SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-18 and SF-22) had survival percentage above 100% (Table 2) which indicated that they could tolerate and grow in condition having 0.30% bile (concentration of bile normally found in human small intestine). Since the isolate SF-09 was the only LAB isolate that had ability to survive and grow at pH 2 and in the medium with 0.30% bile, it was selected for further studies. The isolate SF-09 was identified as *Enterococcus faecium* SF-09 because its 16S rDNA sequence (Figure 1) showed 99% homology to that of *Enterococcus faecium* Aus0004 (accession NR 102790.1). *E. faecium* strains tolerant to acid and bile have been previously reported by several research groups.[6,7,8] Prior to electrotransformation of *E. faecium* SF-09 with the food-grade vector pFLP1, plasmid isolation showed that the bacterium had no plasmid. A transformant obtained from the electrotransformation of *E. faecium* SF-09 with pFLP1 (named as E. faecium-pFLP1) was examined by plasmid isolation and found that it carried a plasmid with a size of 8.1 kb which is the size of pFLP1 (Figure 2). This result suggested that the electrotransformation was successful and pFLP1 can be used as a DNA vector for *E. faecium* SF-09. Since the acid and bile tolerant *E. faecium* SF-09 and the vector pFLP1 are food-grade and safe for oral administration, they can be used for development as a delivery system of a human live oral vaccine which may overcome disadvantages of live attenuated vaccines and killed vaccines as mentioned earlier.

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac
gcttcttttt ccaccggagc ttgctccacc ggaaaaagag gagtggcgaa cgggtgagta
acacgtgggt aacctgccca tcagaagggg ataacacttg gaaacaggtg ctaataccgt
ataacaatcg aaaaccgcat ggttttgatt tgaaaggcgc tttcgggtgt cgctgatgga
tggacccgcg gtgcataagc tagttggtga ggtaacggct caccaaggcc acgatgcata
gccgacctga gagggtgatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctcctacggg
aggcagcagt agggaatctt cggcaatgga cgaaagtctg accgagcaac gccgcgtgag
tgaagaaggt tttcggatcg taaaactctg atgttagaga agaacaagga tgagagtaac
tgttcatccc ttgacggtat ctaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc
ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg
tttcttaagt ctgatgtgaa agccccccggc tcaaccgggg agggtcattg gaaactggga
gacttgagtg cagaagagga gagtggaatt ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagatata
tggaggaaca ccagtggcga aggcggctct ctggtctgta actgacgctg aggctcgaaa
gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgagtgcta
agtgttggag ggtttccgcc cttcagtgct gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg
gagtacgacc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag
catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cctttgacca
ctctagagat agagcttccc ggtcgggggc aaagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca
gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccctta ttgttagttg
ccatcattca gttgggcact ctagcaagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga
tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atgggaagta
caacgagttg cgaagtcgcg aggctaagct aatctcttaa agcttctctc agttcggatt
gcaggctgca actcgcctgc atgaagccgg aatcgctagt aatcgcggat cagcacgccg
cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacgaga gtttgtaaca
cccgaagtcg gtgaggtaac cttttggagc cagccgccta aggtgggata gatgattggg
gtaaagtcgt aa

Figure 1. The 16S rDNA sequence of the LAB isolate SF-09.

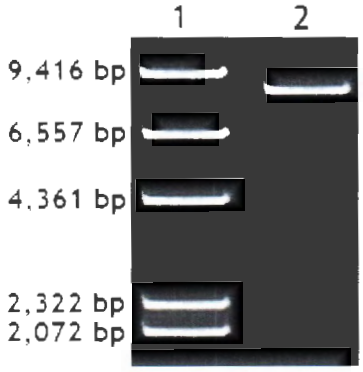


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the vector DNA isolated from *E. faecium*-pFLP1. Lane 1: lambda DNA digested with HindIII; lane 2: the isolated vector DNA.

Table 1. Viability of the isolated LAB after treatment at pH 2 and with 0.30% bile for 3 h.

LAB isolate	Survival percentage (%)	Survival percentage (%)
SF-02	0	105.95
SF-03	0	102.09
SF-09	108.80	105.47
SF-10	0	104.26
SF-12	0	101.24
SF-15	0	73.75
SF-17	0	96.43
SF-18	0	102.11
SF-20	0	97.56
SF-22	0	103.53

Table 2. Viability of the isolated LAB after treatment with 0.30% bile for 3 h.

LAB isolate Survival percentage (%)

LAB isolate	Survival percentage (%)
SF-02	105.95
SF-03	102.09
SF-09	105.47
SF-10	104.26
SF-12	101.24
SF-15	73.75
SF-17	96.43
SF-18	102.11
SF-20	97.56
SF-22	103.53

Conclusion: *E. faecium* SF-09 is a food derived lactic acid bacterium that has potential to be used as a delivery system of a human live oral vaccine because it is considered to be safe, tolerant to acid and bile at the level normally found in human gastrointestinal tract and able to carry pFLP1, a food-grade DNA vector.

References:

1. Dertzbaugh MT. Plasmid. 1998;39:100-113.
2. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Lett Appl Microbiol. 1998;27:183-185.
3. Erkkila S, Petaja E. Meat Sci. 2000;55:297-300.
4. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. J Bacteriol. 1991;173:697–703.
5. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. J Gen Appl Microbiol. 2012;58:317—324.
6. Buntin N, Chanthachum S, Hongpattarakere T. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2008;30(Suppl.1):141-148.
7. Saelim K, Sohsomboon N, Kaewsuwan S, Maneerat S. Czech J. Anim. Sci. 2012;57: 529-539.

8. Kabore D, Sawadogo-Lingani H, Dicko MH, Diawara B, Jakobsen M. Afr J Biotechnol. 2012;11:1197-1206.

การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และพันธุศาสตร์ของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Escherichia coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE (ESBL)

MORPHOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE (ESBL)-PRODUCING *Escherichia coli*

Naritsara Pudpai, Srisan Phupaboon, Sukrita Punyauppa-path, Parichat Phumkhachorn, Pongsak Rattanachaikunsopon*

Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

*E-mail rattanachaikunsopon@yahoo.com

บทคัดย่อ

ESBL-producing *Escherichia coli* คือ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสชนิดกว้าง (extended spectrum beta lactamase, ESBL) ได้ แบคทีเรียประเภทนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งส่งผลทำให้การรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียประเภทนี้ทำได้ยาก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกไลติกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ ESBL-producing *E. coli* และเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และพันธุศาสตร์ของแบคเทอริโอเฟจเหล่านั้น จากการทดลองแยกแบคเทอริโอเฟจพบว่าตัวอย่างน้ำเสีย 3 ตัวอย่างมีไลติกแบคเทอริโอเฟจที่ต้องการ ซึ่งให้ชื่อว่า NP1, NP2 และ NP3 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพบว่าแบคเทอริโอเฟจทั้ง 3 ตัว มีรูปร่างคล้ายกันมาก คือ มีหัวลักษณะหลายเหลี่ยม และมีหางยาวแบบยืดหดไม่ได้ สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งสังเกตได้จากการที่สารพันธุกรรมสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แต่ไม่ถูกตัดด้วย RNase A และ S_1 nuclease จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและพันธุศาสตร์ที่ได้ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ NP1, NP2 และ NP3 ไว้ในสกุล *Siphoviridae* แบคเทอริโอเฟจที่ได้จากการศึกษานี้น่าจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก ESBL-producing *E. coli*

คำสำคัญ : Bacteriophage, Bacteriophage therapy, ESBL-producing *E. coli*

Abstract

ESBL-producing *Escherichia coli* are *E. coli* that can produce extended spectrum beta lactamase (ESBL). Their resistance to a number of antibiotics makes their infections much more difficult to treat. This study aims to isolate lytic bacteriophages specific to ESBL-producing *E. coli* and to characterize them morphologically and genetically. From the bacteriophage isolations, 3 wastewater samples were found to contain the lytic bacteriophages, designated NP1, NP2 and NP3. By using transmission electron microscopy, all of these bacteriophages had very similar morphology, an icosahedral head with a long non-contractile tail. Their genomes were determined to be double stranded DNA which were cleaved by *Eco*RI restriction enzyme, but not Rnase A and S_1 nuclease. Based on their morphological and genetic characteristics, NP1, NP2 and NP3 can be classified as members of the family *Siphoviridae*. The bacteriophages obtained from this study may be useful for treating ESBL-producing *E. coli* infections.

Keywords : Bacteriophage, Bacteriophage therapy, ESBL-producing *E. coli*

บทนำ

Escherichia coli strains that produce an enzyme called extended-spectrum beta lactamase (ESBL) are named as ESBL-producing *E. coli*. The enzyme contributes to multiple drug resistance characteristics of the bacteria. They are resistant to a wide range of antibiotics, especially members of cephalosporins such as cefuroxime, cefotaxime and ceftazidime. ESBL-producing *E. coli* cause a number of health problems including urinary tract infections and bacteremia. The infections most commonly occur in the elderly, people who have recently been in hospital, and people who receive or have received antibiotic treatment. Since most antibiotics are ineffective in treating ESBL-producing *E. coli* infections, alternative therapeutic approaches against the bacteria are required. One of the potential candidates is bacteriophage therapy, an approach using one or more bacteriophages (bacterial viruses) to treat bacterial infections. Several reports have shown the ability of

bacteriophages to kill drug resistant bacteria [1-3]. Therefore, it is of interest to find a bacteriophage for using as therapeutic agent to control ESBL-producing *E. coli*.

This study aims to isolate bacteriophages specific to ESBL-producing *E. coli* from wastewater and to examine their morphological and genetic characteristics which are useful information for bacteriophage classification. With further characterizations and clinical trials, the bacteriophages from this study may be useful as potential therapeutic agents for controlling ESBL-producing *E. coli* infections

วัตถุประสงค์

1. To isolate bacteriophages specific to ESBL-producing *E. coli* from wastewater
2. To examine morphological and genetic characteristics of the isolated bacteriophages

วิธีดำเนินงาน

1. Bacteriophage isolation

Wastewater samples for bacteriophage isolation were collected from various sources such as hospitals, animal farms, industries and houses in Ubon Ratchathani, Thailand. Each sample was subjected to bacteriophage enrichment by mixing the sample with an equal volume of double strength nutrient broth containing ESBL-producing *E. coli*, kindly donated from Sanpasitthiiprasong Hospital, Ubon Ratchathani, Thailand. After incubation at 37°C overnight, the culture was centrifuged and the supernatant was filtered through a membrane with a pore size of 0.45 μm. The presence of a lytic bacteriophage in the filtrate was examined by using the spot test method. Overnight culture of host bacterial strain was smeared thoroughly on a nutrient agar plate by a sterile swab. Five μl of the filtrate was spotted on the bacterial lawn. The plate was incubated at 37°C overnight. A clear zone in the plate indicated the presence of bacteriophage. In all cases, positive tests were confirmed by plaque assay which were performed as described by Lu *et al*. [4].

2. Study on bacteriophage morphology

Bacteriophage morphology was studied by transmission electron microscopy which was performed at the Scientific Equipment Service Unit, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand.

3. Study on bacteriophage genome

Bacteriophage genome was extracted by using PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, USA). It was subjected to enzymatic digestion with RNase A (an enzyme digesting RNA), S_1 nuclease (an enzyme digesting single stranded DNA), and a restriction enzyme *Eco*RI (and enzyme digesting double stranded DNA) and then analyzed by agarose (0.8% w/v) gel electrophoresis at constant voltage of 100V.

ผลการวิจัย

Filtrates prepared from 3 wastewater samples were found to produce clear zones on lawns of ESBL-producing *E. coli* by spot test. By using plaque assay, clear plaques were obtained from all filtrates indicating that bacteriophages in the filtrates responsible of antibacterial activity were lytic bacteriophages. The bacteriophages were designated NP1 to NP3. A clear zone and plaques produced by NP1 is shown in Figure 1. Transmission electron microscopy of all three bacteriophages revealed that they had very similar morphology. Each of them had an icosahedral head with a long non-contractile tail (Figure 2). Enzymatic digestion of NP1, NP2 and NP3 genomes demonstrated that all of the genomes were digested by *Eco*RI, but not by RNase A and S_1 nuclease indicating that it was double stranded DNA. The *Eco*RI digestion patterns of the genomes of NP1, NP2 and NP3 are shown in Figure 3.

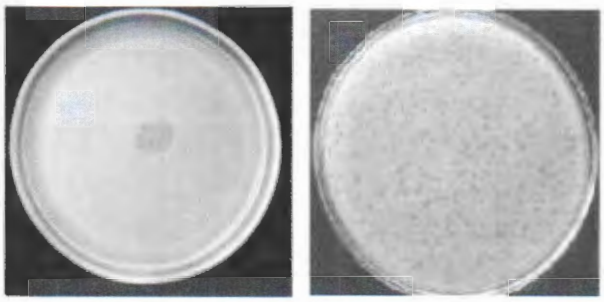


Figure 1 A clear zone on ESBL-producing *E. coli* lawn (a) and clear plaques on ESBL-produc *E. coli* lawn (b) produced by the bacteriophage NP1.

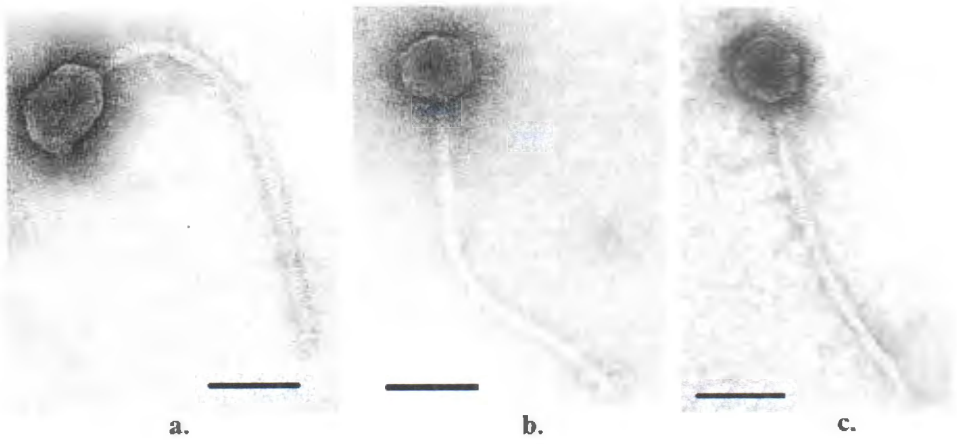


Figure 2 Morphology of NP1 (a), NP2 (b) and NP3 (c) as studied by transmission electron microscopy (Bar = 50 nm).

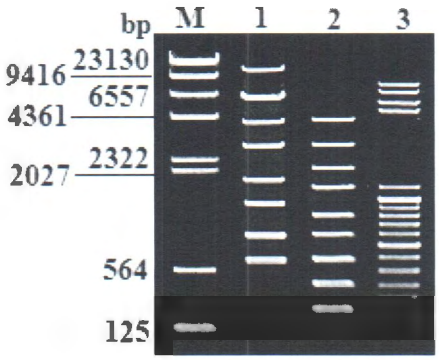


Figure 3 *Eco*RI digestion patterns of bacteriophage genomes analyzed by agarose gel electrophoresis. M = lambda DNA digested with *Hin*dIII (Thermo Fisher Scientific, USA); 1-3 = *Eco*RI digested DNA of bacteriophages NP1-NP3, respectively.

สรุปและอภิปรายผล

In this study, we intended to find bacteriophages for using as therapeutic agents to control infections caused by ESBL-producing *E. coli*. Therefore, only lytic bacteriophages were required because of their ability to kill and damage the host cells. Based on their morphological and genomic characteristics, the bacteriophages can be classified as members of the family *Siphoviridae* according to the International

Committee on Taxonomy of Viruses[5]. Although NP1, NP2 and NP3 are in the same family and have very similar morphology, they are clearly not the same bacteriophage because their genome have different *Eco*RI digestion patterns (Figure 3). The bacteriophages obtained from this study are in the process of testing for the ability to control ESBL-producing *E. coli* both *in vitro* and in animal models. In conclusion, this study provides a preliminary data showing that NP1, NP2 and NP3 are potential candidates for use to treat ESBL-producing *E. coli* infections. However, more experiments are required for further characterization of the bacteriophages before being used as therapeutic agents.

กิตติกรรมประกาศ

We are grateful to the faculty of Science, Ubon Ratchathani University for the financial support throughout the study.

เอกสารอ้างอิง

1. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, and Iannelli D. Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 2007;51:2765-73.
2. Thamniamton W, Boonsarn V, Phumkhachorn P, and Rattanachaikunsopon P. Isolation and characterization of a bacteriophage specific to drug resistant Klebsiella pneumoniae DR1. Int. J. Curr. Res. Rev. 2010;2:30-43.
3. Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, Rajeeva BC, Krohne G, Karunasagar I, and Karunasagar I. Isolation of Vibrio harveyi bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. Aquaculture 2006;255:117-24.
4. Lu Z, Breidt F, Fleming HP, Altermann E, and Klaenhammer TR. Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, FJL-1, from a cucumber fermentation. Int. J. Food Microbiol. 2003;84:225-35.
5. Nelson D. Phage taxonomy: we agree to disagree. J. Bacteriol. 2004;186:7029-31.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นายศรีสรรค์ ปูพบุญ

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2552-2555 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
พ.ศ.2549-2551 โรงเรียนราษีไศล
มัธยมศึกษาตอนปลาย จังหวัดศรีสะเกษ

ประวัติการวิจัย Phupaboon, S. and et al. "Food derived lactic acid bacterium with potential as a human vaccine delivery system", **In The 40th Congress on Science and Technology of Thailand**. p.711-715. Khon Kaen: Khon Kaen university, 2014.

Phupaboon, S. and Laopaiboon, R. "Probiotic potential of microorganisms isolated from fermented pork and fermented vegetable", In **The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology**. p.461-464. Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani university, 2012.