รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโพรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีที่สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในหลอดทดลอง

Screening of Bile-Salt-Hydrolyze Enzyme Producing Lactic Acid Bacteria Probiotic and *in-vitro* Determination of Their Cholesterol-Lowering Property

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล

นุชจรี จีนด้วง

จุฑาวดี กันนัย

ภาณุพงศ์ วงศ์เมือง

สรารัตน์ ธราพร

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ประจำปีงบประมาณ 2558 สัญญารับทุนเลขที่ WU58113

งานวิจัย การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโพรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีที่สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในหลอดทดลอง

ผู้วิจัย นายมณฑล เลิศคณาวนิชกุล
นางสาวนุชจรี จีนด้วง
นางสาวจุฑาวดี กันนัย
นายภาณุพงศ์ วงศ์เมือง
นางสาวสรารัตน์ ธราพร

บทคัดย่อ

การมีระดับโคเลสเตอรอลที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตและความพิการในหลายประเทศ ปัจจุบันได้มีรายงานการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกโพรไบโอติกมาช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งสามารถพบเชื้อกลุ่มดังกล่าวอยู่ในรูปของอาหาร เช่น นมเปรี้ยว เนย โยเกิร์ต ไอศกรีม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโพรไบโอติก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่กำลังได้รับความนิยมและมีหลากหลายรูปแบบทั้งที่อยู่ในรูปของแคปซูลและรูปแบบอื่นๆ แทนการใช้ยาสังเคราะห์ทางเคมีที่อาจเกิดผลข้างเคียงขึ้นได้ ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยจึงสนใจศึกษาการลดลงของโคเลสเตอรอลในหลอดทดลอง ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ได้แก่ เอนเทอโรค็อกคัส ฟีเซี่ยม เอ็น 15 และแลคโตบาซิลลัส แพลนทาลัม แอล 26 รวมไปถึงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ได้แก่ แลคโตบาซิลลัส เพนโทซัส I และ II ซึ่งในเบื้องต้นพบว่ากลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mann Rogosa Sharpe (MRS) ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และท่อน ให้ผลลบกับการทดสอบคะตะเลส แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 5 สายพันธุ์ สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ได้ทุกสายพันธุ์ สามารถทนเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้น 0.30 % และแสดงสมบัติการลดระดับโคเลสเตอรอลตั้งแต่ 24.04% ถึง 62.67% ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี อย่างไรก็ตาม เอ็น15 สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ดีที่สุด (62.67%) และที่น่าสนใจคือสามารถตรวจพบยีนผลิตเอนเทอโรซินในแบคทีเรียดังกล่าวได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้นจึงอาจจะนำไปใช้ร่วมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดเพื่อป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งและ/หรือช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรค เพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้นและมีประสิทธิภาพ

Research Title Screening of Bile-Salt-Hydrolyze Enzyme Producing Lactic Acid Bacteria Probiotic and *in-vitro*Determination of Their Cholesterol-Lowering Property

Authors Monthon Lertcanawanichakul
Nutjaree Jeanduang
Juthawadee Kannai
Panupong Wongmuang
Sararat Tharaporn

Abstract

Hypercholesterolemia is a major risk factor for artherosclerosis and cardiovascular disease, cause of mortality and defectiveness in several country. The recent studies have demonstrated that lactic acid bacteriamay remove and reduce cholesterol level. Dairy products such as milk, yoghurt, ice cream and cheeses are common carriers for lactic acid bacteria (LAB), and fermented dairy products, including food supplement have been reported to exhibit hypercholesterolemia properties, know as probiotics. For the reason, this study aims to study on cholesterol-lowering properties of LAB from *Enterococcus faecium*N15 and *Lactobacillus plantarum* L26 including isolated from natural source, food and food supplements *(Lact. pentosus* I and *Lact. pentosus* II). All tested LAB have been growth in Mann Rogosa Sharpe (MRS), Gram-positive bacilli and cocci, negative result for catalase test. Also, they could be grown in MRS plus 0.30 % oxgall and showed capability to reduce cholesterol level significantly difference ($p<0.05$) from 24.04% to 62.67%, but not depended on bile salt hydrolase activity. Interestingly *Ent. faecium*(N15) showed the most reduce cholesterol level (62.67%) and may produce bacteriocin (*enterocin* gene) when detected indirectly by PCR method. It implied that N15 may benefits for hypercholesterolemia and supplemented with probiotic product in order to promotion of health in nearly future.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอุตสาหะของผู้ร่วมงานวิจัย โดยได้รับความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุชจรี จีนด้วง เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ และนางสาวธัญญลักษณ์ พลายด้วง ที่ได้ช่วยวิเคราะห์และสอนเทคนิคทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการศึกษาลดลงของโคเลสเตอรอล

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้จัดสรรเงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2558 เพื่อสนับสนุนการทำวิจัย จนกระทั่งการดำเนินงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณผู้ประพันธ์ทุกท่านที่ได้ใช้แหล่งทรัพยากรข้อมูลของท่านมาใช้ในการเรียบเรียงเขียนรูปเล่มงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง และหวังว่าความรู้ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะมีประโยชน์บ้างไม่มากก็น้อยสำหรับผู้ที่มีความสนใจ และขอมอบความรู้ที่ได้ให้แก่ประเทศชาติ

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล

กุมภาพันธ์ 2558

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ii
กิตติกรรมประกาศ..... iii
สารบัญ..... iv
สารบัญตาราง..... vi
สารบัญภาพ..... vii
สารบัญสัญลักษณ์และคำย่อ..... viii
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย..... 3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม..... 4
2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก..... 4
2.2 รายละเอียดเกี่ยวกับโพรไบโอติก..... 7
2.3 รายละเอียดเกี่ยวกับโคเลสเตอรอล..... 9
2.4 รายละเอียดเกี่ยวกับเกลือน้ำดี..... 12
2.5 รายละเอียดเกี่ยวกับแบคเทอริโอซิน..... 14
2.6 รายละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 20
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย..... 21
3.1 วัสดุอุปกรณ์..... 21
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 25
บทที่ 4 ผลการวิจัย 31
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย..... 44
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 48
เอกสารอ้างอิง 49

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก..... 53
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 54
ภาคผนวก ข การย้อมแกรมและการทดสอบคะตะเลส..... 56
ภาคผนวก ค การเตรียมกราฟมาตรฐานโคเลสเตอรอล..... 59
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ข้อมูล..... 60
ภาคผนวก จ การเผยแพร่ผลงานวิจัย..... 63

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ชนิดและส่วนประกอบของ lipoproteins..... 12
ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้ในการศึกษา..... 21
ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนแบคเทอริโอซิน..... 22
ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR..... 26
ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ทำ PCR จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย..... 27
ตารางที่ 3.5 ส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการลดลงของระดับโคเลสเตอรอล..... 29
ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัย-วลัยลักษณ์..... 32
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกจากBCC..... 34
ตารางที่ 4.3 ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกจากกลุ่มตัวอย่าง..... 36
ตารางที่ 4.4 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลตโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL..... 38
ตารางที่ 4.5 ระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมต่างๆที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ (น้ำเลี้ยงเชื้อ) ในสภาวะที่มี 0.30% oxgall และไม่มี 0.30% oxgall 42
ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS..... 42

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของโคเลสเตอรอล..... 10
ภาพที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลใน HMG-CoA reductase pathway..... 11
ภาพที่ 2.3 แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด..... 15
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของไนซิน..... 15
ภาพที่ 3.1 แถบดีเอ็นเอของ100-bp ladder..... 28
ภาพที่ 3.2 รูปแบบแถบยีนแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์จาก BCC ภายหลังจากการทำ PCR..... 28
ภาพที่ 4.1 รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียกรดแลคติก *Ped.pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1),*Ped.acidilactici* L25 (L25), *Lact. plantarum* (L26), *Ent. faecium* N15 (N15), *L. lactis* C3 (C3)..... 33
ภาพที่ 4.2 รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. lactic*BCC19567, *Ped. pentosaceus* BCC38100, *Lact. plantarum* BCC47648 และ *Ent. faecium*BCC38124 35
ภาพที่ 4.3 รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากตัวอย่าง ขนมจีน, มูลวัว, ลำไส้ไก่ 1, ลำไส้ไก่ 2, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร1, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 2, นมเปรี้ยว, และแหนม..... 37
ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบหายีนแบคเทอริโอซิน (Enterocin)..... 40
ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลหลังจากการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRSไม่มีเกลือน้ำดี oxgallหรือที่มีเกลือน้ำดี oxgall 0.30 % 43

สารบัญสัญลักษณ์และคำย่อ

ดล.	=	เดซิลิตร
มค.ก.	=	ไมโครกรัม
มค.ล.	=	ไมโครลิตร
มค.ม.	=	ไมโครเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
ATP	=	Adenosine triphosphate
BCC	=	BIOTEC Culture-collection
bp	=	Base pair
BSH	=	Bile salt hydrolase
C3	=	*Lactococcus lactis* C3
$CaCl_2$	=	Calcium chloride
Cho	=	Cholesterol
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	=	Dithiothreitol
HACCP	=	Hazard Analysis Critical Control Point
HDL	=	High-density lipoprotein
HHP	=	High Hydrostatic Pressure
H_2SO_4	=	Sulfuric acid
IDL	=	Intermediate-density lipoprotein
KOH	=	Potassium hydroxide
L14/1	=	*Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1
L25	=	*Ped. acidilactici* L25
L26	=	*Lactobacillus plantarum* L26
LAB	=	Lactic acid bacteria
LCAT	=	lecithin-cholesterol-acyl-transferase
LDL	=	Low-density lipoprotein

สารบัญสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
MRS	=	Mann Rogosa Sharpe
N15	=	*Enterococcus faecium* N 15
NaCl	=	Sodium chloride
NTCP	=	Na-taurocholate cotransporter
OD	=	Optical density
PCR	=	Polymerase chain reaction
pH	=	Positive potential of the hydrogen ions
pKa	=	Acid dissociation constant
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid
TBE	=	Tris borate ethylenediaminetetraacetic acid
TDCA	=	Taurodeoxycholic acid
TG	=	Triglyceride
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific and Technological Research
VLDL	=	Very low-density lipoprotein
w/v	=	Weight by volume
w/w	=	Weight by weight
µM	=	Micromolarity

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การมีระดับโคเลสเตอรอลที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตและความพิการในหลายประเทศ การเพิ่มสูงขึ้นของระดับโคเลสเตอรอลเป็นปัจจัยเสี่ยงสำหรับการพัฒนาไปเป็นโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerotic vascular disease) (1-2) การเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งเกิดจากการมีชั้นไขมันไปเกาะพอกพูนอยู่บริเวณผิวเอนโดธีเลียม (endothelium) ทำให้เกิดความเสื่อมสภาพของหลอดเลือดแดง ซึ่งโรคนี้จะพบได้เมื่อมีอายุมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีหลายปัจจัยที่อาจทำให้เกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งเร็วขึ้น เช่น การสูบบุหรี่จัด การขาดการออกกำลังกาย โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกาต์ การกินยาเม็ดคุมกำเนิด และโดยเฉพาะการมีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูง (3-4) ปัจจุบันมีการใช้ยาสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดแต่อาจจะทำให้เกิดผลข้างเคียงขึ้นได้ (1) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจใช้วิถีทางชีววิธีมาช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดโดยมีรายงานการใช้แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกหลายชนิด เช่น *Lactobacillus acidophilus, Pediococcus pentosaceus, Bifidobacterium bifidum* และ *Enterococcus faecium* (1-2, 5) โพรไบโอติกมักจะกล่าวโดยรวมถึงกลุ่มจุลินทรีย์มีชีวิตเมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่พอเหมาะจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (5-6) ซึ่งพบเชื้อกลุ่มดังกล่าวอยู่ในรูปของอาหาร เช่น นมเปรี้ยว เนย โยเกิร์ต ไอศกรีม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโพรไบโอติก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่กำลังได้รับความนิยมและมีหลากหลายรูปแบบทั้งที่อยู่ในรูปของแคปซูลและรูปแบบอื่นๆ ช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ช่วยให้การย่อยดีขึ้นเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุและวิตามินป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ ลดการตอบสนองต่อการอักเสบรวมถึงช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ (5, 7) จากการที่ได้ถูกรายงานไว้ว่ามีอยู่ด้วยกันหลายกลไก ได้แก่ กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลผ่านทางผิวเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกโดยการดูดซับ (absorb) ผ่านทางผนังเซลล์ peptidoglycan ของแบคทีเรียส่งผลให้โคเลสเตอรอลถูกลำไส้ดูดซึมได้ลดลงและจะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยแบคทีเรียจะนำโคเลสเตอรอลไปใช้ในกระบวนการเมเทบอลิซึม กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมีชีวิต กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยอาศัยไมเซลล์โคเลสเตอรอล กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยการแตกตัวของเกลือน้ำดี (deconjugation of bile salt) และกลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase: BSH) (5) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะสนใจความสามารถของเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดระดับโคเลสเตอรอล

เอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี พบได้ในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสกุล เช่น *Lactobacillus, Bifidobacterium* และ *Lactococcus* เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่เข้าไปสลายการสังเคราะห์เกลือน้ำดี โดยจะตัดพันธะตรงตำแหน่งของกรดอะมิโน glycine และ/หรือ taurine ที่รวมตัวกับกรดน้ำดี ส่งผลให้เกลือน้ำดีไม่สามารถทำหน้าที่แตกตัวไขมันเพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมอาหารประเภท

ไขมันได้ ทำให้มีการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่ลำไส้ลดลงและขับโคเลสเตอรอลออกมาในรูปของกรดน้ำดี พร้อมกับอุจจาระ เป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลง (5, 8) จากการศึกษาในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่าผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกนอกจากจะช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดโดยการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีแล้วยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพด้านการย่อยอาหาร การดูดซึมสารอาหาร การขับถ่าย ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันรวมทั้งบรรเทาอาการของโรคภูมิแพ้ต่อต้านเชื้อโรค และป้องกันมะเร็งลำไส้ดังที่ได้เคยมีรายงานมาบ้างแล้วในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกโพรไบโอติก (8) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารกลุ่มโปรตีนออกฤทธิ์ต้านเชื้อโรคที่เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ได้แก่ acidolin, acidophilin, bulgarican, lactocilin และ nisin เป็นต้น แต่สารดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันเท่านั้น (9) จากสมบัติดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีสมบัติเบื้องต้นของโพรไบโอติก คือสามารถแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยสารที่แบคทีเรียผลิตออกมา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกยังคงสามารถแสดงสมบัติอื่นๆ ของโพรไบโอติกได้ เช่น สามารถทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ดี สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ดี สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ดี มีฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีและส่งเสริมสุขภาพของเจ้าของบ้านได้ดีขึ้น (6, 10) จะเห็นได้ว่ามีการรายงานกลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลหลากหลายกลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยจึงสนใจศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในแง่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีและ/หรือผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อศึกษาการทำให้มีระดับของโคเลสเตอรอลลดลงในหลอดทดลอง โดยใช้กลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์จำนวน 5 ชนิด (ไอโซเลต) ได้แก่ *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *Ped. acidilactici* L25 (L25), *Lact. plantarum L26* (L26), *Ent. faecium* N15 (N15) และ *L. lactis*C3 (C3) เชื้อจากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ BIOTEC Culture Collection (BCC) ได้แก่ *Ent. faecium* BCC38124, *Lact. plantarum* BCC47648, *L. Lactic* BCC19567 และ *Ped. pentosaceus* BCC38100 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากตัวอย่างอาหารจากธรรมชาติและจากผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ได้แก่ ขนมจีน ลำไส้ไก่ มูลวัว แหนม นมเปรี้ยว (ดัชมิลค์ดีไลท์) และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโพรไบโอติก (Probiotic defense) มาใช้ในการศึกษาดังกล่าว เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่มีประโยชน์ในการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้เพื่อส่งเสริมสุขภาพและ/หรือเกิดเป็นแนวทางนำไปใช้ร่วมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดเพื่อป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งและ/หรือช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรค เพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 พิสูจน์ยืนยันแบคทีเรียกรดแลคติกจากเชื้อที่เก็บไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

1.2.2 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร รวมทั้งพิสูจน์ยืนยันเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

1.2.3 ศึกษาวิธีการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีและหายีนแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2

1.2.4 ศึกษาการลดระดับโคเลสเตอรอลในหลอดทดลอง โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาสามารถลดระดับของโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mann Rogosa Sharpe (MRS) ในหลอดทดลอง

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จากแหล่งธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

1.4.2 ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ผสม 0.5% taurodeoxycholic acid (TDCA) และ 0.37 g/L $CaCl_2$

1.4.3 ตรวจสอบหายีนแบคเทอริโอซินโดยดูการปรากฏของยีน เมื่อทดสอบด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ primer สำหรับแบคเทอริโอซิน Pediocin, Enterocin และ Nisin (ตารางที่ 3.2 ในบทที่ 3)

1.4.4 ทดสอบหาการลดระดับของโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ในหลอดทดลอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ทราบวิธีการและ/หรือสามารถพิสูจน์ยืนยันแบคทีเรียกรดแลคติกจากเชื้อที่เก็บไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

1.5.2 ทราบวิธีการและ/หรือสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร รวมทั้งพิสูจน์ยืนยันเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

1.5.3 ทราบวิธีการและ/หรือสามารถตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีจากแบคทีเรียกรดแลคติก ในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2

1.5.4 ทราบวิธีการและ/หรือสามารถตรวจสอบหายีนแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR

1.5.5 ทราบวิธีการและ/หรือสามารถศึกษาการลดระดับโคเลสเตอรอลในหลอดทดลองโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ในข้อ1.5.1 และ 1.5.2

1.5.6 ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2 เพื่อนำไปพัฒนาเป็นต้นแบบของสารชีวภาพในการลดระดับโคเลสเตอรอล

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก (11)

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลและให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมัก เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะทั่วไป คือ ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างทั้งแบบแท่ง ทรงกลม และกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระบบไซโตโครม ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ยกเว้นในจีนัส *Bacillus* และ *Sporolactobacillus* ไม่สร้างเอนไซม์ catalase บางชนิดสร้าง pseudocatalase ซึ่งขาดกลุ่ม porphyrin ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ บางชนิดสามารถเจริญได้ในบริเวณที่ไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันและสามารถทนกรดได้ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นพวกที่มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนและค่อนข้างสมบูรณ์ เชื้อที่เจริญได้ในอาหารที่มี growth factor และ vitamin หลายชนิด เช่น biotin และ riboflavin เป็นต้น ส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ก่อให้เกิดโรค เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น พบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในท่อทางเดินอาหาร ช่องฟันและช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนั้นยังพบทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะในอาหาร เช่น อาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์นม เนื้อหมัก เครื่องในสัตว์และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยนำไปใช้ในการถนอมอาหารและใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารหลายประเภท เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ โดยสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซินและกรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารจำเพาะที่มีผลต่อลักษณะกลิ่นและรสชาติของอาหาร

2.1.2 แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล (12) ได้แก่

1) *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 มิลลิเมตร (มม.) จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญมีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้เจริญที่อุณหภูมิ 20-41 °ซปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์มีmol % G+C ระหว่าง 34-46 %

2) *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์คือ *Vagococcus fluvialis* และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

3) *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 มม. จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์สามารถเจริญได้ที่ 10 °ซแต่ไม่เจริญที่ 45 °ซ พบในแหล่ง

ต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้ามันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่*L. lactis* ssp. *hordniae, L. lactis* ssp. *lactic, L. lactis* ssp. *cremoris, L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. lactis* ssp. *hordniae, L. raffinolactis* และ *L. piscium* มี mol % G+Cระหว่าง 34-43 %

4) *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นๆผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญสามารถเจริญที่ 10 °ซ หรือบางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรคปัจจุบันประกอบด้วย5 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่ *Ent. faecalis, Ent. avium, Ent. gallinarum* และ *Ent. cecorum* มี mol % G+C ระหว่าง 37-40 %

5) *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36–1.43 มม. แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Ped. acidilactici, Ped. damonosus, Ped. dextrinicus, Ped.inopinatus, Ped. parvulus* และ *Ped. pentosaceus* มี mol % G+Cระหว่าง 34-44 %

6) *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือ สปีชีส์ *Ped. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18% และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

7) *Aerococcus*มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae*โดย *A. viridians* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน

8) *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร ซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล สารหอมระเหยและคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักกลูโคส (heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoclactis*, *Leuc.mesenteroides,Leuc.gelidum, Leuc. carnosum, Leuc. pseudomesenteroides, Leuc. citreum, Leuc. argentinum* และ *Leuc.fallax* มี mol % G+C ระหว่าง 37-40 %

9) *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูงรวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ: ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นและลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน

10) *Weissella* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะ *Leuconostoc* (leuconostoc-like bacteria) รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ*Lactobacillus confuses (W. confuses), Leuc. paramesenteroides (W. paramesenteroides), L. kandleri (W. kandleri), L. halotolerans (W.halotoleran),*

*L. minor(W.minor), L. viridescens(W. viridescen)*และสปีชีส์ใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica*

11) *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุดมีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของ mol% G+C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32-53 % พบในแหล่งต่าง ๆเช่น เยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืชและน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโทส (มากกว่า 85 %) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนทไม่ได้ ประกอบด้วย18 สปีชีส์

กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และphosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้

กลุ่ม Obilgately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพน-โทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็นแลคเตทเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

12) *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว (Slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 มม. และยาว1.1-3.0 มม. จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตทและเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์คือ *Carnobacterium divergens, C. piscicola, C. mobile, C. funditum*และ *C. alterfunditum*มี mol % G+C ระหว่าง 31.6-37.2 %

2.1.3 การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (13, 14)

1) ด้านอาหารและเครื่องดื่ม

มีการนำกรดแลคติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดส่วนใหญ่จะใช้กรดแลคติกเป็นส่วนประกอบในอาหารโดยตรง (food ingredient) ใช้ปรับสภาพความเป็นกรดเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยวตามต้องการและมีการใช้กรดแลคติกร่วมกับกรดซิตริกและพรอพาโนอิกเพื่อทำให้เกิดรสเปรี้ยวในอาหาร แต่อาจมีความจำเป็นต้องใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียวสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการกลิ่นและรสชาติที่จำเพาะ กรดแลคติกที่อยู่ในรูปของ stearoyl-2 lactylate (SSL) โดยที่ CSL ใช้เป็นตัวปรับสภาวะแป้งหมัก (dough conditioner) ซึ่งรวมตัวกับกลูเตนในแป้งหมักทำให้สามารถทนต่อสภาวะการกวนและสภาวะต่าง ๆ ในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมอบได้ดีขึ้น ปกติใช้ CSL เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ส่วน SSL มีคุณสมบัติเป็น emulsifier ได้ดีและสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ขนมอบได้กรดแลคติกยังใช้เป็นส่วนประกอบในเนยแข็งชนิดต่างๆ ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น salami ก็มีกรดแลคติกเป็นองค์ประกอบนอกจากนั้นมีการนำกรดแลคติกไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแทนกรดซิตริกฟอสฟอริก

และกรดอื่นๆ สำหรับอุตสาหกรรมเบียร์และการผลิตขนมหวานก็มีการใช้กรดแลคติกในการปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้ในการผลิต

2) ด้านอื่นๆ คือการนำกรดแลคติกไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพอลิแลคเทตซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่อใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

2.1.4 ประเภทของการหมักด้วย lactic acid bacteria (15)

1) Homofermentation เป็นการหมักด้วยแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 85-95% เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ส่วนน้ำตาลที่เหลืออาจใช้เพื่อให้พลังงานและสารระเหยอื่นๆ ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus*, *Pediococcus*

2) Heterofermentation เป็นการหมักที่ใช้น้ำตาลประมาณ 50% ให้เป็นกรดแลคติก น้ำตาลที่เหลืออีกประมาณ 20-25 % ให้เป็นกรดอะซิติก และเอทิลแอลกอฮอล์ที่เหลืออีก 20-25% ใช้ในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตัวอย่าง เช่น *Leuconoctoc*

2.1.5 ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมทีมีคุณสมบัติช่วยลดโคเลสเตอรอล (16)

การลดโคเลสเตอรอลในธรรมชาตินอกจากมีการรับประทานอาหารและการออกกำลังกาย ยังมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีแบคทีเรียบรรจุในรูปแบบต่างๆ เช่น แคปซูล เป็นผง ช่วยลดการโคเลสเตอรอล ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุม มีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารธรรมชาติหลายอย่างที่ช่วยให้ลด LDL และเพิ่ม HDL ได้ แบคทีเรียซึ่งพบในอาหารจำพวกโพรไบโอติก เช่น โยเกิร์ต และอาหารเสริมบางชนิด ได้สลายน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรต ทำให้ร่างกายไม่สะสมพวกแป้งและน้ำตาลไว้ในรูปไขมัน

2.2 รายละเอียดเกี่ยวกับโพรไบโอติก

คำว่า โพรไบโอติก (Probiotic) ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี พ.ศ. 2508 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดในปี พ.ศ. 2517 Parker ได้ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติกคือสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้คำจำกัดความล่าสุด ซึ่งเสนอโดย Fuller ในปี พ.ศ. 2532 อธิบายคำว่า โพรไบโอติกคืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย คำว่าจุลินทรีย์ (Microorganism) หมายถึงสิ่งมีชีวิตซึ่งส่วนใหญ่มีขนาดเล็กมากจนมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ที่อาจมีโทษหรือมีประโยชน์ต่อเราก็ได้ แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิดใหญ่ๆ คือไวรัสราหรือยีสต์ แบคทีเรีย และ พาราไซต์ไวรัส เป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กที่สุดได้แก่ เชื้อเอชไอวีงูสวัดและเริม เป็นต้น ราหรือยีสต์ได้แก่โรคผิวหนังที่ขึ้นตามที่อับชื้น มักทำให้มีอาการคัน พาราไซต์ ได้แก่ เชื้อมาเลเรีย

แบคทีเรียน่าจะเป็นคำที่รู้จักแพร่หลายมากที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ที่กล่าวมาแล้ว และคนก็มักนึกถึงแต่เชื้อโรคอย่างเดียว ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้แก่ เชื้อวัณโรค เชื้อที่ทำให้เจ็บคอ หรือเชื้อที่ทำให้เราท้องเสียจากอาหารเป็นพิษ เป็นต้น แต่ยังมีแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ต่อร่างกายเรา

ได้แก่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ ซึ่งอาจเรียกว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย แบคทีเรียที่ดีเหล่านี้ คือ โพรไบโอติกนั่นเอง ได้แก่ *Lact. acidophilus*, *Ent. faecalis*, *S. thermophiles* และ *B. bifidum*

แบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ต่อเรานี้ อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของเรา ตั้งแต่เราเกิดเป็นทารก ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ให้กับเรา ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิดซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายเป็นที่ทราบกันดีว่า โดยปกติแล้วแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมนมเปรี้ยวส่วนใหญ่ คือแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli และ Streptococci แต่จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพของแบคทีเรียในลำไส้จากอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่าความจริงแล้ว Bifidobacteria สามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในอุตสาหกรรมประเภทนี้ ประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นหนึ่งในผู้นำในทางการศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ ได้เป็นผู้บุกเบิกในการผลิตโยเกิร์ตและนมเปรี้ยวที่ได้จากหมักของ Bifidobacteria ซึ่งแม้ว่ารสชาติจะไม่ดีเท่าผลิตภัณฑ์ที่หมักจาก Lactobacilli แต่ด้วยประโยชน์ที่มากกว่า จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับผู้รักสุขภาพ และในเมืองไทยก็มีโยเกิร์ตที่หมักโดย Bifidobacteria วางจำหน่ายแล้ว

นอกจากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว โพรไบโอติกก็ยังถูกใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหาร ในการทดลองทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย อาทิ การใช้ *Lact. rhamnosus* GG ในการบรรเทาและป้องกันอาการท้องร่วงในเด็กทารก การใช้ Bifidobacteria และ Lactobacilli ร่วมกันในการรักษาอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง และช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยด้วยโรคทางเดินอาหารและการเสียชีวิตในทารกที่คลอดก่อนกำหนด นอกจากนี้ยังมีหลักฐานจากงานวิจัยทางการแพทย์อีกหลายชิ้นที่ยืนยันว่า Bifidobacteria สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.1 ตัวอย่างโพรไบโอติกที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน (พ.ศ. 2547) (17)

1) Lactobacilli
   1.1) *Lact.acidophilus*
   1.2) *Lact.casei*
   1.3) *Lact.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
   1.4) *Lact.reuteri*
   1.5) *Lact.brevis*
   1.6) *Lact.rhamnosus*
2) Gram-positive cocci
   2.1) *L. lactis* ssp. *cremoris*
   2.2) *S. salivarius* ssp. *thermophiles*
   2.3) *Ent. faecium*
3) Bifidobacteria
   3.1) *B. bifidum*
   3.2) *B. adolescentis*
   3.3) *B. animalis*
   3.4) *B. infantis*

3.5) *B. longum*

3.6) *B. thermophilum*

2.2.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อร่างกาย (18)

1) กรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตออกมา จะทำให้สภาวะภายในลำไส้มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

2) ทำให้ระบบขับถ่ายดี ไม่เกิดการสะสมของของเสียในร่างกายเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งตับ

3) วิตามินบีที่ได้ จะทำให้เซลล์ในระบบภูมิต้านทานทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ และยังทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดแดงดีขึ้นด้วย

4) ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด

5) แบคทีเรียกรดแลคติกยังช่วยลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือดด้วย

6) นอกจากนี้ ยังผลิตเอนไซม์แลคเตส ซึ่งช่วยย่อยน้ำตาลในนม ทำให้เราไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมดีขึ้น

2.2.3 สมดุลของแบคทีเรียสามารถถูกรบกวนได้ด้วยสาเหตุ 2 ประการด้วยกัน (19) คือ

1) สารปฏิชีวนะ ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียที่ดีในระบบทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่ไม่ดี บางคนใช้โพรไบโอติกเพื่อชดเชยผลกระทบที่เกิดจากสารปฏิชีวนะ เช่นการเกิดก๊าซตะคริวหรือท้องเสีย เช่นเดียวกับที่บางคนใช้เพื่อบรรเทาอาการที่สภาวะร่างกายขาดเอนไซม์ที่ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสในนม และอาการของโรคระบบทางเดินอาหาร

2) จุลินทรีย์ที่ไม่ดีซึ่งอาจก่อให้เกิดโรค เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ราและปาราสิต จะทำให้เกิดการเสียสมดุล นักวิจัยหลายท่านพบว่าโพรไบโอติกสามารถต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ดีได้โดยการแทน หรือยับยั้งการเจริญและกิจกรรมที่เกิดขึ้นดังนี้ได้

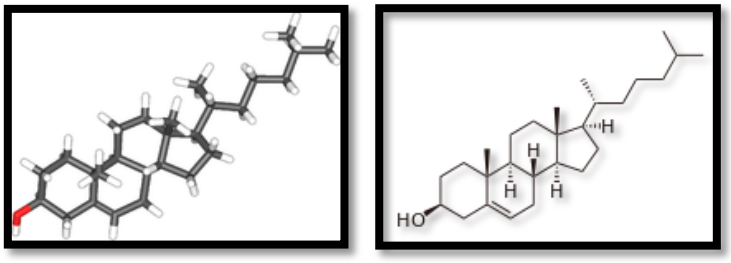
2.3 รายละเอียดเกี่ยวกับโคเลสเตอรอล (20-22)

โคเลสเตอรอล (Cholesterol) เป็นทั้งสารสเตอรอยด์ (Steroid) ลิพิด(Lipid) และแอลกอฮอล์ (alcohol) ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่ละลายน้ำเป็นสิ่งจำเป็นต่อชีวิต เนื่องจากร่างกายต้องใช้เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของผนังเซลล์ และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮอร์โมน เช่น estrogen, progesterone, testosterone, aldosterone และ cortisol นอกจากนั้นโคเลสเตอรอลยังใช้ในการสร้างวิตามินดี และน้ำดีสำหรับย่อยไขมันในอาหาร เป็นต้น

โคเลสเตอรอลมีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมีมากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ มันเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (cardiovascular disease) และภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง หากโคเลสเตอรอลในเลือดมีมากเกินความต้องการของร่างกาย คือ มากกว่า 200 มิลลิลิตร/เดซิลิตร (มล./ดล.) โคเลสเตอรอลเหล่านี้สะสมใต้ผนังหลอดเลือดด้านในมากขึ้นทำให้หลอดเลือดตีบและอุดตันในที่สุด

2.3.1 คุณสมบัติของโคเลสเตอรอล

โคเลสเตอรอลมีสูตรเคมี คือ $C_{27}H_{46}O$ มวลโมเลกุลคือ 386.654 ลักษณะทางกายภาพคือ white crystalline powder จุดหลอมเหลว148-150 °ซ จุดเดือด360 °ซ ความสามารถละลายได้ในน้ำ 0.095 มิลลิกรัม/ลิตร (30 °ซ)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของโคเลสเตอรอล (20)

2.3.2 ชนิดของโคเลสเตอรอล

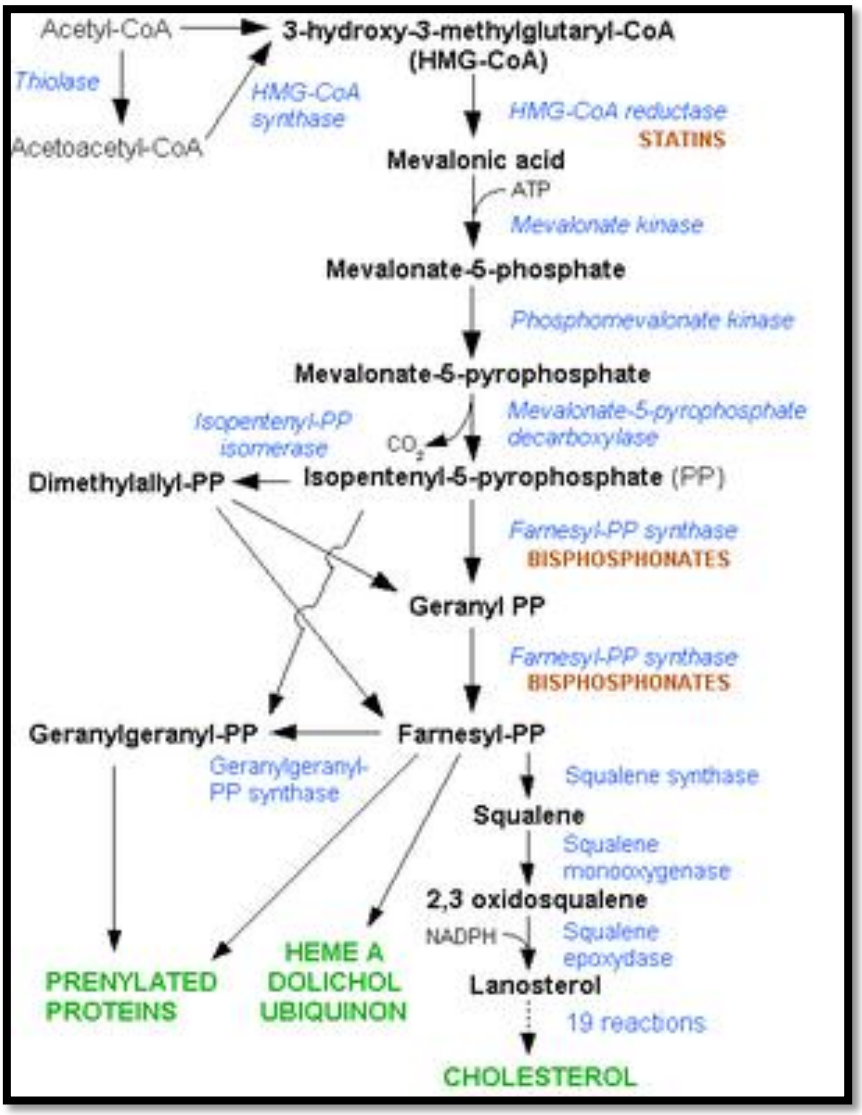
1) Low-density lipoprotein (LDL) ทำหน้าที่ขนส่งโคเลสเตอรอลไปเก็บไว้ตามเซลล์ต่างๆ เพื่อนำไปผลิตฮอร์โมน หรือไปสร้างผนังเซลล์ สำหรับโคเลสเตอรอลส่วนที่เกินความต้องการ LDLsจะนำไปเกาะไว้ตามผนังเส้นเลือดแดง และเมื่อมีการสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้เส้นเลือดแดงตีบลง ในที่สุดจะเกิดการอุดตันของเส้นเลือดแดง ทำให้เซลล์บริเวณนั้นขาดเลือดไปหล่อเลี้ยงทำให้เซลล์ตาย จึงเรียก LDL ว่าโคเลสเตอรอลชนิดร้ายโคเลสเตอรอลที่น้อยกว่า 100 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (มก./ดล.) จะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้

2) High-density lipoprotein (HDL) ทำหน้าที่ขนส่งไปยังตับ และขับออกจากร่างกายผ่านทางน้ำดี เนื่องจาก HDLทำหน้าที่กำจัดโคเลสเตอรอลส่วนเกิน จึงเรียกว่า โคเลสเตอรอลชนิดดีที่มีค่าตั้งแต่ 40 มก./ดล.ขึ้นไป จะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้

3) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride, TG) เป็นไขมันอีกประเภทหนึ่งในกระแสเลือด เปรียบเสมือนผู้ช่วยผู้ร้ายคนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง พร้อมกับระดับ HDL ต่ำ หรือ LDL สูงยิ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ

2.3.3 การสังเคราะห์โคเลสเตอรอลและการนำเข้าสู่ร่างกาย

การสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในร่างกายมีสารตั้งต้นการสังเคราะห์มาจากอะซิทิลโคเอ (Acetyl CoA) 1 โมเลกุลและอะซิโทซิทิลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) 1 โมเลกุลโดยผ่าน เอชเอ็มจี-โคเอ รีดักเทส พาทเวย์ (HMG-CoA reductase pathway) การผลิตโคเลสเตอรอลทั้งหมดในร่างกายประมาณ 20-25 % (ซึ่งผลิตได้วันละ 1 กรัม) เกิดขึ้นในตับ ส่วนอื่นของร่างกายที่ผลิตมากรองลงไปได้แก่ลำไส้เล็ก ต่อมหมวกไตอวัยวะสืบพันธุ์ ในผู้ใหญ่ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 68 กิโลกรัม (150 ปอนด์) จะมีโคเลสเตอรอลในร่างกายทั้งหมดประมาณ 35 กรัม โดยที่ร่างกายจะสังเคราะห์ขึ้นเองประมาณ 1 กรัมต่อวัน ซึ่งโดยทั่วไปร่างกายของคนไทยควรได้รับโคเลสเตอรอลจากอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่เกิน 300 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งส่วนที่ร่างกายรับเพิ่มเข้าไปจะถูกชดเชยโดยการลดปริมาณที่สังเคราะห์ขึ้นเอง



ภาพที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลใน HMG-CoA reductase pathway (21)

การขนส่งโคเลสเตอรอลภายในร่างกายนั้นเริ่มตั้งแต่การดูดซึมจากลำไส้เล็กในรูปของไคโลไมครอนระหว่างทางอาจจะมีไลโพไลเปสมาย่อยได้กรดไขมันอิสระให้กับเนื้อเยื่อต่างๆ ระหว่างทางทำให้มีขนาดเล็กลงกลายเป็น Chylomicrons remnant แล้วเข้าสู่ตับ (Exogenous pathway) ส่วนตับจะมีการขนส่งโคเลสเตอรอลจากตับไปสู่ส่วนต่างๆของร่างกายในรูปของ VLDL ก่อน บางส่วนจะถูกย่อยสลายโดยไลโพไลเปสจะเหลือเป็น IDL และ LDL ตามลำดับจึงไปสู่อวัยวะเป้าหมายนำโคเลสเตอรอลและกรดไขมันให้กับเซลล์ (Endogenous pathway) ส่วนอวัยวะต่างๆ จะสามารถส่งกลับโคเลสเตอรอลมาสู่ตับได้โดย HDL หน้าที่ของ HDL คือทำหน้าที่ขนส่งโคเลสเตอรอลและ กรดไขมัน จากส่วนต่างๆของร่างกายไปที่ตับเพื่อทำลายโดยใช้เอนไซม์ LCAT (Lecithin-cholesterol-acyl-transferase) เปลี่ยนโคเลสเตอรอลให้เป็นโคเลสเตอรอลเอสเทอร์เก็บไว้ใน

แกนกลางของ HDL-c โดย HDL-c ตัวนี้เรียกว่า HDL3 ในระหว่างทางอาจจะมีการรับกรดไขมันอิสระหรือไตรกลีเซอไรด์จากพวกที่โดนไลเปสย่อยสลายไว้ ก็จะมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นเรียกว่าเป็น HDL2 แล้วจึงนำเข้าสู่ตับ แต่โมเลกุลของ HDL2 และ HDL3 นั้นอาจเปลี่ยนรูปไปมากันได้โดยอาศัย LCAT ช่วยโคเลสเตอรอล ส่วนใหญ่จะถูกขับออกนอกร่างกายทางระบบน้ำดี เนื่องจากโคเลสเตอรอลเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นการที่จะถูกพาไปในกระแสเลือดจะต้องรวมกับโปรตีนจำเพาะก่อนเพื่อให้มีคุณสมบัติในการละลายน้ำ โปรตีนจำเพาะนี้เรียกว่า อะโพโปรตีนสารประกอบที่เกิดขึ้นเรียกว่าไลโพโปรตีน ซึ่งจะทำหน้าที่ขนส่งโคเลสเตอรอลไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิพิดซึ่งสามารถแบ่งโคเลสเตอรอลด้วยวิธี ultracentrifugation และวิธี electrophoresis ออกเป็น 4 ส่วนและ 4 แถบตามลำดับแต่ละชนิดของไลโพโปรตีน มีส่วนประกอบของโปรตีนและไขมันเป็นสัดส่วนแตกต่างกัน LDL-c หรือ beta band จะทำหน้าที่ขนส่งโคเลสเตอรอลออกจากตับไปสะสมที่เนื้อเยื่อและผนังเลือดมากที่สุด

ตารางที่ 2.1 ชนิดและส่วนประกอบของ Lipoproteins

แยกโดยวิธี		ส่วนประกอบ(%)			
Electrophoresis	Ultracentrifugation	Protein	Triglyceride	Cholesterol	Phospholipid
Chylomicrons	Chylomicrons	2	98	-	-
Beta	VLDL	10	55	13	22
Pre-Beta	LDL	21	12	45	22
Alpha	HDL	50	6	18	26

2.4 รายละเอียดเกี่ยวกับเกลือน้ำดี (22)

เกลือน้ำดี เป็นสารที่ไม่มีสี ละลายน้ำได้ดี และมีรสขม เกลือหรือกรดน้ำดีมี 2 ชนิดที่สำคัญ คือ primary bile acid และ secondary bile acid ตับสังเคราะห์เกลือน้ำดีชนิด primary bile acids คือ cholic acid และ chenodeoxycholic acid จากโคเลสเตอรอลส่วน secondary bile acids คือ deoxycholic acid และ lithocholic acid เปลี่ยนมาจาก primary bile acids โดยแบคทีเรียในลำไส้

2.4.1 การสังเคราะห์เกลือน้ำดี

ตับเปลี่ยนโคเลสเตอรอลเป็น primary bile acid โดยปฏิกิริยาที่ต้องใช้เอนไซม์หลายขั้นตอน เอนไซม์ที่ควบคุม rate limiting step ของการสังเคราะห์เกลือน้ำดี คือ 7α-hydroxylase ทำหน้าที่อ็อกซิไดส์โคเลสเตอรอลให้เป็น 7α-hydroxycholesterol ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น cholic acid และ chenodeoxycholic acid ซึ่งเป็น primary bile acid cholic acid และ chenodeoxycholic acid ทำปฏิกิริยา conjugation กับกรดอะมิโน glycine หรือ taurine ได้เป็น glycocholate, taurocholate, glycochenodeoxycholate และ taurochenodeoxycholate การ conjugation กับกรดอะมิโนทั้งสองทำให้ค่า pKa ของกรดน้ำดีลดลง Conjugated bile acids จึงอยู่ในรูปที่เป็น anion ทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น ป้องกันการตกตะกอนในสารละลายที่เป็นกรดและมี

แคลเซียม Conjugated bile acids ในน้ำดีจะอยู่ในสภาพเกลือของโซเดียมหรือโปแตสเซียม เช่น sodium glycocholate หรือ potassium glycocholate

2.4.2 การส่งเกลือน้ำดีออกจากตับ

ตับส่งเกลือน้ำดีออกจากเซลล์เข้าสู่ bile canaliculi โดยใช้ active transport ซึ่งต้องใช้พลังงานจาก ATP การส่งออกเกลือน้ำดีเป็นการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีอย่างหนึ่ง จะมีผลทำให้มีการขับอิเล็กโทรไลต์ โคเลสเตอรอลและฟอสโฟไลปิดตามมา เมื่อเกลือน้ำดีถูกขับลงสู่ลำไส้เพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมอาหารไขมัน แบคทีเรียในลำไส้ และ colon จะสลาย (Deconjugate) พันธะระหว่างเกลือน้ำดีกับ glycine และ taurine ได้เป็น unconjugated primary bile acid ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกรีดิวส์ให้เป็น secondary bile acids โดยการตัด hydroxyl group ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่7ออก secondary bile acid จะไม่สามารถเปลี่ยนกลับเป็น primary bile acid ได้อีก แต่ถูกคอนจูเกตกับ glucuronic acid ได้ secondary bile acids ละลายน้ำได้น้อยกว่า primary bile acids ส่วนใหญ่จะถูกขับทิ้งไปทางอุจจาระ

2.4.3 Enterohepatic circulation ของเกลือน้ำดี

เกลือน้ำดีในลำไส้ส่วนใหญ่จะถูกดูดกลับโดย Na-cotransport ที่ไอเลียมตอนปลาย ผ่านเยื่อบุลำไส้กลับเข้าสู่ระบบไหวเวียนทางหลอดเลือดดำปอร์ตัลโดยจับกับแอลบูมิน เกลือน้ำดีกลับเข้าสู่ตับโดย Na-cotransport เช่นเดียวกับที่ลำไส้ เกลือน้ำดีในร่างกายรวมกันทั้งหมดมีประมาณ 2-4 กรัม แต่เกลือน้ำดีจะมีการไหลเวียนระหว่างตับและลำไส้ประมาณวันละ 4-12 ครั้งต่อวัน คือประมาณ 2-3 รอบต่ออาหารแต่ละมื้อ ทำให้มีเกลือน้ำดีผ่านลำไส้มากกว่าวันละ 30 กรัม แต่ในคนปกติจะมีเกลือน้ำดีถูกขับออกทางอุจจาระเพียงประมาณวันละ 0.2-0.6 กรัม ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการดูดกลับเกลือน้ำดีของลำไส้และความสำคัญของ enterohepatic circulation ที่ทำให้นำเกลือน้ำดีกลับมาใช้ได้ใหม่

การนำเกลือน้ำดีกลับเข้าสู่เซลล์เป็นการขนส่งแบบ Na-cotransport โปรตีนที่ทำหน้าที่ชื่อ Na-taurocholate cotransporter (NTCP) เป็น integral membrane protein ทำหน้าที่apical membrane ของเซลล์เยื่อบุลำไส้และที่ sinusoidal membrane ของเซลล์ตับNTCP ในคนไข้บางรายที่มีอาการท้องเดินโดยไม่ทราบสาเหตุ พบว่ามี mutation ของโปรตีนนี้ทำให้การดูดกลับเกลือน้ำดีเสีย ทำให้มีเกลือน้ำดีค้างอยู่ใน distal intestine มากซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการท้องเดิน

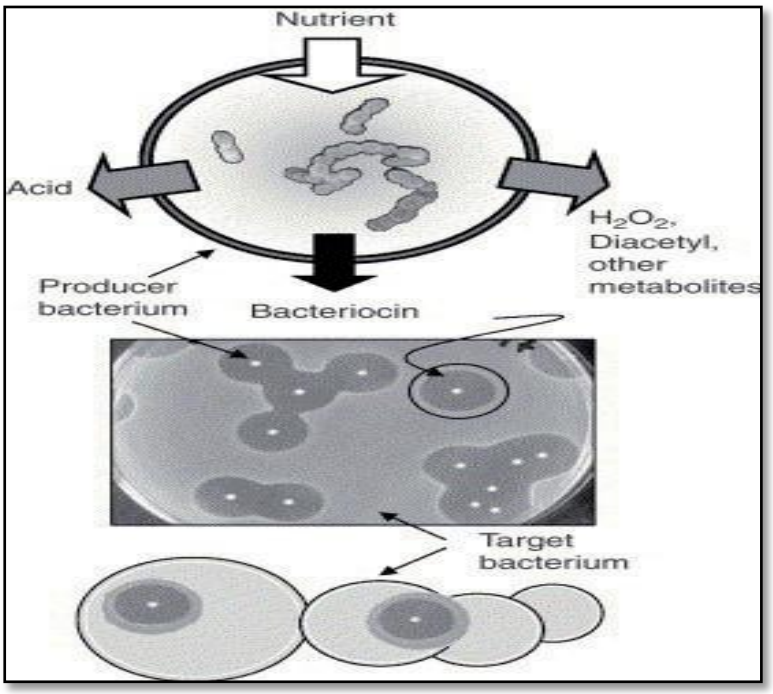
ตับทำหน้าที่สังเคราะห์เกลือน้ำดีขึ้นมาชดเชยปริมาณที่เสียไปทางอุจจาระ ถ้าร่างกายเสียเกลือน้ำดีไปมาก เช่น การดูดกลับที่ลำไส้น้อยลง เกลือน้ำดีกลับเข้าสู่ตับน้อย เสียไปทางอุจจาระมาก ตับก็จะสลายโคเลสเตอรอลเพื่อสังเคราะห์เป็นเกลือน้ำดีมากขึ้น ดังนั้น จึงได้มีนำวิธีการนี้มาใช้ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดโดยการให้สารบางอย่างที่ขัดขวางการดูดกลับของเกลือน้ำดี เช่น cholestyramine ซึ่งเป็น anion-exchange resin ชนิดหนึ่ง สามารถจับเกลือน้ำดีไว้และถูกขับทิ้งทางอุจจาระ สารในธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทำนองเดียวกัน คือ dietary fiber ทำให้เกลือน้ำดีไม่ถูกดูดกลับซึ่งถ้ามีมากในอาหารจะช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

2.5 รายละเอียดเกี่ยวกับแบคเทอริโอซิน (23)

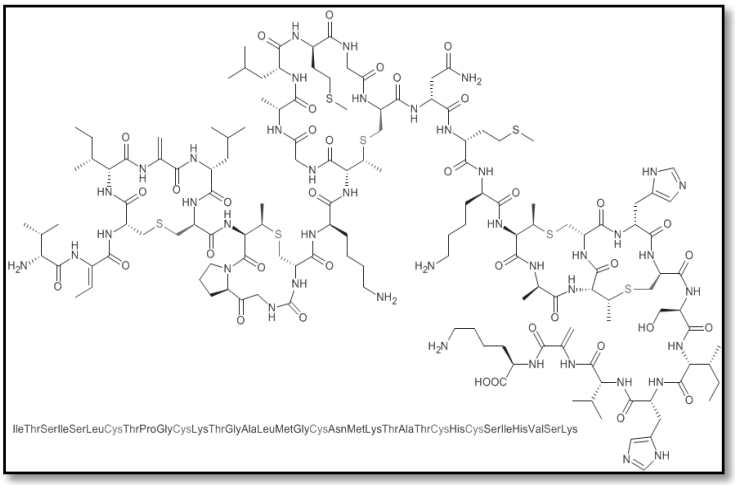
แบคเทอริโอซินหมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) คือแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคเทอริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) กลับเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด

แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) หรือท่อน (rods) ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก microaerophilic หรือ facultative anaerobe ไม่มีไซโตโครม (cytochrome) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และมีค่า G+C content น้อยกว่า 55 mol % ประกอบด้วยจีนัสต่างๆ ได้แก่ *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Weissella,Aerococcus, Vagococcus, Oenococcus, Carnobacterium* และ *Tetragenococcus*แบคทีเรียกรดแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณ 50 % และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล อะเซโทอินและกรดอินทรีย์ แบคทีเรียกรดแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria, GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (starter culture) เติมลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Carnobacterium*

กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้มักแยกมาจากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการประยุกต์ทางด้านอาหาร การสร้างแบคเทอริโอซินนี้มีข้อดีแก่แบคทีเรียกรดแลคติกเองคือแบคเทอริโอซินสามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารนั้นๆ ดังภาพที่ 2.3 แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อน ทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหาร ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการเนื่องจากมีความปลอดภัย มีรสชาติสดใหม่ และพร้อมรับประทาน



ภาพที่ 2.3 แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้งแบคเทอริโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (23)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของไนซิน (23)

แบคเทอริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ไนซิน จะมีประสิทธิภาพในการใช้มากกว่า โดยพบว่าไนซินมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วย ซึ่งมักจะก่อโรคในอาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมที่นำมาแปรรูปเป็นเนย ซึ่งความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะแพร่ผ่านได้ลำบาก ในขณะที่แบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์แคบก็สามารถยับยั้งเชื้อเฉพาะกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่น

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร กล่าวคือ

1) เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย

2) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต

3) สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร

4) มักจะทนต่อ pH และความร้อน

5) บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *L.monocytogenes*และ *Clostridium botulinum*

6) มักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิด จึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation

7) ช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น เพิ่มความปลอดภัย และรสชาติดีขึ้น

8) มีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) สูง

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินเป็นสารกันเสียในอาหาร มีข้อดีหลายประการ คือ

1) ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร

2) ช่วยในการรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่างๆ

3) ลดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในอาหาร

4) ลดค่าใช้จ่ายจากการเน่าเสียของอาหาร

5) ลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร

6) ช่วยลดการใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อในอาหาร ทำให้รักษาคุณค่าของสารอาหารและวิตามินในอาหาร

7) เป็นที่ต้องการของโรงงานและผู้บริโภค โดยแนวที่โรงงานอุตสาหกรรมอาหารในยุโรปนิยมในปัจจุบัน คือ ไม่ใช้สารปรุงแต่ง ลดกระบวนการแปรรูปอาหาร เพื่อให้อาหารสดใหม่

2.5.1 การจัดจำแนกแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก

แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์อื่น คือสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และจัดเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างจะพบเป็นคลัสเตอร์ (cluster) ในโอเปอรอน ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 class ซึ่งส่วนใหญ่แบคเทอริโอซินที่พบมักจัดอยู่ใน Class I และClass II

1) Class I

Class I มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้ว จะเข้ารวมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (Lanthionine, Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไธโออีเทอร์ (Thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมธิลแลนไธ-โอนีน (Methyllanthionine, MeLan) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่าแลนติไบโอติก (Lantibiotics)

แลนติไบโอติกมักแบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลักคือ type A หรือ subclass Ia ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาว ไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือไนซิน อีกกลุ่มหนึ่งคือ type B หรือ subclass Ib มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็น

ก้อน (Globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เมอซาซิดิน (Mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ซึ่งมักจะเกิดความสับสน เนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรู และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติกออกเป็น 11 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อดังนี้คือ ไนซิน (Nisin) อีพิเดอมิน (Epidermin) สเตรปติน (Streptin) เปป 5 (pep 5) แลคติซิน 481 (Lacticin 481) เมอซาซิดิน (Mersacidin) แอลทีเอ็นเอ 2 (LtnA 2) ไซโตไลซิน (Cytolysin) แลคโตซิน S (Lactocin S) ซินนามัยซิน (Cinnamycin) และ ซับแลนซิน (Sublancin)

2) Class II

Class II มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ปัจจุบันที่พบมากมี2 subclass คือ subclass IIa มีชื่อว่า pediocin-like (หรือเรียกว่า Listeria-active) และ subclass IIb หรือ แบคเทอริโอซินที่มี 2 องค์ประกอบ (Two-component bacteriocins) ใน class IIa ตัวที่มีการศึกษามากที่สุด คือ เพดดิโอซิน AcH/PA-1 สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับของกรดอะมิโน 40-60 % โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YGNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge)subclass IIa ปัจจุบันได้รับความสนใจมากเนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria*เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร subclass IIb หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กันถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มีแอคติวิตีหรือมีแอคติวิตีเหลือเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ แลคตาซินเอฟ (Lactacin F)และแลคโตคอกซินจี (Lactococcin G) นอกจากนี้ยังมี subclass IIc (Sec-dependent bacteriocins) ตัวอย่างเช่น อะซิโดซิน B (Aidocin B) ไดเวอจิซิน A (Divergicin A) แบคเทอริโอซิน 31 และเอนเทอโรซิน P (Enterocin P) และ subclass IId ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่น ตัวอย่างเช่น แลคโตคอกซิน A และ B ไดอะเซติน B (Diacetin B) อะซิโดซิน 8912 (Acidocin 8912) เป็นต้น

3) Class III

Class III ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน จึงแตกต่างจาก class I และ II ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ เฮลเวติซิน J (Helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (Enterolysin A)

4) Class IV

Klaenhammer (1993) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือclass IV ซึ่งแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิดิค (Glucidic) และ/หรือลิปิดในโครงสร้างด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ เช่น ลิวโคซิน S (Leucocin S) และแลคโตซิน 27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง หรือมีเซ็นเทอริซิน 52 (Mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิโพโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น

2.5.2 กลไกการออกฤทธิ์

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก มีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันโดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ไนซินเป็นสารที่มีแอคติวิตีต่อเชื้อในกลุ่มแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่โดยการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Bacillus* spp. และ*Clostridium* spp. ในทางกลับกันแลคโตคอกซิน A (Lactococcin A) มีฤทธิ์ค่อนข้างแคบ สามารถยับยั้งเฉพาะกลุ่ม Lactococci แบค-เทอริโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic และแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่มีการศึกษามากที่สุดคือ ไนซิน ซึ่งไนซินจะทำให้เกิดรูและขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายที่สุด นอกจากนี้ยังมีแลนติไบโอติกอื่นที่ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้แก่ แลคติซิน 3147 เปป 5 ซับทิลิน และอีพิเดอมิน อย่างไรก็ตามไนซินยังช่วยรบกวนการสร้างผนังเซลล์ด้วย ซึ่งกลไกการทำงานของไนซินทั้งสองนี้ สามารถออกฤทธิ์ได้ที่ความเข้มข้นในระดับนาโนโมลาร์ (nM) เท่านั้น

แบคเทอริโอซิน class II จะออกฤทธิ์โดยการสร้างรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เช่นกัน เป็นผลให้เกิดการแยกตัวของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่วไหลของกรดอะมิโนและไอออน รวมทั้ง ATP ภายในเซลล์การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร

แบคเทอริโอซินจะช่วยในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหารและลดการป่วยอันเนื่องมาจากอาหารเป็นพิษ การใช้แบคเทอริโอซินมักใช้เป็นตัวเสริมในภายหลังเพื่อป้องกันโรคอาหารเป็นพิษเท่านั้นโดยทั่วไปการควบคุมการผลิตอาหารในโรงงานอุตสาหกรรมควรจะมีระบบที่ป้องกันหรือลดจำนวนการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ทั้งนี้รวมถึงการมีระบบสุขาภิบาล สุขอนามัย และการจัดการที่ดี (Good manufacturing practices) ซึ่งครอบคลุมถึงกระบวนการตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบ บริเวณโรงงานผลิต ควบคุมผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งอนามัยส่วนบุคคล นอกจากนี้การควบคุมความปลอดภัยของอาหารโดยอาศัยหลักการพื้นฐานของ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) นั้น จะวัดจากการที่โรงงานสามารถจำแนก ประเมิน และควบคุมระบบอันตรายที่ส่งผลถึงความปลอดภัยในอาหาร อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีระบบควบคุมที่เคร่งครัด แต่การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษก็ยังคงพบได้ทั่วไป จากรายงานของ Council for Agricultural Science and Technology พบว่ามีผู้ป่วยจากโรคติดเชื้อที่มากับอาหาร 6.5-33 ล้านคน และมีการตายถึง 9,000 รายต่อปี ในจำนวนนี้โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *L. monocytogenes* นับว่ามีความสำคัญมาก เชื้อชนิดนี้จะปนเปื้อนในโรงงานผลิตภัณฑ์อาหารและส่งผลร้ายต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะหญิงมีครรภ์ทารก ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ *L. monocytogenes* นี้พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม สามารถรอดชีวิตได้ในอุณหภูมิ

ตู้เย็นและที่ความเข้มข้นของเกลือสูง รายงานในประเทศเวลส์และอังกฤษพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ 194 คนในปี2000 และตาย 68 คน นอกจากนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกายังพบผู้ป่วยประมาณ 2,500 คน และทำให้เกิดการตาย 500 คนต่อปี จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมเชื้อ ซึ่งแบคเทอริโอซินจะเข้ามามีบทบาท นอกจาก *L. monocytogenes* แล้วยังมีเชื้อก่อโรคในกลุ่มแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Escherichia coli* VTEC 0157, *Campylobacter*และ*Salmonella* ถึงแม้ว่าฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจะไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของกลุ่มแกรมลบได้อย่างสมบูรณ์ แต่สามารถใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่น เช่น การใช้ความดันสูง (High Hydrostatic Pressure, HHP) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ หรือใช้ร่วมกับกรดแลคติกที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อในกลุ่มแกรมลบ เช่น *Salmonella anatum* ที่พบมากในแหนม ถูกทำลายได้เร็วขึ้น ดังนั้นแบคเทอริโอซินสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและพวกที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร โดยเฉพาะจะเข้าไปมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิต

แบคเทอริโอซินได้เข้ามามีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร คือ การใช้แบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซิน ผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารหมัก

บทบาทของแบคเทอริโอซินในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร โดยอาจใช้ในรูปการเติมเชื้อตั้งต้นที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงไปในอาหาร ให้เป็นอาหารหมักหรือใช้ในรูปส่วนผสมที่เป็นผงเติมลงไปในอาหาร ซึ่งใช้เติมได้ทั้งในอาหารหมักและอาหารทั่วไป

2.5.3สรุป

ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินนั้นเป็นที่รู้จักกันมากว่า 1,000 ปีความรู้เกี่ยวกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับไนซินสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารชนิดอื่น รวมทั้งนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้ออื่น การใช้แบคเทอริโอซินนั้นเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากจะช่วยลดการใช้สารเคมีโดยอาจใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับสารที่ใช้ถนอมอาหารทางธรรมชาติอื่น

ปัญหาที่พบในการใช้แบคเทอริโอซินในการใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร คือ พบการพัฒนาการดื้อต่อแบคเทอริโอซิน ซึ่งการแก้ไขปัญหานี้ทำได้โดยการใช้เชื้อตั้งต้นที่สร้างแบคเทอริโอซินหลายสายพันธุ์เช่น การใช้สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรซิน A ร่วมกับสายพันธุ์ที่สร้างเพดดิโอซิน PA-1 เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้อนุพันธ์ของแบคเทอริโอซินที่มีการปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มความเสถียรและเพิ่มการสร้างแบคเทอริโอซินให้มากขึ้น ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนกรดอะมิโนในโครงสร้างของไนซิน Z โดยเปลี่ยนจากเมไธโอนีนที่ตำแหน่ง 21 เป็นไลซีน พบว่าสามารถเพิ่มการละลายของเปปไทด์ที่ pH 8 ให้เพิ่มขึ้น 5 เท่าเมื่อเทียบกับไนซิน Z เดิม รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในอาหาร ซึ่งทั้งเนื้อของอาหารและกระบวนการผลิตล้วนมีผลต่อแอคติวิตีและความเสถียรของแบคเทอริโอซิน การสร้างอนุพันธ์ของแบคเทอริโอซินชนิดใหม่จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติดังกล่าวให้ดีขึ้น และส่งผลดีต่อผู้บริโภคตามมา

2.6 รายละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การลดปริมาณโคเลสเตอรอล (Cholesterol) ในเลือดโพรไบโอติกบางสายพันธุ์เช่น *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* และ *Bifidobacterium* เป็นต้นสามารถสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส (Bile Salt Hydrolase; BSH) ซึ่งทำให้น้ำดี (Bile) แตกตัวออกเป็นกรดน้ำดีอิสระและกรดอะมิโนส่งผลให้ประสิทธิภาพการละลายไขมันลดลงเนื่องจากกรดน้ำดีอิสระมีประสิทธิภาพการละลายไขมันต่ำกว่าน้ำดีนอกจากนั้นกรดน้ำดีอิสระส่วนใหญ่ยังถูกขับออกจากร่างกายไปพร้อมกับมูลดังนั้นเพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมไขมันไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีการนำโคเลสเตอรอลมาใช้ในการสังเคราะห์น้ำดีขึ้นมาใหม่เป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลลดลง (25)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรุจา (2544) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lact.buchneri*A11, *Lact. sake*A14, *Lact. plantarum*C01, *Lact. plantarum*K01, *Ent. faecium*KUPB20, *Ped.dextranicus*D01, *Ped. dextranicus*T09 และ *Leuc. paramesenteroides* T05 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของน้ำดี 1 และ4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับใกล้เคียงกับน้ำดีภายในกระเพาะพักของไก่หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีน้ำดีทั้งสองความเข้มข้นถึงแม้ว่ากลไกความทนทานต่อน้ำดีของ Lactobacilli จะไม่เป็นที่เข้าใจมากนักแต่สันนิษฐานว่าอาจเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส (bile salt hydrolase, BSH) ซึ่งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Lactobacillus* สร้างขึ้นมาทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำดีออกเป็นกรดน้ำดีและกรดอะมิโนส่งผลให้ความสามารถในการละลายและทำให้การทำงานของน้ำดีอ่อนฤทธิ์ลง(26)จึงไม่สามารถทำลายไขมันที่เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้จึงทำให้แบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีน้ำดีได้

Morovský และคณะ (1998) ได้รายงานว่าพบเชื้อ *Enterococcus faecium* BC25 สามารถสร้าง Enterocin BC25 ซึ่งเชื้อดังกล่าวแยกได้จากกระเพาะอาหารของวัว Enterocin BC25 และเชื้อดังกล่าวสามารถต้านเชื้อ *Streptococcus bovis* AO 24/85 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 125 AU/ml (27)

Morovský และคณะ (2001) ได้รายงานว่าพบเชื้อ *Ent.faecium* BC25 สามารถสร้าง Enterocin BC25มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันมากกับยีน Enterocin A และเชื้อดังกล่าวสามารถต้านเชื้อกลุ่ม Streptococci และ Enterococci (28)

Viola และคณะ (2007) ได้รายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Ent.faecium* EF55 ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่มีการสร้าง Enterocin ชนิด A และ P (37)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาได้มาจากที่เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์และที่ได้มาจาก BIOTEC Culture-collection (BCC) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียกรดแลคติก	แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย
Pediococcus pentosaceus 1 L14/1 (L14/1)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
Ped.acidilactici L25 (L25)	
Lactobacillus plantarum(L26)	
L. lactis C3	
Enterococcus faecium N 15 (N15)	
Candida albicans TISTR5779	
L. lactis BCC19567	BIOTEC Culture collection (BCC)
Ped. pentosaceus BCC38100	
*Lact. plantarum*BCC47648	
Ent. faecium BCC38124	

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง/อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mann Rogosa Sharpe (MRS) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

3.1.3 สารเคมี

1) สารเคมีสำหรับการย้อมสีแบบแกรม

1.1) Crystal violet เป็นสีย้อมแรกในการย้อมแบบแกรม (primary stain)

1.2) Iodine ช่วยในการติดสีย้อมได้ดีขึ้น (mordant)

1.3) 95 % Alcohol เป็น decolorize ในการล้างสี

1.4) Safranin O เป็นสีที่สองในการย้อมแกรม (counter stain)

2) สารเคมีสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1) Glycerol (Merck, Germany)

2.2) 0.85 % NaCl (Merck, Germany)

2.3) Bromocresol purple ความเข้มข้น 0.004 % (w/v) (Merck, Germany)

2.4) $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) (Merck, Germany)

3) สารเคมีสำหรับเทคนิคการเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) เพื่อตรวจหาชิ้นยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

3.1) 10X buffer (i-Taq, Intron, Korea)

3.2) 25 mM $MgCl_2$ (i-Taq, Intron, Korea)

3.3) *Taq* DNA polymerase (5ยูนิต/มค.ล.) (i-Taq, Intron, Korea)

3.4) 2 mM dNTPs (i-Taq, Intron, Korea)

3.5) 20 μMPrimers (i-Taq, Intron, Korea) ใช้เพื่อตรวจหายีนแบคเทอริโอซินดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนแบคเทอริโอซิน (29)

ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด(bp)
Pediocin	Sense, *pedF*	5'-GGTAAGGCTACCACTTGCAT-3'	332
	Anti-sense, *pedR*	5'-CTACTAACGCTTGGCTGGCA-3'	
Enterocin	Sense, *entAF*	5'-GGGTACCACTCATAGTGGAA-3'	412
	Anti-sense, *entAR*	5'-CCAGCAGTTCTTCCAATTTCA-3'	
Nisin	Sense, nisRF	5'-CTATGAAGTTGCGACGCATCA-3'	608
	Anti-sense, *nisRR*	5'-CATGCCACTGATACCCAAGT-3'	

3.6) 6X loading dye

3.7) Ethidium bromide (Merck, Germany)

3.8) ผงวุ้นอะกาโรส (Difco, USA)

3.9) 10X TBE buffer (Tris base 108 กรัม, 0.5 M EDTA 40 มล., boric acid 55 กรัม) (Merck, Germany)

3.10) 100-bp ladder (Vavitist, Malaysia)

3.11) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (i-Taq, Intron, Korea)

4) สารเคมีสำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี (Bile salt-hydrolase: BSH)

4.1) 0.5 % taurodeoxycholic acid (TDCA) (Merck, Germany)

4.2) Potassium phosphate buffer ที่ pH 6.5 (Merck, Germany)

4.3) 10 mM Dithiothreitol (DTT) (Merck, Germany)

4.4) Oxgall bile (Difco, USA) ความเข้มข้น 0.3 % (w/v)

4.5) Trichloroacetic acid (15 % w/v) (Merck, Germany)

4.6) 2 % ninhydrin (Merck, Germany)

4.7) Glycine (Merck, Germany)

5) สารเคมีสำหรับการทดสอบวัดระดับโคเลสเตอรอล

5.1) Horse serum, Donor herd Hybridoma test, Sterile filtered (Sigma-Aldrich, USA)

5.2) Oxgall bile (Difco, USA) ความเข้มข้น 0.3 % (w/v)

5.3) 95 % ethanol (Merck, Germany)

5.4) 50 % KOH (Merck, Germany)

5.5) n-Hexane (Merck, Germany)

5.6) *o*-phthalaldehyde (Merck, Germany)

5.7) H_2SO_4 (Merck, Germany)

5.8) Glacial acetic acid (Lab-scan,Thailand)

5.9) สารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอลความเข้มข้น 181 มิลลิกรัม (มก.)/มิลลิลิตร (มล.)(Thermo, USA)

6) สารเคมีสำหรับการวินิจฉัยเชื้อ

6.1) ชุด API 50 CHL kit (Biomereux, France)

3.1.5 วัสดุอุปกรณ์

1) จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (มม.)

2) Automatic pipettes ขนาด 100 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (มค.ล.)

3) Tips

4) Cuvette ขนาดบรรจุ 1 มิลลิลิตร (มล.)

5) ขวด duran ขนาดบรรจุ 500 และ 1,000 มล.

6) หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 13x100, 25x150 มม.

7) Rack

8) Millipore filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (มค.ล.)

9) ขวดใส่ 70 % alcohol พร้อม alcohol

10) Needle และ loop

11) ตะเกียง alcohol พร้อม 90 % alcohol

12) เครื่องปรับเทียบความขุ่น Mcfarland No. 0.5

13) หลอดปั่นก้นแหลม ขนาดบรรจุ 50 มล.

14) Candle jar พร้อมเทียนไขสีขาว

15) ถุงมือ เบอร์ S

16) หลอดทดลองขนาด 13x100 มม.

17) หลอดทดลองขนาด 12x75มม.
18) Spreader
19) ไม้จิ้มฟัน
20) Slide
21) กระบะใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ
22) ถาดใส่น้ำแข็งสำหรับทำ PCR
23) อาหารหมักดอง (แหนมปลาเค็มผักกาดดอง และผลไม้ดอง)
24) Moist chamber No. 987
25) Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.
26) Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มล.

3.1.5 เครื่องมือ

1) Spectophotometer (Thermo spectronic GENESYS 20, USA)
2) Light microscroscope ชนิด compound (Olympus CH30, Japan)
3) Autoclave (Tomy-pressure steam sterilizer ES-315, Japan)
4) Refrigerated centrifuge (Thermo electron corporation, France)
5) Incubator (WTB BINDER KB, Germany)
6) Biological safety cabinet class 2 (Hareaus HERA safe, Germany)
7) Hot air oven (WTB BINDER FD, Germany)
8) Vortex mixer (VM 300, Taiwan)
9) Freezer (SANYO, Thailand)
10) Refrigerator (SANDEN Intercool, Thailand)
11) Water bath (Heto HMT-200, Denmark)
12) Sonicator (SONIC SVCCX 750, USA)
13) Gel electrophoresis apparatus (Amersham EPS 3501XL)
14) Gel documentation (SYNGENE)
15) PCR machine (Biorad iCycler Thermo cycler)
16) Stomacher (Seward 400, Canada)
17) Microwave (Sharp R351, Thailand)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

1) จากเชื้อที่ได้เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

1.1) หยดสารแขวนลอยแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ (ไอโซเลต) ดังแสดงในตารางที่ 3.1จาก 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ ปริมาตร 100 มค.ล. ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บริเวณกลางจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ชม.) หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนี

1.2) นำโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 1.1) ไปขีดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในสภาวะเดิมข้างต้น

1.3) นำโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 1.2) มายืนยันเชื้อด้วยการย้อมสีแบบแกรม และทำการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

1.4) แยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 100 มค.ล. ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13x100 มม. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 24-48 ชม.จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (เชื้อเจริญ)

1.5) แยกแบ่งเก็บสารแขวนลอยเชื้อใส่ลงใน 15 % glycerol และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ-30°ซ

2) จากการคัดแยกกลุ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารเสริม (29-30)

2.1) นำตัวอย่างจากธรรมชาติ ได้แก่ นมแหนม มูลสัตว์ และอาหารเสริม ปริมาณ 25 กรัม ผสม 0.85 % NaCl ปริมาตร 225 มล. นำมาตีด้วยเครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher)

2.2) นำไปเจือจางที่ระดับ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} จนมีระดับความเจือจางถึง 10^{-6} ด้วย 0.85 % NaCl

2.3) ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มล.จากระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-6} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS

2.4) เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารด้วย แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อรูปตัวแอล (Sterile spreader รูป L) ที่ทำจากแท่งแก้ว

2.5) นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่37°ซ เป็นเวลา 24-48 ชม. ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (candle jar)

2.6) คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม. ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % จนเกิดโคโลนีเดี่ยวๆ นำตัวอย่างโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น โดยใช้สมบัติการติดสีแกรม ทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส

3.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี

1) การทดสอบเชิงคุณภาพ (31)

1.1) นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบมาทำ Replica Test ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่ผสม 0.5 % taurodeoxycholic acid (TDCA)

1.2) นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 °ซ เวลา 72 ชม.ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

1.3) ตรวจสอบว่าเชื้อใดบ้างที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีจะมีลักษณะสีขาวขุ่นรอบโคโลนี

3.2.3 การตรวจหายีนแบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

1) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก 32-33)

1.1) นำแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (ประมาณ 1 loop) ที่อุณหภูมิ 37 °ซข้ามคืน มาใส่ในน้ำปราศจากอิออน 100 มค.ล.vortexให้เข้ากัน แล้วนำแช่แข็งที่ -20°ซเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.2) นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2) ขั้นตอนการทำ PCR

2.1) นำน้ำยา PCR ทั้งหมดวางที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะละลาย ยกเว้นเอนไซม์ *Taq*DNA polymerase

2.2) Label หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.สำหรับใช้เป็นหลอด master mix

2.3) Label หลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มล.จำนวน 18 หลอด

2.4) นำหลอดทดลองทั้งหมดที่ label แล้ว ใส่ในตะแกรงวางหลอดทดลองที่แช่ไว้ในถาดน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิส่วนประกอบสำหรับทำ PCR ให้เย็นอยู่เสมอ

2.5) คำนวณส่วนผสม PCR ทั้งหมด ตามจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะทำการตรวจ ยกเว้นดีเอ็นเอแม่แบบดังแสดงตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR (ดัดแปลงจาก 33)

สาร	ปริมาตร (มค.ล.)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ดีเอ็นเอแม่แบบ	10	-
10X buffer ที่มี 15 mM $MgCl_2$	5	1X มี 1.5 mM $MgCl_2$
$MgCl_2$(25 mM)	2	1 mM
Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/มค.ล.)	1.25	0.125 ยูนิต/มค.ล.
2 mM dNTPs	4	200 µM
20 µM Forward Primer	2	0.8 µM
20 µM Reverse Primer	2	0.8 µM
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	23.75	-
รวม	50	-

2.6) เติมส่วนผสม PCR ทั้งหมดลงในหลอด master mix (เติม *Taq* DNA polymerase หลังสุด) จากนั้นผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ด้วย vortex mixer เบาๆ และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูงสุดประมาณ 10 วินาที (spin down)

2.7) แบ่งส่วนผสม PCR ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มล.หลอดละ 40 มค.ล.

2.8) เติมดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่ต้องการตรวจ10 มค.ล.ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด (1 ตัวอย่างดีเอ็นเอต่อส่วนผสม PCR 1 หลอด)

2.9) ปั่นเหวี่ยงหลอดทดลองด้วยความเร็วรอบสูงสุดประมาณ 10 วินาที

2.10) นำหลอดทดลองใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิและเวลาต่างๆดังตารางที่ 3.4

2.11) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ให้นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ (PCR product) ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการนำไปวิ่งในวุ้นอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3) และ 4)

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ทำ PCR จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย (33)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (วินาที)	
Initial denaturation	94	300	
Denaturation	94	60	30 รอบ
Annealing	55	30	
Extension	72	45	
Final extension	72	300	

3) การเตรียมวุ้นอะกาโรส (ดัดแปลงจาก 32, 34)

3.1) ชั่งผงวุ้นอะกาโรสเจลน้ำหนัก 1 กรัม ลงใน 0.5X TBE buffer

3.2) นำไปเข้าเครื่องไมโครเวฟ เพื่อละลายผงวุ้น จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น

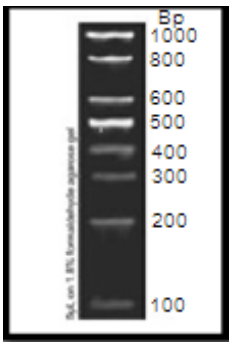
3.3) เทใส่แม่พิมพ์ที่วางหวีไว้แล้ว จากนั้นปล่อยทิ้งให้แข็งตัวแล้วดึงหวีออก

3.4) นำวุ้นอะกาโรสไปหล่อด้วย 0.5X TBE buffer ในเครื่องวิ่งวุ้นอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า เพื่อรอการโหลดตัวอย่างจากข้อ 2)

4) การวิ่งวุ้นอะกาโรสเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า

4.1) นำผลผลิตจากข้อ 2) ปริมาตร 10 มค.ล.ผสมกับ 6X loading dye 2 มค.ล. บนแผ่นพาราฟิล์ม เพื่อเตรียมตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีวิ่งในวุ้นอะกาโรส

4.2) โหลดตัวอย่างลงในหลุม 1 % อะกาโรสที่เตรียมไว้ในข้อ 3) ซึ่งแช่อยู่ใน 0.5X TBE ตั้งแต่หลุมที่ 5 ถึง 17 เมื่อโหลดตัวอย่างครบแล้ว ให้โหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA)100-bp ladder 4 มค.ล.ลงในหลุมที่ 1 เพื่อใช้เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างดังภาพที่ 1 โหลด DNA 10 มค.ล.ลงในหลุมที่ 2 ถึงหลุม 17 และโหลด *C. albicans* TISTR 5779 ในหลุมที่ 18 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ

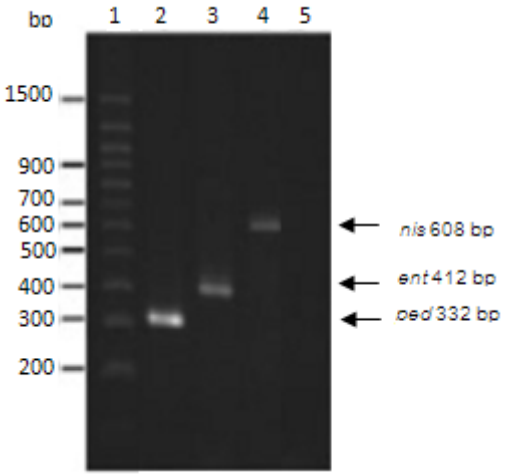


ภาพที่ 3.1 แถบดีเอ็นเอของ 100-bp ladder (35)

4.3) ทำ electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เวลาประมาณ 40 นาที หรือจนสีของ loading dye เคลื่อนที่ไป 2/3 ของเจล

4.4) เมื่อครบเวลาให้นำเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 5 นาที เพื่อย้อมดีเอ็นเอและล้างในน้ำกลั่น 5-10 นาที

4.5) บันทึกภาพผลการทดลองโดยใช้ gel documentation โดยใช้ *C. albicans* หรือน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 รูปแบบแถบยีนแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์จาก BCC ภายหลังจากการทำ PCR Lane 1: 100-bp ladder; lane 2: ยีนควบคุมการผลิต Pediocin ขนาด 332 bp จาก *Ped. pentosaceus* BCC38100 ; lane 3: ยีนควบคุมการผลิต Enterocinขนาด 412 bp จาก *Ent. faecium* BCC38124; lane 4: ยีนควบคุมการผลิต nisin ขนาด 608 bp จาก *L. lactis*BCC19567; lane 5: ตัวควบคุมผลลบจาก *C. albicans* ภายหลังจากทำ PCR (33)

3.2.4 การวัดระดับโคเลสเตอรอล (5)

1) การเตรียมกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอล

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอลที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 120 มก./มล. จากโคเลสเตอรอลเข้มข้น 181 มก./มล. เพื่อใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1.2) เตรียมโคเลสเตอรอลที่ใช้เป็นตัวควบคุมจากความเข้มข้น 128-173 มก./มล. โดยทำการเจือจางความเข้มข้นเป็น 30 เท่า

1.3) นำสารละลายโคเลสเตอรอลที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานและนำสารตัวควบคุมมาหาปริมาณโคเลสเตอรอลตามวิธีการของ Rudel and Morris (5) ดังมีรายละเอียดในข้อ 2)

1.4) นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ 550 นาโนเมตร (นม.) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟโคเลสเตอรอลมาตรฐาน แล้วนำสารละลายโคเลสเตอรอลที่ใช้เป็นควบคุมมาทดสอบความเชื่อถือโดยได้กราฟเส้นตรง

2) การวัดระดับโคเลสเตอรอล

2.1) การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนวัดระดับโคเลสเตอรอล

2.1.1) นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกมาจากข้อ 3.2.2 และ/หรือ 3.2.3

2.1.2) ปรับเทียบความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8CFU/ml ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นม. ให้มีค่า OD =0.5

2.1.3) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุดต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการลดลงของระดับโคเลสเตอรอล

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	MRS (มล.)	Cholesterol[1] (มล.)	สารแขวนลอย[2] แบคทีเรีย (มล.)
1.MRS	20	-	-
2.MRS+LAB	19	-	1
3.MRS+Cholesterol	18	2	-
4.MRS+Cholesterol+LAB	17	2	1
5. MRS+0.30 % oxgall	20	-	-
6. MRS+0.30 % oxgall+LAB	19	-	1
7.MRS+0.30 % oxgall+Cholesterol	18	2	-
8. MRS+0.30 % oxgall+Cholesterol+LAB	17	2	1

MRS, Mann Rogosa Sharpe; LAB Lactic acid bacteria

[1]: Cholesterol: horse serum, ความเข้มข้น 820 มค.ก./มล.

[2]: สารแขวนลอยแบคทีเรีย, ปริมาณเชื้อตั้งต้น 1.0 x 10^8 CFU/ml

2.1.4) บ่มที่ 37 $^{\circ}$ซ ใช้เวลา 20 ชม.

2.1.5) นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่ 4°ซ เวลา 15 นาที แล้วแยกนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและตัวเชื้อไปตรวจวัดระดับโคเลสเตอรอลในขั้นตอนต่อไป

2.2) ระดับโคเลสเตอรอลในน้ำเลี้ยงเชื้อ

2.2.1) นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาดรูผ่าน 0.45 มค.ม.

2.2.2) นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อในข้อ 2.2.1) ปริมาตร 1 มล.ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกก้นแหลมขนาดบรรจุ 50 มล. เติม 95 % ethanol ปริมาตร 6 มล. และเติม 50 % KOH ปริมาตร 4 มล. ผสมให้เข้ากัน

2.2.3) นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 °ซ เป็นเวลา 10 นาที

2.2.4) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเติม n-hexane ปริมาตร 10 มล.ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการแยกชั้น

2.2.5) ดูดสารละลายในชั้น n-hexane ปริมาตร 5 มล.ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25x150 มม. ที่สะอาดและแห้ง

2.2.6) ระเหย hexane ออก โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. หรือจนกว่าสารละลายระเหยหมด

2.2.7) เติม *o*-phthalaldehyde 0.5 มก. ละลายใน glacial acetic acid 1 มล. ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย จากนั้นดูดสารละลายมามาปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.2.8) เติม H_2SO_4 เข้มข้นปริมาตร 2 มล. โดยค่อยๆ ปล่อยสารลงข้างๆ หลอดและนำไป vortex ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.2.9) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอลในข้อที่1)

3.2.5 การทดสอบจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL (36)

1) นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบเขี่ยโคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวMRS บ่มที่อุณหภูมิ37 °ซ เป็นเวลา 72ชม.

2) เมื่อครบเวลานำมาปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ

3) เทน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้งให้เหลือตะกอนเซลล์ แล้วเติม 0.85% NaCl

4) นำมาปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซแล้วเทส่วนใสทิ้งทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูให้เหลือส่วนตะกอนเซลล์

5) นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาผสมกับ Bromocresol purple 10 มล.

6) นำส่วนผสมจากข้อ 5) มา 100 มค.ล.เติมลงในชุดทดสอบ API 50 CHL ทั้ง 50 หลุม แล้วหยด paraffin oil จำนวน 3-4 หยดปิดทับแต่ละหลุมการทดสอบ

7) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. โดยให้อ่านผลการทดสอบหลุมที่ให้สีเหลืองเป็นบวกและอ่านผลที่เวลา 24 ชม. และ 48 ชม.

8) นำผลการทดสอบไปวินิจฉัยแยกเชื้อด้วย ซอฟแวร์ API v.5.1

บทที่ 4
ผลการวิจัย

กลุ่มวิจัยศึกษาการลดลงของโคเลสเตอรอลในหลอดทดลอง โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่เก็บไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก รวมถึงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยนำมาคัดแยกและศึกษาสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น ได้แก่การย้อมแกรม การทดสอบคะตะเลส เพื่อพิสูจน์ยืนยันแบคทีเรียกรดแลคติกและการตรวจสอบการผลิตยีนแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และนำเชื้อที่คัดแยกได้มาศึกษาการลดลงของระดับโคเลสเตอรอลในหลอดทดลอง เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้ส่งเสริมสุขภาพหรือเกิดเป็นแนวทางนำไปใช้ร่วมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

4.1 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1.1 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

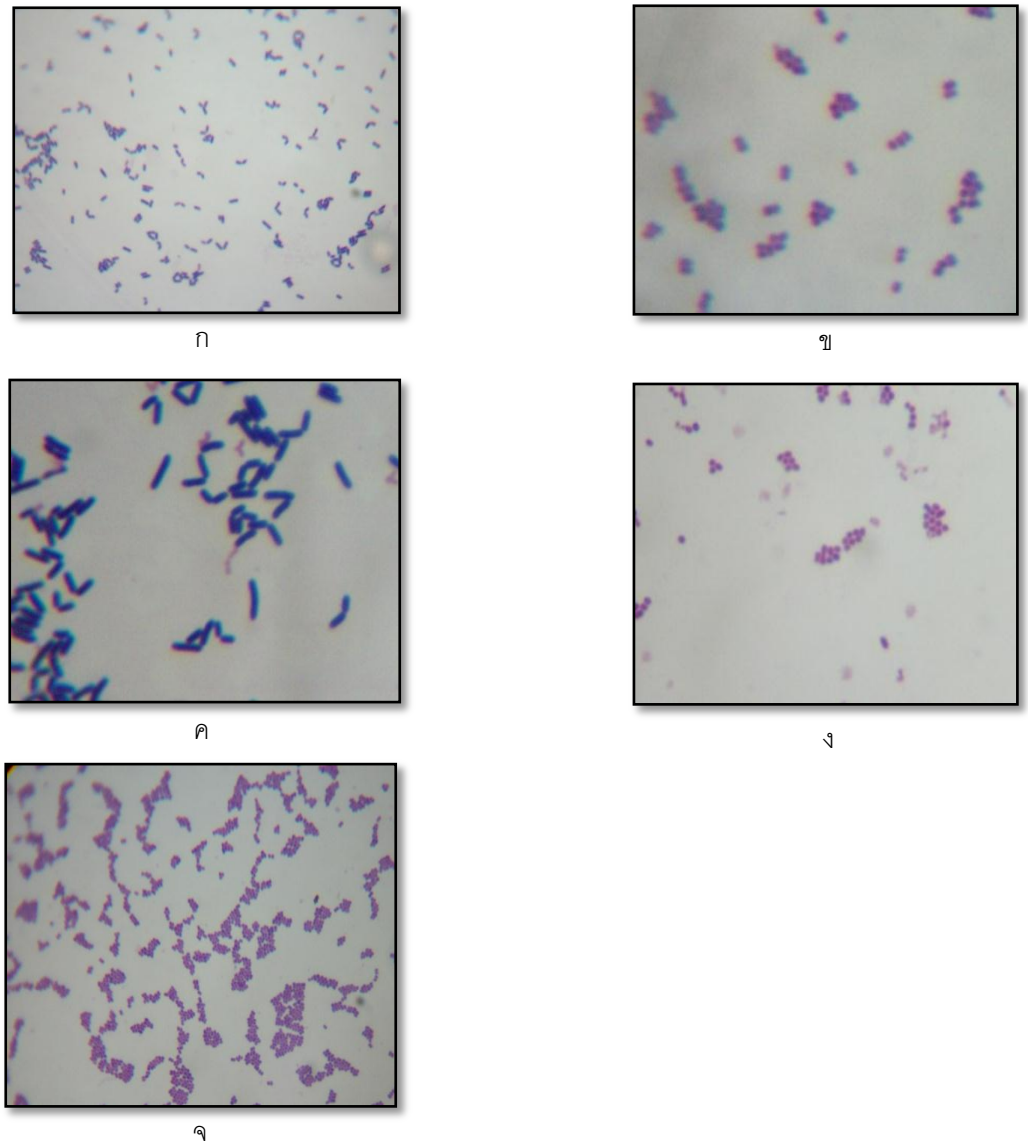
แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *Ped.acidilactici* L25 (L25), *Lact. plantrum*L26 (L26), *Ent. faecium* N15 (N15) และ *L. lactis* C3 (C3) จาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ ในตู้เย็นแช่แข็งซึ่งสามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชม. ให้ลักษณะโคโลนี กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1-2 มม. ยกเว้น N15 มีลักษณะโปร่งแสง เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มม. แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่นำมาศึกษาให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาย้อมติดสีแกรมบวกมีรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นสายโซ่ (cocci in chain) ได้แก่ C3 และ N15 รูปร่างกลมคู่สี่ (cocci in tetrad) ได้แก่ L25 และรูปแท่ง (bacilli) ได้แก่ L14/1 และ L26 ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

แบคทีเรียกรดแลคติก	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส*
L14/1	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
L25	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่สี่	ลบ
L26	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
N15	กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่	ลบ
C3	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่	ลบ

* ลบ, ไม่เกิดฟองก๊าซ



ภาพที่ 4.1 รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียกรดแลคติก *Ped.pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1) (ก), *Ped.acidilactici* L25 (L25) (ข), *Lact. plantarum* (L26) (ค), *Ent. faecium* N15 (N15) (ง) และ *L. lactis* C3 (C3) (จ)

4.1.2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจาก BCC

แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ*L. lactic*BCC19567, *Ped. pentosaceus* BCC38100, *Lact.plantarum* BCC47648 และ *Ent. faecium*BCC38124 ซึ่งสามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชม. ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากกลุ่มตัวอย่างได้แก่ BCC19567, BCC38100 และ BCC47648ให้ลักษณะโคโลนี กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1-2 มม. ยกเว้น BCC38124 ให้ลักษณะโคโลนี กลม

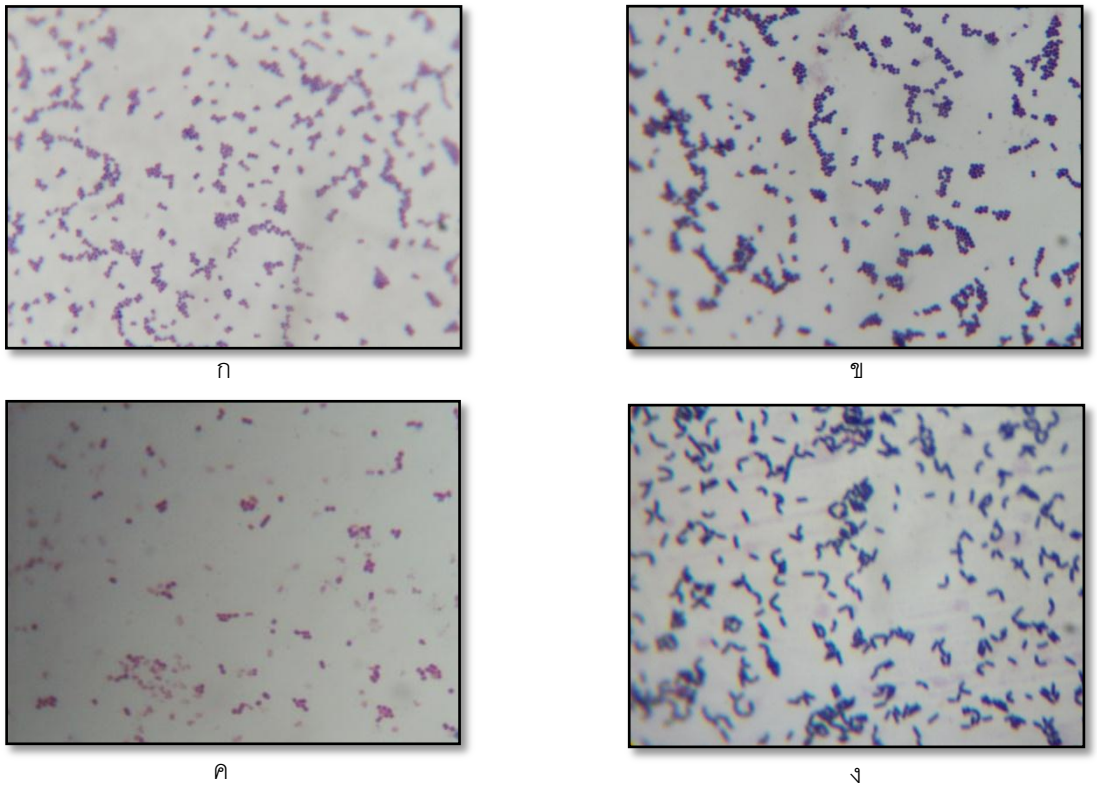
นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มม. แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่นำมาศึกษาให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาย้อมติดสีแกรมบวกมีรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ได้แก่ BCC19567 รูปร่างกลมเรียงตัวเป็นสายโซ่ (cocci in chain) ได้แก่ BCC38124 รูปร่างกลมคู่สี่ (cocci in tetrad) ได้แก่ BCC38100 รูปร่างแท่ง (bacilli) ได้แก่ BCC47648 ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกจาก BCC

แบคทีเรียกรดแลคติก	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส*
BCC19567	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น	ลบ
BCC38100	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่สี่	ลบ
BCC38124	กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่	ลบ
BCC47648	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ

* ลบ, ไม่เกิดฟองก๊าซ



ภาพที่ 4.2 รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. lactic* BCC19567 (ก), *Ped. pentosaceus* BCC38100 (ข), *Lact. plantarum* BCC47648 (ค) และ *Ent. faecium*BCC38124 (ง)

4.2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกจากกลุ่มตัวอย่าง

แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ขนมจีน มูลวัว ลำไส้ไก่ 1 ลำไส้ไก่ 2 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 1 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 2 นมเปรี้ยว และแหนมซึ่งสามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชม. ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากกลุ่มตัวอย่างได้แก่ มูลวัว ลำไส้ไก่ 2 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร1 นมเปรี้ยว และแหนม ให้ลักษณะโคโลนี กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1-2 มม. ส่วนจากตัวอย่างอาหารขนมจีน ลำไส้ไก่ 1 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 2 ให้ลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มม. แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่นำมาศึกษาให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

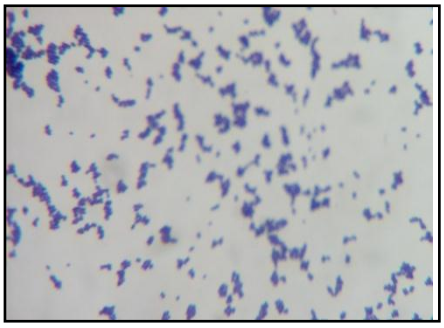
แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาย้อมติดสีแกรมบวกมีรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปร่างกลมคู่สี่ (cocci in tetrad) ได้แก่ มูลวัว และลำไส้ไก่2 และรูปแท่ง (bacilli) ได้แก่ ขนมจีน ลำไส้ไก่ 1ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร1 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร2 นมเปรี้ยว และแหนมดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกจากกลุ่มตัวอย่าง

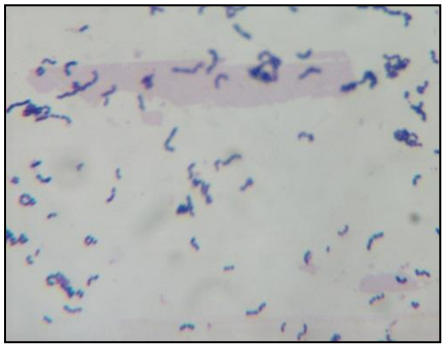
แบคทีเรียกรดแลคติก	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส*
ขนมจีน	กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
มูลวัว	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่สี่	ลบ
ลำไส้ไก่ (1)	กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
ลำไส้ไก่ (2)	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่สี่	ลบ
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร(1)	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร(2)	กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
นมเปรี้ยว	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ
แหนม	กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม.	แกรมบวก รูปท่อน	ลบ

* ลบ, ไม่เกิดฟองก๊าซ

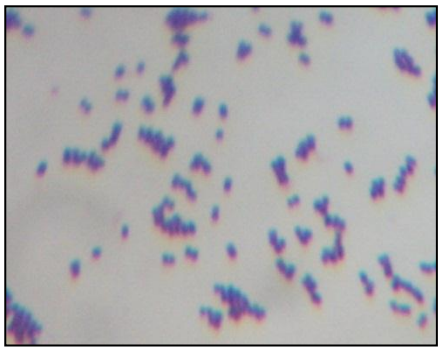
ก



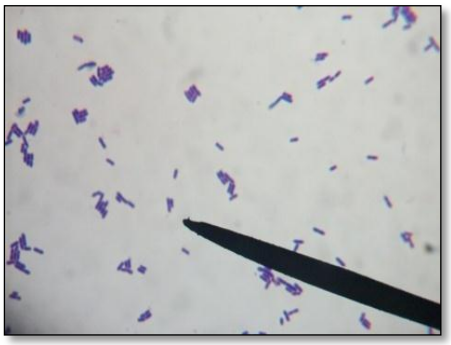
ข



ค

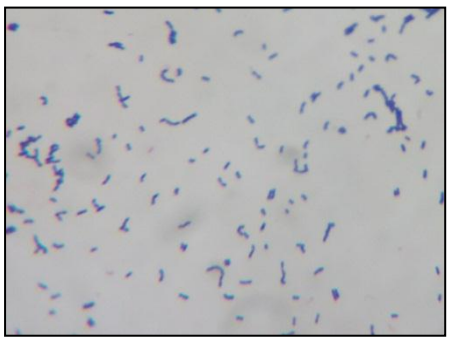


ง

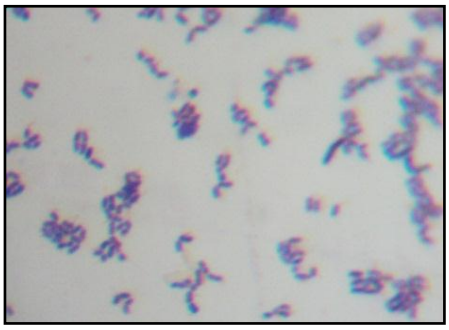


จ

ฉ



ช



ซ

ภาพที่ 4.3 รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากตัวอย่าง ขนมจีน (ก), มูลวัว (ข), ลำไส้ไก่ 1 (ค), ลำไส้ไก่ 2 (ง), ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 1 (จ), ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 2 (ฉ), นมเปรี้ยว (ช) และแหนม (ซ)

4.3 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารเสริมที่สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ชม.จากตารางที่ 4.4 สามารถนำข้อมูลการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API v.5.1 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL ผลปรากฏว่าทั้ง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 1 และ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 2 เป็น *Lact. pentosus* ทั้ง 2 ไอโซเลต โดยโอกาสเป็นไปได้เท่ากับ เท่ากับ 97.2% และ 80.5% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ ไอโซ-เลต โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL

หลุมที่	คาร์โบไฮเดรต	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 1		ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 2	
		บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.	บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.
0	Control	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+
5	Ribose	+	+	+	+
6	D-Xylose	+	+	+	+
7	L-Xylose	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-
9	β-methyl-D-xyloside	-	-	-	-
10	Galactose	+	+	+	+
11	Glucose	+	+	+	+
12	Fructose	+	+	+	+
13	Mannose	+	+	+	+
14	Sorbose	-	-	-	-
15	Rhamnose	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ ไอโซ-เลต โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (ต่อ)

หลุมที่	คาร์โบไฮเดรต	Probiotic 1		Probiotic 2	
		บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.	บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.
18	Mannitol	+	+	+	+
19	Sorbitol	+	+	+	+
20	Methyl-D-Mannoside	-	-	-	-
21	Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-
22	N-Acetyl-Glucosamine	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+
25	Esculin	-	-	-	-
26	Salicin	+	+	+	+
27	Cellubiose	+	+	+	+
28	Maltose	+	+	+	+
29	Lactose	+	+	+	+
30	Melibiose	+	+	-	+
31	Sucrose	+	+	+	+
32	Trehalose	+	+	-	+
33	Insulin	-	-	-	-
34	Melezitose	+	+	+	+
35	Raffinose	-	+	-	-
36	Starch	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-
39	Gentiobiose	+	+	-	+
40	D-Turanose	+	+	+	+
41	D-Lyxose	-	-	-	-
42	D-Tagalose	-	+	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-

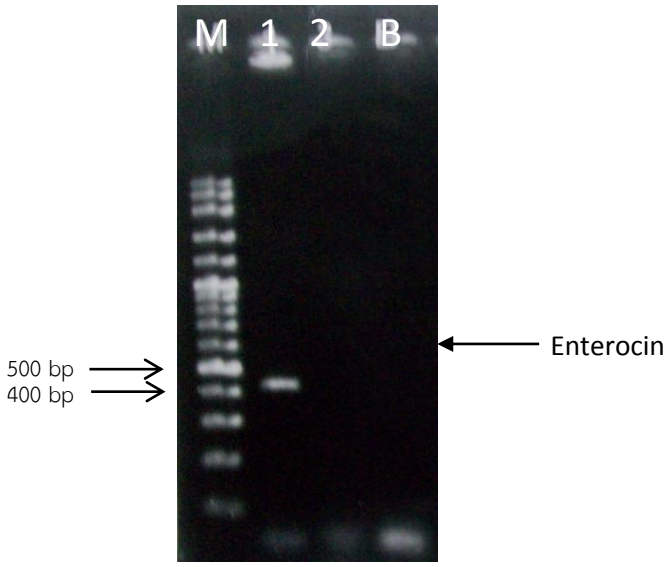
ตารางที่ 4.4 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ ไอโซ-เลต โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (ต่อ)

หลุมที่	คาร์โบไฮเดรต	Probiotic 1		Probiotic 2	
		บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.	บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.
44	L-Fucose	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-
47	Gluconate	-	-	-	-
48	2-Keto-gluconate	-	-	-	-
49	5-Keto-gluconate	-	-	-	-

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้, - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

4.4 การทดสอบหายีนแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาทั้งหมด มีเพียง *Ent. faecium* N15 (N15) ที่ตรวจพบยีนควยคุมการผลิต Enterocin ซึ่งมีขนาด 400-500 คู่เบส ดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบหายีนแบคเทอริโอซิน (Enterocin) ช่อง M คือ 100 bp ladder ช่อง 1 คือ *Ent. faecium* N15 (N15) ช่อง 2 คือ *C. albicans*TISTR 5779 และ ช่อง B คือ Blank

4.5 การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

จากการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหล่งจากธรรมชาติ ตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยจุดเชื้อลง (Replica test) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ใดเลยที่มีผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี

4.6 การลดโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่นำมาศึกษาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของซีรัมม้า (Horse serum) ที่ใช้เป็นแหล่งโคเลสเตอรอลปริมาณ 82 มค.ก./มล. เมื่อบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 20 ชม. ปรากฏว่าเมื่อนำมาวัดระดับโคเลสเตอรอลที่หลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS หลังจากบ่มเลี้ยงที่สภาวะดังกล่าวข้างต้น มีความแตกต่างกันออกไปแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาและจะเห็นได้ว่าในสภาวะที่เติมเกลือน้ำดี 0.30% oxgall ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จะมีการลดลงของโคเลสเตอรอลได้ดีกว่าในหลอดที่มีซีรัมม้าผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพียงอย่างเดียว โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ตั้งแต่ 24.04 ถึง 62.67 % และ N15 ลดระดับของโคเลสเตอรอลได้ดีที่สุด คือ 62.67% ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และตารางที่ 4.6 และความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลหลังจากการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี 0.30% oxgall และที่มีเกลือน้ำดี 0.30% oxgall เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ดังภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมต่างๆที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ (น้ำเลี้ยงเชื้อ) ในสภาวะที่มี 0.30% oxgall และไม่มี 0.30% oxgall เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

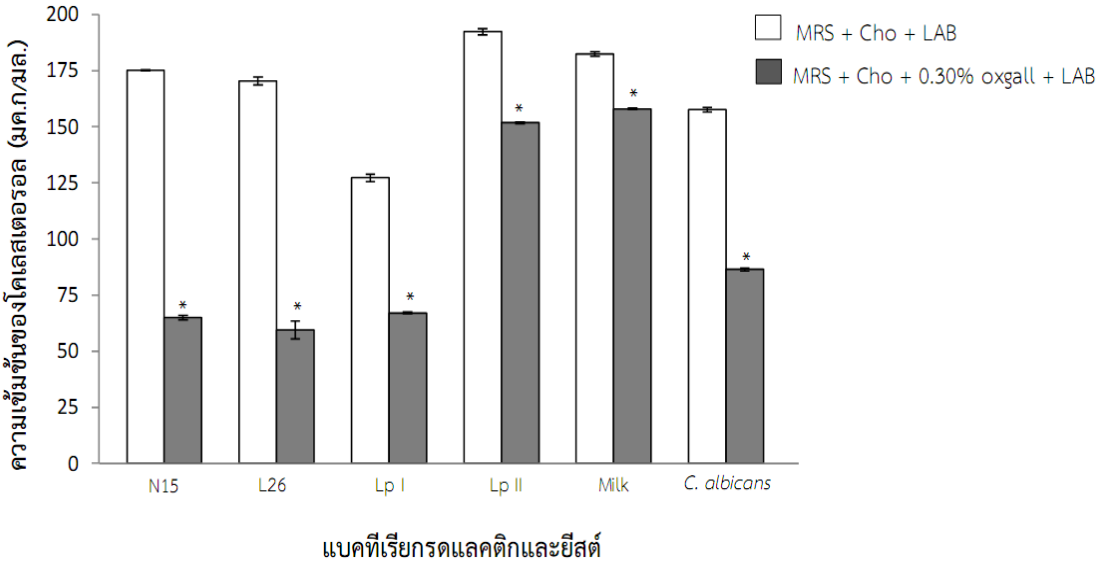
ลำดับ	เชื้อ	ความเข้มข้นของโคเลสเตอรอล(มค.ก/มล.)			
		MRS + Cho	MRS + Cho + LAB	MRS + 0.30% oxgall + Cho	MRS + 0.30% oxgall + Cho + LAB
1	N15	140.12 ± 0.17	175.12±0.17	173.81± 0.34	64.88±0.51
2	L26	178.10± 0.34	170.36± 0.84	159.64 0.17	59.52±2.02
3	*Lact. pentosus* I	196.19±0.00	127.26±0.84	123.21± 0.17	67.02± 0.17
4	*Lact. pentosus* II	205.36± 0.51	192.38± 0.67	119.17± 0.51	151.79± 0.17
5	LAB isolated from curd	150.24± 3.70	182.50± 0.51	207.98± 0.84	157.98± 0.17
6	*C. albicans*	160.48± 0.34	157.62±0.67	133.69± 0.51	86.43± 0.34

N15, *Ent. faecium* N15; L26, *Lact. plantarum*; Cho, Cholesterol; MRS, Mann Rogosa Sharpe; LAB, Lactic acid bacteria

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมต่างๆ ที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก 5 สายพันธุ์และยีส 1 สายพันธุ์ (น้ำเลี้ยงเชื้อ) ในสภาวะที่มี 0.30% oxgall เป็นเวลา 20 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

ลำดับ	**เชื้อ**	**% การลดลงของโคเลสเตอรอล**
1	N 15	62.67
2	L26	60.83
3	*Lact. pentosus* I	45.60
4	*Lact. pentosus* II	0
5	LAB isolated from curd	24.04
6	*C. albicans*	35.35

N15, *Ent. faecium* N15; L26, *Lact. Plantarum*



ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลหลังจากการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี oxgall (□) หรือที่มีเกลือน้ำดี oxgall 0.30% (■) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง; Mean ± 2SD; MRS, Mann Rogosa Sharpe; Cho, Cholesterol; LAB; Lactic acid bacteria; N15; *Enterococcus faecium* N15; L26, *Lactobacillus plantarum*; Lp I, *Lactobacillus pentosus*; Lp II, *Lactobacillus pentosus*; Milk, นมเปรี้ยว; * $p < 0.05$

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การพิสูจน์แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียทั้งหมดที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ จากเชื้อที่เก็บไว้ที่มหาลัยวลัยลักษณ์ได้แก่*Ped. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *Ped. acidilactici* L25 (L25), *Lact. plantarum* (L26), *Ent. faecium* N15 (N15) และ *L. lactis* C3 (C3) เชื้อจาก BIOTEC Culture collection (BCC) ได้แก่ *L. lactic* BCC19567*, Ped. pentosaceus* BCC38100,*Lact. plantarum* BCC47648และ *Ent. faecium* BCC38124และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารตัวอย่าง โดยเชื้อสามารถเจริญได้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกมีลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ ขาว ทึบแสง มันวาว แบคทีเรียกรดแลคติกทุกชนิดให้ผลลบกับการทดสอบคะตะเลส (29) ลักษณะภายใต้กล้องเป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างมีทั้งกลม ท่อน ท่อนเกือบกลม โดยจะมีการเรียงตัวที่แตกต่างกันออกไป เช่น เรียงตัวเป็นสายโซ่ (cocci in chain) ในกลุ่มของ *Lactococcus* กลมเป็นคู่สี่ (cocci in tetrad) ในกลุ่มของ*Pediococcus* ท่อนเกือบกลมหรือรูปไข่ (coccobacilli) ในกลุ่มของ*Enterococcus* (30)

5.2 การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเสริม พบเชื้อลักษณะ 2 แบบ ที่สามารถเจริญได้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก โดย Probiotic 1 มีลักษณะโคโลนี กลม นูน ขาว ขอบเรียบ ทึบแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม. และ Probiotic 2 มีลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ โปร่งแสง มันวาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม. เมื่อนำเชื้อมาทั้งสองมาทำการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ มีลักษณะภายใต้กล้องเป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปท่อน และทำการทดสอบจำแนกชนิดของเชื้อด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL kit (36) เมื่อทำการวิเคราะห์เชื้อจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร พบว่า Probiotic 1 และ Probiotic 2 มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Lact. pentosus*ทั้ง 2 ไอโซเลต โดยมีโอกาสเป็นไปได้ เท่ากับ 97.2% และ 80.5% ตามลำดับโดยเชื้อมีการใช้ชีวเคมี 25 ชนิด คือ L-Arabinose, Ribose, D-Xylose, Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, Mannitol, Sorbitol, N-Acetyl Glucosamine, Amygdalin, Arbulin, Esculin, Salicin, Cellubinose, Maltose, Lactose, Melibiose, Sucrose, Trehalose, Melezitose, Raffinose, Gentiobinose, D-Turanose และ D-Tagalose ซึ่งมีความสอดคล้องกับการแปลผลในคู่มือ หรือซอฟแวร์API v. 5.1

5.3 การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี

การทดสอบหาเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เนื่องจากกิจกรรมการย่อยน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการเผาผลาญโคเลสเตอรอลในคนและสัตว์ ซึ่งกระบวนการเมตาบอลิซึมของโคเลสเตอรอลพบว่า ผลสุดท้ายที่ได้คือ น้ำดีที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) เพื่อช่วยในการแตกตัวไขมันใน

ลำไส้ ทำให้น้ำย่อยไลเปสสามารถย่อยไขมันได้ และเพิ่มการดูดซึมไขมันในลำไส้ เอนไซม์ BSH สลายพันธะเอไมด์ของน้ำดีได้เป็น bile acid และกรดอะมิโน ส่งผลให้ปริมาณและคุณสมบัติการเป็นอิมัลติฟายเออร์ของน้ำดีลดลง ทำให้กระบวนการเผาผลาญโคเลสเตอรอลสูงขึ้น เพื่อเพิ่มการผลิตน้ำดี (38)มีการศึกษาพบว่าเกลือน้ำดีที่ถูกย่อยโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของคนที่มีระดับโคเลสเตอรอลสูงและช่วยป้องกันภาวะการมีระดับโคเลสเตอรอลสูงในคนปกติ (39)

มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลัสมีการผลิต BSH ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการสลายตัวของ glycine หรือ taurine ที่รวมตัวกับเกลือน้ำดี หรือทั้ง glycine และ taurine ที่รวมตัวกับเกลือน้ำดีที่เป็นส่วนหนึ่งกรดอะมิโนและเกลือน้ำดีอิสระ การแตกตัวของเกลือน้ำดีจะถูกขับออกมาในปริมาณมากของกรดน้ำดีอิสระในอุจจาระ ดังนั้นการทำลายกรดน้ำดีโดยแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลัสสามารถที่จะลดระดับคอเลสเตอรอลได้ (40) และจากการศึกษาของแบคทีเรียไบฟิโด พบว่าแบคทีเรียไบฟิโดทุกสายพันธุ์มีเอนไซม์ย่อยน้ำดี ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีเอนไซม์ย่อยน้ำดี (41) นอกจากนี้จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก *Lact. buchneri* ที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ BSH ของ *Lact. buchneri* ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยลดระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดที่เป็นปัจจัยเสี่ยงทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (1)

แบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างธรรมชาติ ได้แก่ตัวอย่างอาหาร ได้ถูกรายงานว่า โพรไบโอติกแลคโตบาซิลัส ที่มีอยู่ในนมเปรี้ยวมีผลช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ (42) และได้เพิ่มตัวอย่างจากธรรมชาติ คือ จากลำไส้ไก่ ซึ่งจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจากลำไส้ไก่ พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี (BSH) ซึ่งสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ (39) และได้ทำการศึกษาวิธีการตรวจหาเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีเชิงคุณภาพ โดยจากการศึกษาพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีพบว่า MRS ที่ผสมด้วย 0.5% TDCA จะให้ผลการตกตะกอนขาวรอบโคโลนีสำหรับเชื้อที่สร้าง BSH ได้ ด้วยวิธี Replica test (31) และจากการทดสอบด้วยวิธี Replica test พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดใดที่นำมาศึกษาสามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนส่วนผสมในอาหาร MRS ที่ผสม TDCA ที่ใช้ทดสอบเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี โดยการเติม 0.37g/L $CaCl_2$ (43) ด้วยวิธี spotting test จะมีความแตกต่างโดยเตรียมเชื้อหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้ $CaCl_2$ เป็นส่วนช่วยการตกตะกอนของเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี และจากการทำการทดสอบไม่พบเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีอาจเนื่องจากสภาวะที่ใช้บ่มเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถตรวจวัดได้ หรืออาจเกิดจากปริมาณเอนไซม์มีน้อยจึงไม่สามารถตรวจวัดด้วยวิธีเชิงคุณภาพได้ จึงได้ทำการศึกษาวิธีการทดสอบเชิงปริมาณหาเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี (1) แต่เนื่องจากทางกลุ่มไม่มีสารในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการเทียบกับปริมาณเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี จึงไม่ได้ทำการทดสอบในขั้นตอนนี้ ซึ่งหากมีการใช้สาร Taurodeoxycholic acid เป็นสารตั้งต้น ต้องใช้สาร Taurine เป็นสารในการเตรียมกราฟมาตรฐาน จึงควรใช้ Glycocholate เป็นสารตั้งต้น และต้องใช้สาร Glycine เป็นสารในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถหาสารมาตรฐานได้ง่ายกว่า (39)

5.4 การทดสอบตรวจหายีนแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีเพียง *Ent. faecium* N15 (N15) ที่ตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง Enterocin เมื่อทดสอบโดยวิธีอ้อมด้วยการใช้คู่ของ Primer ที่จำเพาะสำหรับ Enterocin (ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.2 ในบทที่ 3) ซึ่งเป็นแบคเทอโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Morovský และคณะ (1998) ได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Ent.faecium* BC25 สามารถสร้าง Enterocin BC25 ซึ่งเชื้อดังกล่าวแยกได้จากกระเพาะอาหารของวัว (27) และจากการรายงานของ Viola และคณะ (2007) ได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Ent.faecium* EF55 ที่แยกได้จากลำไส้ของไก่สามารถผลิต Enterocin ชนิด A และ P (37) และจากการศึกษาในครั้งนี้มีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นตรวจไม่เจอยีน Enterocin ซึ่งอันที่จริงแล้วแบคทีเรียที่นำมาศึกษาเคยถูกรายงานว่ามีการผลิต Enterocin อย่างไรก็ตามอาจมีความแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (33)

5.5 การลดลงของโคเลสเตอรอล

แบคทีเรียกรดแลคติกหลากหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนั่นคือกลุ่มจุลินทรีย์มีชีวิตเมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่พอเหมาะจะมีประโยชน์ต่อระบบขับถ่ายและสุขภาพของผู้บริโภค ปัจจุบันได้มีการศึกษาว่าแบคทีเรียกรดแลคติกโพรไบโอติกสามารถลดและกำจัดโคเลสเตอรอลได้ (5) ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรายงานว่าสามารถลดโคเลสเตอรอลได้แก่ *Lact.acidophilus*, *Lact. plantarum*, *B. bifidum*, *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*และ *Ent. Faecium* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ (44) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์จากนมหมัก เช่น นม เปรี้ยว โยเกิร์ต ไอศกรีม เนย และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้มีการรายงานว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลลงได้ โดยการลดลงของระดับโคเลสเตอรอล 1% สามารถลดอัตราเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจได้ 2-3% แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lact. Acidophilus* ATCC 43121 สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในหนูได้ นอกจากนี้ยังสามารถลด VLDL, IDL และ LDL ได้เช่นกัน (5) จากการศึกษาแบคทีเรีย *Ent. faecium* M-74 สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ 12% หลังจาก 56 สัปดาห์(45) และการการศึกษาให้หนูกิน isoXavone-supplemented soy โยเกิร์ตที่ผสมด้วย *Ent. faecium* สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลรวมและโคเลสเตอรอลที่ไม่ใช่ HDL (non-HDL cholesterol) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้กิน (44) จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอุจจาระของทารก และจาก*Lact. plantarum* A7 สามารถลดโคเลสเตอรอลรวมและไตรกลีเซอไรด์ในหนูได้แต่ไม่มีผลต่อ HDL-cholesterol (46) จากการศึกษาการลดลงของโคเลสเตอรอลในหลอดทดลองของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lact.plantarum* และ *Lact. paracasei* ที่คัดแยกได้จากเนย Italian Castelmagno PDO สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลลงได้ใน MRS broth โดยเฉพาะ *Lact.plantarum* ลดระดับโคเลสเตอรอลลงได้ 19.4% ส่วน *Lact. paracasei* ลดระดับโคเลสเตอรอลลงได้ 6.8% ผ่านกระบวนการดูดซับโดยส่วน

ของผนังเซลล์และกลไกการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี (5, 47) จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้คือ *Ent. faecium* (N15) สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Lact. plantarum* (L26), *Lact. pentosus* I, *Lact. pentosus* II และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากนมเปรี้ยว ตามลำดับ และกลไกที่ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลจากการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ 1) กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยการดูดซับ (absorb) ผ่านทางผนังเซลล์ peptidoglycan ของแบคทีเรีย ส่งผลให้โคเลสเตอรอลถูกลำไส้ดูดซึมได้ลดลงและจะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ (5, 44) 2) กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยแบคทีเรียจะนำโคเลสเตอรอลไปใช้ในกระบวนการเมเทบอลิซึม ส่วนกลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี (Bile salt hydrolase) เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่เข้าไปสลายการสังเคราะห์เกลือน้ำดี โดยจะตัดพันธะตรงตำแหน่งของกรดอะมิโน glycine และ/หรือ taurine ที่รวมตัวกับกรดน้ำดี ส่งผลให้เกลือน้ำดีไม่สามารถทำหน้าที่แตกตัวไขมันเพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมอาหารประเภทไขมันได้ ทำให้มีการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่ลำไส้ลดลงและขับโคเลสเตอรอลออกมาในรูปของกรดน้ำดีพร้อมกับอุจจาระ จากการศึกษาในครั้งนี้แบคทีเรียไม่ได้ใช้กลไกของเอนไซม์ BSH ใช้เพียงกลไกการดูดซับและกลไกการนำโคเลสเตอรอลไปใช้ในกระบวนการเมเทบอลิซึม โดยแบคทีเรียกรดแลคติกรูปท่อนสามารถลดโคเลสเตอรอลได้ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกรูปกลมอาจเกี่ยวกับพื้นที่ผิวในการสัมผัสโคเลสเตอรอลมากกว่า ในการศึกษาการลดลงของโคเลสเตอรอลจะใช้ซีรัมม้า โดยในบางสภาวะของการเตรียมสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของโคเลสเตอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอาจทำให้มีตะกอนของโคเลสเตอรอลได้ และการใช้ซีรัมม้าเป็นแหล่งโคเลสเตอรอลอาจทำให้มีผลรวมของโคเลสเตอรอลสูงเกินกว่าค่าจริงที่เติมลงไป เพราะเป็นส่วนผสมของ LDL, VLDL, IDL, HDL และ TG ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านของน้ำหนักโมเลกุลและมีผลทำให้เกิดตะกอนของโคเลสเตอรอลเมื่อผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และจะเห็นได้ว่า *C. albicans* สามารถลดโคเลสเตอรอลได้เช่นกัน อาจเนื่องมาจากขนาดที่ใหญ่ของ *C. albicans* จึงมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสโคเลสเตอรอลได้มากอาจใช้กลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยการดูดซับ (absorb) ผ่านทางผนังเซลล์ chitin ซึ่งอาจเทียบเคียงว่าอาจคล้ายกับแบคทีเรีย ซึ่งกลไกการลดโคเลสเตอรอลที่ได้กล่าวมาได้มีการกล่าวถึงในงานวิจัยหลายฉบับที่ผ่านมา ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาการลดระดับโคเลสเตอรอลโดยผ่านกลไกการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดี และควรจะมีการศึกษาในสัตว์ทดลองร่วมด้วย โดยคาดว่าน่าจะมีประโยชน์ในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการลดระดับโคเลสเตอรอลไปใช้การพัฒนาอาหารเพื่อส่งเสริมสุขภาพหรือเกิดเป็นแนวทางนำไปใช้ร่วมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดเพื่อป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งและ/หรือช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรค เพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* (N15), *Lact. plantarum* (L26), *Lact. pentosus* I, *Lact. pentosus* II และแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากนมเปรี้ยว พบว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ได้ทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะ *Ent. faecium* (N15) สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ดีที่สุด และมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกโดยตรวจพบยีนที่ควบคุมการผลิตEnterocin ได้ อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีถือเป็นสมบัติหนึ่งในการเป็นโพรไบโอติก และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.30 % oxgall ได้ และแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีหรือไม่มีเกลือน้ำดี oxgall ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้เป็นสิ่งพิสูจน์ได้ถึงความสามารถลดโคเลสเตอรอลของแบคทีเรียกรดแลคติก และอาจนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้เพื่อส่งเสริมสุขภาพและ/หรือเกิดเป็นแนวทางนำไปใช้ร่วมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดเพื่อป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งและ/หรือช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรค เพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Sridevi N, Vishwe P, Prabhune A. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. **Food Res Int** 2009; 42(4): 516-20.
2. Jungae J, Sukyung K, Sung YC, Hee JJ, Hyun PJ, Jae SG, et al. Hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C56BL/6 mice. **Nutrition** 2010; 26(3): 321-30.
3. **โรคหลอดเลือดหัวใจ** [ออนไลน์] 2004-2012 [อ้างเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2555] จาก http://www.vibhavadi.com/web/health_detail.php?id=105
4. **โรคหลอดเลือดหัวใจ**[ออนไลน์] 2009 [อ้างเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2555] จาก http://www.thaitravelhealth.com/blog/archives/1673
5. Lye H, Rahmat-Ali GR, Liong M. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract.**Int Dairy J** 2010; 20(3): 169-75.
6. มาลีจิรวงศ์ศรี. เอกสารแนบท้าย การพิจารณา การอนุญาต การกล่าวอ้างทางสุขภาพของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร. **คำสั่งสำนักคณะกรรมการอาหารและยา**. 2551; 403: 1-3
7. **Probiotic defense by NOWfood N-R** [ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 14 พฤศจิกายน 2555] จาก http://www.cheapshop.in.th/product.detail_600529_th_2966618
8. Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Appl Environ Microbiol** 2006; 72(3): 1729-38.
9. อรอนงค์ พริ้งสกุล. แบคทีรีโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติค. **วารสารวิทยาศาสตร์มศว**2007; 23(2): 145-60.
10. **สมบัติโพรไบโอติก** [ออนไลน์] 2009 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://www.krabork.com/2009/11/11
11. **คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก** [ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 14 พฤศจิกายน 2555] จากhttp://www.bicchemical.com/index.php
12. เกริกวุฒิ รุ่งอมรชัย, สุชาริณี เที่ยงแท้. การคัดแยกและการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากลำไส้เป็ด.**ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจาคุณทหารลาดกระบัง**. 2551: 3-4.
13. **ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลกติก**[ออนไลน์] 2010 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://paemmy-paemmy.blogspot.com/2010/01/blog-post_29.html
14. **แบคทีเรียแลคติกกับโพรไบโอติก**[ออนไลน์] 2010 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://www.noknoi.com/magazine/series.php?id=2154

15. **แลกติคแอสิดแบคทีเรีย**[ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://wiratchanee.wordpress.com/lactic-acid-bacteria/
16. **แบคทีเรียแลคติก**[ออนไลน์] 2010 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://www.siamvitamins.com/article-th-77677.
17. **โพรไบโอติก**[ออนไลน์] 2009 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://www.raksukhapap.com/probiotic.html.
18. อุทัย เก้าเอี้ยน.โพรไบโอติก. **สงขลานครินทร์เวชสาร** 2549; 24:315-23.
19. **โพรไบโอติก** [ออนไลน์] 2010 [อ้างเมื่อ 10 กรกฎาคม 2555] จาก http://www.foodindustrythailand.com/v17/index.
20. **Cholesterol** [ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 12กรกฎาคม 2555] จาก http://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol.
21. **คอเลสเตอรอล** [ออนไลน์] 2009 [อ้างเมื่อ 12กรกฎาคม 2555] จาก http://th.wikipedia.org/wiki/คอเลสเตอรอล.
22. **เกลือน้ำดี**[ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 12กรกฎาคม 2555] จากwww.si.mahidol.ac.th/บทที่17_หน้าที่ของตับ
23. สิรินดา ยุ่นฉลาด, กาญจนา นนทะเสน. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถใช้แทนสารกันบูดในผลิตภัณฑ์อาหาร. **วารสารศูนย์บริการวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น** 2554; 19(1):4-10.
24. **เอนไซม์ย่อยน้ำดี**[ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 12 กรกฎาคม 2555] จาก www.si.mahidol.ac.th/.../home/.../บทที่9_เมตะบอลิสมของไลปิด
25. Corzo G, Gilland SE. Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated of bile salt.**J Dairy Sci**1999; 8: 487-90.
26. Djouvinov D, Boicheva S, Simeonova T, Vlaikova T. Effect of feeding Lactinaprobiotic on performance some blood parameters and caecal microflora of mule ducklings. **Trakia J Sci**2005; 3(2): 22-8.
27. Morovský M, Pristaš P, Czikková S, Javorský P. A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* BC25 against ruminal Streptococcus bovis. **Microbiol Res** 1998; 153(3): 277-81.
28. Morovský M, Pristaš P, Javorský P, Nes IF, Holo H. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the ent A gene among ruminal Gram-positive cocci. **Microbiol Res** 2001;156(2):133-8.
29. **การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus*จากแหนมที่มีแนวโน้มสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในลำไส้มนุษย์**[ออนไลน์]2550 [อ้างเมื่อ 8 มีนาคม 2555] จากhttp://sci.bsru.ac.th/dept/bio/picnew/tum.doc

30. *มีชัย ลัดดี.***การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก** [ออนไลน์]2552 [อ้างเมื่อ 8 มีนาคม 2555] จาก http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/2.php
31. Michael P, Scott D. Development of a Differential Medium for Bile Salt Hydrolase-Active *Lactobacillus* spp. **Appl Environ Microbiol** 1989; 55(1): 11-6.
32. Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibushi M, Karunasagar I, Karunasagar I. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. **Lett Appl Microbiol**2003; 36(6): 423-7.
33. Suwanjinda D, Eames C, Panbangred W. Screening of Lactic Acid Bacteria for Bacteriocin by Microbiological and PCR Methods. **Biochem Mol Biol Educ**2007; 35(5):364-9.
34. Kim YB, Okada J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibushi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. **J Clin Microbiol** 1999; 37(4): 1173-7.
35. **RiboReady 100bp RNA ladder** [ออนไลน์] 2551 [อ้างเมื่อ 16 มีนาคม 2555] จาก http://www.gibthai.com/pro/highlight_detail.php?pro_id=32
36. **API 50 CHL**[ออนไลน์] 2012 [อ้างเมื่อ 18 พฤศจิกายน 2555] จาก http://www.biomerieux-usa.com/
37. Viola S, Andrea L. *In vitro* study on bacteriocin production of Enterococci associated with chicken**. Anaerobe** 2007; 13: 228-37.
38. Cole, C B, R Fuller. Bile acid deconjugation and attachment of chicken gut bacteria: their possible role in growth depression. **Brit Poultry Sci** 1984; 25: 227-31.
39. ปริยดา ตั๋นจักร. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก. **ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. 2550: 3-10.
40. Nguyen, Kang, Lee.Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **Int J Food Microb**2007; 113: 358–61.
41. Tanaka, Doesburg K, Iwasaki I, Mierau I. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity.**J Daily Sci** 1999; 82: 2530-5.
42. Chiu, Tseng Y. The effects of Lactobacillus fermented milkon lipid metabolism in hamsters fed on high cholesterol diet. **App Microb Phys** 2005; 71: 238–45.

43. Schillinger U, Guigas C, Holzapfel WH.*In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt like products.**Int Dairy J** 2005; 15: 1289–97.
44. Rossi EA, Cavallini DCU, Carlos IZ, Vendramini RC, Dâmaso AR, Valdez GFD. Intake of isoXavone-supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. **Eur Food Res Technol** 2008; 228: 275–82.
45. Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z.One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. **Bratisl Lek Listy** 2005;106(2):67-72.
46. Fazeli H, Moshtaghian J, Mirlohi M, Shirzadi M. Reduction in serum lipid parameters by incorporation of a native strain of *Lactobacillus plantarum* A7 in Mice. **Iran J Diabetes Lipid Disorder** 2010; 9: 1-7.
47. Belviso S, Giordano M, Dolci P, Zeppa G.*In vitro* cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. **Dairy Sci Technol** 2009; 89 (2): 169-76.
48. จีรศักดิ์ ญาติรักษ์, วิชญาพร ยืนยั่ง, วีรยา เพ็งช่วย, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล**. การศึกษาการลดระดับของโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแมนโรโกซ่าชาร์ปในหลอดทดลองโดยแบคทีเรียกรดแลคติก.**การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37; 10 ตุลาคม 2554;กรุงเทพมหานคร.
49. **MRS agar** [ออนไลน์] 2011 [อ้างเมื่อ 3 ธันวาคม 2555] จาก http://th.wikipedia.org/wiki/MRS_agar/

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS broth (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม:ชั่ง MRS broth 52.2 ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ล. ผสมให้เข้ากัน ดูดแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

2. MRS agar (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม: ชั่ง MRS broth 5.22 ก. และชั่งผงวุ้น 1.8 ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

3. MRS agar + 0.5% TDCA (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม : ชั่ง MRS broth 5.22 ก. ผงวุ้น 1.8 ก. และชั่ง TDCA 0.5 ก. ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

4. MRS agar + 0.5% TDCA + 0.037% $CaCl_2$ (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม: ชั่ง MRS broth 5.22 ก. ผงวุ้น 1.8 ก. TDCA 0.5 ก. และ $CaCl_2$ 0.037 ก.ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 0.85% NaCl (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม : ละลาย NaCl ปริมาตร 6.8 ก. ในน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 800 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

2. การเตรียม 95% ethanol (Merck, Germany) **(ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)**

วิธีการเตรียม : ต้องการเตรียม 95% ethanol ใช้**จากความเข้มข้น 99.8%** ปริมาตร 60 มล. โดยตวง ethanol ปริมาตร 57.11 มล. ในน้ำกลั่น 2.89 มล. ผสมให้เข้ากัน

3. การเตรียม 50% KOH (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม: ชั่ง KOH 50 ก. ในน้ำกลั่น 100 มล. ผสมให้เข้ากัน

4. การเตรียม O-phthaldi-aldehyde (Merck, Germany)

วิธีการเตรียม: ชั่ง O-phthaldi-aldehyde (Merck, Germany) 0.5 มค.ก. ใน Glacial acetic acid 1 มล. (Lab-scan,Thailand) ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข
การย้อมแกรมและการทดสอบคะตะเลส

การย้อมสีแกรม

การย้องสีแกรม เป็นวิธีการเบื้องต้นที่สำคัญในการวิเคราะห์จำแนกแบคทีเรีย การย้อมแกรมวิธีนี้ใช้การย้อมแกรมสองสี แต่เซลล์แบคทีเรียจะติดสีย้อมเพียงสีเดียวเท่านั้น จึงทำให้เห็นความแตกต่างของแบคทีเรียที่นำมาศึกษาได้ อย่างไรก็ตามการที่จะนำแบคทีเรียมาย้อมแกรมควรจะทำให้อยู่ในรูปเชื้อบริสุทธิ์

ส่วนประกอบของชุดสีย้อม

1. Crystal violet
2. Gram iodine
3. 95% ethyl alcohol
4. Safranin

วิธีการย้อม

1. เกลี่ย (smear) เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการย้อมลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อ fix เชื้อให้ติดกับสไลด์
2. หยด Crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำเบา
3. หยด Gram iodine บนสไลด์นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ
4. หยด 95% ethyl alcohol บนสไลด์นาน 30 วินาที หรือเมื่อสีหมด ล้างด้วยน้ำ
5. หยด Safranin บนสไลด์นาน 15-30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำ ซับให้แห้ง แล้วจึงมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ ข1ลักษณะการเปลี่ยนแปลงระหว่างการย้อมแกรมของแบคทีเรีย

สีและสารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	**แบคทีเรียแกรมลบ**
1. Ammonium oxalase crystal violet	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. Gram iodine	สารละลายไอโอดีนรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง	สารละลายไอโอดีนรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง
3. Acetone-alcohol decolorizer	ไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์สูญเสียน้ำ จึงเกิดการเหี่ยวหรือหดตัว ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดเล็ก สารประกอบของสี ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกมาได้ เซลล์จึงติดสีม่วง	สารพวกลิปิดที่ผนังเซลล์
4. Safranin	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีนี้เซลล์ติดสีม่วงตามเดิม	เซลล์ติดสีแดงของ Safranin

หลักเกณฑ์ในการย้อมแกรม

1. เซลล์ปกติ (Vegetative cell) เท่านั้นที่ติดสีแกรมบวกหรือแกรมลบ แต่ถ้าเซลล์เกิดแตกขึ้นมาจะติดสีเฉพาะแกรมลบเท่านั้น

2. การย้อมแกรมต้องใช้ Crystal violet และสารละลายไอโอดีนเสมอ

3. แบคทีเรียเท่านั้นที่ให้ผลต่างกันในการย้อมแกรม แต่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆจะติดสีย้อมแกรมอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น เซลล์ยีสต์จะติดสีแกรมบวก

4. การย้อมสีแกรมสามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแกรมลบได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมลบเป็นแกรมบวกได้

5. ไซโตพลาสซึมติดสีแกรมลบเท่านั้น

6. แบคทีเรียแกรมบวกถูกล้างสียากกว่าแกรมลบ

7. สปอร์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature endospore) จะติดสีแกรมบวก ส่วนสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (mature endospore) ไม่ติดสีแกรม

การทดสอบคะตะเลส

หลักการ

ทดสอบความสามารถในการสร้าง enzyme catalase ซึ่งแบคทีเรียสร้างขึ้นมาเพื่อย่อยสลาย H_2O_2 ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์

การใช้งาน

3% H_2O_2ใช้แยก *staphylococcus* ซึ่งให้ผลการทดสอบ catalase positive ออกจาก *streptococcus* ซึ่งให้ผลการทดสอบ catalase negative และแบคทีเรียกรดแลคติกให้ผลการทดสอบ catalase negative

30% H_2O_2 ใช้แยก *Neisseria gonorrhoese* ซึ่งให้ผลการทดสอบ catalase positive ออกจาก *neisseria meningitidis*

การทดสอบ

1. ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อแล้วแตะลงบนสไลด์ที่สะอาด
2. หยด H_2O_2ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์

การอ่านผล

Positive: มีฟองเกิดขึ้นทันที

Negative: ไม่มีฟองเกิดขึ้น

ภาคผนวก ค
การเตรียมกราฟมาตรฐานโคเลสเตอรอล

1. เตรียม stock calibrator ของโคเลสเตอรอล (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

1.1 Stock calibrator เข้มข้น 120 มค.ก./มล. (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

ดูด Stock calibrator เข้มข้น 181 มค.ก./มล. ปริมาตร 663 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 337 มล.

1.2 Stock calibrator เข้มข้น 100 มค.ก./มล. (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

ดูด Stock calibrator เข้มข้น 181 มค.ก./มล. ปริมาตร 552 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 448 มล.

1.3 Stock calibrator เข้มข้น 80 มค.ก./มล. (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

ดูด Stock calibrator เข้มข้น 181 มค.ก./มล. ปริมาตร 442 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 558 มล.

1.4 Stock calibrator เข้มข้น 60 มค.ก./มล. (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

ดูด Stock calibrator เข้มข้น 181 มค.ก./มล. ปริมาตร 331 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 669 มล.

1.5 Stock calibrator เข้มข้น 40 มค.ก./มล. (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

ดูด Stock calibrator เข้มข้น 181 มค.ก./มล. ปริมาตร 221 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 779 มล.

1.6 Stock calibrator เข้มข้น 20 มค.ก./มล. (ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

ดูด Stock calibrator เข้มข้น 181 มค.ก./มล. ปริมาตร 110 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 890 มล.

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ข้อมูล

1) One-Way ANOVA ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ชนิดและยีสต์ 1ชนิด
2) Independent t-test ใช้ในการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ชนิดเดียวกัน

ตารางที่ ฉ1 ผลการทดสอบ ANOVA เพื่อบอกความแตกต่างในการลดระดับโคเลสเตอรอลที่ไม่มีเกลือน้ำดี oxgall (0%) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ANOVA

Cholesterol without oxgall

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5253.968	5	1050.794	2.411E3	.000
Within Groups	2.615	6	.436		
Total	5256.583	11			

ตารางที่ ฉ2ผลการทดสอบ ANOVA เพื่อบอกความแตกต่างในการลดระดับโคเลสเตอรอลที่มีเกลือน้ำดี oxgall (0.30%) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ANOVA

Cholesterol with oxgall

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20321.401	5	4064.280	5.375E3	.000
Within Groups	4.537	6	.756		
Total	20325.938	11			

ตารางที่ ฉ3 ผลการทดสอบ Independent t-test เพื่อบอกความแตกต่างในการลดระดับโคเลสเตอรอลที่ไม่มีเกลือน้ำดี oxgall (0%)และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%)

เปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี Oxgall (0%) และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%) ของ *Ent. faecium* N15 (N15) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Reduction	Equal variances assumed	1.165E16	.000	292.827	2	.000	110.23810	.37646	108.61831	111.85788
	Equal variances not assumed			292.827	1.220	.001	110.23810	.37646	107.07807	113.39812

เปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี Oxgall (0%) และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%) ของ *L. lactic* ssp. *lactis*1 L26 (L26) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Reduc	Equal variances assumed	8.054E15	.000	71.615	2	.000	110.83333	1.54762	104.17447	117.49220
	Equal variances not assumed			71.615	1.337	.002	110.83333	1.54762	99.75409	121.91257

เปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี Oxgall (0%) และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%) ของ *Lact. pentosus* I ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Reduc	Equal variances assumed	1.297E16	.000	99.235	2	.000	60.23810	.60703	57.62627	62.84992
	Equal variances not assumed			99.235	1.080	.005	60.23810	.60703	53.75081	66.72538

เปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี Oxgall (0%) และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%) ของ *Lact. pentosus* II ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Reduc	Equal variances assumed	1.268E16	.000	82.705	2	.000	40.59524	.49085	38.48330	42.70718
	Equal variances not assumed			82.705	1.125	.005	40.59524	.49085	35.77539	45.41509

เปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี Oxgall (0%) และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากนมเปรี้ยวดัชมิลค์ ดีไลท์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Reduc	Equal variances assumed	1.546E17	.000	65.143	2	.000	24.52381	.37646	22.90403	26.14359
	Equal variances not assumed			65.143	1.220	.004	24.52381	.37646	21.36378	27.68384

เปรียบเทียบความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีเกลือน้ำดี Oxgall (0%) และมีเกลือน้ำดี Oxgall (0.30%) ของ *C. albicans* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Reduc	Equal variances assumed	1.130E16	.000	132.655	2	.000	71.19000	.53666	68.88095	73.49905
	Equal variances not assumed			132.655	1.471	.001	71.19000	.53666	67.86911	74.51089

ภาคผนวก จ
การเผยแพร่ผลงานวิจัย