



การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก  
สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก  
**Selection and Characterisation of Local Lactic Acid Bacteria  
Isolates for Using as Probiotics**

มณฑล เลิศคณาวณิชกุล  
จิราพร เจริญพูล  
วรารัณ จุ่งลก

มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก  
สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

มณฑล เลิศคนาวนิชกุล

จิราพร เจริญพูล

วรางคณา จุ่งลก

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนเงินทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่งกลาง ปี พ.ศ. 2550 แก่คณะผู้วิจัย และขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์บางส่วนและเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ** : RSA5080008

**ชื่อโครงการ** : การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

**ชื่อนักวิจัย** : นายมณฑล เลิศคณาวณิชกุล  
 สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
 วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

: นางสาวจิราพร เจริญพูล  
 สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
 วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

: นางสาววรางคณาจุงลัก  
 สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
 วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

**E-mail address** : lmonthon@wu.ac.th, monthon\_55@yahoo.com  
 jjirapor@wu.ac.th  
 cwarang@wu.ac.th

**ระยะเวลาโครงการ** : กรกฎาคม 2550 – กรกฎาคม 2553

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 76 ไอโซเลทจากอาหารหมักชนิดต่างๆ โดยการใช้วิธี Dual-culture agar plate เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นในการคัดเลือกคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* และเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR050 มีการผลิตเอนไซม์โคติเนสจากยีนยีนโคติเนสลูกผสมและแสดงฤทธิ์ร่วมกับสารเมตาบอไลต์จากเชื้อทำลาย *Micrococcus luteus* ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมรวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสและสเตรปโตมัยซีที่ออกฤทธิ์ต้าน

แบคทีเรียตัวนี้คือยา และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตมัยซีทสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสมีฤทธิ์ในการสมานแผลได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางส่วนที่คัดเลือกได้สามารถกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันได้

**คำหลัก :** บาซิลลัส แบคทีเรียกรดแลคติก โปรไบโอติก สเตรปโตมัยซีท ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

## Abstract

---

- Project Code** : RSA5080008
- Project Title** : Selection and Characterisation of Local Lactic Acid Bacteria Isolates for Using as Probiotics
- Investigator** : Mr. Monthon Lertcanawanichakul  
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,  
Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- : Miss Jiraporn Jaroenpool  
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,  
Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- : Miss Warahgchana Chunklok  
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,  
Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- E-mail address** : lmonthon@wu.ac.th, monthon\_55@yahoo.com  
jjirapor@wu.ac.th  
cwarang@wu.ac.th
- Project Period** : July 2007 – July 2010

The seventy-six isolates of lactic acid bacteria (LAB) were obtained from various fermented foods. Dual-culture agar plate assay used as preliminary screening of antimicrobial activity spectrum. LAB were isolated by selective medium, MRS. Most of the isolates revealed anti-microbial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. Interestingly, *Lactobacillus plantarum* TISTR050 could produce chitinase enzyme that encoding on the recombinant chitinase gene. It showed more synergistically effect against *Micrococcus luteus*. The screening of LAB and other

bacterial groups (*Bacillus* and *Streptomyces*) was further study to obtain antibiotic-producing bacterial strains. The metabolites obtained from LAB and *Streptomyces* could inhibit growth of colon cancer and oral cancer cell line, respectively. *Bacillus* metabolic products revealed wound healing properties. Moreover, some of selected LAB showed immunomodulating activity.

**Keywords :** *Bacillus*, Lactic acid bacteria, Probiotic, *Streptomyces*, Antimicrobial activity, Anticancer activity, Immunomodulating activity

## สารบัญ

|                                                                                                                        | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย) .....                                                                                               | i    |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) .....                                                                                            | iii  |
| สารบัญตาราง .....                                                                                                      | viii |
| สารบัญภาพ .....                                                                                                        | ix   |
| สารบัญคำย่อ .....                                                                                                      | xi   |
| <b>บทที่</b>                                                                                                           |      |
| 1. บทนำ .....                                                                                                          | 1    |
| 2. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย                                                                                      |      |
| 1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                         | 6    |
| 2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนส .....                                                                             | 11   |
| 3. รายละเอียดเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของจีน .....                                                                  | 13   |
| 4. รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อและ การปรับ<br>สภาวะภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ ..... | 14   |
| 5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา .....                                                                              | 17   |
| 3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง                                                                                   |      |
| 1. วัสดุอุปกรณ์                                                                                                        |      |
| I. เกี่ยวกับการคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์ .....                                                                   | 23   |
| II. เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน .....                                                           | 36   |
| 2. วิธีดำเนินการทดลอง                                                                                                  |      |
| I. เกี่ยวกับการคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์                                                                         |      |
| I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                        | 25   |
| II. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV .....                                                                                   | 32   |
| III. การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                  | 32   |
| II. เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน                                                                 |      |
| I. การทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย<br>กรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2-cell) .....      | 39   |
| II. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรีย<br>กรดแลคติกโดยวิธี Cravioto's adapted method .....     | 45   |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่                                                                                                                    | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| III. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส .....                        | 47   |
| IV. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส .....                                  | 53   |
| V. ศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซีทต่อเซลล์มะเร็ง .....                              | 55   |
| VI. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน .....                                                                                        | 56   |
| <b>4. ผลการทดลอง</b>                                                                                                     |      |
| I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                          | 59   |
| II. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV .....                                                                                     | 61   |
| III. ผลการถ่ายยีนโคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                  | 62   |
| IV. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก .....                   | 66   |
| V. การคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำผลไม้ .....                                                                        | 68   |
| VI. การคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                  | 70   |
| VII. การทดสอบความเป็นพิษของชีวสารต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) .....                                                   | 73   |
| VIII. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ..... | 78   |
| IX. การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>Bcl-2</i> และยีน <i>p21</i> .....                                                        | 79   |
| X. การศึกษาการแสดงออกของ ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis .....                                                      | 80   |
| XI. คุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส .....                                       | 81   |
| XII. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน. ....                                                                                       | 84   |
| <b>5. บทย่อ อภิปรายผล สรุปผล</b>                                                                                         |      |
| อภิปรายผลการทดลอง .....                                                                                                  | 93   |
| สรุป .....                                                                                                               | 101  |
| เอกสารอ้างอิง .....                                                                                                      | 106  |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่                                                                                                                      | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาคผนวก.....                                                                                                               | 118  |
| ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์                                                                                                     |      |
| ภาคผนวก ข ประกาศนียบัตรงานนำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์                                                                   |      |
| ภาคผนวก ค คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เรื่อง “เจลแต้มสิวที่ผลต้าน<br>แบคทีเรียก่อสิวที่ประกอบด้วยโปรตีนชีวสารกึ่งบริสุทธิ์” |      |

## สารบัญตาราง

| ตาราง                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 จำนวนไอโซเลทและฤทธิ์ต้านการเจริญ indicating strains โดยวิธีซีดเชื้อ.....                                                                                                              | 59   |
| 2 Antimicrobial activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay.....                                                                                                              | 60   |
| 3 ผลการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV .....                                                                                                                                                    | 61   |
| 4 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของโคติเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion.....                                                                           | 64   |
| 5 คุณสมบัติการเกาะติดพื้นผิวไอโซเลท T9 และไอโซเลท N35.....                                                                                                                              | 66   |
| 6 ความไวของแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (T9) และ <i>L. plantarum</i> TISTR050 ต่อยาปฏิชีวนะ.....                                                                          | 68   |
| 7 ปริมาณเซลล์ (logCFU/ml) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก (T9) ในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ .....                                                                                                         | 69   |
| 8 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>S. aureus</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยวิธี agar well diffusion ..... | 72   |
| 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptomyces</i> spp.....                                                                                                                       | 72   |
| 10 Inhibition zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบโดยวิธี agar plug diffusion โดยใช้โคโลนีของเชื้อ.....                                                                                           | 72   |

## สารบัญภาพ

| ภาพ                                                                                                                                                                                     | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 ปริมาณเชื้อ <i>L. plantarum</i> ที่ระดับความเจือจาง $10^{-7}$ (ก) และ $10^{-8}$ (ข) ก่อนและหลังผ่าน UV .....                                                                          | 61   |
| 2 การเจริญของ <i>L. plantarum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ MRS ที่ $37^{\circ}\text{C}$ ใน shaking incubator .....                                                                | 62   |
| 3 รูปแบบของแถบ DNA ที่สกัดจาก transformants ที่ตำแหน่งลูกศรชี้คือ recombinant chitinase gene (pHYB43).....                                                                              | 63   |
| 4ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ transformants ต่อจุลินทรีย์ดัชนี.....                                                                                                                          | 65   |
| 5 ฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียไอโซเลท T9 ในการยับยั้งแบคทีเรียดัชนี.....                                                                                                          | 67   |
| 6 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>S. aureus</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยวิธี agar well diffusion ..... | 71   |
| 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง %viability กับความเข้มข้นของโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข).....                         | 74   |
| 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง %viability กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข) .....                                        | 75   |
| 9 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ CO4 .....                                                                                        | 76   |
| 10 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU6.....                                                                                        | 76   |
| 11 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU10.....                                                                                       | 77   |
| 12 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ YM.....                                                                                                        | 77   |
| 13 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของยา 5-Fluorouracil.....                                                                                                  | 78   |
| 14 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 .....                                                     | 79   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพ                                                                                                                                                                                | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 15 การแสดงออกของยีน Bcl-2 และยีน p21 เมื่อเทียบกับ $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ..... | 80   |
| 16 การแสดงออกของโปรตีน phosphor ERK1/2 และ $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 .....         | 81   |
| 17 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCat เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 .....                                                                    | 82   |
| 18 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCat เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB .....                                                                                                         | 83   |
| 19 การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                                                  | 85   |
| 20 การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์โมโนไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                                                   | 85   |
| 21 การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์มัยอีลอยด์เดนดริติกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                                        | 86   |

## สารบัญคำย่อ

|           |                                          |
|-----------|------------------------------------------|
| มก., mg   | มิลลิกรัม                                |
| มล., ml   | มิลลิลิตร                                |
| มม.       | มิลลิเมตร                                |
| มค.ม.     | ไมโครเมตร                                |
| มค.ล.     | ไมโครลิตร                                |
| มค.ก.     | ไมโครกรัม                                |
| °ซ.       | องศาเซลเซียส                             |
| นม., nm   | นาโนเมตร                                 |
| ชม.       | ชั่วโมง                                  |
| AmpB      | Amphotericin B, แอมโฟเทอริซิน บี         |
| Chi       | Chitinase, เอนไซม์ไคติเนส                |
| CFU       | Colony Forming Unit                      |
| min       | minute, นาที                             |
| sp., spp. | species                                  |
| LAB       | Lactic Acid Bacteria, แบคทีเรียกรดแลคติก |
| tLAB      | transformed Lactic Acid Bacteria         |

# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันพบว่าอัตราการเกิดโรคติดเชื้อราแบบแพร่กระจายสูงขึ้นในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลานาน (นงนุช, 2540) ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเอดส์เพิ่มขึ้นพบการติดเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Candidiasis ได้ถึง 71.26 % ของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบ (วิชาญ, 2540) ยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อราที่ใช้อยู่ไม่เพียงพอสำหรับรักษาโรคได้ทุกชนิดจากเชื้อในกลุ่มเดียวกัน ทั้งนี้เพราะปัญหาด้านการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ พิษของยาและตลอดจนอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยา (โสภิต, 2542) เช่น หากมีการใช้ยาแอมโฟเทอริน บีรักษาโรคติดเชื้อราในร่างกาย (systemic fungal infections) เป็นระยะเวลานานก็จะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น electrolyte ผิดปกติ ไตวาย กดไขกระดูก มีอาการไข้ เป็นต้น (วิชาญ, 2540) และแม้ว่ายาตัวใหม่ในกลุ่ม azole ที่มีผลข้างเคียงน้อยลงแต่เมื่อใช้รักษาเป็นระยะเวลานานก็จะพบอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปัญหาที่พบในระบบการเลี้ยงปศุสัตว์กล่าวคือนอกจากกลุ่มแบคทีเรียแล้วยังพบว่ากลุ่มเชื้อราและ/หรือสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราเหล่านั้นยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของปศุสัตว์และอาจมีผลต่อการชักนำให้เกิดกลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะถ้าหากมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้อง ซึ่งทำให้ต้องมีการใช้ยาใหม่ที่มีราคาแพงกว่าเดิมและมักเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นวิธีควบคุมอัตราการดื้อยาที่ดีที่สุดคือการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมทั้งชนิดและระยะเวลาจึงได้มีการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านั้น รวมทั้งการหาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเช่น การใช้สารสกัดจากสมุนไพร (โสภิต, 2542; อภิราม และ มณฑล, 2545) และ/หรือการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัช เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอสลินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมากมาย เพื่อค้นหาชีวสาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไตอะซิดิล อะเซทาลดีไฮด์ รูเทอริน และ แบคทีเรียโอสลินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (ดวงพร, 2537; สมุณทา, 2545) ซึ่งอาจสามารถนำมาทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ได้

nisin เป็นแบคทีเรียโอสลินที่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา ซึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อแต่ละชนิดมีโครงสร้างทางผนังเซลล์ที่แตกต่างกันกล่าวคือ ใน

แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบมีผนังเซลล์ที่มีความซับซ้อน (หนา) กว่า เนื่องจากมีจำนวนชั้นมากกว่า และมีส่วนประกอบที่เพิ่มขึ้นมาคือ lipopolysaccharides ในผนังชั้นนอก (outer membrane) นอกจากนี้เชื้อบางชนิดอาจมีผนังชั้นนอกสุดเป็น capsule เช่นใน *Klebsiella* หรือ slime layer เช่นใน *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งทำให้ยาต้านจุลชีพรวมทั้งแบคทีเรียโอสซินซึมผ่านเข้าไปออกฤทธิ์ที่ target sites ได้ยาก แต่การเติมสารบางจำพวก เช่น EDTA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น chelating agent มาจับกับส่วนของ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบทำให้มีการเพิ่มการแพร่ผ่าน (permeability) ของสารเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นซึ่งจะทำให้มีการเพิ่มฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสซินได้ในระดับหนึ่ง (Kordel and Sahl, 1986; Stevens et.al., 1991) อย่างไรก็ตามได้มีการมีรายงานพบว่าหากมีการใช้ nisin เป็นระยะเวลายาวนานติดต่อกันในเชื้อกลุ่มที่มีการดื้อยา เช่น MRSA, multidrug resistance *Streptococcus pneumoniae* ก็จะทำให้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อ nisin ขึ้นมาได้เช่นกัน จึงจำเป็นต้องมีการระมัดระวังในการเลือกใช้แบคทีเรียโอสซินต่อเชื้อโรคให้มากขึ้นกว่าเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า nisin ยังไม่มีฤทธิ์ต่อยีสต์ โดยอาจเนื่องมาจากยีสต์มีโครงสร้างทางผนังเซลล์ที่หนาแน่นประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นร่างแหของ ไคติน (chitin) กับโปรตีนถึง 22-44% ซึ่งคล้ายกับที่พบใน filamentous fungi ทำให้การแพร่ผ่านของ nisin เข้าสู่ target site เป็นไปได้อย่างลำบาก (Dielbandhosing et.al., 1998) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่าไคตินสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase : Chi) ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช แมลง จุลินทรีย์ต่างๆ (Felse and Panda, 1999) หรือแม้แต่ในมนุษย์ และได้มีบทสรุปจากงานวิจัยหลายฉบับว่าไคตินเนสที่สร้างจาก macrophage ในร่างกายมนุษย์ก็เพื่อเป็นกลไกการป้องกันร่างกายต่อการติดเชื้อในกลุ่มรา (fungi) และ/หรือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Boot et.al., 1995; Escott and Adams, 1995) และได้มีการศึกษาฤทธิ์ของไคตินเนสร่วมกับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการทำลายแมลงศัตรูพืชซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ที่ส่วนเปลือกนอกและส่วน peritrophic membrane ภายใน mid gut (Richards and Richards, 1977) หรือแม้กระทั่งการใช้ไคตินเนสยับยั้งการแพร่กระจายของแมลงหรือเชื้อราก่อโรคพืช ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าการเสริมฤทธิ์ในการทำลายได้ดียิ่งขึ้นซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจอย่างยิ่ง (Sneh et.al., 1983; Smirnoff, 1971;1973;1974; Smirnoff et.al, 1973; Morris, 1976; Regev et.al., 1996; Wiwat et.al., 1996; Kramer et.al., 1997; Tantimavanich et.al., 1997, Lertcanawanichakul et.al., 2004) ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกให้มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ให้มีฤทธิ์กว้างขึ้น

นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้นยังพบว่าสารเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถต้านมะเร็งและมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานในร่างกาย ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายจำแนกเป็น innate immunity และ adaptive immunity อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มฟาโกไซต์ เช่น นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ โมโนไซต์ และลิมโฟไซต์รวมทั้งสารน้ำต่างๆ บริเวณผิวเยื่อ

(mucosal-Associated lymphoid tissue; MALT) ระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารประกอบด้วย เซลล์ แอนติบอดี และสารน้ำในสารคัดหลั่ง ทำหน้าที่กำจัดแอนติเจนที่ผ่านเข้ามาทางการกิน (ingested antigen) เยื่อบุจะเป็นด่านป้องกันระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับเนื้อเยื่อภายในที่จะเป็นช่องทางการเข้าสู่ร่างกายของจุลชีพและสิ่งแปลกปลอม เรียกเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารว่า Gut associated lymphoid tissue (GALT) ได้แก่ ที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ (intestine) ทั้งในชั้นของ connective tissue และ lamina propria ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อต้านจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Abbas AK, 2007)

ในระบบทางเดินอาหารมีทั้งแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีผลดีต่อสุขภาพ เช่น *Lactobacillus* *Bifidobacteria* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก (*Lactic acid bacteria*) และจุลชีพก่อโรค (*Pathogenic bacteria*) ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร หากจุลชีพที่มีผลดีต่อสุขภาพมีจำนวนมากก็สามารถเกาะติดผนังลำไส้และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ช่วยป้องกันไม่ให้จุลชีพชนิดก่อโรคเกาะติดและเจริญจนก่อให้เกิดพยาธิสภาพ ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นอาหารเสริมสุขภาพหรือโปรไบโอติก เพื่อสร้างสมดุลของจุลชีพในระบบทางเดินอาหารและต้านทานต่อจุลชีพก่อโรคในลำไส้ การสร้างเสริมภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้เป็นผลจากการการปรับสภาวะการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้ เช่น Peyer's Patch, mesenteric lymph node ให้ทำงานได้อย่างเหมาะสม (Vaarala O, 2003) เซลล์เดนดริติก (*dendritic cells*) เป็น antigen presenting cell (APC) พบในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ผิวหนัง เนื้อเยื่อของระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ในส่วนของ Peyer's Patch และ mesenteric lymph node ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อจุลชีพที่ผ่านเข้ามาทางเนื้อเยื่อดังกล่าว โดยการกระตุ้นเซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันทั้ง innate และ adaptive immunity ผ่านโมเลกุลบนเซลล์เมมเบรนที่เป็นที่รับสำหรับแอนติเจนและสามารถปรับแต่งแอนติเจนแล้วนำเสนอร่วมกับ MHC class II ให้กับ naïve T lymphocyte และสร้างไซโตไคน์ เช่น Interleukin (IL)-12, type I interferon (IFN) (Abbas AK, 2007)

มีการศึกษาการตอบสนองของเดนดริติกเซลล์ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างกว้างขวางพบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์เดนดริติกทำงานและส่งเสริมการทำงานของเซลล์อื่นๆ เช่น NK cell, B lymphocyte, T helper cell และ T regulatory cell (Treg) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลบนผิวเซลล์เช่น CD80, CD83, CD86, CD54, CD206, HLA-DR บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้นและเพิ่มการผลิต IL-10, IL-12 และการสร้าง IFN- $\gamma$  และอาจมีบทบาทในการควบคุมไม่ให้เกิดภาวะภูมิแพ้หรืออักเสบในลำไส้โดยการกระตุ้นการทำงานของ Treg ลดการทำงานของ Th1 ที่จะส่งเสริมกระบวนการอักเสบ (Hart AL และคณะ; 2004; Niess JH and Reinecker HC, 2006; Elmadfa I และคณะ 2010; Galdeano CM และคณะ, 2006; Mohamadzadeh M และคณะ, 2005; Gill HS และคณะ, 2000) แบคทีเรียกรดแลคติกที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

โปรไบโอติก จึงมักจะมีการทดสอบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถส่งเสริมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักและผลิตภัณฑ์นม ที่ได้มีการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นแล้วว่าสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียตัวอื่นที่ใช้เป็นกลุ่มตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร รวมทั้งได้ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกที่ดี เช่น การทนต่อกรด ต่าง การเกาะติดพื้นผิว เป็นต้น โดยแบคทีเรียดังกล่าวได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เช่น สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) ในการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาทั้งในเซลล์เดนดริติกที่แยกได้จากเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มโมโนนิวเคลียร์เซลล์

ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ศึกษาคุณลักษณะที่ดีของกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะนอกเหนือจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อื่น ได้แก่ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนไคไติเนสใน *L. plantarum* TISTR 050 ในการดูฤทธิ์ร่วมกันในเบื้องต้นต่อการยับยั้งเชื้อรา เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมนุษย์และอาจนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ดีได้ต่อไปในอนาคต

## วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตัวอื่น
2. ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายถอดยีนไคไติเนส (heterologous chitinase gene) โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 เป็นต้นแบบ
3. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก
4. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 3. ในน้ำผลไม้
5. การศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
6. การศึกษาการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติก
7. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก
8. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp.

9. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR และการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis
10. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสโดยวิธี wound closure assay
11. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้น (Activation) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่แยกจากเลือดของคนปกติ
12. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้นการเจริญแก่ตัว (maturation) ของเซลล์เดนดริติกในกระแสเลือด

## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

#### รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก
2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์โคติเนส
3. รายละเอียดเกี่ยวกับการควบคุมการส่งออกของเงิน
4. รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อและ การปรับสภาวะภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

#### 1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก (พงษ์เทพ, 2546; สุมณฑา, 2542)

##### 1.1 ความรู้ทั่วไป

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ (non spore-forming) ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส (catalase) ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophile) แต่บางชนิดก็สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียรูปร่างทั้งแบบท่อนและแบบกลม ประกอบไปด้วยหลายสกุล (genus) คือ

- |                  |                   |
|------------------|-------------------|
| - Aerococcus     | - Pediococcus     |
| - Alloiooccus    | - Streptococcus   |
| - Carnobacterium | - Tetragenococcus |
| - Enterococcus   | - Vagococcus      |
| - Lactobacillus  | - Bifidobacterium |
| - Lactococcus    |                   |

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถแบ่งออกตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 85-95) และ heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก (ร้อยละ 50) ร่วมกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ด้วยเช่น กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล

เป็นต้น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในอาหาร เช่น อาหารหมัก ผักสด เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ด้วยเช่น ทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ เป็นต้น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารโดยนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเติมลงไปในการอาหาร เพื่อช่วยปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติอาหาร และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

กรดแลคติก เป็นผลผลิตของ lactic acid bacteria ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อของการหมัก หมักอาหารและทำหน้าที่เป็น antimicrobial ตามธรรมชาติ โดยที่กรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้หลายชนิด รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* ในจำพวก กรดอินทรีย์ Lactic acid เป็นตัวที่ preserve ผลิตภัณฑ์หมักดองในธรรมชาติ เป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยเป็นตัววัด pH ในเซลล์ และรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุภายในและภายนอกเซลล์

สิ่งที่มีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพของกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากความสามารถในการละลายน้ำทำให้มีโมเลกุลที่มีขนาดเล็กพอที่จะซึมผ่านเข้าสู่ periplasm แล้วโมเลกุลใหญ่พวกโปรตีน (เช่น bacteriocins or enzymes) และ hydrophobic substances (เช่น hydrophobic antibiotics) ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียชั้นของ lipopolysaccharide (LPS) ขณะเดียวกันก็มีการสูญเสียหน้าที่ของ permeability barrier ด้วย โดยสารที่ถูกเรียกว่าเป็น permeabilizers นั้น เช่น EDTA ซึ่งมีสมบัติเป็น chelating agent ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อ OM โดยทำให้สูญเสีย LPS และ polycations เช่น polythethyleneimine หรือ polymyxin B nonapeptide ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้ OM ถูกทำลาย Permeabilizers ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความสามารถในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แต่จะมีส่วนประกอบอื่นๆที่แทรกซึมเข้าไปและเพิ่มความไวต่อ hydrophobic antibiotics, detergents, lysozyme หรือ bacteriocins จึงมีความคิดที่จะใช้ permeabilizers ร่วมกับ antimicrobials อื่นๆในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย

## 1.2 หลักในการจัดแบ่งเป็นชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก (ดวงพร, 2537)

1.2.1 *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดหนึ่ง จึงจัดแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการหมักกรดแลคติก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1.2.1.1 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ homofermentative เพียงอย่างเดียว (obligate homofermenters) หมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปได้ 85% หรือมากกว่า ในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือกลูโคเนตไม่เกิดแก๊ส เช่น *L. delbrueckii*, *L. leichmanii* และมีบางชนิดที่หมักน้ำตาลกลูโคสไม่เกิดแก๊ส แต่ถ้าเป็นกลูโคเนตจะเกิดแก๊ส เช่น *L. casei*, *L. plantarum* เป็นต้น

1.2.1.2 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้ง 2 แบบ (facultative heterofermenters) การหมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลคติกประมาณ 56% นอกนั้นเป็น CO<sub>2</sub> กรดอะซิติกและเอทานอล เกิดแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคสและกลูโคเนต อุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้มีผลต่อการแบ่งเป็นชนิดต่างๆ เช่น *L. fermentum* เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นต้น

1.2.1.3 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ heterofermentative เพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) การหมักคาร์โบไฮเดรตจะเกิดกรดแลคติก CO<sub>2</sub> และ กรดอะซิติก สมาชิกของพวกนี้เป็นที่รู้จักกันน้อย เช่น *L. hilgardii* , *L. trichodes* และ *L. heterohiochii* เป็นต้น

สำหรับแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ *Lactobacillus* spp. ประกอบด้วย

1.2.2 *Leuconostoc* spp. เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวก *Lactobacillus* spp. ได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติกเพราะเกิดเมือก

1.2.3 *Pediococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกจัดไว้ใน species ใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*

1.2.4 *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกอีก species หนึ่ง มีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. และ *Streptococcus* spp.

นักจุลชีววิทยาบางคนยังจัดแบคทีเรียสกุล *Bifidobacterium* ไว้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกด้วย แม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกก็ตาม

### 1.3 สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น

สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น (antibacterial substance) ที่สร้างมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีตัล (diacetyl) รูเทอริน (reuterin) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

1.3.1 กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก คือ กรดแลคติกและกรดอะซิติก โดยกรดอินทรีย์จะทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH, pKa (dissociation constant) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์นั้นโดยทั่วไปกรดอะซิติกสามารถยับยั้งการเจริญต่อ

เชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลคติก อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนทานต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid-producing bacteria)

1.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เนื่องจากไปทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ เสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลอื่น ๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังอาจมีผลในทางอ้อมด้วยเช่น เมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการเกิดสารยับยั้งดังกล่าวว่า “ lactoperoxidase antibacterial system”

1.3.3 ไดอะซีทิล (diacetyl) ไดอะซีทิล หรือ 2,3 -butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะซีทิลได้จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซีทิลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการยับยั้งของไดอะซีทิลเชื่อว่าเกิดจากไปรบกวนการใช้อาร์จินีน (arginine) ภายในเซลล์โดยไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ

ไดอะซีทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ไวน์แดง ไวน์ขาว เบียร์ และกาแฟ ความเข้มข้นของไดอะซีทิลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้โดยทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัม/มิลลิตร ความเข้มข้นของไดอะซีทิลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ถึงแม้ว่าไดอะซีทิลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้แต่ก็ต้องใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นหอมดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่นิยมใช้เป็นสารกีดกันเชื้อในการทำความสะดวกภาชนะหรือเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร

1.3.4 อะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย hetero fermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase หรือ เอนไซม์นี้ถูกกีดการสร้างจะทำให้มีอะเซทัลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะเซทัลดีไฮด์เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ต

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นโดยอะเซทาลดีไฮด์มารายงานไว้น้อยมาก อะเซทาลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* เป็นต้น เนื่องจากในอาหารที่เติมแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจะมีปริมาณอะเซทาลดีไฮด์ค่อนข้างน้อยเช่น ในโยเกิร์ตพบประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะเซทาลดีไฮด์ จึงนับว่าน้อยมาก

1.3.5 รูเทอริน (reuterin) เป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากเป็นรูเทอรินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* รูเทอรินมีคุณสมบัติสำคัญคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ แต่ไม่ใช่โปรตีนเพราะไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดย proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคทีริโอซิน เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอรินพบว่า เป็น ( $\beta$ -hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimers โดยเกิดขึ้นในกระบวนการ เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยรูเทอรินมีค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยรูเทอรินได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น โดยเชื่อว่ารูเทอรินมีฤทธิ์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างรูเทอรินจึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการถนอมอาหารได้

1.3.6 แบคทีริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้มีหลายชนิด คุณสมบัติสำคัญของแบคทีริโอซินคือ เป็นโปรตีนหรือสารประกอบของโปรตีน เช่น lipocarbohydrate proteins หรือ glycoprotein แบคทีริโอซินส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันมักจะมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพแตกต่างกัน เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เสถียรภาพต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน และกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นโดยแบคทีริโอซินอาจมีหลายแบบขึ้นกับชนิดของแบคทีริโอซิน กลไกหนึ่งที่เป็นไปได้คือเซลล์ที่จะถูกทำลายโดยแบคทีริโอซินจะต้องมีที่รับ สำหรับแบคทีริโอซินนั้นอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคทีริโอซินจับกับที่รับแล้วจะทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์ ดังนั้นการผ่านเข้าออกของไอออนต่างๆ ระหว่างในและนอกเซลล์จึงเสียสมดุลไปและทำให้เซลล์ตายในที่สุด อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินบางชนิดก็อาจทำให้เซลล์ตาย

โดยเซลล์ยังคงสภาพเดิมได้ ทั้งนี้เซลล์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียโอซินชนิดที่ตนเองสร้าง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคทีเรียโอซินที่สร้างออกมานั้นไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่สร้าง

นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน แบคทีเรียโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* เป็นต้น โดยแบคทีเรียโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะได้ ดังตาราง

| ลักษณะและคุณสมบัติ                                 | แบคทีเรียโอซิน                      | สารปฏิชีวนะ                                |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| การนำไปใช้งาน                                      | ทางอาหาร                            | ทางการแพทย์                                |
| กระบวนการสังเคราะห์                                | ผลิตจากไรโบโซม                      | ผลิตผ่านsecondary metabolite               |
| ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย | น้อย                                | มาก                                        |
| การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต        | มี                                  | ไม่มี                                      |
| การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย                         | ปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ | การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม                 |
| ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย                          | ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์        | ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์ |
| ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง                         | ยังไม่มีรายงาน                      | มี                                         |

## 2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไคตินเนส

ไคตินเป็นสายยาวของโมเลกุล N-acetyl-(D)-glucosamine (NAG) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Jeuniaux, 1966; Flach et.al., 1992) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สำคัญในธรรมชาติของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และในทางเกษตรกรรมพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสสามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อราก่อโรคพืชได้ (Fuchs et. al., 1986)

เอนไซม์ไคตินเนสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการตัดย่อยสายไคตินได้เป็นเอกโซไคตินเนส (exochitinase) และเอนโดไคตินเนส (endochitinase) (Bade and Hickey, 1988) ซึ่งจะเข้าไปสลายพันธะตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 1 และคาร์บอนตัวที่ 4 ของโมเลกุล NAG ที่อยู่ติดกัน

โดยที่เอกโซไคตินเนสจะย่อยสายไคตินทางด้านปลายให้โคโตไบโอส (chitobiose: dimer ของ N-acetylglucosamine) ส่วนเอนโดไคตินเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกภายในสายไคติน (Jeuniaux, 1966) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาหลายแบบตั้งแต่ dimer, trimer หรือ tetramer ของ N-acetylglucosamine โดยมีชื่อเรียกว่า chitobiose, chitotriose หรือ chitotetraose ตามลำดับ (Roberts and Selitrennikoff, 1988; Bassler et.al., 1991) และที่สำคัญคือเอนโดไคตินเนสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ นอกจากนี้แล้วในระบบเอนไซม์ไคตินเนส (chitinolytic) ยังสามารถตรวจพบเอนไซม์โคโตไบโอเอส (chitobiase) และ N-acetylglucosaminidase ที่สามารถย่อยโคโตไบโอเอสได้ NAG อิสระออกมา ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ถูกจัดว่ามีหน้าที่เหมือนกัน (Tronsmo and Harman, 1993) แต่ที่ต่างกันคือเอนไซม์ N-acetylglucosaminidase สามารถใช้โคโตไตรโอสเป็นสารตั้งต้นได้นอกจากโคโตไบโอส (Flach et.al., 1992; Soto-gil and Zyskind, 1989)

ถึงแม้ว่าไคตินจะสามารถตรวจพบได้เป็นปริมาณสูงในธรรมชาติและสามารถหาซื้อได้ แต่คุณสมบัติยังไม่เหมาะต่อการนำมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสเนื่องจากยังมีขนาดใหญ่และซับซ้อน ซึ่งจำเป็นต้องมีการเตรียมก่อนนำมาใช้และเรียกชื่อเป็น colloidal chitin (Flach et.al., 1992) ที่ไม่ละลายน้ำ หรือ glycol chitin หรือ carboxymethyl chitin ที่อยู่ในรูปของสารละลาย นอกจากนี้การติดฉลากไคตินด้วยสีย้อมเช่น procion red G และ remazol brilliant violet 5R ก็ถูกนำมาใช้ในการทดสอบเอนไซม์ไคตินเนส (Hackman and Goldberg, 1964) แต่ความไวยังต่ำ ซึ่งแก้ไขโดยใช้ tritiated chitin (Molano et.al., 1977) เข้ามาแทนที่แต่เนื่องจากเป็นสาร radioactive ดังนั้นจึงยากต่อการจัดการ ซึ่งวิธีการทดสอบเอนไซม์ไคตินเนสได้มีการพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับเพื่อให้มีความไวสูงขึ้นเช่นการใช้สารเรืองแสง (fluorogenic substance) เช่น 4-methylumbelliferone (4-MU) (O'Brien and Colwell, 1987) หรือสารให้สี p-nitrophenol (Fuches et.al., 1986) แบคทีเรียที่สามารถย่อยไคตินได้จะทำให้เกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีดังกล่าวและสามารถตรวจวัดปริมาณได้อย่างคร่าวๆ โดยดูจากขนาดวงใสหรือจำนวนวันที่ใช้ทำให้เกิดวงใส แต่นอกจากการใช้ไคตินที่ไม่ละลายน้ำมาเพื่อทดสอบเอนไซม์ไคตินเนสแล้วยังมีไคตินที่ละลายน้ำได้มาทดสอบได้ด้วยและทดสอบการย่อยไคตินด้วยการย้อมด้วยสีย้อม congo red (Teather and Wood, 1982) 1989) หรือ calcoflor white M2R (Trudel and Asselin) หรือ trypan blue (Ueda et.al., 1994) นอกจากนี้การใช้สารเรืองแสงในการหาปริมาณเอนไซม์ไคตินเนสเป็นที่นิยมมากเนื่องจากมีความรวดเร็ว เช่นการเททับโคโลนีที่ถูกย่อยด้วยสารเรืองแสง 4-MU หรือ p-Nitrophenol ดูการเรืองแสงสีฟ้าขาวภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือการปรากฏสีเหลืองรอบโคโลนี ตามลำดับ แล้วจึงใช้เครื่องมือ fluorometry ในการหาปริมาณประกอบ (Wortman et.al., 1986; Kless et.al., 1989)

### 3. การควบคุมการแสดงออกของจีน

การแสดงออกของรหัสพันธุกรรมที่ปรากฏใน DNA ต้องอาศัยกระบวนการหลายอย่างประกอบเข้าด้วยกัน อันดับแรกก็คือการถอดรหัส (transcription) สาย DNA ให้เปลี่ยนไปเป็น RNAs ซึ่งประกอบด้วย transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA) และ messenger RNA (mRNA) โดยที่ลำดับเบสที่ปรากฏอยู่ในสาย mRNA จะถูกแปลรหัส (translation) ไปเป็นสายของกรดอะมิโน (amino acid) ประกอบเป็นโปรตีน ส่วน tRNA และ rRNA เป็นอนุพันธ์ที่มาจาก precursor RNA สายยาวที่ผ่านกระบวนการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อย RNA (RNA processing enzyme) โดยที่โมเลกุลของ RNAs ทั้งหมดมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของยีน (Doi, 1991)

ระบบของเอนไซม์ (enzyme machinery) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสของจีนคือ DNA-dependent RNA polymerase ที่เรียกกย่อ ๆ ว่า RNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์แกน (core enzyme) ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ sigma ( $\sigma$ ) factor เปลี่ยนไปเป็น holoenzyme และจะไปจับอย่างจำเพาะกับส่วนของลำดับเบสที่ปลายสาย 5' ที่เป็นตำแหน่งของ promoter

ขอบเขตของ promoter ประกอบด้วยลำดับเบสประมาณ 40-50 เบสแพร์ (base pair: bp) และลำดับเบสอื่นที่จะถูกจับด้วยเอนไซม์ RNA polymerase โดยส่วนของ  $\sigma$  factor ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ที่ตำแหน่ง conserved region ที่ -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) และที่ตำแหน่ง +1 ซึ่งเป็นตำแหน่งแรกของการถอดรหัส มีการทดลองเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) ที่ตำแหน่ง -10 และ -35 ปรากฏว่าทำให้ promoter มีหน้าที่ลดลงแต่หากมี

mutation ที่ตำแหน่งอื่นด้านปลาย 3' ปรากฏว่าไม่มีผลต่อหน้าที่ของ promoter โดยส่วนใหญ่แล้ว จีนและชุดของจีน (operon) จะถูกควบคุมด้วย promoter หลายแบบอาจเป็นแบบเรียงลำดับซ้ำกันในทิศทางเดียวกัน (tandem) หรือทับซ้อนกัน (overlap) ซึ่งการถอดรหัสอาจเป็นการใช้ holoenzyme ชนิดเดียวกันหรือมากกว่านั้น

$\sigma$  factors มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและเมื่อรวมกับ RNA polymerase ได้เป็น holoenzymes หลายแบบที่มีความแตกต่างจำเพาะกับ promoters ชนิดต่างๆ (Streips, 1991) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสในเชื้อแต่ละชนิด เช่น holoenzymes ของ *Bacillus subtilis* ( $\sigma^{43}$ ), *E. coli* ( $\sigma^{70}$ ) และ *Lactobacillus lactis* ( $\sigma^{39}$ ) จะมีตำแหน่งจับจำเพาะที่เดียวกันตรงตำแหน่ง -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) และต้องมีเบสระหว่าง (spacer) 2 ตำแหน่งจำนวน 17 bp และในเบคทีเรียกรดแลคติกที่ตำแหน่ง -15 ควรมีลำดับเบสคู่เป็น TG ส่วนที่ตำแหน่งเหนือกว่า -35 ไปทางปลาย 3' ควรเป็นตำแหน่งที่มี AT ซ้ำกันมากๆ (AT rich) จึงจะเป็น promoter ที่มีประสิทธิภาพในเบคทีเรียกรดแลคติก (Araya et.al., 1993; de Vos, 1999)

#### 4. รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อและ การปรับสภาวะภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้

เซลล์เดนดริติกเป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน innate immunity มีบทบาทในการกระตุ้นลิมโฟไซต์และควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจัดเป็นเซลล์ชนิด APC ส่วนใหญ่พบในเนื้อเยื่อ ในกระแสเลือดพบได้ประมาณร้อยละ 0.1-0.5 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เซลล์เดนดริติกจะอยู่ในรูป immature cells ในเนื้อเยื่อเซลล์เดนดริติกดักจับสิ่งแปลกปลอมและเริ่มต้นกระตุ้นกระบวนการอักเสบ ในขณะที่เดียวกันจะเดินทางจากเนื้อเยื่อไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนดริติกทั้งรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลบนผิวเซลล์เรียกว่ามีการเจริญแก่ตัว (maturation) ได้แก่การเพิ่มขึ้นของ HLA-DR, costimulatory molecule คือ CD80 และ CD86 และ maturation marker คือ CD83 การสร้างและหลั่งไซโตไคน์หลายชนิด เซลล์เดนดริติกสามารถกระตุ้นเซลล์ได้หลายกลุ่มทั้ง B lymphocyte, T lymphocyte และ natural killer cells (Palucka K. และคณะ 1999; Banchereau J. และคณะ, 2000)

เซลล์เดนดริติกในกระแสเลือดสามารถแบ่งได้เป็น สองชนิดคือ myeloid dendritic cells (mDCs) ซึ่งมีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่สำคัญ คือ CD1c, CD11c, HLA-DR และโมเลกุลในกลุ่ม Toll like receptor (TLR) ได้แก่ TLR-2, -3, -4, และ TLR-7 เซลล์เดนดริติกในกลุ่มที่สองคือ plasma cytoid dendritic cells (pDCs) มีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่สำคัญ คือ , CD123, HLA-DR และโมเลกุลในกลุ่ม Toll like receptor (TLR) ได้แก่ TLR- 7, and -9 ทั้งสองกลุ่มทำหน้าที่ต่างกันในระบบภูมิคุ้มกัน กล่าวคือ mDCs ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell และหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญคือ interleukin (IL)-12 ส่วน pDCs ทำหน้าที่ในการสร้างไซโตไคน์ที่สำคัญคือ Interferon (IFN)- $\alpha$  และ IFN- $\beta$  ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการต้านการติดเชื้อไวรัส มีการศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์เดนดริติกในหลอดทดลองจากเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CD34+ progenitor cells) หรือสามารถเพาะเลี้ยงได้จาก เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (CD14+) โดยกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ IL-4 และ granulocyte monocyte stimulating factor (GM-CSF) และ tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  เรียกว่า monocyte derive dendritic cells (moDCs) (Zheng Z. และคณะ, 2000) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาการทำงานของเซลล์ในหลอดทดลอง

ในร่างกายเดนดริติกเซลล์จะเดินทางจากเนื้อเยื่อเข้าสู่กระแสเลือดและจากกระแสเลือดเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง เซลล์เดนดริติกในเนื้อเยื่อมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น Lanagerharns cell, follicular dendritic cells ทำหน้าที่ดักจับแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในเนื้อเยื่อ แล้วกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ได้แก่ B lymphocyte และ T lymphocyte CD4+ T lymphocyte จะ recognize แอนติเจนที่ถูกนำเสนออยู่บน MHC Class II molecule ของเซลล์เดนดริติก ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของโมเลกุล CD40 ligand บน T lymphocyte

ในขณะเดียวกันเซลล์เดนดริติกก็จะถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 chemokines และ maturation marker ได้แก่ CD80 CD86 CD83 การหลั่งไซโตไคน์จะยิ่งเพิ่มการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte ดังนั้นเซลล์ทั้งสองชนิดจึงทำงานส่งเสริมซึ่งกันและกัน เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญได้แก่ IL-12 รวมทั้ง IL-18, IL-15, IFN- $\alpha$  และ IFN- $\beta$  ซึ่งถูกหลั่งมาจากเซลล์เดนดริติกยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell (cytotoxic activity) ให้สูงขึ้นและในทางกลับกัน NK cell ก็สามารถกระตุ้นการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกด้วยเช่นกันโดยการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  และ IFN- $\gamma$  และผ่านโมเลกุล NKp30 (Walzer T. และคณะ, 2005) ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง NK และเซลล์เดนดริติกอาจเกิดขึ้นในต่อมน้ำเหลืองหรือเนื้อเยื่อและยังส่งผลกระตุ้นการทำงานของ T lymphocyte อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นทั้ง NK และเซลล์เดนดริติกจึงเป็นจุดเชื่อมระหว่าง innate และ adaptive immunity

บทบาทของเซลล์เดนดริติกในการเริ่มต้นและควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เกิดจากการรับรู้สิ่งแปลกปลอมและองค์ประกอบของจุลชีพ (Pathogen associated molecular patterns) ของเซลล์เดนดริติกผ่าน Pattern recognition receptors (PRRs) การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytose) และนำเสนอแอนติเจนผ่าน MHC class I, II นอกจาก TLR จะเป็น PRRs ที่พบบนเซลล์เมมเบรนของเซลล์เดนดริติกยังมีโมเลกุลอื่นๆอีกเช่น C-type lectin receptor, mannose receptor เซลล์เดนดริติกรับรู้สัญญาณการกระตุ้นเซลล์ (danger signal) ผ่าน PRRs นำไปสู่การเกิดกระบวนการอักเสบและการกระตุ้น T lymphocyte TLR มี ligands หลายชนิด เช่น lipoproteins และ peptidoglycans ที่จำเพาะกับ TLR2, double-stranded RNA ของไวรัส จำเพาะกับ TLR3, Lipopolysachride ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ Gram negative bacteria จำเพาะกับ TLR4, flagellin ที่พบในส่วน Flagella ของแบคทีเรียจำเพาะกับ TLR5 single-stranded RNA และ synthetic imidazoquinoline จำเพาะกับ TLR7 และ TLR8, unmethylated CpG ซึ่งพบใน DNA ของแบคทีเรียจะจำเพาะกับ TLR9 การจับกันของ ligand และ TLR บนเซลล์เดนดริติก กระตุ้นให้เกิดการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ที่ส่งเสริมกระบวนการอักเสบ คือ TNF and IL-1 (Goldstein DR, 2006)

ในลำไส้พบเซลล์เดนดริติกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ lamina propia (LP) ของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่, lymphoid follicle, mesenteric lymphnode (MLN) และ Payer's patch (PP) จะมีบทบาทในการจับแอนติเจนบริเวณเนื้อเยื่อของลำไส้โดยการยึดเซลล์ผ่าน lumen การศึกษาในหนูพบว่า ส่วน PP มีเซลล์เดนดริติกหลายกลุ่มย่อยและมีบทบาทต่างกัน ในส่วนของ LP มีเซลล์เดนดริติกสองกลุ่มย่อยโดยแยกออกจากกันด้วยการมีโมเลกุล CD103 บนเซลล์เมมเบรน (Rescigno M, 2009) ในลำไส้ของมนุษย์การจำแนกกลุ่มย่อยยังไม่ชัดเจนเหมือนในหนู แต่ทราบว่ามียบทบาทสำคัญในการปรับระบบภูมิคุ้มกันโดยควบคุมการทำงานของ T lymphocyte และการสร้างแอนติบอดีชนิด IgA เซลล์เดนดริติกทำให้เกิดพัฒนาการของ regulatory T cells (Treg) และ T

helper cells (Th1, Th2, Th17) ที่เยื่อในลำไส้เล็กเซลล์เดนดริติกจะพัฒนามาจากโมโนไซต์ที่เคลื่อนย้ายเข้ามาในเนื้อเยื่อจากกระบวนการอักเสบ โดยมีเซลล์ชนิดต่างๆ ที่มีส่วนร่วมในการเกิดพัฒนาการของเซลล์เดนดริติก ได้แก่ intestinal epithelial cells (IECs) ทำให้เซลล์เดนดริติกลดการสร้าง IL-12 ที่จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ Th1 แต่ส่งเสริมการทำงานของ Th2 โดยการหลั่ง thymic stromal lymphopoietin (TSLP) และการหลั่ง transforming growth factor (TGF)- $\beta$  ทำให้เกิดพัฒนาการของ CD103+DC ที่ควบคุม Th1 และการสร้าง IgA Stromal cells มีผลต่อการทำงานของเซลล์เดนดริติกและยับยั้งการสร้าง IFN- $\alpha$  เซลล์ macrophage ในลำไส้มีบทบาทในการลดการอักเสบในลำไส้โดยกระตุ้น regulatory T cells และยับยั้ง Th17 นอกจากนี้แบคทีเรียใน lumen ยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์เดนดริติกในลำไส้เล็ก โดยการกระตุ้น IEC ให้หลั่ง TSLP (Ressigno M., 2009) IECs มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อลำไส้ IECs ตอบสนองต่อ gram negative bacteria ในลำไส้ แต่ไม่ตอบสนองต่อแบคทีเรียประจำถิ่นและแบคทีเรียกรดแลคติก การกระตุ้นให้เซลล์เดนดริติกตอบสนองผ่าน IECs จะต้องมีการมี receptor ที่จำเพาะบน IECs ต่อแบคทีเรียชนิดนั้น (Zoumpopoulou G. และคณะ, 2009)

ในปัจจุบันความสนใจนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมากขึ้นโดยผสมในอาหารเช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจว่าแบคทีเรียกรดแลคติกรักษาสสมดุลและปรับสภาวะภูมิคุ้มกันในลำไส้ได้อย่างไร และเหตุใดที่แบคทีเรียกรดแลคติกไม่ได้ก่อโรคในลำไส้ ในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งทางด้าน innate และ adaptive immune response เช่น Phagocytosis, Natural killer cell cytotoxicity, การสร้างแอนติบอดีและไซโตไคน์และการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte (Gill HS, 1998) ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ที่เพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทำให้สามารถต้านทานต่อจุลชีพก่อโรคได้ Kaila M และคณะ (1992) รายงานการวิจัยในเด็กเล็กที่ได้รับ *Lactobacillus* GG มีอาการแสดงของโรคติดเชื้อโรตาไวรัสหรืออาการท้องเสียสั้นลงและมีแอนติบอดีชนิด IgA เพิ่มขึ้น มีหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ มีความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกในกระดุนระบบภูมิคุ้มกัน ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับหากมีปริมาณสูงก็จะช่วยเพิ่มการตอบสนองได้ดี การใช้แบคทีเรียที่มีชีวิตและสภาวะของแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารหมักกระตุ้นการตอบสนองได้ ทั้งนี้ไม่มีรายงานว่ากระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันขึ้นกับ อายุ อาหารและปัจจัยทางกายภาพของผู้บริโภค (Gill HS, 2004)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียในลำไส้กับแบคทีเรียก่อโรคมีความแตกต่างกัน การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียกรดแลคติกไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ เนื่องจากการกระตุ้นนั้นมีความรุนแรงน้อยกว่าการตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรค อาจเนื่องมาจากเซลล์เดนดริติกในเนื้อเยื่อลำไส้รับรู้แบคทีเรียกรดแลคติกผ่าน TLR2, TLR9 และ NOD2 ที่จับกับส่วน

peptidoglycan ของแบคทีเรียเช่นเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่น กระตุ้นการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกในรูปแบบที่แตกต่างกัน และส่งเสริมการทำงานของ Treg ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการหลั่ง IL-10 และ TGF- $\beta$  (Rook GAW. และคณะ, 2005) TGF- $\beta$  มีผลทำให้การสร้าง IgA ในลำไส้มีปริมาณสูงขึ้น *Lactobacillus* กระตุ้นเซลล์เดนดริติกให้มีการแก่ตัวแต่หลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  และ IL-12 ในปริมาณที่น้อย แต่ยังคงสร้าง IL-10 ได้ ดังนั้นจึงเป็นการลดการทำงานของ Th1 ที่จะส่งเสริมกระบวนการอักเสบ (Christensen HR. และคณะ, 2002) Treg ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้ จะมีการตอบสนองต่อเซลล์เดนดริติกที่ถูกกระตุ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ไม่ว่าจะให้แบคทีเรียกรดแลคติกโดยการกินหรือการให้ทางชั้นใต้ผิวหนังเนื่องจาก Treg จะเดินทางไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย กลไกหนึ่งของการควบคุมการทำงานของ Treg คือแบคทีเรียกรดแลคติกจับกับ C type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule 3- grabbing non integrin (DC-SIGN) อย่างไรก็ดีแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น *L. casei*, *L. reuteri* ที่สามารถจับกับ DC-SIGN (Smith HH. และคณะ, 2005) เซลล์เดนดริติกบริเวณ PP จะมีการกระตุ้นและหลั่ง IL-4, IL-10 (Th2) ได้มากกว่าเซลล์เดนดริติกจากเนื้อเยื่อลำไส้และยังกระตุ้น T lymphocyte ให้หลั่ง IFN- $\gamma$  (Th1) ได้น้อย บ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์เดนดริติกบริเวณ PP มีบทบาทในการปรับสภาวะการทำงานของลิมโฟไซต์ในระบบทางเดินอาหาร (Iwasaki A. และคณะ, 1999)

การศึกษากลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนมากเนื่องจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่หลากหลาย Lee Y. และคณะ (2005) ทดสอบการกระตุ้น phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว Macrophage จากหนูซึ่งได้รับแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีชีวิตและผ่านการทำลายด้วยความร้อน (heat killed bacteria) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า *W. kimchii* PL9001, *L. plantarum* PL9011, *L. fermentum* PL9015 เพิ่มเปอร์เซ็นต์ phagocytotic activity อย่างมีนัยสำคัญและแบคทีเรียที่มีชีวิตกระตุ้นได้ดีกว่า heat killed bacteria การศึกษาของ Galdeano CM และคณะ (2006) ทดลองให้หนูกินแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. casei* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มการกระตุ้น innate immune cell โดยเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ TLR2 และ CD206 ในเนื้อเยื่อลำไส้มากขึ้น และเพิ่มจำนวนเซลล์ที่สร้าง IgA ในส่วน LP ของลำไส้ แต่ไม่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวน T lymphocyte

## 5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

อาภัสรา กอบกัยกิจ (2536) การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักไทย ผัก ผลไม้ดอง แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว จากตลาดสดต่าง ๆ ได้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 50 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum* 40 สายพันธุ์, *Lactobacillus animalis*

7 สายพันธุ์, *Lactobacillus pentosus* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus marinus* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerance* 1 สายพันธุ์ ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* พบว่าส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 3.3-4.0 ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยดูความกว้างของบริเวณ ยับยั้งและวัดค่าการดูดกลืนแสงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เมื่อ ทดสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 36 ชม. ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่แยกได้จากหน่อไม้ ดอก ปรับให้มีความเป็นกรดต่าง 6.5 จะสามารถเกิดบริเวณใสบนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็งต่อเชื้อทดสอบ *B. subtilis* และ หนองเหนียวการเจริญของ เชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากที่สุด การทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำส่วนสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยการโครมาโตกราฟีอย่างต่อเนื่องบน ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 และเซฟาเดกซ์ จี-75 ตรวจสอบชนิด และขนาดของสารต่อต้านจุลชีพโดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าน่าจะเป็นสารไลโปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 ดาลตัน ใช้ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพ เป็นหัวเชื้อเตรียมโยเกิร์ตระดับห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบด้วยประสาทสัมผัสระดับการให้คะแนนของสีและเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตที่เตรียมด้วยเชืวดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่าโยเกิร์ตที่ทำจากโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด ค่าการยอมรับรวมของโยเกิร์ตทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 5.33

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) ได้ทำการแยกแลคติกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้และนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25723, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella typhimurium* 3230 ซึ่งเชื้อที่แยกได้นี้ได้สร้างสารยับยั้งเป็นกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และพบว่าบางชนิดสร้างสารยับยั้งซึ่งไม่มีคุณสมบัติเป็นกรดอินทรีย์ โดยเป็นสารพวกโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งคาดว่าสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็นแบคเทอรีโอซิน

ปาริชาติ พุ่มขจร และคณะ (2543) ได้ศึกษาถึงความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอรีโอซิน ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมัก โดยนำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 273 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักจำนวน 15 ตัวอย่าง มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ (indicator organism) 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเมื่อนำ culture supernatant ดังกล่าวมาปรับ pH 7 ปรากฏว่าที่แบคทีเรียแลคติกจำนวน 81 ไอโซเลท ที่ยังคงยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ และเมื่อเติมเอนไซม์อะเลสลงไป พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก จำนวน 37 ไอโซเลท ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเมื่อเติมเอนไซม์โปรติเนสลงไปอีก พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก

5 ไอโซเลท ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์บางชนิดได้ ซึ่งสามารถที่จะนำไปใช้ได้จริงในขั้นตอนการผลิตอาหารหมัก และอุตสาหกรรมการผลิตอาหารอื่นๆ

ธิดาทิพย์ วงศ์สุวรรณ และคณะ (2544) จากการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 2 ชนิดคือ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี swab paper disc และวิธี spot on lawn พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* จากการทดสอบด้วยวิธีการทั้งสองดังที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นจึงได้นำสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ใน culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทดังกล่าวไปศึกษาความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ pepsin และ protienase K ซึ่งปรากฏว่าสารดังกล่าวถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด และเมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทไปเทียบเคียงชนิด พบว่าเป็นเชื้อ *Streptococcus* ทั้ง 2 ไอโซเลท

ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ (2544) ได้ทำการ review ในเรื่องของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ที่มักใช้เป็นหัวเชื้อของอาหารหมักในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายชนิด เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารที่ช่วยในการปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น สารดังกล่าวได้แก่ สารพวกกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล อะเซทาลดีไฮด์ รูเทอริน และแบคทีเรียโอซิน เป็นต้น โดยสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้แตกต่างกัน

สมบุรณ์ ธนาสุภรณ์ (2544) เขียนบทความเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่พบในปลาร้าและปลาจ่อมโดยได้รายงานไว้ว่า อาหารหมักพื้นบ้านของไทยเช่น น้ำปลา บูด ชีวี่ว แหนม ปลาส้ม ส้มผัก หอยดอง ผักกาดดอง หอมดอง ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น มีรสเปรี้ยวเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกและช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ พบว่าในอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือต่ำมีกรดมากจะมีแบคทีเรียรูปร่างแท่งคือ แลคโตบาซิลลัส เพนโตซัส และ แลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม และพวกรูปร่างกลม เพติโอคอคคัส เพนโตซาเซ็นส ส่วนอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูง เช่น น้ำปลา บูดและ ชีวี่ว มีกรดน้อยจะพบแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเตตราจีโนคอคคัส แต่อย่างไรก็ตามอาหารหมักที่มีเกลือสูงแต่มีรสเปรี้ยวเช่น ปลาร้า ปลาจ่อมก็พบแลคโตบาซิลลัสหลายชนิด ซึ่งประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักอาหาร เช่น นมหมัก (โยเกิร์ต หรือ นมเปรี้ยว) โดยเชื้อจะผลิตกรดแลคติก กรดอะซีติก และเอทานอลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะเซทิล โพลีแซคคาไรด์ แบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะ สำหรับใช้เป็นสารถนอมอาหารเพื่อยับยั้งเชื้อโรคได้ และใช้เป็นเซลล์ที่มีชีวิตเป็นโพรไบโอติก (probiotic) เพื่อทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของโฮสต์และป้องกันการเกิดโรคท้องร่วง ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี ส่วนความสำคัญทางด้าน

สุขภาพได้รายงานว่าไม่ใช่แบคทีเรียกรดแลคติกทุกชนิดที่จะมีผลต่อสุขภาพ จะพบเพียงบางตัวเท่านั้น เช่น แลคโตบาซิลลัส และไบฟิโดแบคทีเรียบางชนิดที่มีบทบาทในลำไส้ในการช่วยลดโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ กลูโคสในเลือด ความดันและการบดเน่าในลำไส้ใหญ่ ในต่างประเทศนิยมใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัส แอซิโดฟิลลัส เป็นหัวเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยวหรือเชื้อผงสำหรับรักษาโรคในลำไส้ แลคโตบาซิลลัส แพลนท์ารัม มีผลต่อการสร้างแอนติบอดี แลคโตบาซิลลัส คาเซไอ เพิ่มความต้านทานของโฮสต์ต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เช่นเดียวกับเชื้อชนิดอื่นที่พบในอาหารหมักของไทยก็จะเข้าสู่ลำไส้โดยการบริโภคอาหารหมักดองต่าง ๆ เป็นประจำ ซึ่งอาจมีบทบาทในทางก่อโรคได้เช่นกัน

ชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา และคณะ (2545) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร โดยทำการคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักดอง ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดใน อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 73 ไอโซเลท และทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมี เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 21 ไอโซเลทสกัดสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhi* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Sarcina lutea* ATCC 9341 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคูณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคทีเรียโอซิน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพด้วยผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะนำไปสู่แนวทางในการพัฒนาต้านจุลชีพและสารถนอมอาหารจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย

Alakomi และคณะ (2000) ผลของกรดแลคติก ที่สามารถซึมผ่าน outer membrane ของ *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ถูกศึกษาโดยใช้ a fluorescent – probe uptake assay และใช้วิธีตรวจหา sensitize ของการแตกสลายของแบคทีเรีย(bacteriolysis) โดยใช้ตัวควบคุมคือ EDTA (a permeabilizer acting by chelation) และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งปรับความเป็นกรดต่ำสุดทำให้ตรงกับกรดแลคติก และมีการทดสอบในการแสดงออกของ KCN ด้วย ผลสุดท้ายจะเห็นว่ากรดแลคติกที่ความเข้มข้น 5 mM (pH 4) จะให้ผลที่ชัดเจนต่อความสามารถในการซึมผ่านของเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละสปีชีส์ ผลจากการทดสอบ fluorescent assay ให้ผลดีกว่า EDTA หรือ HCl หรือ HCl + KCN ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* การซึมผ่านของกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก ถูกยับยั้งโดย  $MgCl_2$  ความไวต่อการสลาย outer membrane ของ *Escherichia coli* และ serovar Typhimurium เมื่อใช้ Lactic acid + sodium dodecyl sulfate (SDS) จะมากกว่า HCl + SDS อย่างไรก็ดีตาม กรดทั้งสอง เมื่อเติม SDS และเติม Triton x-100 จะมีความไวต่อ *Pseudomonas aeruginosa* กรดนี้จะทำให้มีการปลดปล่อย

lipopolysaccharide จาก serovar Typhimurium ออกมาในสัดส่วนที่ค่อนข้างมากโดยสามารถวิเคราะห์ได้โดยการทำ electrophoresis และทำ fatty acid analysis ซึ่งจะแสดงให้เห็นเช่นกัน การปลดปล่อย lipopolysaccharide จาก outer membrane ที่เกิดจากการแตกตัวเกิดขึ้นได้ดีกว่า EDTA และ HCl ดังนั้นจะได้ว่าการแตกตัวมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพ(antimicrobial) ที่ pH ต่ำๆ ร่วมกับการซึมผ่านเข้าสู่ outer membrane ของ Gram- Negative Bacteria และอาจเกิดจาก effect ของ antimicrobial substances อื่นๆ

Tjoelker LW และคณะ (2000) รายงานการตรวจพบการผลิตโคตินเนสจากเห็ดที่ติดเชื้อ Aspergillus และได้สรุปโครงสร้างของโคตินเนสจากมนุษย์ ว่าอย่างน้อยต้องประกอบด้วย chitin binding domain โดยอยู่ทางด้าน C-terminal 49 ซึ่งถ้าส่วนนี้ขาดหายไปจะทำให้คุณสมบัติ chitin binding activity หายไป ส่วนของ chitin binding domain เป็นส่วนสำคัญที่จะไปจับและย่อยสลาย insoluble chitin ตรงส่วนผนังเซลล์ของเชื้อรา

Seliternikoff CP (2001) ได้ review เกี่ยวกับโปรตีนที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา (Antifungal proteins) ที่ผลิตออกมาโดยพืชที่ถูกกรุกรานจากเชื้อราหรือไวรัส ซึ่งพบมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน กล่าวคือ pathogenesis-related (PR) proteins ที่ถูกจัดแบ่งออกได้เป็น PR-1, 2, 3, 4, 5 และโปรตีนอื่น ๆ เช่น Defensins, Cyclophilin-like protein , Glycine/histidine-rich protein, RIPs, LTPs, Killer proteins เป็นต้น และหนึ่งในกลุ่มของ PR protein (PR-3) ก็คือ โคตินเนสสามารถป้องกันเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ด้วย เช่น *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Fusarium oxysporum* เป็นต้น

Elmedfah I. และคณะ (2010) รายงานการศึกษาในร่างกาย (in vivo) โดยใช้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีขายในท้องตลาดกับแบบดั้งเดิม ให้อาสาสมัครผู้หญิงที่มีสุขภาพดีรับประทานโยเกิร์ตที่มีแบคทีเรีย *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* , *S thermophilus*, *L. casei* วันละ 100 กรัมเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์และเพิ่มเป็น 200 กรัมในสองสัปดาห์ถัดมา เจาะเก็บเลือดเพื่อทดสอบการแสดงออกของ CD69 บน T lymphocyte โดยวิธี Flow cytometry และวัดความสามารถของ NK cell ในการทำลาย Target cell (K562) และวัดปริมาณการสร้างไซโตไคน์จาก Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มขึ้นของ CD69 บน Th cells และการหลั่งไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ IL-6 ในขณะที่ IL-10 ลดลงเล็กน้อย และการเพิ่มขึ้นจะยังคงมีอยู่แม้ว่าจะหยุดรับประทานผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

Christensen HR. และคณะ (2002) ศึกษาการกระตุ้นเซลล์เดนดริติกในหลอดทดลอง (in vitro) ทดสอบ โดยใช้ bone marrow derived DC ของหนูมาทดสอบกับแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ *L. reuteri* DSM12264, *L. plantarum* Lb1, *L. fermentum* Lb20, *L. casei* subsp. *alactus* CHCC3137, *L. plantarum* 299, *L. jhonsonii* La1 วัดการสร้างไซโตไคน์ และการแสดงออกของเครื่องหมายบนผิวเซลล์ พบว่า *L. reuteri* , *L. plantarum* Lb1, *L. fermentum* Lb20, *L. casei*, *L. plantarum* 299, *L. jhonsonii* La1 กระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-6, IL-12, TNF-

α ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กระตุ้น สำหรับการหลั่ง IL-10 ต้องใช้ปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าการหลั่งไซโตไคน์ข้างต้น ทุกสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ maturation marker( HLA-DR, CD86) บนผิวเซลล์เดนดริติกได้ บ่งชี้การเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติก และพบว่า *L. reuteri* สามารถยับยั้งความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่กระตุ้นเซลล์เดนดริติก ดังนั้นการปรับสภาวะการทำงานของ Th1 Th2 Th3 โดยเซลล์เดนดริติกต้องขึ้นกับแบคทีเรียประจำถิ่นและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกด้วย

Elmedfah I, et al (2010) ศึกษาโดยใช้ MoDCs ที่เพาะเลี้ยงจากโมโนซัยต์ ทดสอบกับแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้เซลล์ต่อแบคทีเรียในอัตราส่วน 1 cell: 10 CFU หรือเพาะเลี้ยงร่วมกับ Caco-2 cells (เป็น epithelial cell barrier) เป็นเวลา 24 ชม. วัดการสร้างไซโตไคน์ IFN-(, IL-1(, IL-10, IL-12 และวัดการแสดงออกของ CD80 CD83 D86 และ CD54 การสร้างไซโตไคน์และการแสดงออกของ CD86 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นเซลล์เดนดริติกด้วย *L. delbrueckii* แต่ *L. rhamnosus* เพิ่มการแสดงออกของ CD80 และ CD86 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์หรือโมเลกุลบนผิวเซลล์อื่นๆ ในกรณีที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกับ Caco-2 cell จะไม่กระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์หรือโมเลกุลบนผิวเซลล์เดนดริติก

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### I. เกี่ยวกับการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์

##### 1. วัสดุ อุปกรณ์

###### 1.1 อาหารที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย

1.1.1 อาหารที่ใช้มีทั้งประเภท แป้ง เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นม

1.1.2 อาหารประเภทแป้ง ได้แก่ เส้นขนมจีน ข้าวหมาก

1.1.3 อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ กะปิ กุ้งส้ม ไตปลา ปลาร้า ปลา หมู แหนมปลา แหนมหมู แหนมไก่

1.1.4 อาหารประเภท ผัก ผลไม้ ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ หัวผักกาดเค็ม กะหล่ำปลี มะม่วงสุก มะเขือเทศ มะพร้าว

1.1.5 ผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยว

###### 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase soy broth (TSB) และ Trypticase soy agar (TSA)

Mann Rogosa Sharpe (MRS) broth และ MRS agar

Luria-Bertani (LB) ประกอบด้วย Tryptone, yeast extract, sodium chloride (NaCl)

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM (สำหรับ *Streptomyces* spp.) (Yeast Extract , Malt Extract, Agar 2.0 %, Glucose)

ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 50 CHL (biomerieux)

###### 1.3 จุลินทรีย์

###### 1.3.1 จุลินทรีย์ดัชนี

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (TISTR 050)

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008)

*Candida albicans* DSM 70014 (TISTR 5239)

*Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887)

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (TISTR 781)

*P. aeruginosa* TISTR 1478

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517)

*Micrococcus luteus* TISTR 884

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ไอโซเลต 338, 403, 414, 539, 3576

*Salmonella typhimurium* TISTR 292

#### 1.3.2 แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ

*Brevibacillus laterosporus* SA14 แยกได้จากอากาศในมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

*Streptomyces* species แยกได้จากดินภายในมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ได้แก่ *Streptomyces* spp. CFJ2 (CK9), *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257 (CO4), *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-1334 (WU6) และ *Streptomyces* spp. B26 (WU10)

1.4 แผ่นยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ sulphamethoxazole trimethoprim 25 (SXT), carbenicillin 100 (CAR), amikacin 30 (AK), oxacillin 1 (OX), ampicillin 10 (AMP), penicillin G 10 (P), nitrofurantoin 300 (F), cephalotin 30 (KF), gentamicin 10 (CN)

#### 1.5 สารโปรไบโอติก

#### 1.6 แผ่นนับสำริ่จุรูป 3M Petrifilm™

#### 1.7 สารเคมี

1.7.1 ทดสอบ catalase test : 3% hydrogen peroxide

1.7.2 electrophoresis : Agarose gel

Hydrochloric acid

EDTA

Trisma Base

Lambda ( $\lambda$ )-DNA

#### 1.8 วัสดุอุปกรณ์

Pipette, L-shape rod, eppendorf tubes, centrifuge tubes ไม้จิ้มฟัน กระดาษกรอง ช้อนตักยา

#### 1.9 เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์

UV transiluminator

Spectrophotometer

High-speed refrigerated centrifuge

## 2. วิธีการดำเนินการวิจัย

### I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

#### 1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร(อาหารหมัก ผลไม้ และ /หรือ ผลิตภัณฑ์นม )

1.1.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม

1.1.2 นำตัวอย่างที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากันจนทั่ว บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

1.2 กระจายเชื้อลงบน TSA/MRS agar plate (ทำซ้ำ 2 plate)

- ดูดเชื้อจากข้อ 1.1.2 ปริมาตร 0.1 มล. ลงบน TSA plate (ทำซ้ำอีก 1 plate ลงบน MRS agar plate ) แล้วกระจายจนทั่ว agar โดยใช้ L-shape rod

1.3 บ่มเพาะ Plates ทั้งหมดจากข้อ 1.2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน 5-10 % CO<sub>2</sub>

1.4 สำหรับ Plate ที่มีเชื้อเจริญขึ้นมามาก ให้แตะ colony ที่บริเวณรอบ ๆ ไม่มีเชื้ออื่นเจริญขึ้นมาเพื่อทำ pure culture โดยใช้ needle เขี่ยเชื้อแล้วนำมา streak ลงบน MRS agar plate โดยวิธี streak plate method

1.5 บ่มเพาะ Plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน 5-10 % CO<sub>2</sub> เพื่อจะนำเชื้อไป ทดสอบ antimicrobial spectrum

การคัดเลือกโคโลนี : คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะ นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง มาทดสอบเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีที่ต้องการทดสอบมาป้ายบนกระดาษที่สะอาดหยด 3% ของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 หยดทับลงบนโคโลนีแล้วสังเกตการเกิดฟองภายใน 10 วินาที หากเกิดฟองแสดงถึงการทดสอบให้ผลบวกแต่หากไม่เกิดฟองแสดงถึงการทดสอบให้ผลลบ ทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบอะไมเลสลบไปย้อมสีแบบแกรม และเลือกเฉพาะโคโลนีที่ย้อมได้แกรมบวกรูปแท่ง ไปขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนปรากฏโคโลนีให้เห็น

#### 2. ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว

2.1 นำเชื้อที่คัดเลือกได้ในตอนต้นประมาณ 100 ไมโครเลท รวมถึงเชื้อ C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (เชื้อควบคุมการทดลอง) มาปรับเทียบให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

2.2 ถ่ายสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 19 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตรและภายในบรรจุไม้เสียบลูกชิ้นปราศจากเชื้อ (เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมผลลบ)

2.3 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลการเกิดก๊าซและการเกาะติดพื้นผิวบริเวณไม่เสียบลูกชิ้นและผิวด้านในหลอดทดลอง บันทึกผลการเจริญและสังเกตการเกาะติดพื้นผิวทุกวันเป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญและเกาะติดพื้นผิวเร็วที่สุด ปริมาณมากที่สุด และเกาะติดแน่นมากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาการมีชีวิตเหลือรอดในน้ำผลไม้

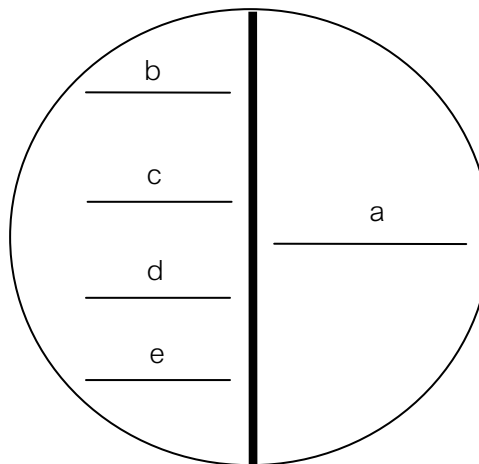
### 3. Antimicrobial spectrum

3.1 ตระ colony จากข้อ 1.5 ในหัวข้อ 1. แล้วขีดเป็นเส้นตรงกลางบน TSA agar plate จากขอบข้างหนึ่งไปยังขอบอีกข้างหนึ่งของ plate

3.2 บ่มเพาะ plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3 ตระเชื้อ *S. aureus* ด้วย loop แล้วขีดเป็นเส้นตรงเริ่มจากริมของเชื้อจากข้อ 3.2 (อย่าให้ loop สัมผัสกับเชื้อจากข้อ 3.2 ) ไปยังขอบ plate ที่อยู่ข้างเดียวกัน

3.4 ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3 แต่ใช้เชื้อ *L. plantarum* (a), *E. coli* (b), *B. Subtilis* (c), *P. aeruginosa* (d) และ *C. albicans* (e) โดยแบ่งเป็น 2 ข้าง ดังรูป



3.5 บ่ม plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3.6 สังเกตโดยดูรอยขีดเชื้อที่ติดกับเชื้อในข้อ 2.2 ว่ามีเชื้อเจริญขึ้นหรือไม่

### 4. ทดสอบ Activity ในการยับยั้งเชื้อ ของกรดแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี agar well diffusion assay

4.1 บ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

4.3 แยกเก็บส่วนใส กรองด้วย Millipore 0.45  $\mu\text{m}$  วัด pH ด้วย pH meter

4.4 นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบ antimicrobial activity กับ indicating strains ที่ปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland No. 0.5

4.4.1 swab indicating strain ที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง

4.4.2 เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม.

4.4.3 หยอดส่วนใสลงในหลุมดังกล่าว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4.4.4 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4.5 ตรวจผลการยับยั้งเชื้อ indicating strain โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

#### 5. การวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL

5.1.1 ใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 50 CHL (biomerieux) ในการทดสอบแยกชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทโดยมีขั้นตอนโดยย่อดังต่อไปนี้

1) เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ให้มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 2 ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ให้มาพร้อมกับชุดทดสอบ API 50 CHL แล้วนำไปหยดใส่ในช่องทดสอบบน strips ทุกช่องจำนวน 50 ช่องๆ ละ ประมาณ 120 ไมโครลิตร โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

2) หยดปิดทับช่องว่างที่เหลือด้วย mineral oil เพื่อให้เกิดสภาพไร้อากาศ แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนสีของอาหารในหลุมเป็นสีเหลืองและสีดำในหลุมที่ทดสอบ esculine ให้บันทึกเป็นบวก หากเป็นสีอื่นให้บันทึกผลเป็นลบ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เกิน 48 ชั่วโมง

5.1.2 นำผลการทดสอบที่ได้ไปวิเคราะห์แยกชนิดของเชื้อโดยใช้ซอฟต์แวร์ API 50 V. 5.1

#### 6. ความทนทานต่อระดับ pH 2-10

6.1 นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาปรับเทียบความขุ่นเทียบกับ McFarland No. 0.5 แล้วเติมลงไปในห้องอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 19 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่ปรับ pH เท่ากับ 2-11

6.2 นำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโตโดยดูความขุ่นและตะกอนเชื้อในหลอดทดสอบทุกหลอดที่มี pH ต่างๆ กัน และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมเชื้อเป็นชุดควบคุมการทดลองเพื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญ

## 7. ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

7.1 เตรียมสารแขวนลอยเชื้อที่คัดเลือกได้รวมทั้ง *L. plantarum* TISTR 050 ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.6% จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

7.2 นำแผ่นยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ sulphamethoxazole trimethoprim 25 (SXT), carbenicillin 100 (CAR), amikacin 30 (AK), oxacillin 1 (OX), ampicillin 10 (AMP), penicillin G 10 (P), nitrofurantoin 300 (F), cephalotin 30 (KF), gentamicin 10 (CN) ไปวางบนผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนยับยั้งรอบแผ่นยาแต่ละชนิด

## 8. ความทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส)

8.1 การเก็บรักษาเชื้อ : ถ่ายสารแขวนลอยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน 50% กลีเซอรอล ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

8.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ : นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนครบเวลา 1 เดือนแล้วมาขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญบนอาหารแข็ง MRS

## 9. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในน้ำผลไม้

### 9.1.1 การเตรียมน้ำผลไม้

1) ล้างผลไม้ 3 ชนิด คือ แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และมะนาวให้สะอาด ตัดแกนเปลือกและนำเอาเมล็ดออก จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คั้นเอาเฉพาะส่วนของน้ำผลไม้ชนิดละ 3.5 ลิตร ด้วยถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

2) วัดความหวานด้วยเครื่อง refractometer บันทึกผล

3) เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์จำนวน 200 ppm ลงไปในน้ำผลไม้แต่ละชนิดและนำมาต้มที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อปนเปื้อน

4) แยกบรรจุน้ำผลไม้แต่ละชนิดลงในขวดพลาสติกขาวขุ่นที่ปราศจากเชื้อที่ผ่านการกลั่นด้วยโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ขวดละ 225 มิลลิลิตร โดยบรรจุน้ำผลไม้แต่ละชนิดๆ ละ 12 ขวด รวม 36 ขวด

### 9.1.2 การเติมสารโปรไบโอติกลงในน้ำผลไม้

เติมสารโปรไบโอติกลงในน้ำผลไม้แต่ละขวดๆ ละ 4.5 กรัม รวม 12 ขวด และชุดที่ไม่เติมโปรไบโอติกจำนวน 12 ขวด สำหรับชุดควบคุมผลลบให้เตรียมเช่นเดียวกับข้างต้นแต่ไม่ต้องเติมเชื้อลงไป ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

### 9.1.3 การเติมแบคทีเรียโปรไบโอติกลงในน้ำผลไม้

เตรียมเชื้อที่คัดเลือกได้ให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $12 \times 10^8$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรด้วยการเทียบความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No.4 แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อเติมลงไปในน้ำผลไม้ทุกขวดๆ ละ 25 มิลลิเมตร ยกเว้นขวดควบคุมผลลบ จากนั้นนำน้ำผลไม้ทั้งหมดไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิต

9.1.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหลืรอดในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

นำน้ำผลไม้ที่ต้องการนับจำนวนเซลล์มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำเจือจางแบบ 10 เท่าใน 0.85% NaCl จนถึง  $10^{-4}$  นำไปตรวจนับแบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิตในน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยแผ่นนับสำเร็จรูป 3M Petrifilm™ โดยทำการตรวจนับในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ของการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณความเกี่ยวข้องของสารโปรไบโอติกที่มีต่อปริมาณการยู่รอดของเชื้อในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

### 10. ทดสอบ Activity ในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียโอซิน ด้วย well diffusion assay

นำส่วนใสจากข้อ 3.3 มาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 2N NaOH และปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4.

11. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก

#### กลุ่ม *Bacillus*

##### 11.1 การเตรียมแบคทีเรีย

11.1.1 แบคทีเรียดัชนี (indicator organism): *Staphylococcus aureus* TISTR 517

1) ขีด *S. aureus* TISTR 517 ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

2) นำไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ : เซลล์ควรมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น

##### 11.1.2 แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ

1) ขีดแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

2) นำไปย้อมสีแบบแกรมและย้อมสปอร์ เพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์และการเรียงตัวของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ : เซลล์ควรมีรูปท่อน สร้างสปอร์อยู่ข้างเซลล์

## 11.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

### 11.2.1 การเตรียมแบคทีเรียดังนี้

- 1) นำแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 (บ่มเลี้ยง 1 วัน) มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  Colony Forming Unit/ml)
- 2) ป้ายลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ด้วยสำลีพันก้านไม่ปราศจากเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
- 3) เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 หลุม (หลุมควบคุมและหลุมทดสอบ) ด้วยทูปปราศจากเชื้อขนาด 1000 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

### 11.2.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

- 1) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ *Brev. laterosporus* SA14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.
- 2) แบ่งสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube
- 3) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 4) นำส่วนใสที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

### 11.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

- 1) โดยวิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับข้อ 4.
- 2) โดยวิธี spot on lawn  
ทดสอบคล้ายกับ agar well diffusion ต่างกันตรงที่ไม่ต้องเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ใช้วิธีหยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ลงแบคทีเรียต้นนี้ไว้ก่อนหน้านี้ (ข้อ 2.3.1.1) และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

## กลุ่ม *Streptomyces* spp.

### 11.3 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

- 11.3.1 นำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาขีดลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนีและนำไปย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

11.3.2 นำเชื้อจากข้อ 11.3.1 ส่วนหนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นนำมาเก็บใน glycerol 15 % ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

#### 11.4 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ในรูป crude proteins

11.4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-7 วันแล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

11.4.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำให้เข้มข้นในรูปผงโดยใช้วิธี Lyophilization

11.4.3 นำผงที่ได้มาละลายด้วย PBS ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

#### 11.5 นำตะกอนเชื้อไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้วิธี Sonication

11.5.1 นำตะกอนเชื้อที่แยกได้จากข้อ 11.4.1 มาเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

11.5.2 นำไปทำให้เซลล์แตก โดยใช้ Sonicator ความถี่ 40 Hz เป็นเวลา 40 นาที โดยหล่อไว้บนน้ำแข็ง

11.5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

11.5.4 นำส่วนใสมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

#### 11.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อ *Streptomyces* spp.

11.6.1 วิธี Agar Plug Diffusion (ทดสอบจากวันไคโคโลนีของ *Streptomyces* spp.)

1) นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อดัชนี MRSA 339, 403, 414, 539, 3576 และ *S. aureus* TISTR 517 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แล้วปรับความขุ่นโดยเทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ  $1.8 \times 10^8$  CFU/ml

2) ใช้ sterile swab จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อดัชนีแต่ละชนิด และ swab กับผิวด้านในของหลอด แล้วหมุนให้พอกหมด ๆ นำมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA เป็น 3 ระบาย วางไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งที่อุณหภูมิห้อง

3) ใช้ทิปขนาด 1,000 ไมโครลิตรเจาะวันจากไตโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. จากข้อ 11.3.1 และใช้วันที่เจาะได้มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM เพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมแล้วนำชิ้นวันทั้งหมดไปวางลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA ในข้อข้างบน

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) สังเกตความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดัชนีโดยดูวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ agar plug

#### 11.6.2 ทดสอบจากวันรอบโคโลนีของ *Streptomyces* spp.

ทำตามขั้นตอนในข้อ 11.6.1 โดยเปลี่ยนจากการเจาะวันไตโคโลนีของเชื้อมาเป็นเจาะวันรอบๆโคโลนีของเชื้อแทน

## II การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV

1. บ่มเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 100 มล.
2. แบ่งใส่ sterile plates 2 plates plate ละ 25 มล.
3. นำไปวางไว้ใต้แสง UV เป็นเวลา 10 นาที
4. นำไปทำเจือจางประมาณ  $10^{-7}$  แล้ว นำความเจือจางที่  $10^{-6}$  และ  $10^{-7}$  มา spread ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ใน 5-10 %  $\text{CO}_2$
5. สำหรับ Plate ที่มีเชื้อเจริญขึ้นมาน้อย ให้เท SDA ปริมาตร 5 มล. ซึ่งหลอมและอุ่นที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ใส่เชื้อ *Candida albicans* ที่บ่มเลี้ยงใน TSB ปริมาตร 1 มล.
6. บ่มเพาะ Plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.
7. วัดขนาดสัดส่วนของ inhibition zone กับ colony ของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ผ่าเหล่า UV

## III การถ่ายยีนไคตินเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก

1. การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน
  - 1.1 เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS
  - 1.2 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เจริญในช่วง mid- logarithmic phase ด้วย shaking incubator
  - 1.3 การแยกเก็บเชื้อ

1.3.1 แชนเยนเชื้อจากข้อ 1.2 เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมา centrifuge เพื่อแยกเก็บตะกอน เชื้อที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง แชนเซลล์ในน้ำแข็ง

1.3.2 เติม 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM  $\text{CaCl}_2$  ที่เย็นจำนวน 30 มิลลิลิตร (ครึ่งหนึ่งของปริมาตรของเชื้อ) ลงบนเซลล์ เขย่าเบาๆ จนเซลล์ละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งอีก 5 นาที

1.3.3 แยกคอมพีเทนท์เซลล์โดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง

1.3.4 เติม 10 mM Tris-HCl pH 8.0 , 50 mM  $\text{CaCl}_2$  ที่เย็นจำนวน 4 มล. (1/15 ของปริมาตรตั้งต้น) ค่อยๆเขย่าจนเซลล์กระจายหมด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งอีก 30 นาที (อาจเพิ่มเวลาเป็น 12-24 ชม. ก็ได้ ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเพิ่มขึ้น 4-6 เท่า) เติม glycerol ให้ได้ความเข้มข้น 15 %

1.3.5 นำไปแช่แข็งที่ -30 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเกิน 3 วัน ) หรือนำไปใช้ได้ทันที

## 2. การนำ recombinant plasmid เข้าสู่ *Lactobacillus* host

2.1 สกัด recombinant chitinase gene (pHYB 43 ) จาก *E. coli* DH 5 $\alpha$  ด้วยวิธี alkaline lysis method แบบ large scale ดังนี้

2.1.1 ถ่าย overnight culture ของ เชื้อ *E. coli* DH $\alpha$  (pHYB43) ปริมาตร 1 มล. ใส่ใน eppendorf

2.1.2 ปั่นใน 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.1.3 เติม Solution I 100 ไมโครลิตร ทำให้เชื้อกระจายตัวโดยใช้ vortex mixer

2.1.4 เติม Solution II 200 ไมโครลิตร mix โดยกลับหลอด 2-3 ครั้ง

2.1.5 เติม Solution III 150 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าจะได้ตะกอนขาวจำนวนมาก

2.1.6 ปั่นที่ 13000 rpm 10 นาที เก็บ supernate ใส่ eppendorf ใหม่

2.1.7 ใส่ 0.7 V isopropanol แล้วผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอด 2-3 ครั้ง

2.1.8 ปั่นที่ 13000 rpm นาน 20 นาที เก็บตะกอน แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

2.1.9 นำไปละลายกับ TE 30 ไมโครลิตร แชนเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 หรือนำไปทำ agarose gel electrophoresis

2.2 นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 1.3.5 มาผสมกับ recombinant chitinase gene (pHYB 43) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่สกัดได้จากข้อ 2.1 แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว นำไป

heat shock โดยแช่ใน water bath 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง นาน 5 นาที

2.3 จากนั้น เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 1 มล. ลงไป

2.4 บ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge 5000 rpm, นาน 2 นาที แยกเก็บเซลล์แล้ว resuspend เพื่อนำไป spread ลงบน MRS agar plate ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.5 บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงใน 5-10 % CO<sub>2</sub> คัดเลือก transformants

### 3. ทดสอบการแสดงออกของยีนโคตินเนส

#### 3.1 ทดสอบโดยวิธีการขยี้เซลล์

นำโคโลนีของ transformants ที่ได้จากข้อ 2.5 (อายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง) 2-3 โคโลนี มาขยี้ด้วยแท่งแก้ว แล้วหยดทับด้วย 4-MUG substrate (active substrate) แล้วนำไปดูจุดเรืองแสงสีฟ้าสว่าง (light blue fluorescence ) ภายใต้เครื่อง UV transilluminator

#### 3.2 Electrophoresis

##### การทำ agarose gel electrophoresis

1. ชั่งอากาศาโรส 0.7 กรัม ในบัฟเฟอร์ TBE 100 มล. ต้มจนกระทั่งอากาศาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงบน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหยดดีเอ็นเอแล้ว

2. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ให้เจลแข็งตัว ตั้งเอาช่องที่หยดดีเอ็นเอออกจากนั้นเทบัฟเฟอร์ TBE ลงทั้งสองข้างของช่องจนกระทั่งท่วม

3. นำเอาดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 แล้วหยดลงในช่องที่เตรียมไว้บนอากาศาโรส

4. ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับ power supply โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก แรงเคลื่อน 10 โวลต์/ชั่วโมง ขนาดความยาวเจล จะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีเคลื่อนที่ไปเกือบถึงปลายสุดอีกข้างของเจล

5. ปิด power supply แล้วค่อย ๆ นำเจลออกจาก chamber แล้วแช่เจลลงใน staining solution (เอธิเดียมโบรไมด์) ประมาณ 15-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ใส่ถุงมือเพื่อป้องกันไม่ ให้ถูกกับเอธิเดียมโบรไมด์ )

6. ล้างสีออกในน้ำกลั่น เขย่าเบาๆ 15-30 นาที อาจจะทิ้งเจลไว้ในน้ำกลั่นค้างคืน

7. นำเจลไปส่องดูแถบต่าง ๆ ใต้

3.3 ทดสอบ Activity ในการย่อยสลายโคตินของโคตินเนส ที่สร้างจาก Transformants โดยวิธี well diffusion assay

3.3.1 บ่มเลี้ยง *L. plantarum* (negative control), pHYB43 (positive control) และ transformant ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

3.3.3 แยกเก็บส่วนใส กรองด้วย Millipore 0.45 ไมโครเมตร

3.3.4 นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบ Activity ดังนี้

1. เจาะหลุม Glycol chitin ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 ซม.

2. หยอดส่วนใสจากข้อ 3.2.3 ลงในหลุมดังกล่าวจนเต็มหลุม (ประมาณ 80 ไมโครลิตร )

3.3.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.6 ตรวจสอบการย่อยสลายไคติน ดังนี้

1) Inoculate CalCofluor White ปริมาณเล็กน้อยลงใน Tris-HCl pH 8.0

2) เทสารละลายให้ท่วม plate ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3) เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด

4) เติมน้ำให้ท่วม plate Rotate ไว้ 12 ชั่วโมง แล้วเทน้ำทิ้ง นำplate มาส่องด้วย UV transilluminator

3.4 ทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของไคตินเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay

3.4.1 นำส่วนใสที่ได้จาก ข้อ 3.2.3 มาทดสอบ Activity ดังนี้

1) swab indicating strains (*E. coli* , *S. aureus*, *B. subtilis*, *P.aeruginosa*, *M. luteus*) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 0.5 ลงบน TSA

2) เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 ซม. หยอดส่วนใส ลงในหลุมดังกล่าวจนเต็มหลุม (ปริมาตร 80 ไมโครลิตร )

3) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อ indicating strains โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

## II. เกี่ยวกับฤทธิ์ด้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

### 1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ human colon carcinoma cell line; Caco-2 cells (Cell Line Service, Germany)

1.2 เซลล์มะเร็งช่องปาก human mouth carcinoma cell line; CLS-354 cells (Cell Line Service, Germany)

1.3 เซลล์ผิวหนัง human squamous cell line (HaCaT) (p40-46) (Cell Line Service, Germany)

1.4 อาหารและสารเคมีสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์

1.4.1 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง Caco-2 cells

- 1) DMEM/Ham's F12 (PAA)
- 2) Fetal bovine serum (Biochrom AG)
- 3) Penicillin and streptomycin (Biochrom AG)
- 4) Glutamine (GIBCO)

1.4.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง CLS-354 cells

- 1) RPMI 1640 (PAA)
- 2) Fetal bovine serum (Biochrom AG)
- 3) Penicillin and streptomycin (Biochrom AG)
- 4) Glutamine (GIBCO)

1.4.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง HaCaT cells

- 1) DMEM (PAA)
- 2) Fetal bovine serum (Biochrom AG)
- 3) Penicillin and streptomycin (Biochrom AG)
- 4) Glutamine (GIBCO)

1.4.3 สารเคมีสำหรับการ trypsinization

- 1) 70% ethanol in water
- 2) PBS without  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$
- 3) 25% Trypsin/EDTA in HBSS, without  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  (GIBCO)

#### 1.4.4 สารเคมีสำหรับการนับ viable cells

- 1) 0.4% Trypan Blue Solution

#### 1.4.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

- 1) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - a tetrazole (MTT) (Sigma-alrich)

- 2) DMSO

- 3) ยาต้านมะเร็ง 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma-alrich)

- 4) สารเคมีอื่นๆ (HCl , NaOH)

#### 1.4.6 อาหารเลี้ยงเซลล์น้ำยาสำหรับแยกเม็ดเลือดขาว

- 1) Ficoll-hypaque (Robbins Scientific, Sunnyvale, USA)
- 2) Phosphate buffer saline (PAA Laboratories, Linz, Austria)
- 3) RPMI 1640 (PAA Laboratories, Linz, Austria)
- 4) Fetal calf serum (PAA Laboratories, Linz, Austria)
- 5) Penicillin/streptomycin (PAA Laboratories, Linz, Austria)

#### 1.4.7 สารเคมีสำหรับการกระตุ้นเซลล์และโมโนโคลนอลแอนติบอดี

- 1) Lipopolysaccharide (*E. coli* :RH 100) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 2) McFarland No.0.5 และ McFarland No. 1
- 3) Phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 4) Paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 5) PerCP -conjugated anti-CD69 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 6) PE-conjugated anti-CD80 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 7) PE-conjugated anti-CD86 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 8) FITC-conjugated anti-CD1c (BDCA-1) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)
- 9) APC-conjugated anti-CD303 (BDCA-2) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)
- 10) PerCP -conjugated anti-CD14 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 11) PerCP -conjugated anti-CD19 (Becton Dickinson, San Jose, USA)

#### 1.5 อุปกรณ์พื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยา

- 1.5.1 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร

- 1.5.2 ไม้พันสำลี

- 1.5.3 ขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

1.5.4 ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร

1.5.5 หลอดทดลอง และ Rack วางหลอดทดลองขนาด 13x100, 25x150 และ 50x150 มิลลิเมตร

1.5.6 Loop

1.5.7 Needle

1.5.8 ตะเกียงบนเสน

1.5.9 ขวดใส่ 70 % alcohol

1.5.10 เครื่องปรับเทียบความขุ่น Macfarland No 0.5

1.5.11 กระดาษกรองขนาดรูผ่าน 0.5 ไมโครเมตร

1.5.12 Syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร

1.5.13 สำลีก้อน

1.5.14 ถุงมือ

1.6 อุปกรณ์พื้นฐานทางด้านการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

1.6.1 กระดาษชำระ

1.6.2 Automatic pipette และ Tips ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.6.3 Tissue culture flasks

1.6.4 Serological pipette ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.6.5 Microtiter plate ก้นแบน (4 หลุมและ 24 หลุม)

1.6.6 Microcentrifuge tubes

1.6.7 Cuvett

1.6.8 Millipore filter ขนาดรูผ่าน 0.45 ไมครอน

1.7 อุปกรณ์สำหรับการทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

1.7.1 Automatic pipette ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.7.2 Tips สำหรับ automatic pipette ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.7.3 Serological pipette ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.7.3 ขวด Duran ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.7.4 ปีกเกอร์ ขนาด 50, 150, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.7.5 Falcon tubes ขนาด 5 มิลลิลิตร

1.7.6 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.7.7 หลอดเก็บเลือดที่มีเฮพารินเป็นสารกันเลือดแข็ง

## 1.8 เครื่องมือ

- 1.8.1. Shaking incubator (Cocono CH30)
- 1.8.2 Autoclave (Tomy-pressure steam sterilizer ES-315)
- 1.8.3 Hot Air Oven (WTB BINDER FD, Thailand)
- 1.8.4 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- 1.8.5 Inverted phase contrast microscope (Nikon)
- 1.8.5 Inverted phase contrast microscope (Nikon)
- 1.8.6 Microwave (Sharp, Japan)
- 1.8.7 Centrifuge (Thermo electron corporation, France)
- 1.8.8 CO<sub>2</sub> incubator (Thermo electron corporation, France)
- 1.8.9 Biological safety cabinet class 2 (Heraeus, Germany)
- 1.8.10 Ultrasonic processor VCX-750 Watt (vibra cell<sup>TM</sup>)
- 1.8.11 Refrigerated centrifuge (Thermo electron corporation, France)
- 1.8.12 Lyophilizer (EYELA FDU 2100, Japan)
- 1.8.13 Biohazard Laminar flow (Heraeus, Germany)
- 1.8.14 Sonicator (SONIC and Material, INC, USA)
- 1.8.15 Incubator (WTB BINDER FD, Thailand)
- 1.8.16 Spectrophotometer (Thermo Spectronic, USA)
- 1.8.17 Hemacytometer
- 1.8.18 Flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA)

## 2. วิธีดำเนินการทดลอง

### I. การทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells)

#### 1. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง Caco-2 cells (p34-52)

1.1 เลี้ยง Caco-2 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM:Ham's F12 ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum, 1 % penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% โดยมีจำนวนเซลล์  $3 \times 10^4$  เซลล์ ใน tissue culture flasks ซึ่งมีพื้นที่ 75 cm<sup>2</sup>

1.2 เลี้ยงไว้ 2 วัน ก่อนที่จะทำการทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

## 2. การ Trypsinization

2.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก flask แล้วเติม PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน flask และนำไปบ่มที่ CO<sub>2</sub> incubator 37 องศาเซลเซียสปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และ ความชื้น 95 % เป็นเวลา 5 นาที

2.2 ดูด PBS ออก แล้วเติม 0.25 % Trypsin/EDTA ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ CO<sub>2</sub> incubator 37 องศาเซลเซียสปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และ ความชื้น 95 % เป็นเวลา 5 นาที เคาะให้เซลล์หลุดออก แล้วนำไปดูภายใต้กล้อง

2.3 เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นดูดลงให้เข้ากัน

2.4 ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.5 เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน flask กลับล้างแล้วดูดใส่ใน microcentrifuge tube

2.6 นำ microcentrifuge tube บั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.7 ดูดส่วนใสทิ้งและเติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.8 แบ่งส่วนหนึ่งไปนับเซลล์และอีกส่วนนำไปถ่ายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง

## 3. ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ตั้งต้นเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ

3.1 นำ cell suspension ออกมา 100-200 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube ภายใต้สภาวะปราศจากเชื้อ

3.2 เติม PBS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เซลล์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และสี 0.4 % trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf ผสมให้เข้ากัน (dilution factor = 100/30)

3.3 ทำความสะอาด Hemocytometer และเติม cell suspension ลงใน chamber ทั้งสองข้าง ประมาณ 5-10 ไมโครลิตร และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10 เท่า นับในช่องนับเม็ดเลือดขาว (4 ช่อง)

3.4 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (มองเห็นสว่าง) และที่ไม่มีชีวิต ควรนับไม่ต่ำกว่า 200 cells เพื่อเพิ่มความถูกต้องของการนับเซลล์

3.5 คำนวณปริมาณของเซลล์ทั้งหมดเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

$$\text{จำนวนเซลล์ (cell/มิลลิลิตร)} = \text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ 1 ช่อง} \times 10^4 \times \text{Dilution factor}$$

3.6 คำนวณปริมาตรของ suspended cells ที่จะใส่ตั้งต้นเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์  $3 \times 10^4$  เซลล์ต่อพื้นที่ 2.0 ตารางเซนติเมตร ใน 24 well plate

#### 4. การเติมเซลล์ลงหลุม

4.1 ดูดเซลล์ใส่ในแต่ละหลุมจำนวน  $3 \times 10^4$  เซลล์ ตามปริมาตรที่คำนวณได้

4.2 นำไปบ่มที่ CO<sub>2</sub> incubator 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 5. การเตรียมแบคทีเรีย

5.1 แบคทีเรียดัชนี (indicator organism): *S. aureus* TISTR 517 และ *E. coli* TISTR 887)

5.1.1 นำแบคทีเรียดัชนีแต่ละชนิดจาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.2 นำไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.2 แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (test strain): *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), *L plantarum* TISTR 050 (Lp), *L. plantarum* 1 T9 (T9) และ *E. faecium* N15 (N15)

5.2.1 ปิเปตต์เชื้อแต่ละสายพันธุ์จาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

5.2.2 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมาขีดบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

5.2.3 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมายืนยันเชื้อโดยการย้อมสีแบบแกรมและทำการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์อะลาเลส โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

5.2.4 แยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร. ในหลอดทดลองขนาด 16×100 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง

## 6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion assay

### 6.1 การเตรียมแบคทีเรียด้วยวิธี

6.1.1 นำโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวิธีที่บ่มเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH 1 วัน มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml)

6.1.2 ป้ายลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ด้วยสำลีพันก้านไม้ ปราศจากเชื้อตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

6.1.3 เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH 7 หลุม (หลุมควบคุม 1 หลุม และหลุมทดสอบ 6 หลุม) ด้วยทิวปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

### 6.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

6.2.1 ดูดแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 5. มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) ใน 0.85% NaCl (sterile) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิตร (2% ของอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่)

6.2.2 นำสารแขวนลอยเชื้อที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิตร ใส่ในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 250 มิลลิตร โดยเลี้ยงเชื้อละ 4 ขวด จะได้ทั้งหมด 24 ขวด และอีก 4 ขวดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อทดสอบ (ใช้สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม) จะได้ทั้งหมดเป็น 28 ขวด บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

6.2.3 โดยในแต่ละวันให้ทำการแบ่งสารแขวนลอยจากขวด Duran ในข้อ 6.2.2) ออกมาขวดละ 1 มิลลิตร ลงในหลอด microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

6.2.4 แยกน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion assay ในข้อ 6.2.3 ต่อ โดยจะทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ ข้อ 3-4 ทุกๆ วันเป็นระยะเวลา 5 วัน

### 6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

6.3.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อและที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใส่ในหลุมปริมาตร 80 ไมโครลิตร

6.3.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ของเหลวซึมผ่านเข้าไปในเนื้อวุ้นจนหมดแล้วจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.3.3 สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี

## 7. การเตรียมเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

### 7.1 เมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

7.1.1 ดูดแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 5. มาปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน 0.85% NaCl (sterile) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร (2% ของอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่)

7.1.2 นำสารแขวนลอยเชื้อที่ปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร. ใส่ในขวด Duran ขนาด 250 ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 250 มิลลิลิตร. โดยเลี้ยงเชื้อละ 4 ขวด จะได้ทั้งหมด 24 ขวด และอีก 4 ขวดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (ใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS) จะได้ทั้งหมดเป็น 28 ขวด บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

7.1.3 เมื่อครบเวลาให้ทำการแบ่งสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดใส่ในหลอด centrifuge tube ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

7.1.5 จากนั้นนำน้ำส่วนใสมาแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน ส่วนหนึ่งไม่ปรับ pH คือมี pH เป็นกรดอีกส่วนหนึ่งนำไปปรับ pH ให้เป็นกลาง แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี lyophilization

### 7.2 Lyophilization

7.2.1 นำเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่เตรียมได้จาก ข้อ 7.1.5 ซึ่งมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร.

7.2.2 นำ flask ไปทำ pre-freeze แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

7.2.3 นำ flask ไปเข้าเครื่อง lyophilizer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการระเหิดแห้งจนกลายเป็นผง

7.2.4 นำผงเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้มาชั่งแล้วละลายด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 1 g/ml แล้วทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (BioRad)

7.2.5 เมื่อทราบปริมาณโปรตีนของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละตัวแล้วนำไปกรองผ่าน filter ขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร

7.2.6 นำเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 1 mg protein/ml และ 0.5 mg protein/ml และนำไปทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells)

## 8. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (BioRad)

### 8.1 การเตรียม working solution

8.1.1 ผสม stock solution 10 มิลลิลิตร กับ deionized water (DI) 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:4)

8.1.2 นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ในตู้เย็นโดยไม่ให้โดนแสง

### 8.2 การเตรียม standard concentration

8.2.1 Standard ที่ใช้คือ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.09 0.18 0.36 0.73 และ 1.45 mg protein/ml

8.2.2 คำนวณหาปริมาตรของ standard concentration จาก stock ความเข้มข้นเริ่มต้น 1.45 mg protein/ml โดยใช้สูตร  $M_1V_1 = M_2V_2$  โดย

$M_1$  คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของ BSA

$M_2$  คือ ความเข้มข้นของ BSA ที่ต้องการเตรียม standard

$V_1$  คือ ปริมาตรเริ่มต้นของ BSA

$V_2$  คือ ปริมาตรรวมทั้งหมดที่ต้องการใช้

| ปริมาตร BSA standa (1.45 mg protein/ml)<br>(ml) | น้ำกลั่น (ml) | ความเข้มข้นสุดท้าย<br>(mg protein/ml) |
|-------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 0.06                                            | 0.94          | 0.09                                  |
| 0.12                                            | 0.88          | 0.18                                  |
| 0.25                                            | 0.75          | 0.36                                  |
| 0.50                                            | 0.50          | 0.73                                  |
| 1.00                                            | -             | 1.45                                  |

### 8.3 การวัดปริมาณโปรตีน

8.3.1 ดูด standard หรือ sample ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ working solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

8.3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟและคำนวณเป็นความเข้มข้นของโปรตีนในหน่วย mg protein/ml

## 9. การทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้

9.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ lyophilization และกรองด้วยตัวกรอง (filter) แล้ว และเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่าน

การ lyophilization และกรองด้วย filter แล้วทั้งหมด 7 ตัวอย่างมาเจือจางแบบ two folds dilution ในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วผสมให้เข้ากัน โดยความเข้มข้นที่ต้องการ คือ 0.003 0.006 0.0125 และ 0.025 mg protein/ml

9.2 นำแต่ละค่าการเจือจางของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งอีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ PBS ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง (ปริมาตรของ PBS ที่ใช้เท่ากับปริมาตรของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง) และกลุ่มที่ใช้อาหาร DMEM:Ham's F12 ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

9.3 นำไปบ่มใน CO<sub>2</sub>-incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.4 เตรียม 0.5 mg/ml ของ MTT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณที่มากและนานเนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

9.5 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไป 1,000 ไมโครลิตร

9.6 นำไปบ่มใน CO<sub>2</sub>-incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.7 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 0.5 mg/ml MTT ที่ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 500 ไมโครลิตร

9.8 นำไปบ่มใน CO<sub>2</sub>-incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมตาบอไลต์

9.9 เมื่อครบเวลาเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกไป แล้วคว่ำ 24 well plate ลงบนกระดาษซับเพื่อเอาอาหารที่เหลือออก

9.10 เติม 1,000 ไมโครลิตร ของ DMSO เพื่อไปละลาย formazan (MTT metabolic product) ออกมา แล้วผสม formazan ที่ออกมากับ DMSO ให้เข้ากัน

9.11 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm. แล้วหักลบค่าที่ได้จากการดูดกลืนแสงที่ 670 nm. ทำการทดสอบ 2 ครั้งโดยมีการทำซ้ำครั้งละ 2 การทดสอบย่อย

## II. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี Cravioto's adapted method

### 1. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

1.1 นำแบคทีเรียทดสอบมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm/นาที เป็นเวลา 10 นาที

1.2 เทส่วนใสที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

1.3 ปั่นล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย Cold – PBS ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm/นาที เป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง

1.4 แบ่งสารแขวนลอยเชื้อจากข้อ 1.3 มาปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) ด้วย PBS

1.5 หลังจากนั้นเติม DMEM: Ham's F12 ซึ่งมี 10 % FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะลงไป เพื่อปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml

## 2. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยง Caco-2 cells (passage number 34-52) เลี้ยง Caco-2 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM:Ham's F12 ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum, 1 % penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% โดยมีจำนวนเซลล์  $5 \times 10^5$  เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีพื้นที่ 21 cm<sup>2</sup>

2.2 เลี้ยงไว้ 3 วันหรือจนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ประมาณ 80 - 90 %) ก่อนที่จะทำการทดสอบความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี Cravioto's adapted method

## 3. ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการเกาะติดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (adhesion) กับเซลล์มะเร็งลำไส้

3.1 นำเซลล์ที่เตรียมจากข้อ 2 ไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS

3.2 เติม 2 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM: Ham's F12 ซึ่งมี 10 % FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะ

3.3 เติม 1 มิลลิลิตร ของเซลล์แบคทีเรียที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียได้  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml ลงในเซลล์

3.4 บ่มไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.5 เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง

3.6 Fix เซลล์ด้วย cold – ethanol แล้วย้อมด้วยสี Giemsa อัตราส่วน 1:20 (ละลายใน PBS) ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

3.7 ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.8 ศึกษาดูการเกาะติดของแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการสุ่มนับทั้งหมด 20 fields แล้วทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ซึ่งมีเกณฑ์กำหนดดังนี้คือ

Non adhesive : พบการเกาะติดของแบคทีเรีย < 40 เซลล์ / 20 fields

Adhesive : พบการเกาะติดของแบคทีเรีย 40 – 100 เซลล์ / 20 fields

Strongly adhesive : พบการเกาะติดของแบคทีเรีย > 100 เซลล์ / 20 fields

### III. ศึกษาการไทการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส

#### 1. ขั้นตอนการเตรียมแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

1.1 นำแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 จาก 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2 นำโคโลนีที่ปรากฏขึ้นในข้อ 1.1) มายืนยันความถูกต้องของเชื้อ โดยการย้อมสีแบบแกรม ควรติดสีแกรมบวกรูปท่อนและย้อมสีสปอร์ควรติดสีเขียวของ malachite green

1.3 เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25x150 มิลลิเมตร ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.4 ดูดเชื้อจากข้อ 1.3 มา 4 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด และอีก 10 ขวด ไม่เติมเชื้อ บ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5 แบ่งสารแขวนลอยเชื้อในข้อ 1.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube

1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

1.7 นำส่วนใสที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 ด้วยวิธี agar well diffusion

1.8 ทำซ้ำข้อ 1.5–1.7) ทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน จนกว่าจะเกิดฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517

#### 2. การเตรียมแบคทีเรียตัวชี้ *S. aureus* TISTR 517

2.1 ขีด *S. aureus* TISTR 517 ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.2 นำไปย้อมสีแบบแกรม เพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเซลล์ควมมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวคล้ายพวงอุ้งน

2.3 นำแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามสภาวะในข้อ 1) มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  Colony Forming Unit/ml)

2.4 ป้ายสารแขวนลอยเชื้อในข้อ 1.3) ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA ด้วยสำลีพันก้านไม่ปราศจากเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

2.5 เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 หลุม (หลุมควบคุมและหลุมทดสอบ) ด้วยทิวปปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 ด้วยวิธี agar well diffusion

3.1 หยอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ใส่ลงในหลุมควบคุม และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่บ่มเลี้ยงเชื้อจนเกิดฤทธิ์ยับยั้งมาหยอดในหลุมทดสอบ

3.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารผ่านเข้าเนื้อวุ้นจนหมด แล้วจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมที่เติมสารทดสอบ

4. ขั้นตอนการเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth)

4.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 แล้วมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.2 นำน้ำส่วนใสไปตกตะกอนโปรตีนชีวสาร ด้วย 80% ammonium sulfate

5. ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14

5.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน มาทำการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ดังนี้

5.2 นำสารละลายในข้อ 5.1 ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

5.3 ตะกอนมาละลายด้วย PBS โดยเติมครั้งละ 1 มิลลิลิตร จนตะกอนละลายหมด

6. ขั้นตอนการทำ dialysis

6.1 ใส่สารละลายโปรตีนชีวสารในข้อ 5.3) ลงในถุง dialysis ที่มีขนาดรูผ่าน 3.5 กิโลดาลตันที่เปียกชุ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมกวนเบาๆ ตลอดเวลา

6.2 เปลี่ยน PBS ทุกๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 3 ครั้ง จากนั้นวางแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน PBS พร้อมกวนตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.3 นำสารละลายในถุง dialysis ปั่นเหวี่ยงที่ refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

6.4 แยกส่วนใสออกเพื่อนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ทดสอบวัดปริมาณโปรตีนของชีวสารด้วยวิธี Bradford

7. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ human oral squamous carcinoma (CLS-354 cells)

7.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้อาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมด้วย fetal bovine serum ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (final concentration 10% v/v), 200 มิลลิโมลาร์ ของ glutamine ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (final concentration 2 มิลลิโมลาร์ ) และ 100 หน่วย penicillin/streptomycin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (final concentration 1 หน่วย)

7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเตรียม flask ที่มีพื้นที่ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 7.1) จำนวน 10-12 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์มะเร็งช่องปากประมาณ  $1 \times 10^6$  cells ใส่ลงในอาหาร แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและความชื้น 95% เลี้ยงไว้ 24-48 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ

#### 8. ขั้นตอนการทำ MTT

8.1 เตรียมเซลล์มะเร็งช่องปาก จำนวน  $1 \times 10^5$  cells/well ทำการเพาะเลี้ยงใน 24 well plate บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8.2 เตรียม MTT 0.5 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมให้เข้ากัน ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณที่มากและนานเนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

8.3 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลท์

8.4 เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกให้หมด (ดูดออกเบา ๆ เพื่อไม่ให้เซลล์ฟุ้งกระจายขึ้นมา)

8.5 เติม 1,000 ไมโครลิตร ของ DMSO เพื่อไปละลาย formazan ออกมา แล้วผสมให้เข้ากัน

8.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm แล้วหักลบค่าที่ได้ออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 670 nm

#### 9. ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์และเตรียมเซลล์

9.1 ภายใต้อุณหภูมิปราศจากเชื้อ นำเซลล์มะเร็งช่องปากมา 20 ไมโครลิตร เติมลงใน PBS 70 ไมโครลิตร

9.2 เติม 0.4 % trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมโดยการปิเปตเบา ๆ

9.3 ทำความสะอาด Hemocytometer และ cover slip

9.4 นำ cover slip วางไว้บน chamber

9.5 เติม cell suspension ลงใน chamber ทั้งสองข้าง ประมาณ 5-10 ไมโครลิตร และส่องภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 20 เท่า

9.6 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (มองเห็นสว่าง) และที่ไม่มีชีวิต (ถูกย้อมให้เป็นสีน้ำเงิน ประมาณ 200-300 cells ใน 4 ช่องนับเม็ดเลือดขาว)

9.7 คำนวณปริมาตรของ suspended cells เพื่อให้มีจำนวนเซลล์  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อพื้นที่ 1.88 ตารางเซนติเมตร (24-well plate) แล้วเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหุลุมละ 500 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 %

9.8 เมื่อครบเวลานับอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารใหม่ที่ผสมกับชีวสารจาก *Brev. leterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.9 เก็บเซลล์ที่เหลือรอดจากการทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจาก *Brev. leterosporus* SA14 แล้วนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์

9.10 เก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ ยีน *Bcl-2* และยีน *p21* โดยวิธี RT-PCR

#### 10. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* โดยวิธี Real Time PCR

10.1 ขั้นตอนการเตรียม Total RNA จากเซลล์มะเร็งช่องปากที่ถูกทดสอบด้วยชีวสาร โดยใช้ RNeasy Minikit (Qiagen, Germany)

10.2 นำเซลล์มะเร็งช่องปากที่มีปริมาณ  $3 - 4 \times 10^6$  เซลล์ มาสกัด RNA

10.3 เติม Buffer RLT 350 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ  $\beta$ -Mercaptoethanol 3.5 ไมโครลิตรแล้วเพื่อให้เซลล์แตก หลังจากนั้นผสมเซลล์กับน้ำยาให้เข้ากัน ปิเปิดส่วนผสมกับเซลล์ลงใน QIA shredder spin column ที่สวมอยู่ข้างบนหลอด collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,300 รอบต่อนาที (full speed) เป็นเวลา 2 นาที

10.4 ตั้ง QIA shredder spin column ส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม 70% ethanol ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในส่วนผสมในหลอด collection tube ด้านล่างเพื่อตกตะกอน RNA แล้วผสมให้เข้ากัน (ระวังอย่าให้เกิดฟอง)

10.5 ปิเปิดส่วนผสมจากข้อ 1.3) มาใส่ลงใน RNeasy spin column ที่สวมอยู่ข้างบนหลอด collection tube อันใหม่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

10.6 จากขั้นตอนที่ 4 RNA จะติดอยู่บน RNeasy spin column แล้วปิเปิดของเหลวส่วนล่างที่กั้นหลอด collection tube ทิ้งไป

10.7 นำ RNeasy spin column ซึ่งมี RNA อยู่สวมเข้ากับ collection tube อันเก่าจากขั้นตอนที่ 5 หลังจากนั้นเติม RW1 buffer ลงไป 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

10.8 นำ RNeasy spin column ส่วนบนออก แล้วปิเปิดของเหลวส่วนล่างที่กั้นหลอด collection tube ทิ้งไป

10.9 เติม buffer RPE ที่ผสมกับ absolute ethanol แล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไป จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

10.10 ทำซ้ำเหมือนกับข้อ 10.8) 2 ครั้ง และครั้งสุดท้ายใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง 2 นาที

10.11 นำ RNeasy spin column ส่วนบนออก มาใส่ใน collection tube อันใหม่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,300 รอบต่อนาที (full speed) เป็นเวลา 1 นาที

10.12 นำ RNeasy spin column ส่วนบนออกมาใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RNase-free water ลงไป 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ก็จะได้ Total RNA

10.13 ทำการวัดปริมาณ RNA โดยเจือจาง RNA ด้วย RNase-free water ในสัดส่วน 1:10 (RNA 1 ไมโครลิตร: RNase-free water 9 ไมโครลิตร) แล้วจึงนำไปวัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Thermo scientific NANODROP 1000 Spectrophotometer) จากนั้นก็นำ RNA ที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

#### 11. ขั้นตอนการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA

11.1 เตรียม master mix โดยแต่ละตัวอย่างมีปริมาณ RNA 10 ไมโครกรัม ดังตารางที่ 1

11.2 นำไปป้อนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

11.3 ทำการวัดปริมาณ cDNA โดยเจือจาง cDNA ด้วย RNase-free water ในสัดส่วน 1:10 (cDNA 1 ไมโครลิตร: RNase-free water 9 ไมโครลิตร) ที่ได้ไปวัดปริมาณในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Thermo scientific NANODROP 1000 Spectrophotometer) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

| ส่วนประกอบ                                           | ปริมาตร      | ความเข้มข้นสุดท้าย                   |
|------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| 10 เท่า Buffer RT                                    | 2.0 $\mu$ l  | 1 เท่า                               |
| dNTP Mix (5 mM each dNTP)                            | 2.0 $\mu$ l  | 0.5 mM each dNTP                     |
| Oligo-dT primer (10 $\mu$ M)                         | 2.0 $\mu$ l  | 1.0 $\mu$ l                          |
| RNase inhibitor (10 units/ $\mu$ l)                  | 1.0 $\mu$ l  | 0.5 units (per 20- $\mu$ l reaction) |
| Omniscrypt Reverse Transcriptase (40 units/ $\mu$ l) | 1.0 $\mu$ l  | 2 units (per 20- $\mu$ l reaction)   |
| RNase-free water                                     | Variable     |                                      |
| Template RNA                                         | Variable     |                                      |
| ปริมาตรรวม                                           | 20.0 $\mu$ l |                                      |

#### 12. ขั้นตอนการทำ RT-PCR โดยวิธี TaqMan Gene Expression Assay

12.1 เตรียม master mix โดยใช้ส่วนผสมต่างๆ คือ 1.1) 20 เท่า TaqMan Universal PCR ที่มี probe และ primers สำหรับยีน *Bcl-2* ยีน *p21* หรือ ยีน  $\beta$ -actin 1.2) 2 เท่า TaqMan® Gene Expression Master Mix และ 3) DNase free water ดังตารางที่ 2

12.2 ผสมส่วนผสมในข้อ 12.1) ให้เข้ากันแล้วเติมลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate

12.3 เติม cDNA 1  $\mu$ l ลงในแต่ละหลุมทดสอบที่มี master mix ของแต่ละยีนอยู่แล้ว

12.4 นำส่วนผสมดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* เปรียบเทียบกับยีน  $\beta$ -actin โดยใช้เครื่อง Real Time PCR จากบริษัท Applied Biosystems รุ่น 7300

| ส่วนประกอบในการทำ PCR                                                                        | ปริมาตร      | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| 20 เท่า TaqMan® Gene Expression Assay สำหรับยีน <i>Bcl-2</i> , <i>p21</i> และ $\beta$ -actin | 1.0 $\mu$ l  | 1 เท่า             |
| 2 เท่า TaqMan® Gene Expression Master Mix                                                    | 10.0 $\mu$ l | 1 เท่า             |
| cDNA template (500 ng/ $\mu$ l)                                                              | 1.0 $\mu$ l  | 500 ng             |
| DNase-free water                                                                             | 8.0 $\mu$ l  |                    |
| ปริมาตรรวม                                                                                   | 20.0 $\mu$ l |                    |

### 13. ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน phosphor-ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2

13.1 นำตะกอนเซลล์มะเร็งช่องปากซึ่งทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 มาทำให้เซลล์แตกโดยวิธี sonication ใน buffer ซึ่งประกอบด้วย 150 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM PMSF (Calbiochem, Germany), 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Calbiochem, Germany), 0.01 M NaF, 0.014 mM chymostatin (Calbiochem, Germany), 99.3 KU/ml aprotinin (Calbiochem, Germany) และ 0.01 mg/ml pepstatin A (Calbiochem, Germany)

13.2 นำ cell lysate ที่ได้ไปปั่นที่ 10000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatants ส่วนบนไปวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford

13.3 นำ 80 ไมโครกรัม ของโปรตีนจากข้อ 13.2 มาละลายใน 2 เท่าของ Laemmli sample buffer (BioRad, USA) แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13.4 นำโปรตีนที่เตรียมจากข้อ 13.3 ไปแยกแถบของโปรตีนพร้อมด้วย positive control [(p44/42 MAPK (Erk1/2) Control Cell Extracts)] (Cell Signaling Technology, USA) โดยวิธี SDS/PAGE electrophoresis โดยใช้ 10% polyacrylamide gel (BioRad, USA)

13.5 นำโปรตีนซึ่งถูกแยกแล้วใน gel ตามข้อ 13.4 ถ่ายลงบน PVDF membrane (BioRad, USA)

13.6 หลังจากนั้นให้ทำการ block แผ่น membranes ด้วย 5% non fat dry milk (BioRad, USA) ที่เตรียมใน 1XTBST ซึ่งมีองค์ประกอบ คือ 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 137 mM NaCl และ 0.1% Tween 20 (Biochemica, Germany) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

13.7 ล้างแผ่น membranes ด้วย 1 เท่าของ TBST buffer หลังจากนั้นบ่มด้วย anti-ERK1/2 (1:5000) (Cell Signaling Technology, USA) ที่เตรียมใน 5% bovine serum albumin (BioRad, USA) ใน 1 เท่าของ TBST ส่วน anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, USA) (1:1000) ให้เตรียมใน 5% BSA ใน 2 เท่าของ TBST ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ internal control ใช้ anti  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology, USA) (1:5000) เตรียมใน 5% BSA ใน 1 เท่าของ TBST ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13.8 หลังจากนั้นให้ล้างแผ่น membranes แล้วบ่มต่อด้วย secondary antibody (Cell Signaling Technology, USA) (1:5000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างแผ่น PVDF membranes ด้วย 1 เท่าของ TBST

13.9 ตรวจหาแถบของโปรตีนด้วยระบบ ECL plus (Amersham, UK) โดยใช้แผ่น Hyperfilm (Amersham, UK)

13.10 นำแผ่น PVDF membranes เดิมมา strip แล้วทำการทดสอบกับแอนติบอดีตัวต่อไป

#### IV. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส

##### 1. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT

1.1 เลี้ยงเซลล์ HaCaT (p40-46) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % โดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ  $5 \times 10^6$  เซลล์ ใน culture flask ซึ่งมี พื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงไว้ 24-48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบต่าง ๆ

1.2 เลี้ยงไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ

##### 2. ขั้นตอนการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT โดยโปรตีนชีวสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.1 นำชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA 14 ที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนเช่นเดียวกันมาเจือจางแบบ two fold dilution

2.2 นำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์ผิวหนัง HaCaT

2.3 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay

2.4 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มชีวสารในข้อที่ 2.3) แล้วจึงเตรียม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ MTT ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณที่มากและนาน เนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

2.5 เอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 500 ไมโครลิตร ของ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ MTT ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลท์

2.6 เมื่อครบเวลา เอาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกไป แล้วคว่ำ plate ลงบนกระดาษซับ เพื่อเอาอาหารที่เหลือออกให้หมด

2.7 เติม 1000 ไมโครลิตรของ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ออกมา แล้วผสม formazan ที่ออกมากับ DMSO ให้เข้ากัน

2.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร แล้วหักลบค่าที่ได้ออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 670 นาโนเมตร

2.9 ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยมีการทำซ้ำครั้งละ 2 การทดสอบ

3. ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการสมานแผลโดยศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ที่ทดสอบด้วยชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14

3.1 ทำการแยกเซลล์ (trypsinization) HaCaT

3.2 เติมเซลล์ลงไปให้มีปริมาณ  $3 \times 10^5$  cells ต่อ 1 culture dish โดยใช้ culture disk ซึ่งมีพื้นที่ 21 ตารางเซนติเมตร บ่มเลี้ยงไว้จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% FBS 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % โดยจะเตรียมไว้ทั้งหมด 20 culture dish

3.3 เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเต็มพื้นที่ (100% confluency) ให้เปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็น DMEM และ 1% penicillin/streptomycin และเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 เมื่อครบเวลาใช้ micropipette tip ขูดเซลล์ออกให้มีพื้นที่ว่าง

3.5 ล้างเซลล์ด้วย PBS 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่ขูดหลุดออกมา

3.6 แบ่ง culture dish ออกเป็น 2 การทดสอบ สำหรับการทดสอบที่ 1 มี 10 culture dish เติม DMEM ที่มีองค์ประกอบของ 2% FBS และ 1% penicillin/streptomycin และชุดการทดสอบที่ 2 เติม DMEM ที่มี 10% FBS 1% penicillin/streptomycin แล้วบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายภาพเซลล์ทั้ง 2 ชุดการทดสอบ

3.8 เติมชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ลงไปใน culture dish ของทั้ง 2 ชุดการทดสอบ สำหรับกลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อและ PBS ส่วน Allantoin ใช้เป็น positive control

3.9 สังเกตการเคลื่อนที่ของเซลล์พร้อมถ่ายภาพเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่ได้ขูดเซลล์ออก เมื่อเวลา 30 นาที 3 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง โดยมีข้อกำหนดในการเลือกบริเวณที่ถ่ายภาพคือ ต้องเป็นบริเวณที่มี cell debris อยู่ในบริเวณพื้นที่ ที่ขูดเซลล์ออกอยู่น้อย เลือกบริเวณที่ขอบเซลล์เรียบตรงและมองเห็นได้ชัดเจน และ เลือกบริเวณที่มองเห็นขอบทั้งสองด้านของเซลล์เมื่อดูด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า เลนส์ใกล้ตา 100 เท่า

## V. ศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซีทต่อเซลล์มะเร็ง

### 1. การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

1.1 นำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาขีดลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนีและนำไปย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2 นำเชื้อจากข้อ 1.1 ส่วนหนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นนำมาเก็บใน glycerol 15 % ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

### 2. การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ในรูป crude proteins

2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-7 วันแล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

2.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำให้เข้มข้นในรูปผงโดยใช้วิธี Lyophilization

2.3 นำผงที่ได้มาละลายด้วย PBS ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เพื่อนำไปทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT ต่อไป

## VI. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

### 1. การเตรียมแบคทีเรีย

1.1 แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (test strain): *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp)

1.2 ปิเปตต์เชื้อแต่ละสายพันธุ์จาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

1.3 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมาขีดบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

1.4 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมายืนยันเชื้อโดยการย้อมสีแบบแกรมและทำการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์อะตาเลส โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

1.5 แยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16×100 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.6 เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง โดยปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง

1.7 ล้างสองครั้งโดยเติม PBS 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุดแล้วเติม PBS 1 มิลลิลิตร

## 2. การทดสอบหาเวลาและปริมาณแบคทีเรียที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยแสงยูวี

2.1 นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No.0.5 ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 4 หลอด

2.2 นำไปเทบนจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 1 จาน เปิดฝา วางภายใต้แสงยูวี 15, 30, 45, และ 60 นาที

2.3 เมื่อครบเวลาปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากจานเพาะเชื้อใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด

2.4 ปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อทดสอบการตายของเชื้อ

2.5 ทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมโดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้อ 1.7 มาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No. 0.5 ปรับจำนวนให้ได้ปริมาณเชื้อ 7.5×10<sup>8</sup>, 10×10<sup>8</sup>, 15×10<sup>8</sup> และ 20×10<sup>8</sup> CFU

2.6 นำไปเทบนจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 1 จาน เปิดฝาวางภายใต้แสงยูวี 15 นาที

2.7 เมื่อครบเวลาปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากจานเพาะเชื้อ ใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด

2.8 ปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อทดสอบการตายของเชื้อ

2.9 เมื่อได้เวลาและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมคือเวลา 15 นาที ปริมาณเชื้อ  $20 \times 10^8$  CFU แล้วเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบในขั้นต่อไปโดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS มาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No.1 ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด 7 หลอด เทบนจานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ 1 จานเปิดฝาวางภายใต้แสงยูวี 15 นาที

2.10 เมื่อครบเวลาปิเปตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากจานเพาะเชื้อ ใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด เติมน้ำ PBS 3 มิลลิลิตร

2.11 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี  $\text{CO}_2$  5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อทดสอบการตายของเชื้อ

2.12 ปรับปริมาณเชื้อโดยเทียบกับ MacFarland No.0.5 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) แล้วใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.13 นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด เติมน้ำ PBS 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการกระตุ้นเซลล์

### 3. การเตรียม peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

3.1 นำเลือดครบส่วน 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด conical centrifuge tube นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 15 นาที เลือดจะแยกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนเม็ดเลือดแดง และส่วนพลาสมา ใช้ pasture pipette ดูดส่วนพลาสมาทิ้ง ระวังกายาดูดเอาชั้นเม็ดเลือดขาวออกไป

3.2 เติมน้ำ PBS ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอยู่ในหลอดผสมเลือด ด้วย pasture pipette หรือปิเปตหลอด แล้วผสมโดยการกลับหลอดทดลอง 3-4 ครั้ง ให้ผสมกันดี

3.3 ดูดน้ำยา Ficoll-hypaque ใส่หลอดทดลองกันแหลมมีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร ใช้ pasture pipette ดูดเลือดที่เจือจางแล้วค่อยๆ ปลอ่ย (overlay) ลงบนชั้นของน้ำยา Ficoll-hypaque ระวังกายาให้เลือดผสมกับน้ำยา อัตราส่วนของเลือด: น้ำยา Ficoll-hypaque เท่ากับ 2:1

3.4 ปิดฝาแล้วนำหลอดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm นาน 30 นาที โดยปรับปุ่ม Breaker ของเครื่อง centrifuge ไปที่ off เพื่อให้เครื่องค่อยๆ ลดความเร็วเมื่อครบเวลา

3.5 ใช้ pasture pipette ดูดเอาชั้นของ mononuclear cell ใส่ในหลอดใหม่ ระวังกายา ดูดเอาส่วนชั้นของน้ำยา Ficoll-hypaque

3.6 ล้างเซลล์โดยเติม PBS ลงไปในหลอดให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 rpm นาน 12 นาที ครบเวลาแล้วเทน้ำส่วนบนทิ้ง แล้วเขย่าหลอดทดลองด้วย vortex mixer

3.7 ล้างอีก 3 ครั้งด้วย 10 มิลลิลิตร PBS เช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.8 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบครบ (RPMI 1640 with L-glutamine, penicillin/streptomycin, 10% fetal calf serum) ลงไปในหลอด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.04% Trypan blue 90 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ใช้ automatic pipette ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer

3.9 คำนวณเซลล์ที่นับได้ เท่ากับ  $(N \times 10) / 0.1 \times$  จำนวนช่องเม็ดเลือดขาว ปรับปริมาตรเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบครบ ให้มีปริมาณเซลล์  $1 \times 10^7$  cells/ml

#### 4. การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1 เตรียมหลอดทดลองพลาสติกปราศจากเชื้อและมีฝาปิด ขนาด 12x75 มิลลิเมตร ใส่เซลล์ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองทุกหลอด จำนวนเซลล์หลอดละ  $1 \times 10^6$  cells

4.2 ในหลอดที่ 1 เป็น isotype control หลอดที่ 2, 3 เป็น negative และ positive control โดยเติม LPS 0.5 ไมโครกรัม ตามลำดับ ในหลอดที่ 4, 5 และ 6 เติมเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน  $1 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  และ  $100 \times 10^6$  CFU ตามลำดับ

4.3 ปรับปริมาตรทุกหลอดให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบครบ

4.4 ปิดฝาและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปั่นที่ 1,200 rpm นาน 6 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด

4.5 นำไปปั่นที่ 1,200 rpm นาน 6 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งนำเซลล์ที่ได้ไปย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อวัด maturation marker และ activation marker

#### 5. การย้อมเซลล์และการวัดด้วยฟลูออโรไซโตมิเตอร์

5.1 เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดละ 5 ไมโครลิตร สำหรับการวัด CD69 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี PerCP-conjugated anti-CD69, PerCP-anti-mouse IgG1 (isotype control) ใส่ในหลอดทดลอง สำหรับการวัด CD86 /CD80 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังนี้ FITC-conjugated anti-CD1c (BDCA-1), PerCP-conjugated anti-CD14/19, PE-conjugated anti-CD80, PE-conjugated anti-CD86 และ PE-anti-mouse IgG1 (isotype control)

5.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 20 นาที แล้วล้าง 1 ครั้งด้วย PBS 2 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 1200 rpm นาน 6 นาที เทส่วนใสทิ้ง

5.3 เติม 1% paraformaldehyde 500 ไมโครลิตร นำไปวัดด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เมื่อนำอาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์นม มาหั่นเป็นชิ้นๆ แล้ว ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถเจริญในทุก plate ยกเว้นจากตัวอย่างหัวผักกาดเค็มและเลือกโคโลนีที่มีลักษณะขาวขุ่น กลมมน ขอบเรียบ และย้อมสีแกรมได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ซึ่งสามารถสุ่มเลือกได้มาทั้งหมด 76 โคโลนี แต่ทั้งหมดไม่สามารถแสดงฤทธิ์ antimicrobial ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลตและฤทธิ์ด้านการเจริญ indicating strains โดยวิธีซีดเชื้อ

| ผลิตภัณฑ์อาหาร | จำนวนโคโลนี | ชื่อ           | antimicrobial activity |
|----------------|-------------|----------------|------------------------|
| ขนมจีน         | 10          | ขนมจีน A- J    | ND                     |
| ข้าวหมาก       | 8           | ข้าวหมาก A-H   | ND                     |
| กะปิ           | 4           | กะปิ A-D       | ND                     |
| กุ้งสับ        | 6           | กุ้งสับ A- F   | ND                     |
| ไตปลา          | 3           | ไตปลา A-C      | ND                     |
| ปลาร้า         | 3           | ปลาร้า A-C     | ND                     |
| ปลา            | 9           | ปลา A-I        | ND                     |
| หมู            | 3           | หมู A-C        | ND                     |
| แหนมปลา        | 8           | แหนมปลา A-H    | ND                     |
| แหนมหมู        | 4           | แหนมหมู A-D    | ND                     |
| แหนมไก่        | 2           | แหนมไก่ A-B    | ND                     |
| ผักกาดดอง      | 4           | ผักกาดดอง A-D  | ND                     |
| หน่อไม้ดอง     | 3           | หน่อไม้ดอง A-C | ND                     |
| กะหล่ำปลี      | 3           | กะหล่ำปลี A-C  | ND                     |
| มะม่วงสุก      | 3           | มะม่วงสุก A-C  | ND                     |
| นมเปรี้ยว      | 3           | นมเปรี้ยว A-C  | ND                     |

ND, ไม่สามารถบันทึกผลได้เนื่องจาก indicating strains ไม่เจริญ

หลังจากนั้นคัดเลือกเชื้อจากทั้ง 76 โคโลนี โดยสังเกตจากลักษณะทาง Macroscopic และดูการเจริญของ โคโลนีมาทดสอบ ซึ่งให้ผล catalase test เป็น Negative, Gram strain เป็น Positive bacilli , non-spore forming และ เลือก โคโลนีที่เจริญดีและให้ลักษณะที่ชัดเจน เลือก มา 10 โคโลนี มาทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (Colonization) ผลการทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (Colonization) ให้ผล negative ทั้งหมด

นำส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ 3 ชนิด คือ *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยวัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น ปรากฏว่า *B. subtilis* ให้ inhibition zone เกิดขึ้นจากส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างทุกไอโซเลท ส่วน *E. coli* ให้ inhibition zone เกิดขึ้นจากส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากແໝປລາ G และ *S. aureus* ให้ inhibition zone เกิดขึ้นจากส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากແໝປລາ A กับ E แต่เมื่อปรับ pH ของส่วนใสให้เป็นกลางปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ตัวอื่นหลงเหลืออยู่ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Antimicrobial activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

| น้ำเลี้ยงเชื้อ      | pH<br>ที่<br>48 ชั่วโมง | วงใสของการยับยั้ง ( เซนติเมตร) |      |                    |      |                  |      |
|---------------------|-------------------------|--------------------------------|------|--------------------|------|------------------|------|
|                     |                         | <i>E. coli</i>                 |      | <i>B. subtilis</i> |      | <i>S. aureus</i> |      |
|                     |                         | ก่อน                           | หลัง | ก่อน               | หลัง | ก่อน             | หลัง |
| Control (MRS)       | 6.49                    | 0                              | 0    | 0                  | 0    | 0                | 0    |
| <i>L. plantarum</i> | 3.76                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໝປລາ A             | 3.79                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 1.2              | 0    |
| ແໝປລາ B             | 3.87                    | 0                              | 0    | 1.0                | 0    | 0                | 0    |
| ແໝປລາ C             | 3.88                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໝປລາ D             | 3.78                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໝປລາ E             | 3.70                    | 0                              | 0    | 1.4                | 0    | 1.2              | 0    |
| ແໝປລາ F             | 3.87                    | 0                              | 0    | 1.0                | 0    | 0                | 0    |
| ແໝປລາ G             | 3.72                    | 1.2                            | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໝ ມູ C             | 4.34                    | 0                              | 0    | 0.9                | 0    | 0                | 0    |
| ກະລໍ່າປລີ B         | 4.31                    | 0                              | 0    | 0.9                | 0    | 0                | 0    |
| ຍາຄູລຢ໌ A           | 3.68                    | 0                              | 0    | 1.5                | 0    | 0                | 0    |

indicating strains ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008), *Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517)

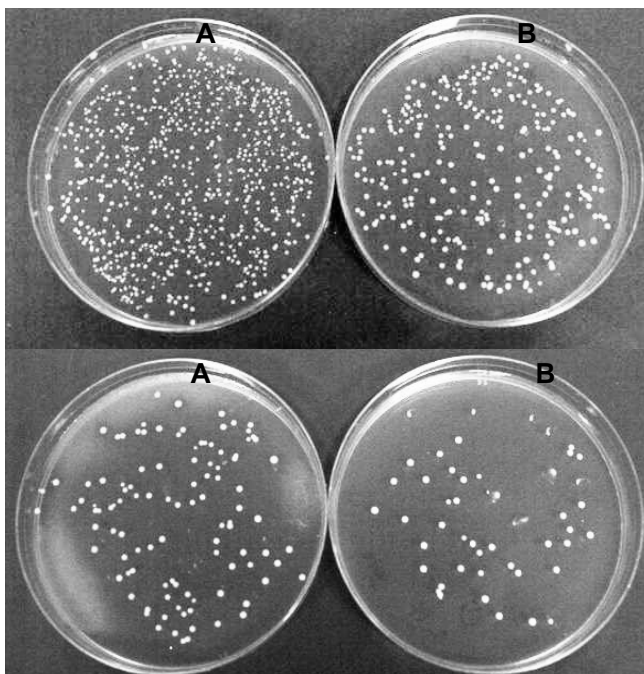
ก่อน, ก่อนปรับ pH; หลัง, หลังปรับ pH

## II. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV

จากการนำเชื้อ *L. plantarum* มาปรับปรุงพันธุ์โดยผ่านแสง UV 10 นาที และทำการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* พบว่าเชื้อจะมีจำนวนลดลง (รูปที่ 1) และยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ดีขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 1

ตารางที่ 3 ผลการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV

| ลักษณะที่สังเกตได้            | ก่อนผ่าน UV |           | หลังผ่าน UV |           |
|-------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|                               | ความเจือจาง |           | ความเจือจาง |           |
|                               | $10^{-6}$   | $10^{-7}$ | $10^{-6}$   | $10^{-7}$ |
| จำนวนโคโลนี                   | 408         | 240       | 53          | 45        |
| ขนาดโคโลนี                    | 0.05-0.30   |           | 0.20-0.30   |           |
| ผลการยับยั้ง                  |             |           |             |           |
| <i>Candida albicans</i>       | 0.8-1.0     |           | 1.0-1.2     |           |
| [วัดจาก inhibition zone (cm)] |             |           |             |           |



**A** – *L. plantarum* ที่ไม่ได้ผ่านการส่องด้วย UV ที่ความเจือจาง  $10^{-7}$

**B** – *L. plantarum* ที่ผ่านการส่องด้วยแสง UV ที่ ความ เจือจาง  $10^{-7}$

**ก**

**A** – *L. plantarum* ที่ไม่ได้ผ่านการส่องด้วย UV ที่ความเจือจาง  $10^{-8}$

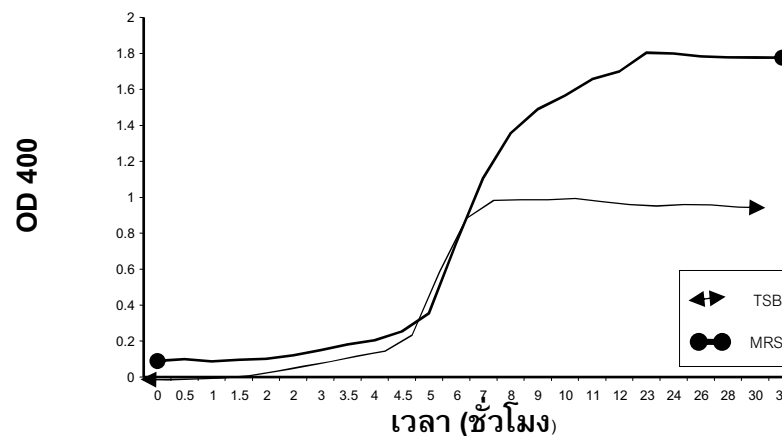
**B** – *L. plantarum* ที่ผ่านการส่องด้วยแสง UV ที่ความเจือจาง  $10^{-8}$

**ข**

รูปที่ 1 ปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเจือจาง  $10^{-7}$  (ก) และ  $10^{-8}$  (ข) ก่อนและหลังการผ่าน UV

### III. ผลการทดสอบการถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แลคโตบาซิลลัส

ผลการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ใน TSB และ MRS ที่อุณหภูมิ 37°C ใน shaking incubator เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า *L. plantarum* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ได้ดีกว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสง (OD400) ที่เพิ่มขึ้น และสามารถนำมาสร้างกราฟเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อได้ ดังรูปที่ 2 โดยที่ *Lactobacillus* host เจริญเข้าสู่ mid- logarithmic phase เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง และ MRS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของ *Lactobacillus* spp.



รูปที่ 2 การเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ MRS ที่ 37°C ใน shaking incubator

ผลการแสดงออกของยีนไคติเนสใน transformants มีดังนี้

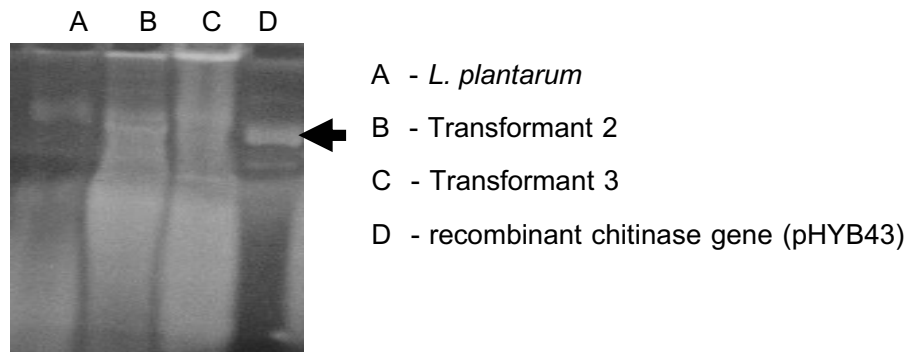
#### 1. ผลการทดสอบโดยวิธีการขี้เซลล์

เมื่อใช้โคโลนีจาก *L. plantarum*, Transformant 1, 2, 3 และ pHYB43 (Positive control) มาขยี้ลงบนกระดาดากรอง หยดทับด้วย 4-MUG substrate (active substrate) จากนั้นนำไปดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ปรากฏเห็นการเรืองแสงสีฟ้าสว่างใน Transformant ที่ 2 และ 3 และมีผลบวกใน pHYB43

#### 2. agarose gel electrophoresis

หลังจากสกัด recombinant chitinase gene (pHYB 43) จาก *E. coli* DH 5 $\alpha$  ด้วยวิธี alkaline lysis method แบบ large scale และถ่ายถอดยีนเข้าสู่ *Lactobacillus* host (*L. plantarum* TISTR 050) จากนั้นนำมาทดสอบการมีอยู่ของยีนไคติเนสด้วยวิธี (DNA) electrophoresis โดยใช้ supporting medium คือ 0.7% agarose gel ปรากฏว่าเห็นแถบยีน

ไคติเนสใน transformant 2 (lane B), 3 (lane C) และ recombinant chitinase gene (pHYB 43) (lane D) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 รูปแบบของแถบ DNA ที่สกัดจาก transformants ตำแหน่งลูกศรชี้คือ recombinant chitinase gene (pHYB 43)

จากการทำ 0.7% agarose gel electrophoresis จะสังเกตเห็นแถบของ DNA ใน transformant 2 และ 3 (lane B และ C) อยู่ในตำแหน่งเดียวกับแถบของ DNA ของ recombinant chitinase gene (pHYB 43) (lane D) ซึ่งผลที่ได้อาจจะยืนยันได้ว่า transformant 2 และ 3 ได้รับ recombinant chitinase gene (pHYB 43) เข้าไปภายในเซลล์แล้ว ส่วน *L. plantarum* (lane A) ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบตำแหน่งแถบของ DNA ที่ไม่มี recombinant chitinase gene (pHYB 43)

3. ผลการทดสอบ Activity ในการย่อยสลายไคตินของไคติเนสที่สร้างจาก Transformant โดยวิธี agar well diffusion assay

จากการทดสอบ Activity ในการย่อยสลายไคตินที่สร้างจาก Transformants โดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ส่วนใสจาก Transformant 1, 2, 3, *L. plantarum* และ pHYB43 ปรากฏว่าจะเห็นการย่อย glycol chitin ปรากฏเป็นวงมีด (hallow zone) รอบหลุมที่หยดส่วนใสของ Transformant 2, 3 และ pHYB43 อย่างไรก็ตามยังสามารถสังเกตเห็นลักษณะดังกล่าวใน *L. plantarum* host

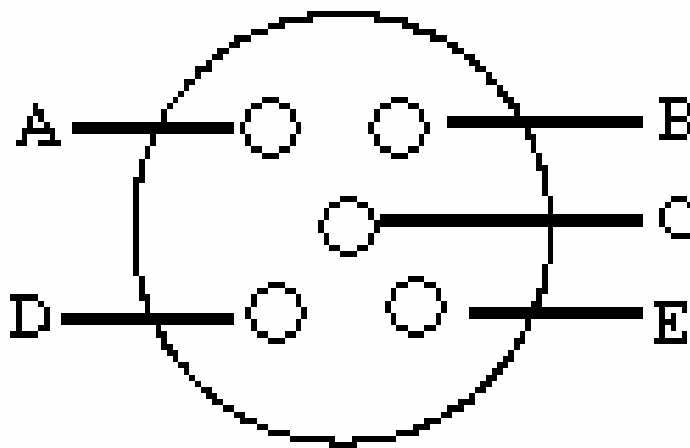
#### 4. ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของโคติเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของโคติเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay ปรากฏว่ามีเฉพาะ *M. luteus* TISTR 884 ที่โดนยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์ปรับปรุงที่มีชั้นยีนโคติเนส ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของโคติเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay

| แหล่งของสาร<br>(ส่วนใส) | Clear zone (cm)  |                    |                      |                  |                    |                |
|-------------------------|------------------|--------------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------|
|                         | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>M. luteus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>L. plantarum</i>     | 1.5              | 1.5                | 2.0                  | 2.2              | -                  | 1.2            |
| Transformant 2          | 1.4              | 1.4                | 1.5                  | 2.5              | -                  | 1.2            |
| Transformant 3          | 1.45             | 1.7                | 1.8                  | 2.4              | -                  | 1.2            |
| pHYB43                  | -                | -                  | -                    | -                | -                  | -              |
| Control ( MRS)          | -                | -                  | -                    | -                | -                  | -              |

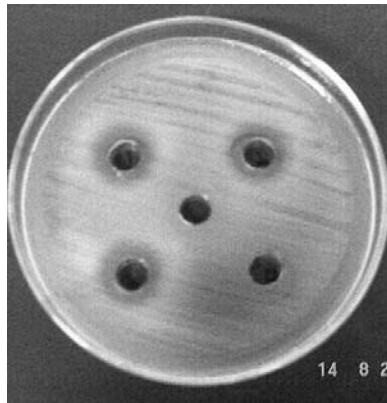
ลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 4



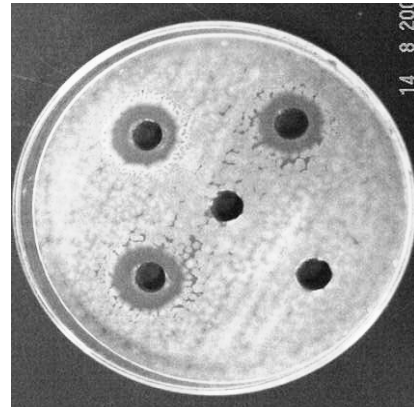
A – *Lactobacillus plantarum*, D – Transformant 3

B – Transformant 2, E – pHYB43

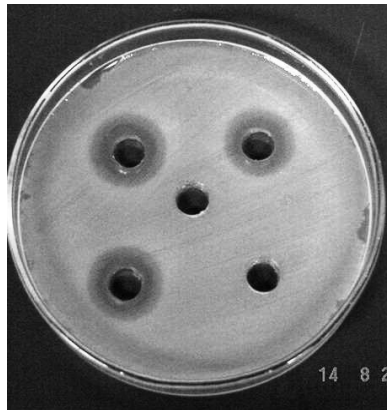
C – Control (MRS)



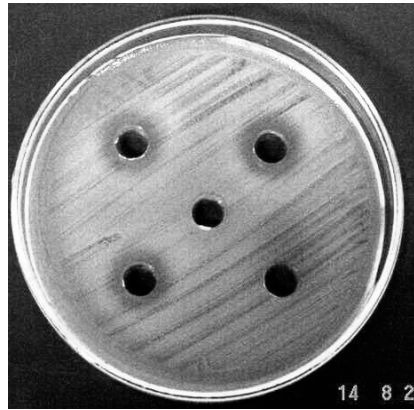
*Staphylococcus aureus*



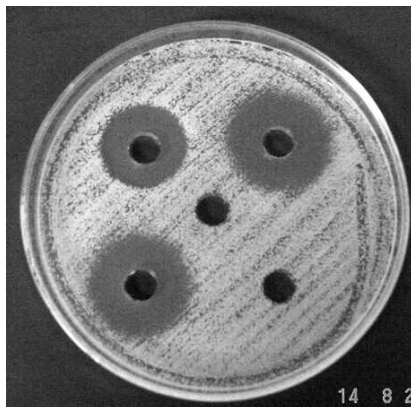
*Bacillus subtilis*



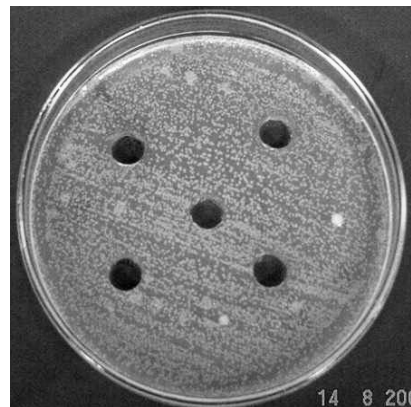
*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*



*Micrococcus luteus*



*Candida albicans*

รูปที่ 4ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ transformants ต่อจุลินทรีย์ดัชนี

#### IV. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก

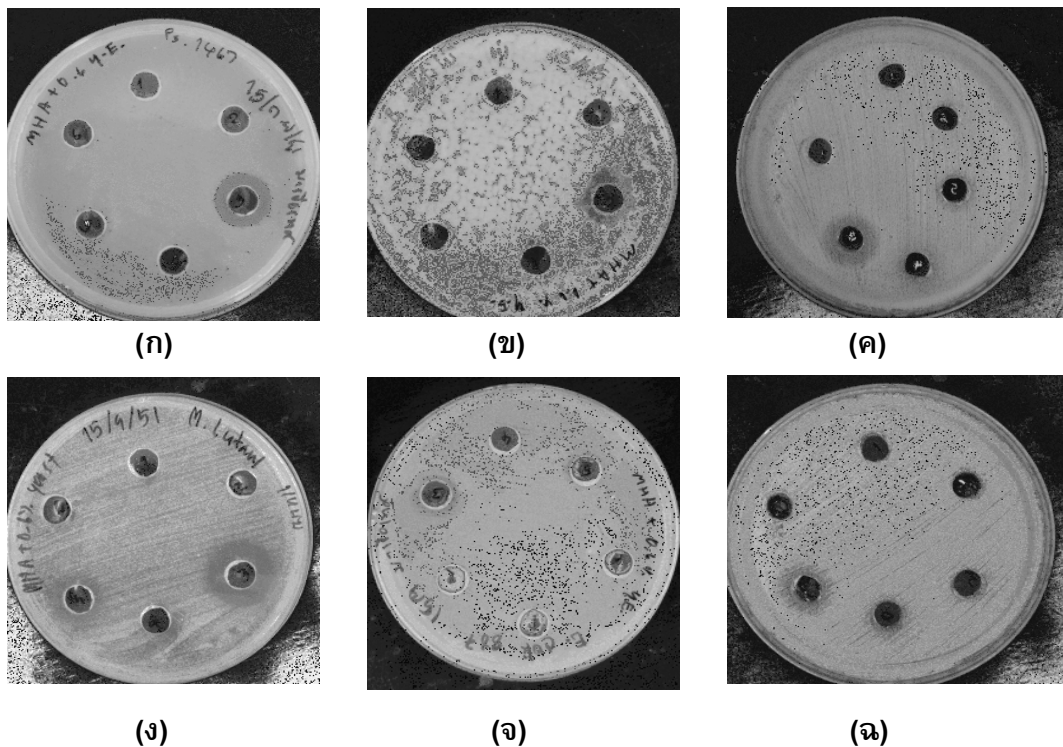
แบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ : จากการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากผัก-ผลไม้ (มะเขือเทศ แดงโม มะพร้าว กะหล่ำปลี) นมวัว และนมแพะ ปรากฏว่าตรวจพบโคโลนีเจริญขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จำนวนมาก จากนั้นได้ทำการคัดเลือกรูปแบบของโคโลนีตามคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งได้แก่ หนู สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ ย้อมติดสีแกรมบวกรูปท่อน โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว : ในการทดสอบความสามารถของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 106 ไอโซเลทในการเกาะติดพื้นผิว รวมเชื้อควบคุม (C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050) ปรากฏว่าเชื้อทั้งหมดผลิตก๊าซเมื่อนำไปเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แต่พบมีเพียงไอโซเลทที่ 9 ที่แยกออกมาได้จากมะเขือเทศ และไอโซเลทที่ 35 ที่แยกออกมาได้จากนมเท่านั้นที่สามารถแสดงการเกาะติดผิวหลอดด้านในของหลอดทดลอง จึงได้ตั้งชื่อว่า T9 และ N35 ตามลำดับ แต่พบว่า T9 แสดงการเกาะกลุ่มที่เร็วกว่าและยาวนานกว่า ดังแสดงในตารางที่ 5 ดังนั้นจึงเลือก T9 ไปศึกษาตลอดการทดลอง

ตารางที่ 5 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของไอโซเลท T9 และไอโซเลท N35

| ไอโซเลท          | ระยะเวลาที่เริ่มเกาะติดพื้นผิว (ชั่วโมง) | จำนวนวันที่เกาะติดพื้นผิว (วัน) | การคงสภาพเกาะติด |
|------------------|------------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| นมมะเขือเทศ (T9) | 24                                       | >4                              | มาก              |
| นม (N35)         | 36                                       | 2                               | น้อย             |

ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดย เมตาบอไลต์ต่างๆ : ไอโซเลท T9 ที่คัดเลือกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ทำลาย แบคทีเรียดัชนีที่นำมาทดสอบทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 ) แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทำลายราดัชนี *Candida albicans* TISTR 5779 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ดังแสดงในรูปที่ 5



**รูปที่ 5** ฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียไอโซเลท T9 ในการยับยั้งแบคทีเรียดัชนี *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 (ก) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (ข) *Salmonella typhimurium* TISTR 292 (ค) *Micrococcus luteus* TISTR 884 (ง) *Escherichia coli* TISTR 887 (จ) *Staphylococcus aureus* TISTR 517 (ฉ)

แยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL : ในการวิเคราะห์แยกชนิดไอโซเลท T9 ด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 ปรากฏว่าไอโซเลท T9 ที่แยกได้มาจากมะเขือเทศคือ *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกมาได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกและจะเลือกนำไปทดสอบต่อไป

ความทนทานต่อระดับ pH 2-10 : ไอโซเลท T9 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH 2-10 และสามารถสังเกตเห็นการเกาะติดพื้นผิวหลอดด้านในของแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดทดลอง

ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ : ไอโซเลท T9 ตี้อยู่ยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ยกเว้น Nitrofurantoin ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความไวของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* 1 (T9) และ *L. plantarum* TISTR050 ต่อยาปฏิชีวนะ

| แบคทีเรีย                     | วงใสของการยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร) |      |    |      |     |    |    |    |    |
|-------------------------------|---------------------------------------|------|----|------|-----|----|----|----|----|
|                               | CN                                    | CAR  | AK | SXT  | AMP | F  | KF | OX | P  |
| <i>L. plantarum</i> 1         | 20                                    | 9    | 19 | 9    | 20  | 19 | 7  | 0  | 13 |
| <i>L. plantarum</i> TISTR 050 | 26                                    | 17.5 | 26 | 20.5 | 21  | R  | 11 | 0  | 21 |

## V. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ตัดแยกได้ในน้ำผลไม้

ไอโซเลท T9 สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำผลไม้ที่นำมาศึกษาแตกต่างกันโดยพบว่าสามารถมีชีวิตรอดได้ดีในน้ำแดงโมและน้ำมะเขือเทศในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน ส่วนน้ำมะพร้าวทำให้แบคทีเรียตายทั้งหมดภายหลังการจัดเก็บไว้เพียง 9 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย *L. plantarum* 1 (ไอโซเลท T9) ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/มิลลิลิตร มีอัตราการอยู่รอดโดยเฉลี่ยมากที่สุดที่น้ำแดงโมที่ไม่เติมสารพรีไบโอติกโดยมีปริมาณเซลล์หลงเหลือชีวิตรอดประมาณ  $5.4 \pm 0.21$  log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน รองลงมาคือการอยู่รอดในน้ำมะเขือเทศที่เติมสารพรีไบโอติก (5.3 log CFU/ml), ในน้ำมะเขือเทศที่ไม่เติมสารพรีไบโอติก (5.2 log CFU/ml), ในน้ำแดงโมที่เติมสารพรีไบโอติก (5.0 log CFU/ml) ส่วนในน้ำมะพร้าวทั้งที่เติมสารพรีไบโอติกและไม่เติมสารพรีไบโอติกนั้นเชื้ออยู่รอดได้เพียงประมาณ 6 วัน ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์อัตโนมัติ SPSS โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ ONE WAY ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. plantarum* 1 ปรากฏว่าการเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ (p-value < 0.05)

ตารางที่ 7 ปริมาณเซลล์ (logCFU/ml) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก (T9) ในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

| น้ำผลไม้                                     | Mean log CFU/ml $\pm$ SD |             |                |                |                |                |                |                |
|----------------------------------------------|--------------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                              | 0                        | 3           | 6              | 9              | 12             | 15             | 18             | 21             |
| <b>น้ำมะเขือเทศ</b>                          |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>ไม่เติมสารพรีไบโอติก | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 7.4 $\pm$ 0.23 | 8.0 $\pm$ 0.23 | 5.7 $\pm$ 0.24 | 5.6 $\pm$ 0.32 | 5.3 $\pm$ 0.19 | 5.2 $\pm$ 0.19 |
| 2. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 7.2 $\pm$ 0.11 | 6.0 $\pm$ 0.32 | 5.9 $\pm$ 0.11 | 5.7 $\pm$ 0.23 | 5.3 $\pm$ 0.28 | 5.3 $\pm$ 0.23 |
| <b>น้ำแตงโม</b>                              |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>ไม่เติมสารพรีไบโอติก | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 7.2 $\pm$ 0.23 | 6.7 $\pm$ 0.2  | 6.0 $\pm$ 0.21 | 5.2 $\pm$ 0.29 | 5.2 $\pm$ 0.27 | 5.4 $\pm$ 0.21 |
| 2. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 6.8 $\pm$ 0.18 | 6.7 $\pm$ 0.2  | 6.0 $\pm$ 0.34 | 5.6 $\pm$ 0.32 | 5.1 $\pm$ 0.34 | 5.0 $\pm$ 0.31 |
| <b>น้ำมะพร้าว</b>                            |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>ไม่เติมสารพรีไบโอติก | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 5.4 $\pm$ 0.37 | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| 2. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 5.4 $\pm$ 0.22 | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| <b>0.85 NaCl</b>                             |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | ND                       | ND          | 6.8 $\pm$ 0.23 | 6.0 $\pm$ 0.14 | 5.9 $\pm$ 0.31 | 5.8 $\pm$ 0.23 | 5.8 $\pm$ 0.26 | 5.4 $\pm$ 0.23 |
| 2. เติมโปรไบโอติก                            | ND                       | ND          | 6.3 $\pm$ 0.25 | 6.0 $\pm$ 0.16 | 5.8 $\pm$ 0.25 | 5.9 $\pm$ 0.24 | 5.9 $\pm$ 0.22 | 5.3 $\pm$ 0.21 |

ND คือไม่ได้ทำการทดลอง

## VI. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก

### กลุ่ม *Bacillus*

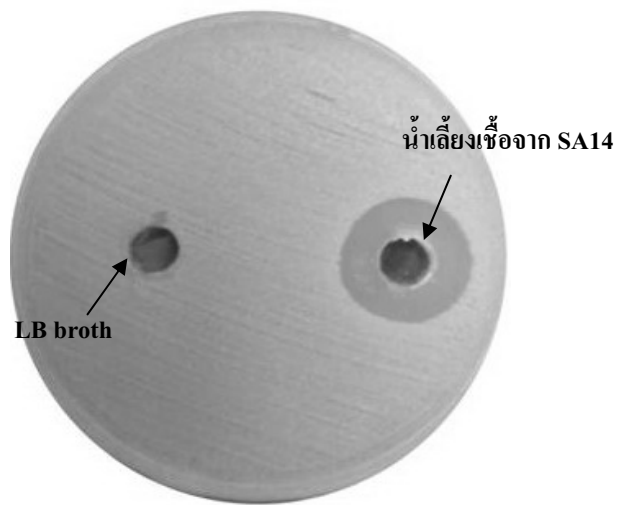
น้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเลี้ยง *Brev. laterosporus* SA14 แสดงฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus* ทั้งวิธีทดสอบแบบ agar well diffusion และ spot on lawn (รูปที่ 6) และจะเริ่มตรวจพบฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Duran ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 8

ชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยวิธี lyophilization และผ่านการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ไม่ผ่านความร้อนและผ่านความร้อน 100°C 15 นาที พบว่ายังคงมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus*

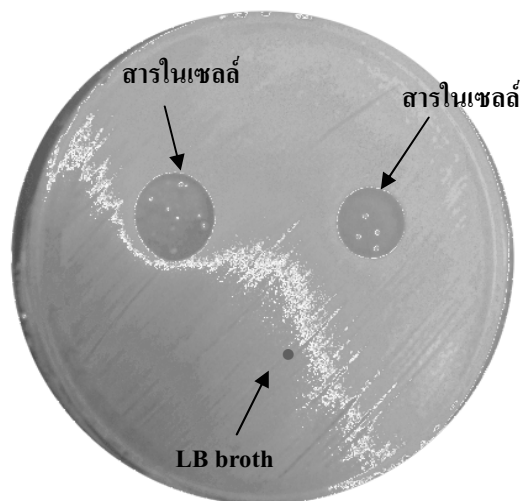
### กลุ่ม *Streptomyces* spp.

แบคทีเรีย *Streptomyces* spp. คัดแยกได้จากดินบริเวณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract - malt extract (YM) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะให้โคโลนีลักษณะ กลม ขนาด 1.5-3 มิลลิเมตร ฝังวัน ผิวหน้าเหี่ยว และสร้างสปอร์ เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวก แตกกิ่งก้านคล้ายสายราดังตารางที่ 9

ฤทธิ์ต้าน MRSA ของ *Streptomyces* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar plug diffusion พบว่าไอโซเลท CO4 และไอโซเลท WU6 มีฤทธิ์ต้าน MRSA ทั้งหมด ส่วนไอโซเลท CK9 มีฤทธิ์ต้าน MRSA เพียง 3 สายพันธุ์ (MRSA 414, MRSA 539, MRSA 3576) และ *S. aureus* TISTR 517 สำหรับไอโซเลท WU10 ไม่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ดังแสดงในตารางที่ 10



(ก)



(ข)

รูปที่ 6ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *S. aureus* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Brev. Laterosporus* SA14 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion (ก) และ ตัวเชื้อของ *Brev. Laterosporus* SA14 ที่ได้จากวิธี sonication และทดสอบด้วยวิธี spot on lawn (ข)

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *S. aureus* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Brev. laterosporus* SA14 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยวิธี agar well diffusion

| ระยะเวลาการบ่มเลี้ยง (วัน) | ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) |
|----------------------------|----------------------|
| 1                          | -                    |
| 2                          | -                    |
| 3                          | 14                   |
| 4                          | 22                   |
| 5                          | 22                   |

ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp.

| เชื้อ | ลักษณะโคโลนี | สีโคโลนี               | ขนาด (mm) | ผิวหน้าโคโลนี |
|-------|--------------|------------------------|-----------|---------------|
| CO4   | กลม, ฝักรุ่น | เหลือง ส้ม, สปอร์สีขาว | 1.5       | เหี่ยวย่น     |
| WU10  | กลม, ฝักรุ่น | ขาวขุ่น, สปอร์สีขาว    | 2         | เหี่ยวย่น     |
| WU6   | กลม, ฝักรุ่น | ขาวขุ่น, สปอร์สีขาว    | 3         | เหี่ยวย่น     |
| CK9   | กลม, ฝักรุ่น | ขาวขุ่น                | 2         | เหี่ยวย่น     |

ตารางที่ 10 Inhibition zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบโดยวิธี agar plug diffusion โดยใช้โคโลนีของเชื้อ

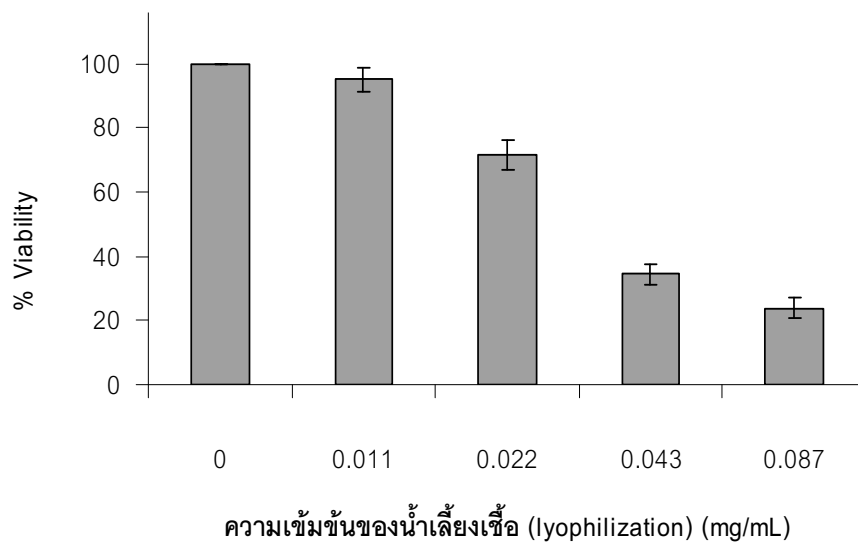
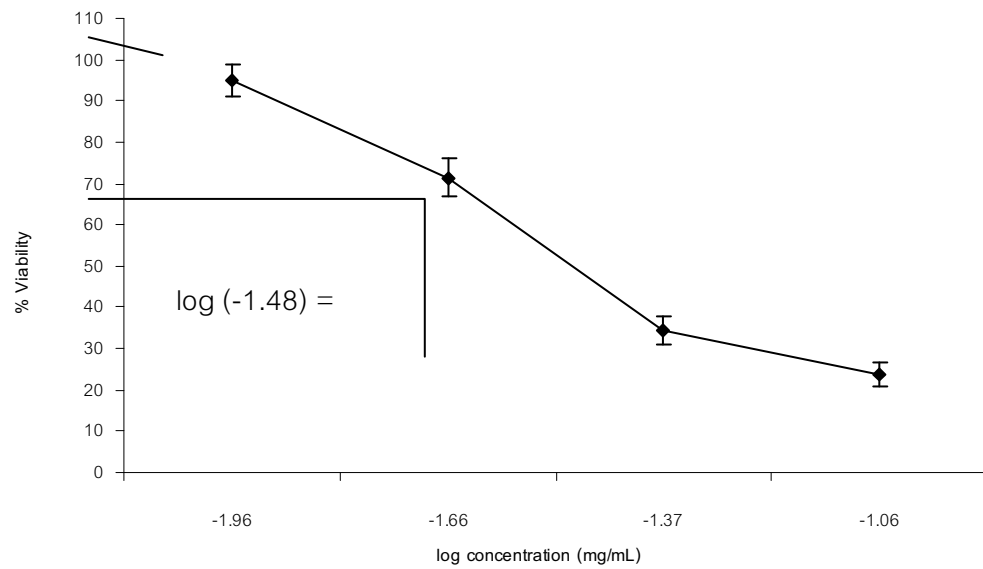
| <i>Streptomyces</i> spp. | Inhibition zone (mm) |             |             |             |              |                               |
|--------------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------------|
|                          | MRSA<br>338          | MRSA<br>403 | MRSA<br>414 | MRSA<br>539 | MRSA<br>3576 | <i>S. aureus</i><br>TISTR 517 |
| WU6                      | 17.0                 | 16.0        | 17.0        | 13.5        | 14.0         | 14.5                          |
| WU10                     | -                    | -           | -           | -           | -            | -                             |
| CO4                      | 22.5                 | 19.5        | 20.5        | 22.5        | 20.5         | 18.0                          |
| CK9                      | -                    | -           | 8.0         | 10.0        | 10.5         | 9.0                           |

MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

## VII. การทดสอบความเป็นพิษของชีวสารต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354)

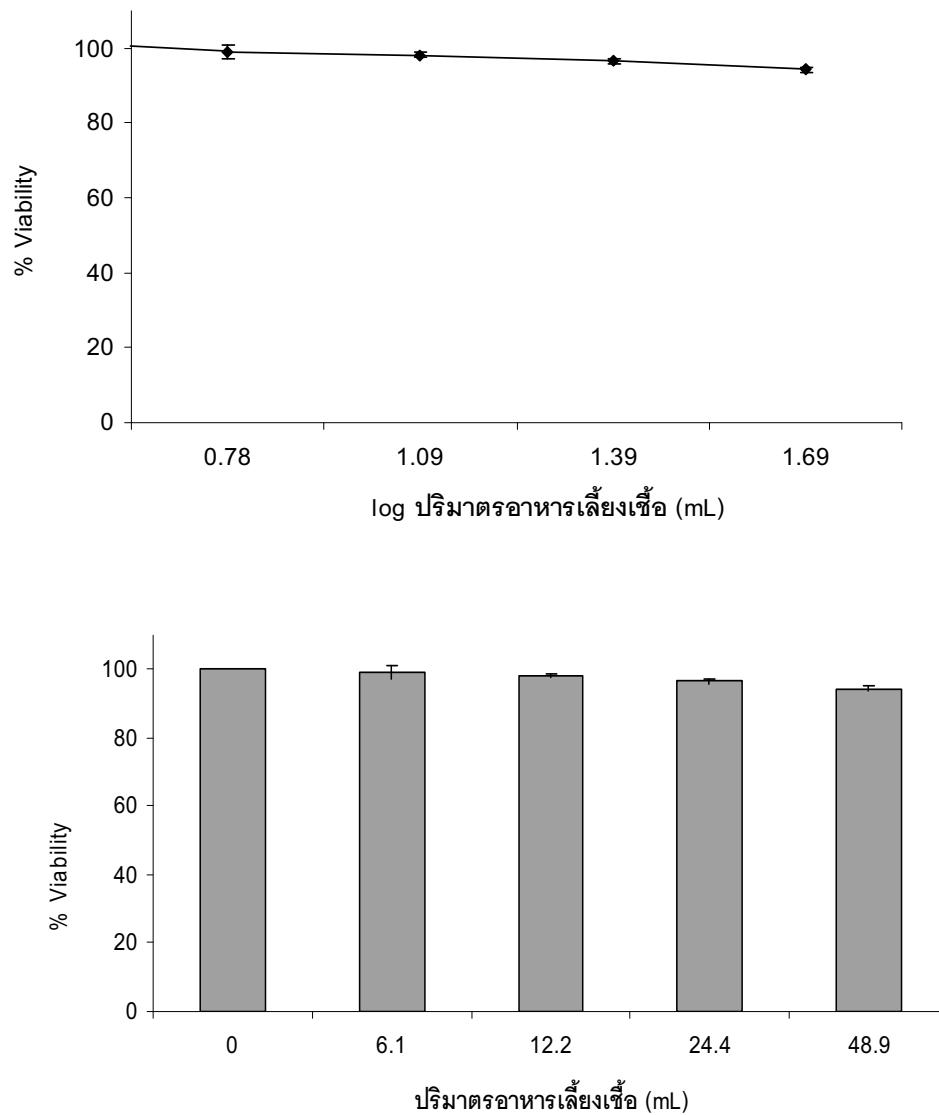
จากการนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) พบว่าชีวสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี lyophilization ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.033 mg protein/ml รูปที่ 7 และชีวสารกึ่งบริสุทธิ์จากการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน ให้ค่า  $IC_{50}$  ที่เท่ากันคือ 0.034 mg protein/ml โดยชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ lyophilization มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.67 mg/ml (w/v) และอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 8

จากการนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) พบว่าชีวสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าไอโซเลท CO4 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.005 mg protein/ml หรือเท่ากับ ความเข้มข้น 5.88 mg/ml (w/v) ดังรูปที่ 9 ส่วนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU6 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.032 mg protein/ml หรือเท่ากับ ความเข้มข้น 34.83 mg/ml ดังรูปที่ 10 และชีวสารของน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU10 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.023 mg protein/ml หรือเท่ากับ ความเข้มข้น 25.62 mg/ml ดังรูปที่ 11 อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 12 ส่วนยา 5-fluorouracil ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.75 mg/ml ดังรูปที่ 13



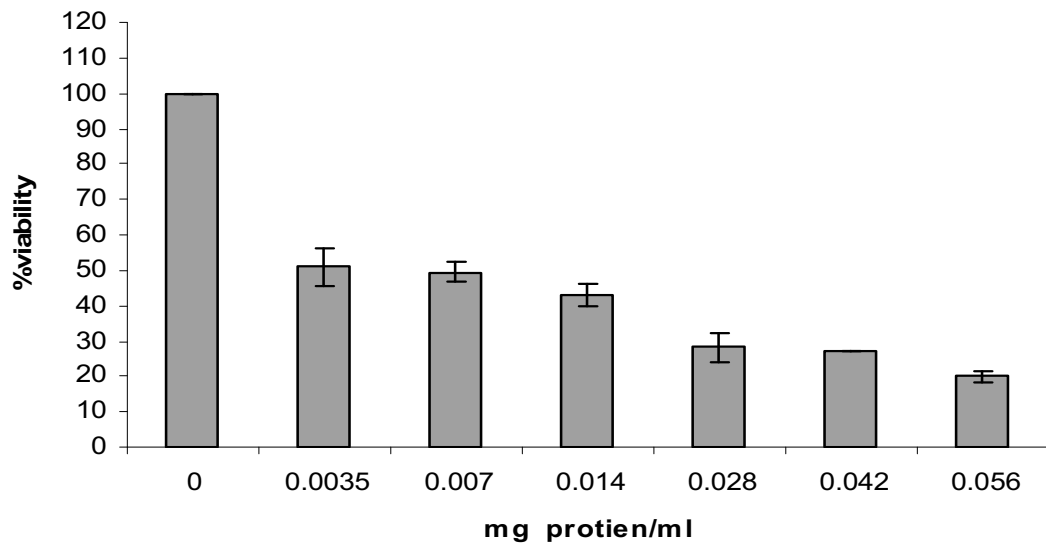
(ข)

รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง % viability กับความเข้มข้นของโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข)

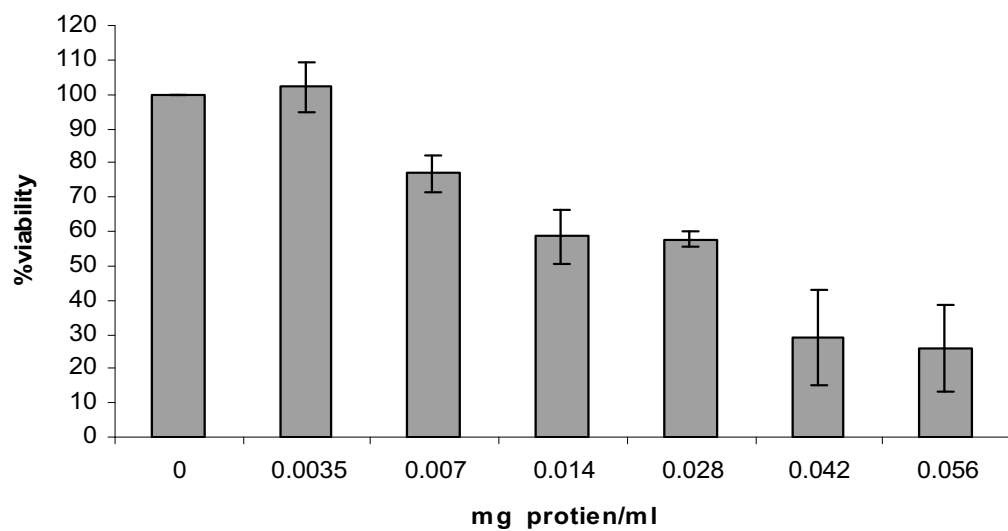


(ข)

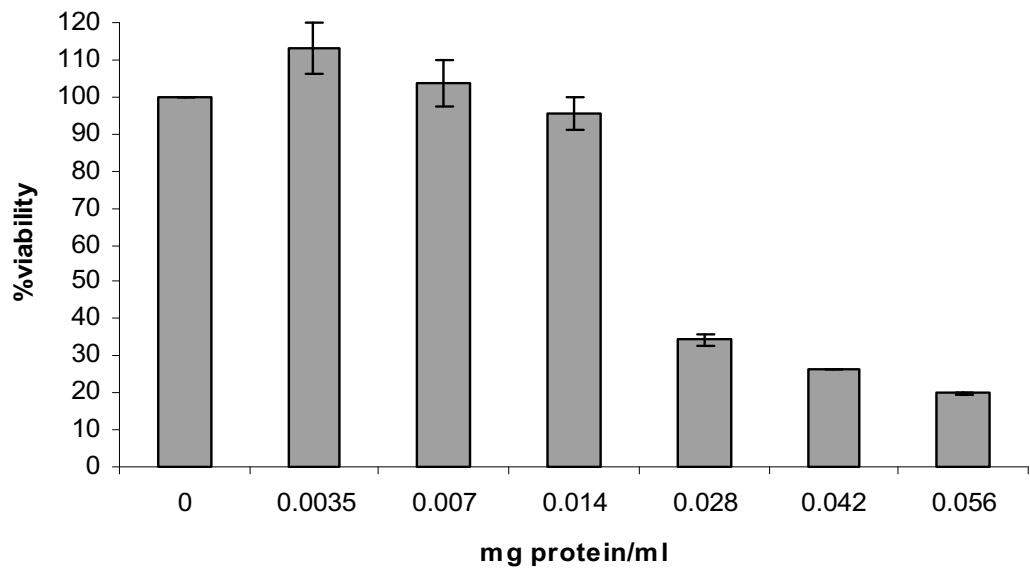
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง % viability กับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข)



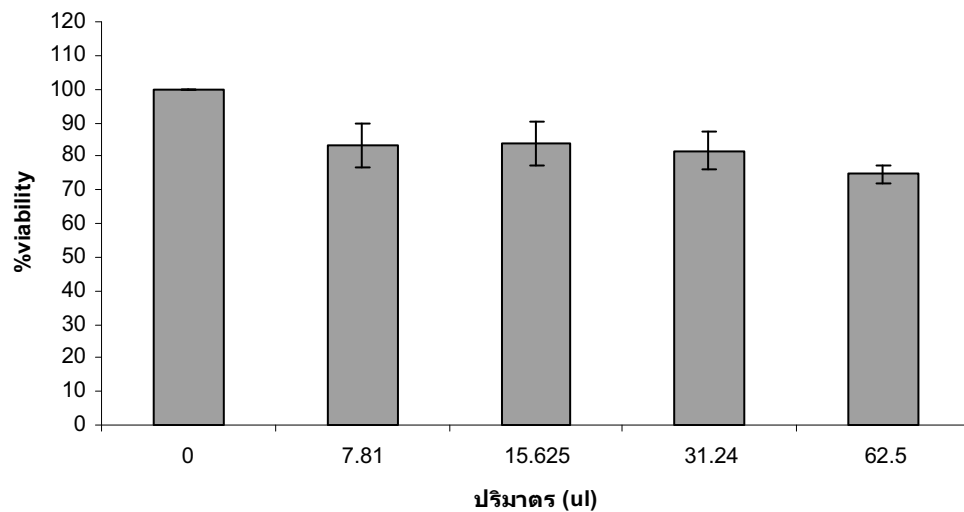
รูปที่ 9 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นโปรตีนของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ CO4



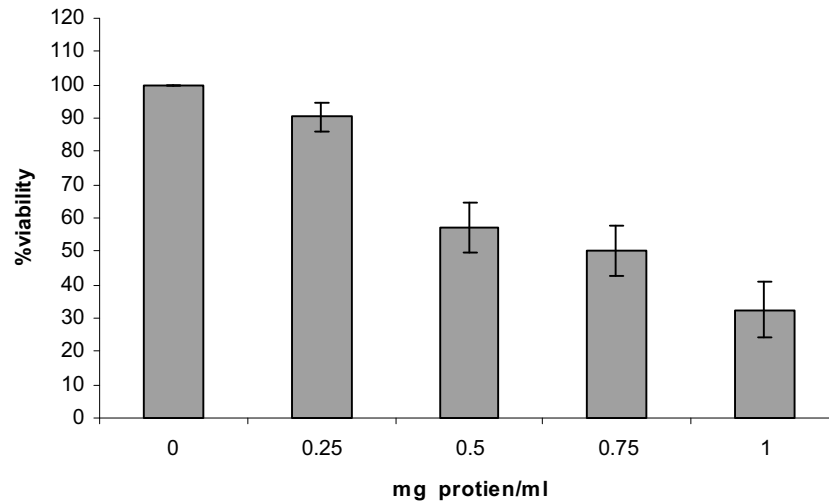
รูปที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นโปรตีนของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU6



รูปที่ 11 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นโปรตีนของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU10



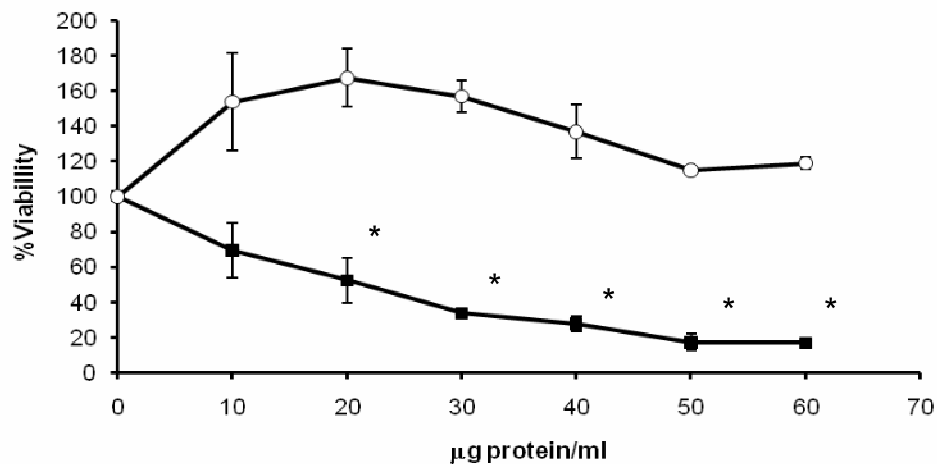
รูปที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ YM



รูปที่ 13 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของยา 5-Fluorouracil (5-FU)

#### VIII. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน และโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 22 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 14)

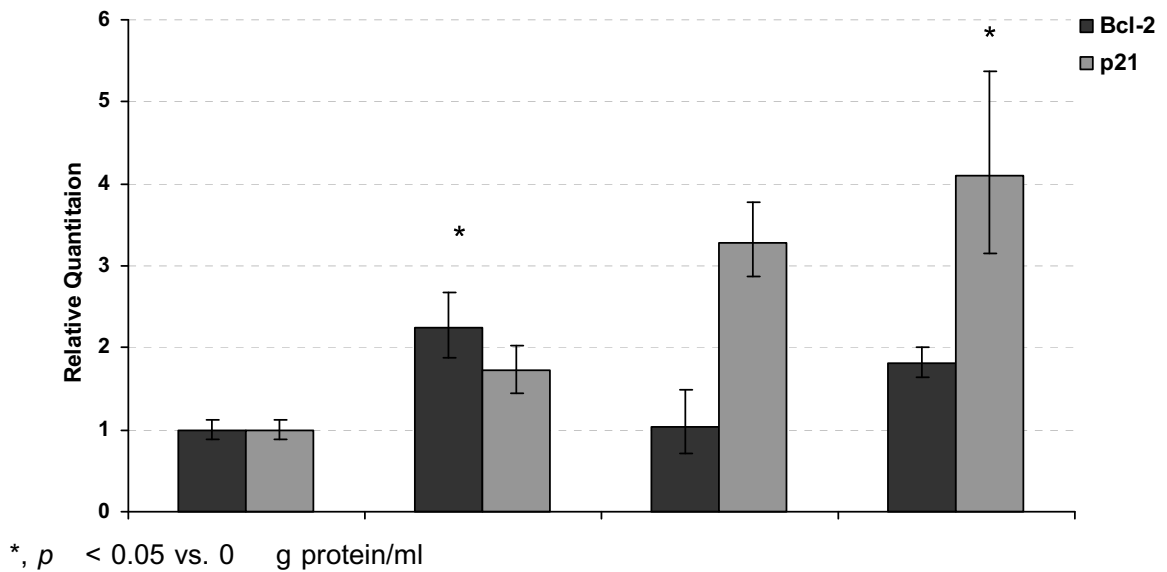


\*,  $p$ -value < 0.05 vs. 0 µg protein/ml

รูปที่ 14 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 (■) และอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน (○)

#### IX. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และ ยีน *p21*

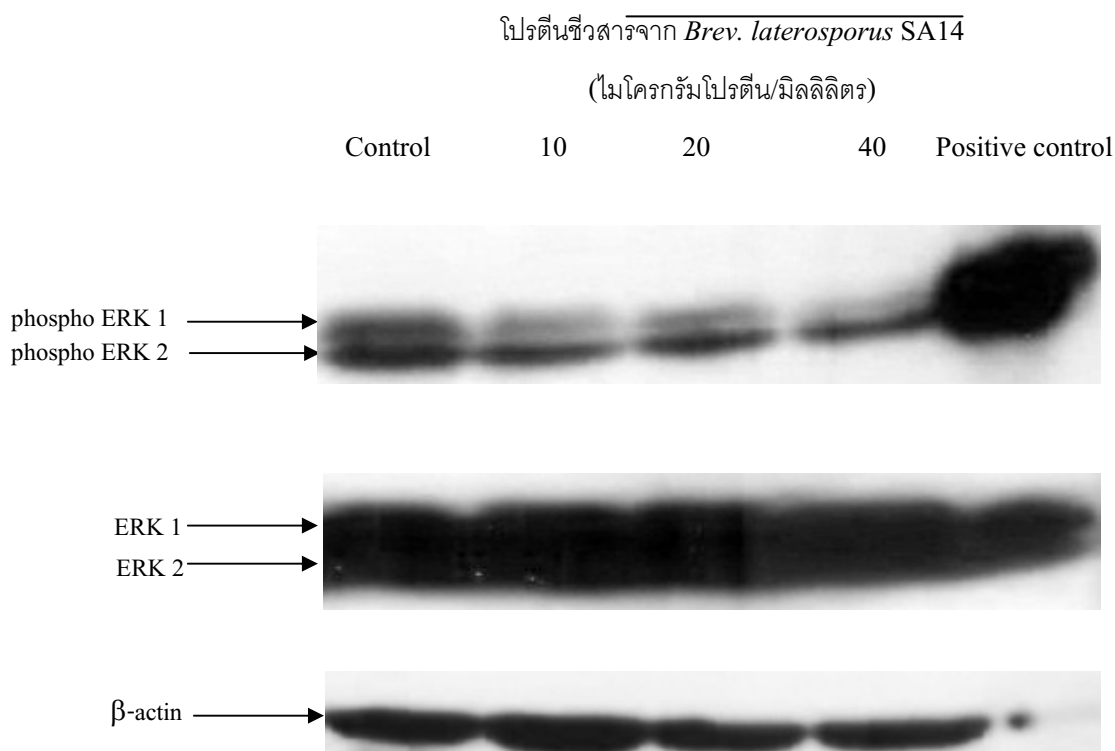
จากการนำ cDNA ของเซลล์มะเร็งช่องปาก ที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มาศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลให้การแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งช่องปากตายไปประมาณร้อยละ 30 ทำให้การแสดงออกของยีน *Bcl-2* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลไกการป้องกันเซลล์จากชีวสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 20 และ 30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงขึ้นพบว่าโปรตีนชีวสารทำให้การแสดงออกของยีน *Bcl-2* ลดลง (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 การแสดงออกของยีน *Bcl-2* (■) และยีน *p21* (■) เมื่อเทียบกับ  $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80 % ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 0-30 ไมโครกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร

#### X. การศึกษาการแสดงออกของ ERK 1/2 protein โดยวิธี Western blot analysis

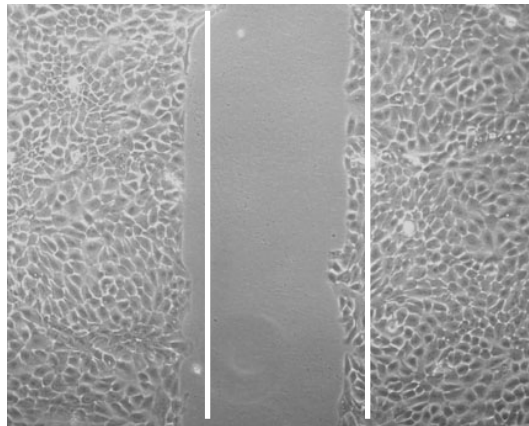
จากการนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยวิธี Western blot analysis พบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ total ERK1/2 ผลจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าปริมาณโปรตีนในแต่ละหลุมทดสอบมีปริมาณที่เท่ากัน เนื่องจากการแสดงออกของ  $\beta$ -actin ซึ่งใช้เป็น internal control มีปริมาณที่เท่ากันในแต่ละหลุม และแถบโปรตีนของตัวอย่างที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารเป็นแถบโปรตีนของ phospho ERK1/2 และ total ERK 1/2 จริงเนื่องจากเป็นแถบโปรตีนที่อยู่ในแนวเดียวกันกับ positive control ที่ใช้ (รูปที่ 16)



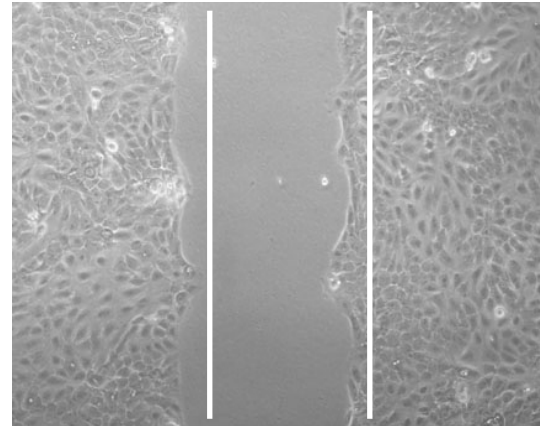
**รูปที่ 16** การแสดงโปรตีน phospho ERK1/2, total ERK1/2 และ  $\beta$ -actin ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ที่ตกตะกอนด้วย 80 % ammonium sulfate

#### **XI. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส**

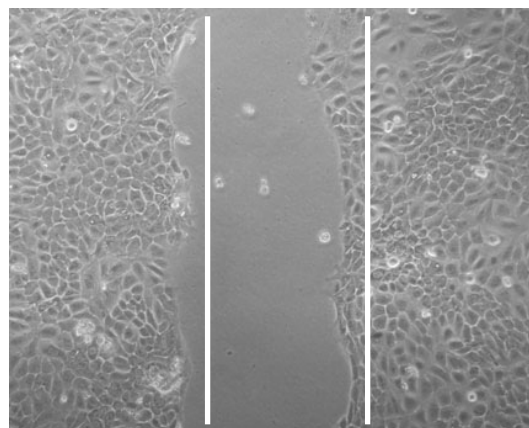
จากการนำโปรตีนชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าโปรตีนชีวสารทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT และเมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ในการสมานบาดแผลพบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวทำให้เซลล์ผิวหนัง HaCaT มีการเคลื่อนที่มาปิดบาดแผลเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที และมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 17) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เตรียมจากการกระบวนการเดียวกันทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 28 ชั่วโมง ไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 18) ส่วน PBS ไม่ทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาปิดบาดแผล ส่วน Allantoin ซึ่งใช้เป็น positive control ทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และเห็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง



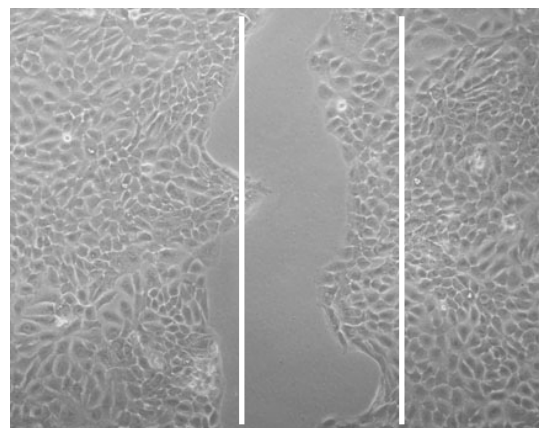
หลังทำให้เกิดบาดแผล 24 ชั่วโมง



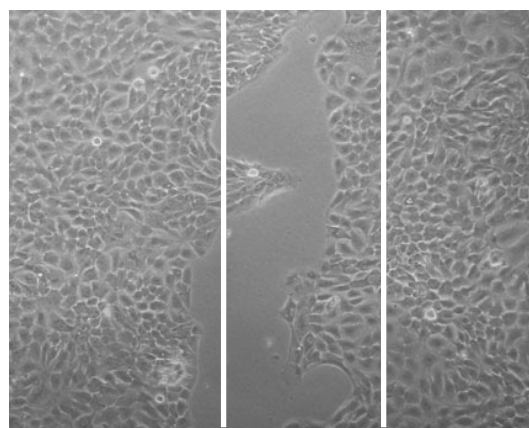
หลังเติมชีวสาร 30 นาที



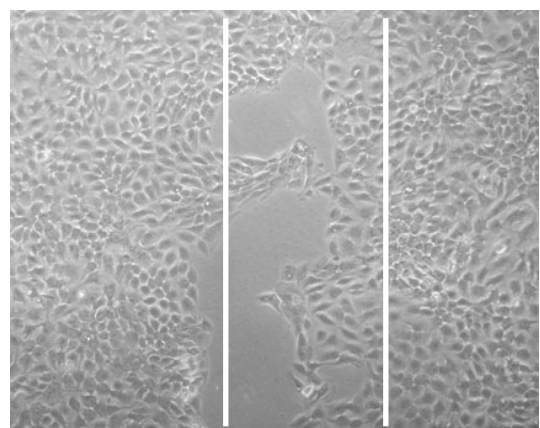
หลังเติมชีวสาร 3 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 16 ชั่วโมง

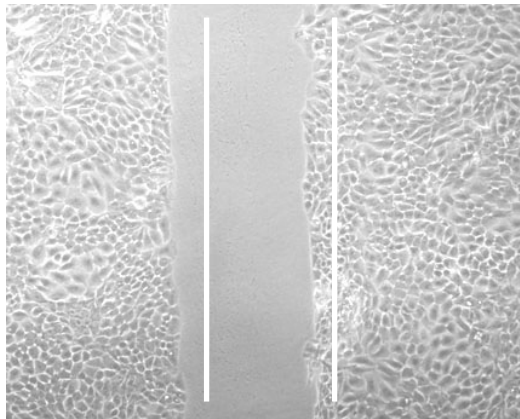


หลังเติมชีวสาร 28 ชั่วโมง

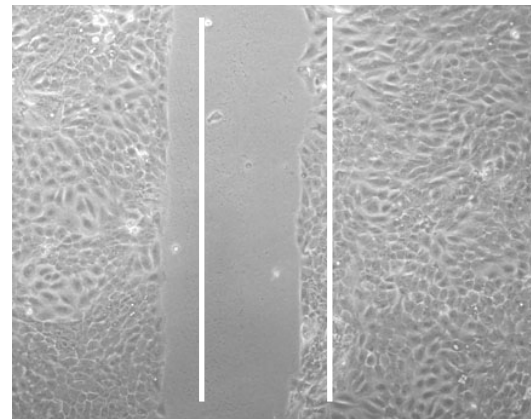


หลังเติมชีวสาร 48 ชั่วโมง

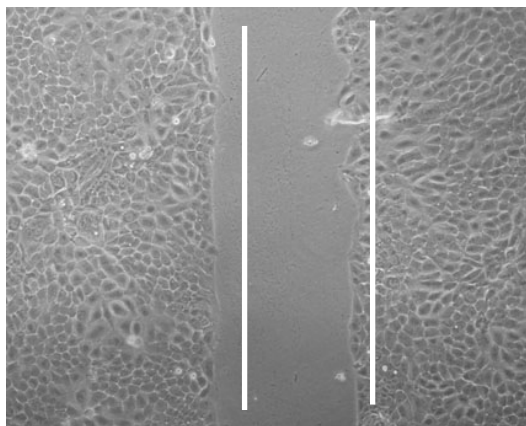
**รูปที่ 17** การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA 14 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ใน 2% FBS



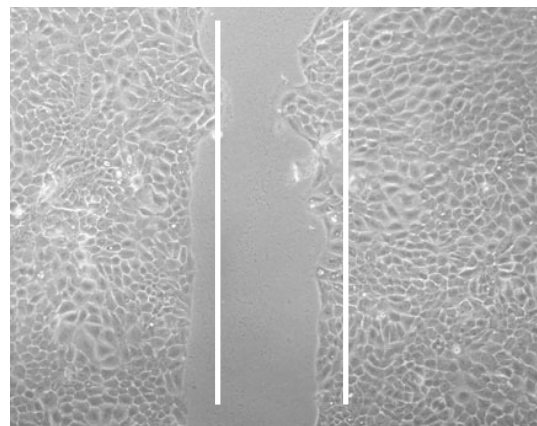
หลังทำให้เกิดบาดแผล 24 ชั่วโมง



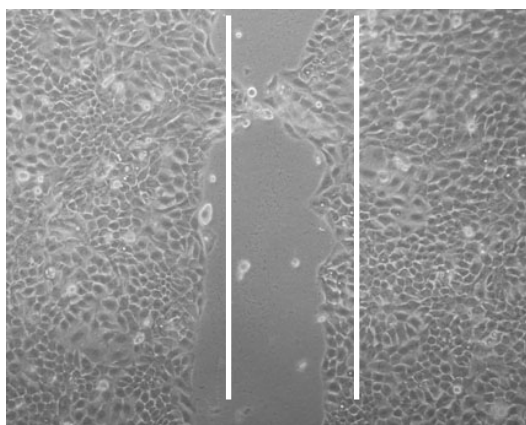
หลังเติมชีวสาร 30 นาที



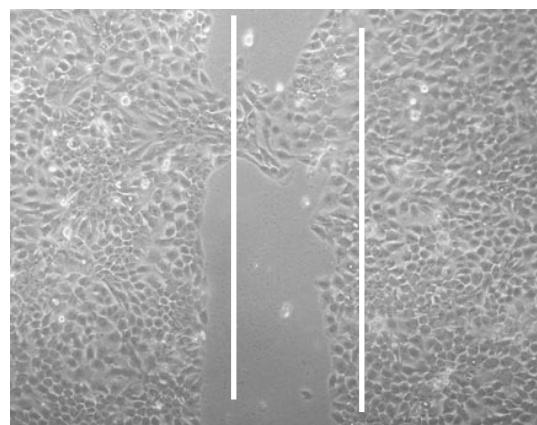
หลังเติมชีวสาร 3 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 16 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 28 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 48 ชั่วโมง

**รูปที่ 18** การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ใน 2% FBS

## XII.ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

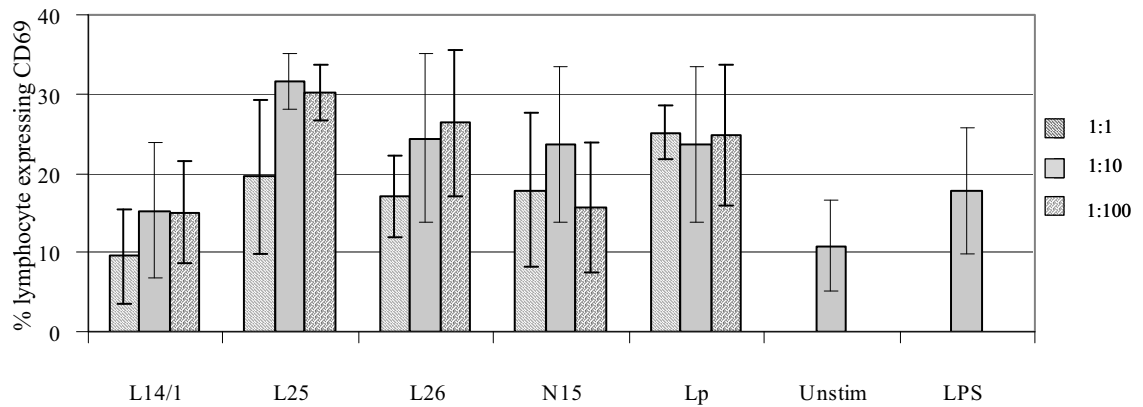
### ผลการวัด CD69

CD69 เป็นเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่มีการแสดงออกเมื่อเซลล์เลือดขาวถูกกระตุ้น ผลการศึกษาพบว่าบนเซลล์ลิมโฟไซต์มีการแสดงออกของ CD69 เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L 25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) โดยใช้จำนวนโมโนนิวเคลียร์ต่อเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 1:1, 1:10 และ 1:100 โดยวัดการแสดงออกของ CD69 ซึ่งเป็น activation marker บนผิวเซลล์โมโนไซต์และลิมโฟไซต์ด้วยเครื่องโฟลซัยโตมิเตอร์ ในคนปกติจำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ลิมโฟไซต์ที่มีการแสดงออกของ CD69 ต่อ L14/1 เท่ากับ 9.5%, 15.3% และ 15% ตามลำดับ L 25 เท่ากับ 19.6%, 31.6% และ 30.1% ตามลำดับ L 26 เท่ากับ 17.1%, 24.4% และ 26.3% ตามลำดับ N 15 เท่ากับ 17.8%, 23.7% และ 16.7% ตามลำดับ Lp เท่ากับ 25.1%, 23.7% และ 24.8% ตามลำดับ ผลการกระตุ้นด้วย LPS (0.5 µg) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก เท่ากับ 17.8% และเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ เท่ากับ 10.8% ดังรูปที่ 19 ส่วนค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์โมโนไซต์ที่มีการแสดงออกของ CD69 ต่อ L14/1 เท่ากับ 3.7%, 6.8% และ 5.7% ตามลำดับ L 25 เท่ากับ 11.8%, 13.6% และ 8.3% ตามลำดับ L 26 เท่ากับ 8.1%, 7.4% และ 5.7% ตามลำดับ N 15 เท่ากับ 8.1%, 16.6% และ 7.4% ตามลำดับ Lp เท่ากับ 16%, 11.4% และ 6.8% ตามลำดับ ผลการกระตุ้นด้วย LPS (0.5 µg) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก เท่ากับ 6.2% และเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ เท่ากับ 5.3% ดังรูปที่ 20

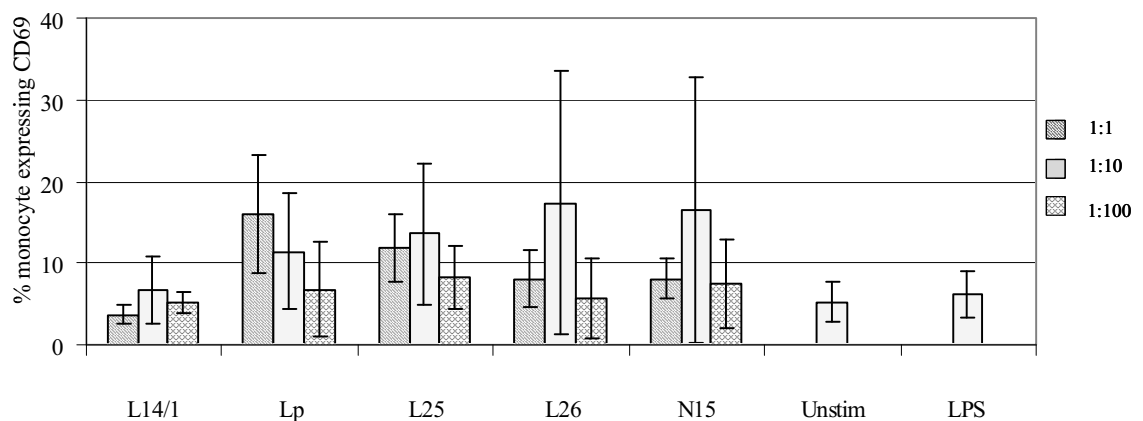
### ผลการตรวจวัด CD80 หรือ CD86

CD80 และ CD86 เป็นเครื่องหมายบนผิวเซลล์เดนดริติกบ่งชี้การเจริญแก่ตัวของเซลล์หลังถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพ การทดลองนี้วัดการแสดงออกบนผิวเซลล์มัยอีลอยด์เดนดริติก (mDCs) และพลาสมาซัยตอยเซลล์ (pDCs) หลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1) และ *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) ผลการตรวจวัดการแสดงออกของ CD86 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 ในอัตราส่วนโมโนนิวเคลียร์เซลล์ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 1:10 และ 1:100 โดยใช้ พบว่ามัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD86 เท่ากับ 75.6%, 79.2%, ตามลำดับ เทียบกับสารควบคุมผลบวก 85.1% และควบคุมผลลบ 83.4% ผลการวัด CD80 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) 1:10 และ 1:100 มีค่าเท่ากับ 88.6%,

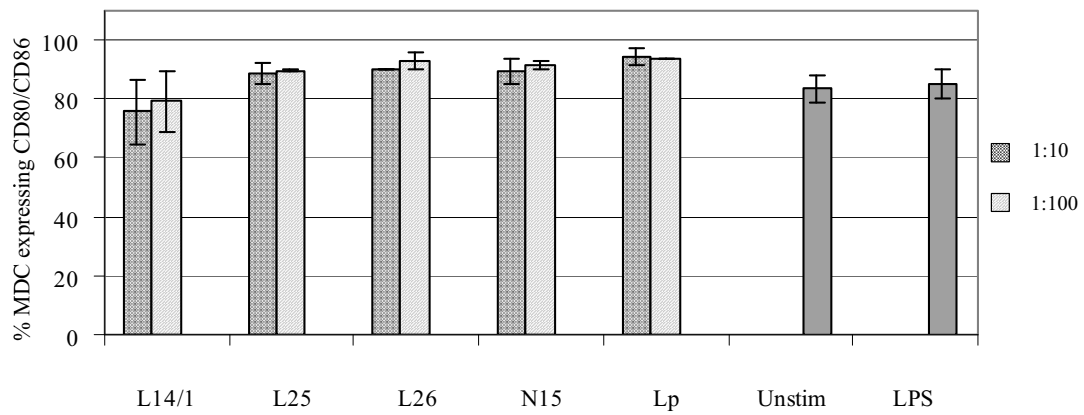
89.7%; 90.4%, 93.1%; 89.5%, 91.4%; 94.3%, 93.6% ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 21 ในขณะที่การแสดงออกบนพลาสมาซัยตอยเซลล์ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากจำนวนเซลล์น้อยมาก



**รูปที่ 19** การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) เทียบกับหลอดควบคุมผลบวก (LPS) และผลลบ (unstim) ผลการแสดงจากจำนวน 3 ตัวอย่าง (N=3)



**รูปที่ 20** การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์โมโนไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) เทียบกับหลอดควบคุมผลบวก (LPS) และผลลบ (unstim) ผลการแสดงจากจำนวน 3 ตัวอย่าง (N=3)



**รูปที่ 21** การแสดงออกของ CD86 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), และการแสดงออกของ CD80 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย *P. acidilactici* L25 (L25), *Lc lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) เทียบกับหลอดควบคุมผลบวก (LPS) และผลลบ (unstim) ผลการแสดงจากจำนวน 2 ตัวอย่าง (N=2)

## บทที่ 5

### บทย่อ อภิปรายผลและสรุปผล

#### จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้
2. ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายทอดชิ้นยีนไคติเนส (heterologous chitinase gene) โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 เป็นต้นแบบ
3. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก
4. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 3. ในน้ำผลไม้
5. การศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
6. การศึกษาการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติก
7. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก
8. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp.
9. ศึกษาการตายของเซลล์มะเร็งจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR และการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2 ด้วยวิธี Western blot analysis
10. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสโดยวิธี wound closure assay
11. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้น (Activation) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่แยกจากเลือดของคนปกติ
12. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้นการเจริญแก่ตัว (maturation) ของเซลล์เดนดริติกในกระแสเลือด

## ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้าและผลที่ได้รับ

### I. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกและการศึกษาคุณลักษณะการเป็นโปรไบโอติก

#### 1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 คัดเลือกสายพันธุ์ของแลคโตบาซิลลัสจากตัวอย่างอาหารหมักด้วยเทคนิคกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และทดลองเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้เป็น indicating strains ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ปรากฏว่ามีเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญได้ดีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และสามารถสุมเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความทนทานอากาศได้จำนวน 76 ไอโซเลท ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าไอโซเลททั้งหมดที่แยกออกมาได้ไม่สามารถทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธีซีดเชื้อได้ อาจเนื่องมาจาก indicating strains ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จึงได้สุมเลือกมา 10 ไอโซเลทมาทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธี agar well diffusion ดังข้อ 2

1.2 ศึกษาฤทธิ์ของแลคโตบาซิลลัสจำนวน 10 ไอโซเลทมาทดสอบฤทธิ์ antimicrobial spectrum โดยวิธี agar diffusion assay ด้วยการนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (มล.) แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37°C. 48 ชม. จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated ultra centrifuge (Sorval) ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm อุณหภูมิ 4°C. นาน 10 นาที แล้วทำการกรองส่วน supernatant ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (มค.ม.) นำไปหยดลงในหลุมของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy (TS) ที่ได้ทำการป้ายจุลินทรีย์ดัชนี (indicating strains) ที่มีความเข้มข้นเทียบเท่า McFarland No.0.5 ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่ 37°C. 24 ชม. สังเกตโดยดูรอบรอยหลุมว่าเกิด inhibition zone หรือไม่ ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทที่สุมเลือกมาทดสอบสามารถยับยั้ง indicating strains แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นไปปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 2N NaOH ปรากฏว่าไม่มีวงใสของการยับยั้งเชื้อปรากฏขึ้น

1.3 ปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ UV และสอดใส่ชั้นยีนโคตินเนสโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 เป็นต้นแบบ และใช้ *Candida albicans* TISTR 5239 เป็นเชื้อดัชนี ปรากฏว่า

1.3.1 *L. plantarum* ที่ผ่าน UV ให้ผลการยับยั้ง *C. albicans* ดีขึ้น แต่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงสายพันธุ์ผ่าเหล่าด้วย UV หลายๆ รุ่น จะพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ลดลง

1.3.2 การสอดใส่ชั้นยีนโคตินเนสเข้าสู่ *L. plantarum* นั้นสามารถตรวจพบการแสดงออกของชั้นยีนโคตินเนสเพียงเล็กน้อยและชั้นยีนไม่เสถียรรูปเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้หลายรุ่น และเบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *Micrococcus luteus* TISTR 884 เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามฤทธิ์ดังกล่าวจะสูญหายไปเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ปรับปรุงพันธุ์ไว้หลาย ๆ รุ่น

## 2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (เพิ่มเติม) และการศึกษาคุณลักษณะการเป็นโปรไบโอติก

2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยใช้เกณฑ์ดังนี้คือ 1) การเลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น ผักผลไม้ ผลิตภัณฑ์นม ผลการศึกษาเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากผัก-ผลไม้ (มะเขือเทศ แดงโม มะพร้าว กะหล่ำปลี) นมวัว และนมแพะพบว่าตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีลักษณะคือ หนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ ย้อมติดสีแกรมบวกรูปท่อน โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท 2) การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 106 ไอโซเลทรวมเชื้อควบคุม (C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050) ปรากฏว่ามีเพียงไอโซเลทที่ 9 ที่แยกออกมาได้จากมะเขือเทศ และไอโซเลทที่ 35 ที่แยกออกมาได้จากนมเท่านั้นที่สามารถแสดงการเกาะติดผิวหลอดด้านในของหลอดทดลอง จึงได้ตั้งชื่อว่า T9 และ N35 ตามลำดับ แต่พบว่า T9 แสดงการเกาะกลุ่มที่เร็วกว่าและยาวนานกว่า 3) การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดยเมตาบอไลต์ต่างๆ พบว่าไอโซเลท T9 ที่คัดเลือกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียดัชนีที่นำมาทดสอบทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 ) แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทำลายราดัชนี *Candida albicans* TISTR 5779 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion 4) การแยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 ปรากฏว่าไอโซเลท T9 ที่แยกได้มาจากมะเขือเทศคือ *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกมาได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติก 5) ความทนต่อระดับ pH 2-10 พบว่าไอโซเลท T9 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH 2-10 และสามารถสังเกตเห็นการเกาะติดพื้นผิวหลอดด้านในของแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดทดลอง 6) ความทนทานต่อการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะพบว่าไอโซเลท T9 ตี้อต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ยกเว้นยา nitrofurantoin 7) ความคงตัวในสภาวะที่มีสารเสริมต่างๆ ประมาณ 1 เดือน 8) ความคงทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ไอโซเลท T9 สามารถเจริญเป็นโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ภายหลังจากการเก็บรักษาไว้ใน -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2.2 การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 2.1 ในน้ำผลไม้ 3 ชนิด (น้ำแดงโม น้ำมะพร้าว และน้ำมะเขือเทศ) พบว่าไอโซเลท T9 สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำผลไม้ที่นำมาศึกษาแตกต่างกันโดยพบว่าสามารถมีชีวิตเหลือรอดได้ดีในน้ำแดงโมและน้ำ

มะเขือเทศในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน ส่วนน้ำมะพร้าวทำให้แบคทีเรียตายทั้งหมดภายหลังการจัดเก็บไว้เพียง 9 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *L. plantarum* 1 (ไอโซเลท T9) ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/ml มีอัตราการอยู่รอดโดยเฉลี่ยมากที่สุดในน้ำแตงโมที่ไม่เติมสารพรีไบโอติกโดยมีปริมาณเซลล์หลงเหลือชีวิตปริมาณ  $5.4 \pm 0.21$  log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน รองลงมาคือการอยู่รอดในน้ำมะเขือเทศที่เติมสารพรีไบโอติก (5.3 log CFU/ml) ในน้ำมะเขือเทศที่ไม่เติมสารพรีไบโอติก (5.2 log CFU/ml) ในน้ำแตงโมที่เติมสารพรีไบโอติก (5.0 log CFU/ml) ส่วนในน้ำมะพร้าวทั้งที่เติมสารพรีไบโอติกและไม่เติมสารพรีไบโอติกนั้นเชื้ออยู่รอดได้เพียงประมาณ 6 วัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์อัตโนมัติ SPSS โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ ONE WAY ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. plantarum* 1 ปรากฏว่า การเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ ( $p\text{-value} < 0.05$ )

3. การศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกและการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้

3.1 การศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells) ได้ร้อยละ 50 พบว่าเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์คือ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *Pediococcus acidilactici* L25 (L25), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp), *Lactobacillus plantarum* 1 T9 (T9) และ *Enterococcus faecium* N15 (N15) ที่ถูกเจือจางแบบ 2 เท่าในช่วงความเข้มข้นของโปรตีน 0.003 - 0.025 mg protein/ml ที่มี pH เป็นกรด มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่าเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่า pH ให้เป็นกลาง

3.2 การศึกษาการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ Lp และ L25 และสามารถเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีมากมีจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ N15, L26 และ L14/1 ส่วน T9 ไม่สามารถเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ได้

## II. การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มอื่นและฤทธิ์ต่าง ๆ ของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรีย

1. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก ผลการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Bacillus* คือ *Brev. laterosporus* SA14 พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus* ทั้ง

วิธีทดสอบแบบ agar well diffusion และ spot on lawn และจะเริ่มตรวจพบฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Duran ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร นอกจากนี้การนำน้ำเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar plug diffusion พบว่าไอโซเลท CO4 และไอโซเลท WU6 มีฤทธิ์ต้าน MRSA ทั้งหมด ส่วนไอโซเลท CK9 มีฤทธิ์ต้าน MRSA เพียง 3 สายพันธุ์ (MRSA 414, MRSA 539, MRSA 3576) และ *S. aureus* TISTR 517 สำหรับไอโซเลท WU10 ไม่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ส่วนการทดสอบโดยใช้วัฏรอบโคโลนีของเชื้อดังกล่าวพบว่ามีเฉพาะ CO4 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ที่นำมาศึกษา

## 2. ฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรีย

2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* ด้วยวิธี MTT พบว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.033 mg protein/ml (3.67 mg/ml) และยาต้านมะเร็ง (5-FU) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.75 mg/ml จากการทดลองยังพบอีกว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีจะให้ค่า  $IC_{50}$  ที่เท่ากันคือ 0.034 mg protein/ml สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. โดยใช้ชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการระเหิดแห้ง (lyophilization) พบว่าไอโซเลท CO4 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.005 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 5.88 mg/ml (w/v) ส่วนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ไอโซเลท WU6 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.032 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 34.83 mg/ml และชีวสารของน้ำเลี้ยงเชื้อ ไอโซเลท WU10 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.023 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 25.62 mg/ml ซึ่งชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ดี

2.2 ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส (*Brevibacillus laterosporus* SA14)

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 พบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 22 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร และจากการศึกษาการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ด้วยโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21*

ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* เมื่อเทียบกับ  $\beta$ -actin ที่ใช้เป็น internal control แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และเมื่อนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis พบว่าโปรตีนชีวสารสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ total ERK1/2 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากลไกการตายของเซลล์มะเร็งช่องปากน่าจะเกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีการลดลงของโปรตีน phospho ERK1/2 และการเพิ่มสูงขึ้นของยีน *p21* ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์และทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด

2.3 ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *บาซิลลัส*

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ HaCaT อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เข้ามาปิดบริเวณบาดแผลด้วยวิธี wound closure assay ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 2% fetal bovine serum พบว่าโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ได้เร็วกว่าเซลล์ HaCaT ที่บ่มเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

### III.ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติก

ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์คือ เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1) เชื้อ *Pediococcus acidilactici* L25 (L25) เชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26) เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) และเชื้อ *Enterococcus faecium* N15 (N15) โดยใช้เซลล์ (whole cell) ของแบคทีเรียในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์และวัดการแสดงออกของ CD 69 ซึ่งเป็น activation marker บนผิวเซลล์กลุ่ม ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโมเลกุล CD69 บนเซลล์ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่กระตุ้นด้วย LPS ปรากฏว่าแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 5 สายพันธุ์ในการกระตุ้นเซลล์เดนดริติกในกระแสเลือด 2 กลุ่มคือ มัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์และพลาสมาซัยตอยด์เดนดริติกเซลล์

(myeloid and plasmacytoid dendritic cells) ให้มีการแสดงออกของโมเลกุล CD80 และหรือ CD86 ซึ่งเป็น maturation marker ของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้น พบว่าเซลล์มีอีลอยด์เดนดริติก เซลล์มีการแสดงออกของ CD 80 หรือ CD86 ไม่ต่างจากเซลล์ควบคุม ในขณะที่พลาสมาซัยตอยด์เดนดริติกเซลล์ ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีนี้เนื่องจากมีเซลล์น้อยเกินไป

## อภิปรายผลการทดลอง

### I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักประเภทต่างๆ พบว่ามีเชื้อเจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้สำหรับคัดเลือก (selective media) แบคทีเรียกรดแลคติก (ซุตินันท์, 2545) ซึ่งมีลักษณะทาง Macroscopic คือ โคลนสีขาวขุ่น กลม หนูน ขอบเรียบ ส่วนลักษณะทาง Microscopic กล่าวคือแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ (catalase test = Negative, Gram stain = Positive bacilli, non-spore forming) และเมื่อคัดเลือกโคลนของเชื้อทั้ง 40 โคลน นำไปทดสอบ antimicrobial activity โดยใช้เชื้อทดสอบ คือ *L. plantarum*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* พบว่าให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาเป็นเชื้อดัชนีได้ทั้งหมด การที่เชื้อแต่ละ isolates มีคุณสมบัติ antimicrobial แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน อาทิเช่น ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Batish et.al, 1997; Harlander, 1993) และความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจปรับปรุงได้โดยใช้อาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียง 0.2% (MRS 0.2%) เพื่อลดการเกิดกรดของอาหาร (วิลาวณีย์, 2542) นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญคือสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ซึ่งอาจอยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 85-95) (ปาริชาติ, 2543) จึงทำให้ความเข้มข้นของสารยับยั้งอื่นมีน้อย นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี agar well diffusion มีข้อจำกัดในด้านการแพร่ของสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดโมเลกุลของสารแบคทีเรียอิน ดังนั้น ควรทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี broth dilution เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบอีกครั้งหนึ่ง (ซุตินันท์, 2545)

การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวของเชื้อที่คัดเลือกได้พบว่ามีเชื้อเพียงบาง isolates ที่ยึดเกาะติดพื้นผิวได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่เหมาะสมและ/หรือขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเชื้อเองซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการมีแคปซูลหรือฟิไล (pili) ของเชื้อ โดยโครงสร้างทั้ง 2 ชนิดได้ถูกรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่มของเชื้อและมีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรค (นริกุล และคณะ, 2526)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักต้องมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นดัชนีรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ซึ่งอาจเนื่องมาจากการดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นมาหรือสารอื่นๆ เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไตอะซิดิล อะเซทาลดีไฮด์ รุเทอรินและแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (ปาริชาติและพงศ์ศักดิ์, 2543; ปาริชาติและคณะ, 2543; ชุตินันท์และคณะ, 2545) แต่มีเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยมีรายงานว่ากรดอินทรีย์แสดงคุณสมบัติดังกล่าว (Corsetti et.al., 1998) ดังนั้นเพื่อยืนยันข้อความดังกล่าวจึงได้ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 2.5-11.0 ซึ่งฤทธิ์จะยังคงอยู่ในช่วงที่ pH เป็นกรด แสดงว่ากรดอินทรีย์มีบทบาทดังกล่าว อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่ารุเทอรินก็มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อราเช่นกัน (Daeschel, 1989)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย L14/1, L25, L26, Lp, T9 และ N15 มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งลำไส้ โดยพบว่าเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เป็นกรด จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่าเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่า pH ให้เป็นกลางโดยเรียงลำดับจากที่มีฤทธิ์ดีที่สุดถึงน้อยที่สุดคือ T9>Lp>L26>N15>L14/1>L25 ส่วนเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่า pH ให้เป็นกลางจากที่มีฤทธิ์ดีที่สุดถึงน้อยที่สุดคือ L14/1> L25, L26, Lp, T9 และ N15

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Lactobacillus plantarum* 1 T9 (T9) มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีที่สุด ส่วน *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (Lp) พบว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรองลงมาซึ่งฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ดังที่ได้กล่าวมานี้สอดคล้องกับงานวิจัยหนึ่งที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* 0101 และ *Lactobacillus plantarum* 1058 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง fibrosarcoma ได้ (Shimizu et.al., 1987)

*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L 26) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเป็นลำดับที่ 3 รองจากเชื้อกลุ่ม Lp ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำในสัตว์ทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *cremoris* ซึ่งแยกได้จากเซลล์ลำไส้สามารถยับยั้งก้อนมะเร็งชนิด sarcoma ได้ (Kitazawa et.al., 1990) ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่าเมตาบอไลต์จาก L26 ที่ความเข้มข้น 0.003 และ 0.006 mg protein/ml สามารถที่จะทำให้การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมตาบอไลต์ดังกล่าวอาจมีสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของมะเร็งลำไส้ ดังเช่นรายงานการวิจัยหนึ่งพบว่า สายเปปไทด์ชนิดหนึ่งที่สกัดได้จาก sarcoplasmic protein ของวัว ทำให้การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้น ส่วนสายเปปไทด์ชนิดอื่นๆที่สกัดได้จากแหล่งเดียวกันมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Jang et.al., 2008)

*Enterococcus faecium* N15 (N15) พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า *E. faecium* RM11 มีฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้โดยทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ตายไปร้อยละ 21-29 (Thirabunyanon et.al., 2009)

*Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1) และ *Pediococcus acidilactici* L25 (L25) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งลำไส้เช่นกันและจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ในการมะเร็งของแบคทีเรียในสายพันธุ์นี้

กลไกที่กรดแลคติกสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งน่าจะเกิดเนื่องมาจากการที่  $H^+$  สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์มีความเป็นกรดสูง (เยาวภา, 2552) นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นกรดทำให้โปรตีนเสียสภาพและกรดยังสามารถยับยั้งการขนส่งของกรดอะมิโนภายในเซลล์ได้ (Richard, 1992)

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์คือ L14/1, L25, L26, Lp, T9 และ N15 บ่มเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้เพื่อดูความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่า L26 L14/1 และ N15 มีการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ดีที่สุด ส่วน L25 และ Lp มีการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ในระดับดี แต่ T9 มีการเกาะติดเซลล์มะเร็งที่น้อยมากซึ่งถือได้ว่าไม่สามารถเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษากการเกาะติด Caco-2 cells ของแบคทีเรีย *Enterococcus mundtii* ST4SA และ *Lactobacillus plantarum* 423 พบว่าสามารถเกาะติด Caco-2 cells ได้ดี (Botes et.al., 2008) ยังมีการศึกษาพบอีกว่า *Lactococcus* ssp. *lactis* NIAI527 สามารถเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีที่สุด โดยสามารถทนต่อกรดและน้ำดีได้ (Kimoto et.al., 1999) และนอกจากนี้ยังพบว่า *Pediococcus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Clostridium diffcisi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* และ rotavirus เป็นต้น และบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการยึดเกาะพื้นผิวได้ดี เช่น เซลล์ microvilli ของลำไส้เล็ก พื้นผิวแก้วและพลาสติก เป็นต้น จึงใช้คุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและคุณสมบัติในการเกาะพื้นผิว มาผลิตเป็นอาหารเสริมโปรไบโอติกแบบมีชีวิต (Shimizu et.al., 1987)

มีรายงานวิจัยที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* 423 มี surface bound protein คือ Elongation factor Tu (EF-Tu) ซึ่งเป็น envelope associated protein และยังมีเอนไซม์ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็นแหล่งสร้างพลังงานของเซลล์ และเอนไซม์ triosephosphate isomerase (TPI) ที่ทำหน้าที่สร้างพลังงานให้แก่เซลล์ ซึ่งทั้งหมดเป็นโปรตีนที่ช่วยในการเกาะติดพื้นผิวของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดเซลล์เช่น surface layer proteins (Slps) ที่พบใน *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus helveticus* โปรตีน Aggregation promoting factor (APFs) พบได้ในเชื้อ *L. johnsonii* และ *L. gasserii* โปรตีนในกลุ่มของ ancholless multifunctional protein เช่น EF-TU และ chaperonin protein complex GroEL ซึ่งเป็น intracellular protein ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน และการม้วนพับของโปรตีน ซึ่งจะพบโปรตีนเหล่านี้บนผิวเซลล์และใน culture medium ของเชื้อ *L. johnsonii* La1 นอกจากนี้ยังมี

โปรตีน Surface enzyme เช่น Prt B ของเชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งโปรตีนต่างๆ ที่กล่าวมานี้ล้วนเป็นโปรตีนที่ช่วยในการเกาะติดทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *L. plantarum* มี adhesin-gene คือ mub และ mab ซึ่งช่วยในการเกาะติด (Ramiah et.al., 2008) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ fibrillae ซึ่งน่าจะเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สามารถช่วยให้ตัวเชื้อเกาะติดกับ epithelial cell ได้และยังพบอีกว่า lipoteichoic acid ซึ่งเป็น polymer ของ glycerophosphate ที่จะไปรวมตัวกับโปรตีนบนผิวเซลล์ ทำให้มีลักษณะเหมือนสะพานเชื่อมติดกับ epithelial cell และนอกจากนี้ยังพบว่า lectins ซึ่งอาจพบได้ที่ผิวของ lactobacilli ผิวของเซลล์เจ้าบ้านหรือจากอาหารที่รับประทานเข้าไป โดย lectins จะเข้าไปจับแบบจำเพาะกับ receptor ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนผิว epithelial cell หรือบนผิว lactobacilli (Gerald and Tannock, 1992)

## II. การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มอื่นและฤทธิ์ต่าง ๆ ของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรีย

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* หลายชนิด สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและปล่อยออกมานอกเซลล์ (Huang et.al., 2005) ซึ่ง *Brev. laterosporus* SA14 ได้ผลิตสารปฏิชีวนะดังกล่าวได้เช่นกัน โดยสามารถตรวจพบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* TISTR 517 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 7 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ซึ่งฤทธิ์ที่ตรวจพบสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่พบว่าสารปฏิชีวนะถูกผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์ตั้งแต่วันแรกของการบ่มเลี้ยงเชื้อ (กฤษณวัฒน์ และคณะ, 2550) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ฤทธิ์ปฏิชีวนะดังกล่าวพบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงบางขวดในวันแรกของการบ่มเลี้ยง และจะพบฤทธิ์ปฏิชีวนะครบทุกขวดในวันที่ 3 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจเกิดจากปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณเชื้อตั้งต้นในการบ่มเลี้ยง สภาพะในการบ่มเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออุณหภูมิ ซึ่งอาจจะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะมีการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ มากมายที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการดำรงชีวิต โดยโปรตีนบางส่วนได้ถูกผลิตและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งมักพบได้บ่อยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถหลั่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้โดยตรง อันเนื่องมาจากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่มีแต่เพียงชั้นของ peptidoglycan ไม่มีชั้นไขมันมาห่อหุ้มเหมือนกับที่มีในแบคทีเรียแกรมลบที่มีความซับซ้อนกว่า จึงทำให้สามารถตรวจพบฤทธิ์ปฏิชีวนะจากโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและภายในเซลล์แบคทีเรีย (ภัทรชัย, 2549)

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน และโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก ส่วนโปรตีนชีวสารที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น

22 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวน่าจะเป็นกลุ่มของ microbial peptide และ secondary metabolites (Reddy et.al., 2004) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ที่บ่มเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (นันทวัน และคณะ, 2553) จากการศึกษาฤทธิ์ของ crude proteins ของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29 colon cancer cells) พบว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ร้อยละ 50 เท่ากับ 360 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (มณฑล และ วรางคณา, 2552) ซึ่งกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจาก antimicrobial peptide มีประจวบเหมาะ ซึ่งสามารถเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุลบของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งต่างจากเซลล์ปกติที่มีประจุเป็นกลาง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดเป็นรูพรุน (Hoskin et.al., 2008) โดยผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดเนื่องจากสภาวะที่ใช้ทดสอบและพันธุกรรมของเซลล์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

เมื่อนำเซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาสกัด RNA เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และ ยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ไม่มีต่อการแสดงออกของยีน *Bcl-2* แต่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสาร มีรายงานการวิจัยพบว่าในชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งช่องปากและจากเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของโปรตีน *Bcl-2* ที่สูง (De Sousa et.al., 2009) ดังนั้นยีน *Bcl-2* และโปรตีน *Bcl-2* จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญของยาต้านมะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวไม่ได้มีผลลดการแสดงออกของยีน *Bcl-2* จากการวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่ายาที่มีเป้าหมายที่สำคัญคือไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* งานวิจัยหนึ่งพบว่าสาร 50-nitro-indirubinoxime (50-NIO) มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยส่งเสริมให้มีการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในระยะ G2/M และ G1/S โดยมีกลไกที่สำคัญคือ เพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* (Kim et.al., 2009) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สาร vesnarinone สามารถยับยั้งการเจริญของ squamous cell carcinoma cells ได้ โดยสารดังกล่าวทำให้เซลล์มีการแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้น (Yoneda et.al., 1998) สำหรับกลไกของโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ในการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *p21* ยังไม่มีการรายงานและการศึกษาถึงกลไกที่แน่ชัด แต่รายงานวิจัยพบว่า antimicrobial peptide สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (Hoskin et.al., 2008)

เมื่อนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก พบว่าโปรตีนชีวสารมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 ในเซลล์มะเร็งช่องปาก

โดยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าขึ้นเนื้อมะเร็งช่องปากจากผู้ป่วยมีการแสดงออกของ phospho ERK1/2 สูง (Park et.al., 2010) โปรตีน phospho ERK1/2 จึงเป็น molecular target ของยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น curcumin (Shin et.al., 2010) และ aspirin (Park et.al., 2010) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของ phospho ERK1/2 ส่วนโปรตีน total ERK1/2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของกลไกยังไม่ทราบแน่ชัด น่าจะเกิดจากการที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายทำให้มีผลรบกวนโปรตีน tyrosine kinase ซึ่งเป็น receptor ที่ควบคุมการส่งสัญญาณผ่านวิถี MAP kinase pathway หรืออาจเกิดจากโปรตีนชีวสารมีผลทำลาย intracellular enzyme ภายในเซลล์ดังเช่นที่พบในเซลล์แบคทีเรีย (Hoskin and Ramamoorthy, 2008)

จากการนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบความสามารถในการสมานแผลของเซลล์ HaCaT ที่ความเข้มข้น 0.39 µg protein/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 2% FBS พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่เตรียมจากการตกตะกอนด้วย 80 % ammonium sulfate ทำให้เซลล์ มีการเคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่เกิดบาดแผลได้เร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเมื่อมีการอักเสบ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียทำให้ epithelial cell ได้รับความเจ็บและจะทำให้เกิดการซ่อมแซมและสมานบาดแผลอย่างรวดเร็วเพื่อที่จะปิดบาดแผลที่เกิดขึ้นโดยทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (migration) และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ epithelial cell จนกระทั่งปิดบาดแผลนั้น (Karrasch et.al., 2009)

สำหรับแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยซิสเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญและหลากหลาย *Streptomyces* spp. CO4, WU6, และ WU10 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ต้าน MRSA แตกต่างกันได้ อาจเนื่องมาจากแต่ละไอโซเลทของ *Streptomyces* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกันและออกฤทธิ์ได้หลายแบบดังที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยซิสที่แยกได้และได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นพบว่ามี 3 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท CO4 ไอโซเลท WU10 และไอโซเลท WU6 และเมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257, *Streptomyces flaveolus* strain NRRLB-13334 และ *Streptomyces* sp. b26 ตามลำดับ (สุเมธ และคณะ, 2552) ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการระเหิดแห้งจากไอโซเลท CO4 พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าไอโซเลท WU10 และ WU6 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมบวกจะปลดปล่อยสารออกมานอกเซลล์ (Lewis et.al., 1984) ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่อาจถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงให้ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังเช่นรายงานที่พบสาร mithramycin (MM) ที่มี

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. AA030098 (Lee et.al., 2007) มีรายงานพบว่าเชื้อ *Streptomyces antibioticus* สามารถผลิตสาร pentostatin ซึ่งเป็น purine nucleoside analog ที่ได้จากกระบวนการหมัก มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ในขณะนั้นยังไม่เคยมีการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดอื่น (Spiers, 1996) ส่วนเชื้อ *Streptomyces flaveolus* พบว่ายังไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของเชื้อดังกล่าว อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *Streptomyces flaveolus* strain Tü 1240 สามารถสังเคราะห์สาร tirandamycin A ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (Hagenmaier et.al., 1976) นอกจากนั้นมีการค้นพบสาร angucycline landomycin E (LE) และสาร guanine-7-oxide จากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากได้ โดยที่กลไกการตายของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Korynevskaya et.al., 2007) การทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ปกติและการศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสาร เป็นสิ่งที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อที่จะได้นำสารนั้นมาใช้พัฒนาเป็นสารต้นแบบในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อไป

### III. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน มีรายงานการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกหลายรูปแบบ ได้แก่ การใช้ความร้อน การทำเป็นผงแห้ง (lyophilized bacteria) การใช้แสงอัลตราไวโอเลต (Fink LN. และคณะ, 2008; Chuang L. และคณะ, 2007) สำหรับการใช้แสงอัลตราไวโอเลตมีข้อดีคือ ทำได้ง่ายภายใน 15 นาที ก็สามารถทำลายแบคทีเรียได้หมด Hiramatsu Y. และคณะ (2007) ทดสอบการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียที่มีชีวิต แบคทีเรียที่ถูกทำลายด้วยความร้อน และแบคทีเรียที่ทำให้เซลล์แตกโดยการทำให้ sonicator พบว่าแบคทีเรียที่มีชีวิตและแบคทีเรียที่ผ่านความร้อน กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อยกว่าแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้เซลล์แตก ดังนั้นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการเตรียมแบคทีเรียก่อนนำไปใช้ในการกระตุ้น

CD69 เป็นเครื่องหมายบ่งชี้การตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น ลิมโฟไซต์ (activated T, B cell) และ NK cell จากการทดลองนี้ เมื่อเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก จะมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ที่มีการแสดงออกของ CD69 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น (Elmadfah I. และคณะ, 2010) การเพิ่มขึ้นของ CD69 อาจเนื่องมาจาก APC ในโมโนนิวเคลียร์เซลล์รับรู้แบคทีเรียกรดแลคติกและนำไปสู่การกระตุ้น T-lymphocyte Fink LN. และคณะ (2008) ได้ศึกษาการแสดงออกของ CD69 บน NK cell เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เดนดริติกที่ถูกกระตุ้นด้วย *L. acidophilus* และ *B. bifidum* โดยพบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD69 ได้ไม่ต่างกัน แต่กระตุ้นให้ NK cell สร้างไซโต

ไคน์ IFN- $\gamma$  ได้ต่างกัน นั่นคือแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำให้เกิดการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกแล้วไปกระตุ้นเซลล์อื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันต่อไป ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้การเพิ่มขึ้นของ CD69 บนลิ้มโฟซัยต์จึงน่าจะเป็นผลมาจากเซลล์เดนดริติกที่ถูกกระตุ้น ส่วนการเพิ่มขึ้นของ CD69 บนโมโนซัยต์เป็นผลมาจากการกระตุ้นจากแบคทีเรียโดยตรง

ผลการตรวจวัดการแสดงออกของ CD80 และ CD86 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์และพลาสมาซัยตอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งบ่งชี้การเจริญแก่ตัว (maturation marker) เช่นเดียวกับ HLA-DR, CD54 CD83 CD209 (Elmadfah I. และคณะ; 2010) เดนดริติกเซลล์ที่ตัวแก่นี้มีความสำคัญในการกระตุ้น T cell ให้เปลี่ยนไปเป็น Th1/Th2, effector cytotoxic T cell หรือ regulatory T cells (Treg) (Foligne B และคณะ; 2007) จากผลการทดลองนี้เมื่อมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีการแสดงออกของ CD80 CD86 ประมาณ 70-80% ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น อาจเนื่องมาจากเดนดริติกเซลล์ที่นำมากระตุ้นนี้เป็นเดนดริติกเซลล์ที่อยู่ในกระแสเลือดอาจจะถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนอยู่ก่อนแล้ว จึงทำให้กลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นมีการแสดงออกของ CD86 สูง Zeuthen LH. และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการตอบสนอง MoDCs ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* X37, *L. paracasei* Z11, *L. reuteri* DSM12246, *B. bifidum* S131 และ *L. rhamnosus* GG พบว่ามีการแสดงออกของ CD86 เพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดย MoDC ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย *L. acidophilus* X37 และ *L. paracasei* Z11 สูงกว่า *L. reuteri*, *B. bifidum* S131 และ *L. rhamnosus* GG และ MoDC ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียมีการแสดงออกของ CD86 ในระดับสูง ซึ่งไม่แตกต่างจากการกระตุ้นด้วย *L. reuteri*, *B. bifidum* S131 และ *L. rhamnosus* GG มากนัก นั่นคือการแสดงออกของ CD86 มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากการศึกษาของ Chuang L. และคณะ (2007) ศึกษาการกระตุ้น MoDC ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวัดการสร้างไซโตไคน์ IL-12 โดยพบว่าปริมาณการตอบสนองขึ้นกับระยะเวลาการกระตุ้นโดยเวลาที่ 24 ชั่วโมง จะตอบสนองได้ดีกว่า 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเบื้องต้นถึงการนำเซลล์เดนดริติกในกระแสเลือดมาใช้เพื่อศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกและไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังนั้นการศึกษากการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกจึงควรใช้ immature dendritic cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากโมโนซัยต์หรือเซลล์ต้นกำเนิดจะให้ผลดีกว่าและลดปัญหาเรื่องจำนวนเซลล์ที่มีน้อยเกินไป

## สรุป

### การทดลองในรอบปีที่ 1

1. คัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมักด้วยเทคนิคกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และทดลองเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้เป็น indicating strains ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ปรากฏว่ามีเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญได้ดีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และสามารถสุ่มเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความทนทานอากาศได้จำนวน 76 ไอโซเลท ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าไอโซเลททั้งหมดที่แยกออกมาได้ไม่สามารถทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธีซีดเชื้อได้ อาจเนื่องมาจาก indicating strains ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จึงได้สุ่มเลือกมา 10 ไอโซเลทมาทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธี agar well diffusion ดังข้อ 2

2. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลทมาทดสอบฤทธิ์ antimicrobial spectrum โดยวิธี agar diffusion assay ด้วยการนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (มล.) แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37°C. 48 ชม. จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated ultra centrifuge (Sorval) ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm อุณหภูมิ 4°C. นาน 10 นาที แล้วทำการกรองส่วน supernatant ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (มค.ม.) นำไปหยดลงในหลุมของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy (TS) ที่ได้ทำการป้ายจุลินทรีย์ดัชนี (indicating strains) ที่มีความชุ่มเทียบเท่า McFarland No.0.5 ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่ 37°C. 24 ชม. สังเกตโดยดูรอบรอยหลุมว่าเกิด inhibition zone หรือไม่ ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทที่สุ่มเลือกมาทดสอบสามารถยับยั้ง indicating strains แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นไปปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 2N NaOH ปรากฏว่าไม่มีวงใสของการยับยั้งเชื้อปรากฏขึ้น

3. ปรับปรุงสายพันธุ์โดยการใช้ UV และสอดใส่ซินิโนโคตินเนสโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 เป็นต้นแบบ และใช้ *Candida albicans* TISTR 5239 เป็นเชื้อดัชนี ปรากฏว่า

3.1 *L. plantarum* ที่ผ่าน UV ให้ผลการยับยั้ง *C. albicans* ดีขึ้น แต่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงสายพันธุ์ผ่าเหล่าด้วย UV หลายๆ รุ่น จะพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ลดลง

3.2 การสอดใส่ซินิโนโคตินเนสเข้าสู่ *L. plantarum* นั้นสามารถตรวจพบการแสดงออกของซินิโนโคตินเนสเพียงเล็กน้อยและซินิโนไม่เสถียรรูปเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้หลายรุ่น และเบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *Micrococcus luteus* TISTR 884 เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามฤทธิ์ดังกล่าวจะสูญหายไปเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ปรับปรุงพันธุ์ไว้หลาย ๆ รุ่น

## การทดลองในรอบปีที่ 2

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยใช้เกณฑ์ดังนี้คือ 1) การเลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น ผัก ผลไม้ ผลิตภัณฑ์นม ผลการศึกษาเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากผัก-ผลไม้ (มะเขือเทศ แดงโม มะพร้าว กะหล่ำปลี) นมวัว และนมแพะพบว่าตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีลักษณะคือ หนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ ย้อมติดสีแกรมบวกรูปท่อน โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท 2) การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 106 ไอโซเลทรวมเชื้อควบคุม (C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050) ปรากฏว่ามีเพียงไอโซเลทที่ 9 ที่แยกออกมาได้จากมะเขือเทศ และไอโซเลทที่ 35 ที่แยกออกมาได้จากนมเท่านั้นที่สามารถแสดงการเกาะติดผิวหลอดด้านในของหลอดทดลอง จึงได้ตั้งชื่อว่า T9 และ N35 ตามลำดับ แต่พบว่า T9 แสดงการเกาะกลุ่มที่เร็วกว่าและยาวนานกว่า 3) การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดยเมตาบอลิต์ต่างๆ พบว่าไอโซเลท T9 ที่คัดเลือกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียดัชนีที่นำมาทดสอบทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 ) แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทำลายราดัชนี *Candida albicans* TISTR 5779 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion 4) การแยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 ปรากฏว่าไอโซเลท T9 ที่แยกได้มาจากมะเขือเทศคือ *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกมาได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติก 5) ความทนต่อระดับ pH 2-10 พบว่าไอโซเลท T9 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH 2-10 และสามารถสังเกตเห็นการเกาะติดพื้นผิวหลอดด้านในของแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดทดลอง 6) ความทนทานต่อการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะพบว่าไอโซเลท T9 ตื้อต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ยกเว้นยา nitrofurantoin 7) ความคงตัวในสภาวะที่มีสารเสริมต่างๆ ประมาณ 1 เดือน 8) ความคงทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ไอโซเลท T9 สามารถเจริญเป็นโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ภายหลังจากการเก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1. ในน้ำผลไม้ 3 ชนิด (น้ำแดงโม น้ำมะพร้าว และน้ำมะเขือเทศ) พบว่าไอโซเลท T9 สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำผลไม้ที่นำมาศึกษาแตกต่างกันโดยพบว่าสามารถมีชีวิตเหลือรอดได้ดีในน้ำแดงโมและน้ำมะเขือเทศในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน ส่วนน้ำ

มะพร้าวทำให้แบคทีเรียตายทั้งหมดภายหลังการจัดเก็บไว้เพียง 9 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *L. plantarum* 1 (ไอโซเลท T9) ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/ml มีอัตราการอยู่รอดโดยเฉลี่ยมากที่สุดในน้ำแดงโมที่ไม่เติมสารฟรีไบโอติกโดยมีปริมาณเซลล์หลงเหลือชีวิตปริมาณ  $5.4 \pm 0.21$  log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน รองลงมาคือการอยู่รอดในน้ำมะเขือเทศที่เติมสารฟรีไบโอติก ( $5.3$  log CFU/ml) ในน้ำมะเขือเทศที่ไม่เติมสารฟรีไบโอติก ( $5.2$  log CFU/ml) ในน้ำแดงโมที่เติมสารฟรีไบโอติก ( $5.0$  log CFU/ml) ส่วนในน้ำมะพร้าวทั้งที่เติมสารฟรีไบโอติกและไม่เติมสารฟรีไบโอติกนั้นเชื้ออยู่รอดได้เพียงประมาณ 6 วัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์อัตโนมัติ SPSS โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ ONE WAY ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารฟรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. plantarum* 1 ปรากฏว่า การเติมและไม่เติมสารฟรีไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ ( $p\text{-value} < 0.05$ )

3. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก ผลการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Bacillus* คือ *Brev. laterosporus* SA14 พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus* ทั้งวิธีทดสอบแบบ agar well diffusion และ spot on lawn และจะเริ่มตรวจพบฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Duran ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร นอกจากนี้การนำน้ำเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar plug diffusion พบว่าไอโซเลท CO4 และไอโซเลท WU6 มีฤทธิ์ต้าน MRSA ทั้งหมด ส่วนไอโซเลท CK9 มีฤทธิ์ต้าน MRSA เพียง 3 สายพันธุ์ (MRSA 414, MRSA 539, MRSA 3576) และ *S. aureus* TISTR 517 สำหรับไอโซเลท WU10 ไม่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ส่วนการทดสอบโดยใช้วัฏรอบโคโลนีของเชื้อดังกล่าวพบว่ามีเฉพาะ CO4 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ที่นำมาศึกษา

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* ด้วยวิธี MTT พบว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.033 mg protein/ml (3.67 mg/ml) และยาต้านมะเร็ง (5-FU) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.75 mg/ml จากการทดลองยังพบอีกว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีจะให้ค่า  $IC_{50}$  ที่เท่ากันคือ 0.034 mg protein/ml สำหรับการทดสอบความเป็นพิษ

ต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. โดยใช้ชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการระเหิดแห้ง (lyophilization) พบว่าไอโซเลท CO4 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.005 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 5.88 mg/ml (w/v) ส่วนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU6 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.032 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 34.83 mg/ml และชีวสารของน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU10 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.023 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 25.62 mg/ml ซึ่งชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ดี

### การทดลองในรอบปีที่ 3

1. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส (*Brevibacillus laterosporus* SA14)

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 พบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 22 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ด้วยโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมแต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และเมื่อนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis พบว่าโปรตีนชีวสารสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ total ERK1/2 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากลไกการตายของเซลล์มะเร็งช่องปากน่าจะเกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีการลดลงของโปรตีน phospho ERK1/2 และการเพิ่มสูงขึ้นของยีน *p21* ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์และทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด

2. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ HaCaT อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เข้ามาปิดบริเวณบาดแผลด้วยวิธี wound closure assay ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 2% fetal bovine serum พบว่าโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ได้เร็วกว่าเซลล์ HaCaT ที่บ่มเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

3. ศึกษาฤทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ในการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน

ผลการกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และ เซลล์เดนดริติก ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD69 เพิ่มขึ้นบนโมโนไซต์และลิมโฟไซต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 บนมายอีลอยต์เดนดริติกเซลล์แต่ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ถูกคัดเลือกมามีคุณสมบัติในการปรับสภาวะภูมิคุ้มกัน แต่ต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงการกระตุ้นเซลล์อื่นๆในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งใช้เป็นแนวทางในการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นๆ ต่อไป

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาสารสำคัญในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่ออกฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง
2. ควรมีการศึกษาระบบการแสดงออกของจีนในแบคทีเรียกรดแลคติกในพลาสมิดชนิดต่างๆ

## เอกสารอ้างอิง

1. กฤษณวัฒน์ นาคบุตร กุ้ง ดาววีระกุล อภิญญา ชูพันธ์. การศึกษาคุณสมบัติของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียหมายเลข SA14, SA15 หรือ SA16 ที่มีฤทธิ์ต้านสแตปฟีโลคอคคัสออเรียส ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน (วทบ. เทคนิคการแพทย์), สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช, ประเทศไทย, 2550.
2. ชูตินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา, จันทรวดี โล่เสถียรกิจ, และศิริมา สุวรรณภูมิ. สารแบคทีเรียโอซิน ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร. วารสารวิชาการม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2545; 4(2): 10-20.
3. ดวงพร คันทโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2537.
4. นงนุช วนิตย์ธนาคม. วิทยาเชื้อราทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร : พี.บี. ฟอเรนบิกส์ เซ็นเตอร์, 2540.
5. นริกุล สุระพัฒน์และคณะ. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพมหานคร-สาร. 2526.
6. นันทวัน อุทัยพันธ์, สุรดา เศรษฐการ, ศิริประภา สารานพคุณ, สมพร ทาบัว, ลัดดาวัลย์ สนิท, วราภรณ์ หมิ่นสัน, มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, วรางคณา จุ่งลก. การศึกษาความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 ต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 36; 26-28 ตุลาคม 2553. ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค. กรุงเทพฯ; 2553.
7. ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, และยุภารัตน์ เครือวงษา. ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2543; 28(1): 22-30.
8. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย : สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2543; 12(3): 101-107.
9. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2542: 11(2); 65-71.พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหาร 2546; 3: 173-179.

10. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซิน. วารสารจารย์พา 2546; 72: 16-25.
11. พรรณกร อิมวิทยา. โรคติดเชื้อรา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการ คณะรัฐมนตรี, 2543: 61-68.
12. ภัทรชัย กীরติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ หจก.วี.เจ. พรินติ้ง; 2549.
13. มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, วรางคณา จุ่งลก. 2552. การศึกษาคุณสมบัติของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อปรีเวียซิลลัสเลตเตอโรสปอรัส สายพันธุ์เอสเอ14 ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินและความเป็นพิษของชีวสารต่อเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ HT-29 ในหลอดทดลอง, การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35; 15-17 ตุลาคม 2552. โรงแรมเดอะไทด์ รีสอร์ท บางแสน และมหาวิทยาลัยบูรพา.
14. มานิน จุลศิริ. ยาต้านจุลชีพ (ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต. 2532.
15. เมระณี เทียนประสิทธิ์. โรคเชื้อราที่ผิวหนัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, 2527: 159-177.
16. ยุพิน สังวรินทะ และคณะ. เกษขวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชา เกษขวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539; 538-540.
17. เยวภา สุวดี. สารกันเสียชีวภาพจาก lactic acid bacteria. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ.2552 (บริการสารสนเทศออนไลน์) สืบได้จาก home page: url : <http://202.129.59.198/rdi/html/LAB.html>
18. วิชาญ วิทยาศัย และประคอง วิทยาศัย. เวชปฏิบัติของผู้ติดเชื้อเอดส์. กรุงเทพมหานคร : บริษัท โอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์ จำกัด, 2540.
19. วิลาวรรณย์ เจริญจิระตระกูล. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. สงขลานครินทร์ วทท. 2543; 22(2): 177-189.
20. ไศภิต ธีราช. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อรา. ภาควิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์); คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2542.
21. สมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีพเพื่อสุขภาพ. วารสารจารย์พา 2542; 65: 41-44.
22. สุขเมธ เนาว์รุ่งโรจน์ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล วรางคณา จุ่งลก ภูวดล บางรักษ์. การแยกและคัดเลือกรวมแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes จากตัวอย่างดินที่ผลิตชีวสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์. การประชุมวิชาการการนำเสนอผลงานวิจัยระดับ

- บัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 2 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร; 23-24 เมษายน 2552: 3-10.
23. อภิราม ส่องศรี และ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ของสารสกัดสมุนไพร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2545 (ตุลาคม-ธันวาคม); 44(4): 250-260.
  24. Abbas AK, Litchman AH, and Pillai S. Cellular and Molecular immunology. 6<sup>th</sup> ed., Philadelphia: Saunder. 2007
  25. Alakomi H-L et. al. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by disrupting the Outer Membrane. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5): 2001-2005.
  26. Araya T, Ishinachi N, Shimamura S, Tanaka T and Takahashi H. Genetic and Molecular analysis of the *rpoD* gene from *Lactobacillus lactis*. Biosc Biotech Biochem 1993; 57: 88-92.
  27. Bade ML and Hickey K. Classification of enzymes hydrolyzing chitins. In : Gudmund S-B, Anthonson T and Sandford P, International Conference on Chitin and Chitosan (4<sup>th</sup> : 1988 : Trondheim) London : Elsevier Appl Sci 1988; 835 p.
  28. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol 2000; 18: 767-811.
  29. Bassler BL, Yu C, Lee YC and Roseman S. Chitin utilization by marine bacteria : degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. J Biol Chem 1991; 266(36): 24276-24286.
  30. Batish VK, Roy U, Lal R and Grover S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. Cri Rev Biotechnol 1997; 17(3): 209-225.
  31. Boot RG, Renkema H, Strijland A and Van Zonneveld AJ. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophage. J Biol Chem 1995; 44(3): 26252-26256.
  32. Botes M, Loos B, van Reenen C and Dicks L. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. Arch Microbio 2008; 190: 573-84.

33. Brigidi P, Gonzakez-Veray RA, Rossi M, Matteuzzi D. Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus sterothermophilus* NUB3621 in nonselective medium. *Biotechnol Bioengineer* 1996; 53: 507-514.
34. Cabo ML, Braber AF and Koenraad P. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J food Protect* 2002; 65: 1309-1316.
35. Christensen HR, Frakiaer H, PestkaJJ, Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J immunol* 2002; 168: 171-8.
36. Chuang L, Wu KG, Pai C, Hsieh PS, Tsai JJ, Yen JH and Lin MY. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 11080–6.
37. De Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and *Bcl-2* in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13(5): 308-12.
38. De Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 289-295.
39. Dielbandhoesing KS, Zang H, Carop HL, Varrt DV and Klis MF. Specific cell wall protein confer resistance to nisin upon yeast cell. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4047-4052.
40. Doi RH. Regulation of gene expression; page 15-39. In: Strips UN and Yasbin RE (ed.). *Modern Microbiol Genetics*. USA: John-Wiley&Sons, Inc. 1991, 548 pp.
41. Elmadfa I, Klein P, Meyer AL. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. *Proc Nutr Soc* 2010; 69(3): 416-20.
42. Escott MG and Adams JD. Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 4770-4773.
43. Fink LN, Frokiaer H. Dendritic cells from Peyer's patches and mesenteric lymphnodes differ from spleen dendritic cells in their response to commensal gut bacteria. *Scand J Immunol* 2008; 68: 270-9.

44. Felse AP and Panda T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 51: 141-151.
45. Flach J, Pilet P-E and Jolles P. What's new in chitinase research?. Experientia 1992; 48: 701-716.
46. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Younes AB, Chareyre F, Sirard JC. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. PLoS ONE 2007; 2(3): e313.
47. Fuchs RL, McPherson SA and Drahos DJ. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. Appl Environ Microbiol 1986; 51(3): 504-509.
48. Galdeano CM, Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity Clin Vaccine Immunol. 2006; 13(2): 219-26.
49. Gamel PH and Piot JC. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. Gene 1992; 120: 17-26.
50. Gerald W. Tannock. Adherence of lactobacilli to epithelial surfaces 32-34. In: Brian JB., editor. The lactic acid bacteria. Cambridge : Elsevier applied science, 1992.
51. Gruss A. and Ehrlich D. Insertion of foreign DNA into plasmids from Gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. J Bacteriol 1988; 3: 1183-1190.
52. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN0001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). Brit. J. Nutr 2000; 83: 167–76.
53. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. Postgrad Med J. 2004; 80(947): 516-26.
54. Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity Curr Opin in Immunol 2004; 16: 538–544.
55. Hackman RH and Goldberg M. New substrates for use with chitinases. Analyt Biochem 1964; 8: 397-401.

56. Hagenmaier H, Jaschke KH, Santo L, Scheer M, Zähler H. Metabolic products of microorganisms. Tirandamycin B(author's transl)]. Arch Microbiol 1976; 109: 65-74.
57. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, et al . Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria.Gut 2004; 53(11): 1602-9.
58. Hiramatsu Y, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa K. Bifidobacterium components have immunomodulatory characteristics dependent on the method of preparation. Cytotechnol 2007; 55: 87-79.
59. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta 2008; 1778(2): 357-75.
60. Huang X, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L, Zhang K. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. Res Microbiol 2005; 156(5-6): 719-27.
61. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells.J Exp Med 1999; 190(2): 229-39
62. Jang A, Jo C, Kang Ks, Lee M. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide. Food- chemistry 2008; 107: 327-36.
63. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol 200; 31(11): 3388-93.
64. Jeuniaux C. Chitinase. In : Colowick SP, Kaplan NO (ed.). Meth Enzymol 1966; 8: 645-650.
65. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virlanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. Pediatr. Res 1992; 32: 141-4.
66. Karrasch T, Jobin C. Wound Healing Responses at the Gastrointestinal Epithelium: a Close Look at Novel Regulatory Factors and Investigative Approaches. Z Gastroenterol 2009;47(12):1221-9.

67. Kern DL, Hokanson GC, French JC, Dalley NK. Guanine 7-N-oxide, A novel antitumor antibiotic. J Antibiot 1985; 38: 572-4.
68. Kim SA, Kim SW, Chang S, Yoon JH, Ahn SG. 5'-nitro-indirubinoxime induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human KB oral carcinoma cells. Cancer Lett 2009; 274(1): 72-7.
69. Kimoto M, Kurisaki J, Tsuji N, Ohmomo S, Okamoto T. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. Lett Appl Microbiol. 1999; 29: 313–6.
70. Kitazawa H, Toba T, Itoh T, Kumano N, Adachi S. Antitumoral activity of smile-forming encapsulated *Lactobacillus* *lactis* spp. *Cremoris* isolated from Scandinavian røp sour milk 'villi'. Zootechnical Science. 1990; 277-83.
71. Kless H, Ditré Y, Chet I and Oppenheim AB. Cloning of the gene encoding for chitinase of *Serratia marcescens*. Mol Gen Genet 1989; 217: 471-473.
72. Kollar R, Petrakova E, Ashwell G, Robbins WP and Cabib E. Architecture of the yeast cell wall : the linkage between chitin and  $\beta$ -(1,3) glucan. J Biol Chem 1995; 270: 1170-1178.
73. Kordel M and Sahl H-G. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. FEMS Microbiol Lett 1986; 34: 139-144.
74. Korynevskaya A, Heffeter P, Matselyukh B, Elbling L, Micksche M, Stoika R, et al. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E. Biochem Pharmacol 2007; 74: 1713-26.
75. Kramer KJ, Muthukrishnan S. Insect chitinase: Molecular biology and potential used as biopesticides. Insect Biochem Molec Biol 1997; 27(11): 887-900.
76. Lee EM, Park HR, Hwang JH, Park DJ, Chang KS, Kim CJ. Mithramycin inhibits etoposide resistance in glucose-deprived HT-29 human colon carcinoma cells. J Microbiol Biotechnol 2007; 17: 1856-61.
77. Lee Y, Lee TS. Enhancement in ex vivo phagocytic capacity of peritoneal leukocytes in mice by oral delivery of various lactic-acid-producing bacteria. Curr Microbiol 2005; 50(1): 24-7.
78. Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH. Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and Toxicity of

- engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar*. *Current Microbiology* 2004; 48(3): 175-81.
79. Lewis DL, Hodson RE, Freeman LF. Effect of microbial community interactions on transformation rate of xenobiotic chemical. *Appl Environ Microbiol* 1984; 43: 561-565.
  80. Magnusson J and Schnurer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryneformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(1): 1-5.
  81. Magnusson J, Strom K, Roos, S, Sjogren J and Schnurer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 219: 129-135.
  82. Marcilla A, Valentin E and Sentandreu R. The cell wall structure : developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Internatl Microbiol* 1998; 1: 107-116.
  83. Mari YM, Espinoza AES, Ubieta R., Batista OF and Fernandez MT. Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commu* 1999; 258: 29-31.
  84. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. 2005; 102(8) :2880-5.
  85. Molsno J, Duran A and Canbib E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analyt Biochem* 1977; 83: 648-656.
  86. Morris ON. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis* –chitinase in a spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) control. *Can Entomol* 1976; 108: 225-233.
  87. Niess JH and Reinecker HC. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell Microbiol* 2006; 8(4): 558-64.
  88. O'Brien and Colwell RR. A rapid test for chitinase activity that uses 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ ,D-Glucosaminide. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 1718-1720.
  89. Old RW and Primrose SB. Principles of gene manipulations 4<sup>th</sup> edn. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 1989.

90. Ostroff, G.R. and Pene, J.J. 1984. Molecular cloning with bifunctional vector in *Escherichia coli* to *Bacillus subtilis*. Mol Gener Genet 1984; 193: 306-311.
91. Palucka K and Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive Immunity. J Clin Immunol 1999; 19: 12-25.
92. Park IS, Jo JR, Hong H, Nam KY, Kim JB, Hwang SH, et al. Aspirin induces apoptosis in YD-8 human oral squamous carcinoma cells through activation of caspases, down-regulation of Mcl-1, and inactivation of ERK-1/2 and AKT. Toxicol In Vitro 2010; 24(3): 713-20.
93. Ramiah K, van Reenen CA, Dicks L M.T. Surface-bound protein of *Lactobacillus- plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol. 2008; 159: 470-75.
94. Rast MD, Baumgartner D, Mayer C and Hollenstein OG. Cell wall-associated enzymes in fungi. Phytochemistry 2003; 64: 339-366.
95. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. Int J Antimicrob Agents 2004; 24(6): 536-47.
96. Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J and Zilberstein A. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 3581-3586.
97. Resscigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. J Clin Invest. 2009; 119(9): 2441-50.
98. Richards AG and Richards PA. The Peritrophic membranes of insects. Annu Rev Entomol 1977; 22: 219-140.
99. Richard GE. Organic acid 212-213. In: Brian JB., editor. The lactic acid bacteria. Cambridge: Elsevier applied science, 1992.
100. Roberts WK and Selitrennikoff CP. Plant and Bacterial chitinases differ in antifungal activity. J Gen Microbiol 1988; 134: 169-176.
101. Rook GAW and Brunet LR. Microbes, immunoregulation and the gut. Gut 2005; 54: 317-20

102. Sambrook J., Fritsch Ef and Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
103. Selitrennikoff C. Antifungal proteins. Appl Environ Microbiol 2001; 67(7): 2883-2894.
104. Shin HK, Kim J, Lee EJ, Kim SH. Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-kappaB activations. Phytother Res 2010; 24(4): 577-82.
105. Shimizu T, Nomoto K, Yokokawa T, Mutai M. Role of colony stimulating activity in antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. J Leukoc Biol. 1987; 42: 204-12.
106. Smirnoff WA, Randall AP, Martineau R, Haliberton W and Juneau. Field test of the effectiveness of chitinase additive to *Bacillus thuringiensis* Berliner against *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Can J For Res 1973; 3: 228-236.
107. Smirnoff WA. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce bud worm. J Invert Pathol 1974; 24: 344-348.
108. Smirnoff WA. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. Can Entomol 1971; 103: 1829-1831.
109. Smirnoff WA. Results of tests with *Bacillus thuringiensis* and chitinase on larvae of the spruce budworm. J Invert Pathol 1973; 21: 116-118.
110. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(6): 1260-7.
111. Sneh B, Schuster S and Gross S. Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and UV-protectant. Z Ang Entomol 1983; 96: 77-83.

112. Soto-gil RW and Zyskind JW. N,N'-diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi* : primary structure, processing, and evolutionary relationship. J Biol Chem 1989; 264(25): 14778-14783.
113. Spiers AS. Deoxycorymycin (pentostatin): clinical pharmacology, role in the chemotherapy of cancer, and use in other diseases. Haematologia (Budap) 1996; 27: 55-84.
114. Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA and Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and other gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 3316-3315.
115. Streips UN. Regulation system; page 1-13. In: Streips UN and Yasbin RE (ed.). Modern Microbiol Genetics. USA: John-Wiley&Sons, Inc. 1991, 548 pp.
116. Tantaimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A and Panbangred W. Cloning of chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for enhanced insecticidal activity. J Gen Appl Microbiol 1997; 43(6): 341-347.
- 117 Tronsmo A and Harman GE. Detection and quantification of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, chitobiosidase and exochitinase in solutions and on gels. Analt Biochem 1993; 208: 74-79.
118. Teather RM and Wood PJ. Use of Congo Red-Polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol 1982; 43(4); 777-780.
119. Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. Biotechnol Lett. 2009; 31(4): 571-6.
120. Trudel J and Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt Biochem 1989; 178:362-366.
121. Ueda M, Kawagushi T and Arai M. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding chitinase II from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. J Ferment Bieng 1994; 78(3): 205-211.
122. Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. Clin Exp Allergy 2003; 33(12): 1634-40.
123. Vassileva-Atanassova A., Mironova R., Nacheva G. and Ivanovl. N-terminal methionine in recombinant proteins expressed in two different *Escherichia coli* strains. J Bacteriol 1999; 69: 63-67.

124. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005; 106(7): 2252-8.
125. Watanabe K, Hamasaki M, Nakashima Y, Kakita Y and Miake F. High-frequency transformation of *Lactobacillus casei* with plasmid pHY300PLK by electroporation. *Curr Microbiol* 1994; 29: 217-222.
126. Wiwat C, Lertcanawanichakul M, Siwayapram P, Pantuwatana S and Bhumiratana A. Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene* 1996; 179: 119-126.
127. Wortman AT, Somerville CC and Colwell RR. Chitinase determinations of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and application of a chitinase probe. *Appl Environ Microbiol* 1986; 52: 142-145.
128. Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Osaki T. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitor *p21* in vesnarinone-induced differentiation of squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett* 1998; 133(1): 35-45.
129. Zheng Z, Takahashi M, Narita M, Toba K, Liu A, Furukawa T, *et al.* Generation of dendritic cells from adherent cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha. *J Hematother Stem Cell Res* 2000 ;9(4): 453-64.
130. Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Dewulf J, Pot B, Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Inter Jof Food Microbiol* 2009; 131: 40–51.



การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก  
สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก  
**Selection and Characterisation of Local Lactic Acid Bacteria  
Isolates for Using as Probiotics**

มณฑล เลิศคณาวณิชกุล  
จิราพร เจริญพูล  
วรางคณา จุ่งลก

มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก  
สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

มณฑล เลิศคนาวนิชกุล

จิราพร เจริญพูล

วรางคณา จุ่งลก

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนเงินทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่งกลาง ปี พ.ศ. 2550 แก่คณะผู้วิจัย และขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์บางส่วนและเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5080008

ชื่อโครงการ : การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์  
ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

ชื่อนักวิจัย : นายมณฑล เลิศคณาวณิชกุล  
สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

: นางสาวจิราพร เจริญพูล  
สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

: นางสาววรางคณาจุงลัก  
สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

E-mail address : lmonthon@wu.ac.th, monthon\_55@yahoo.com  
jjirapor@wu.ac.th  
cwarang@wu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : กรกฎาคม 2550 – กรกฎาคม 2553

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 76 ไอโซเลทจากอาหารหมักชนิดต่างๆ โดยการใช้วิธี Dual-culture agar plate เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นในการคัดเลือกคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* และเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR050 มีการผลิตเอนไซม์โคติเนสจากยีสินโคติเนสลูกผสมและแสดงฤทธิ์ร่วมกับสารเมตาบอไลต์จากเชื้อทำลาย *Micrococcus luteus* ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมรวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสและสเตรปโตมัยซีที่ออกฤทธิ์ต้าน

แบคทีเรียตัวนี้คือยา และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตรปโตมัยซีทสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสมีฤทธิ์ในการสมานแผลได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางส่วนที่คัดเลือกได้สามารถกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันได้

**คำหลัก :** บาซิลลัส แบคทีเรียกรดแลคติก โปรไบโอติก สเตรปโตมัยซีท ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

## Abstract

---

- Project Code** : RSA5080008
- Project Title** : Selection and Characterisation of Local Lactic Acid Bacteria Isolates for Using as Probiotics
- Investigator** : Mr. Monthon Lertcanawanichakul  
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,  
Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- : Miss Jiraporn Jaroenpool  
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,  
Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- : Miss Warahgchana Chunklok  
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,  
Walailak University, Nakhon Si Thammarat
- E-mail address** : lmonthon@wu.ac.th, monthon\_55@yahoo.com  
jjirapor@wu.ac.th  
cwarang@wu.ac.th
- Project Period** : July 2007 – July 2010

The seventy-six isolates of lactic acid bacteria (LAB) were obtained from various fermented foods. Dual-culture agar plate assay used as preliminary screening of antimicrobial activity spectrum. LAB were isolated by selective medium, MRS. Most of the isolates revealed anti-microbial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. Interestingly, *Lactobacillus plantarum* TISTR050 could produce chitinase enzyme that encoding on the recombinant chitinase gene. It showed more synergistically effect against *Micrococcus luteus*. The screening of LAB and other

bacterial groups (*Bacillus* and *Streptomyces*) was further study to obtain antibiotic-producing bacterial strains. The metabolites obtained from LAB and *Streptomyces* could inhibit growth of colon cancer and oral cancer cell line, respectively. *Bacillus* metabolic products revealed wound healing properties. Moreover, some of selected LAB showed immunomodulating activity.

**Keywords :** *Bacillus*, Lactic acid bacteria, Probiotic, *Streptomyces*, Antimicrobial activity, Anticancer activity, Immunomodulating activity

## สารบัญ

|                                                                                                                       | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....                                                                                               | i    |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) .....                                                                                           | iii  |
| สารบัญตาราง .....                                                                                                     | viii |
| สารบัญภาพ .....                                                                                                       | ix   |
| สารบัญคำย่อ .....                                                                                                     | xi   |
| บทที่                                                                                                                 |      |
| 1. บทนำ .....                                                                                                         | 1    |
| 2. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย                                                                                     |      |
| 1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                        | 6    |
| 2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนส .....                                                                            | 11   |
| 3. รายละเอียดเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของจีน .....                                                                 | 13   |
| 4. รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อและ การปรับ<br>สภาวะภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้..... | 14   |
| 5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา .....                                                                             | 17   |
| 3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง                                                                                  |      |
| 1. วัสดุอุปกรณ์                                                                                                       |      |
| I. เกี่ยวกับการคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์ .....                                                                  | 23   |
| II. เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน .....                                                          | 36   |
| 2. วิธีดำเนินการทดลอง                                                                                                 |      |
| I. เกี่ยวกับการคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์                                                                        |      |
| I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก.....                                                                        | 25   |
| II. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV .....                                                                                  | 32   |
| III. การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                 | 32   |
| II. เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน                                                                |      |
| I. การทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย<br>กรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2-cell).....      | 39   |
| II. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรีย<br>กรดแลคติกโดยวิธี Cravioto's adapted method.....     | 45   |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่                                                                                                                    | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| III. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส .....                        | 47   |
| IV. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส .....                                  | 53   |
| V. ศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซีทต่อเซลล์มะเร็ง .....                              | 55   |
| VI. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน .....                                                                                        | 56   |
| <b>4. ผลการทดลอง</b>                                                                                                     |      |
| I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                          | 59   |
| II. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV .....                                                                                     | 61   |
| III. ผลการถ่ายยีนโคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                  | 62   |
| IV. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก .....                   | 66   |
| V. การคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำผลไม้ .....                                                                        | 68   |
| VI. การคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                  | 70   |
| VII. การทดสอบความเป็นพิษของชีวสารต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) .....                                                   | 73   |
| VIII. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ..... | 78   |
| IX. การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>Bcl-2</i> และยีน <i>p21</i> .....                                                        | 79   |
| X. การศึกษาการแสดงออกของ ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis .....                                                      | 80   |
| XI. คุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอลไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส .....                                       | 81   |
| XII. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน. ....                                                                                       | 84   |
| <b>5. บทย่อ อภิปรายผล สรุปผล</b>                                                                                         |      |
| อภิปรายผลการทดลอง .....                                                                                                  | 93   |
| สรุป .....                                                                                                               | 101  |
| เอกสารอ้างอิง .....                                                                                                      | 106  |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่                                                                                                                      | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาคผนวก.....                                                                                                               | 118  |
| ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์                                                                                                     |      |
| ภาคผนวก ข ประกาศนียบัตรงานนำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์                                                                   |      |
| ภาคผนวก ค คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เรื่อง “เจลแต้มสิวที่ผลต้าน<br>แบคทีเรียก่อสิวที่ประกอบด้วยโปรตีนชีวสารกึ่งบริสุทธิ์” |      |

## สารบัญตาราง

| ตาราง                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 จำนวนไอโซเลทและฤทธิ์ต้านการเจริญ indicating strains โดยวิธีซีดเชื้อ.....                                                                                                              | 59   |
| 2 Antimicrobial activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay.....                                                                                                              | 60   |
| 3 ผลการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV .....                                                                                                                                                    | 61   |
| 4 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของโคติเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion.....                                                                           | 64   |
| 5 คุณสมบัติการเกาะติดพื้นผิวไอโซเลท T9 และไอโซเลท N35.....                                                                                                                              | 66   |
| 6 ความไวของแบคทีเรีย <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (T9) และ <i>L. plantarum</i> TISTR050 ต่อยาปฏิชีวนะ.....                                                                          | 68   |
| 7 ปริมาณเซลล์ (logCFU/ml) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก (T9) ในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ .....                                                                                                         | 69   |
| 8 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>S. aureus</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยวิธี agar well diffusion ..... | 72   |
| 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptomyces</i> spp.....                                                                                                                       | 72   |
| 10 Inhibition zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบโดยวิธี agar plug diffusion โดยใช้โคโลนีของเชื้อ.....                                                                                           | 72   |

## สารบัญภาพ

| ภาพ                                                                                                                                                                                     | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 ปริมาณเชื้อ <i>L. plantarum</i> ที่ระดับความเจือจาง $10^{-7}$ (ก) และ $10^{-8}$ (ข) ก่อนและหลังผ่าน UV .....                                                                          | 61   |
| 2 การเจริญของ <i>L. plantarum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ MRS ที่ $37^{\circ}\text{C}$ ใน shaking incubator .....                                                                | 62   |
| 3 รูปแบบของแถบ DNA ที่สกัดจาก transformants ที่ตำแหน่งลูกศรชี้คือ recombinant chitinase gene (pHYB43).....                                                                              | 63   |
| 4ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ transformants ต่อจุลินทรีย์ดัชนี.....                                                                                                                          | 65   |
| 5 ฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียไอโซเลท T9 ในการยับยั้งแบคทีเรียดัชนี.....                                                                                                          | 67   |
| 6 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>S. aureus</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยวิธี agar well diffusion ..... | 71   |
| 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง %viability กับความเข้มข้นของโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข).....                         | 74   |
| 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง %viability กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข) .....                                        | 75   |
| 9 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ CO4 .....                                                                                        | 76   |
| 10 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU6.....                                                                                        | 76   |
| 11 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU10.....                                                                                       | 77   |
| 12 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ YM.....                                                                                                        | 77   |
| 13 แผนภูมิแท่งแสดง %viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของยา 5-Fluorouracil.....                                                                                                  | 78   |
| 14 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 .....                                                     | 79   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพ                                                                                                                                                                                | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 15 การแสดงออกของยีน Bcl-2 และยีน p21 เมื่อเทียบกับ $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 ..... | 80   |
| 16 การแสดงออกของโปรตีน phosphor ERK1/2 และ $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 .....         | 81   |
| 17 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCat เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Brev. laterosporus</i> SA14 .....                                                                    | 82   |
| 18 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCat เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB .....                                                                                                         | 83   |
| 19 การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                                                  | 85   |
| 20 การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์โมโนไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                                                   | 85   |
| 21 การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์มัยอีลอยด์เดนดริติกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                                                                        | 86   |

## สารบัญคำย่อ

|           |                                          |
|-----------|------------------------------------------|
| มก., mg   | มิลลิกรัม                                |
| มล., ml   | มิลลิลิตร                                |
| มม.       | มิลลิเมตร                                |
| มค.ม.     | ไมโครเมตร                                |
| มค.ล.     | ไมโครลิตร                                |
| มค.ก.     | ไมโครกรัม                                |
| °ซ.       | องศาเซลเซียส                             |
| นม., nm   | นาโนเมตร                                 |
| ชม.       | ชั่วโมง                                  |
| AmpB      | Amphotericin B, แอมโฟเทอริซิน บี         |
| Chi       | Chitinase, เอนไซม์ไคติเนส                |
| CFU       | Colony Forming Unit                      |
| min       | minute, นาที                             |
| sp., spp. | species                                  |
| LAB       | Lactic Acid Bacteria, แบคทีเรียกรดแลคติก |
| tLAB      | transformed Lactic Acid Bacteria         |

# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันพบว่าอัตราการเกิดโรคติดเชื้อราแบบแพร่กระจายสูงขึ้นในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลานาน (นงนุช, 2540) ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเอดส์เพิ่มขึ้นพบการติดเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Candidiasis ได้ถึง 71.26 % ของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบ (วิชาญ, 2540) ยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อราที่ใช้อยู่ไม่เพียงพอสำหรับรักษาโรคได้ทุกชนิดจากเชื้อในกลุ่มเดียวกัน ทั้งนี้เพราะปัญหาด้านการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ พิษของยาและตลอดจนอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยา (โสภิต, 2542) เช่น หากมีการใช้ยาแอมโฟเทอริน บีรักษาโรคติดเชื้อราในร่างกาย (systemic fungal infections) เป็นระยะเวลานานก็จะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น electrolyte ผิดปกติ ไตวาย กดไขกระดูก มีอาการไข้ เป็นต้น (วิชาญ, 2540) และแม้ว่ายาตัวใหม่ในกลุ่ม azole ที่มีผลข้างเคียงน้อยลงแต่เมื่อใช้รักษาเป็นระยะเวลานานก็จะพบอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปัญหาที่พบในระบบการเลี้ยงปศุสัตว์กล่าวคือนอกจากกลุ่มแบคทีเรียแล้วยังพบว่ากลุ่มเชื้อราและ/หรือสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราเหล่านั้นยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของปศุสัตว์และอาจมีผลต่อการชักนำให้เกิดกลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะถ้าหากมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้อง ซึ่งทำให้ต้องมีการใช้ยาใหม่ที่มีราคาแพงกว่าเดิมและมักเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นวิธีควบคุมอัตราการดื้อยาที่ดีที่สุดคือการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมทั้งชนิดและระยะเวลาจึงได้มีการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านั้น รวมทั้งการหาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเช่น การใช้สารสกัดจากสมุนไพร (โสภิต, 2542; อภิราม และ มณฑล, 2545) และ/หรือการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัช เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอสลินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมากมาย เพื่อค้นหาชีวสาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไตอะซิดิล อะเซทาลดีไฮด์ รูเทอริน และ แบคทีเรียโอสลินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (ดวงพร, 2537; สมุณทา, 2545) ซึ่งอาจสามารถนำมาทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ได้

nisin เป็นแบคทีเรียโอสลินที่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา ซึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อแต่ละชนิดมีโครงสร้างทางผนังเซลล์ที่แตกต่างกันกล่าวคือ ใน

แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบมีผนังเซลล์ที่มีความซับซ้อน (หนา) กว่า เนื่องจากมีจำนวนชั้นมากกว่า และมีส่วนประกอบที่เพิ่มขึ้นมาคือ lipopolysaccharides ในผนังชั้นนอก (outer membrane) นอกจากนี้เชื้อบางชนิดอาจมีผนังชั้นนอกสุดเป็น capsule เช่นใน *Klebsiella* หรือ slime layer เช่นใน *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งทำให้ยาต้านจุลชีพรวมทั้งแบคทีเรียโอสซินซึมผ่านเข้าไปออกฤทธิ์ที่ target sites ได้ยาก แต่การเติมสารบางจำพวก เช่น EDTA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น chelating agent มาจับกับส่วนของ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบทำให้มีการเพิ่มการแพร่ผ่าน (permeability) ของสารเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นซึ่งจะทำให้มีการเพิ่มฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสซินได้ในระดับหนึ่ง (Kordel and Sahl, 1986; Stevens et.al., 1991) อย่างไรก็ตามได้มีการมีรายงานพบว่าหากมีการใช้ nisin เป็นระยะเวลายาวนานติดต่อกันในเชื้อกลุ่มที่มีการดื้อยา เช่น MRSA, multidrug resistance *Streptococcus pneumoniae* ก็จะทำให้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อ nisin ขึ้นมาได้เช่นกัน จึงจำเป็นต้องมีการระมัดระวังในการเลือกใช้แบคทีเรียโอสซินต่อเชื้อโรคให้มากขึ้นกว่าเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า nisin ยังไม่มีฤทธิ์ต่อยีสต์ โดยอาจเนื่องมาจากยีสต์มีโครงสร้างทางผนังเซลล์ที่หนาแน่นประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นร่างแหของ ไคติน (chitin) กับโปรตีนถึง 22-44% ซึ่งคล้ายกับที่พบใน filamentous fungi ทำให้การแพร่ผ่านของ nisin เข้าสู่ target site เป็นไปได้อย่างลำบาก (Dielbandhosing et.al., 1998) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่าไคตินสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase : Chi) ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช แมลง จุลินทรีย์ต่างๆ (Felse and Panda, 1999) หรือแม้แต่ในมนุษย์ และได้มีบทสรุปจากงานวิจัยหลายฉบับว่าไคตินเนสที่สร้างจาก macrophage ในร่างกายมนุษย์ก็เพื่อเป็นกลไกการป้องกันร่างกายต่อการติดเชื้อในกลุ่มรา (fungi) และ/หรือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Boot et.al., 1995; Escott and Adams, 1995) และได้มีการศึกษาฤทธิ์ของไคตินเนสร่วมกับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการทำลายแมลงศัตรูพืชซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ที่ส่วนเปลือกนอกและส่วน peritrophic membrane ภายใน mid gut (Richards and Richards, 1977) หรือแม้กระทั่งการใช้ไคตินเนสยับยั้งการแพร่กระจายของแมลงหรือเชื้อราก่อโรคพืช ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าการเสริมฤทธิ์ในการทำลายได้ดียิ่งขึ้นซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจอย่างยิ่ง (Sneh et.al., 1983; Smirnoff, 1971;1973;1974; Smirnoff et.al, 1973; Morris, 1976; Regev et.al., 1996; Wiwat et.al., 1996; Kramer et.al., 1997; Tantimavanich et.al., 1997, Lertcanawanichakul et.al., 2004) ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกให้มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ให้มีฤทธิ์กว้างขึ้น

นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้นยังพบว่าสารเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถต้านมะเร็งและมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานในร่างกาย ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายจำแนกเป็น innate immunity และ adaptive immunity อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มฟาโกไซต์ เช่น นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ โมโนไซต์ และลิมโฟไซต์รวมทั้งสารน้ำต่างๆ บริเวณผิวเยื่อ

(mucosal-Associated lymphoid tissue; MALT) ระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารประกอบด้วย เซลล์ แอนติบอดี และสารน้ำในสารคัดหลั่ง ทำหน้าที่กำจัดแอนติเจนที่ผ่านเข้ามาทางการกิน (ingested antigen) เยื่อบุจะเป็นด่านป้องกันระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับเนื้อเยื่อภายในที่จะเป็นช่องทางการเข้าสู่ร่างกายของจุลชีพและสิ่งแปลกปลอม เรียกเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารว่า Gut associated lymphoid tissue (GALT) ได้แก่ ที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ (intestine) ทั้งในชั้นของ connective tissue และ lamina propria ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อต้านจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Abbas AK, 2007)

ในระบบทางเดินอาหารมีทั้งแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีผลดีต่อสุขภาพ เช่น *Lactobacillus* *Bifidobacteria* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก (*Lactic acid bacteria*) และจุลชีพก่อโรค (*Pathogenic bacteria*) ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร หากจุลชีพที่มีผลดีต่อสุขภาพมีจำนวนมากก็สามารถเกาะติดผนังลำไส้และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ช่วยป้องกันไม่ให้จุลชีพชนิดก่อโรคเกาะติดและเจริญจนก่อให้เกิดพยาธิสภาพ ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นอาหารเสริมสุขภาพหรือโปรไบโอติก เพื่อสร้างสมดุลของจุลชีพในระบบทางเดินอาหารและต้านทานต่อจุลชีพก่อโรคในลำไส้ การสร้างเสริมภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้เป็นผลจากการการปรับสภาวะการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้ เช่น Peyer's Patch, mesenteric lymph node ให้ทำงานได้อย่างเหมาะสม (Vaarala O, 2003) เซลล์เดนดริติก (*dendritic cells*) เป็น antigen presenting cell (APC) พบในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ผิวหนัง เนื้อเยื่อของระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ในส่วนของ Peyer's Patch และ mesenteric lymph node ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อจุลชีพที่ผ่านเข้ามาทางเนื้อเยื่อดังกล่าว โดยการกระตุ้นเซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันทั้ง innate และ adaptive immunity ผ่านโมเลกุลบนเซลล์เมมเบรนที่เป็นที่รับสำหรับแอนติเจนและสามารถปรับแต่งแอนติเจนแล้วนำเสนอร่วมกับ MHC class II ให้กับ naïve T lymphocyte และสร้างไซโตไคน์ เช่น Interleukin (IL)-12, type I interferon (IFN) (Abbas AK, 2007)

มีการศึกษาการตอบสนองของเดนดริติกเซลล์ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างกว้างขวางพบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์เดนดริติกทำงานและส่งเสริมการทำงานของเซลล์อื่นๆ เช่น NK cell, B lymphocyte, T helper cell และ T regulatory cell (Treg) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลบนผิวเซลล์เช่น CD80, CD83, CD86, CD54, CD206, HLA-DR บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้นและเพิ่มการผลิต IL-10, IL-12 และการสร้าง IFN- $\gamma$  และอาจมีบทบาทในการควบคุมไม่ให้เกิดภาวะภูมิแพ้หรืออักเสบในลำไส้โดยการกระตุ้นการทำงานของ Treg ลดการทำงานของ Th1 ที่จะส่งเสริมกระบวนการอักเสบ (Hart AL และคณะ; 2004; Niess JH and Reinecker HC, 2006; Elmadfa I และคณะ 2010; Galdeano CM และคณะ, 2006; Mohamadzadeh M และคณะ, 2005; Gill HS และคณะ, 2000) แบคทีเรียกรดแลคติกที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

โปรไบโอติก จึงมักจะมีการทดสอบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถส่งเสริมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักและผลิตภัณฑ์นม ที่ได้มีการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นแล้วว่าสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียตัวอื่นที่ใช้เป็นกลุ่มตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร รวมทั้งได้ทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกที่ดี เช่น การทนต่อกรด ต่าง การเกาะติดพื้นผิว เป็นต้น โดยแบคทีเรียดังกล่าวได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เช่น สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) ในการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาทั้งในเซลล์เดนดริติกที่แยกได้จากเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มโมโนนิวเคลียร์เซลล์

ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ศึกษาคุณลักษณะที่ดีของกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะนอกเหนือจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อื่น ได้แก่ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนไคไติเนสใน *L. plantarum* TISTR 050 ในการดูฤทธิ์ร่วมกันในเบื้องต้นต่อการยับยั้งเชื้อรา เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมนุษย์และอาจนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ดีได้ต่อไปในอนาคต

## วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตัวอื่น
2. ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายถอดยีนไคไติเนส (heterologous chitinase gene) โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 เป็นต้นแบบ
3. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก
4. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 3. ในน้ำผลไม้
5. การศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
6. การศึกษาการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติก
7. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก
8. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp.

9. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR และการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis
10. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสโดยวิธี wound closure assay
11. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้น (Activation) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่แยกจากเลือดของคนปกติ
12. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้นการเจริญแก่ตัว (maturation) ของเซลล์เดนดริติกในกระแสเลือด

## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

#### รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก
2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์โคติเนส
3. รายละเอียดเกี่ยวกับการควบคุมการส่งออกของเงิน
4. รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อและ การปรับสภาวะภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

#### 1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก (พงษ์เทพ, 2546; สุมนทา, 2542)

##### 1.1 ความรู้ทั่วไป

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ (non spore-forming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophile) แต่บางชนิดก็สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียรูปร่างทั้งแบบท่อนและแบบกลม ประกอบไปด้วยหลายสกุล (genus) คือ

- |                  |                   |
|------------------|-------------------|
| - Aerococcus     | - Pediococcus     |
| - Alloiooccus    | - Streptococcus   |
| - Carnobacterium | - Tetrigenococcus |
| - Enterococcus   | - Vagococcus      |
| - Lactobacillus  | - Bifidobacterium |
| - Lactococcus    |                   |

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถแบ่งออกตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 85-95) และ heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก (ร้อยละ 50) ร่วมกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ด้วยเช่น กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล

เป็นต้น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในอาหาร เช่น อาหารหมัก ผักสด เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ด้วยเช่น ทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ เป็นต้น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารโดยนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเติมลงไปในการอาหาร เพื่อช่วยปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติอาหาร และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

กรดแลคติก เป็นผลผลิตของ lactic acid bacteria ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อของการหมัก หมักอาหารและทำหน้าที่เป็น antimicrobial ตามธรรมชาติ โดยที่กรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้หลายชนิด รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* ในจำพวก กรดอินทรีย์ Lactic acid เป็นตัวที่ preserve ผลิตภัณฑ์หมักดองในธรรมชาติ เป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยเป็นตัววัด pH ในเซลล์ และรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุภายในและภายนอกเซลล์

สิ่งที่มีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพของกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากความสามารถในการละลายน้ำทำให้มีโมเลกุลที่มีขนาดเล็กพอที่จะซึมผ่านเข้าสู่ periplasm แล้วโมเลกุลใหญ่พวกโปรตีน (เช่น bacteriocins or enzymes) และ hydrophobic substances (เช่น hydrophobic antibiotics) ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียชั้นของ lipopolysaccharide (LPS) ขณะเดียวกันก็มีการสูญเสียหน้าที่ของ permeability barrier ด้วย โดยสารที่ถูกเรียกว่าเป็น permeabilizers นั้น เช่น EDTA ซึ่งมีสมบัติเป็น chelating agent ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อ OM โดยทำให้สูญเสีย LPS และ polycations เช่น polythethyleneimine หรือ polymyxin B nonapeptide ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้ OM ถูกทำลาย Permeabilizers ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความสามารถในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แต่จะมีส่วนประกอบอื่นๆที่แทรกซึมเข้าไปและเพิ่มความไวต่อ hydrophobic antibiotics, detergents, lysozyme หรือ bacteriocins จึงมีความคิดที่ว่าจะใช้ permeabilizers ร่วมกับ antimicrobials อื่นๆในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย

## 1.2 หลักในการจัดแบ่งเป็นชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก (ดวงพร, 2537)

1.2.1 *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดหนึ่ง จึงจัดแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการหมักกรดแลคติก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1.2.1.1 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ homofermentative เพียงอย่างเดียว (obligate homofermenters) หมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปได้ 85% หรือมากกว่า ในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือกลูโคเนตไม่เกิดแก๊ส เช่น *L. delbrueckii*, *L. leichmanii* และมีบางชนิดที่หมักน้ำตาลกลูโคสไม่เกิดแก๊ส แต่ถ้าเป็นกลูโคเนตจะเกิดแก๊ส เช่น *L. casei*, *L. plantarum* เป็นต้น

1.2.1.2 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้ง 2 แบบ (facultative heterofermenters) การหมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลคติกประมาณ 56% นอกนั้นเป็น CO<sub>2</sub> กรดอะซิติกและเอทานอล เกิดแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคสและกลูโคเนต อุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้มีผลต่อการแบ่งเป็นชนิดต่างๆ เช่น *L. fermentum* เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นต้น

1.2.1.3 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ heterofermentative เพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) การหมักคาร์โบไฮเดรตจะเกิดกรดแลคติก CO<sub>2</sub> และ กรดอะซิติก สมาชิกของพวกนี้เป็นที่รู้จักกันน้อย เช่น *L. hilgardii* , *L. trichodes* และ *L. heterohiochii* เป็นต้น

สำหรับแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ *Lactobacillus* spp. ประกอบด้วย

1.2.2 *Leuconostoc* spp. เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวก *Lactobacillus* spp. ได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติกเพราะเกิดเมือก

1.2.3 *Pediococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกจัดไว้ใน species ใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*

1.2.4 *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกอีก species หนึ่ง มีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. และ *Streptococcus* spp.

นักจุลชีววิทยาบางคนยังจัดแบคทีเรียสกุล *Bifidobacterium* ไว้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกด้วย แม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกก็ตาม

### 1.3 สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น

สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น (antibacterial substance) ที่สร้างมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีตัล (diacetyl) รูเทอริน (reuterin) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

1.3.1 กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก คือ กรดแลคติกและกรดอะซิติก โดยกรดอินทรีย์จะทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH, pKa (dissociation constant) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์นั้นโดยทั่วไปกรดอะซิติกสามารถยับยั้งการเจริญต่อ

เชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลคติก อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนทานต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid-producing bacteria)

1.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เนื่องจากไปทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ เสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลอื่น ๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังอาจมีผลในทางอ้อมด้วยเช่น เมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการเกิดสารยับยั้งดังกล่าวว่า “ lactoperoxidase antibacterial system”

1.3.3 ไดอะซีทิล (diacetyl) ไดอะซีทิล หรือ 2,3 -butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะซีทิลได้จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซีทิลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการยับยั้งของไดอะซีทิลเชื่อว่าเกิดจากไปรบกวนการใช้อาร์จินีน (arginine) ภายในเซลล์โดยไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ

ไดอะซีทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ไวน์แดง ไวน์ขาว เบียร์ และกาแฟ ความเข้มข้นของไดอะซีทิลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้โดยทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัม/มิลลิตร ความเข้มข้นของไดอะซีทิลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ถึงแม้ว่าไดอะซีทิลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้แต่ก็ต้องใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นหอมดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่นิยมใช้เป็นสารกีดกันเชื้อในการทำความสะดวกภาชนะหรือเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร

1.3.4 อะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย hetero fermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase หรือ เอนไซม์นี้ถูกกีดขวางการสร้างจะทำให้มีอะเซทัลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะเซทัลดีไฮด์เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ต

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นโดยอะเซทาลดีไฮด์มารายงานไว้น้อยมาก อะเซทาลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* เป็นต้น เนื่องจากในอาหารที่เติมแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจะมีปริมาณอะเซทาลดีไฮด์ค่อนข้างน้อยเช่น ในโยเกิร์ตพบประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะเซทาลดีไฮด์ จึงนับว่าน้อยมาก

1.3.5 รูเทอริน (reuterin) เป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากเป็นรูเทอรินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* รูเทอรินมีคุณสมบัติสำคัญคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ แต่ไม่ใช่โปรตีนเพราะไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดย proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคทีริโอซิน เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอรินพบว่า เป็น ( $\beta$ -hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimers โดยเกิดขึ้นในกระบวนการ เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยรูเทอรินมีค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยรูเทอรินได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น โดยเชื่อว่ารูเทอรินมีฤทธิ์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างรูเทอรินจึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการถนอมอาหารได้

1.3.6 แบคทีริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้มีหลายชนิด คุณสมบัติสำคัญของแบคทีริโอซินคือ เป็นโปรตีนหรือสารประกอบของโปรตีน เช่น lipocarbohydrate proteins หรือ glycoprotein แบคทีริโอซินส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันมักจะมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพแตกต่างกัน เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เสถียรภาพต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน และกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นโดยแบคทีริโอซินอาจมีหลายแบบขึ้นกับชนิดของแบคทีริโอซิน กลไกหนึ่งที่เป็นไปได้คือเซลล์ที่จะถูกทำลายโดยแบคทีริโอซินจะต้องมีที่รับ สำหรับแบคทีริโอซินนั้นอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคทีริโอซินจับกับที่รับแล้วจะทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์ ดังนั้นการผ่านเข้าออกของไอออนต่างๆ ระหว่างในและนอกเซลล์จึงเสียสมดุลไปและทำให้เซลล์ตายในที่สุด อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินบางชนิดก็อาจทำให้เซลล์ตาย

โดยเซลล์ยังคงสภาพเดิมได้ ทั้งนี้เซลล์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียโอซินชนิดที่ตนเองสร้าง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคทีเรียโอซินที่สร้างออกมานั้นไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่สร้าง

นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน แบคทีเรียโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* เป็นต้น โดยแบคทีเรียโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะได้ ดังตาราง

| ลักษณะและคุณสมบัติ                                 | แบคทีเรียโอซิน                      | สารปฏิชีวนะ                                |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| การนำไปใช้งาน                                      | ทางอาหาร                            | ทางการแพทย์                                |
| กระบวนการสังเคราะห์                                | ผลิตจากไรโบโซม                      | ผลิตผ่านsecondary metabolite               |
| ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย | น้อย                                | มาก                                        |
| การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต        | มี                                  | ไม่มี                                      |
| การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย                         | ปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ | การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม                 |
| ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย                          | ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์        | ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์ |
| ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง                         | ยังไม่มีรายงาน                      | มี                                         |

## 2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนส

ไคตินเป็นสายยาวของโมเลกุล N-acetyl-(D)-glucosamine (NAG) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Jeuniaux, 1966; Flach et.al., 1992) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สำคัญในธรรมชาติของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส และในทางเกษตรกรรมพบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อราก่อโรคพืชได้ (Fuchs et. al., 1986)

เอนไซม์ไคติเนสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการตัดย่อยสายไคตินได้เป็นเอกโซไคติเนส (exochitinase) และเอนโดไคติเนส (endochitinase) (Bade and Hickey, 1988) ซึ่งจะเข้าไปสลายพันธะตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 1 และคาร์บอนตัวที่ 4 ของโมเลกุล NAG ที่อยู่ติดกัน

โดยที่เอกโซไคตินเนสจะย่อยสายไคตินทางด้านปลายให้โคโตไบโอส (chitobiose: dimer ของ N-acetylglucosamine) ส่วนเอนโดไคตินเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกภายในสายไคติน (Jeuniaux, 1966) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาหลายแบบตั้งแต่ dimer, trimer หรือ tetramer ของ N-acetylglucosamine โดยมีชื่อเรียกว่า chitobiose, chitotriose หรือ chitotetraose ตามลำดับ (Roberts and Selitrennikoff, 1988; Bassler et.al., 1991) และที่สำคัญคือเอนโดไคตินเนสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ นอกจากนี้แล้วในระบบเอนไซม์ไคตินเนส (chitinolytic) ยังสามารถตรวจพบเอนไซม์โคโตไบโอเอส (chitobiase) และ N-acetylglucosaminidase ที่สามารถย่อยโคโตไบโอเอสได้ NAG อิสระออกมา ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ถูกจัดว่ามีหน้าที่เหมือนกัน (Tronsmo and Harman, 1993) แต่ที่ต่างกันคือเอนไซม์ N-acetylglucosaminidase สามารถใช้โคโตไตรโอสเป็นสารตั้งต้นได้นอกจากโคโตไบโอเอส (Flach et.al., 1992; Soto-gil and Zyskind, 1989)

ถึงแม้ว่าไคตินจะสามารถตรวจพบได้เป็นปริมาณสูงในธรรมชาติและสามารถหาซื้อได้ แต่คุณสมบัติยังไม่เหมาะต่อการนำมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสเนื่องจากยังมีขนาดใหญ่และซับซ้อน ซึ่งจำเป็นต้องมีการเตรียมก่อนนำมาใช้และเรียกชื่อเป็น colloidal chitin (Flach et.al., 1992) ที่ไม่ละลายน้ำ หรือ glycol chitin หรือ carboxymethyl chitin ที่อยู่ในรูปของสารละลาย นอกจากนี้การติดฉลากไคตินด้วยสีย้อมเช่น procion red G และ remazol brilliant violet 5R ก็ถูกนำมาใช้ในการทดสอบเอนไซม์ไคตินเนส (Hackman and Goldberg, 1964) แต่ความไวยังต่ำ ซึ่งแก้ไขโดยใช้ tritiated chitin (Molano et.al., 1977) เข้ามาแทนที่แต่เนื่องจากเป็นสาร radioactive ดังนั้นจึงยากต่อการจัดการ ซึ่งวิธีการทดสอบเอนไซม์ไคตินเนสได้มีการพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับเพื่อให้มีความไวสูงขึ้นเช่นการใช้สารเรืองแสง (fluorogenic substance) เช่น 4-methylumbelliferone (4-MU) (O'Brien and Colwell, 1987) หรือสารให้สี p-nitrophenol (Fuches et.al., 1986) แบคทีเรียที่สามารถย่อยไคตินได้จะทำให้เกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีดังกล่าวและสามารถตรวจวัดปริมาณได้อย่างคร่าวๆ โดยดูจากขนาดวงใสหรือจำนวนวันที่ใช้ทำให้เกิดวงใส แต่นอกจากการใช้ไคตินที่ไม่ละลายน้ำมาเพื่อทดสอบเอนไซม์ไคตินเนสแล้วยังมีไคตินที่ละลายน้ำได้มาทดสอบได้ด้วยและทดสอบการย่อยไคตินด้วยการย้อมด้วยสีย้อม congo red (Teather and Wood, 1982) 1989) หรือ calcoflor white M2R (Trudel and Asselin) หรือ trypan blue (Ueda et.al., 1994) นอกจากนี้การใช้สารเรืองแสงในการหาปริมาณเอนไซม์ไคตินเนสเป็นที่นิยมมากเนื่องจากมีความรวดเร็ว เช่นการเททับโคโลนีที่ถูกย่อยด้วยสารเรืองแสง 4-MU หรือ p-Nitrophenol ดูการเรืองแสงสีฟ้าขาวภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือการปรากฏสีเหลืองรอบโคโลนี ตามลำดับ แล้วจึงใช้เครื่องมือ fluorometry ในการหาปริมาณประกอบ (Wortman et.al., 1986; Kless et.al., 1989)

### 3. การควบคุมการแสดงออกของจีน

การแสดงออกของรหัสพันธุกรรมที่ปรากฏใน DNA ต้องอาศัยกระบวนการหลายอย่างประกอบเข้าด้วยกัน อันดับแรกก็คือการถอดรหัส (transcription) สาย DNA ให้เปลี่ยนไปเป็น RNAs ซึ่งประกอบด้วย transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA) และ messenger RNA (mRNA) โดยที่ลำดับเบสที่ปรากฏอยู่ในสาย mRNA จะถูกแปลรหัส (translation) ไปเป็นสายของกรดอะมิโน (amino acid) ประกอบเป็นโปรตีน ส่วน tRNA และ rRNA เป็นอนุพันธ์ที่มาจาก precursor RNA สายยาวที่ผ่านกระบวนการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อย RNA (RNA processing enzyme) โดยที่โมเลกุลของ RNAs ทั้งหมดมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของยีน (Doi, 1991)

ระบบของเอนไซม์ (enzyme machinery) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสของจีนคือ DNA-dependent RNA polymerase ที่เรียกกย่อ ๆ ว่า RNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์แกน (core enzyme) ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ sigma ( $\sigma$ ) factor เปลี่ยนไปเป็น holoenzyme และจะไปจับอย่างจำเพาะกับส่วนของลำดับเบสที่ปลายสาย 5' ที่เป็นตำแหน่งของ promoter

ขอบเขตของ promoter ประกอบด้วยลำดับเบสประมาณ 40-50 เบสแพร์ (base pair: bp) และลำดับเบสอื่นที่จะถูกจับด้วยเอนไซม์ RNA polymerase โดยส่วนของ  $\sigma$  factor ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ที่ตำแหน่ง conserved region ที่ -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) และที่ตำแหน่ง +1 ซึ่งเป็นตำแหน่งแรกของการถอดรหัส มีการทดลองเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) ที่ตำแหน่ง -10 และ -35 ปรากฏว่าทำให้ promoter มีหน้าที่ลดลงแต่หากมี

mutation ที่ตำแหน่งอื่นด้านปลาย 3' ปรากฏว่าไม่มีผลต่อหน้าที่ของ promoter โดยส่วนใหญ่แล้ว จีนและชุดของจีน (operon) จะถูกควบคุมด้วย promoter หลายแบบอาจเป็นแบบเรียงลำดับซ้ำกันในทิศทางเดียวกัน (tandem) หรือทับซ้อนกัน (overlap) ซึ่งการถอดรหัสอาจเป็นการใช้ holoenzyme ชนิดเดียวกันหรือมากกว่านั้น

$\sigma$  factors มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและเมื่อรวมกับ RNA polymerase ได้เป็น holoenzymes หลายแบบที่มีความแตกต่างจำเพาะกับ promoters ชนิดต่างๆ (Streips, 1991) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสในเชื้อแต่ละชนิด เช่น holoenzymes ของ *Bacillus subtilis* ( $\sigma^{43}$ ), *E. coli* ( $\sigma^{70}$ ) และ *Lactobacillus lactis* ( $\sigma^{39}$ ) จะมีตำแหน่งจับจำเพาะที่เดียวกันตรงตำแหน่ง -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) และต้องมีเบสระหว่าง (spacer) 2 ตำแหน่งจำนวน 17 bp และในเบคทีเรียกรดแลคติกที่ตำแหน่ง -15 ควรมีลำดับเบสคู่เป็น TG ส่วนที่ตำแหน่งเหนือกว่า -35 ไปทางปลาย 3' ควรเป็นตำแหน่งที่มี AT ซ้ำกันมากๆ (AT rich) จึงจะเป็น promoter ที่มีประสิทธิภาพในเบคทีเรียกรดแลคติก (Araya et.al., 1993; de Vos, 1999)

#### 4. รายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อและ การปรับสภาวะภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้

เซลล์เดนดริติกเป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน innate immunity มีบทบาทในการกระตุ้นลิมโฟไซต์และควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจัดเป็นเซลล์ชนิด APC ส่วนใหญ่พบในเนื้อเยื่อ ในกระแสเลือดพบได้ประมาณร้อยละ 0.1-0.5 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เซลล์เดนดริติกจะอยู่ในรูป immature cells ในเนื้อเยื่อเซลล์เดนดริติกดักจับสิ่งแปลกปลอมและเริ่มต้นกระตุ้นกระบวนการอักเสบ ในขณะที่เดียวกันจะเดินทางจากเนื้อเยื่อไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนดริติกทั้งรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลบนผิวเซลล์ เรียกว่ามีการเจริญแก่ตัว (maturation) ได้แก่การเพิ่มขึ้นของ HLA-DR, costimulatory molecule คือ CD80 และ CD86 และ maturation marker คือ CD83 การสร้างและหลั่งไซโตไคน์หลายชนิด เซลล์เดนดริติกสามารถกระตุ้นเซลล์ได้หลายกลุ่มทั้ง B lymphocyte, T lymphocyte และ natural killer cells (Palucka K. และคณะ 1999; Banchereau J. และคณะ, 2000)

เซลล์เดนดริติกในกระแสเลือดสามารถแบ่งได้เป็น สองชนิดคือ myeloid dendritic cells (mDCs) ซึ่งมีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่สำคัญ คือ CD1c, CD11c, HLA-DR และโมเลกุลในกลุ่ม Toll like receptor (TLR) ได้แก่ TLR-2, -3, -4, และ TLR-7 เซลล์เดนดริติกในกลุ่มที่สองคือ plasma cytoid dendritic cells (pDCs) มีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่สำคัญ คือ , CD123, HLA-DR และโมเลกุลในกลุ่ม Toll like receptor (TLR) ได้แก่ TLR- 7, and -9 ทั้งสองกลุ่มทำหน้าที่ต่างกันในระบบภูมิคุ้มกัน กล่าวคือ mDCs ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell และหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญคือ interleukin (IL)-12 ส่วน pDCs ทำหน้าที่ในการสร้างไซโตไคน์ที่สำคัญคือ Interferon (IFN)- $\alpha$  และ IFN- $\beta$  ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการต้านการติดเชื้อไวรัส มีการศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์เดนดริติกในหลอดทดลองจากเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (CD34+ progenitor cells) หรือสามารถเพาะเลี้ยงได้จาก เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (CD14+) โดยกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ IL-4 และ granulocyte monocyte stimulating factor (GM-CSF) และ tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  เรียกว่า monocyte derive dendritic cells (moDCs) (Zheng Z. และคณะ, 2000) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาการทำงานของเซลล์ในหลอดทดลอง

ในร่างกายเดนดริติกเซลล์จะเดินทางจากเนื้อเยื่อเข้าสู่กระแสเลือดและจากกระแสเลือดเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง เซลล์เดนดริติกในเนื้อเยื่อมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น Lanagerharns cell, follicular dendritic cells ทำหน้าที่ดักจับแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาในเนื้อเยื่อ แล้วกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ได้แก่ B lymphocyte และ T lymphocyte CD4+ T lymphocyte จะ recognize แอนติเจนที่ถูกนำเสนออยู่บน MHC Class II molecule ของเซลล์เดนดริติก ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของโมเลกุล CD40 ligand บน T lymphocyte

ในขณะเดียวกันเซลล์เดนดริติกก็จะถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 chemokines และ maturation marker ได้แก่ CD80 CD86 CD83 การหลั่งไซโตไคน์จะยิ่งเพิ่มการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte ดังนั้นเซลล์ทั้งสองชนิดจึงทำงานส่งเสริมซึ่งกันและกัน เป็นไซโตไคน์ที่สำคัญได้แก่ IL-12 รวมทั้ง IL-18, IL-15, IFN- $\alpha$  และ IFN- $\beta$  ซึ่งถูกหลั่งมาจากเซลล์เดนดริติกยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell (cytotoxic activity) ให้สูงขึ้นและในทางกลับกัน NK cell ก็สามารถกระตุ้นการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกด้วยเช่นกันโดยการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  และ IFN- $\gamma$  และผ่านโมเลกุล NKp30 (Walzer T. และคณะ, 2005) ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง NK และเซลล์เดนดริติกอาจเกิดขึ้นในต่อมน้ำเหลืองหรือเนื้อเยื่อและยังส่งผลกระตุ้นการทำงานของ T lymphocyte อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นทั้ง NK และเซลล์เดนดริติกจึงเป็นจุดเชื่อมระหว่าง innate และ adaptive immunity

บทบาทของเซลล์เดนดริติกในการเริ่มต้นและควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เกิดจากการรับรู้สิ่งแปลกปลอมและองค์ประกอบของจุลชีพ (Pathogen associated molecular patterns) ของเซลล์เดนดริติกผ่าน Pattern recognition receptors (PRRs) การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytose) และนำเสนอแอนติเจนผ่าน MHC class I, II นอกจาก TLR จะเป็น PRRs ที่พบบนเซลล์เมมเบรนของเซลล์เดนดริติกยังมีโมเลกุลอื่นๆอีกเช่น C-type lectin receptor, mannose receptor เซลล์เดนดริติกรับรู้สัญญาณการกระตุ้นเซลล์ (danger signal) ผ่าน PRRs นำไปสู่การเกิดกระบวนการอักเสบและการกระตุ้น T lymphocyte TLR มี ligands หลายชนิด เช่น lipoproteins และ peptidoglycans ที่จำเพาะกับ TLR2, double-stranded RNA ของไวรัส จำเพาะกับ TLR3, Lipopolysachride ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ Gram negative bacteria จำเพาะกับ TLR4, flagellin ที่พบในส่วน Flagella ของแบคทีเรียจำเพาะกับ TLR5 single-stranded RNA และ synthetic imidazoquinoline จำเพาะกับ TLR7 และ TLR8, unmethylated CpG ซึ่งพบใน DNA ของแบคทีเรียจะจำเพาะกับ TLR9 การจับกันของ ligand และ TLR บนเซลล์เดนดริติก กระตุ้นให้เกิดการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ที่ส่งเสริมกระบวนการอักเสบ คือ TNF and IL-1 (Goldstein DR, 2006)

ในลำไส้พบเซลล์เดนดริติกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ lamina propia (LP) ของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่, lymphoid follicle, mesenteric lymphnode (MLN) และ Payer's patch (PP) จะมีบทบาทในการจับแอนติเจนบริเวณเนื้อเยื่อของลำไส้โดยการยึดเซลล์ผ่าน lumen การศึกษาในหนูพบว่า ส่วน PP มีเซลล์เดนดริติกหลายกลุ่มย่อยและมีบทบาทต่างกัน ในส่วนของ LP มีเซลล์เดนดริติกสองกลุ่มย่อยโดยแยกออกจากกันด้วยการมีโมเลกุล CD103 บนเซลล์เมมเบรน (Rescigno M, 2009) ในลำไส้ของมนุษย์การจำแนกกลุ่มย่อยยังไม่ชัดเจนเหมือนในหนู แต่ทราบว่ามียบทบาทสำคัญในการปรับระบบภูมิคุ้มกันโดยควบคุมการทำงานของ T lymphocyte และการสร้างแอนติบอดีชนิด IgA เซลล์เดนดริติกทำให้เกิดพัฒนาการของ regulatory T cells (Treg) และ T

helper cells (Th1, Th2, Th17) ที่เยื่อในลำไส้เล็กเซลล์เดนดริติกจะพัฒนามาจากโมโนไซต์ที่เคลื่อนย้ายเข้ามาในเนื้อเยื่อจากกระบวนการอักเสบ โดยมีเซลล์ชนิดต่างๆ ที่มีส่วนร่วมในการเกิดพัฒนาการของเซลล์เดนดริติก ได้แก่ intestinal epithelial cells (IECs) ทำให้เซลล์เดนดริติกลดการสร้าง IL-12 ที่จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ Th1 แต่ส่งเสริมการทำงานของ Th2 โดยการหลั่ง thymic stromal lymphopoietin (TSLP) และการหลั่ง transforming growth factor (TGF)- $\beta$  ทำให้เกิดพัฒนาการของ CD103+DC ที่ควบคุม Th1 และการสร้าง IgA Stromal cells มีผลต่อการทำงานของเซลล์เดนดริติกและยับยั้งการสร้าง IFN- $\alpha$  เซลล์ macrophage ในลำไส้มีบทบาทในการลดการอักเสบในลำไส้โดยกระตุ้น regulatory T cells และยับยั้ง Th17 นอกจากนี้แบคทีเรียใน lumen ยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์เดนดริติกในลำไส้เล็ก โดยการกระตุ้น IEC ให้หลั่ง TSLP (Ressigno M., 2009) IECs มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อลำไส้ IECs ตอบสนองต่อ gram negative bacteria ในลำไส้ แต่ไม่ตอบสนองต่อแบคทีเรียประจำถิ่นและแบคทีเรียกรดแลคติก การกระตุ้นให้เซลล์เดนดริติกตอบสนองผ่าน IECs จะต้องมีการมี receptor ที่จำเพาะบน IECs ต่อแบคทีเรียชนิดนั้น (Zoumpopoulou G. และคณะ, 2009)

ในปัจจุบันความสนใจนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมากขึ้นโดยผสมในอาหารเช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจว่าแบคทีเรียกรดแลคติกรักษาสสมดุลและปรับสภาวะภูมิคุ้มกันในลำไส้ได้อย่างไร และเหตุใดที่แบคทีเรียกรดแลคติกไม่ได้ก่อโรคในลำไส้ ในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งทางด้าน innate และ adaptive immune response เช่น Phagocytosis, Natural killer cell cytotoxicity, การสร้างแอนติบอดีและไซโตไคน์และการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte (Gill HS, 1998) ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ที่เพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทำให้สามารถต้านทานต่อจุลชีพก่อโรคได้ Kaila M และคณะ (1992) รายงานการวิจัยในเด็กเล็กที่ได้รับ *Lactobacillus* GG มีอาการแสดงของโรคติดเชื้อโรตาไวรัสหรืออาการท้องเสียสั้นลงและมีแอนติบอดีชนิด IgA เพิ่มขึ้น มีหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ มีความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกในกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับหากมีปริมาณสูงก็จะช่วยเพิ่มการตอบสนองได้ดี การใช้แบคทีเรียที่มีชีวิตและสภาวะของแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารหมักกระตุ้นการตอบสนองได้ ทั้งนี้ไม่มีรายงานว่ากระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันขึ้นกับ อายุ อาหารและปัจจัยทางกายภาพของผู้บริโภค (Gill HS, 2004)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียในลำไส้กับแบคทีเรียก่อโรคมีความแตกต่างกัน การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียกรดแลคติกไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ เนื่องจากการกระตุ้นนั้นมีความรุนแรงน้อยกว่าการตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรค อาจเนื่องมาจากเซลล์เดนดริติกในเนื้อเยื่อลำไส้รับรู้แบคทีเรียกรดแลคติกผ่าน TLR2, TLR9 และ NOD2 ที่จับกับส่วน

peptidoglycan ของแบคทีเรียเช่นเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่น กระตุ้นการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกในรูปแบบที่แตกต่างกัน และส่งเสริมการทำงานของ Treg ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการหลั่ง IL-10 และ TGF- $\beta$  (Rook GAW. และคณะ, 2005) TGF- $\beta$  มีผลทำให้การสร้าง IgA ในลำไส้มีปริมาณสูงขึ้น *Lactobacillus* กระตุ้นเซลล์เดนดริติกให้มีการแก่ตัวแต่หลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  และ IL-12 ในปริมาณที่น้อย แต่ยังคงสร้าง IL-10 ได้ ดังนั้นจึงเป็นการลดการทำงานของ Th1 ที่จะส่งเสริมกระบวนการอักเสบ (Christensen HR. และคณะ, 2002) Treg ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้ จะมีการตอบสนองต่อเซลล์เดนดริติกที่ถูกกระตุ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ไม่ว่าจะให้แบคทีเรียกรดแลคติกโดยการกินหรือการให้ทางชั้นใต้ผิวหนังเนื่องจาก Treg จะเดินทางไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย กลไกหนึ่งของการควบคุมการทำงานของ Treg คือแบคทีเรียกรดแลคติกจับกับ C type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule 3- grabbing non integrin (DC-SIGN) อย่างไรก็ดีแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น *L. casei*, *L. reuteri* ที่สามารถจับกับ DC-SIGN (Smith HH. และคณะ, 2005) เซลล์เดนดริติกบริเวณ PP จะมีการกระตุ้นและหลั่ง IL-4, IL-10 (Th2) ได้มากกว่าเซลล์เดนดริติกจากเนื้อเยื่อลำไส้และยังกระตุ้น T lymphocyte ให้หลั่ง IFN- $\gamma$  (Th1) ได้น้อย บ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์เดนดริติกบริเวณ PP มีบทบาทในการปรับสภาวะการทำงานของลิมโฟไซต์ในระบบทางเดินอาหาร (Iwasaki A. และคณะ, 1999)

การศึกษากลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนมากเนื่องจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่หลากหลาย Lee Y. และคณะ (2005) ทดสอบการกระตุ้น phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว Macrophage จากหนูซึ่งได้รับแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีชีวิตและผ่านการทำลายด้วยความร้อน (heat killed bacteria) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า *W. kimchii* PL9001, *L. plantarum* PL9011, *L. fermentum* PL9015 เพิ่มเปอร์เซ็นต์ phagocytotic activity อย่างมีนัยสำคัญและแบคทีเรียที่มีชีวิตกระตุ้นได้ดีกว่า heat killed bacteria การศึกษาของ Galdeano CM และคณะ (2006) ทดลองให้หนูกินแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. casei* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มการกระตุ้น innate immune cell โดยเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ TLR2 และ CD206 ในเนื้อเยื่อลำไส้มากขึ้น และเพิ่มจำนวนเซลล์ที่สร้าง IgA ในส่วน LP ของลำไส้ แต่ไม่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวน T lymphocyte

## 5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

อาภัสรา กอบกัยกิจ (2536) การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักไทย ผัก ผลไม้ดอง แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว จากตลาดสดต่าง ๆ ได้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 50 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum* 40 สายพันธุ์, *Lactobacillus animalis*

7 สายพันธุ์, *Lactobacillus pentosus* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus marinus* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerance* 1 สายพันธุ์ ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* พบว่าส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 3.3-4.0 ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยดูความกว้างของบริเวณ ยับยั้งและวัดค่าการดูดกลืนแสงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เมื่อ ทดสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 36 ชม. ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่แยกได้จากหน่อไม้ ดอก ปรับให้มีความเป็นกรดต่าง 6.5 จะสามารถเกิดบริเวณใสบนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็งต่อเชื้อทดสอบ *B. subtilis* และ หนองเหนียวการเจริญของ เชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากที่สุด การทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำส่วนสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยการโครมาโตกราฟีอย่างต่อเนื่องบน ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 และเซฟาเดกซ์ จี-75 ตรวจสอบชนิด และขนาดของสารต่อต้านจุลชีพโดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าน่าจะเป็นสารไลโปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 ดาลตัน ใช้ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพ เป็นหัวเชื้อเตรียมโยเกิร์ตระดับห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบด้วยประสาทสัมผัสระดับการให้คะแนนของสีและเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตที่เตรียมด้วยเชืวดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่าโยเกิร์ตที่ทำจากโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด ค่าการยอมรับรวมของโยเกิร์ตทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 5.33

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) ได้ทำการแยกแลคติกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้และนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25723, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella typhimurium* 3230 ซึ่งเชื้อที่แยกได้นี้ได้สร้างสารยับยั้งเป็นกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และพบว่าบางชนิดสร้างสารยับยั้งซึ่งไม่มีคุณสมบัติเป็นกรดอินทรีย์ โดยเป็นสารพวกโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งคาดว่าสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็นแบคเทอรีโอซิน

ปาริชาติ พุ่มขจร และคณะ (2543) ได้ศึกษาถึงความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอรีโอซิน ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมัก โดยนำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 273 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักจำนวน 15 ตัวอย่าง มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ (indicator organism) 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเมื่อนำ culture supernatant ดังกล่าวมาปรับ pH 7 ปรากฏว่าที่แบคทีเรียแลคติกจำนวน 81 ไอโซเลท ที่ยังคงยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ และเมื่อเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไป พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก จำนวน 37 ไอโซเลท ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเมื่อเติมเอนไซม์โปรติเนสลงไปอีก พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก

5 ไอโซเลท ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์บางชนิดได้ ซึ่งสามารถที่จะนำไปใช้ได้จริงในขั้นตอนการผลิตอาหารหมัก และอุตสาหกรรมการผลิตอาหารอื่นๆ

ธิดาทิพย์ วงศ์สุวรรณ และคณะ (2544) จากการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 2 ชนิดคือ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี swab paper disc และวิธี spot on lawn พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* จากการทดสอบด้วยวิธีการทั้งสองดังที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นจึงได้นำสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ใน culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทดังกล่าวไปศึกษาความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ pepsin และ protienase K ซึ่งปรากฏว่าสารดังกล่าวถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด และเมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทไปเทียบเคียงชนิด พบว่าเป็นเชื้อ *Streptococcus* ทั้ง 2 ไอโซเลท

ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ (2544) ได้ทำการ review ในเรื่องของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ที่มักใช้เป็นหัวเชื้อของอาหารหมักในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายชนิด เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารที่ช่วยในการปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น สารดังกล่าวได้แก่ สารพวกกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล อะเซทาลดีไฮด์ รูเทอริน และแบคทีเรียโอซิน เป็นต้น โดยสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้แตกต่างกัน

สมบุรณ์ ธนาสุภรณ์ (2544) เขียนบทความเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่พบในปลาร้าและปลาจ่อมโดยได้รายงานไว้ว่า อาหารหมักพื้นบ้านของไทยเช่น น้ำปลา บูด ชีวี่ว แหนม ปลาส้ม ส้มผัก หอยดอง ผักกาดดอง หอมดอง ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น มีรสเปรี้ยวเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกและช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ พบว่าในอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือต่ำมีกรดมากจะมีแบคทีเรียรูปร่างแท่งคือ แลคโตบาซิลลัส เพนโตซัส และ แลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม และพวกรูปร่างกลม เพติโอคอคคัส เพนโตซาเซ็นส ส่วนอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูง เช่น น้ำปลา บูดและ ชีวี่ว มีกรดน้อยจะพบแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเตตราจีโนคอคคัส แต่อย่างไรก็ตามอาหารหมักที่มีเกลือสูงแต่มีรสเปรี้ยวเช่น ปลาร้า ปลาจ่อมก็พบแลคโตบาซิลลัสหลายชนิด ซึ่งประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักอาหาร เช่น นมหมัก (โยเกิร์ต หรือ นมเปรี้ยว) โดยเชื้อจะผลิตกรดแลคติก กรดอะซีติก และเอทานอลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซีติล โพลีแซคคาไรด์ แบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะ สำหรับใช้เป็นสารถนอมอาหารเพื่อยับยั้งเชื้อโรคได้ และใช้เป็นเซลล์ที่มีชีวิตเป็นโพรไบโอติก (probiotic) เพื่อทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของโฮสต์และป้องกันการเกิดโรคท้องร่วง ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี ส่วนความสำคัญทางด้าน

สุขภาพได้รายงานว่าไม่ใช่แบคทีเรียกรดแลคติกทุกชนิดที่จะมีผลต่อสุขภาพ จะพบเพียงบางตัวเท่านั้น เช่น แลคโตบาซิลลัส และไบฟิโดแบคทีเรียบางชนิดที่มีบทบาทในลำไส้ในการช่วยลดโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ กลูโคสในเลือด ความดันและการบดเน่าในลำไส้ใหญ่ ในต่างประเทศนิยมใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัส แอซิโดฟิลลัส เป็นหัวเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยวหรือเชื้อผงสำหรับรักษาโรคในลำไส้ แลคโตบาซิลลัส แพลนท์ารัม มีผลต่อการสร้างแอนติบอดี แลคโตบาซิลลัส คาเซไอ เพิ่มความต้านทานของโฮสต์ต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เช่นเดียวกับเชื้อชนิดอื่นที่พบในอาหารหมักของไทยก็จะเข้าสู่ลำไส้โดยการบริโภคอาหารหมักดองต่าง ๆ เป็นประจำ ซึ่งอาจมีบทบาทในทางก่อโรคได้เช่นกัน

ชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา และคณะ (2545) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร โดยทำการคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักดอง ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดใน อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 73 ไอโซเลท และทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมี เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 21 ไอโซเลทสกัดสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhi* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Sarcina lutea* ATCC 9341 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคูณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคทีเรียโอซิน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพด้วยผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะนำไปสู่แนวทางในการพัฒนายาต้านจุลชีพและสารถนอมอาหารจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ และ ปลอดภัย

Alakomi และคณะ (2000) ผลของกรดแลคติก ที่สามารถซึมผ่าน outer membrane ของ *Escherichia coli* O157:H7 , *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ถูกศึกษาโดยใช้ a fluorescent – probe uptake assay และใช้วิธีตรวจหา sensitize ของการแตกสลายของแบคทีเรีย(bacteriolysis) โดยใช้ตัวควบคุมคือ EDTA (a permeabilizer acting by chelation) และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งปรับความเป็นกรดต่ำสุดทำให้ตรงกับกรดแลคติก และมีการทดสอบในการแสดงออกของ KCN ด้วย ผลสุดท้ายจะได้ว่ากรดแลคติกที่ความเข้มข้น 5 mM (pH 4) จะให้ผลที่ชัดเจนต่อความสามารถในการซึมผ่านของเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละสปีชีส์ ผลจากการทดสอบ fluorescent assay ให้ผลดีกว่า EDTA หรือ HCl หรือ HCl + KCN ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* การซึมผ่านของกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก ถูกยับยั้งโดย  $MgCl_2$  ความไวต่อการสลาย outer membrane ของ *Escherichia coli* และ serovar Typhimurium เมื่อใช้ Lactic acid + sodium dodecyl sulfate (SDS) จะมากกว่า HCl + SDS อย่างไรก็ดีตาม กรดทั้งสอง เมื่อเติม SDS และเติม Triton x-100 จะมีความไวต่อ *Pseudomonas aeruginosa* กรดนี้จะทำให้มีการปลดปล่อย

lipopolysaccharide จาก serovar Typhimurium ออกมาในสัดส่วนที่ค่อนข้างมากโดยสามารถวิเคราะห์ได้โดยการทำ electrophoresis และทำ fatty acid analysis ซึ่งจะแสดงให้เห็นเช่นกัน การปลดปล่อย lipopolysaccharide จาก outer membrane ที่เกิดจากการแตกหักเกิดขึ้นได้ดีกว่า EDTA และ HCl ดังนั้นจะได้ว่าการแตกหักมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพ(antimicrobial) ที่ pH ต่างๆ ร่วมกับการซึมผ่านเข้าสู่ outer membrane ของ Gram- Negative Bacteria และอาจเกิดจาก effect ของ antimicrobial substances อื่นๆ

Tjoelker LW และคณะ (2000) รายงานการตรวจพบการผลิตไคตินเนสจากเห็ดที่ติดเชื้อ Aspergillus และได้สรุปโครงสร้างของไคตินเนสจากมนุษย์ ว่าอย่างน้อยต้องประกอบด้วย chitin binding domain โดยอยู่ทางด้าน C-terminal 49 ซึ่งถ้าส่วนนี้ขาดหายไปจะทำให้คุณสมบัติ chitin binding activity หายไป ส่วนของ chitin binding domain เป็นส่วนสำคัญที่จะไปจับและย่อยสลาย insoluble chitin ตรงส่วนผนังเซลล์ของเชื้อรา

Seliternikoff CP (2001) ได้ review เกี่ยวกับโปรตีนที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา (Antifungal proteins) ที่ผลิตออกมาโดยพืชที่ถูกกรุกรานจากเชื้อราหรือไวรัส ซึ่งพบมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน กล่าวคือ pathogenesis-related (PR) proteins ที่ถูกจัดแบ่งออกได้เป็น PR-1, 2, 3, 4, 5 และโปรตีนอื่น ๆ เช่น Defensins, Cyclophilin-like protein , Glycine/histidine-rich protein, RIPs, LTPs, Killer proteins เป็นต้น และหนึ่งในกลุ่มของ PR protein (PR-3) ก็คือ ไคตินเนสสามารถป้องกันเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ด้วย เช่น *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Fusarium oxysporum* เป็นต้น

Elmedfah I. และคณะ (2010) รายงานการศึกษาในร่างกาย (in vivo) โดยใช้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีขายในท้องตลาดกับแบบดั้งเดิม ให้อาสาสมัครผู้หญิงที่มีสุขภาพดีรับประทานโยเกิร์ตที่มีแบคทีเรีย *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* , *S thermophilus*, *L. casei* วันละ 100 กรัมเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์และเพิ่มเป็น 200 กรัมในสองสัปดาห์ถัดมา เจาะเก็บเลือดเพื่อทดสอบการแสดงออกของ CD69 บน T lymphocyte โดยวิธี Flow cytometry และวัดความสามารถของ NK cell ในการทำลาย Target cell (K562) และวัดปริมาณการสร้างไซโตไคน์จาก Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มขึ้นของ CD69 บน Th cells และการหลั่งไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ IL-6 ในขณะที่ IL-10 ลดลงเล็กน้อย และการเพิ่มขึ้นจะยังคงมีอยู่แม้ว่าจะหยุดรับประทานผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

Christensen HR. และคณะ (2002) ศึกษาการกระตุ้นเซลล์เดนดริติกในหลอดทดลอง (in vitro) ทดสอบ โดยใช้ bone marrow derived DC ของหนูมาทดสอบกับแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ *L. reuteri* DSM12264, *L. plantarum* Lb1, *L. fermentum* Lb20, *L. casei* subsp. *alactus* CHCC3137, *L. plantarum* 299, *L. jhonsonii* La1 วัดการสร้างไซโตไคน์ และการแสดงออกของเครื่องหมายบนผิวเซลล์ พบว่า *L. reuteri* , *L. plantarum* Lb1, *L. fermentum* Lb20, *L. casei*, *L. plantarum* 299, *L. jhonsonii* La1 กระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-6, IL-12, TNF-

α ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กระตุ้น สำหรับการหลั่ง IL-10 ต้องใช้ปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าการหลั่งไซโตไคน์ข้างต้น ทุกสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ maturation marker( HLA-DR, CD86) บนผิวเซลล์เดนดริติกได้ บ่งชี้การเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติก และพบว่า *L. reuteri* สามารถยับยั้งความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่กระตุ้นเซลล์เดนดริติก ดังนั้นการปรับสภาวะการทำงานของ Th1 Th2 Th3 โดยเซลล์เดนดริติกต้องขึ้นกับแบคทีเรียประจำถิ่นและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกด้วย

Elmedfah I, et al (2010) ศึกษาโดยใช้ MoDCs ที่เพาะเลี้ยงจากโมโนซัยต์ ทดสอบกับแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้เซลล์ต่อแบคทีเรียในอัตราส่วน 1 cell: 10 CFU หรือเพาะเลี้ยงร่วมกับ Caco-2 cells (เป็น epithelial cell barrier) เป็นเวลา 24 ชม. วัดการสร้างไซโตไคน์ IFN-(, IL-1(, IL-10, IL-12 และวัดการแสดงออกของ CD80 CD83 D86 และ CD54 การสร้างไซโตไคน์และการแสดงออกของ CD86 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกระตุ้นเซลล์เดนดริติกด้วย *L. delbrueckii* แต่ *L. rhamnosus* เพิ่มการแสดงออกของ CD80 และ CD86 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์หรือโมเลกุลบนผิวเซลล์อื่นๆ ในกรณีที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกับ Caco-2 cell จะไม่กระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์หรือโมเลกุลบนผิวเซลล์เดนดริติก

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### I. เกี่ยวกับการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์

##### 1. วัสดุ อุปกรณ์

###### 1.1 อาหารที่ใช้ในการแยกแบคทีเรีย

1.1.1 อาหารที่ใช้มีทั้งประเภท แป้ง เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นม

1.1.2 อาหารประเภทแป้ง ได้แก่ เส้นขนมจีน ข้าวหมาก

1.1.3 อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ กะปิ กุ้งส้ม ไตปลา ปลาร้า ปลา หมู แหนมปลา  
แหนมหมู แหนมไก่

1.1.4 อาหารประเภท ผัก ผลไม้ ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ หัวผักกาดเค็ม กะหล่ำปลี  
มะม่วงสุก มะเขือเทศ มะพร้าว

1.1.5 ผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยว

###### 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase soy broth (TSB) และ Trypticase soy agar (TSA)

Mann Rogosa Sharpe (MRS) broth และ MRS agar

Luria-Bertani (LB) ประกอบด้วย Tryptone, yeast extract, sodium chloride (NaCl)

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM (สำหรับ *Streptomyces* spp.) (Yeast Extract , Malt  
Extract, Agar 2.0 %, Glucose)

ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 50 CHL (biomerieux)

###### 1.3 จุลินทรีย์

###### 1.3.1 จุลินทรีย์ดัชนี

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (TISTR 050)

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008)

*Candida albicans* DSM 70014 (TISTR 5239)

*Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887)

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (TISTR 781)

*P. aeruginosa* TISTR 1478

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517)

*Micrococcus luteus* TISTR 884

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ไอโซเลท 338, 403, 414, 539, 3576

*Salmonella typhimurium* TISTR 292

#### 1.3.2 แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ

*Brevibacillus laterosporus* SA14 แยกได้จากอากาศในมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

*Streptomyces* species แยกได้จากดินภายในมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ได้แก่ *Streptomyces* spp. CFJ2 (CK9), *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257 (CO4), *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-1334 (WU6) และ *Streptomyces* spp. B26 (WU10)

1.4 แผ่นยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ sulphamethoxazole trimethoprim 25 (SXT), carbenicillin 100 (CAR), amikacin 30 (AK), oxacillin 1 (OX), ampicillin 10 (AMP), penicillin G 10 (P), nitrofurantoin 300 (F), cephalotin 30 (KF), gentamicin 10 (CN)

#### 1.5 สารพรไบโอติก

#### 1.6 แผ่นนับสำริ่จุรูป 3M Petrifilm™

#### 1.7 สารเคมี

1.7.1 ทดสอบ catalase test : 3% hydrogen peroxide

1.7.2 electrophoresis : Agarose gel

Hydrochloric acid

EDTA

Trisma Base

Lambda ( $\lambda$ )-DNA

#### 1.8 วัสดุอุปกรณ์

Pipette, L-shape rod, eppendorf tubes, centrifuge tubes ไม้จิ้มฟัน กระดาษกรอง ช้อนตักยา

#### 1.9 เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์

UV transiluminator

Spectrophotometer

High-speed refrigerated centrifuge

## 2. วิธีการดำเนินการวิจัย

### I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

#### 1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร(อาหารหมัก ผลไม้ และ /หรือ ผลิตภัณฑ์นม )

1.1.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม

1.1.2 นำตัวอย่างที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากันจนทั่ว บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

1.2 กระจายเชื้อลงบน TSA/MRS agar plate (ทำซ้ำ 2 plate)

- ดูดเชื้อจากข้อ 1.1.2 ปริมาตร 0.1 มล. ลงบน TSA plate (ทำซ้ำอีก 1 plate ลงบน MRS agar plate ) แล้วกระจายจนทั่ว agar โดยใช้ L-shape rod

1.3 บ่มเพาะ Plates ทั้งหมดจากข้อ 1.2 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน 5-10 % CO<sub>2</sub>

1.4 สำหรับ Plate ที่มีเชื้อเจริญขึ้นมามาก ให้แตะ colony ที่บริเวณรอบ ๆ ไม่มีเชื้ออื่นเจริญขึ้นมาเพื่อทำ pure culture โดยใช้ needle เขี่ยเชื้อแล้วนำมา streak ลงบน MRS agar plate โดยวิธี streak plate method

1.5 บ่มเพาะ Plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน 5-10 % CO<sub>2</sub> เพื่อจะนำเชื้อไป ทดสอบ antimicrobial spectrum

การคัดเลือกโคโลนี : คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะ นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง มาทดสอบเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีที่ต้องการทดสอบมาป้ายบนกระดาษไคโรไลต์ที่สะอาดหยด 3% ของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 หยดทับลงบนโคโลนีแล้วสังเกตการเกิดฟองภายใน 10 วินาที หากเกิดฟองแสดงถึงการทดสอบให้ผลบวกแต่หากไม่เกิดฟองแสดงถึงการทดสอบให้ผลลบ ทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบอะไมเลสลบไปย้อมสีแบบแกรม และเลือกเฉพาะโคโลนีที่ย้อมได้แกรมบวกรูปแท่ง ไปขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนปรากฏโคโลนีให้เห็น

#### 2. ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว

2.1 นำเชื้อที่คัดเลือกได้ในตอนต้นประมาณ 100 ไมโครเลท รวมถึงเชื้อ C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (เชื้อควบคุมการทดลอง) มาปรับเทียบให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

2.2 ถ่ายสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 19 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตรและภายในบรรจุไม้เสียบลูกชิ้นปราศจากเชื้อ (เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมผลลบ)

2.3 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลการเกิดก๊าซและการเกาะติดพื้นผิวบริเวณไม่เสียบลูกชิ้นและผิวด้านในหลอดทดลอง บันทึกผลการเจริญและสังเกตการเกาะติดพื้นผิวทุกวันเป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญและเกาะติดพื้นผิวเร็วที่สุด ปริมาณมากที่สุด และเกาะติดแน่นมากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาการมีชีวิตเหลือรอดในน้ำผลไม้

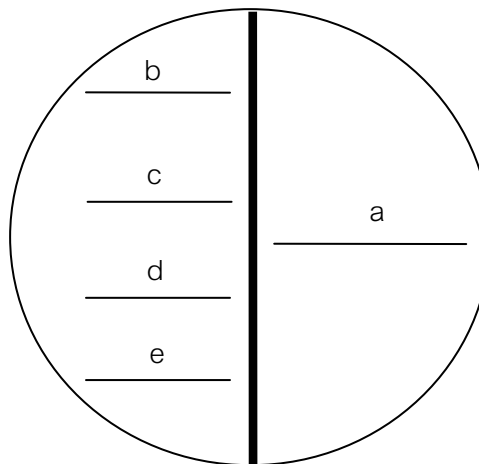
### 3. Antimicrobial spectrum

3.1 ตระ colony จากข้อ 1.5 ในหัวข้อ 1. แล้วขีดเป็นเส้นลงตรงกลางบน TSA agar plate จากขอบข้างหนึ่งไปยังขอบอีกข้างหนึ่งของ plate

3.2 บ่มเพาะ plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3 ตระเชื้อ *S. aureus* ด้วย loop แล้วขีดเป็นเส้นตรงเริ่มจากริมของเชื้อจากข้อ 3.2 (อย่าให้ loop สัมผัสกับเชื้อจากข้อ 3.2 ) ไปยังขอบ plate ที่อยู่ข้างเดียวกัน

3.4 ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3 แต่ใช้เชื้อ *L. plantarum* (a), *E. coli* (b), *B. Subtilis* (c), *P. aeruginosa* (d) และ *C. albicans* (e) โดยแบ่งเป็น 2 ข้าง ดังรูป



3.5 บ่ม plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3.6 สังเกตโดยดูรอยขีดเชื้อที่ติดกับเชื้อในข้อ 2.2 ว่ามีเชื้อเจริญขึ้นหรือไม่

### 4. ทดสอบ Activity ในการยับยั้งเชื้อ ของกรดแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี agar well diffusion assay

4.1 บ่มเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

4.3 แยกเก็บส่วนใส กรองด้วย Millipore 0.45  $\mu\text{m}$  วัด pH ด้วย pH meter

4.4 นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบ antimicrobial activity กับ indicating strains ที่ปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland No. 0.5

4.4.1 swab indicating strain ที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง

4.4.2 เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม.

4.4.3 หยอดส่วนใสลงในหลุมดังกล่าว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4.4.4 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4.5 ตรวจผลการยับยั้งเชื้อ indicating strain โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

#### 5. การวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL

5.1.1 ใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 50 CHL (biomerieux) ในการทดสอบแยกชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทโดยมีขั้นตอนโดยย่อดังต่อไปนี้

1) เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ให้มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 2 ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ให้มาพร้อมกับชุดทดสอบ API 50 CHL แล้วนำไปหยดใส่ในช่องทดสอบบน strips ทุกช่องจำนวน 50 ช่องๆ ละ ประมาณ 120 ไมโครลิตร โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

2) หยดปิดทับช่องว่างที่เหลือด้วย mineral oil เพื่อให้เกิดสภาพไร้อากาศ แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนสีของอาหารในหลุมเป็นสีเหลืองและสีดำในหลุมที่ทดสอบ esculine ให้บันทึกเป็นบวก หากเป็นสีอื่นให้บันทึกผลเป็นลบ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เกิน 48 ชั่วโมง

5.1.2 นำผลการทดสอบที่ได้ไปวิเคราะห์แยกชนิดของเชื้อโดยใช้ซอฟต์แวร์ API 50 V. 5.1

#### 6. ความทนทานต่อระดับ pH 2-10

6.1 นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาปรับเทียบความขุ่นเทียบกับ McFarland No. 0.5 แล้วเติมลงไปในห้องอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 19 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่ปรับ pH เท่ากับ 2-11

6.2 นำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโตโดยดูความขุ่นและตะกอนเชื้อในหลอดทดสอบทุกหลอดที่มี pH ต่างๆ กัน และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมเชื้อเป็นชุดควบคุมการทดลองเพื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญ

## 7. ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

7.1 เตรียมสารแขวนลอยเชื้อที่คัดเลือกได้รวมทั้ง *L. plantarum* TISTR 050 ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.6% จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

7.2 นำแผ่นยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ sulphamethoxazole trimethoprim 25 (SXT), carbenicillin 100 (CAR), amikacin 30 (AK), oxacillin 1 (OX), ampicillin 10 (AMP), penicillin G 10 (P), nitrofurantoin 300 (F), cephalotin 30 (KF), gentamicin 10 (CN) ไปวางบนผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนยับยั้งรอบแผ่นยาแต่ละชนิด

## 8. ความทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส)

8.1 การเก็บรักษาเชื้อ : ถ่ายสารแขวนลอยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน 50% กลีเซอรอล ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

8.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ : นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนครบเวลา 1 เดือนแล้วมาขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญบนอาหารแข็ง MRS

## 9. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในน้ำผลไม้

### 9.1.1 การเตรียมน้ำผลไม้

1) ล้างผลไม้ 3 ชนิด คือ แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และมะนาวให้สะอาด ตัดแกนเปลือกและนำเอาเมล็ดออก จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คั้นเอาเฉพาะส่วนของน้ำผลไม้ชนิดละ 3.5 ลิตร ด้วยถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

2) วัดความหวานด้วยเครื่อง refractometer บันทึกผล

3) เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์จำนวน 200 ppm ลงไปในน้ำผลไม้แต่ละชนิดและนำมาต้มที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อปนเปื้อน

4) แยกบรรจุน้ำผลไม้แต่ละชนิดลงในขวดพลาสติกขาวขุ่นที่ปราศจากเชื้อที่ผ่านการกลั่นด้วยโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ ขวดละ 225 มิลลิลิตร โดยบรรจุน้ำผลไม้แต่ละชนิดๆ ละ 12 ขวด รวม 36 ขวด

### 9.1.2 การเติมสารโปรไบโอติกลงในน้ำผลไม้

เติมสารโปรไบโอติกลงในน้ำผลไม้แต่ละขวดๆ ละ 4.5 กรัม รวม 12 ขวด และชุดที่ไม่เติมโปรไบโอติกจำนวน 12 ขวด สำหรับชุดควบคุมผลลบให้เตรียมเช่นเดียวกับข้างต้นแต่ไม่ต้องเติมเชื้อลงไป ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

### 9.1.3 การเติมแบคทีเรียโปรไบโอติกลงในน้ำผลไม้

เตรียมเชื้อที่คัดเลือกได้ให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $12 \times 10^8$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตรด้วยการเทียบความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No.4 แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อเติมลงไปในน้ำผลไม้ทุกขวดๆ ละ 25 มิลลิลิตร ยกเว้นขวดควบคุมผลลบ จากนั้นนำน้ำผลไม้ทั้งหมดไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิต

9.1.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหลืรอดในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

นำน้ำผลไม้ที่ต้องการนับจำนวนเซลล์มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำเจือจางแบบ 10 เท่าใน 0.85% NaCl จนถึง  $10^{-4}$  นำไปตรวจนับแบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิตในน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยแผ่นนับสำเร็จรูป 3M Petrifilm™ โดยทำการตรวจนับในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ของการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณความเกี่ยวข้องของสารโปรไบโอติกที่มีต่อปริมาณการยู่รอดของเชื้อในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

### 10. ทดสอบ Activity ในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียโอซิน ด้วย well diffusion assay

นำส่วนใสจากข้อ 3.3 มาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 2N NaOH และปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4.

11. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก

#### กลุ่ม *Bacillus*

##### 11.1 การเตรียมแบคทีเรีย

11.1.1 แบคทีเรียดัชนี (indicator organism): *Staphylococcus aureus* TISTR 517

1) ขีด *S. aureus* TISTR 517 ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

2) นำไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ : เซลล์ควรมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวคล้ายพวงองุ่น

##### 11.1.2 แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ

1) ขีดแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

2) นำไปย้อมสีแบบแกรมและย้อมสปอร์ เพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์และการเรียงตัวของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ : เซลล์ควรมีรูปท่อน สร้างสปอร์อยู่ข้างเซลล์

## 11.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

### 11.2.1 การเตรียมแบคทีเรียดังนี้

- 1) นำแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 (บ่มเลี้ยง 1 วัน) มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  Colony Forming Unit/ml)
- 2) ป้ายลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ด้วยสำลีพันก้านไม่ปราศจากเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
- 3) เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 หลุม (หลุมควบคุมและหลุมทดสอบ) ด้วยทูปปราศจากเชื้อขนาด 1000 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

### 11.2.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

- 1) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ *Brev. laterosporus* SA14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.
- 2) แบ่งสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube
- 3) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 4) นำส่วนใสที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

### 11.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

- 1) โดยวิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับข้อ 4.
- 2) โดยวิธี spot on lawn  
ทดสอบคล้ายกับ agar well diffusion ต่างกันตรงที่ไม่ต้องเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ใช้วิธีหยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ลงแบคทีเรียต้นนี้ไว้ก่อนหน้านี้ (ข้อ 2.3.1.1) และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

## กลุ่ม *Streptomyces* spp.

### 11.3 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

- 11.3.1 นำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาขีดลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนีและนำไปย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

11.3.2 นำเชื้อจากข้อ 11.3.1 ส่วนหนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นนำมาเก็บใน glycerol 15 % ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

#### 11.4 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ในรูป crude proteins

11.4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-7 วัน แล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

11.4.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำให้เข้มข้นในรูปผงโดยใช้วิธี Lyophilization

11.4.3 นำผงที่ได้มาละลายด้วย PBS ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

#### 11.5 นำตะกอนเชื้อไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้วิธี Sonication

11.5.1 นำตะกอนเชื้อที่แยกได้จากข้อ 11.4.1 มาเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

11.5.2 นำไปทำให้เซลล์แตก โดยใช้ Sonicator ความถี่ 40 Hz เป็นเวลา 40 นาที โดยหล่อไว้บนน้ำแข็ง

11.5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

11.5.4 นำส่วนใสมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

#### 11.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อ *Streptomyces* spp.

11.6.1 วิธี Agar Plug Diffusion (ทดสอบจากวันไคโคโลนีของ *Streptomyces* spp.)

1) นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อดัชนี MRSA 339, 403, 414, 539, 3576 และ *S. aureus* TISTR 517 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แล้วปรับความขุ่นโดยเทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ  $1.8 \times 10^8$  CFU/ml

2) ใช้ sterile swab จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อดัชนีแต่ละชนิด และ swab กับผิวด้านในของหลอด แล้วหมุนให้พหุมาด ๆ นำมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA เป็น 3 ระบาย วางไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งที่อุณหภูมิห้อง

3) ใช้ทูปขนาด 1,000 ไมโครลิตรเจาะวันจากไตโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. จากข้อ 11.3.1 และใช้วันที่เจาะได้มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM เพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมแล้วนำชิ้นวันทั้งหมดไปวางลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA ในข้อข้างบน

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) สังเกตความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดัชนีโดยดูวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆ agar plug

#### 11.6.2 ทดสอบจากวันรอบโคโลนีของ *Streptomyces* spp.

ทำตามขั้นตอนในข้อ 11.6.1 โดยเปลี่ยนจากการเจาะวันไตโคโลนีของเชื้อมาเป็นเจาะวันรอบๆโคโลนีของเชื้อแทน

## II การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV

1. บ่มเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 100 มล.
2. แบ่งใส่ sterile plates 2 plates plate ละ 25 มล.
3. นำไปวางไว้ใต้แสง UV เป็นเวลา 10 นาที
4. นำไปทำเจือจางประมาณ  $10^{-7}$  แล้ว นำความเจือจางที่  $10^{-6}$  และ  $10^{-7}$  มา spread ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ใน 5-10 %  $\text{CO}_2$
5. สำหรับ Plate ที่มีเชื้อเจริญขึ้นมาน้อย ให้เท SDA ปริมาตร 5 มล. ซึ่งหลอมและอุ่นที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ใส่เชื้อ *Candida albicans* ที่บ่มเลี้ยงใน TSB ปริมาตร 1 มล.
6. บ่มเพาะ Plate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.
7. วัดขนาดสัดส่วนของ inhibition zone กับ colony ของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ผ่าเหล่า UV

## III การถ่ายยีนไคตินเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก

1. การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน
  - 1.1 เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS
  - 1.2 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เจริญในช่วง mid- logarithmic phase ด้วย shaking incubator
  - 1.3 การแยกเก็บเชื้อ

1.3.1 แชนเยนเชื้อจากข้อ 1.2 เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมา centrifuge เพื่อแยกเก็บตะกอน เชื้อที่ความเร็รรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง แชนเซลล์ในน้ำแข็ง

1.3.2 เติม 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM  $\text{CaCl}_2$  ที่เย็นจำนวน 30 มิลลิลิตร (ครึ่งหนึ่งของปริมาตรของเชื้อ) ลงบนเซลล์ เขย่าเบาๆ จนเซลล์ละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งอีก 5 นาที

1.3.3 แยกคอมพีเทนท์เซลล์โดยการปั่นที่ความเร็รรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง

1.3.4 เติม 10 mM Tris-HCl pH 8.0 , 50 mM  $\text{CaCl}_2$  ที่เย็นจำนวน 4 มล. (1/15 ของปริมาตรตั้งต้น) ค่อยๆเขย่าจนเซลล์กระจายหมด ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งอีก 30 นาที (อาจเพิ่มเวลาเป็น 12-24 ชม. ก็ได้ ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเพิ่มขึ้น 4-6 เท่า) เติม glycerol ให้ได้ความเข้มข้น 15 %

1.3.5 นำไปแช่แข็งที่ -30 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเกิน 3 วัน ) หรือนำไปใช้ได้ทันที

## 2. การนำ recombinant plasmid เข้าสู่ *Lactobacillus* host

2.1 สกัด recombinant chitinase gene (pHYB 43 ) จาก *E. coli* DH 5 $\alpha$  ด้วยวิธี alkaline lysis method แบบ large scale ดังนี้

2.1.1 ถ่าย overnight culture ของ เชื้อ *E. coli* DH $\alpha$  (pHYB43) ปริมาตร 1 มล. ใส่ใน eppendorf

2.1.2 ปั่นใน 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.1.3 เติม Solution I 100 ไมโครลิตร ทำให้เชื้อกระจายตัวโดยใช้ vortex mixer

2.1.4 เติม Solution II 200 ไมโครลิตร mix โดยกลับหลอด 2-3 ครั้ง

2.1.5 เติม Solution III 150 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าจะได้ตะกอนขาวจำนวนมาก

2.1.6 ปั่นที่ 13000 rpm 10 นาที เก็บ supernate ใส่ eppendorf ใหม่

2.1.7 ใส่ 0.7 V isopropanol แล้วผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอด 2-3 ครั้ง

2.1.8 ปั่นที่ 13000 rpm นาน 20 นาที เก็บตะกอน แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

2.1.9 นำไปละลายกับ TE 30 ไมโครลิตร แชนเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 หรือนำไปทำ agarose gel electrophoresis

2.2 นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 1.3.5 มาผสมกับ recombinant chitinase gene (pHYB 43) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่สกัดได้จากข้อ 2.1 แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว นำไป

heat shock โดยแช่ใน water bath 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง นาน 5 นาที

2.3 จากนั้น เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 1 มล. ลงไป

2.4 บ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge 5000 rpm, นาน 2 นาที แยกเก็บเซลล์แล้ว resuspend เพื่อนำไป spread ลงบน MRS agar plate ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.5 บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงใน 5-10 % CO<sub>2</sub> คัดเลือก transformants

### 3. ทดสอบการแสดงออกของยีนโคตินเนส

#### 3.1 ทดสอบโดยวิธีการขยี้เซลล์

นำโคโลนีของ transformants ที่ได้จากข้อ 2.5 (อายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง) 2-3 โคโลนี มาขยี้ด้วยแท่งแก้ว แล้วหยดทับด้วย 4-MUG substrate (active substrate) แล้วนำไปดูจุดเรืองแสงสีฟ้าสว่าง (light blue fluorescence ) ภายใต้เครื่อง UV transilluminator

#### 3.2 Electrophoresis

##### การทำ agarose gel electrophoresis

1. ชั่งอากาศ 0.7 กรัม ในบัฟเฟอร์ TBE 100 มล. ต้มจนกระทั่งอากาศละลายลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงบน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหยดดีเอ็นเอแล้ว

2. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ให้เจลแข็งตัว ตั้งเอาช่องที่หยดดีเอ็นเอออกจากนั้นเทบัฟเฟอร์ TBE ลงทั้งสองข้างของช่องจนกระทั่งท่วม

3. นำเอาดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 แล้วหยดลงในช่องที่เตรียมไว้บนอากาศ

4. ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับ power supply โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก แรงเคลื่อน 10 โวลต์/ชั่วโมง ขนาดความยาวเจล จะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีเคลื่อนที่ไปเกือบถึงปลายสุดอีกข้างของเจล

5. ปิด power supply แล้วค่อย ๆ นำเจลออกจาก chamber แล้วแช่ลงใน staining solution (เอธิเดียมโบรไมด์) ประมาณ 15-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ใส่ถุงมือเพื่อป้องกันไม่ให้ถูกกับเอธิเดียมโบรไมด์ )

6. ล้างสีออกในน้ำกลั่น เขย่าเบาๆ 15-30 นาที อาจจะทิ้งเจลไว้ในน้ำกลั่นค้างคืน

7. นำเจลไปส่องดูแถบต่าง ๆ ใต้

3.3 ทดสอบ Activity ในการย่อยสลายโคตินของโคตินเนส ที่สร้างจาก Transformants โดยวิธี well diffusion assay

3.3.1 บ่มเลี้ยง *L. plantarum* (negative control), pHYB43 (positive control) และ transformant ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

3.3.3 แยกเก็บส่วนใส กรองด้วย Millipore 0.45 ไมโครเมตร

3.3.4 นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบ Activity ดังนี้

1. เจาะหลุม Glycol chitin ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 ซม.

2. หยอดส่วนใสจากข้อ 3.2.3 ลงในหลุมดังกล่าวจนเต็มหลุม (ประมาณ 80 ไมโครลิตร )

3.3.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.6 ตรวจสอบการย่อยสลายไคติน ดังนี้

1) Inoculate CalCofluor White ปริมาณเล็กน้อยลงใน Tris-HCl pH 8.0

2) เทสารละลายให้ท่วม plate ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3) เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด

4) เติมน้ำให้ท่วม plate Rotate ไว้ 12 ชั่วโมง แล้วเทน้ำทิ้ง นำplate มาส่องด้วย UV transilluminator

3.4 ทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของไคตินเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay

3.4.1 นำส่วนใสที่ได้จาก ข้อ 3.2.3 มาทดสอบ Activity ดังนี้

1) swab indicating strains (*E. coli* , *S. aureus*, *B. subtilis*, *P.aeruginosa*, *M. luteus*) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 0.5 ลงบน TSA

2) เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 ซม. หยอดส่วนใส ลงในหลุมดังกล่าวจนเต็มหลุม (ปริมาตร 80 ไมโครลิตร )

3) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อ indicating strains โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

## II. เกี่ยวกับฤทธิ์ด้านมะเร็งและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

### 1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 เซลล์มะเร็งลำไส้ human colon carcinoma cell line; Caco-2 cells (Cell Line Service, Germany)

1.2 เซลล์มะเร็งช่องปาก human mouth carcinoma cell line; CLS-354 cells (Cell Line Service, Germany)

1.3 เซลล์ผิวหนัง human squamous cell line (HaCaT) (p40-46) (Cell Line Service, Germany)

1.4 อาหารและสารเคมีสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์

1.4.1 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง Caco-2 cells

- 1) DMEM/Ham's F12 (PAA)
- 2) Fetal bovine serum (Biochrom AG)
- 3) Penicillin and streptomycin (Biochrom AG)
- 4) Glutamine (GIBCO)

1.4.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง CLS-354 cells

- 1) RPMI 1640 (PAA)
- 2) Fetal bovine serum (Biochrom AG)
- 3) Penicillin and streptomycin (Biochrom AG)
- 4) Glutamine (GIBCO)

1.4.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง HaCaT cells

- 1) DMEM (PAA)
- 2) Fetal bovine serum (Biochrom AG)
- 3) Penicillin and streptomycin (Biochrom AG)
- 4) Glutamine (GIBCO)

1.4.3 สารเคมีสำหรับการ trypsinization

- 1) 70% ethanol in water
- 2) PBS without  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- 3) 25% Trypsin/EDTA in HBSS, without  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (GIBCO)

#### 1.4.4 สารเคมีสำหรับการนับ viable cells

- 1) 0.4% Trypan Blue Solution

#### 1.4.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

- 1) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - a tetrazole (MTT) (Sigma-alrich)

- 2) DMSO

- 3) ยาต้านมะเร็ง 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma-alrich)

- 4) สารเคมีอื่นๆ (HCl , NaOH)

#### 1.4.6 อาหารเลี้ยงเซลล์น้ำยาสำหรับแยกเม็ดเลือดขาว

- 1) Ficoll-hypaque (Robbins Scientific, Sunnyvale, USA)
- 2) Phosphate buffer saline (PAA Laboratories, Linz, Austria)
- 3) RPMI 1640 (PAA Laboratories, Linz, Austria)
- 4) Fetal calf serum (PAA Laboratories, Linz, Austria)
- 5) Penicillin/streptomycin (PAA Laboratories, Linz, Austria)

#### 1.4.7 สารเคมีสำหรับการกระตุ้นเซลล์และโมโนโคลนอลแอนติบอดี

- 1) Lipopolysaccharide (*E. coli* :RH 100) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 2) McFarland No.0.5 และ McFarland No. 1
- 3) Phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 4) Paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- 5) PerCP -conjugated anti-CD69 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 6) PE-conjugated anti-CD80 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 7) PE-conjugated anti-CD86 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 8) FITC-conjugated anti-CD1c (BDCA-1) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)
- 9) APC-conjugated anti-CD303 (BDCA-2) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)
- 10) PerCP -conjugated anti-CD14 (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- 11) PerCP -conjugated anti-CD19 (Becton Dickinson, San Jose, USA)

### 1.5 อุปกรณ์พื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยา

- 1.5.1 จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร

- 1.5.2 ไม้พันสำลี

- 1.5.3 ขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

1.5.4 ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร

1.5.5 หลอดทดลอง และ Rack วางหลอดทดลองขนาด 13x100, 25x150 และ 50x150 มิลลิเมตร

1.5.6 Loop

1.5.7 Needle

1.5.8 ตะเกียงบนเสน

1.5.9 ขวดใส่ 70 % alcohol

1.5.10 เครื่องปรับเทียบความขุ่น Macfarland No 0.5

1.5.11 กระดาษกรองขนาดรูผ่าน 0.5 ไมโครเมตร

1.5.12 Syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร

1.5.13 สำลีก้อน

1.5.14 ถุงมือ

1.6 อุปกรณ์พื้นฐานทางด้านการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

1.6.1 กระดาษชำระ

1.6.2 Automatic pipette และ Tips ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.6.3 Tissue culture flasks

1.6.4 Serological pipette ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.6.5 Microtiter plate ก้นแบน (4 หลุมและ 24 หลุม)

1.6.6 Microcentrifuge tubes

1.6.7 Cuvett

1.6.8 Millipore filter ขนาดรูผ่าน 0.45 ไมครอน

1.7 อุปกรณ์สำหรับการทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

1.7.1 Automatic pipette ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.7.2 Tips สำหรับ automatic pipette ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.7.3 Serological pipette ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.7.3 ขวด Duran ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.7.4 ปีกเกอร์ ขนาด 50, 150, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.7.5 Falcon tubes ขนาด 5 มิลลิลิตร

1.7.6 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.7.7 หลอดเก็บเลือดที่มีเฮพารินเป็นสารกันเลือดแข็ง

## 1.8 เครื่องมือ

- 1.8.1. Shaking incubator (Cocono CH30)
- 1.8.2 Autoclave (Tomy-pressure steam sterilizer ES-315)
- 1.8.3 Hot Air Oven (WTB BINDER FD, Thailand)
- 1.8.4 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- 1.8.5 Inverted phase contrast microscope (Nikon)
- 1.8.5 Inverted phase contrast microscope (Nikon)
- 1.8.6 Microwave (Sharp, Japan)
- 1.8.7 Centrifuge (Thermo electron corporation, France)
- 1.8.8 CO<sub>2</sub> incubator (Thermo electron corporation, France)
- 1.8.9 Biological safety cabinet class 2 (Heraeus, Germany)
- 1.8.10 Ultrasonic processor VCX-750 Watt (vibra cell<sup>TM</sup>)
- 1.8.11 Refrigerated centrifuge (Thermo electron corporation, France)
- 1.8.12 Lyophilizer (EYELA FDU 2100, Japan)
- 1.8.13 Biohazard Laminar flow (Heraeus, Germany)
- 1.8.14 Sonicator (SONIC and Material, INC, USA)
- 1.8.15 Incubator (WTB BINDER FD, Thailand)
- 1.8.16 Spectrophotometer (Thermo Spectronic, USA)
- 1.8.17 Hemacytometer
- 1.8.18 Flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA)

## 2. วิธีดำเนินการทดลอง

### I. การทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells)

#### 1. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง Caco-2 cells (p34-52)

1.1 เลี้ยง Caco-2 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM:Ham's F12 ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum, 1 % penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% โดยมีจำนวนเซลล์  $3 \times 10^4$  เซลล์ ใน tissue culture flasks ซึ่งมีพื้นที่  $75 \text{ cm}^2$

1.2 เลี้ยงไว้ 2 วัน ก่อนที่จะทำการทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

## 2. การ Trypsinization

2.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก flask แล้วเติม PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน flask และนำไปบ่มที่ CO<sub>2</sub> incubator 37 องศาเซลเซียสปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และ ความชื้น 95 % เป็นเวลา 5 นาที

2.2 ดูด PBS ออก แล้วเติม 0.25 % Trypsin/EDTA ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ CO<sub>2</sub> incubator 37 องศาเซลเซียสปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และ ความชื้น 95 % เป็นเวลา 5 นาที เคาะให้เซลล์หลุดออก แล้วนำไปดูภายใต้กล้อง

2.3 เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นดูดลงให้เข้ากัน

2.4 ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.5 เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน flask กลับล้างแล้วดูดใส่ใน microcentrifuge tube

2.6 นำ microcentrifuge tube บั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.7 ดูดส่วนใสทิ้งและเติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.8 แบ่งส่วนหนึ่งไปนับเซลล์และอีกส่วนนำไปถ่ายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง

## 3. ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ตั้งต้นเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ

3.1 นำ cell suspension ออกมา 100-200 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube ภายใต้สภาวะปราศจากเชื้อ

3.2 เติม PBS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เซลล์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และสี 0.4 % trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf ผสมให้เข้ากัน (dilution factor = 100/30)

3.3 ทำความสะอาด Hemocytometer และเติม cell suspension ลงใน chamber ทั้งสองข้าง ประมาณ 5-10 ไมโครลิตร และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10 เท่า นับในช่องนับเม็ดเลือดขาว (4 ช่อง)

3.4 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (มองเห็นสว่าง) และที่ไม่มีชีวิต ควรนับไม่ต่ำกว่า 200 cells เพื่อเพิ่มความถูกต้องของการนับเซลล์

3.5 คำนวณปริมาณของเซลล์ทั้งหมดเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

$$\text{จำนวนเซลล์ (cell/มิลลิลิตร)} = \text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ 1 ช่อง} \times 10^4 \times \text{Dilution factor}$$

3.6 คำนวณปริมาตรของ suspended cells ที่จะใส่ตั้งต้นเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์  $3 \times 10^4$  เซลล์ต่อพื้นที่ 2.0 ตารางเซนติเมตร ใน 24 well plate

#### 4. การเติมเซลล์ลงหลุม

4.1 ดูดเซลล์ใส่ในแต่ละหลุมจำนวน  $3 \times 10^4$  เซลล์ ตามปริมาตรที่คำนวณได้

4.2 นำไปบ่มที่ CO<sub>2</sub> incubator 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 5. การเตรียมแบคทีเรีย

5.1 แบคทีเรียดัชนี (indicator organism): *S. aureus* TISTR 517 และ *E. coli* TISTR 887)

5.1.1 นำแบคทีเรียดัชนีแต่ละชนิดจาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.2 นำไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.2 แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (test strain): *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), *L. plantarum* TISTR 050 (Lp), *L. plantarum* 1 T9 (T9) และ *E. faecium* N15 (N15)

5.2.1 ปิเปตต์เชื้อแต่ละสายพันธุ์จาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

5.2.2 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมาขีดบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

5.2.3 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมายืนยันเชื้อโดยการย้อมสีแบบแกรมและทำการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์อะลาเลส โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

5.2.4 แยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร. ในหลอดทดลองขนาด 16×100 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง

## 6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion assay

### 6.1 การเตรียมแบคทีเรียด้วยวิธี

6.1.1 นำโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวิธีที่บ่มเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH 1 วัน มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml)

6.1.2 ป้ายลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ด้วยสำลีพันก้านไม้ ปราศจากเชื้อตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

6.1.3 เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH 7 หลุม (หลุมควบคุม 1 หลุม และหลุมทดสอบ 6 หลุม) ด้วยทิวปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

### 6.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ

6.2.1 ดูดแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 5. มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) ใน 0.85% NaCl (sterile) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิตร (2% ของอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่)

6.2.2 นำสารแขวนลอยเชื้อที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิตร ใส่ในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 250 มิลลิตร โดยเลี้ยงเชื้อละ 4 ขวด จะได้ทั้งหมด 24 ขวด และอีก 4 ขวดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อทดสอบ (ใช้สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม) จะได้ทั้งหมดเป็น 28 ขวด บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

6.2.3 โดยในแต่ละวันให้ทำการแบ่งสารแขวนลอยจากขวด Duran ในข้อ 6.2.2) ออกมาขวดละ 1 มิลลิตร ลงในหลอด microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

6.2.4 แยกน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion assay ในข้อ 6.2.3 ต่อ โดยจะทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ ข้อ 3-4 ทุกๆ วันเป็นระยะเวลา 5 วัน

### 6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

6.3.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อและที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใส่ในหลุมปริมาตร 80 ไมโครลิตร

6.3.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ของเหลวซึมผ่านเข้าไปในเนื้อวุ้นจนหมดแล้วจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.3.3 สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี

## 7. การเตรียมเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

### 7.1 เมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

7.1.1 ดูดแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 5. มาปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน 0.85% NaCl (sterile) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร (2% ของอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่)

7.1.2 นำสารแขวนลอยเชื้อที่ปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร. ใส่ในขวด Duran ขนาด 250 ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 250 มิลลิลิตร. โดยเลี้ยงเชื้อละ 4 ขวด จะได้ทั้งหมด 24 ขวด และอีก 4 ขวดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (ใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS) จะได้ทั้งหมดเป็น 28 ขวด บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

7.1.3 เมื่อครบเวลาให้ทำการแบ่งสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดใส่ในหลอด centrifuge tube ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

7.1.5 จากนั้นนำน้ำส่วนใสมาแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน ส่วนหนึ่งไม่ปรับ pH คือมี pH เป็นกรดอีกส่วนหนึ่งนำไปปรับ pH ให้เป็นกลาง แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี lyophilization

### 7.2 Lyophilization

7.2.1 นำเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่เตรียมได้จาก ข้อ 7.1.5 ซึ่งมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร.

7.2.2 นำ flask ไปทำ pre-freeze แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

7.2.3 นำ flask ไปเข้าเครื่อง lyophilizer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการระเหิดแห้งจนกลายเป็นผง

7.2.4 นำผงเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้มาชั่งแล้วละลายด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 1 g/ml แล้วทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (BioRad)

7.2.5 เมื่อทราบปริมาณโปรตีนของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละตัวแล้วนำไปกรองผ่าน filter ขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร

7.2.6 นำเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 1 mg protein/ml และ 0.5 mg protein/ml และนำไปทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cells)

## 8. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (BioRad)

### 8.1 การเตรียม working solution

8.1.1 ผสม stock solution 10 มิลลิลิตร กับ deionized water (DI) 40 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:4)

8.1.2 นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ในตู้เย็นโดยไม่ให้โดนแสง

### 8.2 การเตรียม standard concentration

8.2.1 Standard ที่ใช้คือ bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.09 0.18 0.36 0.73 และ 1.45 mg protein/ml

8.2.2 คำนวณหาปริมาตรของ standard concentration จาก stock ความเข้มข้นเริ่มต้น 1.45 mg protein/ml โดยใช้สูตร  $M_1V_1 = M_2V_2$  โดย

$M_1$  คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของ BSA

$M_2$  คือ ความเข้มข้นของ BSA ที่ต้องการเตรียม standard

$V_1$  คือ ปริมาตรเริ่มต้นของ BSA

$V_2$  คือ ปริมาตรรวมทั้งหมดที่ต้องการใช้

| ปริมาตร BSA standa (1.45 mg protein/ml)<br>(ml) | น้ำกลั่น (ml) | ความเข้มข้นสุดท้าย<br>(mg protein/ml) |
|-------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 0.06                                            | 0.94          | 0.09                                  |
| 0.12                                            | 0.88          | 0.18                                  |
| 0.25                                            | 0.75          | 0.36                                  |
| 0.50                                            | 0.50          | 0.73                                  |
| 1.00                                            | -             | 1.45                                  |

### 8.3 การวัดปริมาณโปรตีน

8.3.1 ดูด standard หรือ sample ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ working solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

8.3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟและคำนวณเป็นความเข้มข้นของโปรตีนในหน่วย mg protein/ml

## 9. การทดสอบความเป็นพิษของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์มะเร็งลำไส้

9.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ lyophilization และกรองด้วยตัวกรอง (filter) แล้ว และเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่าน

การ lyophilization และกรองด้วย filter แล้วทั้งหมด 7 ตัวอย่างมาเจือจางแบบ two folds dilution ในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วผสมให้เข้ากัน โดยความเข้มข้นที่ต้องการ คือ 0.003 0.006 0.0125 และ 0.025 mg protein/ml

9.2 นำแต่ละค่าการเจือจางของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง โดยเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งอีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ PBS ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง (ปริมาตรของ PBS ที่ใช้เท่ากับปริมาตรของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง) และกลุ่มที่ใช้อาหาร DMEM:Ham's F12 ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

9.3 นำไปบ่มใน CO<sub>2</sub>-incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.4 เตรียม 0.5 mg/ml ของ MTT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณที่มากและนานเนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

9.5 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสมเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไป 1,000 ไมโครลิตร

9.6 นำไปบ่มใน CO<sub>2</sub>-incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.7 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 0.5 mg/ml MTT ที่ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 500 ไมโครลิตร

9.8 นำไปบ่มใน CO<sub>2</sub>-incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมตาบอไลต์

9.9 เมื่อครบเวลาเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกไป แล้วคว่ำ 24 well plate ลงบนกระดาษซับเพื่อเอาอาหารที่เหลือออก

9.10 เติม 1,000 ไมโครลิตร ของ DMSO เพื่อไปละลาย formazan (MTT metabolic product) ออกมา แล้วผสม formazan ที่ออกมากับ DMSO ให้เข้ากัน

9.11 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm. แล้วหักลบค่าที่ได้จากการดูดกลืนแสงที่ 670 nm. ทำการทดสอบ 2 ครั้งโดยมีการทำซ้ำครั้งละ 2 การทดสอบย่อย

## II. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี Cravioto's adapted method

### 1. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

1.1 นำแบคทีเรียทดสอบมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm/นาที เป็นเวลา 10 นาที

1.2 เทส่วนใสที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

1.3 ปั่นล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย Cold – PBS ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm/นาที เป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง

1.4 แบ่งสารแขวนลอยเชื้อจากข้อ 1.3 มาปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) ด้วย PBS

1.5 หลังจากนั้นเติม DMEM: Ham's F12 ซึ่งมี 10 % FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะลงไป เพื่อปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml

## 2. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยง Caco-2 cells (passage number 34-52) เลี้ยง Caco-2 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM:Ham's F12 ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% fetal bovine serum, 1 % penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% โดยมีจำนวนเซลล์  $5 \times 10^5$  เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีพื้นที่ 21 cm<sup>2</sup>

2.2 เลี้ยงไว้ 3 วันหรือจนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ประมาณ 80 - 90 %) ก่อนที่จะทำการทดสอบความสามารถในการเกาะติดเซลล์มะเร็งลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี Cravioto's adapted method

## 3. ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการเกาะติดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (adhesion) กับเซลล์มะเร็งลำไส้

3.1 นำเซลล์ที่เตรียมจากข้อ 2 ไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS

3.2 เติม 2 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM: Ham's F12 ซึ่งมี 10 % FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะ

3.3 เติม 1 มิลลิลิตร ของเซลล์แบคทีเรียที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียได้  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml ลงในเซลล์

3.4 บ่มไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.5 เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง

3.6 Fix เซลล์ด้วย cold – ethanol แล้วย้อมด้วยสี Giemsa อัตราส่วน 1:20 (ละลายใน PBS) ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

3.7 ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.8 ศึกษาดูการเกาะติดของแบคทีเรียกับเซลล์มะเร็งลำไส้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการสุ่มนับทั้งหมด 20 fields แล้วทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ซึ่งมีเกณฑ์กำหนดดังนี้คือ

Non adhesive : พบการเกาะติดของแบคทีเรีย < 40 เซลล์ / 20 fields

Adhesive : พบการเกาะติดของแบคทีเรีย 40 – 100 เซลล์ / 20 fields

Strongly adhesive : พบการเกาะติดของแบคทีเรีย > 100 เซลล์ / 20 fields

### III. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส

#### 1. ขั้นตอนการเตรียมแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

1.1 นำแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 จาก 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2 นำโคโลนีที่ปรากฏขึ้นในข้อ 1.1) มายืนยันความถูกต้องของเชื้อ โดยการย้อมสีแบบแกรม ควรติดสีแกรมบวก รูปท่อนและย้อมสีสปอร์ควรติดสีเขียวของ malachite green

1.3 เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25x150 มิลลิเมตร ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.4 ดูดเชื้อจากข้อ 1.3 มา 4 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด และอีก 10 ขวด ไม่เติมเชื้อ บ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5 แบ่งสารแขวนลอยเชื้อในข้อ 1.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube

1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

1.7 นำส่วนใสที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 ด้วยวิธี agar well diffusion

1.8 ทำซ้ำข้อ 1.5–1.7) ทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน จนกว่าจะเกิดฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517

#### 2. การเตรียมแบคทีเรียตัวชี้ *S. aureus* TISTR 517

2.1 ขีด *S. aureus* TISTR 517 ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.2 นำไปย้อมสีแบบแกรม เพื่อศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเซลล์ควมมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวคล้ายพวงอุ้งน

2.3 นำแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามสภาวะในข้อ 1) มาปรับเทียบความขุ่น เท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  Colony Forming Unit/ml)

2.4 ป้ายสารแขวนลอยเชื้อในข้อ 1.3) ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA ด้วยสำลีพันก้านไม่ปราศจากเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

2.5 เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 หลุม (หลุมควบคุมและหลุมทดสอบ) ด้วยทิวปปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 517 ด้วยวิธี agar well diffusion

3.1 หยอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ใส่ลงในหลุมควบคุม และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่บ่มเลี้ยงเชื้อจนเกิดฤทธิ์ยับยั้งมาหยอดในหลุมทดสอบ

3.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารผ่านเข้าเนื้อวุ้นจนหมด แล้วจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมที่เติมสารทดสอบ

4. ขั้นตอนการเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth)

4.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 แล้วมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.2 นำน้ำส่วนใสไปตกตะกอนโปรตีนชีวสาร ด้วย 80% ammonium sulfate

5. ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14

5.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน มาทำการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ดังนี้

5.2 นำสารละลายในข้อ 5.1 ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

5.3 ตกอนมาละลายด้วย PBS โดยเติมครั้งละ 1 มิลลิลิตร จนตกอนละลายหมด

6. ขั้นตอนการทำ dialysis

6.1 ใส่สารละลายโปรตีนชีวสารในข้อ 5.3) ลงในถุง dialysis ที่มีขนาดรูผ่าน 3.5 กิโลดาลตันที่เปียกชุ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมกวนเบาๆ ตลอดเวลา

6.2 เปลี่ยน PBS ทุกๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 3 ครั้ง จากนั้นวางแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน PBS พร้อมกวนตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.3 นำสารละลายในถุง dialysis ปั่นเหวี่ยงที่ refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

6.4 แยกส่วนใสออกเพื่อนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ทดสอบวัดปริมาณโปรตีนของชีวสารด้วยวิธี Bradford

7. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ human oral squamous carcinoma (CLS-354 cells)

7.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้อาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมด้วย fetal bovine serum ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (final concentration 10% v/v), 200 มิลลิโมลาร์ ของ glutamine ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (final concentration 2 มิลลิโมลาร์ ) และ 100 หน่วย penicillin/streptomycin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (final concentration 1 หน่วย)

7.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเตรียม flask ที่มีพื้นที่ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 7.1) จำนวน 10-12 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์มะเร็งช่องปากประมาณ  $1 \times 10^6$  cells ใส่ลงในอาหาร แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและความชื้น 95% เลี้ยงไว้ 24-48 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ

#### 8. ขั้นตอนการทำ MTT

8.1 เตรียมเซลล์มะเร็งช่องปาก จำนวน  $1 \times 10^5$  cells/well ทำการเพาะเลี้ยงใน 24 well plate บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8.2 เตรียม MTT 0.5 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมให้เข้ากัน ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณที่มากและนานเนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

8.3 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลท์

8.4 เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกให้หมด (ดูดออกเบา ๆ เพื่อไม่ให้เซลล์ฟุ้งกระจายขึ้นมา)

8.5 เติม 1,000 ไมโครลิตร ของ DMSO เพื่อไปละลาย formazan ออกมา แล้วผสมให้เข้ากัน

8.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm แล้วหักลบค่าที่ได้ออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 670 nm

#### 9. ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์และเตรียมเซลล์

9.1 ภายใต้อุณหภูมิปราศจากเชื้อ นำเซลล์มะเร็งช่องปากมา 20 ไมโครลิตร เติมลงใน PBS 70 ไมโครลิตร

9.2 เติม 0.4 % trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมโดยการปิเปตเบา ๆ

9.3 ทำความสะอาด Hemocytometer และ cover slip

9.4 นำ cover slip วางไว้บน chamber

9.5 เติม cell suspension ลงใน chamber ทั้งสองข้าง ประมาณ 5-10 ไมโครลิตร และส่องภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 20 เท่า

9.6 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (มองเห็นสว่าง) และที่ไม่มีชีวิต (ถูกย้อมให้เป็นสีน้ำเงิน ประมาณ 200-300 cells ใน 4 ช่องนับเม็ดเลือดขาว)

9.7 คำนวณปริมาตรของ suspended cells เพื่อให้มีจำนวนเซลล์  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อพื้นที่ 1.88 ตารางเซนติเมตร (24-well plate) แล้วเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหลุมละ 500 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 %

9.8 เมื่อครบเวลานับอาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารใหม่ที่ผสมกับชีวสารจาก *Brev. leterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.9 เก็บเซลล์ที่เหลือรอดจากการทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจาก *Brev. leterosporus* SA14 แล้วนำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์

9.10 เก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ ยีน *Bcl-2* และยีน *p21* โดยวิธี RT-PCR

#### 10. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* โดยวิธี Real Time PCR

10.1 ขั้นตอนการเตรียม Total RNA จากเซลล์มะเร็งช่องปากที่ถูกทดสอบด้วยชีวสาร โดยใช้ RNeasy Minikit (Qiagen, Germany)

10.2 นำเซลล์มะเร็งช่องปากที่มีปริมาณ  $3 - 4 \times 10^6$  เซลล์ มาสกัด RNA

10.3 เติม Buffer RLT 350 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ  $\beta$ -Mercaptoethanol 3.5 ไมโครลิตรแล้วเพื่อให้เซลล์แตก หลังจากนั้นผสมเซลล์กับน้ำยาให้เข้ากัน ปิเปตส่วนผสมกับเซลล์ลงใน QIA shredder spin column ที่สวมอยู่ข้างบนหลอด collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,300 รอบต่อนาที (full speed) เป็นเวลา 2 นาที

10.4 ตั้ง QIA shredder spin column ส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม 70% ethanol ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในส่วนผสมในหลอด collection tube ด้านล่างเพื่อตกตะกอน RNA แล้วผสมให้เข้ากัน (ระวังอย่าให้เกิดฟอง)

10.5 ปิเปตส่วนผสมจากข้อ 1.3) มาใส่ลงใน RNeasy spin column ที่สวมอยู่ข้างบนหลอด collection tube อันใหม่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

10.6 จากขั้นตอนที่ 4 RNA จะติดอยู่บน RNeasy spin column แล้วปิเปตของเหลวส่วนล่างที่กั้นหลอด collection tube ทิ้งไป

10.7 นำ RNeasy spin column ซึ่งมี RNA อยู่สวมเข้ากับ collection tube อันเก่าจากขั้นตอนที่ 5 หลังจากนั้นเติม RW1 buffer ลงไป 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

10.8 นำ RNeasy spin column ส่วนบนออก แล้วปิเปตของเหลวส่วนล่างที่กั้นหลอด collection tube ทิ้งไป

10.9 เติม buffer RPE ที่ผสมกับ absolute ethanol แล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไป จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที

10.10 ทำซ้ำเหมือนกับข้อ 10.8) 2 ครั้ง และครั้งสุดท้ายใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง 2 นาที

10.11 นำ RNeasy spin column ส่วนบนออก มาใส่ใน collection tube อันใหม่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,300 รอบต่อนาที (full speed) เป็นเวลา 1 นาที

10.12 นำ RNeasy spin column ส่วนบนออกมาใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RNase-free water ลงไป 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ก็จะได้ Total RNA

10.13 ทำการวัดปริมาณ RNA โดยเจือจาง RNA ด้วย RNase-free water ในสัดส่วน 1:10 (RNA 1 ไมโครลิตร: RNase-free water 9 ไมโครลิตร) แล้วจึงนำไปวัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Thermo scientific NANODROP 1000 Spectrophotometer) จากนั้นก็นำ RNA ที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

#### 11. ขั้นตอนการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA

11.1 เตรียม master mix โดยแต่ละตัวอย่างมีปริมาณ RNA 10 ไมโครกรัม ดังตารางที่ 1

11.2 นำไปป้อนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

11.3 ทำการวัดปริมาณ cDNA โดยเจือจาง cDNA ด้วย RNase-free water ในสัดส่วน 1:10 (cDNA 1 ไมโครลิตร: RNase-free water 9 ไมโครลิตร) ที่ได้ไปวัดปริมาณในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Thermo scientific NANODROP 1000 Spectrophotometer) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

| ส่วนประกอบ                                           | ปริมาตร      | ความเข้มข้นสุดท้าย                   |
|------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| 10 เท่า Buffer RT                                    | 2.0 $\mu$ l  | 1 เท่า                               |
| dNTP Mix (5 mM each dNTP)                            | 2.0 $\mu$ l  | 0.5 mM each dNTP                     |
| Oligo-dT primer (10 $\mu$ M)                         | 2.0 $\mu$ l  | 1.0 $\mu$ l                          |
| RNase inhibitor (10 units/ $\mu$ l)                  | 1.0 $\mu$ l  | 0.5 units (per 20- $\mu$ l reaction) |
| Omniscrypt Reverse Transcriptase (40 units/ $\mu$ l) | 1.0 $\mu$ l  | 2 units (per 20- $\mu$ l reaction)   |
| RNase-free water                                     | Variable     |                                      |
| Template RNA                                         | Variable     |                                      |
| ปริมาตรรวม                                           | 20.0 $\mu$ l |                                      |

#### 12. ขั้นตอนการทำ RT-PCR โดยวิธี TaqMan Gene Expression Assay

12.1 เตรียม master mix โดยใช้ส่วนผสมต่างๆ คือ 1.1) 20 เท่า TaqMan Universal PCR ที่มี probe และ primers สำหรับยีน *Bcl-2* ยีน *p21* หรือ ยีน  $\beta$ -actin 1.2) 2 เท่า TaqMan® Gene Expression Master Mix และ 3) DNase free water ดังตารางที่ 2

12.2 ผสมส่วนผสมในข้อ 12.1) ให้เข้ากันแล้วเติมลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate

12.3 เติม cDNA 1  $\mu$ l ลงในแต่ละหลุมทดสอบที่มี master mix ของแต่ละยีนอยู่แล้ว

12.4 นำส่วนผสมดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* เปรียบเทียบกับยีน  $\beta$ -actin โดยใช้เครื่อง Real Time PCR จากบริษัท Applied Biosystems รุ่น 7300

| ส่วนประกอบในการทำ PCR                                                                        | ปริมาตร      | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| 20 เท่า TaqMan® Gene Expression Assay สำหรับยีน <i>Bcl-2</i> , <i>p21</i> และ $\beta$ -actin | 1.0 $\mu$ l  | 1 เท่า             |
| 2 เท่า TaqMan® Gene Expression Master Mix                                                    | 10.0 $\mu$ l | 1 เท่า             |
| cDNA template (500 ng/ $\mu$ l)                                                              | 1.0 $\mu$ l  | 500 ng             |
| DNase-free water                                                                             | 8.0 $\mu$ l  |                    |
| ปริมาตรรวม                                                                                   | 20.0 $\mu$ l |                    |

### 13. ขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน phosphor-ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2

13.1 นำตะกอนเซลล์มะเร็งช่องปากซึ่งทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 มาทำให้เซลล์แตกโดยวิธี sonication ใน buffer ซึ่งประกอบด้วย 150 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM PMSF (Calbiochem, Germany), 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Calbiochem, Germany), 0.01 M NaF, 0.014 mM chymostatin (Calbiochem, Germany), 99.3 KU/ml aprotinin (Calbiochem, Germany) และ 0.01 mg/ml pepstatin A (Calbiochem, Germany)

13.2 นำ cell lysate ที่ได้ไปปั่นที่ 10000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatants ส่วนบนไปวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford

13.3 นำ 80 ไมโครกรัม ของโปรตีนจากข้อ 13.2 มาละลายใน 2 เท่าของ Laemmli sample buffer (BioRad, USA) แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13.4 นำโปรตีนที่เตรียมจากข้อ 13.3 ไปแยกแถบของโปรตีนพร้อมด้วย positive control [(p44/42 MAPK (Erk1/2) Control Cell Extracts)] (Cell Signaling Technology, USA) โดยวิธี SDS/PAGE electrophoresis โดยใช้ 10% polyacrylamide gel (BioRad, USA)

13.5 นำโปรตีนซึ่งถูกแยกแล้วใน gel ตามข้อ 13.4 ถ่ายลงบน PVDF membrane (BioRad, USA)

13.6 หลังจากนั้นให้ทำการ block แผ่น membranes ด้วย 5% non fat dry milk (BioRad, USA) ที่เตรียมใน 1XTBST ซึ่งมีองค์ประกอบ คือ 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 137 mM NaCl และ 0.1% Tween 20 (Biochemica, Germany) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

13.7 ล้างแผ่น membranes ด้วย 1 เท่าของ TBST buffer หลังจากนั้นบ่มด้วย anti-ERK1/2 (1:5000) (Cell Signaling Technology, USA) ที่เตรียมใน 5% bovine serum albumin (BioRad, USA) ใน 1 เท่าของ TBST ส่วน anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, USA) (1:1000) ให้เตรียมใน 5% BSA ใน 2 เท่าของ TBST ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ internal control ใช้ anti  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology, USA) (1:5000) เตรียมใน 5% BSA ใน 1 เท่าของ TBST ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13.8 หลังจากนั้นให้ล้างแผ่น membranes แล้วบ่มต่อด้วย secondary antibody (Cell Signaling Technology, USA) (1:5000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างแผ่น PVDF membranes ด้วย 1 เท่าของ TBST

13.9 ตรวจหาแถบของโปรตีนด้วยระบบ ECL plus (Amersham, UK) โดยใช้แผ่น Hyperfilm (Amersham, UK)

13.10 นำแผ่น PVDF membranes เดิมมา strip แล้วทำการทดสอบกับแอนติบอดีตัวต่อไป

#### IV. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส

##### 1. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT

1.1 เลี้ยงเซลล์ HaCaT (p40-46) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % โดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ  $5 \times 10^6$  เซลล์ ใน culture flask ซึ่งมี พื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงไว้ 24-48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบต่าง ๆ

1.2 เลี้ยงไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ

##### 2. ขั้นตอนการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT โดยโปรตีนชีวสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.1 นำชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA 14 ที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนเช่นเดียวกันมาเจือจางแบบ two fold dilution

2.2 นำแต่ละการเจือจางมาทดสอบกับเซลล์ผิวหนัง HaCaT

2.3 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay

2.4 หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อสารในข้อที่ 2.3) แล้วจึงเตรียม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ MTT ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่ควรเตรียมไว้ในปริมาณที่มากและนาน เนื่องจากสารไม่มีความคงตัว

2.5 เอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 500 ไมโครลิตร ของ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ MTT ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลท์

2.6 เมื่อครบเวลา เอาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกไป แล้วคว่ำ plate ลงบนกระดาษซับ เพื่อเอาอาหารที่เหลือออกให้หมด

2.7 เติม 1000 ไมโครลิตรของ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ออกมา แล้วผสม formazan ที่ออกมากับ DMSO ให้เข้ากัน

2.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร แล้วหักลบค่าที่ได้ออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 670 นาโนเมตร

2.9 ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยมีการทำซ้ำครั้งละ 2 การทดสอบ

3. ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการสมานแผลโดยศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ที่ทดสอบด้วยเชื้อสารจาก *Brev. laterosporus* SA14

3.1 ทำการแยกเซลล์ (trypsinization) HaCaT

3.2 เติมเซลล์ลงไปให้มีปริมาณ  $3 \times 10^5$  cells ต่อ 1 culture dish โดยใช้ culture disk ซึ่งมีพื้นที่ 21 ตารางเซนติเมตร บ่มเลี้ยงไว้จนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ซึ่งมีองค์ประกอบของ 10% FBS 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% และความชื้น 95 % โดยจะเตรียมไว้ทั้งหมด 20 culture dish

3.3 เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเต็มพื้นที่ (100% confluency) ให้เปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็น DMEM และ 1% penicillin/streptomycin และเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 เมื่อครบเวลาใช้ micropipette tip ขูดเซลล์ออกให้มีพื้นที่ว่าง

3.5 ล้างเซลล์ด้วย PBS 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่ขูดหลุดออกมา

3.6 แบ่ง culture dish ออกเป็น 2 การทดสอบ สำหรับการทดสอบที่ 1 มี 10 culture dish เติม DMEM ที่มีองค์ประกอบของ 2% FBS และ 1% penicillin/streptomycin และชุดการทดสอบที่ 2 เติม DMEM ที่มี 10% FBS 1% penicillin/streptomycin แล้วบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายภาพเซลล์ทั้ง 2 ชุดการทดสอบ

3.8 เติมเชื้อสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ลงไปใน culture dish ของทั้ง 2 ชุดการทดสอบ สำหรับกลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อและ PBS ส่วน Allantoin ใช้เป็น positive control

3.9 สังเกตการเคลื่อนที่ของเซลล์พร้อมถ่ายภาพเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่ได้ขูดเซลล์ออก เมื่อเวลา 30 นาที 3 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง โดยมีข้อกำหนดในการเลือกบริเวณที่ถ่ายภาพคือ ต้องเป็นบริเวณที่มี cell debris อยู่ในบริเวณพื้นที่ ที่ขูดเซลล์ออกอยู่น้อย เลือกบริเวณที่ขอบเซลล์เรียบตรงและมองเห็นได้ชัดเจน และ เลือกบริเวณที่มองเห็นขอบทั้งสองด้านของเซลล์เมื่อดูด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า เลนส์ใกล้ตา 100 เท่า

## V. ศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซีทต่อเซลล์มะเร็ง

### 1. การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp.

1.1 นำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาขีดลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนีและนำไปย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2 นำเชื้อจากข้อ 1.1 ส่วนหนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นนำมาเก็บใน glycerol 15 % ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

### 2. การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ในรูป crude proteins

2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-7 วันแล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

2.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำให้เข้มข้นในรูปผงโดยใช้วิธี Lyophilization

2.3 นำผงที่ได้มาละลายด้วย PBS ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เพื่อนำไปทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT ต่อไป

## VI. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

### 1. การเตรียมแบคทีเรีย

1.1 แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (test strain): *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp)

1.2 ปิเปตต์เชื้อแต่ละสายพันธุ์จาก stock 15% glycerol ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

1.3 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมาขีดบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5 % (candle jar) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งปรากฏโคโลนีให้เห็น

1.4 นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏขึ้นมายืนยันเชื้อโดยการย้อมสีแบบแกรมและทำการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นด้วยการนำไปทดสอบเอนไซม์อะตาเลส โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

1.5 แยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16×100 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.6 เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง โดยปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง

1.7 ล้างสองครั้งโดยเติม PBS 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุดแล้วเติม PBS 1 มิลลิลิตร

## 2. การทดสอบหาเวลาและปริมาณแบคทีเรียที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยแสงยูวี

2.1 นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No.0.5 ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 4 หลอด

2.2 นำไปเทบนจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 1 จาน เปิดฝา วางภายใต้แสงยูวี 15, 30, 45, และ 60 นาที

2.3 เมื่อครบเวลาปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากจานเพาะเชื้อใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด

2.4 ปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อทดสอบการตายของเชื้อ

2.5 ทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมโดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้อ 1.7 มาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No. 0.5 ปรับจำนวนให้ได้ปริมาณเชื้อ 7.5×10<sup>8</sup>, 10×10<sup>8</sup>, 15×10<sup>8</sup> และ 20×10<sup>8</sup> CFU

2.6 นำไปเทบนจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 1 จาน เปิดฝาวางภายใต้แสงยูวี 15 นาที

2.7 เมื่อครบเวลาปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากจานเพาะเชื้อ ใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด

2.8 ปิเปิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO<sub>2</sub> 5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อทดสอบการตายของเชื้อ

2.9 เมื่อได้เวลาและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมคือเวลา 15 นาที ปริมาณเชื้อ  $20 \times 10^8$  CFU แล้วเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบในขั้นต่อไปโดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS มาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No.1 ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด 7 หลอด เทบนจานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ 1 จานเปิดฝาวางภายใต้แสงยูวี 15 นาที

2.10 เมื่อครบเวลาปิเปตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากจานเพาะเชื้อ ใส่ในหลอดใหม่ นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเขย่าหลอดด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด เติมน้ำ PBS 3 มิลลิลิตร

2.11 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี  $\text{CO}_2$  5% (candle jar) เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อทดสอบการตายของเชื้อ

2.12 ปรับปริมาณเชื้อโดยเทียบกับ MacFarland No.0.5 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) แล้วใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.13 นำไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าด้วย vortex ให้ตะกอนเซลล์หลุด เติมน้ำ PBS 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการกระตุ้นเซลล์

### 3. การเตรียม peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

3.1 นำเลือดครบส่วน 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด conical centrifuge tube นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 15 นาที เลือดจะแยกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนเม็ดเลือดแดง และส่วนพลาสมา ใช้ pasture pipette ดูดส่วนพลาสมาทิ้ง ระวังกายาดูดเอาชั้นเม็ดเลือดขาวออกไป

3.2 เติมน้ำ PBS ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอยู่ในหลอดผสมเลือด ด้วย pasture pipette หรือปิเปตหลอด แล้วผสมโดยการกลับหลอดทดลอง 3-4 ครั้ง ให้ผสมกันดี

3.3 ดูดน้ำยา Ficoll-hypaque ใส่หลอดทดลองกันแหลมมีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร ใช้ pasture pipette ดูดเลือดที่เจือจางแล้วค่อยๆ ปลอ่ย (overlay) ลงบนชั้นของน้ำยา Ficoll-hypaque ระวังกายาให้เลือดผสมกับน้ำยา อัตราส่วนของเลือด: น้ำยา Ficoll-hypaque เท่ากับ 2:1

3.4 ปิดฝาแล้วนำหลอดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm นาน 30 นาที โดยปรับปุ่ม Breaker ของเครื่อง centrifuge ไปที่ off เพื่อให้เครื่องค่อยๆ ลดความเร็วเมื่อครบเวลา

3.5 ใช้ pasture pipette ดูดเอาชั้นของ mononuclear cell ใส่ในหลอดใหม่ ระวังกายา ดูดเอาส่วนชั้นของน้ำยา Ficoll-hypaque

3.6 ล้างเซลล์โดยเติม PBS ลงไปในหลอดให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 rpm นาน 12 นาที ครบเวลาแล้วเทน้ำส่วนบนทิ้ง แล้วเขย่าหลอดทดลองด้วย vortex mixer

3.7 ล้างอีก 3 ครั้งด้วย 10 มิลลิลิตร PBS เช่นเดียวกับข้อ 3.6

3.8 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบครบ (RPMI 1640 with L-glutamine, penicillin/streptomycin, 10% fetal calf serum) ลงไปในหลอด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.04% Trypan blue 90 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ใช้ automatic pipette ดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer

3.9 คำนวณเซลล์ที่นับได้ เท่ากับ  $(N \times 10) / 0.1 \times$  จำนวนช่องเม็ดเลือดขาว ปรับปริมาณเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบครบ ให้มีปริมาณเซลล์  $1 \times 10^7$  cells/ml

#### 4. การกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์เซลล์ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1 เตรียมหลอดทดลองพลาสติกปราศจากเชื้อและมีฝาปิด ขนาด 12x75 มิลลิเมตร ใส่เซลล์ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองทุกหลอด จำนวนเซลล์หลอดละ  $1 \times 10^6$  cells

4.2 ในหลอดที่ 1 เป็น isotype control หลอดที่ 2, 3 เป็น negative และ positive control โดยเติม LPS 0.5 ไมโครกรัม ตามลำดับ ในหลอดที่ 4, 5 และ 6 เติมเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน  $1 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  และ  $100 \times 10^6$  CFU ตามลำดับ

4.3 ปรับปริมาตรทุกหลอดให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบครบ

4.4 ปิดฝาและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปั่นที่ 1,200 rpm นาน 6 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด

4.5 นำไปปั่นที่ 1,200 rpm นาน 6 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งนำเซลล์ที่ได้ไปย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อวัด maturation marker และ activation marker

#### 5. การย้อมเซลล์และการวัดด้วยฟลูออโรไซโตมิเตอร์

5.1 เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดละ 5 ไมโครลิตร สำหรับการวัด CD69 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี PerCP-conjugated anti-CD69, PerCP-anti-mouse IgG1 (isotype control) ใส่ในหลอดทดลอง สำหรับการวัด CD86 /CD80 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังนี้ FITC-conjugated anti-CD1c (BDCA-1), PerCP-conjugated anti-CD14/19, PE-conjugated anti-CD80, PE-conjugated anti-CD86 และ PE-anti-mouse IgG1 (isotype control)

5.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 20 นาที แล้วล้าง 1 ครั้งด้วย PBS 2 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 1200 rpm นาน 6 นาที เทส่วนใสทิ้ง

5.3 เติม 1% paraformaldehyde 500 ไมโครลิตร นำไปวัดด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เมื่อนำอาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์นม มา หั่นเป็นชิ้นๆ แล้ว ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถ เจริญในทุก plate ยกเว้นจากตัวอย่างหัวผักกาดเค็มและเลือกโคโลนีที่มีลักษณะขาวขุ่น กลมมน ขอบเรียบ และย้อมสีแกรมได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ซึ่งสามารถสุม เลือกได้มาทั้งหมด 76 โคโลนี แต่ทั้งหมดไม่สามารถแสดงฤทธิ์ antimicrobial ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลตและฤทธิ์ด้านการเจริญ indicating strains โดยวิธีซีดเชื้อ

| ผลิตภัณฑ์อาหาร | จำนวน<br>โคโลนี | ชื่อ           | antimicrobial activity |
|----------------|-----------------|----------------|------------------------|
| ขนมจีน         | 10              | ขนมจีน A- J    | ND                     |
| ข้าวหมาก       | 8               | ข้าวหมาก A-H   | ND                     |
| กะปิ           | 4               | กะปิ A-D       | ND                     |
| กุ้งสับ        | 6               | กุ้งสับ A- F   | ND                     |
| ไตปลา          | 3               | ไตปลา A-C      | ND                     |
| ปลาร้า         | 3               | ปลาร้า A-C     | ND                     |
| ปลา            | 9               | ปลา A-I        | ND                     |
| หมู            | 3               | หมู A-C        | ND                     |
| แหนมปลา        | 8               | แหนมปลา A-H    | ND                     |
| แหนมหมู        | 4               | แหนมหมู A-D    | ND                     |
| แหนมไก่        | 2               | แหนมไก่ A-B    | ND                     |
| ผักกาดดอง      | 4               | ผักกาดดอง A-D  | ND                     |
| หน่อไม้ดอง     | 3               | หน่อไม้ดอง A-C | ND                     |
| กะหล่ำปลี      | 3               | กะหล่ำปลี A-C  | ND                     |
| มะม่วงสุก      | 3               | มะม่วงสุก A-C  | ND                     |
| นมเปรี้ยว      | 3               | นมเปรี้ยว A-C  | ND                     |

ND, ไม่สามารถบันทึกผลได้เนื่องจาก indicating strains ไม่เจริญ

หลังจากนั้นคัดเลือกเชื้อจากทั้ง 76 โคโลนี โดยสังเกตจากลักษณะทาง Macroscopic และดูการเจริญของ โคโลนีมาทดสอบ ซึ่งให้ผล catalase test เป็น Negative, Gram strain เป็น Positive bacilli , non-spore forming และ เลือก โคโลนีที่เจริญดีและให้ลักษณะที่ชัดเจน เลือก มา 10 โคโลนี มาทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (Colonization) ผลการทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (Colonization) ให้ผล negative ทั้งหมด

นำส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ 3 ชนิด คือ *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยวัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น ปรากฏว่า *B. subtilis* ให้ inhibition zone เกิดขึ้นจากส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างทุกไอโซเลท ส่วน *E. coli* ให้ inhibition zone เกิดขึ้นจากส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากແໜ່ມປລາ G และ *S. aureus* ให้ inhibition zone เกิดขึ้นจากส่วนใสของเชื้อที่แยกได้จากແໜ່ມປລາ A กับ E แต่เมื่อปรับ pH ของส่วนใสให้เป็นกลางปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ตัวอื่นหลงเหลืออยู่ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Antimicrobial activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

| น้ำเลี้ยงเชื้อ      | pH<br>ที่<br>48 ชั่วโมง | วงใสของการยับยั้ง ( เซนติเมตร) |      |                    |      |                  |      |
|---------------------|-------------------------|--------------------------------|------|--------------------|------|------------------|------|
|                     |                         | <i>E. coli</i>                 |      | <i>B. subtilis</i> |      | <i>S. aureus</i> |      |
|                     |                         | ก่อน                           | หลัง | ก่อน               | หลัง | ก่อน             | หลัง |
| Control (MRS)       | 6.49                    | 0                              | 0    | 0                  | 0    | 0                | 0    |
| <i>L. plantarum</i> | 3.76                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໜ່ມປລາ A           | 3.79                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 1.2              | 0    |
| ແໜ່ມປລາ B           | 3.87                    | 0                              | 0    | 1.0                | 0    | 0                | 0    |
| ແໜ່ມປລາ C           | 3.88                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໜ່ມປລາ D           | 3.78                    | 0                              | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໜ່ມປລາ E           | 3.70                    | 0                              | 0    | 1.4                | 0    | 1.2              | 0    |
| ແໜ່ມປລາ F           | 3.87                    | 0                              | 0    | 1.0                | 0    | 0                | 0    |
| ແໜ່ມປລາ G           | 3.72                    | 1.2                            | 0    | 1.2                | 0    | 0                | 0    |
| ແໜ່ມ ຫູ ຕູ C        | 4.34                    | 0                              | 0    | 0.9                | 0    | 0                | 0    |
| ກະລໍ່າປລີ B         | 4.31                    | 0                              | 0    | 0.9                | 0    | 0                | 0    |
| ຢາຄູລຢ໌ A           | 3.68                    | 0                              | 0    | 1.5                | 0    | 0                | 0    |

indicating strains ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (TISTR 008), *Escherichia coli* ATCC 25922 (TISTR 887), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (TISTR 517)

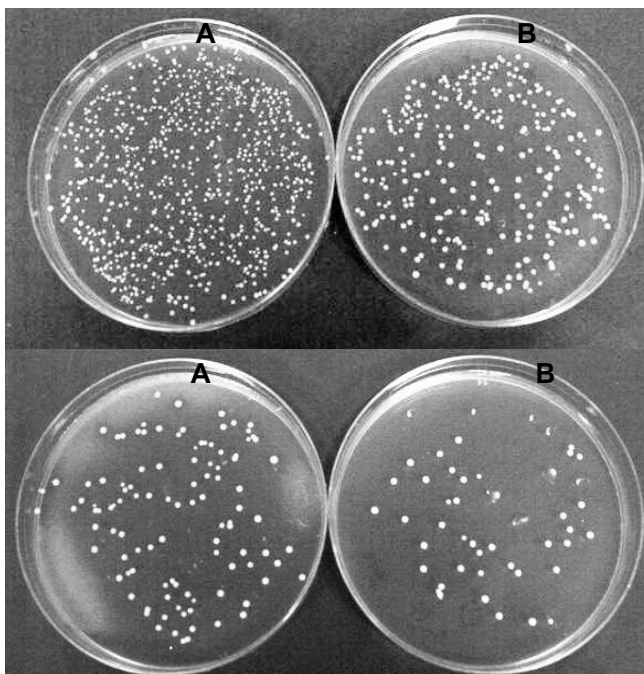
ก่อน, ก่อนปรับ pH; หลัง, หลังปรับ pH

## II. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV

จากการนำเชื้อ *L. plantarum* มาปรับปรุงพันธุ์โดยผ่านแสง UV 10 นาที และทำการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* พบว่าเชื้อจะมีจำนวนลดลง (รูปที่ 1) และยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ดีขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 1

ตารางที่ 3 ผลการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ UV

| ลักษณะที่สังเกตได้            | ก่อนผ่าน UV |           | หลังผ่าน UV |           |
|-------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|                               | ความเจือจาง |           | ความเจือจาง |           |
|                               | $10^{-6}$   | $10^{-7}$ | $10^{-6}$   | $10^{-7}$ |
| จำนวนโคโลนี                   | 408         | 240       | 53          | 45        |
| ขนาดโคโลนี                    | 0.05-0.30   |           | 0.20-0.30   |           |
| ผลการยับยั้ง                  |             |           |             |           |
| <i>Candida albicans</i>       | 0.8-1.0     |           | 1.0-1.2     |           |
| [วัดจาก inhibition zone (cm)] |             |           |             |           |



**A** – *L. plantarum* ที่ไม่ได้ผ่านการส่องด้วย UV ที่ความเจือจาง  $10^{-7}$

**B** – *L. plantarum* ที่ผ่านการส่องด้วยแสง UV ที่ ความ เจือจาง  $10^{-7}$

**ก**

**A** – *L. plantarum* ที่ไม่ได้ผ่านการส่องด้วย UV ที่ความเจือจาง  $10^{-8}$

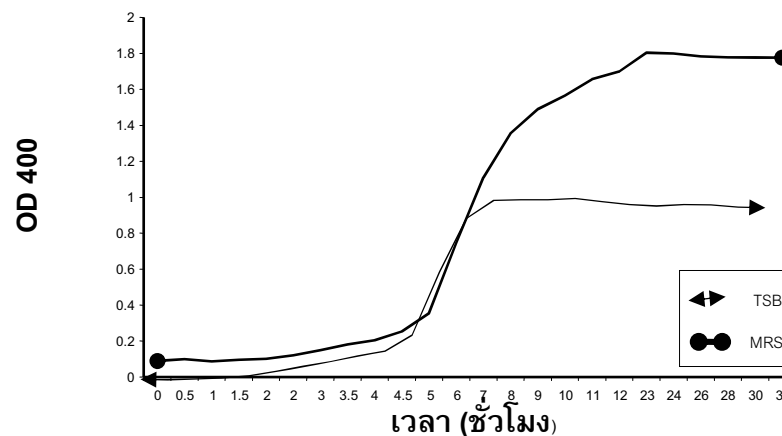
**B** – *L. plantarum* ที่ผ่านการส่องด้วยแสง UV ที่ความเจือจาง  $10^{-8}$

**ข**

รูปที่ 1 ปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเจือจาง  $10^{-7}$  (ก) และ  $10^{-8}$  (ข) ก่อนและหลังการผ่าน UV

### III. ผลการทดสอบการถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แลคโตบาซิลลัส

ผลการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ใน TSB และ MRS ที่อุณหภูมิ 37°C ใน shaking incubator เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า *L. plantarum* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ได้ดีกว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสง (OD400) ที่เพิ่มขึ้น และสามารถนำมาสร้างกราฟเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อได้ ดังรูปที่ 2 โดยที่ *Lactobacillus* host เจริญเข้าสู่ mid- logarithmic phase เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง และ MRS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของ *Lactobacillus* spp.



รูปที่ 2 การเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ MRS ที่ 37°C ใน shaking incubator

ผลการแสดงออกของยีนไคติเนสใน transformants มีดังนี้

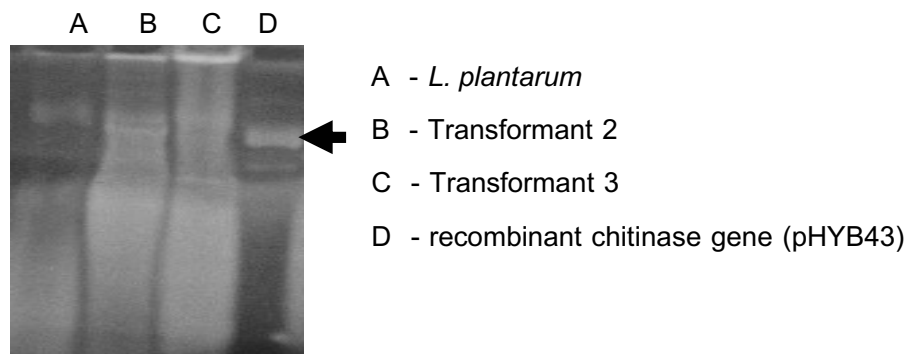
#### 1. ผลการทดสอบโดยวิธีการขี้เซลล์

เมื่อใช้โคโลนีจาก *L. plantarum*, Transformant 1, 2, 3 และ pHYB43 (Positive control) มาขยี้ลงบนกระดาดากรอง หยดทับด้วย 4-MUG substrate (active substrate) จากนั้นนำไปดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ปรากฏเห็นการเรืองแสงสีฟ้าสว่างใน Transformant ที่ 2 และ 3 และมีผลบวกใน pHYB43

#### 2. agarose gel electrophoresis

หลังจากสกัด recombinant chitinase gene (pHYB 43) จาก *E. coli* DH 5 $\alpha$  ด้วยวิธี alkaline lysis method แบบ large scale และถ่ายถอดยีนเข้าสู่ *Lactobacillus* host (*L. plantarum* TISTR 050) จากนั้นนำมาทดสอบการมีอยู่ของยีนไคติเนสด้วยวิธี (DNA) electrophoresis โดยใช้ supporting medium คือ 0.7% agarose gel ปรากฏว่าเห็นแถบยีน

ไคติเนสใน transformant 2 (lane B), 3 (lane C) และ recombinant chitinase gene (pHYB 43) (lane D) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 รูปแบบของแถบ DNA ที่สกัดจาก transformants ตำแหน่งลูกศรชี้คือ recombinant chitinase gene (pHYB 43)

จากการทำ 0.7% agarose gel electrophoresis จะสังเกตเห็นแถบของ DNA ใน transformant 2 และ 3 (lane B และ C) อยู่ในตำแหน่งเดียวกับแถบของ DNA ของ recombinant chitinase gene (pHYB 43) (lane D) ซึ่งผลที่ได้อาจจะยืนยันได้ว่า transformant 2 และ 3 ได้รับ recombinant chitinase gene (pHYB 43) เข้าไปภายในเซลล์แล้ว ส่วน *L. plantarum* (lane A) ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบตำแหน่งแถบของ DNA ที่ไม่มี recombinant chitinase gene (pHYB 43)

3. ผลการทดสอบ Activity ในการย่อยสลายไคตินของไคติเนสที่สร้างจาก Transformant โดยวิธี agar well diffusion assay

จากการทดสอบ Activity ในการย่อยสลายไคตินที่สร้างจาก Transformants โดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ส่วนใสจาก Transformant 1, 2, 3, *L. plantarum* และ pHYB43 ปรากฏว่าจะเห็นการย่อย glycol chitin ปรากฏเป็นวงมีด (hallow zone) รอบหลุมที่หยดส่วนใสของ Transformant 2, 3 และ pHYB43 อย่างไรก็ตามยังสามารถสังเกตเห็นลักษณะดังกล่าวใน *L. plantarum* host

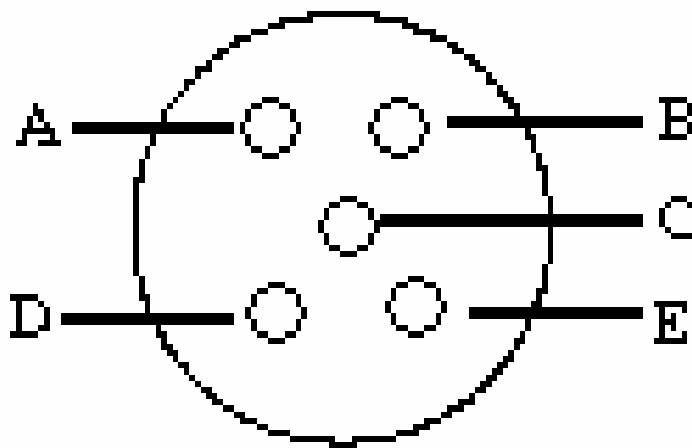
#### 4. ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของไคตินเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของไคตินเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay ปรากฏว่ามีเฉพาะ *M. luteus* TISTR 884 ที่โดนยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์ปรับปรุงที่มีชั้นยีนไคตินเนส ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของไคตินเนสและกรดแลคติกที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion assay

| แหล่งของสาร<br>(ส่วนใส) | Clear zone (cm)  |                    |                      |                  |                    |                |
|-------------------------|------------------|--------------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------|
|                         | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>M. luteus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>L. plantarum</i>     | 1.5              | 1.5                | 2.0                  | 2.2              | -                  | 1.2            |
| Transformant 2          | 1.4              | 1.4                | 1.5                  | 2.5              | -                  | 1.2            |
| Transformant 3          | 1.45             | 1.7                | 1.8                  | 2.4              | -                  | 1.2            |
| pHYB43                  | -                | -                  | -                    | -                | -                  | -              |
| Control ( MRS)          | -                | -                  | -                    | -                | -                  | -              |

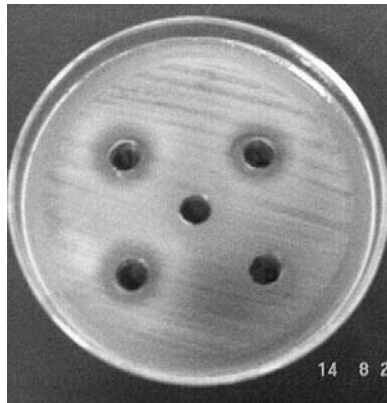
ลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 4



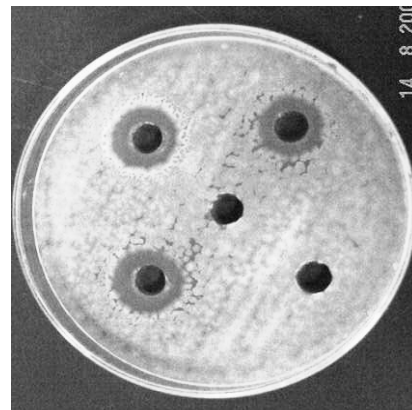
A – *Lactobacillus plantarum*, D – Transformant 3

B – Transformant 2, E – pHYB43

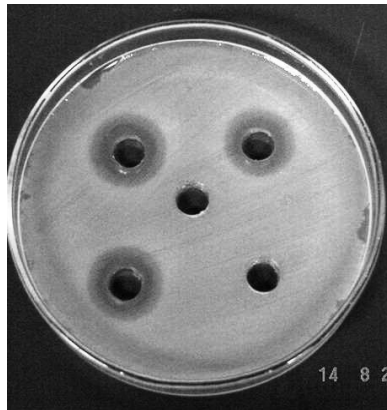
C – Control (MRS)



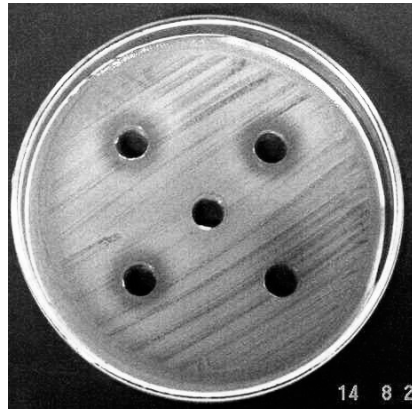
*Staphylococcus aureus*



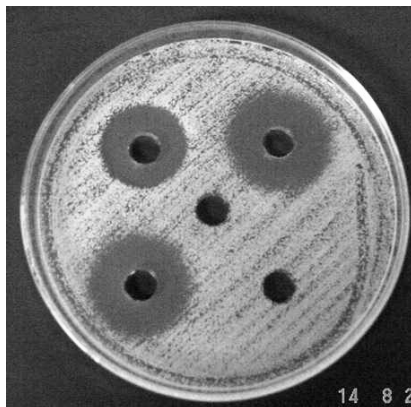
*Bacillus subtilis*



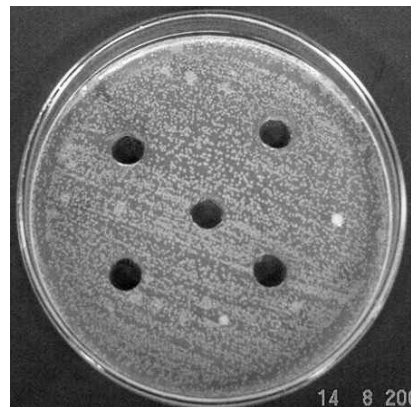
*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*



*Micrococcus luteus*



*Candida albicans*

รูปที่ 4 ภาพที่ยับยั้งการเจริญของ transformants ต่อจุลินทรีย์ดัชนี่

#### IV. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก

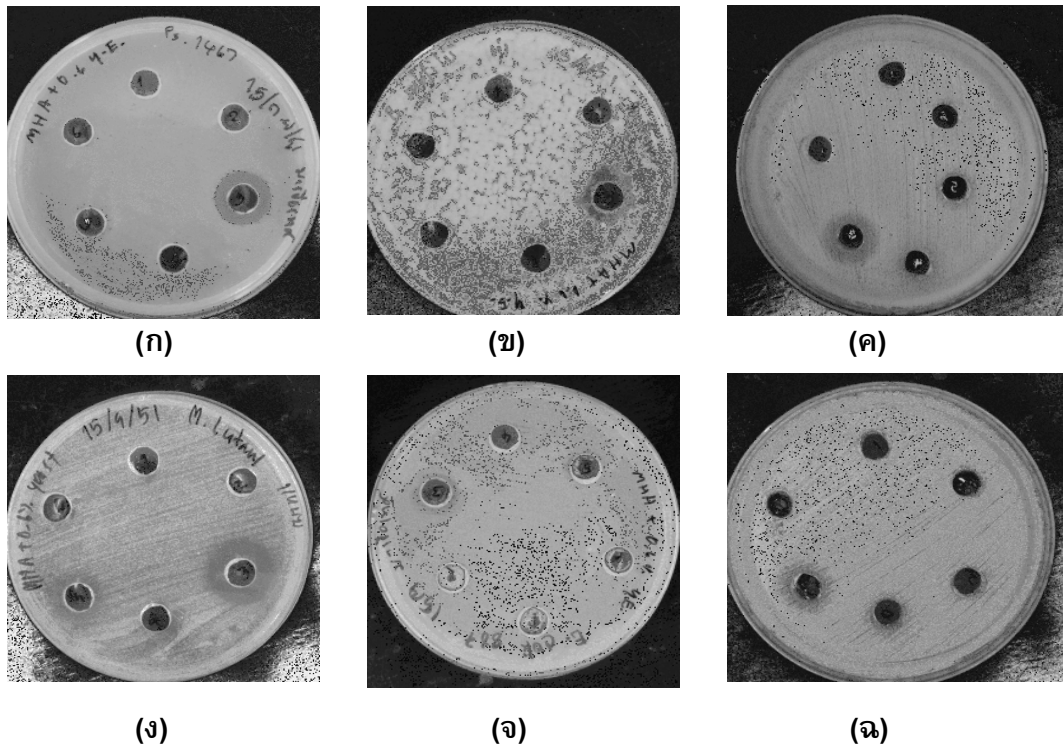
แบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ : จากการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากผัก-ผลไม้ (มะเขือเทศ แดงโม มะพร้าว กะหล่ำปลี) นมวัว และนมแพะ ปรากฏว่าตรวจพบโคโลนีเจริญขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จำนวนมาก จากนั้นได้ทำการคัดเลือกรูปแบบของโคโลนีตามคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งได้แก่ หนู สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ ย้อมติดสีแกรมบวกรูปท่อน โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว : ในการทดสอบความสามารถของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 106 ไอโซเลทในการเกาะติดพื้นผิว รวมเชื้อควบคุม (C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050) ปรากฏว่าเชื้อทั้งหมดผลิตก๊าซเมื่อนำไปเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แต่พบมีเพียงไอโซเลทที่ 9 ที่แยกออกมาได้จากมะเขือเทศ และไอโซเลทที่ 35 ที่แยกออกมาได้จากนมเท่านั้นที่สามารถแสดงการเกาะติดผิวหลอดด้านในของหลอดทดลอง จึงได้ตั้งชื่อว่า T9 และ N35 ตามลำดับ แต่พบว่า T9 แสดงการเกาะกลุ่มที่เร็วกว่าและยาวนานกว่า ดังแสดงในตารางที่ 5 ดังนั้นจึงเลือก T9 ไปศึกษาตลอดการทดลอง

ตารางที่ 5 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของไอโซเลท T9 และไอโซเลท N35

| ไอโซเลท          | ระยะเวลาที่เริ่มเกาะติดพื้นผิว (ชั่วโมง) | จำนวนวันที่เกาะติดพื้นผิว (วัน) | การคงสภาพเกาะติด |
|------------------|------------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| นมมะเขือเทศ (T9) | 24                                       | >4                              | มาก              |
| นม (N35)         | 36                                       | 2                               | น้อย             |

ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดย เมตาบอไลต์ต่างๆ : ไอโซเลท T9 ที่คัดเลือกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ทำลาย แบคทีเรียดัชนีที่นำมาทดสอบทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 ) แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทำลายราดัชนี *Candida albicans* TISTR 5779 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ดังแสดงในรูปที่ 5



**รูปที่ 5** ฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียไอโซเลท T9 ในการยับยั้งแบคทีเรียดัชนี *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 (ก) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (ข) *Salmonella typhimurium* TISTR 292 (ค) *Micrococcus luteus* TISTR 884 (ง) *Escherichia coli* TISTR 887 (จ) *Staphylococcus aureus* TISTR 517 (ฉ)

แยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL : ในการวิเคราะห์แยกชนิดไอโซเลท T9 ด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 ปรากฏว่าไอโซเลท T9 ที่แยกได้มาจากมะเขือเทศคือ *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกมาได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกและจะเลือกนำไปทดสอบต่อไป

ความทนทานต่อระดับ pH 2-10 : ไอโซเลท T9 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH 2-10 และสามารถสังเกตเห็นการเกาะติดพื้นผิวหลอดด้านในของแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดทดลอง

ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ : ไอโซเลท T9 ตี้อยู่ยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ยกเว้น Nitrofurantoin ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความไวของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* 1 (T9) และ *L. plantarum* TISTR050 ต่อยาปฏิชีวนะ

| แบคทีเรีย                     | วงใสของการยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร) |      |    |      |     |    |    |    |    |
|-------------------------------|---------------------------------------|------|----|------|-----|----|----|----|----|
|                               | CN                                    | CAR  | AK | SXT  | AMP | F  | KF | OX | P  |
| <i>L. plantarum</i> 1         | 20                                    | 9    | 19 | 9    | 20  | 19 | 7  | 0  | 13 |
| <i>L. plantarum</i> TISTR 050 | 26                                    | 17.5 | 26 | 20.5 | 21  | R  | 11 | 0  | 21 |

## V. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ตัดแยกได้ในน้ำผลไม้

ไอโซเลท T9 สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำผลไม้ที่นำมาศึกษาแตกต่างกันโดยพบว่าสามารถมีชีวิตรอดได้ดีในน้ำแดงโมและน้ำมะเขือเทศในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน ส่วนน้ำมะพร้าวทำให้แบคทีเรียตายทั้งหมดภายหลังการจัดเก็บไว้เพียง 9 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย *L. plantarum* 1 (ไอโซเลท T9) ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/มิลลิลิตร มีอัตราการอยู่รอดโดยเฉลี่ยมากที่สุดที่น้ำแดงโมที่ไม่เติมสารพรีไบโอติกโดยมีปริมาณเซลล์หลงเหลือชีวิตรอดประมาณ  $5.4 \pm 0.21$  log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน รองลงมาคืออัตราการอยู่รอดในน้ำมะเขือเทศที่เติมสารพรีไบโอติก (5.3 log CFU/ml), ในน้ำมะเขือเทศที่ไม่เติมสารพรีไบโอติก (5.2 log CFU/ml), ในน้ำแดงโมที่เติมสารพรีไบโอติก (5.0 log CFU/ml) ส่วนในน้ำมะพร้าวทั้งที่เติมสารพรีไบโอติกและไม่เติมสารพรีไบโอติกนั้นเชื้ออยู่รอดได้เพียงประมาณ 6 วัน ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์อัตโนมัติ SPSS โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ ONE WAY ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. plantarum* 1 ปรากฏว่าการเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ (p-value < 0.05)

ตารางที่ 7 ปริมาณเซลล์ (logCFU/ml) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก (T9) ในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

| น้ำผลไม้                                     | Mean log CFU/ml $\pm$ SD |             |                |                |                |                |                |                |
|----------------------------------------------|--------------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                              | 0                        | 3           | 6              | 9              | 12             | 15             | 18             | 21             |
| <b>น้ำมะเขือเทศ</b>                          |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>ไม่เติมสารพรีไบโอติก | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 7.4 $\pm$ 0.23 | 8.0 $\pm$ 0.23 | 5.7 $\pm$ 0.24 | 5.6 $\pm$ 0.32 | 5.3 $\pm$ 0.19 | 5.2 $\pm$ 0.19 |
| 2. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 7.2 $\pm$ 0.11 | 6.0 $\pm$ 0.32 | 5.9 $\pm$ 0.11 | 5.7 $\pm$ 0.23 | 5.3 $\pm$ 0.28 | 5.3 $\pm$ 0.23 |
| <b>น้ำแตงโม</b>                              |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>ไม่เติมสารพรีไบโอติก | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 7.2 $\pm$ 0.23 | 6.7 $\pm$ 0.2  | 6.0 $\pm$ 0.21 | 5.2 $\pm$ 0.29 | 5.2 $\pm$ 0.27 | 5.4 $\pm$ 0.21 |
| 2. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 6.8 $\pm$ 0.18 | 6.7 $\pm$ 0.2  | 6.0 $\pm$ 0.34 | 5.6 $\pm$ 0.32 | 5.1 $\pm$ 0.34 | 5.0 $\pm$ 0.31 |
| <b>น้ำมะพร้าว</b>                            |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>ไม่เติมสารพรีไบโอติก | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 5.4 $\pm$ 0.37 | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| 2. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | 7.0 $\pm$ 0              | 7.0 $\pm$ 0 | 5.4 $\pm$ 0.22 | 0              | 0              | 0              | 0              | 0              |
| <b>0.85 NaCl</b>                             |                          |             |                |                |                |                |                |                |
| 1. เติมโปรไบโอติกและ<br>สารพรีไบโอติก        | ND                       | ND          | 6.8 $\pm$ 0.23 | 6.0 $\pm$ 0.14 | 5.9 $\pm$ 0.31 | 5.8 $\pm$ 0.23 | 5.8 $\pm$ 0.26 | 5.4 $\pm$ 0.23 |
| 2. เติมโปรไบโอติก                            | ND                       | ND          | 6.3 $\pm$ 0.25 | 6.0 $\pm$ 0.16 | 5.8 $\pm$ 0.25 | 5.9 $\pm$ 0.24 | 5.9 $\pm$ 0.22 | 5.3 $\pm$ 0.21 |

ND คือไม่ได้ทำการทดลอง

## VI. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก

### กลุ่ม *Bacillus*

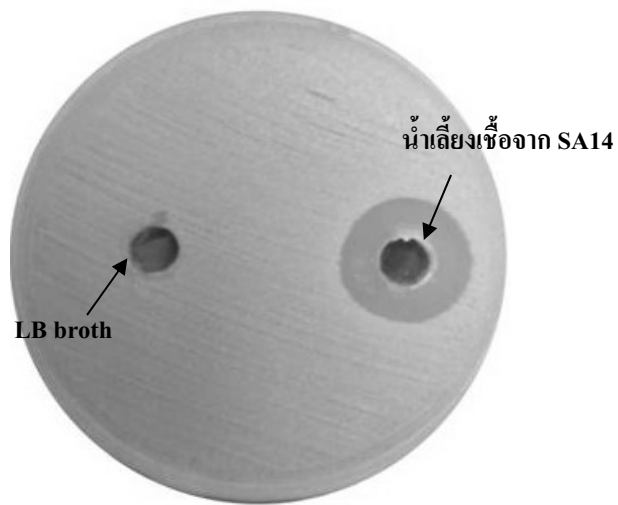
น้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเลี้ยง *Brev. laterosporus* SA14 แสดงฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus* ทั้งวิธีทดสอบแบบ agar well diffusion และ spot on lawn (รูปที่ 6) และจะเริ่มตรวจพบฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Duran ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 8

ชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยวิธี lyophilization และผ่านการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ไม่ผ่านความร้อนและผ่านความร้อน 100°C 15 นาที พบว่ายังคงมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus*

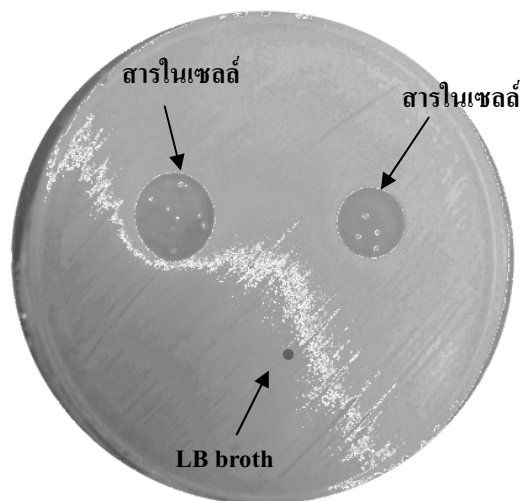
### กลุ่ม *Streptomyces* spp.

แบคทีเรีย *Streptomyces* spp. คัดแยกได้จากดินบริเวณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract - malt extract (YM) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะให้โคโลนีลักษณะ กลม ขนาด 1.5-3 มิลลิเมตร ฝังวัน ผิวหน้าเหี่ยว และสร้างสปอร์ เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวก แตกกิ่งก้านคล้ายสายราดังตารางที่ 9

ฤทธิ์ต้าน MRSA ของ *Streptomyces* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar plug diffusion พบว่าไอโซเลท CO4 และไอโซเลท WU6 มีฤทธิ์ต้าน MRSA ทั้งหมด ส่วนไอโซเลท CK9 มีฤทธิ์ต้าน MRSA เพียง 3 สายพันธุ์ (MRSA 414, MRSA 539, MRSA 3576) และ *S. aureus* TISTR 517 สำหรับไอโซเลท WU10 ไม่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ดังแสดงในตารางที่ 10



(ก)



(ข)

**รูปที่ 6**ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *S. aureus* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Brev. Laterosporus* SA14 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion (ก) และ ตัวเชื้อของ *Brev. Laterosporus* SA14 ที่ได้จากวิธี sonication และทดสอบด้วยวิธี spot on lawn (ข)

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *S. aureus* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Brev. laterosporus* SA14 ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยวิธี agar well diffusion

| ระยะเวลาการบ่มเลี้ยง (วัน) | ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) |
|----------------------------|----------------------|
| 1                          | -                    |
| 2                          | -                    |
| 3                          | 14                   |
| 4                          | 22                   |
| 5                          | 22                   |

ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp.

| เชื้อ | ลักษณะโคโลนี | สีโคโลนี               | ขนาด (mm) | ผิวหน้าโคโลนี |
|-------|--------------|------------------------|-----------|---------------|
| CO4   | กลม, ฝักรุ่น | เหลือง ส้ม, สปอร์สีขาว | 1.5       | เหี่ยวย่น     |
| WU10  | กลม, ฝักรุ่น | ขาวขุ่น , สปอร์สีขาว   | 2         | เหี่ยวย่น     |
| WU6   | กลม, ฝักรุ่น | ขาวขุ่น, สปอร์สีขาว    | 3         | เหี่ยวย่น     |
| CK9   | กลม, ฝักรุ่น | ขาวขุ่น                | 2         | เหี่ยวย่น     |

ตารางที่ 10 Inhibition zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบโดยวิธี agar plug diffusion โดยใช้โคโลนีของเชื้อ

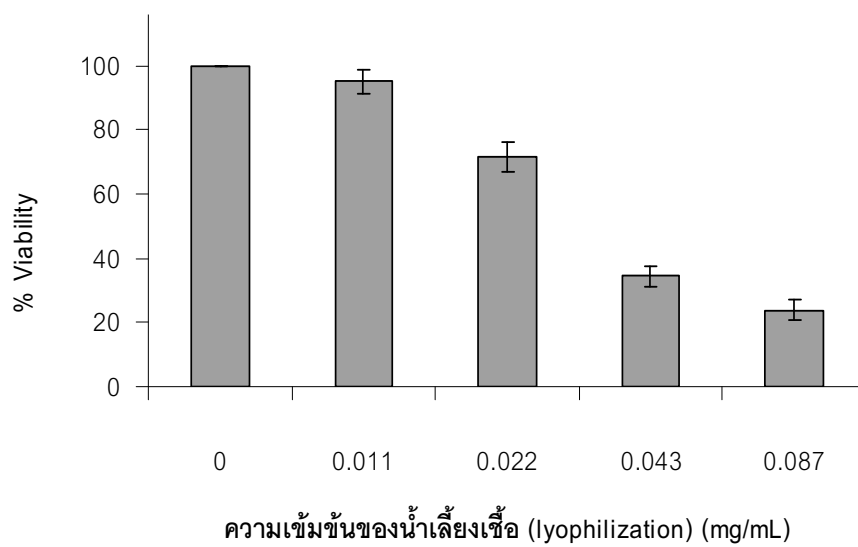
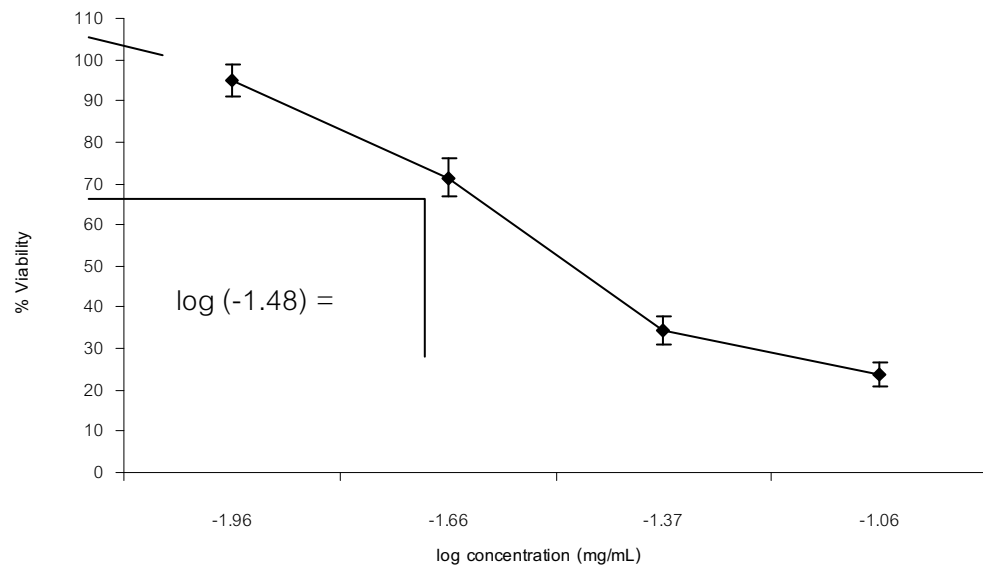
| <i>Streptomyces</i> spp. | Inhibition zone (mm) |             |             |             |              |                               |
|--------------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------------|
|                          | MRSA<br>338          | MRSA<br>403 | MRSA<br>414 | MRSA<br>539 | MRSA<br>3576 | <i>S. aureus</i><br>TISTR 517 |
| WU6                      | 17.0                 | 16.0        | 17.0        | 13.5        | 14.0         | 14.5                          |
| WU10                     | -                    | -           | -           | -           | -            | -                             |
| CO4                      | 22.5                 | 19.5        | 20.5        | 22.5        | 20.5         | 18.0                          |
| CK9                      | -                    | -           | 8.0         | 10.0        | 10.5         | 9.0                           |

MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

## VII. การทดสอบความเป็นพิษของชีวสารต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354)

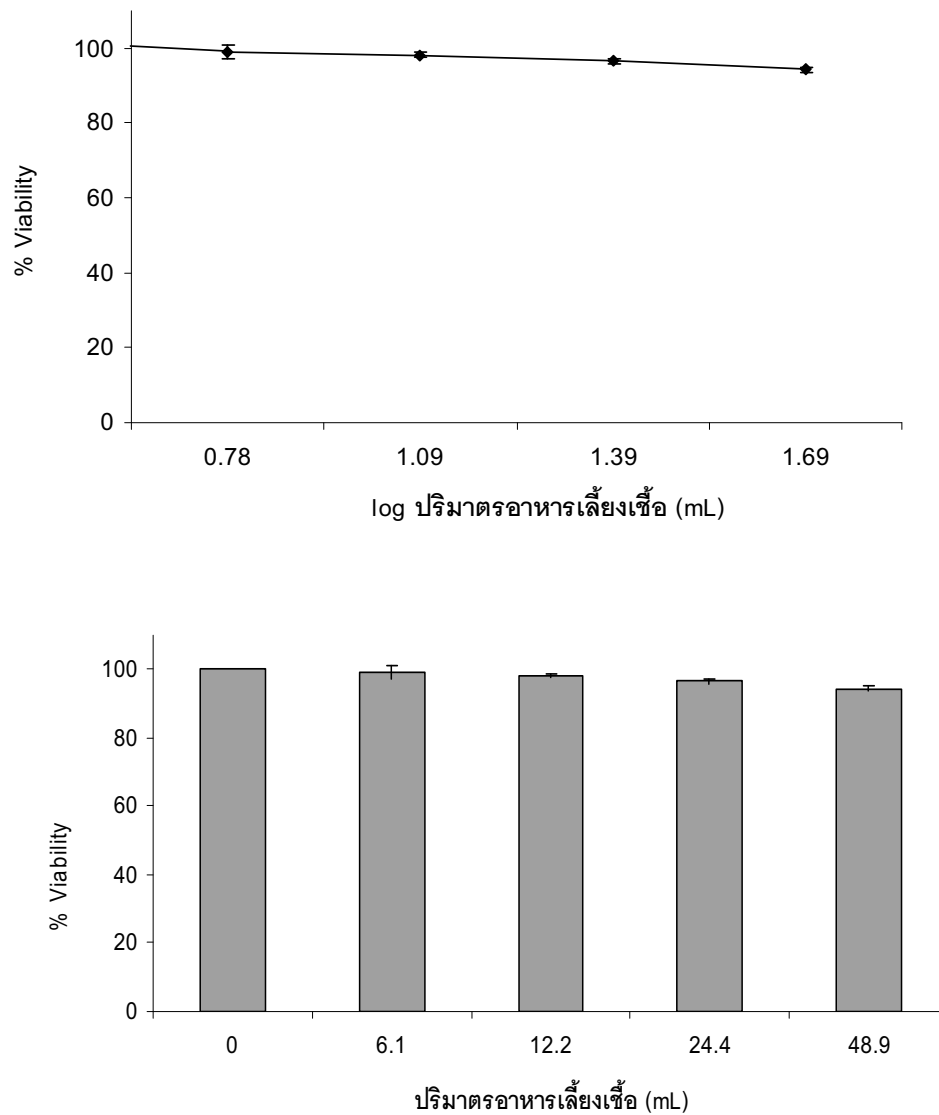
จากการนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) พบว่าชีวสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี lyophilization ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.033 mg protein/ml รูปที่ 7 และชีวสารกึ่งบริสุทธิ์จากการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน ให้ค่า  $IC_{50}$  ที่เท่ากันคือ 0.034 mg protein/ml โดยชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ lyophilization มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.67 mg/ml (w/v) และอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 8

จากการนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) พบว่าชีวสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าไอโซเลท CO4 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.005 mg protein/ml หรือเท่ากับ ความเข้มข้น 5.88 mg/ml (w/v) ดังรูปที่ 9 ส่วนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU6 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.032 mg protein/ml หรือเท่ากับ ความเข้มข้น 34.83 mg/ml ดังรูปที่ 10 และชีวสารของน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU10 ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.023 mg protein/ml หรือเท่ากับ ความเข้มข้น 25.62 mg/ml ดังรูปที่ 11 อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 12 ส่วนยา 5-fluorouracil ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.75 mg/ml ดังรูปที่ 13



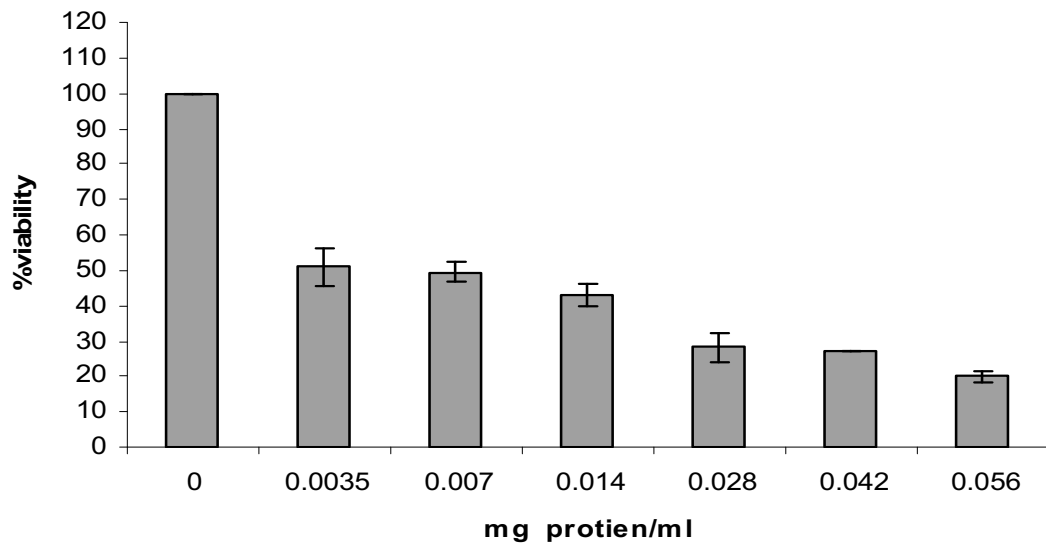
(ข)

รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง % viability กับความเข้มข้นของโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข)

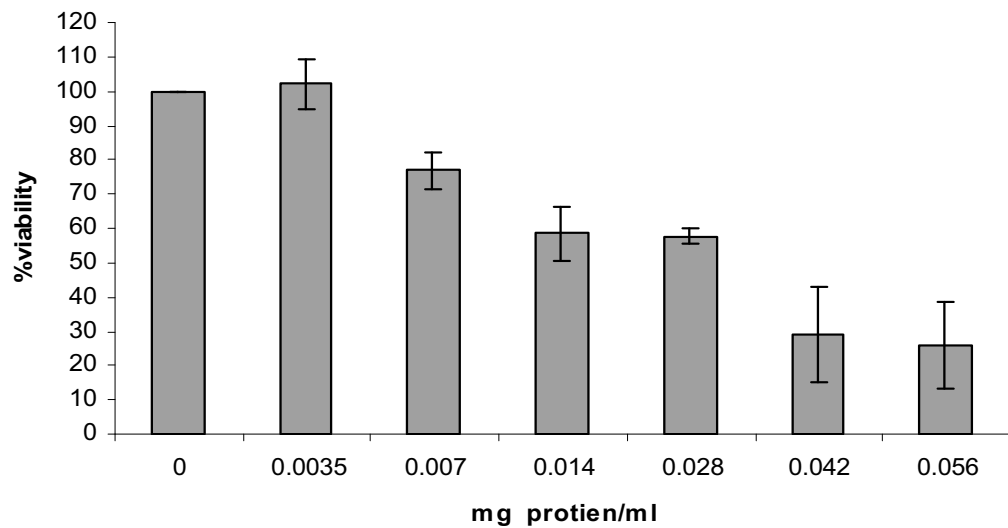


(ข)

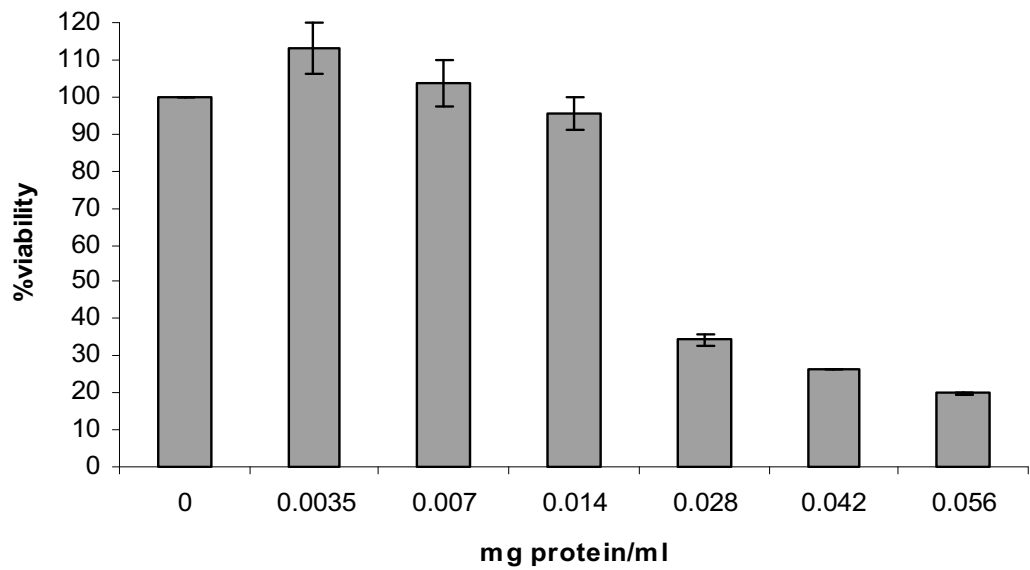
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง % viability กับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านกระบวนการ lyophilization แสดงในรูปแบบกราฟเส้น (ก) และในรูปแบบกราฟแท่ง (ข)



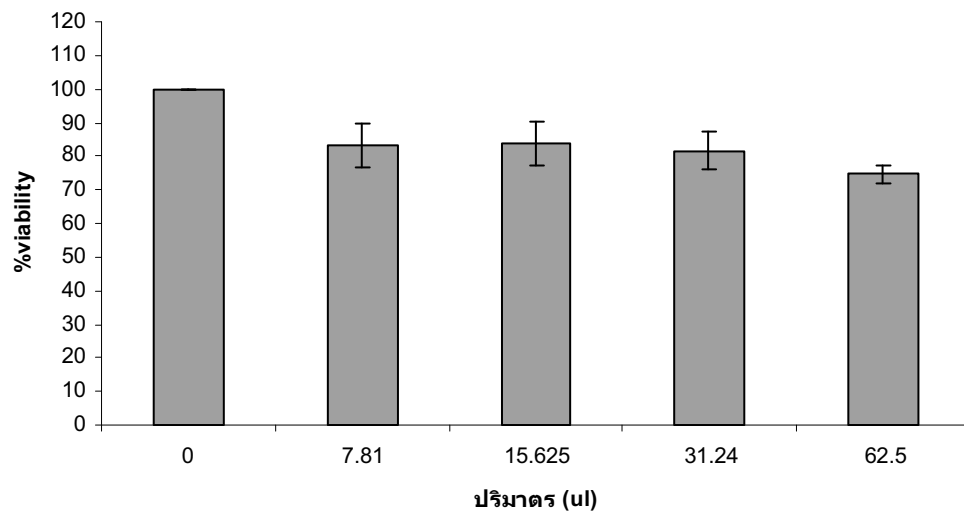
รูปที่ 9 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นโปรตีนของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ CO4



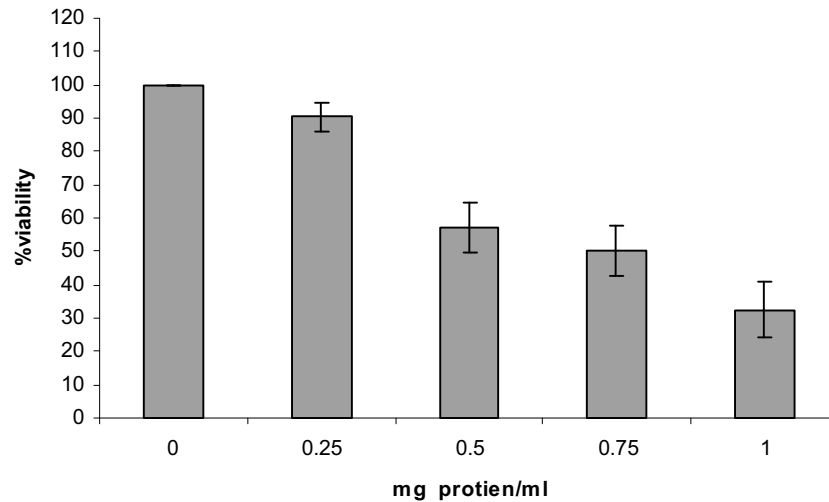
รูปที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นโปรตีนของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU6



รูปที่ 11 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นโปรตีนของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ WU10



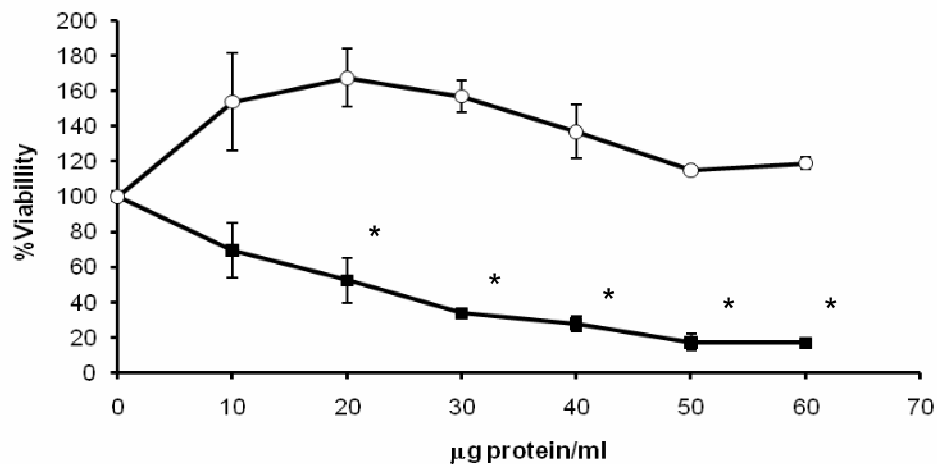
รูปที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ YM



รูปที่ 13 แผนภูมิแท่งแสดง % viability ของเซลล์ CLS-354 กับความเข้มข้นของยา 5-Fluorouracil (5-FU)

#### VIII. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน และโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 22 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 14)

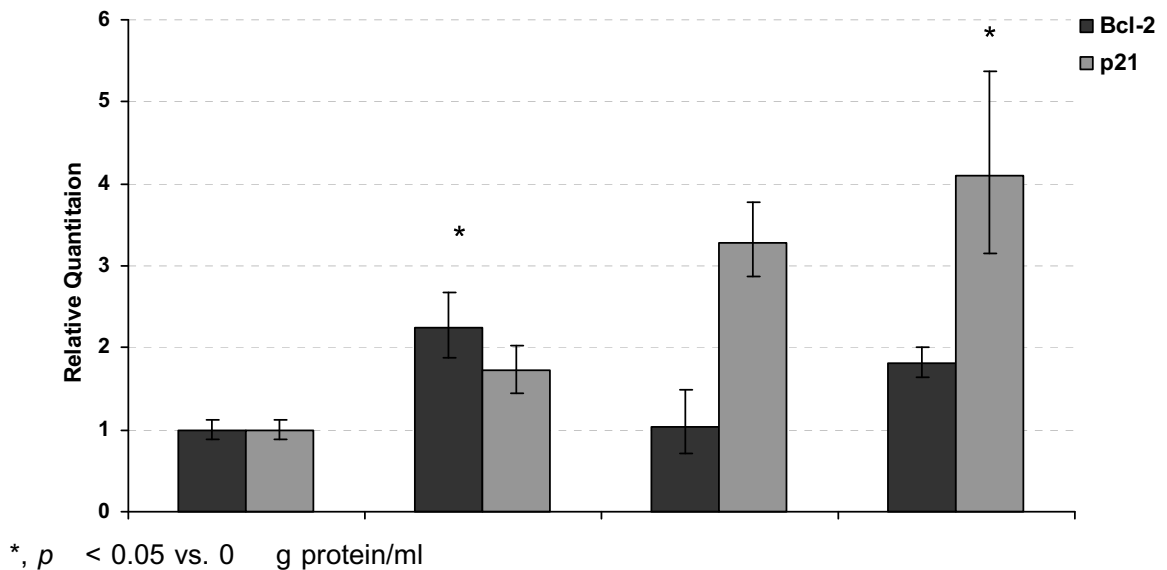


\*,  $p$ -value < 0.05 vs. 0 µg protein/ml

รูปที่ 14 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 (■) และอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน (○)

#### IX. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และ ยีน *p21*

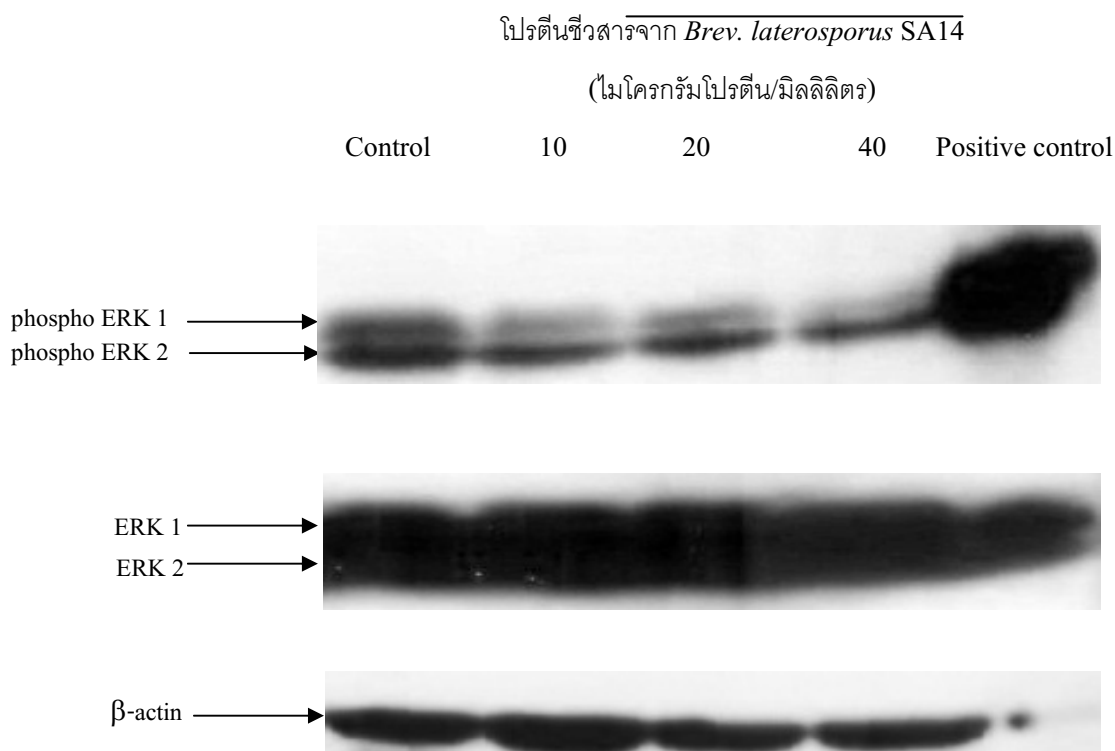
จากการนำ cDNA ของเซลล์มะเร็งช่องปาก ที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มาศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลให้การแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งช่องปากตายไปประมาณร้อยละ 30 ทำให้การแสดงออกของยีน *Bcl-2* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลไกการป้องกันเซลล์จากชีวสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 20 และ 30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงขึ้นพบว่าโปรตีนชีวสารทำให้การแสดงออกของยีน *Bcl-2* ลดลง (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 การแสดงออกของยีน *Bcl-2* (■) และยีน *p21* (■) เมื่อเทียบกับ  $\beta$ -actin ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80 % ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 0-30 ไมโครกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร

#### X. การศึกษาการแสดงออกของ ERK 1/2 protein โดยวิธี Western blot analysis

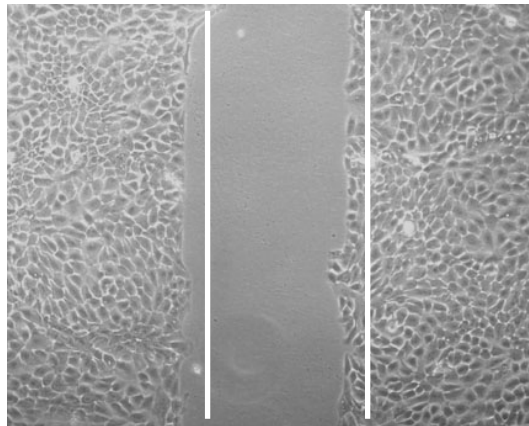
จากการนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยวิธี Western blot analysis พบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ total ERK1/2 ผลจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าปริมาณโปรตีนในแต่ละหลุมทดสอบมีปริมาณที่เท่ากัน เนื่องจากการแสดงออกของ  $\beta$ -actin ซึ่งใช้เป็น internal control มีปริมาณที่เท่ากันในแต่ละหลุม และแถบโปรตีนของตัวอย่างที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารเป็นแถบโปรตีนของ phospho ERK1/2 และ total ERK 1/2 จริงเนื่องจากเป็นแถบโปรตีนที่อยู่ในแนวเดียวกันกับ positive control ที่ใช้ (รูปที่ 16)



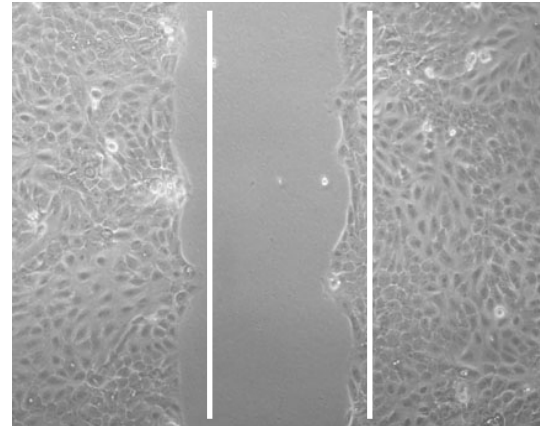
**รูปที่ 16** การแสดงโปรตีน phospho ERK1/2, total ERK1/2 และ  $\beta$ -actin ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ที่ตกตะกอนด้วย 80 % ammonium sulfate

#### **XI. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส**

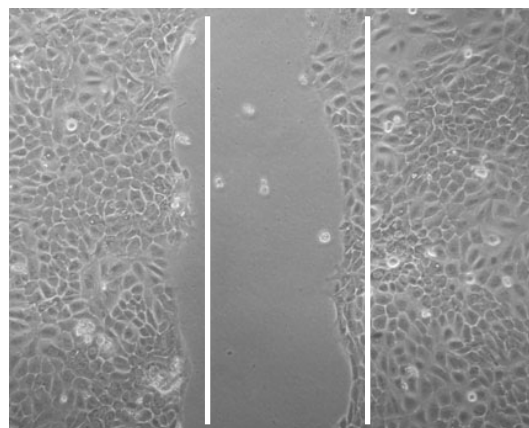
จากการนำโปรตีนชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าโปรตีนชีวสารทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT และเมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ในการสมานบาดแผลพบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวทำให้เซลล์ผิวหนัง HaCaT มีการเคลื่อนที่มาปิดบาดแผลเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที และมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 17) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เตรียมจากการกระบวนการเดียวกันทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 28 ชั่วโมง ไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 18) ส่วน PBS ไม่ทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาปิดบาดแผล ส่วน Allantoin ซึ่งใช้เป็น positive control ทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และเห็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง



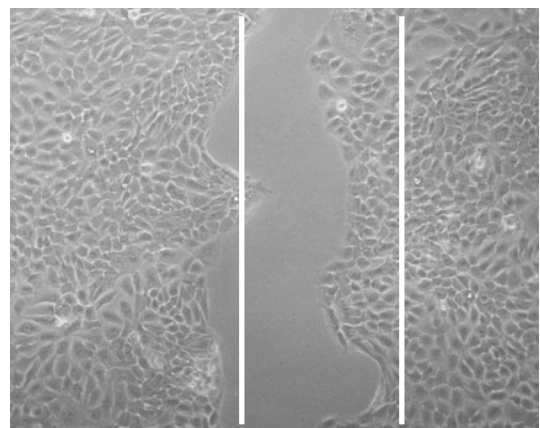
หลังทำให้เกิดบาดแผล 24 ชั่วโมง



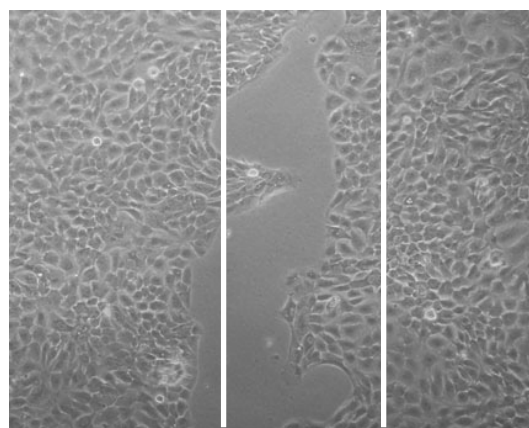
หลังเติมชีวสาร 30 นาที



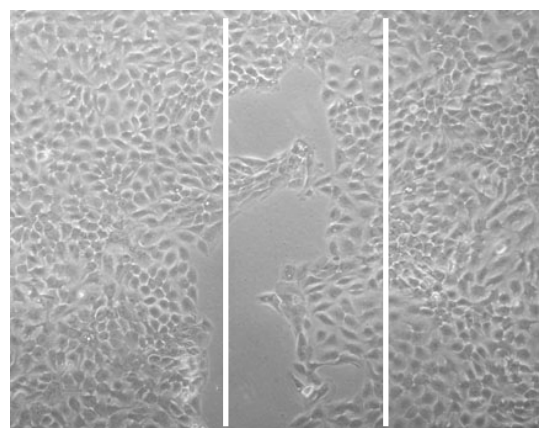
หลังเติมชีวสาร 3 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 16 ชั่วโมง

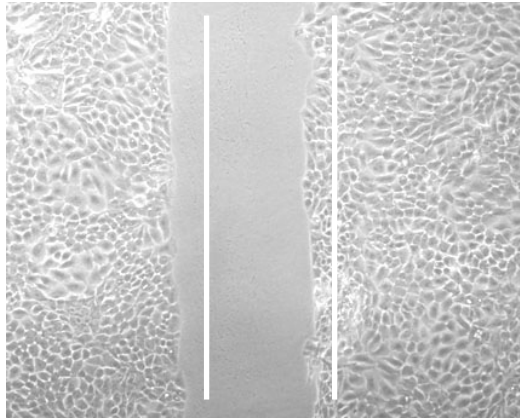


หลังเติมชีวสาร 28 ชั่วโมง

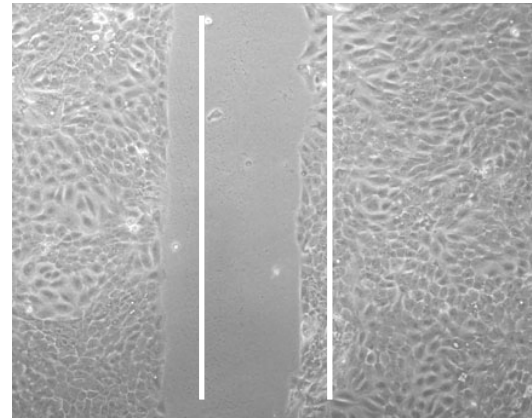


หลังเติมชีวสาร 48 ชั่วโมง

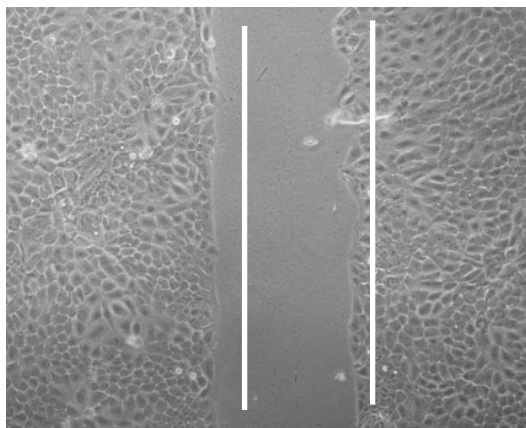
**รูปที่ 17** การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA 14 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ใน 2% FBS



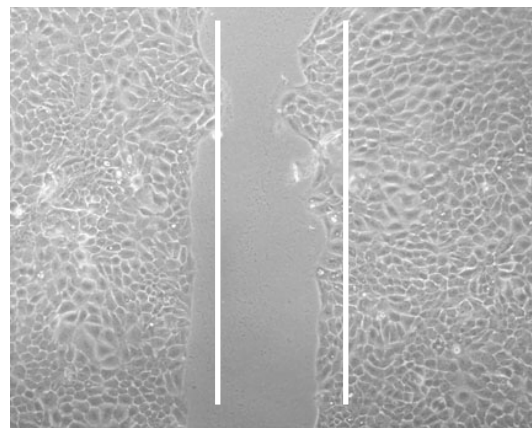
หลังทำให้เกิดบาดแผล 24 ชั่วโมง



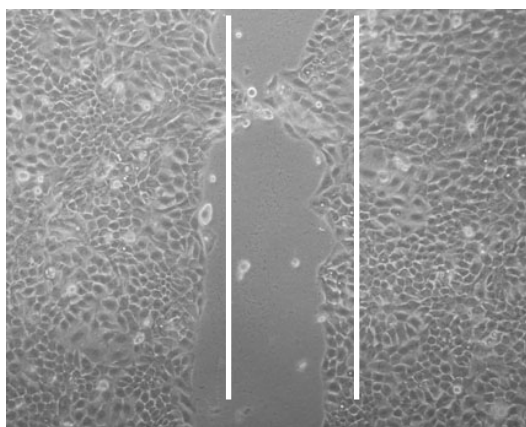
หลังเติมชีวสาร 30 นาที



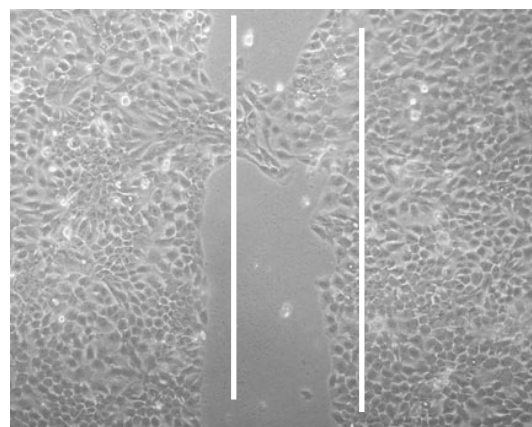
หลังเติมชีวสาร 3 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 16 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 28 ชั่วโมง



หลังเติมชีวสาร 48 ชั่วโมง

**รูปที่ 18** การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 80% ammonium sulfate ใน 2% FBS

## XII.ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

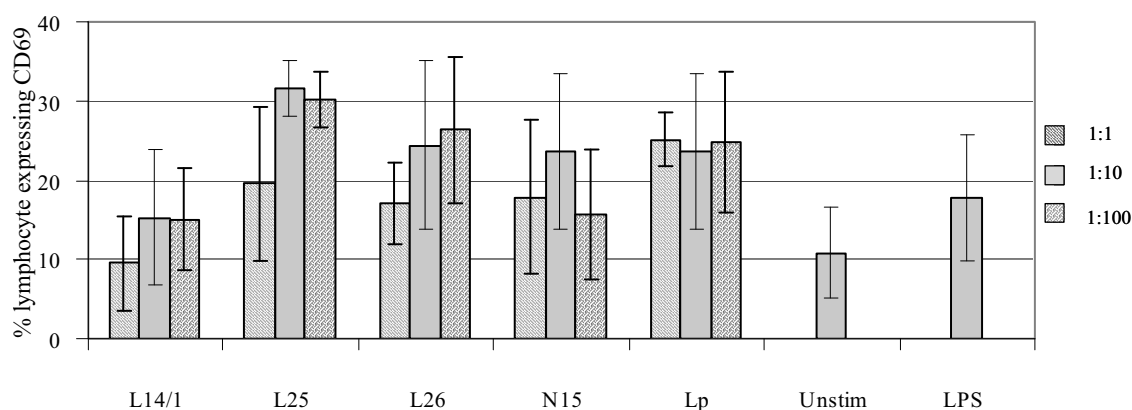
### ผลการวัด CD69

CD69 เป็นเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่มีการแสดงออกเมื่อเซลล์เลือดขาวถูกกระตุ้น ผลการศึกษาพบว่าบนเซลล์ลิมโฟไซต์มีการแสดงออกของ CD69 เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L 25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) โดยใช้จำนวนโมโนนิวเคลียร์ต่อเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 1:1, 1:10 และ 1:100 โดยวัดการแสดงออกของ CD69 ซึ่งเป็น activation marker บนผิวเซลล์โมโนไซต์และลิมโฟไซต์ด้วยเครื่องโฟลซัยโตมิเตอร์ ในคนปกติจำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ลิมโฟไซต์ที่มีการแสดงออกของ CD69 ต่อ L14/1 เท่ากับ 9.5%, 15.3% และ 15% ตามลำดับ L 25 เท่ากับ 19.6%, 31.6% และ 30.1% ตามลำดับ L 26 เท่ากับ 17.1%, 24.4% และ 26.3% ตามลำดับ N 15 เท่ากับ 17.8%, 23.7% และ 16.7% ตามลำดับ Lp เท่ากับ 25.1%, 23.7% และ 24.8% ตามลำดับ ผลการกระตุ้นด้วย LPS (0.5 µg) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก เท่ากับ 17.8% และเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ เท่ากับ 10.8% ดังรูปที่ 19 ส่วนค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์โมโนไซต์ที่มีการแสดงออกของ CD69 ต่อ L14/1 เท่ากับ 3.7%, 6.8% และ 5.7% ตามลำดับ L 25 เท่ากับ 11.8%, 13.6% และ 8.3% ตามลำดับ L 26 เท่ากับ 8.1%, 7.4% และ 5.7% ตามลำดับ N 15 เท่ากับ 8.1%, 16.6% และ 7.4% ตามลำดับ Lp เท่ากับ 16%, 11.4% และ 6.8% ตามลำดับ ผลการกระตุ้นด้วย LPS (0.5 µg) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก เท่ากับ 6.2% และเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ เท่ากับ 5.3% ดังรูปที่ 20

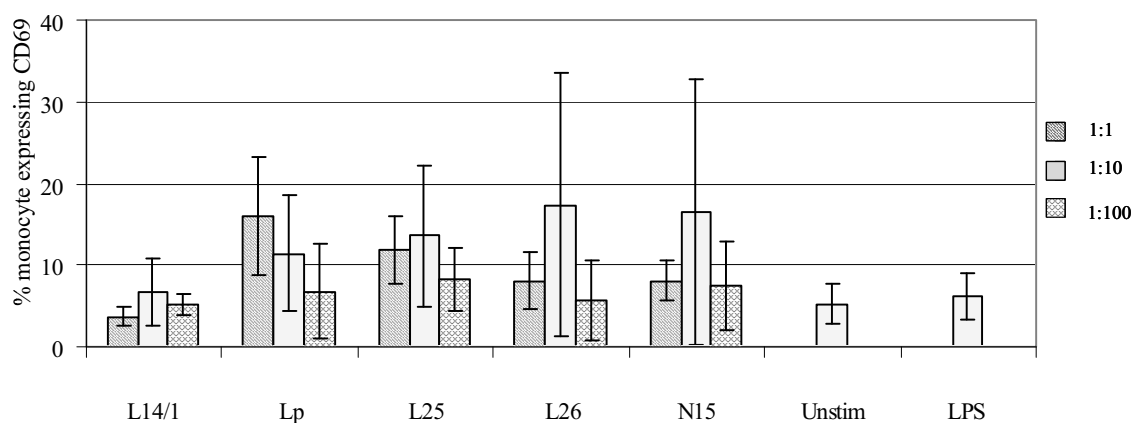
### ผลการตรวจวัด CD80 หรือ CD86

CD80 และ CD86 เป็นเครื่องหมายบนผิวเซลล์เดนดริติกบ่งชี้การเจริญแก่ตัวของเซลล์หลังถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพ การทดลองนี้วัดการแสดงออกบนผิวเซลล์มัยอีลอยด์เดนดริติก (mDCs) และพลาสมาซัยตอยเซลล์ (pDCs) หลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1) และ *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) ผลการตรวจวัดการแสดงออกของ CD86 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *Ped. pentosaceus* 1 L14/1 ในอัตราส่วนโมโนนิวเคลียร์เซลล์ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 1:10 และ 1:100 โดยใช้ พบว่ามัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD86 เท่ากับ 75.6%, 79.2%, ตามลำดับ เทียบกับสารควบคุมผลบวก 85.1% และควบคุมผลลบ 83.4% ผลการวัด CD80 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactic* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L. plantarum* TISTR 050 (Lp) 1:10 และ 1:100 มีค่าเท่ากับ 88.6%,

89.7%; 90.4%, 93.1%; 89.5%, 91.4%; 94.3%, 93.6% ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 21 ในขณะที่การแสดงออกบนพลาสมาซัยตอยเซลล์ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากจำนวนเซลล์น้อยมาก



**รูปที่ 19** การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์ลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) เทียบกับหลอดควบคุมผลบวก (LPS) และผลลบ (unstim) ผลการแสดงจากจำนวน 3 ตัวอย่าง (N=3)



**รูปที่ 20** การแสดงออกของ CD69 บนเซลล์โมโนไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L 25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L 26 (L 26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) เทียบกับหลอดควบคุมผลบวก (LPS) และผลลบ (unstim) ผลการแสดงจากจำนวน 3 ตัวอย่าง (N=3)