

การคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบา จากอาหารหมัก

Isolation and identification of GABA-producing lactic acid bacteria from fermented foods

วัชรมานันท์ ครองเคหา^{1*}
Watcharacha Krongkeha^{1*}

บทคัดย่อ

สารกาบา (GABA) หรือแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิด (gamma aminobutyric acid) เป็นสารสื่อประสาทที่สามารถสร้างขึ้นได้จากธรรมชาติโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารหมัก การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการผลิตสารกาบาจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 2 ชนิด คือ แหนมและปลาซ้ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO₃) เข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ จากแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 40 ไอโซเลท ที่ศึกษาการผลิตสารกาบาในอาหาร MRS broth ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ พบแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารกาบาได้ และสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท N1-2, N2-9, F1-4 และ F2-6 ที่สามารถผลิตสารกาบาได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 0.13, 0.05, 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไอโซเลท N1-2 และ F1-4 มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ไอโซเลท N2-9 และ F2-6 มีรูปร่างเซลล์กึ่งท่อนและทรงกลม เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท N1-2 เป็นชนิด *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลท F1-4 เป็นชนิด *Lactobacillus pentosus* และไอโซเลท N2-9 กับ F2-6 เป็นชนิด *Weissella paramesenteroides* ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นกัลลาเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารหมักต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก สารกาบา ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

Abstract

GABA, gamma aminobutyric acid, is a neurotransmitter, which can be naturally produced by lactic acid bacteria that are commonly found in fermented foods. The purpose of this research was to isolate and identify potential strains of lactic acid bacteria that can produce GABA from 2 different types of fermented food products, namely Nham and Pla Som. MRS agar medium containing 5% monosodium glutamate (MSG) and 0.50% calcium

¹ คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

¹ Faculty of Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Rattanakosin

* Correspondence author. E-mail: chokchai.chu@rmutr.ac.th

carbonate (CaCO_3) was used for bacterial isolation. Forty isolates of lactic acid bacteria were tested for GABA production in MRS broth containing 5% MSG. All isolates of lactic acid bacteria were able to produce GABA. Four isolates were selected, namely N1-2, N2-9, F1-4 and F2-6, due to high capability of GABA production at the maximum amounts of 0.13, 0.05, 0.04 and 0.02 mg/10g, respectively. They are Gram-positive bacteria. The N1-2 and F1-4 isolates are bacilli. The N2-9 and F2-6 isolates are short bacilli and cocci. The results of nucleotide sequences of the 16S rRNA genes revealed that N1-2 was identified as *Lactobacillus plantarum*. F1-4 could be identified as *Lactobacillus pentosus*. In addition, N2-9 and F2-6 were identified as *Weissella paramesenteroides*. Therefore, the selected lactic acid bacteria have the potential to be developed as a starter culture in the fermented food industry.

Keywords: lactic acid bacteria, GABA, fermented food products

บทนำ

สารกาบา (GABA) หรือแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิด (gamma aminobutyric acid) เป็นกรดอะมิโนจำเป็นที่ไม่ใช่โปรตีนซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Manyam, Katz, Hare, Kaniefski, & Tremblay, 1981) มีหน้าที่หลักในการเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยรักษาสมดุลของสมองเมื่อได้รับการกระตุ้นจากความเครียดต่างๆ ส่งผลให้สมองเกิดการผ่อนคลาย ช่วยกระตุ้นการทำงานของต่อมไร้ท่อที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (human growth hormone, HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ส่งผลให้กล้ามเนื้อเกิดความกระชับ และเกิดสาร Lipotropic ซึ่งเป็นสารป้องกันการสะสมไขมัน ลดความดันโลหิต บรรเทาอาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นในวัยทอง เช่น นอนไม่หลับ ซึมเศร้า และระบบประสาทอัตโนมัติผิดปกติ (Jakobs, Jaeken, & Gibson, 1993; Wong, Bottiglieri, & Snead, 2003; Kim, & Kim, 2012)

ด้วยคุณประโยชน์ของสารกาบาต่อสุขภาพร่างกาย อุตสาหกรรมอาหารจึงมีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสารกาบา เพื่อตอบโจทย์

ผู้บริโภคที่ประสบกับภาวะเครียดสะสม ยกตัวอย่างเช่น น้ำผลไม้ นมถั่วเหลือง กาแฟ โยเกิร์ต ลูกอม หมากฝรั่ง ไข่กรอก แหนม ขนมปัง ชีส เป็นต้น ทั้งนี้การผลิตสารกาบาในระดับอุตสาหกรรมทำได้ทั้งการผลิตจากวัตถุดิบและกรรมวิธีทางธรรมชาติ ไปจนถึงการสังเคราะห์จากวัตถุดิบประเภทปิโตรเคมี โดยหากเป็นสารกาบาที่ผลิตจากการกรดกลูตามิก โดยใช้วิธีการหมักทางธรรมชาติ ซึ่งเป็นการผลิตโดยกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก แล้วจึงนำมาทำแห้งเพื่อเก็บในรูปแบบผงละเอียด (Barla et al., 2016)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหารด้วยการหมัก ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารหมักให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมัก (Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986) จัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes แบ่งออกเป็น 21 จีนัส (Axelsson, 2004) ในปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาพัฒนาเป็นกัณฐักเชื้อในอุตสาหกรรม

อาหารหมักกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักธรรมชาติ ส่งผลให้เกิดกลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัสที่ดีของอาหาร นอกจากนี้ยังมีส่วนสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนั้นจึงมีการยอมรับกันว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth, & Schillinger, 2001)

ในปัจจุบัน แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารกาบาถูกคัดแยกได้จากอาหารหมักหลายชนิด และสามารถผลิตสารกาบาในปริมาณที่แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากการศึกษาของ Li, Qiu, Huang, & Cao (2010) พบว่า *Lactobacillus brevis* สายพันธุ์ NCL912 ที่แยกได้จากผักดองพื้นบ้านของจีนสามารถผลิตสารกาบาได้สูงที่สุดถึง 103.50 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *L. buchneri*, *L. brevis* และ *Weissella hellenica* ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักของญี่ปุ่นมีความสามารถในการผลิตสารกาบาได้ในปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (Barla et al., 2016) Kim (2009) ได้คัดแยก *L. brevis* สายพันธุ์ BFC-110 จากกิมจิที่ผลิตสารกาบาได้ปริมาณ 26.70 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Sanchart, Rattanaporn, Haltrich, Phukpattaranont, & Maneerat (2017) ได้คัดเลือก *L. futsaii* CS3 จากกุ่มส้มที่เป็นอาหารหมักพื้นบ้านของไทย สามารถสร้างสารกาบาได้และตรวจพบยีน *gadB* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารกาบาของแบคทีเรียในอาหารด้วย

แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาการค้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบาในอาหารหมักยังมีน้อย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก

และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารกาบาจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการสร้างสารกาบาที่น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารหมักต่อไป ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วิธีการศึกษา

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบา

ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก จำนวน 2 ชนิด คือ แหนมและปลาซึ่ม ที่ได้จากตลาดสด จำนวน 2 แห่งในจังหวัดนครปฐม โดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แบบ serial dilution คัดแยกและตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยเทคนิคการเกลี่ย (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และสารแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kim, & Kim (2012); Vangpikul, & Itsaranuwat (2021) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) และสัญญาณวิทยาของโคโลนีที่ต่างกันเพื่อนำมาย้อมสีแบบแกรม ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test) และเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) (Cappuccino, & Sherman, 1999) จากนั้นนำโคโลนีที่สร้างโซนใสที่เห็นผลการทดสอบเป็นบวก และ

ทดสอบกะตาเลสและออกซิเดสให้ผลเป็นลบ มาทำการเก็บรักษาในสารกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบา

ทำการคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตสารกาบา โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาสารกาบาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยดัดแปลงจากวิธีของ Cho, Ji, & Hae (2007) นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบอเร็ตต์พีเพอร์เข้มข้น 0.20 โมลาร์ pH 9.80 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำให้เย็นในเครื่อง cooling bath เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ทำให้เย็นอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank

3. การระบุชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดกรองได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำโคโลนีที่เก็บในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยบริษัท MacroGen Inc. (Seoul, Korea) สกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียตามวิธีการของ Satomi, Kimura, Mizoi, Sato, & Fujii (1997) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดโดยประมาณ 1,500 คู่เบส จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ตามวิธีการของ Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane (1991) และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับข้อมูลของแบคทีเรียจากฐานข้อมูลจาก GenBank database โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ the National Center for Biotechnological Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา และตรวจสอบเพื่อให้ได้ Alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมด้วย โปรแกรม BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016) และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบา

ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก คือ แหนมและปลาลัม ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และสารแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 ไอโซเลท จากตัวอย่างแหนม ตลาดสด1 จำนวน 10 ไอโซเลท ตัวอย่างแหนม ตลาดสด2 จำนวน 10 ไอโซเลท ตัวอย่างปลาลัม ตลาดสด1 จำนวน 10 ไอโซเลท และตัวอย่างปลาลัม ตลาดสด2 จำนวน 10 ไอโซเลท โดยพบลักษณะของโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) และทดสอบกะตาเลสและออกซิเดสได้ผลเป็นลบดัง (Figure 1) และ (Table 1) ซึ่งกรดแลคติกที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นมาจะทำปฏิกิริยากับสารแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้เป็นสารเชิงซ้อน $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_2$ ทำให้เกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง บริเวณใสที่เกิดขึ้นสามารถนำมาเป็นตัวบ่งชี้ในการ

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก สอดคล้องกับการศึกษาของ Kanklai, Somwong, Rungsirivanich, & Thongwai (2021) รายงานว่าแหล่งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบาส่วนใหญ่เป็นอาหารหมัก และ Tanamool, Hongsachart, & Soemphol (2020) สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* สายพันธุ์ L10-11 ที่สามารถสร้างสารกาบาได้จากปลาลัม

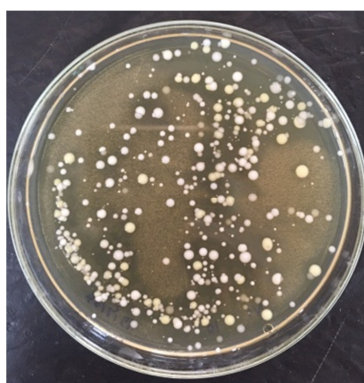


Figure 1 Clear zones around lactic acid bacteria (LAB) colonies on MRS agar containing 5% MSG and 0.50% CaCO_3 .

Table 1 Number and characteristics of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented foods.

sample source (location)	number of Isolate	clear zone	gram stain	oxidase	catalase
Nham (market1)	10	+	+	-	-
Nham (market2)	10	+	+	-	-
Plasom (market1)	10	+	+	-	-
Plasom (market2)	10	+	+	-	-

+, positive; -, negative

2. การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบา

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารกาบาของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 40 ไอโซเลทที่

แยกได้จากตัวอย่างเห็ดและปลาสด โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตสารกาบาของแบคทีเรีย นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank พบว่าตัวอย่างเห็ดจากตลาดสด1 ได้ ไอโซเลท N1-2 ที่สามารถผลิตสารกาบาได้สูงที่สุดปริมาณ 0.13 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม ตัวอย่างเห็ดจากตลาดสด2 ได้แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท N2-9 ที่สามารถผลิตสารกาบาได้สูงที่สุดปริมาณ 0.05 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม ตัวอย่างปลาสดจากตลาดสด1 ได้ไอโซเลท F1-4 ที่สามารถผลิตสารกาบาได้สูงที่สุดในปริมาณ 0.04 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม และตัวอย่างปลาสดจากตลาดสด2 ได้ไอโซเลท F2-6 ที่สามารถผลิตสารกาบาได้สูงที่สุดในปริมาณ 0.02 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม ดัง (Table 2) ซึ่งจากรายงานของ Park et al. (2020) พบว่าสารโมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นสารตั้งต้นราคาถูกที่ใช้ในการกระตุ้นการสร้างสารกาบาของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อทดแทนการใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารเคมีราคาแพง นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Tanamool, Hongsachart, & Soemphol (2020) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth จะส่งผลให้มีการสร้างสารกาบาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Shin et al. (2007) ที่ใช้อาหาร MRS broth ร่วมกับสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในการคัดกรอง

แบคทีเรียกรดแลคติกจากกิมจิที่มีความสามารถในการผลิตสารกาบา เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตสารกาบาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ *L. brevis* สายพันธุ์ BFC-110 ที่คัดแยกจากกิมจิสามารถผลิตสารกาบาได้ปริมาณสูงถึง 26.70 กรัมต่อลิตร (Kim, 2009) นอกจากนี้ Komatsuzaki, Shima, Kawamoto, Momose, & Kimura (2005) ได้รายงานไว้ว่า *L. paracasei* สายพันธุ์ NFRI 7415 ที่คัดแยกจากปลาหมักพื้นบ้านของญี่ปุ่นมีความสามารถผลิตสารกาบาสูงสุด ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสาร pyridoxal phosphate และมีค่า pH เท่ากับ 5 ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถผลิตสารกาบาได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น

3. การระบุชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีย้อมแกรม พบว่า แบคทีเรียทั้ง 40 ไอโซเลท ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างของเซลล์ที่หลากหลาย คือรูปท่อนยาว รูปท่อนสั้น รูปทรงกลม มีการเรียงตัวของเซลล์ทั้งแบบเซลล์เดี่ยว (single) แบบเป็นคู่ (pairs) และแบบสี่เซลล์ (tetrads) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ คีตาเลสและออกซิเดสให้ผลเป็นลบ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ไอโซเลทที่มีความสามารถสูงที่สุดในการผลิตสารกาบาจากตลาดสดทั้งหมด 2 แห่ง คือ ไอโซเลท N1-2, N2-9, F1-4 และ F2-6 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์ติดสีม่วง เมื่อพิจารณารูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ไอโซเลท N1-2 และ F1-4 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ส่วนไอโซเลท N2-9

และ F2-6 เซลล์มีรูปร่างกึ่งท่อนและทรงกลม
ดั่ง (Table 2) และ (Figure 2) ไอโซเลท N1-2 และ F1-4
น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล
Lactobacillus ในส่วนของไอโซเลท N2-9 และ F2-6
น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Weissella*

หรือ *Leuconostoc* ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยก
ได้จากอาหารหมัก พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์
ในสกุล *Lactobacillus* (Kim et al., 2021), *Weissella*
(Yeong, Hee, & Choon, 2020), *Leuconostoc*
(Lee et al., 2020) เป็นต้น

Table 2 GABA content and physiological characteristics of 4 selected lactic acid bacteria (LAB).

selected bacterial isolate	sample source (location)	GABA content (mg/10g)	cell shape	Gram stain
N1-2	Nham (market1)	0.13±0.01	bacilli	+
N2-9	Nham (market2)	0.05±0.01	short bacilli, cocci	+
F1-4	Plasom (market1)	0.04±0.02	bacilli	+
F2-6	Plasom (market2)	0.02±0.03	short bacilli, cocci	+

+, positive

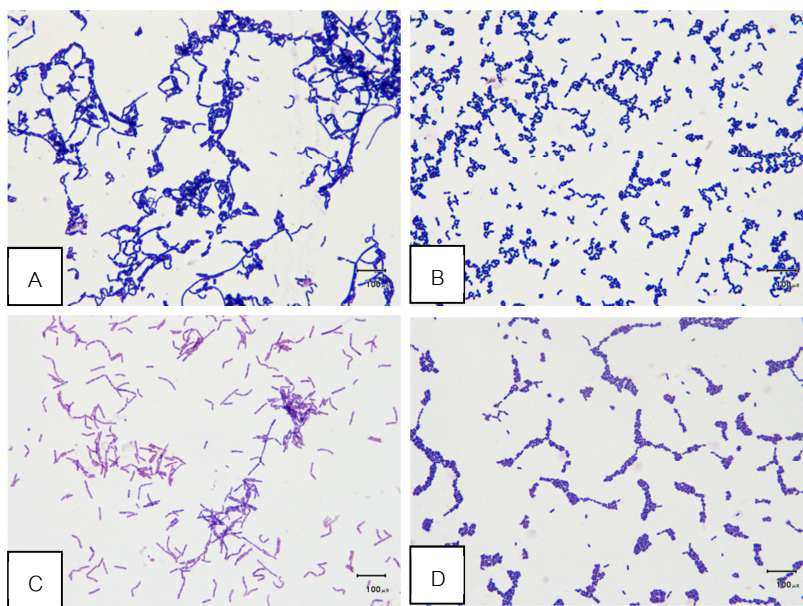


Figure 2 Cell morphology of LAB isolated from fermented foods; N1-2 (A), N2-9 (B), F1-4 (C) and F2-6 (D).

จากการตรวจสอบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA sequences พบว่าไอโซเลท N1-2, N2-9, F1-4 และ F2-6 มีความยาวเท่ากับ 1511, 1535, 1502 และ 1519 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการผลิตสารกาบา จำนวน 4 ไอโซเลท ของยีน 16S rRNA gene ด้วยการใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining และการวิเคราะห์คำนวณแผนภูมิทางสถิติด้วยวิธี maximum composite likelihood ใช้ *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC 11775^T เป็น outgroup พบว่าที่ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.02 ไอโซเลท F1-4 มีลำดับทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันกับ *L. pentosus* 124-2^T ได้ค่า bootstrap เท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ ดัง (Figure 3) ในส่วนของไอโซเลท F2-6 และ N2-9 มีลำดับ

ทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันกับ *W. paramesenteroides* JCM 9890^T ได้ค่า bootstrap เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดัง (Figure 4-5) และไอโซเลท N1-2 มีลำดับทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันกับ *L. plantarum* JCM 1149^T ได้ค่า bootstrap เท่ากับ 51 เปอร์เซ็นต์ ดัง (Figure 6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของแผนภูมิที่เกิดขึ้นของไอโซเลท F1-4 และ N1-2 ยังไม่ถูกต้องสมบูรณ์ เนื่องจากได้เปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap ต่ำ อาจจะต้องใช้รูปแบบจำลองอื่นๆ ที่ให้ผลได้ดีกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Soltis, & Soltis (2016) ที่ได้รายงานว่าในการแยกและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ค่าความเชื่อมั่น bootstrap ที่นำมาใช้สนับสนุนความใกล้เคียงของลำดับพันธุกรรมต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

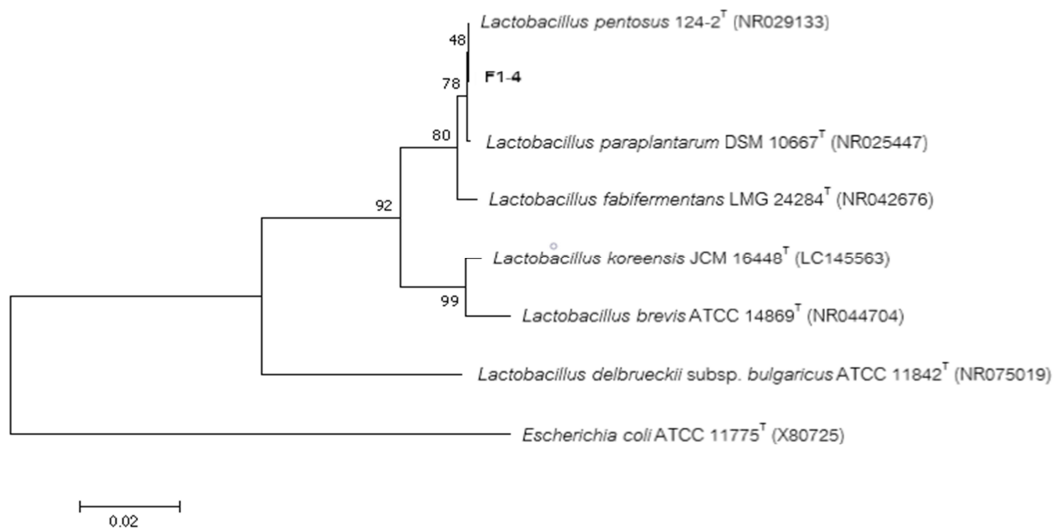


Figure 3 Phylogenetic tree of isolate F1-4 in comparison with bacteria from NCBI database. Scale bar, 0.02 represented substitution per nucleotide position. *E. coli* ATCC 11775^T (X80725) is presented as outgroup sequence.

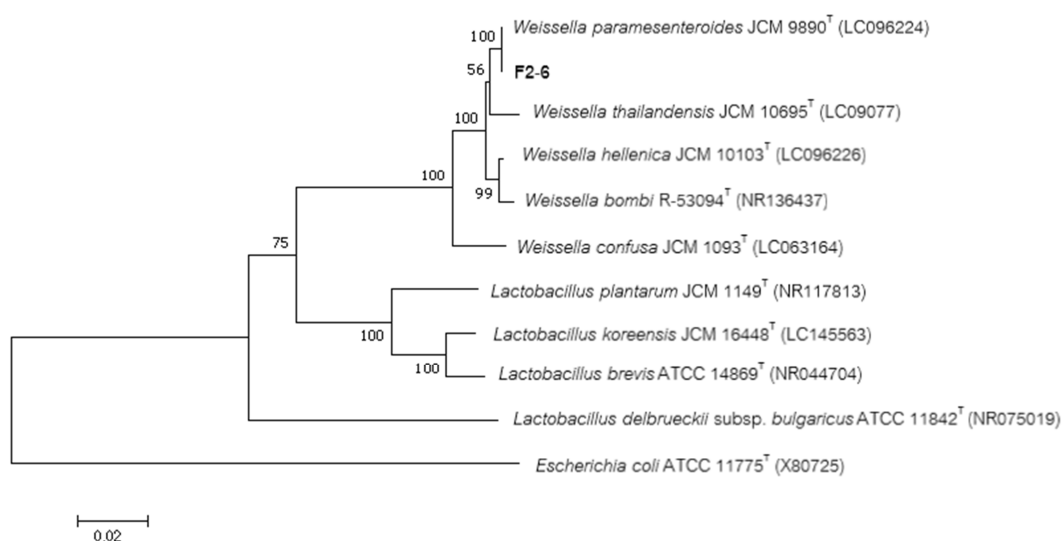


Figure 4 Phylogenetic tree of isolate F2-6 in comparison with bacteria from NCBI database. Scale bar, 0.02 represented substitution per nucleotide position. *E. coli* ATCC 11775^T (X80725) is presented as outgroup sequence.

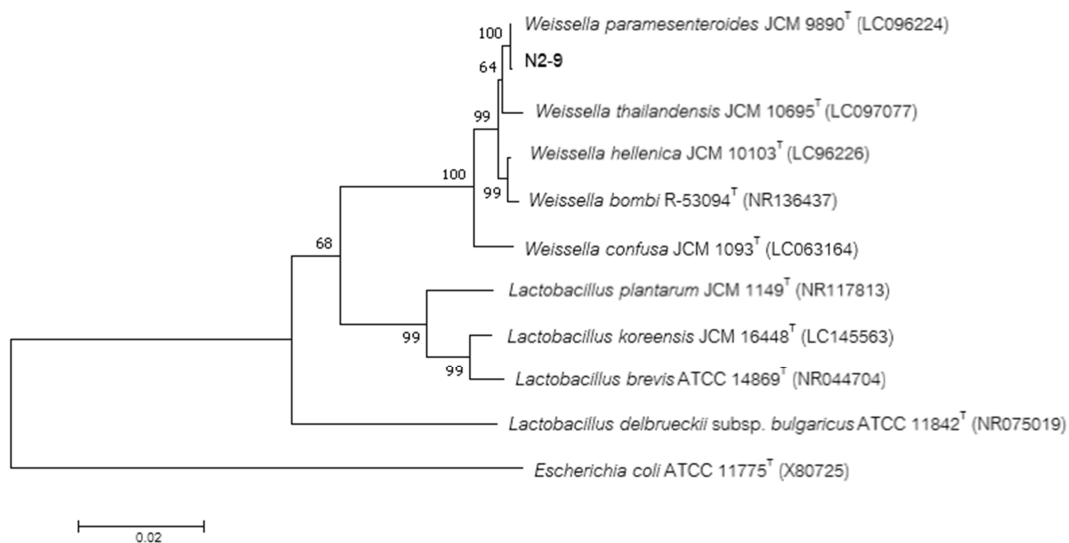


Figure 5 Phylogenetic tree of isolate N2-9 in comparison with bacteria from NCBI database. Scale bar, 0.02 represented substitution per nucleotide position. *E. coli* ATCC 11775^T (X80725) is presented as outgroup sequence.

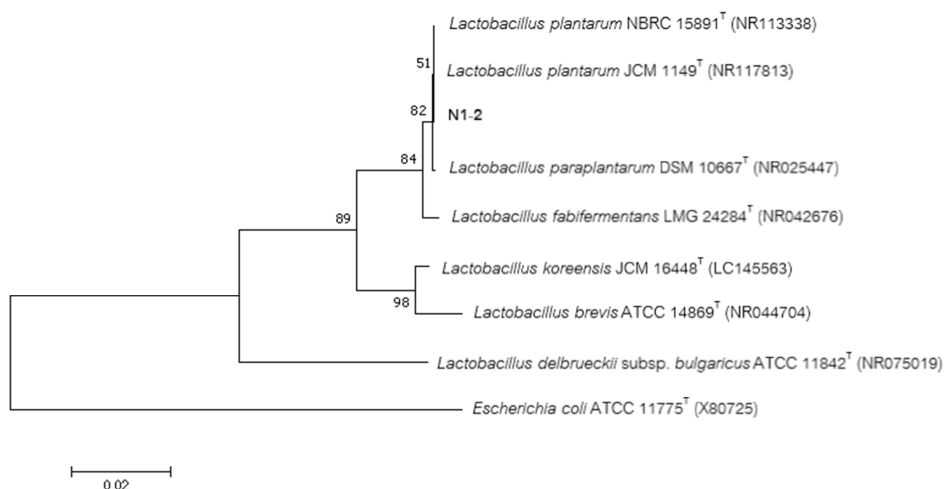


Figure 6 Phylogenetic tree of isolate N1-2 in comparison with bacteria from NCBI database. Scale bar, 0.02 represented substitution per nucleotide position. *E. coli* ATCC 11775^T (X80725) is presented as outgroup sequence.

สรุป

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 2 ชนิด คือ แหนมและปลาซึ่มจากตลาดสด 2 แห่ง ในจังหวัดนครปฐม สามารถสร้างสารกาบาในปริมาณที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจาก 4 กลุ่มตัวอย่างที่ต่างกัน คือ แหนม (ตลาดสด1) แหนม (ตลาดสด2) ปลาซึ่ม (ตลาดสด1) และปลาซึ่ม (ตลาดสด2) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 4 ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการสร้างสารกาบา ได้แก่ ไอโซเลท N1-2, N2-9, F1-4 และ F2-6 โดยสามารถผลิตสารกาบาได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 0.13 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 , 0.04 ± 0.02 และ 0.02 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 4 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์ติดสีแกรมบวก ไอโซเลท N1-2 และ F1-4 เชลล์มีรูปร่างเป็นท่อน

ส่วนไอโซเลท N2-9 และ F2-6 เชลล์มีรูปร่างกึ่งท่อนและทรงกลม สรุปได้ว่า ไอโซเลท N1-2 เป็นชนิด *L. plantarum* ไอโซเลท F1-4 เป็นชนิด *L. pentosus* และไอโซเลท N2-9 กับ ไอโซเลท F2-6 เป็นชนิด *W. paramesenteroides* ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมให้ครอบคลุมเกี่ยวกับการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งที่หลากหลายมากขึ้น ควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารกาบา เช่น อุณหภูมิ เวลา ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของสารตั้งต้น เป็นต้น รวมทั้งควรศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมการสร้างสารกาบาในแบคทีเรียกรดแลคติกต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีงบประมาณ 2563 และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ในการอนุเคราะห์สถานที่และวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright, & A. C. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects* (pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.
- Barla, F., Koyanagi, T., Tokuda, N., Matsui, H., Katayama, T., Kumagai, H., Michihata, T., Sasaki, T., Tsuji, A., & Enomoto, T. (2016). The gamma-aminobutyric acid-producing ability under low pH conditions of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods of Ishikawa Prefecture, Japan, with a strong ability to produce ACE-inhibitory peptides. *Biotechnology Reports*, 10, 105-110.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (1999). *Microbiology: A laboratory manual*. California: Benjamin/Cummings Science.
- Cho, Y. R., Ji, Y. C., & Hae, C. C. (2007). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 104-109.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365-373.
- Jakobs, C., Jaeken, J., & Gibson, K. M. (1993). Inherited disorders of GABA metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16, 704-715.
- Kanklai, J., Somwong, T. C., Rungsirivanich, P., & Thongwai, N. (2021). Screening of GABA-producing lactic acid bacteria from Thai fermented foods and probiotic potential of *Levilactobacillus brevis* F064A for GABA-fermented mulberry juice production. *Microorganisms*, 9, 33.
- Kim, D. S. (2009). *Study on the fermentation in lactic acid bacteria for the production of gamma-aminobutyric acid* (Master's thesis). Hannam University, Daejeon, Korea.
- Kim, H. Y., Shin, M. H., Ryu, S. D., Yun, B. H., Oh, S. N., Park, D. J., & Kim, Y. H. (2021). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria from dry-aged Hanwoo beef. *Food Science of Animal Resources*, 41(3), 468-480.
- Kim, M. J., & Kim, K. S. (2012). Isolation and identification of gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from kimchi. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55, 777-785.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22, 497-504.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.

- Lee, K. W., Kim, G. S., Baek, A. H., Hwang, H. S., Kwon, D. Y., Kim, S. G., & Lee, S. Y. (2020). Isolation and characterization of kimchi starters *Leuconostoc mesenteroides* PBio03 and *Leuconostoc mesenteroides* PBio104 for manufacture of commercial kimchi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1060-1066.
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9, 85-91.
- Manyam, B. V., Katz, L., Hare, T. A., Kaniefski, K., & Tremblay, R. D. (1981). Isoniazid-induced elevation of cerebrospinal fluid (CSF) GABA levels and effects on chorea in Huntington's disease. *Annals of Neurology*, 10, 35-37.
- Park, J. Y., Park, Y. L., Choi, T. R., Kim, H. J., Song, H. S., Han, Y. H., Lee, S. M., Park, S. L., Lee, H. S., Bhatia, S. K., Gurav, R., & Yang, Y. H. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from monosodium glutamate using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis with glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* KCTC 3498. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 37(12), 2225-2231.
- Sanchart, C., Rattanaporn, O., Haltrich, D., Phukpattaranont, P., & Maneerat, S. (2017). *Lactobacillus futsaii* CS3, a new GABA-producing strain isolated from Thai fermented shrimp (Kung-Som). *Indian Journal of Microbiology*, 57, 211-217.
- Satomi, M., Kimura, B., Mizoi, M., Sato, T., & Fujii, T. (1997). *Tetragenococcus muritacus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 832-836.
- Shin, J. W., Kim, D. G., Lee, Y. W., Lee, H. S., Shin, K. S., Choi, C. S., & Kwon, K. S. (2007). Isolation and characterization of *Lactobacillus brevis* AML producing gamma-aminobutyric acid. *Journal of Life Sciences*, 17, 970-975.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2016). Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*, 18(2), 256-267.
- Tanamool, V., Hongsachart, P., & Soemphol, W. (2020). Screening and characterisation of gamma-aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish (Plaasom) in Nong Khai and its application in Thai fermented vegetables (Som-pak). *Food Science and Technology*, 40(2), 483-490.
- Vangpikul, S., & Itsaranuwat, P. (2021). Isolation and selection of lactic acid bacteria with potential probiotics from traditional Thai local pickle products. *RMUTSB Academic Journal*, 9(2), 150-163. (in Thai)
- Weisburg, W. G., Barns, M. S., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.
- Wong, C. G., Bottiglieri, T., & Shead, O. C. (2003). GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54, S3-S12.
- Yeong, M. S., Hee, M. S., & Choon, C. H. (2020). Characterization of high-ornithine-producing *Weissella koreensis* DB1 isolated from kimchi and its application in rice bran fermentation as a starter culture. *Foods*, 9, 1545.