

# การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำพริก ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

## Identification of Lactic Acid Bacteria from Thai's Chilli Pastes Using Nucleotide Sequences of 16S rRNA Gene

นฤมล ธานานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

นวัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์, ศรีสุดา ปันณานุสรณ์ และธีระชัย ธานานันต์\*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

**Narumol Thanananta**

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

**Nawat Ketsawasdiwong, Srisuda Pannanusorn and Theerachai Thanananta\***

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

### บทคัดย่อ

น้ำพริกเป็นอาหารประเภทเครื่องจิ้มชนิดหนึ่ง มีหลากหลายประเภท ประกอบด้วยเครื่องปรุงและสมุนไพรต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย รวมทั้งมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งพบได้ในอาหารที่เกิดจากการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกรดแลคติกซึ่งสามารถช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาอาหาร รวมทั้งสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค งานวิจัยนี้ได้คัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก 5 ชนิด โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร de Man Regosa Sharpe agar (MRS) ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วตรวจสอบลักษณะพื้นฐานและทดสอบทางชีวเคมี แยกแบคทีเรียได้ 29 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก 14 ไอโซเลต และ *Pseudomonas* 15 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลทำให้มั่นใจว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่าง ๆ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Weisella*, และ *Leuconostoc* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม BLASTN เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ของ NCBI พบว่าสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่าง ๆ ได้เป็น *Lactobacillus* 4 ชนิด *Weisella* 1 ชนิด และ *Leuconostoc* 1 ชนิด และเมื่อ

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิเคราะห์การจัดกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มและแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของแบคทีเรียได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : การระบุชนิดของแบคทีเรีย; แบคทีเรียกรดแลคติก; น้ำพริก; ยีน 16S rRNA

## Abstract

Chilli pastes are various pickers with many nutritious ingredients including spices and herbs. They also have other benefits from some fermented microorganisms such as lactic acid bacteria. Therefore, these products contain lactic acid which preserves the shelf life of food and inhibits the food pathogen and microbial spoilages. This study, we focused on screening and identifying lactic acid bacteria from chilli pastes those grown in de Man-Regosa Sharpe agar (MRS) with 1 % CaCO<sub>3</sub>, followed by using molecular biology, the morphology study and biochemistry tests. The result showed that 29 isolates of bacteria were found clear zone on the agar. In 5 chilli pastes, they have 14 isolates of lactic acid bacteria and 15 isolates of *Pseudomonas* spp. By using polymerase chain reaction for investigating molecular biology, lactic acid bacterial isolates were identified as *Lactobacillus*, *Weisella* and *Leuconostoc*. Further investigation using 16S rRNA gene with BLASTN program and compared data in GenBank of NCBI, they could be identified for the species, i.e. 4 species of *Lactobacillus*, 1 species of *Weisella* and 1 species of *Leuconostoc*. Finally, each sample was clearly analyzed for phylogenetic tree and cluster analysis for evolutionary relationships and segmentation.

**Keywords:** identification of bacterial species; lactic acid bacteria; chilli paste; 16S rRNA gene

## 1. คำนำ

น้ำพริก (chilli paste) เป็นอาหารที่เกิดจากภูมิปัญญาของคนไทยมาตั้งแต่โบราณ โดยปรุงด้วยสมุนไพรต่าง ๆ เช่น พริก กระเทียม เครื่องเทศ นำมาโขลกรวมเป็นเนื้อเดียวกัน เป็นกับข้าวที่เป็นเครื่องจิ้ม เพิ่มรสชาติ สี สัน และใช้รับประทานเป็นกับข้าว หรือเป็นส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ ที่ได้รับความนิยมมาจนถึงปัจจุบัน (นิรมล, 2550) น้ำพริกของไทย (Thai's chilli paste) ในแต่ละภูมิภาคมีหลากหลายชนิดและประเภท โดยมีความแตกต่างกันตามวิธีการทำ วัตถุดิบ และเครื่องปรุงที่นำมาประกอบ สามารถจำแนกเป็น 2 ประเภท คือ น้ำพริกสด และน้ำพริกแห้ง

น้ำพริกสดเป็นน้ำพริกที่ทำจากพริกสดมีลักษณะเป็นกึ่งของแข็งและของเหลวผสมกัน โดยส่วนใหญ่เมื่อประกอบเป็นอาหารแล้วนิยมบริโภคทันที เนื่องจากเก็บรักษาได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ มีโอกาสเน่าเสียได้ง่าย แต่มีข้อดี คือ ขั้นตอนการปรุงส่วนใหญ่ไม่ได้ใช้ความร้อน ทำให้สารอาหารต่าง ๆ ไม่ถูกทำลายไปมากนัก ส่วนน้ำพริกแห้งนั้นเป็นน้ำพริกที่ปรุงจากพริกแห้ง มีลักษณะป่นและบรรจุอยู่ในภาชนะที่แห้งและสะอาด แต่น้ำพริกแห้งมีปริมาณน้ำในอาหารน้อยและมักใส่วัตถุดิบเสีย จึงสามารถเก็บได้นานและพบจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้น้อยกว่าน้ำพริกสด (วีรยา, 2554)

ปัจจุบัน น้ำพริกยังคงได้รับความนิยมบริโภค

กันอย่างแพร่หลาย จึงมีขายตามท้องที่ต่าง ๆ ทั้งในตลาดสดและห้างสรรพสินค้า จึงมีภาวะเสี่ยงต่อความสะอาด ทำให้มีปัญหาเกิดขึ้น คือ มีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ เช่น จุลินทรีย์ก่อที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งมีผลต่ออายุในการเก็บรักษา โดยเฉพาะน้ำพริกสดที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบปริมาณสูง อาจพบจุลินทรีย์ที่เป็นโทษได้ ถ้าปรุงไม่สะอาดเพียงพอ อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งอาจพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ได้เช่นกัน เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เป็นโทษ ซึ่งเรียกว่าโพรไบโอติก (probiotic) ที่สามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ และยังส่งเสริมการทำงานของระบบทางเดินอาหาร จึงมีผลช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ และมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค (บุษกร, 2552)

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำพริก

บทความวิจัยที่เผยแพร่ไปแล้ว (นวัณ และคณะ, 2559) ได้เก็บตัวอย่างน้ำพริก 5 ชนิด ที่วางขายในตลาดใต้ร่มหอสราโรจน์ ถนนสุขุมวิท ตำบลเนินพระ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง ได้แก่ น้ำพริกปลาร้า (PR) 3 ตัวอย่าง คือ ยี่ห้อ A, B และ C น้ำพริกหนุ่ม (NU) 2 ตัวอย่าง คือ ยี่ห้อ D และ E น้ำพริกกะปิ (KP) 1 ตัวอย่าง คือ ยี่ห้อ F น้ำพริกกุ้งจ่อม (KJ) 1 ตัวอย่าง คือ ยี่ห้อ G และน้ำพริกมะม่วง (MG) 1 ตัวอย่าง คือ ยี่ห้อ H แล้วนำมาคัดกรองหาแบคทีเรียกรดแลคติก โดยชั่งตัวอย่างน้ำพริก 25 กรัม ใส่ลงในถุงซิปลือกอเนกประสงค์ แล้วเติม สารละลาย phosphate buffer solution (PBS) pH 7.0 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมจนเป็น

เนื้อเดียวกัน ซึ่งมีระดับการเจือจางเป็น  $10^{-1}$  แล้วดูดแต่ละตัวอย่างไปเจือจางต่อที่ระดับการเจือจางตั้งแต่  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$  (Draft International Standard, 2014) แล้วดูดตัวอย่างที่เจือจางในแต่ละระดับการเจือจางใส่ลงในอาหาร de Man Regosa Sharpe (MRS) agar ที่ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) แล้วเกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้ว บ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีที่เกิดเป็นวงใส (clear zone) บนอาหารมาตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการตรวจสอบลักษณะสัณฐานและการทดสอบทางชีวเคมี โดยแยกแบคทีเรียได้ 29 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกและ *Pseudomonas* 14 และ 15 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งได้นำมาวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลในงานวิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้เพื่อให้ระบุได้อย่างละเอียด ถูกต้อง และแม่นยำยิ่งขึ้น

### 2.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

#### 2.2.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบใช้โคโลนี

โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยไพรเมอร์สากล (universal primer) 2 คู่ (บริษัท Sigma-Aldrich Chemie ประเทศสหรัฐอเมริกา) จำนวน 4 สาย คือ (1) F27 (forward primer ชั้นที่ 1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG-3' ( $T_m = 65.1$  องศาเซลเซียส) (2) F984 (forward primer ชั้นที่ 2) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3' ( $T_m = 55.2$  องศาเซลเซียส) (3) F'984 (reverse primer ชั้นที่ 1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-GTAAGTTC TTCGCGTT-3' ( $T_m = 55.2$  องศาเซลเซียส) และ (4) R1492 (reverse primer ชั้นที่ 2) มีลำดับนิวคลีโอ

ไอโทด คือ 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' ( $T_m = 62.5$  องศาเซลเซียส) (Heuer *et al.*, 1997)

ไซม์จัมพันธ์ปราศจากเชื้อเชื้อโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ 1 โคโลนี มาผสมกับ TE บัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตก แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $OD_{260}$ ) จากนั้นเจือจางให้ตัวอย่างมีค่า  $OD_{260}$  เท่ากับ 0.1 แล้วดูด 1-2 ไมโครลิตร ผสมกับสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ลูกลูโซฟอลิเมอเรสในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร (นฤมล และธีระชัย, 2553; นฤมล และธีระชัย, 2554) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ของบริษัท RBC Bioscience (ไต้หวัน) แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermocycler โดยตั้งอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ลูกลูโซฟอลิเมอเรส คือ (1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (3) annealing ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดย (2)-(4) ทำซ้ำ 25 รอบ และ (5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา ลูกลูโซฟอลิเมอเรส ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 4-8 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (คู่ไพรเมอร์ F27 และ F'984) และขนาดประมาณ 500 คู่เบส (คู่ไพรเมอร์ F984 และ R1492) จากนั้นจึงส่งผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท SolGent และ Bioneer ประเทศเกาหลีใต้

2.2.2 การประกอบเป็นสายเดียวกันและการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*

เมื่อได้รับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอประมาณ 1,000 และ 500 คู่เบส มาแล้ว จึงนำมาประกอบเป็นสายเดียวกันและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้อง เพื่อให้ได้ยีน *16S rRNA* ที่สมบูรณ์สำหรับใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรียต่อไป

โดยตรวจสอบและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องตามกราฟโครมาโตแกรม (chromatogram) ด้วยโปรแกรม Bioedit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายหน้า (forward primer) และลำดับนิวคลีโอไทด์สายหลัง (reverse primer) มาประกอบให้เป็นสายเดียวกัน โดยงานวิจัยนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์สายหลังที่ได้จากไพรเมอร์ F'984 และ R1492 มากลับลำดับนิวคลีโอไทด์ (reverse complement) ให้เป็นสายหน้าด้วยโปรแกรม Reverse Complement ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 สาย ที่ได้จากไพรเมอร์ F27, F'984, F984 และ R1492 ซึ่งมีส่วนซ้อนทับกัน (overlap) มาเชื่อมต่อและประกอบรวมกันทั้งหมด โดยทำเหมือนกันในทุกตัวอย่าง ซึ่งจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายที่สมบูรณ์ของ *16S rRNA* จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไประบุชนิดของแบคทีเรียต่อไป

2.2.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ที่สมบูรณ์ครบทุกตัวอย่างแล้ว นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม BLASTN ในฐานข้อมูล GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลจน

ทราบสกุลและชนิดของแบคทีเรียที่มีความเหมือนหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยเลือกจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identities) สูงสุด แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดมาจัดเรียงและเปรียบเทียบตำแหน่งต่าง ๆ (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) และกราฟสำหรับการวิเคราะห์การจัดแบ่งกลุ่มต่อไป

2.2.4 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

หลังจากจัดเรียงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์เรียบร้อยแล้ว นำข้อมูลทั้งหมดมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net>) โดยการเลือกวิธีการสร้างแบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining และใช้สูตรการคำนวณแผนภูมิทางสถิติของ maximum composite likelihood ที่มีการตั้งค่าจำนวนรอบในการสร้างแผนภูมิที่เป็นไปได้มากที่สุดเท่ากับ 1,000 รอบ (Bootstrap method) สังเกตและบันทึกแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้

2.2.5 การสร้างกราฟสำหรับวิเคราะห์การจัดแบ่งกลุ่ม

นำข้อมูลของตัวอย่างทั้งหมดมาจัดแบ่งกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc-2.01e (<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>) ซึ่งข้อมูลที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมนี้ต้องอยู่ในรูปแบบเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งทำได้โดยนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบของเครื่องหมายโมเลกุลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel โดยข้อมูลที่นำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลจะเลือกเฉพาะตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 2 นิวคลีโอไทด์ ซึ่ง

เพียงพอสำหรับการจัดแบ่งกลุ่มในระดับชนิด และผลของกราฟที่แสดงออกจะอยู่ในรูปแบบที่ง่ายและไม่ซับซ้อน จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดเข้าสู่โปรแกรม NTSYSpc-2.01e แล้วคำนวณทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ค่าทั่วไป (general) ค่าความคล้ายคลึงกัน (similarity) และค่าการจัดลำดับตัวอย่าง (ordination) ออกมา จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาแสดงผลในรูปแบบของกราฟการกระจายแบบ 2 มิติ (XY scatter) ผ่านโปรแกรม Microsoft Excel สังเกตกราฟและบันทึกผลที่ได้

### 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

#### 3.1 การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก 5 ชนิด

ผลการวิจัยพบว่าสามารถคัดกรองแบคทีเรียจากน้ำพริก 5 ชนิด ได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต (isolate) คือ น้ำพริกปลาร้า 13 ไอโซเลต ได้แก่ ยี่ห้อ A คือ PR01 ยี่ห้อ B คือ PR02, PR03, PR04, PR05, PR06, PR07 และ PR08 ยี่ห้อ C คือ PR09, PR10, PR11, PR13 และ PR14 น้ำพริกหนุ่ม 5 ไอโซเลต ได้แก่ ยี่ห้อ D คือ NU01 และ NU02 ยี่ห้อ E คือ NU03, NU04 และ NU05 น้ำพริกกะปิ 3 ไอโซเลต ได้แก่ ยี่ห้อ F คือ KP01, KP02 และ KP04 น้ำพริกกุ้งจ่อม 5 ไอโซเลต ได้แก่ ยี่ห้อ G คือ KJ01, KJ02, KJ03, KJ04 และ KJ05 น้ำพริกมะม่วง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ยี่ห้อ H คือ MG01, MG02 และ MG03 โดยทั้ง 29 ไอโซเลต น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกเนื่องจากมีการสร้างวงใส (clear zone) เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง MRS ส่วนกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นนั้นเมื่อทำปฏิกิริยากับ  $\text{CaCO}_3$  ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์เชิงซ้อนของ  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)_2$  น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น (Moorehead and Shumway, 2008) ซึ่งสารเชิงซ้อน  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)_2$  ทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็งและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการ

คัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีอื่น ๆ ต่อไป (นวัณณ์ และคณะ, 2559)

### 3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีชีวโมเลกุล

#### 3.2.1 ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ระบุได้

จากบทความวิจัยที่เผยแพร่ไปแล้ว (นวัณณ์ และคณะ, 2559) ได้ระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการตรวจสอบลักษณะสัณฐานและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำพริกปลาร้าและน้ำพริกหนุ่ม จำนวน 16 ไอโซเลต พบว่าสามารถระบุได้ในระดับสกุล

จำนวน 2 สกุล คือ *Lactobacillus* และ *Weissella*

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียทั้ง 29 ไอโซเลต แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกให้ละเอียดมากขึ้นโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่าแบคทีเรีย 14 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียกรดแลคติก แบ่งเป็น 3 สกุล และ 6 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยเลือกค่าความเหมือน 96-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความน่าเชื่อถือ และถูกต้องสูง ส่วนแบคทีเรียอีก 15 ไอโซเลต ที่เหลือ คือ *Pseudomonas* แบ่งเป็น 3 ชนิด

ตารางที่ 2 ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank

หมายเลขไอโซเลต (isolate) (นวัณณ์ และคณะ, 2559)	แบคทีเรียกรดแลคติกใน GenBank		
	สกุล (genus)	ชนิด (species)	สายพันธุ์ (strain)
KP01	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	JBE 245
KJ02, KJ03, KJ05 และ PR14	<i>Lactobacillus</i>	<i>faracinis</i>	DSM 20185
KJ04	<i>Lactobacillus</i>	<i>faracinis</i>	Y124D
PR13	<i>Lactobacillus</i>	<i>faracinis</i>	NBRC 107150
PR02	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	NRIC 0125
PR07 และ PR11	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	23k
PR09	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidipiscis</i>	LZLJ18-1
PR10	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidipiscis</i>	Ni 1465
KP04	<i>Weissella</i>	<i>viridescens</i>	JCM 1174
NU01	<i>Leuconostoc</i>	<i>galicum</i>	IMAUFB 093

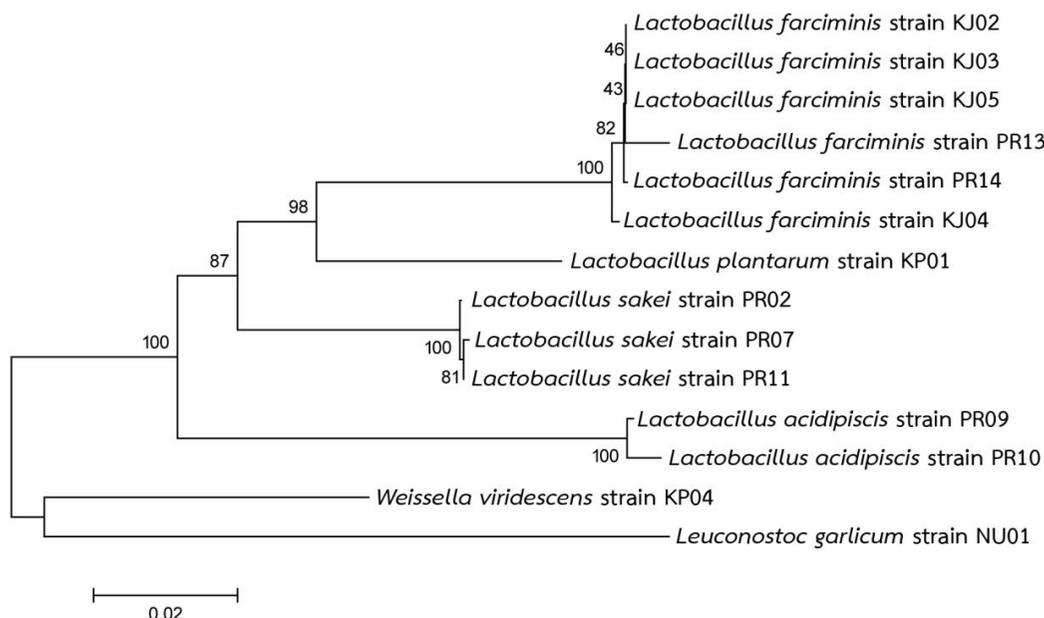
#### 3.2.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก

การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 14 ไอโซเลต จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม MEGA 6.06 โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining และวิเคราะห์แผนภูมิทาง

สถิติด้วยวิธี maximum composite likelihood พบว่าที่ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.02 มีสกุล *Lactobacillus* มีชนิดที่แตกต่างกันและสามารถแยกความแตกต่างกันของพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน รวมถึง *Weissella viridescens* และ *Leuconostoc garlicum* ซึ่งมีความแตกต่างของพันธุกรรมเช่นกัน แต่บางสายพันธุ์อาจแบ่งแยกได้ไม่ชัดเจน เนื่องจาก

มีพันธุกรรมเหมือนหรือใกล้เคียงกันมาก ส่งผลให้แผนภูมิตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีลักษณะซ้อนทับกัน ตัวอย่าง เช่น *Lactobacillus farciminis* strain KJ02, KJ03, และ KJ05 ซึ่งมีค่า Bootstrap

เพียง 43-46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแผนภูมิที่ได้ อาจยังไม่ถูกต้องสมบูรณ์นัก และอาจมีรูปแบบจำลองอื่นที่เป็นไปได้อีก ดังรูปที่ 1

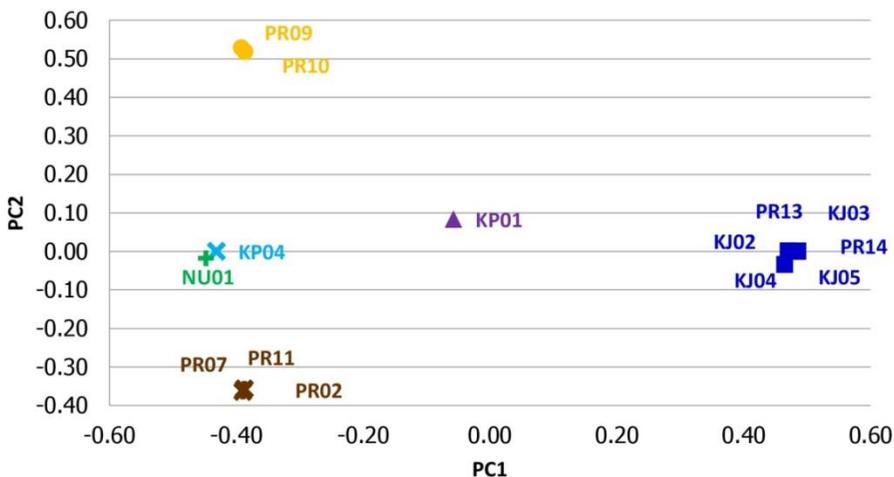


รูปที่ 1 แผนภูมิตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก 14 ไอโซเลต

### 3.2.3 กราฟสำหรับการวิเคราะห์การจัดแบ่งกลุ่ม

เมื่อวิเคราะห์การจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc-2.01e และสร้างกราฟด้วยโปรแกรม Microsoft excel พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์สามารถจัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะชนิดของแบคทีเรียได้อย่างชัดเจน ซึ่งพล็อตข้อมูลได้โดยใช้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่อยู่ในรูป 2 มิติ (2D) หรือ physical coordinate (PC) โดยกำหนดให้ PC1 คือ ระยะห่างทางพันธุกรรมในแนวแกน X และ PC2 คือ ระยะห่างทางพันธุกรรมในแนวแกน Y จึงทำให้เกิดการกระจายของข้อมูลต่าง ๆ ออกไป และทำให้เห็น

ข้อมูลที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันหรือใกล้เคียงกันจะมาอยู่ติดกันเป็นกลุ่ม ๆ ซึ่งผลที่ได้จากการจัดแบ่งกลุ่มมีความใกล้เคียงกันกับแผนภูมิตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยจากรูปที่ 2 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดมีการกระจายเพียงเล็กน้อย เนื่องจากมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกเฉพาะตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียง 2 นิวคลีโอไทด์ ในการสร้างเป็นเครื่องหมายโมเลกุล จึงมีความละเอียดของข้อมูลไม่มากนัก ดังนั้นแบคทีเรียบางสายพันธุ์จึงมีข้อมูลไม่มากพอสำหรับการพล็อตกราฟ เช่น *Leuconostoc garlicum* และ *Weissella viridescens* (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 กราฟการกระจายแบบ 2 มิติ สำหรับการจัดกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก 14 ไอโซเลต [■ คือ *Lactobacillus farciminis*, ▲ คือ *Lactobacillus plantarum*, ● คือ *Lactobacillus acidipiscis*, \* คือ *Lactobacillus sakei*, + คือ *Leuconostoc galicum* และ ✕ คือ *Weissella viridescens*]

#### 4. สรุป

การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกพบว่าได้แบคทีเรียกรดแลคติก 14 ไอโซเลต เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* พบว่าระบุแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 6 ชนิด ใน 3 สกุล และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและกราฟสำหรับวิเคราะห์การจัดแบ่งกลุ่ม พบว่ามีความสอดคล้องกัน โดยมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *16S rRNA* นี้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และมีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจสอบลักษณะสัญญาณและการทดสอบทางชีวเคมี อย่างไรก็ตาม โครงสร้างบางส่วนของแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีค่า Bootstrap ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้แบบจำลองหรือวิเคราะห์แผนภูมิทางสถิติด้วยวิธีอื่น ๆ เพิ่มเติม หรือเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทนสนับสนุนการวิจัยจาก กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 ภายใต้ทุนวิจัยทั่วไปตามสัญญาเลขที่ ทน 28/2558

#### 6. รายการอ้างอิง

- นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2553, การใช้เทคนิคคูเพิล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกบางชนิดในโยเกิร์ต, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 18(2): 19-24.
- นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2554, การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียในกุ้งแช่แข็งด้วยมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 19(2): 12-17.
- นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การตรวจสอบแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัสออเรียสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส, Thai J. Sci. Technol. 1(2): 121-126.

นวัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์, วีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2559, การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก, Thai J. Sci. Technol. 5(1): 67-76.

นิรมล ยูวนบุญ, 2550, น้ำพริก : ฐานทรัพยากรอาหาร วิถีชุมชน ภายใต้กระแสโลกาภิวัตน์, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, กรุงเทพฯ.

บุษกร อุตริชาติ, 2552, จุลชีววิทยาทางอาหาร, พิมพ์ครั้งที่ 4, บริษัท นำศิลป์โฆษณา จำกัด, สงขลา.

วีรยา การพานิช, 2554, กรดเบนโซอิก : วัตถุประสงค์เสียที่นิยมใช้ในอาหาร, สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, นครปฐม.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548, จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, มอก. 2239-2548.

Draft International Standard, 2014, Microbiology of the Food Chain – Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination – Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions, Draft Önorm EN ISO 6887-1.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E.M.H., 1997, Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, Appl. Environ. Microbiol. 63(8): 3233-3241.

Moorehead, A.W. and Shumway, W.W., 2008, Methods and compositions relating to the control of the rates of acid-generating compounds in acidizing operations, U.S. Patent 1-24.