

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ
ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ผ่องพรรณ บุญประสม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ
ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

โดย

ผ่องพรรณ นุญประสม

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)

วันที่ 22 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

กรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 22 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.วสิน เจริญคันธกุล)

วันที่ 22 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 22 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

สำนักงานบัณฑิตศึกษารับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 23 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

ชื่อเรื่อง	การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
ชื่อผู้เขียน	นางสาวผ่องพรรณ บุญประสม
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.มงคล ธีรบุญยานนท์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากมูลเด็กทารกและน้ำนมหมัก เพื่อทดสอบคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรด pH 2.5 ความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง คุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะ ผลจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย 20 ไอโซเลต มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี MTT และเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด 7 ไอโซเลตคือ MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12 และ RM28 มาทำการศึกษาประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี Trypan Blue exclusion พบว่าเมื่อบ่ม cultured medium ของแบคทีเรียร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้อยู่ระหว่าง 23-39 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงสุด และเมื่อบ่มตัวเซลล์ของแบคทีเรียร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้อยู่ระหว่าง 21-34 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด และเมื่อบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้อยู่ระหว่าง 24-45 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตนี้ยังมีประสิทธิภาพการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้ดีอีกด้วย จากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับเบส ดีเอ็นเอส่วน 16S rRNA พบว่า MC31 คือ *Pediococcus pentosaceus* MC52 คือ *Lactobacillus salivarius* MC53 คือ *Lactobacillus salivarius* MC101 คือ *Enterococcus faecium* RM11 คือ *Enterococcus faecium* RM12 คือ *Lactobacillus fermentum* และ RM28 คือ *Lactobacillus fermentum*

โปรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลตนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ในรูปแบบของตัวเซลล์แบคทีเรียหรือในกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ



Title	Selection and Study the Activities of Probiotic Bacteria on Inhibiting Proliferation of Colon Cancer Cells
Author	Miss Pongphun Boonprasom
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Mongkol Thirabunyanon

ABSTRACT

This research on the isolation of lactic acid bacteria from infant faeces and fermented milks was conducted in order to test their probiotic properties such as the ability to inhibit foodborne pathogens, tolerance to low pH 2.5 and 0.3% bile salt, haemolytic activity and antibiotic resistance. Results of the study showed that 20 bacterial isolates were found to exhibit probiotic properties and when these bacterial isolates were later tested for their ability to inhibit the growth of colon cancer cells through MTT assay, 7 isolates consisting of MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12 and RM28 showed the highest inhibiting ability. These bacterial isolates were then again tested for their inhibiting property by using the Trypan Blue exclusion method. Results indicated that when the cultured medium of these bacterial isolates was incubated with colon cancer cells for 24 hours, these bacterial isolates were found to have an efficiency rates of 23-39% of inhibiting the growth of colon cancer cells. In addition, bacterial isolate MC53 was found to show the highest inhibiting efficiency. When these cells of 7 bacterial isolates were incubated with colon cancer cells for 24 hours, these bacterial isolates had an efficiency rates of 21-34% to inhibit the growth of colon cancer cells with bacterial isolate MC31 having the highest efficiency. And when incubated for 48 hours, it was found that these that 7 bacterial isolates had an efficiency rates of 24-45% to inhibit the growth of colon cancer cells with bacterial isolate MC31 had the highest efficiency. Further results showed that these 7 bacterial isolates were also able to attach themselves to Caco-2 cells. The identification and classification of these bacterial isolates using the DNA base 16S rRNA indicated that MC31 was *Pediococcus pentosaceus*,

MC52 and MC53 were *Lactobacillus salivarius*, MC101 and RM11 were *Enterococcus faecium* while RM12 and RM 28 were *Lactobacillus fermentum*.

From this study, it can be recommended that these 7 bacterial isolates could be used to prevent or treat colon cancer as applied in the form of bacterial cells or may be further developed into many types of fermented food products.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และอาจารย์ ดร.วศิน เจริญต้นธนากุล กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และสนับสนุนในเรื่องของอุปกรณ์ สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและ เป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อไพฑูรย์ บุญประสม คุณอัครกฤษณ์ บุญประสม คุณปู่ คุณย่า และญาติพี่น้องทุกคนที่คอยให้การสนับสนุน ให้ทุนการศึกษา ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและให้ กำลังใจในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เสมอมา

ผ่องพรรณ บุญประสม

ธันวาคม 2551

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญเรื่อง	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
สารบัญภาพภาคผนวก	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
โรคมะเร็งลำไส้	3
ระยะต่าง ๆ ของโรคมะเร็งลำไส้	5
การรักษาโรคมะเร็งลำไส้	6
การตายของเซลล์แบบอะพอพอโทซิส	8
วิถีของอะพอพอโทซิส	10
ความสำคัญของไมโทคอนเดรียต่ออะพอพอโทซิส	11
บทบาทของจุลินทรีย์ในลำไส้	13
ความผิดปกติของจุลินทรีย์ในลำไส้	14
โปรไบโอติกแบคทีเรีย	14
คุณสมบัติของแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก	15
บทบาทและการประยุกต์ใช้โปรไบโอติก	17
บทบาทของโปรไบโอติกในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้	20
บทบาทของโปรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	24
กรอบแนวความคิด	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	27

อุปกรณ์ในการวิจัย	27
วิธีวิจัย	31
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	43
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	83
ข้อเสนอแนะ	84
บรรณานุกรม	85
ภาคผนวก	104
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการ	105
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	109
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของ DNA ในส่วน 16S rRNA	114
ภาคผนวก จ ประวัติผู้วิจัย	129

สารบัญตาราง

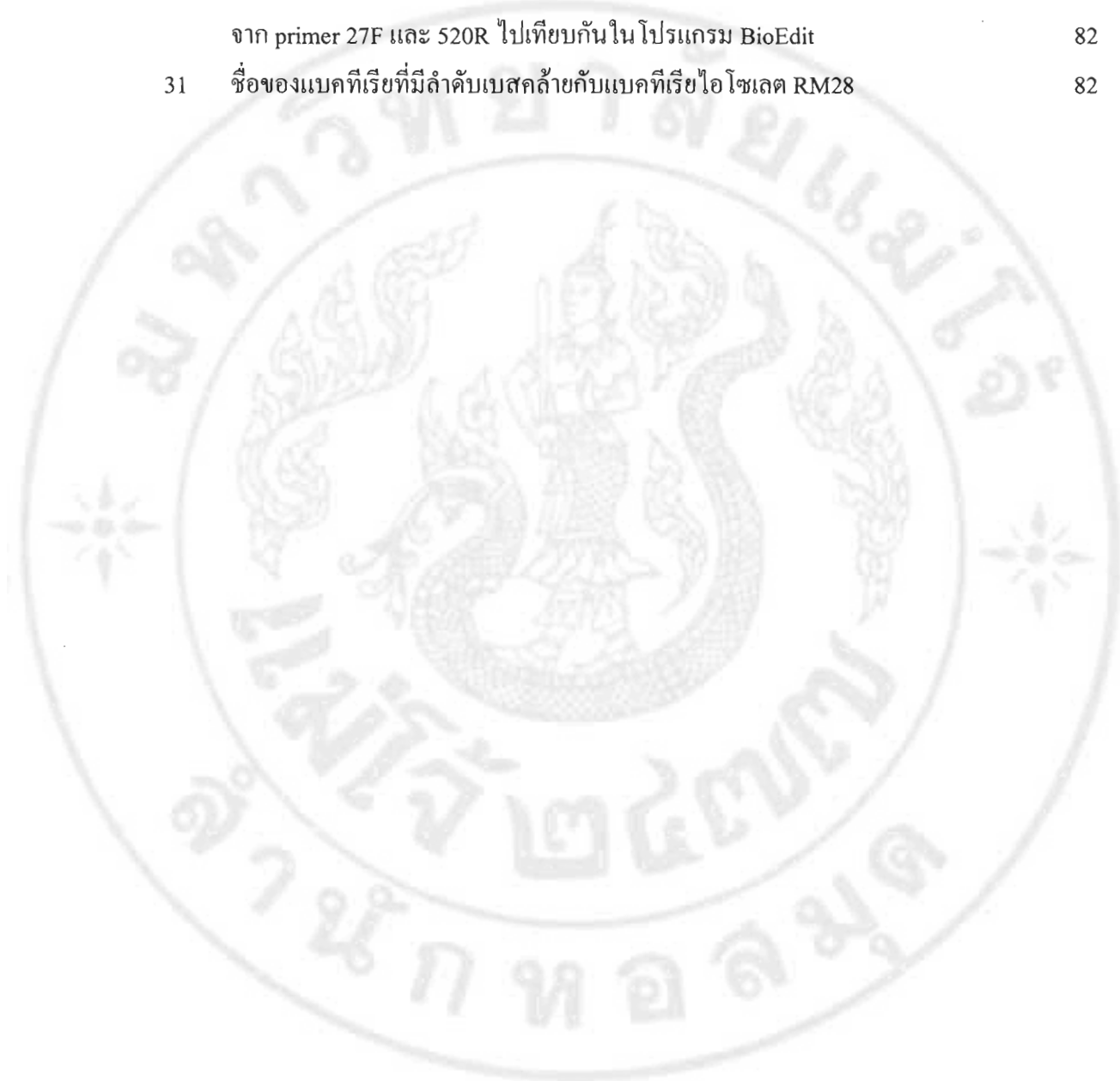
ตาราง	หน้า
1 ตัวควบคุมอะพอพโทซิสชนิดทำให้เกิดการตาย (proapoptotic) และชนิดยับยั้งการตาย (anti-apoptotic)	11
2 แบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นโปรไบโอติก	16
3 รูปร่างและจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	44
4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญในระบบทางเดินอาหาร 8 สายพันธุ์	46
5 กิจกรรมการต้านยาปฏิชีวนะและการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรีย	58
6 ลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง การจัดเรียงตัว ขนาดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	70
7 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA	84

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 กระบวนการก่อมะเร็งลำไส้	3
2 ลักษณะรูปแบบการตายแบบเนโครซิสและอะพอพโทซิส	8
3 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลเด็กทารก) ที่รอดชีวิต ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด pH 2.5	51
4 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากน้ำนมหมัก) ที่รอดชีวิต ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด pH 2.5	51
5 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลของเด็กทารก) ที่รอดชีวิต ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือ น้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์	54
6 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากน้ำนมหมัก) ที่รอดชีวิต ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือ น้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์	55
7 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลของเด็กทารก) โดยใช้วิธี MTT assay	60
8 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของแบคทีเรีย (แยกได้จากน้ำนมหมัก) โดยใช้วิธี MTT assay	60
9 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลของเด็กทารก) โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion	62
10 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของแบคทีเรีย (แยกได้จากน้ำนมหมัก) โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion	63
11 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลของเด็กทารก) โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion	64
12 อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากน้ำนมหมัก) โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion	65
13 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2	68
14 อัตราการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์ Caco-2	68
15 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง ของแบคทีเรียไอโซเลต MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12 และ RM28	71

16	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลต MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12 และ RM28	72
17	ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งลำดับเบสบริเวณ V_1 - V_3	75
18	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC31 ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	76
19	ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC31	76
20	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	77
21	ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC52	77
22	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	78
23	ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC53	78
24	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC101 ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	79
25	ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC101	79
26	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM11 ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	80
27	ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต RM11	80
28	ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM12 ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	81
29	ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต RM12	81

- 30 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM28
ที่จะนำไปเทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้
จาก primer 27F และ 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit 82
- 31 ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต RM28 82



สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวก	หน้า
1 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC31 ที่ได้จาก primer 27F	115
2 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC31 ที่ได้จาก primer 520R	116
3 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ที่ได้จาก primer 27F	117
4 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ที่ได้จาก primer 520R	118
5 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC53 ที่ได้จาก primer 27F	119
6 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC53 ที่ได้จาก primer 520R	120
7 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC101 ที่ได้จาก primer 27F	121
8 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC101 ที่ได้จาก primer 520R	122
9 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM11 ที่ได้จาก primer 27F	123
10 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM11 ที่ได้จาก primer 520R	124
11 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM12 ที่ได้จาก primer 27F	125
12 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM12 ที่ได้จาก primer 520R	126
13 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM28 ที่ได้จาก primer 27F	127
14 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM28 ที่ได้จาก primer 520R	128

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งลำไส้ (Colon cancer) เป็นโรคที่พบมากขึ้น และเป็นสาเหตุการตายในอันดับต้น ๆ ของโรคมะเร็งทั้งหมด โดยการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ส่วนใหญ่นั้นมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่ขาดหลักทางโภชนาการ Bingham (1999) รายงานถึงภาวะเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ที่เกิดจากการรับประทานอาหารประเภทไขมันหรืออาหารที่มีเนื้อแดงมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Guamer and Malagelada (2003) ที่พบว่าการรับประทานอาหารไขมันหรือเนื้อแดงโดยไม่รับประทานผักหรือผลไม้ จะส่งผลให้แบคทีเรียในลำไส้สร้างสาร N-nitrosamine และ heterocyclic aromatic amines ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งขึ้นมา การพัฒนาการของมะเร็งลำไส้พบว่ามีหลายขั้นตอน แต่จะมีจุดเริ่มต้นตรงที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีน oncogenes และ tumor suppressor genes ซึ่งจะนำไปสู่การเริ่มต้นเป็นมะเร็งในที่สุด (Fearon and Vogelstein, 1990) ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งลำไส้สามารถทำได้ 3 วิธีคือ การผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัด และการฉายรังสีรักษา ซึ่งการรักษาตามวิธีดังกล่าวอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยได้ อีกทั้งยังพบว่าทรัพยากรที่นำมาใช้ในการบำบัดหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้มีปริมาณมาก อาทิเช่น ยาหรือสารเคมี ซึ่งส่วนใหญ่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้ในแต่ละปีประเทศของเราจะต้องเสียเงินจำนวนมากในการจัดหาทรัพยากรเหล่านี้ รวมถึงรัฐบาลจะต้องจัดทรัพยากรอื่นมาดูแลคนป่วยเพิ่มเติม เป็นต้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงพยายามศึกษาและคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยกลไกการป้องกันเซลล์มะเร็งลำไส้ยังไม่มีทราบแน่ชัดเท่าที่ควร แต่สามารถสรุปถึงกลไกในการป้องกันมะเร็งลำไส้ในเบื้องต้นได้ดังนี้ การเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ การเปลี่ยนแปลงขบวนการสรีระหรือเคมีในลำไส้ การจับหรือทำลายสารก่อมะเร็งในลำไส้ และการผลิตสารต่อต้านการสร้างสารก่อมะเร็ง (Rafter, 2003) ในต่างประเทศมีนักวิจัยที่มีความสนใจถึงบทบาทของโปรไบโอติกแบคทีเรียในการป้องกันหรือรักษามะเร็งลำไส้เป็นจำนวนมาก แต่ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าวมี

น้อยมาก ซึ่งงานวิจัยในเรื่องดังกล่าวนี้จะเป็นประโยชน์ต่อประชาชนได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้หากผลการวิจัยเป็นไปตามความคาดหวัง ผู้วิจัยสามารถนำเชื้อโปรไบโอติกหรือความรู้ไปประยุกต์ใช้ให้กับประชาชนได้ เพื่อลดการนำเข้ายาที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ ซึ่งการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้โดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายไม่แพงและไม่มีผลข้างเคียงใดๆ อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดีจากมูลเด็กทารกและน้ำนมหมัก
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

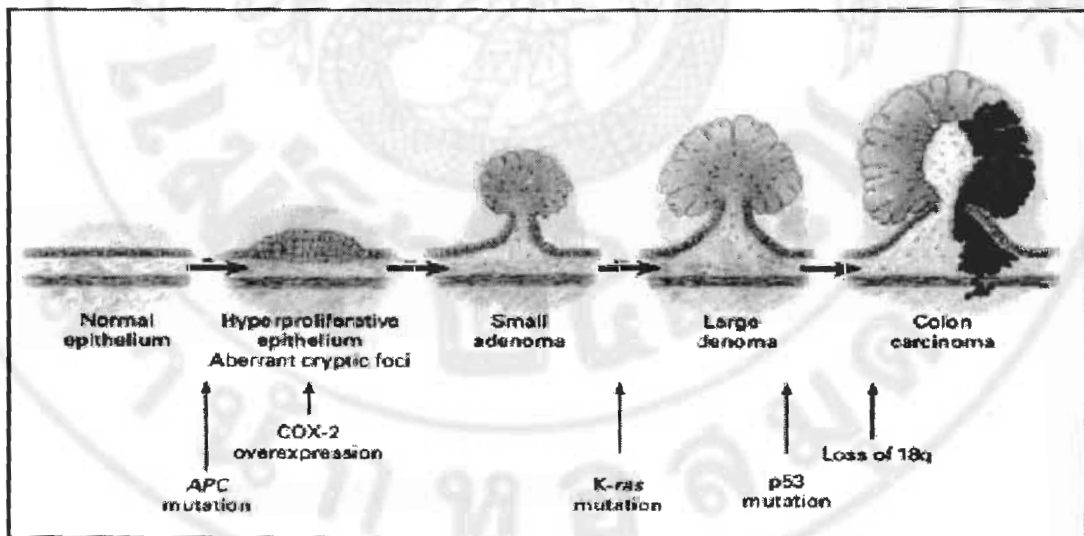
สามารถคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ อีกทั้งยังได้ข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกแบคทีเรียทางด้านการแพทย์ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรไบโอติก เพื่อเป็นการลดการนำเข้าของยาและสารเคมีจากต่างประเทศ และใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ ซึ่งทางเลือกนี้เป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายไม่แพงและไม่มีผลข้างเคียงใดๆ อีกด้วย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

โรคมะเร็งลำไส้ (Colon cancer)

โรคมะเร็งลำไส้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเยื่อเมือกลำไส้ ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเกิดเป็น adenomatous polyp และกลายเป็นเซลล์มะเร็งในระยะเวลาต่อมา (adenoma-carcinoma sequence) โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเยื่อเมือกลำไส้ที่ผิดปกติจนเกิดเป็นมะเร็งนี้เกิดจากความผิดปกติของยีนมะเร็ง (oncogenes) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) ชนิดต่างๆ ดังแสดงในภาพ 1



ภาพ 1 กระบวนการก่อมะเร็งลำไส้

ที่มา: Janne and Mayer (2000)

การเกิดโรคมะเร็งลำไส้เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน 4 ยีนซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกัน 4 แห่ง เริ่มจากการกลายพันธุ์ของยีน APC ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 5 ทำให้เซลล์เยื่อเมือกลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติเกิดเป็นก้อนเนื้อออกแบบไม่ร้ายแรง (small

adenoma) ต่อมาเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *k - ras* ซึ่งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 12 ก่อนเนื้องอกจะเปลี่ยนเป็นแบบที่ร้ายแรงขึ้น และเมื่อมีการสูญเสียการทำงานของยีน *DCC* ซึ่งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 18 ก่อนเนื้องอกจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้องอกที่มีผิวชั้นขรุขระของวิลโล ซึ่งป็นลักษณะที่ร้ายแรงขึ้นไปอีก จนกระทั่งมีการสูญเสียการทำงานของยีน *p53* บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 17 ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเปลี่ยนสถานะ G_i/S transition ของวัฏจักรเซลล์ ก่อนเนื้องอกนั้นจึงกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Janne and Mayer, 2000)

การรับประทานอาหารเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งลำไส้โดยเฉพาะการรับประทานอาหารประเภทไขมันและเนื้อแดง ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่เกี่ยวข้องและศึกษาในเรื่องเหล่านี้ (Willett *et al.*, 1990; Giovannucci *et al.*, 1994; Goldbohm *et al.*, 1994) กลไกที่เกี่ยวข้องกับการรับประทานไขมันจะมีผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนภายในร่างกาย (Henderson *et al.*, 1991) ผลกระทบของกรดน้ำดีที่มีต่อเยื่อบุผิวลำไส้ (colonic mucosa) ผลของสารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปรุงแต่งอาหารและการได้รับธาตุเหล็กมากเกินไป การดูดซึมธาตุเหล็ก (เหล็กที่เป็นส่วนประกอบในฮีโมโกลบินจากเนื้อ) ยังมีผลกระทบที่ไม่แน่ชัด แต่อาจเกี่ยวข้องกับการผลิตธาตุออกซิเจน (Helbock *et al.*, 1998) ความแตกต่างของลักษณะของโรคมะเร็งลำไส้เกิดขึ้นเนื่องจากปัจจัยในการรับประทานอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งมีงานวิจัยหลายงานที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ (Gerhardsson *et al.*, 1998; Slattery *et al.*, 1998; Thun *et al.*, 1992) การรับประทานผัก ผลไม้และสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ได้ ซึ่งภาวะการขาดวิตามินจะทำให้โครโมโซมแตกหักในยีนของมนุษย์ (MacGregor *et al.*, 1990; Blount *et al.*, 1997) การแตกหักของโครโมโซมทำให้เกิดการเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งและเกี่ยวข้องกับภาวะการขาดโฟเลตในมนุษย์ (Blount *et al.*, 1997)

Willett *et al.* (1990) ศึกษาภาวะเสี่ยงการเป็นโรคมะเร็งที่เกิดจากการรับประทานเนื้อแดงและไขมันสัตว์ จากผลการทดลองพบว่าการรับประทานอาหารประเภทเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อแกะ เป็นประจำทุกวันจะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งสูง อีกทั้งการไม่รับประทานผักและผลไม้ก็จะทำให้เกิดภาวะเสี่ยงนี้เช่นกัน จึงแนะนำให้มีการรับประทานเนื้อไก่และเนื้อปลาที่ปราศจากหนังแทนการรับประทานเนื้อวัว และควรรับประทานผักและผลไม้ด้วยเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งชนิดนี้

Ann *et al.* (2005) รายงานว่าการรับประทานเนื้อแดงในปริมาณที่มากเป็นระยะเวลานานจะทำให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ ซึ่งให้ผลต่างจากการบริโภคเนื้อสัตว์ปีกและเนื้อปลาที่ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ต่ำกว่า

Mirian *et al.* (2004) ศึกษาผลของการรับประทานไขมันในปริมาณสูงและการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ พบว่าการรับประทานกรดไขมันแบบไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณที่สูงจะทำให้เกิดภาวะการเสี่ยงการกลายพันธุ์ของยีน K-ras ในเนื้องอกลำไส้

Joanne (2004) ศึกษาการย่อยของผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อภาวะเสี่ยงการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าการหมักเส้นใยในลำไส้ใหญ่โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ จะส่งผลให้เกิดกรดไขมันสายสั้นได้แก่ บิวไทเรต ทำให้ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้

Brian (2003) ศึกษาปัจจัยทางการรับประทานอาหารที่ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ในเมืองเซี่ยงไฮ้ ประเทศจีน พบว่าการรับประทานอาหารพวกเส้นใยและสารอาหารที่พบทั่วไปในผักและผลไม้ เช่น วิตามินซี แคโรทีนและวิตามินอีทำให้ลดภาวะการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ ในขณะที่การรับประทานเนื้อแดง ไข่ และการถนอมอาหารทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้

ระยะต่าง ๆ ของโรคมะเร็งลำไส้ (อมรชัย, 2542)

ระยะที่ 1 หมายถึงมะเร็งลำไส้ที่มะเร็งยังจำกัดอยู่แค่ชั้นในของผนังลำไส้ ไม่ทะลุเลยชั้นของกล้ามเนื้อผนังลำไส้และไม่แพร่ไปถึงต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะอื่น มะเร็งระยะนี้นับว่าเบาที่สุด และการพยากรณ์โรคดีที่สุด รักษาด้วยการผ่าตัดอย่างเดียวก็มีโอกาสหายขาดสูง มักไม่ต้องใช้เคมีบำบัดหรือรังสีบำบัด

ระยะที่ 2 หมายถึงมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่กินลึกลงไปชั้นในผนังลำไส้กว่าระยะที่ 1 ทะลุชั้นกล้ามเนื้อของผนังลำไส้ใหญ่ออกไป แต่ยังไม่ไปต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะที่ห่างออกไป มะเร็งลำไส้ปลายระยะที่ 2 อาจมีความเสี่ยงสูงที่จะกลับเป็นขึ้นมาใหม่ พยาธิแพทย์ที่ตรวจวิเคราะห์ชิ้นเนื้อที่ศัลยแพทย์ตัดออกมาจะช่วยบอกได้ว่า มีความเสี่ยงสูงหรือไม่ ถ้ามีความเสี่ยงสูงที่มะเร็งจะ

ถ้ารีบขึ้นมาอีกแพทย์จะแนะนำว่าควรได้รับการรักษาด้วยยา ซึ่งจะไปฆ่าเซลล์มะเร็ง ถ้ามะเร็งอยู่ใกล้ทวารหนักอาจต้องใช้รังสีบำบัดด้วย

ระยะที่ 3 หมายถึงมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่แพร่กระจายจากลำไส้เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองแล้ว แต่ยังไม่บุกรุกอวัยวะอื่นที่อยู่ห่างออกไป มะเร็งระยะนี้มีความเสี่ยงสูงที่จะกลับมาเป็นใหม่ การรักษาที่ใช้ทั้งเคมีบำบัดหรือรังสีบำบัด อาจช่วยป้องกันไม่ให้มะเร็งกลับเป็นใหม่ และช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดจากมะเร็งชนิดนี้ให้สูงขึ้น

ระยะที่ 4 หมายถึงมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่แพร่กระจายไปยังส่วนอื่นของร่างกาย เช่น ไปที่ตับหรือกระดูกเป็นระยะที่รุนแรงที่สุดของมะเร็ง รักษาไม่หาย ได้แค่บรรเทาอาการต่างๆ ให้ลดลงไม่ให้ทรมาน

การรักษาโรคมะเร็งลำไส้

1. การผ่าตัด

การผ่าตัด ซึ่งเป็นวิธีการรักษาหลัก โดยการตัดลำไส้ส่วนที่เป็นมะเร็งรวมทั้งเกาะต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงออก จากนั้นนำลำไส้ส่วนที่ติดต่อกัน ส่วนมะเร็งลำไส้ตรงที่อยู่ใกล้ทวารหนักอาจจำเป็นต้องตัดทวารหนักออก และทำทวารเทียมในบริเวณหน้าท้องของผู้ป่วย ผู้ป่วยจะถ่ายอุจจาระผ่านทางหน้าท้องและสามารถใช้ชีวิตได้ตามปกติ

2. เคมีบำบัด

เคมีบำบัด หมายถึงการรักษาผู้ป่วยมะเร็งด้วยการให้ยาหรือสารที่จะไปฆ่า หรือทำลายเซลล์มะเร็ง ที่อาจหลงเหลืออยู่หลังจากที่ได้ผ่าตัดเอาก่อนมะเร็งออกไปแล้ว ยังมียาหรือสารอีกชนิดหนึ่งที่ใช้รักษามะเร็งลำไส้ สารนี้ไม่ได้ไปฆ่า หรือทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรง แต่ไปช่วยให้ร่างกายของเราหรือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต่อสู้กับมะเร็งได้ดีขึ้น เมื่อใช้ยานี้ร่วมกับเคมีบำบัดพบว่าผลการรักษาดีขึ้น อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้น เมื่อเทียบกับการรักษาโดยการผ่าตัดเพียงอย่างเดียว

เดียว ข้อเสียหรือผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ของเคมีบำบัดที่พบบ่อยได้แก่ คลื่นไส้ ท้องร่วง ปากเปื่อย ผื่นตามผิวหนัง ผมร่วง กดการทำงานของไขกระดูก การทำงานของตับผิดปกติ เดี๋ยว อารมณ์ขุ่นมัว การให้เคมีบำบัดต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาจมีผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นระยะยาว เช่น น้ำตาไหลตลอดเวลา ผิวแห้ง ผิวชา หรืออาจเกิดมะเร็งชนิดอื่นตามมา

3. รังสีบำบัด

รังสีบำบัดหรือรังสีรักษา หมายถึงการฉายรังสีไปฆ่าหรือทำลายเซลล์มะเร็ง เป็นวิธีการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วนปลายที่ใช้ควบคู่กับการผ่าตัด บางแห่งใช้รังสีบำบัดก่อนผ่าตัด แต่ส่วนใหญ่แล้วนิยมใช้รังสีหลังผ่าตัดเรียบร้อยแล้ว รังสีจะลดโอกาสที่มะเร็งจะเกิดในอุ้งเชิงกราน จึงใช้ร่วมกับการผ่าตัดมะเร็งระยะที่ 2 และ 3 ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการกลับมาของมะเร็งสูง ผลข้างเคียงของการฉายรังสีก็เป็นที่น่ารำคาญคืออยู่ เช่น ท้องร่วง ผลต่อผิวหนังบริเวณที่ถูกรังสี รังสีจะไปกดการทำงานของไขกระดูก ผู้ป่วยจะรู้สึกเบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ไม่มีแรง และความรู้สึกรับรสอาหารผิดปกติ สำหรับมะเร็งลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย มีการศึกษาทดลองพบว่า การรักษาที่ใช้วิธีผ่าตัดร่วมกับเคมีบำบัดและรังสีบำบัดจะได้ผลดีกว่าผ่าตัดอย่างเดียว หรือเคมีบำบัดอย่างเดียว หรือรังสีบำบัดอย่างเดียว จึงถือเป็นมาตรฐานการรักษาเลยว่า ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการแพร่กระจายของมะเร็ง จะใช้วิธีการรักษา 3 วิธีร่วมกันเลย

การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)

การเจริญและการตายของเซลล์เป็นขบวนการที่จำเป็นตลอดชีวิต ในคนที่โตเต็มวัยมีการตายของเซลล์ถึง 10^9 เซลล์ต่อวัน การตายของเซลล์เกิดจากกระบวนการที่แตกต่างกันอย่างน้อยสองขบวนการคือ การตายแบบอะพอพโทซิสซึ่งเป็นการตายแบบใช้พลังงาน และการตายแบบเนโครซิสซึ่งเป็นการตายแบบไม่อาศัยพลังงาน (Ashe *et al.*, 2003) สามารถแบ่งแยกความแตกต่างระหว่างรูปแบบการตายทั้งสองชนิดออกจากกันโดยดูการเปลี่ยนแปลงทางรูปสัณฐานของเซลล์ การตายของเซลล์สามารถจำแนกตาม Clarke's Classification of programmed cell death (PCD) ได้ 3 แบบ ดังนี้

1. Type-I PCD (Apoptosis)

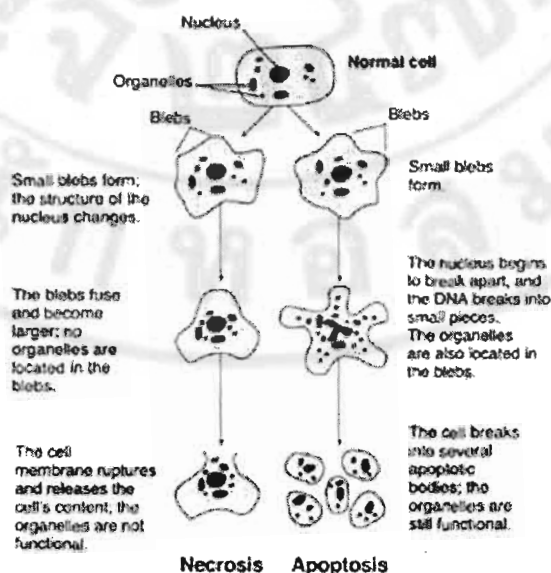
เกิดการหดตัวของเซลล์ การแตกหักของจีโนมิกดีเอ็นเอไปเป็นโอลิโกนิวคลีโอโซม ดีเอ็นเอ (Oligonucleosome DNA fragmentation) โครมาตินหดตัวรวมกันแน่น (chromatin condensation) ซึ่งทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า นิวเคลียสหดตัว (pyknotic nuclei) และการแยกสลายของเซลล์ เป็นรูปแบบที่เรียกว่า อะพอพอโทซิสบอดี (apoptosis bodies)

2. Type-II PCD (Autophagocytosis)

มีการสร้างอโตฟาจิควิว (autophagic vacuoles) มีการขยายตัวของไมโทคอนเดรีย และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) และการขยายตัวเล็กน้อยในกอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus)

3. Type-III PCD (Necrosis-like)

มีการบวม (osmotic swelling) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และออร์แกเนลล์ (organelles) ต่าง ๆ และเกิดขบวนการอักเสบตามมา



ภาพ 2 ลักษณะรูปแบบการตายแบบเนโครซิสและอะพอพอโทซิส

ที่มา: Goodlett and Horn, 2001

อะพอพโทซิสเป็นแบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ที่ควบคุมโดยยีน มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ มีลักษณะแสดงคือเซลล์เกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (lose of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดรัด (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และดีเอ็นเอถูกย่อยให้เป็นชิ้นเล็ก (endonucleocytic degradation of DNA into nucleosomal fragments) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะเกิดภายหลังจากขบวนการเชื่อมโยงของการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signalling) และขบวนการที่อาศัยเอนไซม์ caspase ที่เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) โดยการควบคุมของโปรตีนที่ทำให้เกิดความตาย (proapoptotic proteins) และโปรตีนยับยั้งไม่ให้เกิดการตาย (antiapoptotic proteins)

วิถีอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิสถูกควบคุมโดยยีนหลายตัว เช่น tumor suppressor genes เช่น p53 และ tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN gene) และ oncogenes เช่น AKT และ BCL-2 และมีโมเลกุลเกี่ยวข้องกับหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม anti-apoptotic proteins (Bcl-2 และ Bcl-X_L) และกลุ่ม pro-apoptotic proteins (Apaf-1 และ caspase) รวมทั้งโมโตคอนเดรียที่มีบทบาทในการหลั่งสารที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส เช่น cytochrome C และ apoptosis-inducing factor (AIF) (Tannock *et al.*, 2005) อะพอพโทซิสเกิดเมื่อมีการเชื่อมโยงสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signalling) โดยอาศัยเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) และ pro-apoptotic proteins เป็นตัวชักนำการตายโดยมี anti-apoptotic proteins เป็นตัวยับยั้งการตาย การเหนี่ยวนำอะพอพโทซิสเกิดได้ 2 วิธี ทั้งสองวิธีจะสัมพันธ์ต่อเนื่องกัน โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ effector caspase ที่ย่อยโปรตีน องค์ประกอบเซลล์ต่าง ๆ actin, lamin A, ICAD/CAD, PARP, Rb, p27, p21 ซึ่งจะนำไปสู่อะพอพโทซิส (Tannock *et al.*, 2005; Hu and Kavanagh, 2003)

1. Death-receptor-induced extrinsic pathway (clark *et al.*, 2004)

วิถีภายนอกเกิดเมื่อ death receptors (DRs) เช่น tumor necrosis factor (TNFR), Fas receptor (FasR), DR3, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAILR1 หรือ DR4 และ

TRAILR2 หรือ DR5) และ DR6 เป็นต้น (de Thonel et al., 2005) ถูกกระตุ้นด้วยการจับของลิแกนด์ที่จำเพาะ เกิดโครงสร้างที่ประกอบด้วย adaptor protein และ initiator caspase (pro caspase 8 หรือ 10) เรียกว่า “death-inducing signaling complex” (DISC) กระตุ้นให้ pro caspase เป็น initiator caspase ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ effector caspase ทำงานและนำไปสู่อะพอพอโทซิส

2. Mitochondrial-apotosome-mediated apoptotic intrinsic pathway

วิถีจากภายในที่มีไมโทคอนเดรียและอะพอพอโทโซมเป็นตัวกลางเกิดเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าต่าง ๆ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา ภาวะเครียด ออกซิเดชัน หรือการใช้ยาบำบัด (oxidative stress) ที่ทำให้เกิดการชำรุดเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น (Bi and Odin, 2003)

อะพอพอโทซิสมีตัวควบคุม (regulators) อื่นอีกหลายตัว โดยสามารถแบ่งการควบคุมได้ 2 กลุ่ม คือ ตัวควบคุมที่ทำให้เกิดการตาย (proapoptotic regulators) และตัวควบคุมที่ยับยั้งการตาย (anti-apoptotic regulators) ซึ่งหากมีการควบคุมที่ผิดปกติ เช่น การกระตุ้นให้ตัวควบคุมที่ทำให้เกิดการตายมากเกินไปก็จะเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคอโตอิมมูน แต่หากมีการกระตุ้นให้ตัวควบคุมที่ยับยั้งการตายก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งของขบวนการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการศึกษาอะพอพอโทซิสจึงสามารถใช้ตัวควบคุมต่าง ๆ มาเป็นตัวบ่งชี้ (marker) หรือใช้เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาต่อวิถีการตายแบบดังกล่าวได้

ตาราง 1 ตัวควบคุมอะพอพอโทซิสชนิดทำให้เกิดการตาย (proapoptotic) และชนิดยับยั้งการตาย (anti-apoptotic)

Proapoptotic regulators	Antiapoptotic regulators
Bid	Bcl-X _L
Bad	Bcl-2
Bax	Bcl-w
Bim	Bcl-B
Bak	Mcl-1

ตาราง 1 ตัวควบคุมอะพอพโทซิสชนิดทำให้เกิดการตาย (proapoptotic) และชนิดยับยั้งการตาย (anti-apoptotic) (ต่อ)

Proapoptotic regulators	Antiapoptotic regulators
Puma (p53 upregulated mediator of apoptosis)	FLIP (FLICE-inhibitor of apoptosis protein)
AIF (apoptosis protease-activating factor 1)	XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)
Cytochrome C	c-IAP1 (cellular inhibitor of apoptosis 1)
Apaf-1	c-IAP2
(apoptosis protease-activating factor 1)	(cellular inhibitor of apoptosis 2)
P53	Survivin
P73	NF-KB
Smac/DIABLO	ICAD
(second mitochondria-derived activator)	
Caspase	
(Cysteine aspartate-specific protease)	
HtrA2/Omi	
I κ B (inhibitor of NF-KB)	
CAD (caspase activated DNase)	

ที่มา: Harwood *et al.*, 2005

ความสำคัญของไมโทคอนเดรียต่ออะพอพโทซิส

ไมโทคอนเดรียทำหน้าที่สำรองพลังงานต่อเซลล์ผ่านกระบวนการที่เรียกว่า “Oxidative phosphorylation” มีความสำคัญต่ออะพอพโทซิส (Desagher and Martinou, 2000) ไมโทคอนเดรียมีช่องว่าง (intermembranespace; IMS) คั่นระหว่างเยื่อหุ้มภายนอก (outermembrane; OM) และเยื่อหุ้มภายใน (innermembrane; IM) ชั้น IM มี matrix เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ citric acid cycle, β -oxidation และมีสิ่งที่เรียกว่า “cristae” เป็นส่วนประกอบของ electron

transport chain และ F_0F_1 -ATPase ในการควบคุมขบวนการ oxidative phosphorylation (Regular *et al.*, 2003) ส่วนชั้น IMS จะมีสารหลายชนิดเช่น caspase-independence death effector (nucleases และ/หรือ protease), caspase activators, pro-caspase 2, 3 และ 9 ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส (Bras *et al.*, 2005) สารเหล่านี้จะผ่านจากชั้น OM ออกสู่ไซโตซอล (cytosol) ทางช่อง mitochondria permeability transition pore (PTP) ซึ่งเป็น ion channels ที่พบในไมโทคอนเดรียเช่น adenine nucleotide translocator (ANT protein) voltage dependent anion channel (VDAC) benzodiazepine receptor และ cyclophilin D ในสภาวะปกติเซลล์จะมีระบบ mitochondria outer membrane permeabilization (MOMP) ภายใต้การควบคุมของโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 family (Bras *et al.*, 2005; Regular *et al.*, 2003) ควบคุมไม่ให้สารเหล่านี้ผ่านออกมา เมื่อมีสิ่งกระตุ้นในสภาวะต่างๆ เช่น สภาวะเครียด (stress-induced apoptosis) เช่น การใช้สารเคมี หรือยาเคมีบำบัด รังสียูวี อนุมูลอิสระ การเสียสมดุลของแคลเซียมไอออน (disruption of Ca^{2+} homeostasis) จะรบกวน electrochemical gradient ทำให้ PTP เปิด จะมีสารรั่วออกมามีผลให้ไมโทคอนเดรียบวม และ OM เกิดรอยรั่ว ทำให้โปรตีน apoptogenic factors เช่น cytochrome C, apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G (Endo G) และ second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with a low iso-electric point (Smac/DIABLO) รั่วออกมาจากชั้น IMS หลังเข้าสู่ไซโตซอล โดย AIF และ Endo-G จะส่งผ่านเข้าไปยังนิวเคลียสเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของโครมาติน (chromatin condensation) และการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) ซึ่งกระบวนการนี้ไม่อาศัย ATP และไม่ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ caspase ส่วน Smac/DIABLO จะมีหน้าที่ในการยับยั้ง X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAPs) (Bras *et al.*, 2005) เมื่อ cytochrome C หลังจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอลจะไปจับ apoptosis protein-activating factor 1 (Apaf-1) เกิดการไฮโดรไลซิสของ dATP/ATP ไปเป็น dADP/ADP ส่งผลให้เกิดการรวมกัน (oligomerisation) ของ cytochrome C, Apaf-1 และ pro-caspase-9 เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า “apoptosome” (Bras *et al.*, 2005; Hu and Kavanagh, 2003; Harwood *et al.*, 2005) ทำให้ pro-caspase-9 สามารถแยกย่อยตัวเอง (self-cleavage analogue) ให้เป็นเอนไซม์ที่พร้อมทำงานคือ caspase-9 แล้วไปกระตุ้นให้ effector caspase ทำงาน และเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสขึ้น

บทบาทของจุลินทรีย์ในลำไส้

จุลินทรีย์ในลำไส้เด็กทารกแรกคลอดจะเกิดขึ้นทันทีหลังคลอด และมีมากขึ้นใน 2-3 วันแรก (Guarner and Malagelada, 2003) ในระยะแรกจะมีแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนมากกว่า แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนเป็น 100-1000 เท่า แบคทีเรียที่พบมากในลำไส้ ได้แก่ *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนจะมีปริมาณน้อยมาก เช่น *Escherichia*, *Enterobacters*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Proteus* เป็นต้น เด็กแต่ละคนจะมีแบคทีเรียในลำไส้หลายชนิดมาก และจะมีความแตกต่างของชนิดและจำนวน ทั้งในสภาพร่างกายปกติหรือเมื่อมีโรคที่เกี่ยวข้อง เช่น ภาวะท้องเสีย (Simon and Gorbach, 1984)

หน้าที่หลักของจุลินทรีย์ในลำไส้

1. ช่วยย่อยสลายและหมักสารอาหารให้เป็นพลังงานในรูปของ short-chain fatty acids (Cummings *et al.*, 2003) ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นมากบริเวณลำไส้ใหญ่ซีกขวา ตั้งแต่ส่วนที่ต่อจากลำไส้เล็กขึ้นไป นอกจากนี้ยังช่วยสร้างวิตามินเค (Conly *et al.*, 1994) และช่วยดูดซึมฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็กในบริเวณนั้น (Miyazawa *et al.*, 1996; Younes *et al.*, 2001)
2. ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อของลำไส้ (Alam *et al.*, 1994) โดยผลของกรดไขมันสายสั้น ๆ (short-chain fatty acids) เช่น อะซิเตต (acetate) โพรไพโอเนต (propionate) บิวไทเรต (butyrate) กระตุ้นให้ลำไส้เปลี่ยนสภาพ เพื่อให้ทำงานดูดซับสารอาหารได้เต็มที่ และปรับเปลี่ยนไม่ให้เซลล์กลายเป็นมะเร็ง (Gibson *et al.*, 1992) และช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งในเนื้อเยื่อ และในกระแสโลหิต (Cebra *et al.*, 1998)
3. ทำหน้าที่เป็นเกราะปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมทั้งหลาย โดยเฉพาะจากการแทรกซึมของเชื้อโรคจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย โดยการแย่งเกาะผนังลำไส้ ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคผ่านเข้าไปได้ (Bernet *et al.*, 1994) และอาจแย่งชิงสารอาหารจากเชื้อโรคที่หลุดเข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งปล่อยสารยับยั้งการเติบโตของเชื้อโรค เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) (Lievins *et al.*, 2000)

ความผิดปกติของจุลินทรีย์ในลำไส้

การเคลื่อนย้ายตัวของแบคทีเรียที่มีชีวิตออกจากลำไส้ผ่านทางเนื้อเยื่อของผนังลำไส้ เรียกว่า bacterial translocation (Van, 1994) จะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะเมื่อภูมิคุ้มกันต้านทานบกพร่องด้วยสาเหตุใด ๆ ก็ตาม เช่น ภาวะช็อคจากการเสียเลือด อุบัติเหตุ รุนแรงหรือจากไฟไหม้ น้ำร้อนลวก หรือเมื่อร่างกายเกิดภาวะผิดปกติ เช่น มีการอุดตันในลำไส้ ลำไส้ขาดเลือด จนทำให้มีเชื้อแบคทีเรียในลำไส้เล็กเพิ่มมากกว่าปกติ และในกรณีที่ผนังลำไส้ปล่อยให้มีการเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียที่มีชีวิตหรือพิษจากแบคทีเรียออกนอกบริเวณลำไส้ เช่น ในกรณี ดับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน ดับวายเป็นพิษหรือแม้แต่การเป็นโรคตับแข็งมาก่อน (Guarner and Malagelada, 2003) ทำให้เกิดการกระจายของเชื้อโรคจนเกิดปัญหา การติดเชื้อบริเวณผนังหน้าท้อง (Guarner and Soriano, 1997) หรือเกิดปัญหาภาวะล้มเหลวในการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ (Lichtman, 2001) และทำให้เกิดปัญหาติดเชื้อหลังผ่าตัดได้ง่ายขึ้น จุลินทรีย์ในลำไส้ที่เกิดภาวะผิดปกติมีมากจนเกินไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะชนิดหรือรูปแบบรวมกับการเปลี่ยนแปลง ในรูปแบบของอาหาร เช่น รับประทานอาหารประเภทไขมันหรือเนื้อแดงมาก ๆ จะทำให้เกิด โอกาสเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้มากขึ้น (Bingham, 1999) โดยเฉพาะในครอบครัวที่มีพันธุกรรมที่ เสี่ยงต่อมะเร็งยิ่งมีโอกาสมากขึ้น อาหารประเภทข้าว ผัก ผลไม้ ปลา และแคลเซียม จะช่วยลด โอกาสเสี่ยงของมะเร็ง (Rafter and Glinghammar, 1998) ปัจจุบันเชื่อว่าแบคทีเรียในลำไส้เป็น สาเหตุสำคัญในการเกิดปัญหาภาวะอักเสบเรื้อรังของลำไส้ (inflammatory bowel diseases) (Shanahan, 2001, Swidsinski *et al.*, 2002)

โพรไบโอติกแบคทีเรีย (probiotic bacteria)

โพรไบโอติก หมายถึง อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์เล็ก ๆ ที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทาน เข้าไปแล้วช่วยให้ร่างกายผู้นั้นมีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งอาจช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในร่างกาย (Salminen *et al.*, 1998) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ เคยมีในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นเด็กทารก ซึ่งมีมากมายหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 จุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นโปรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. lactis</i>		

ที่มา: Salminen *et al.*, 1998

คุณสมบัติของแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

1. สามารถสร้างกรดแลคติกทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพความเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่าง ๆ ได้ดีขึ้น และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก
2. สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์อื่น ๆ (Conway *et al.*, 1986) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตมากที่พีเอช 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998) *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่พีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000)
3. สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย เช่น ยาหรือแร่ธาตุบางตัว (Kontula *et al.*, 1998) จากรายงานของ Shirota (1962) กล่าวว่า *Lactobacillus* ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูง ได้แก่ *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. acidophilus* และ *L. casei shirota* ทนได้ถึงความเข้มข้น 2, 4, 10, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี และมี

ความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *Lactobacillus acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้อีกด้วย (Brenan *et al.*, 1993) *Lactobacillus reuteri* (BFE 1058) และ *L. johnsonii* (BFE 1059) (Chateau *et al.*, 1994) และ *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus* สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี ที่มีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Erkkila and Petaja, 2000)

4. สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะ และต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึม เป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

5. สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน เป็นต้น (Fuller, 1993)

6. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้น การสร้างแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) แกมมาอินเตอร์เฟอรอน (gamma interferon) และ ส่งเสริมกิจกรรมของแมโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจาก ร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kaila (1992) มีการนำ *Lactobacillus* sp. (GG) จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้อาการของ ผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคท้องร่วง รับประทาน *Lactobacillus* sp. (GG) มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียง 46 เปอร์เซ็นต์

7. ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ (colon) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของ การเกิดโรคมะเร็ง เช่น เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) เอโซรีดักเตส (azoreductase) ไนเตรดรีดักเตส (nitrate reductase) และเบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) (Kontula *et al.*, 1998) สอดคล้องกับการรายงานของ Gilland (1989) พบว่า นมที่มี *Lactobacillus casei* เป็นส่วนประกอบ จะช่วยกระตุ้นการทำงานของแมโครฟาจในหนูได้ โดยการทดสอบให้หนูกินนมที่มี *L. casei* เป็น ส่วนประกอบ หลังจาก 8 วันนำหนูมาฆ่า และตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจากแมโครฟาจ ในการทดลองนี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ lactase dehydrogenase (LDH) พบว่า การบริโภคนมที่มี

ส่วนประกอบของ *L. casei* จะมีผลในการเพิ่มระดับของ LDH ทำให้ลดการเพิ่มของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้

บทบาทและการประยุกต์ใช้โปรไบโอติก

1. ป้องกันและรักษาภาวะท้องเสีย

ภาวะท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส หรือแบคทีเรียมักพบได้บ่อยทั้งในเด็กเล็กและผู้สูงอายุ หรือผู้ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เช่น ในสถานพักพิง มีผู้นำเอา *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (LGG) มาใช้ป้องกันภาวะท้องเสียในเด็กขาดอาหาร โดยเฉพาะที่ไม่ได้รับการเลี้ยงดูด้วยนมแม่ ซึ่งพบว่าป้องกันได้ดี และ *Lactobacillus* สามารถลดระยะเวลาและความรุนแรงของอาการท้องเสียที่เกิดจากภาวะอาหารเป็นพิษ (Isolauri *et al.*, 1991) และได้ผลดีมากในกลุ่มที่เกิดอาการท้องเสียจาก rotavirus (Guandalini *et al.*, 2000) สามารถลดการจับเชื้อ rotavirus ออกมาในอุจจาระผู้ป่วย เมื่อใช้ *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับ *Streptococcus thermophilus* (Saavedra *et al.*, 1994) ทำให้ผู้ป่วยแพร่เชื้อได้น้อยลง นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันและรักษาอาการท้องเสียในนักท่องเที่ยวนักท่องเที่ยว (travelers diarrhea) (Hilton *et al.*, 1997) และในผู้สูงอายุที่เกิดการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ในลำไส้ใหญ่ หลังการรับยาปฏิชีวนะขณะนอนพักในโรงพยาบาล (Pochapin, 2000) และป้องกันการเกิดซ้ำของโรคได้ (Gorbach *et al.*, 1987) โดยเฉพาะการใช้ *Saccharomyces boulardii* 1 กรัม/วัน 28 วัน ช่วยลดโอกาสเกิดโรคซ้ำ เหลือเพียงร้อยละ 34.6 (Mc *et al.*, 1994) ส่วน *Lactobacillus* ป้องกันการเกิดโรคได้ถึงร้อยละ 50 (Vanderhoof *et al.*, 1999) และจากการศึกษาของ Thomas (2001) เปรียบเทียบ *Lactobacillus* GG กับยาหลอก ไม่พบความแตกต่างในแง่การป้องกันภาวะท้องเสียในผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะ 267 ราย

2. รักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง Inflammatory bowel disease (IBD)

โปรไบโอติกโดยเฉพาะ *Lactobacillus* GG ช่วยลดภาวะอักเสบของลำไส้ โดยการปรับสภาพภูมิคุ้มกันทำให้มีระดับ Ig A ที่ลดลงในช่วงโรคกำเริบกลับสู่ภาวะปกติ ทำให้เยื่อลำไส้หลังสารพิษออกมาน้อยลง (Schultz and Sartor, 2000) นอกจากนี้ยังช่วยปรับลดปริมาณจุลินทรีย์ใน

ลำไส้ ซึ่งเป็นสาเหตุการอักเสบ ทำให้ช่วยลดการอักเสบได้เป็นอย่างดี (Shanahan, 2001) และยังช่วยลดการอักเสบของการผ่าตัดลำไส้เล็กเปิดช่องไว้หน้าท้อง สามารถลดการอักเสบซ้ำจากร้อยละ 100 ให้เหลือเพียงร้อยละ 15 โดยการใช้ *Lactobacillus* ร่วมกับ *Bifidobacterium* และ *Streptococcus salivarius* (Gionchetti *et al.*, 2003)

3. รักษาโรคลำไส้ขาดเลือดในเด็ก (Necrotizing enterocolitis, NEC)

ภาวะ NEC มักพบในเด็กคลอดก่อนกำหนด น้ำหนักตัวแรกคลอดน้อยจากการขาดออกซิเจนเลี้ยงลำไส้และติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่า *L. acidophilus* และ *B. infantis* ช่วยลดปัญหาจากร้อยละ 5.3 เหลือเพียงร้อยละ 1.1 (Lin *et al.*, 2005)

4. เพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การให้โปรไบโอติกแก่เด็ก จะช่วยให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้ดี โดยเฉพาะป้องกันภาวะท้องเสีย (Alak *et al.*, 1997) หรือการติดเชื้อในช่องท้อง แม้ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ในกลุ่มเด็กที่ติดเชื้อ HIV เอดส์ (Cunningham *et al.*, 2000) นอกจากนี้สามารถลดการติดเชื้อในส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย เช่น ในปอด (Guarino, 1998) โดยการเพิ่มภูมิคุ้มกันทั้งในลำไส้และในกระแสโลหิต ลดการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Bengmark, 1996)

5. รักษาโรคภูมิแพ้

เด็กที่มีอาการภูมิแพ้ มีน้ำมูก หรือผื่นคันและหอบหืดจนกลายเป็นโรคเรื้อรัง พบได้มากพอสมควรและหลายรายมีอาการรุนแรงจนต้องใช้การรักษาจำเพาะหลายรูปแบบ โปรไบโอติกที่ให้อาหารเสริมช่วยปรับสภาพภูมิคุ้มกันด้านทานในร่างกาย ช่วยลดการอักเสบช่วยให้ปัญหาภูมิแพ้ลดลง ไม่ว่าจะใช้รักษาภาวะแพ้อาหารด้วย *Lactobacilli* (Majamaa and Isolauri, 1997) หรือภาวะผื่นแพ้ด้วย *bifidobacteria* (Isolauri *et al.*, 2000) ก็พบว่าได้ผลดีเช่นเดียวกัน พบว่าเด็กอายุ 2 ขวบที่ได้รับ *Lactobacillus* GG ลดการเกิดภาวะผื่นแพ้ได้ร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ (Kalliomaki *et al.*, 2001)

6. ป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่มีส่วนในการก่อให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยการสร้างสารก่อมะเร็ง หรือเป็นตัวร่วมในการก่อมะเร็ง โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารประเภทไขมันและเนื้อจำนวนมาก โดยไม่รับประทานผักและผลไม้ ทำให้เพิ่มสารในกลุ่ม N-nitrosamine และ heterocyclic aromatic amines ที่เป็นสาเหตุของมะเร็งลำไส้ใหญ่ 10 กลุ่ม โปรไบโอติกจะช่วยเปลี่ยนสภาพแบคทีเรียในลำไส้ ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดสารพิษเหล่านี้ (Wollowski *et al.*, 2001) ทั้ง *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Singh *et al.*, 1997)

7. รักษาช่องคลอดอักเสบจากเชื้อรา

จากการศึกษาการใช้โปรไบโอติก ในผู้ป่วยที่มีการอักเสบของช่องคลอดจากเชื้อราซ้ำซาก พบว่าสามารถทำให้โรคหายได้ดี (Elmer *et al.*, 1996) เมื่อให้ *Lactobaccillus acidophilus* จะช่วยป้องกันให้เชื้อราในช่องคลอดลดน้อยลง (Hilton *et al.*, 1992) นอกจากนี้อาจช่วยป้องกันการแพร่กระจายของโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์

8. ลดระดับไขมันในกระแสเลือด

โปรไบโอติกอาจช่วยลดระดับไขมันในเลือดได้บ้าง ถ้าหากรับประทานในปริมาณมาก (Jackson *et al.*, 1999) แต่ถ้าใช้ขนาดปกติ อาจจะเห็นผลไม่ชัดเจน

9. ประโยชน์อื่นๆ

มีผู้ใช้โปรไบโอติกในการกำจัด *Helicobacter pylori* ร่วมกับยาปฏิชีวนะอื่น พบว่าได้ผลดีเช่นเดียวกับการรักษาด้วยวิธีอื่น (Cremonini *et al.*, 2001) ช่วยลดอัตราการติดเชื้อในช่องท้องหลังผ่าตัด เมื่อให้รับประทานร่วมกับอาหาร ป้องกันการล้มเหลวในการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ (Bengmark and Gianotti, 1996)

บทบาทของโปรไบโอติกในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้

1. การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้

สารประกอบแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกเอาความเป็นพิษออกโดยการสร้างกลูโคโรไนด์ (glucoronide) ในตับก่อนนำเข้าสู่ลำไส้โดยผ่านทางน้ำดี เนื่องจากกลูโคโรไนด์ (glucoronide) เป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งแบคทีเรียเอนไซม์เบต้า-กลูคูโรไนด์เอส (β -glucuronidase) ที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์กลูโคโรไนด์ (glucoronide) จำนวนมากและอาจจะปล่อยสารก่อมะเร็ง aglycones ให้เป็นอิสระในลำไส้ มีเอนไซม์จากแบคทีเรียอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารก่อมะเร็งและการปล่อยสารก่อมะเร็งในลำไส้ มีงานวิจัยในช่วงแรก ๆ ศึกษาการเติม lactic acid bacteria (LAB) ในอาหารให้หนูซึ่งมีผลทำให้ไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ในอุจจาระ พบว่ามีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตสารป้องกันการก่อมะเร็งได้ (Kulkarni and Reddy, 1994, Rowland *et al.*, 1998) Goldin and Gorbach (1984) ศึกษาผลของการให้ *L. acidophilus* สายพันธุ์ NCFM และ N-2 แก่อาสาสมัครสุขภาพดี 21 คนซึ่งมีผลกับเอนไซม์ของแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ β -glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลคล้าย ๆ กันคือ มีผลค่อย ๆ ลดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสามชนิดข้างต้นหลังจากบริโภคไปแล้ว 10 วัน ในทางกลับกัน เมื่อหยุดการให้ *Lactobacillus* ภายใน 10-30 วัน กิจกรรมเหล่านี้ก็จะหยุดด้วย ดังนั้นหากต้องการให้ได้ผลนี้ควรมีการบริโภคแบคทีเรียอย่างต่อเนื่องสรุปได้ว่าการศึกษาการบริโภค LAB ทั้งในคนและสัตว์ในปริมาณที่แน่นอนจะมีผลในการลดระดับของกิจกรรมเอนไซม์ในอุจจาระที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารก่อมะเร็ง

2. การเปลี่ยนแปลงสถานะทางเคมีกายภาพในลำไส้

Modler *et al.* (1990) พบว่าการลดค่า pH ในลำไส้มีผลกับการเกิดมะเร็งลำไส้ โดยการไปลดการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า (putrefactive bacteria) ในหนูมีการศึกษาการให้อินนูลิน (inulin) ที่มีและไม่มี *B. longum* พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมูล และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้า-กลูคูโรไนด์เอส (β -glucuronidase) และมีการลดลง ของพีเอชในมูล

(Rowland *et al.* 1998) แม้ว่าการศึกษาบางเรื่องไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ในลำไส้อย่างมีนัยสำคัญ

การบริโภคไขมันเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้แต่สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มระดับของกรดน้ำดี (ส่วนใหญ่เป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ ซึ่งสร้างจากกรดน้ำดีปฐมภูมิโดยเอนไซม์ 7α -dehydroxylase จากแบคทีเรีย) ในลำไส้ (Weisburger and Wynder, 1987) มีสมมติฐานหนึ่งกล่าวไว้ว่ากระบวนการก่อมะเร็งในลำไส้เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของผนังลำไส้ ซึ่งเกิดขึ้นโดยกรดน้ำดีที่อยู่ในอุจจาระในรูปของสารละลาย (กรดน้ำดีที่สามารถละลายน้ำได้) ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ในลำไส้ (Bruce, 1987) จากการศึกษาการให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ 14 คน บริโภคนมหมักที่มี *L. acidophilus* พบว่าความเข้มข้นของกรดน้ำดีที่สามารถละลายน้ำได้ในอุจจาระลดลง (Lidbeck *et al.*, 1991)

3. การจับและการย่อยสารก่อมะเร็ง

เซลล์แบคทีเรีย รวมไปถึงผนังเซลล์ของพืช อาจจะเป็นปัจจัยสำคัญในการจับกับสารพิษอิสระในลำไส้ สารที่ก่อให้เกิดมะเร็งโดยทั่วไปพบในอาหารประเภทเนื้อ ซึ่งสามารถจับกับ LAB การจับกันนี้สามารถลดปริมาณของสารก่อมะเร็งลงได้ (Orrhage *et al.*, 1994)

Morotomi และ Mutai (1986) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในลำไส้ 22 สายพันธุ์ในการจับกับสารก่อมะเร็งและเปรียบเทียบกับความสามารถของแบคทีเรียเหล่านั้นกับการบริโภคอาหารที่เป็นเส้นใยบางชนิด จากการศึกษาพบว่า 3-Amino-L, 4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) และ 3-amino-L-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) สามารถจับกับเซลล์แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและการลบได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถจับกับ เส้นใยข้าวโพด แอปเปิ้ล และถั่วเหลืองได้อีกด้วย เมื่อกลไกการจับกันของ Trp-P-2 กับ *L. casei* YIT 9018 และเส้นใยข้าวโพด ถูกศึกษาทำให้ทราบว่า การจับกันขึ้นอยู่กับค่าพีเอช และสามารถถูกยับยั้งได้โดยเกลือโลหะ (metals salt) บ่งชี้ได้ว่ากลไกการจับกันนี้เกิดจากการแลกเปลี่ยนไอออนลบ

Zhang และ Ohta (1993) พบว่าเซลล์ของ LAB ในลำไส้และยีสต์สามารถลดการดูดซึมของ Trp-P-1 จากลำไส้เล็กในหนู อีกทั้งยังลดสารก่อมะเร็งในเลือดได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอีกว่าสารก่อมะเร็งในอาหาร Trp-P-2 สามารถลดลงได้ในหลาย ๆ เนื้อเยื่อในหนูที่มีการ

ให้ LAB (Orhage *et al.*, 2002) และยังมีการศึกษาว่าในคนผู้ซึ่งบริโภค lactobacilli ทำให้มีสารก่อมะเร็งที่มาจากผลิตภัณฑ์เนื้อลดลงในปัสสาวะและอุจจาระ จากข้อมูลข้างต้น มีความเป็นไปได้ว่าการบริโภค LAB มีผลกับการรับเข้า และหรือการขับออกของสารก่อมะเร็ง โดยการจับกับสารเหล่านั้นในลำไส้ Rowland และ Grasso (1975) พบว่า lactobacilli สามารถย่อยสาร nitrosamines ได้

4. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพและปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้

การบริโภคนมหมักที่มี *L. acidophilus* ทำให้สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในอุจจาระได้ เช่น coliforms และเพิ่มระดับของ lactobacilli ในลำไส้ได้ (Ayebo *et al.*, 1980) นอกจากนี้การบริโภค *L. acidophilus* ยังมีประโยชน์ในลำไส้เล็กโดยการหยุดยั้งของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น (putrefactive bacteria) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตสารเร่งการเกิดมะเร็ง (tumor promoters) และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเหม็นเน่า อย่างไรก็ตามกลไกที่เกี่ยวข้องกับผลกระทบนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

5. การผลิตสารประกอบ anti-tumorigenic หรือ antimutagenic

LAB หรือสารประกอบที่สามารถละลายน้ำได้ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียอาจจะมีปฏิกิริยาโดยตรงกับเซลล์มะเร็งในการเพาะเลี้ยงและการยับยั้งการเจริญ (Reddy *et al.*, 1983) LAB สามารถลดการเจริญ และความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 ในคนได้ โดยการเพิ่ม dipeptidyl peptidase IV และ brush border enzymes (Baricault *et al.*, 1995)

6. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การยับยั้งเนื้องอกโดย LAB อาจทำได้โดยการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย Sekine *et al.* (1985) พบว่า *B. infantis* สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งหรือการทำให้เนื้องอกหายไป นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่า LAB ยังมีหน้าที่สำคัญในระบบการป้องกันทางภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มกลไกที่จำเพาะและไม่จำเพาะที่มีผลกระทบกับในการยับยั้งเนื้องอก (Schiffirin *et al.*, 1995)

L. casei สายพันธุ์ Shirota (LcS) สามารถเป็น anti-tumorigenic และ antimetastatic ที่มีผลกับการย้ายการเพาะเลี้ยงของเซลล์เนื้องอก (tumor cell) และสามารถยับยั้งการชักนำของกระบวนการก่อมะเร็งในหนูได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ LcS ในหนูที่เป็น tumour-bearing จะทำให้เกิดการชักนำการผลิต cytokines เช่น interferon- γ , interleukin- β และ tumour necrosis factor- α ใน thoracic cavity ของหนู ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก และสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของหนูได้ (Matsuzaki, 1998) จากการศึกษาทำให้ทราบว่า การรักษาด้วย LcS เป็นการรักษาที่มีศักยภาพและสามารถป้องกันกระบวนการเกิดเนื้องอกได้ตลอดจนการไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างจำเพาะเจาะจง

7. มีผลต่อสรีรวิทยาของร่างกาย

Lactobacilli เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความสำคัญในลำไส้เล็ก และมีผลในการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร ในส่วนของ ileal mucosa (Venitt, 1988) และ colonic mucosa (Fang and Strobel, 1978) มีความสามารถในการดูดซับสารก่อมะเร็งจาก intestinal lumen หลังจากสารเหล่านี้ผ่านเข้าไปในกระแสเลือด ซึ่งสารเหล่านั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเป็นเหมือนสารเมตาบอไลต์ LAB บางสายพันธุ์สามารถเพิ่มกิจกรรมของ NADPH-cytochrome P-450 reductase (Pool-Zobel *et al.*, 1996) และระดับของ glutathione S-transferase (Challa *et al.*, 1997) และลดกิจกรรมของ hepatic uridine diphoglucuronyl transferase (Rowland *et al.*, 1998) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับเมตาบอไลซึมของกระบวนการก่อมะเร็งในหนู

Arimochi *et al.* (1997) พบว่า *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการสร้าง aberrant crypt focus (ACF) ในลำไส้ของหนูซึ่งถูกชักนำโดย azoxymethane (AOM) และเพิ่มการกำจัด O⁶-methylguanine จาก colon mucosal DNA ซึ่งผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้เกิดจากการใช้สารละลายส่วนในด้านบนของเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการบริโภค *B. longum* ในรูปแบบแข็งแบบแห้งจะมีผลทำให้ไปกุดการพัฒนาของ AOM-induced colonic tumour ซึ่งทำให้เกิดการลดการแบ่งตัวของ colonic mucosal cell และลดกิจกรรมของ colonic mucosal และ tumour ornithine decarboxylase และ ras-p21 (Reddy, 1998)

บทบาทของโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

Zabala *et al.* (2001) ศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากมนุษย์ในการยับยั้งการเจริญของ myeloma cell line โดยใช้วิธีทดสอบคือ MTT assay จากการทดลองพบว่า *Enterococcus faecium* CH3 และ *Lactobacillus salivarius* HA8 สามารถยับยั้งการเจริญของ myeloma cell line ได้ 70.9-81.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 10^6 - 10^7 cfu/ml และเมื่อใช้ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml พบว่ามีการยับยั้งการเจริญของ myeloma cell ที่สูงมาก (84.3 และ 95 เปอร์เซ็นต์สำหรับ *Enterococcus faecium* CH3 และ *Lactobacillus salivarius* HA8 ตามลำดับ) ซึ่งการยับยั้งการเจริญนี้อาจเกิดจากการที่แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ myeloma หรือชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์

Sylvia *et al.* (2006) ศึกษาการชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ HT-29 จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกคือ *Lactobacillus acidophilus* MR100 (100), *Lactobacillus bulgaricus* MR110 (110), *Lactobacillus acidophilus* NRC13017 (017), *Lactobacillus acidophilus* NRC13019 (019), *Lactobacillus casei* ADA03 (03), *Lactobacillus casei* NRC13005 (005), *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* CCCC2601 (2601) และ Yogurt Culture YC085 (085) สามารถชักนำเซลล์มะเร็งลำไส้ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ โดย *Lactobacillus casei* ADA03 (03), *Lactobacillus casei* NRC13005 (005), *Lactobacillus acidophilus* NRC13017 (017) ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงที่สุด ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 10^9 cfu/ml

Lee *et al.* (2007) ศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของ *Bacillus polyfermenticus* SCD เช่น คุณสมบัติการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ในมนุษย์และการยับยั้งกระบวนการก่อมะเร็งในลำไส้หนู ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถยึดเกาะกับผิวเซลล์ได้เป็นอย่างดีและสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสมโดยใช้การวิเคราะห์คือ MTT assay และเมื่อทำการทดลองในหนูพบว่าหลังจากให้ *Bacillus polyfermenticus* SCD ไปแล้ว 10 อาทิตย์ด้วยปริมาณ 3×10^6 cfu/วัน พบว่ามีการเจริญลดลง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มเปลี่ยนแปลงจากจุดเล็ก ๆ และลามต่อมาเรื่อย ๆ ที่ถูกชักนำโดย dimethylhydrazine เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม

Kim *et al.* (2002) ศึกษาการใช้เซลล์แบคทีเรีย ไซโตรพลาสซึมและเปปติโดไกลแคน จาก LAB 10 สายพันธุ์ ซึ่งศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์ไลน์ของมะเร็งโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ ³H-thymidine จากผลการทดลองพบว่าเซลล์แบคทีเรีย ไซโตรพลาสซึมและเปปติโดไกลแคนมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด โดยในส่วนของไซโตรพลาสซึมมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งกระเพาะอาหาร ในขณะที่เปปติโดไกลแคนมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ส่วนของไซโตรพลาสซึมของ *Bifidobacterium longum* และ *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* มีกิจกรรมการยับยั้งของเซลล์มะเร็งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 2 ชนิดคือ เซลล์ SNUC2A (เซลล์มะเร็งลำไส้) โดยใช้ส่วนของไซโตรพลาสซึม 33 และ 23 µg/ml ตามลำดับ และ เซลล์ SNU-1 (เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร) โดยใช้ส่วนของไซโตรพลาสซึม 17 และ 11 µg/ml ตามลำดับ

กรอบแนวความคิด

โรคมะเร็งลำไส้เป็นโรคที่มีผู้ป่วยเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งสาเหตุหลักมาจากการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกหลักโภชนาการ โดยเฉพาะการรับประทานอาหารจำพวกเนื้อแดงและไขมัน ไม่รับประทานผักหรือผลไม้ นอกจากนี้แบคทีเรียในลำไส้ยังเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ด้วย ทำให้มีอัตราการตายด้วยโรคนี้นี้เพิ่มสูงขึ้น การรักษาโรคมะเร็งลำไส้สามารถทำได้ 3 วิธีคือ การผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัด และการฉายรังสีรักษา ซึ่งการรักษาตามวิธีดังกล่าวอาจให้ผลข้างเคียงกับผู้ป่วยได้ อีกทั้งยังพบว่าทรัพยากรที่นำมาใช้ในการบำบัดหรือรักษาโรคมะเร็งลำไส้ นั้นนั้นมีปริมาณมากและค่าใช้จ่ายสูง อาทิเช่น ยาหรือสารเคมีซึ่งส่วนใหญ่ก็นำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้ในแต่ละปีประเทศของเราจะต้องเสียเงินจำนวนมากในการจัดหาทรัพยากรเหล่านี้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงพยายามศึกษาและคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ โดยวางแผนในการเก็บรวบรวมเชื้อที่มีความสามารถในการปรับตัวให้เหมาะสมกับมนุษย์เรามากที่สุด ซึ่งเลือกเก็บตัวอย่างจากมูลทวารที่หลากหลายและมีสุขภาพแข็งแรงรวมไปถึงน่านมหมักให้ได้จำนวนตัวอย่างมากที่สุด หลังจากนั้นจะทำการทดสอบการมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกทั่วไป อาทิเช่น คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทนต่อระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น ในขั้นตอนสุดท้ายก็จะทดสอบเชื้อที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cell) เพื่อให้ได้โปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานไปประยุกต์ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียทางด้านการแพทย์ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโปรไบโอติก เพื่อเป็นการลดการนำเข้าของยาและสารเคมีจากต่างประเทศ และใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งลำไส้ ซึ่งทางเลือกนี้เป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายไม่แพงและไม่มีผลข้างเคียงใด ๆ อีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก และน้ำนมดิบที่นำมาแยกแบคทีเรีย
 - 1.1 ตัวอย่างอุจจาระเด็กทารกที่มีอายุอยู่ระหว่าง 1-14 วัน จากโรงพยาบาลแม่และเด็ก จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 17 ตัวอย่าง
 - 1.2 ตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 7 ตัวอย่าง
2. แบคทีเรียก่อโรคที่นำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ (indicator strains)
 - 2.1 *Escherichia coli* TISTR 780
 - 2.2 *Salmonella typhimurium* TISTR 292
 - 2.3 *Staphylococcus aureus* TISTR 118
 - 2.4 *Salmonella enteritidis* DMST 15676
 - 2.5 *Bacillus cereus* TISTR 121
 - 2.6 *Listeria monocytogenes* DMST 1783
 - 2.7 *Vibrio cholera* DMST 2873
 - 2.8 *Helicobacter pylori* DMST 20165
3. อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
 - 3.1 อาหารแข็งสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (MRS) (Criterion, USA)
 - 3.2 อาหารเหลวสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (Criterion, USA)
 - 3.3 อาหารแข็งสูตร Brain heart infusion (BHI) (Scharlau, Spain)
 - 3.4 อาหารกึ่งเหลวสูตร Brain heart infusion (Scharlau, Spain)
 - 3.5 อาหารเหลวสูตร Brain heart infusion (Scharlau, Spain)

4. อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

4.1 อาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco™)

5. เซลล์ต้นตอของเซลล์มะเร็งลำไส้

5.1 เซลล์ Caco-2 (CLS, Germany)

6. สารเคมี

6.1 Sodium chloride (NaCl) (Merk, Germany)

6.2 Sodium bicarbonate (NaHCO₃) (Merk, Germany)

6.3 Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) (Ajax Finechem, Austraria)

6.4 Emulsion oil (Merk, Germany)

6.5 Bile salt (Sigma, USA)

6.6 Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA)

6.7 Trysin EDTA (Hyclone, USA)

6.8 Absolute ethanol (Merk, Germany)

6.9 Glycerol (Merk, Germany)

6.10 Hydrochloric acid (Merk, Germany)

6.11 Hydrogen peroxide (H₂O₂) (Merk, Germany)

6.12 Sodium hydroxide (Merk, Germany)

6.13 Fetal calf serum (Hyclone, USA)

6.14 Non-essential amino acid (Hyclone, USA)

6.15 Triton-X 100 (Merk, Germany)

6.16 ยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml and 10,000 µg/ml) (Hyclone, USA)

6.17 ชุดข้อมแกรม (gram's strain set) (Bio-Medical Laboratory, Thai)

7. สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S

rRNA

- 7.1 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Mobio DNA extraction kit)
- 7.2 Master mix (Promega, USA)
- 7.3 27F (forward primer) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
- 7.4 520R(reverse primer) 5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3'ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (TaKaRa SUPREC™-PCR) (Takara, Japan)
- 7.5 Loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
- 7.6 O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
- 7.7 เอนไซม์ RNase (Nippon Gene, Japan)
- 7.8 Absolute ethanol (Merck, Germany)
- 7.9 ผงวุ้นอะกาโรส

8. เครื่องมือ

- 8.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 8.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 8.3 เครื่องเขย่า
- 8.4 เครื่องพีซีอาร์ (PCR Sprint Thermal Cycler, ยี่ห้อ Thermal hybrid รุ่น Sprint)
- 8.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Digital Balance, ยี่ห้อ OHAUS)
- 8.6 ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Menmert, Germany)
- 8.7 ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ, Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)
- 8.8 ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO2 Incubator, ยี่ห้อ Forma Scientific, รุ่น 3111, USA)
- 8.9 ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115(E2), USA)
- 8.10 ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)
- 8.11 ตู้เขี่ยเชื้อ (Horizontal type laminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3, ประเทศไทย)

- 8.12 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)
- 8.13 ตู้ฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)
- 8.14 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope, ยี่ห้อ Olympus รุ่น UM 500)
- 8.15 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope, Olympus, ULWCD 0.30)
- 8.16 พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)
- 8.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath/Unstirred digital bath, ยี่ห้อ Julabo Labortechnik GMBH รุ่น TW12)
- 8.18 ถังไนโตรเจนเหลว (TAYLOR-WHARTON, XT-20, USA)

9. อุปกรณ์อื่นๆ

- 9.1 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร
- 9.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิเมตร
- 9.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิเมตร
- 9.4 ปีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิเมตร
- 9.5 ปีเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิเมตร
- 9.6 กระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิเมตร
- 9.7 ไมโครปีเปต ปรับปริมาตรได้ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิเมตร
- 9.8 Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
- 9.9 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- 9.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 9.11 Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร
- 9.12 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 9.13 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) และกระจกปิดสไลด์ (cover glass)
- 9.14 ถาดหลุม 24 หลุม
- 9.15 ถาดหลุม 96 หลุม
- 9.16 ขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 50 มิลลิเมตร

วิธีการวิจัย

1. การคัดแยกและเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย

1.1 การเก็บตัวอย่างมูลของเด็กทารก

เก็บตัวอย่างมูลของเด็กทารก ซึ่งมีอายุอยู่ระหว่าง 1-14 วัน จากโรงพยาบาลแม่และเด็ก จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระเด็กทารกในหลอด Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปแยกเชื้อแบคทีเรียต่อไป

1.2 การเก็บตัวอย่างน้ำนม

เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบของแม่โค จากฟาร์มโคนมในจังหวัดเชียงใหม่ และเก็บตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการต้มแล้วจากร้านขายนมสด ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการเก็บในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปบ่มภายในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เพื่อรอการนำไปแยกเชื้อแบคทีเรียต่อไป

1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างมูลเด็กทารกและตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการ โดยทำการเจือจางในน้ำเกลือเป็นลำดับขั้น (serial dilution) แล้วเลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ นำมาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลือกกลุ่มโคโลนีที่แตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีด (streak) บนอาหารแข็งสูตร MRS จนได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) ที่บริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่เก็บรักษาในกลีเซอรอลมาซัดลงบนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งมาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ ผึ่งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเชื้อให้ติดกับสไลด์แน่นขึ้น (heat fix) ทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) โดยย้อมด้วยสี crystal violet ให้ทั่วมรอยเชื่อนาน 1-2 นาที เทสีทิ้ง และล้างสีออกด้วยน้ำประปาเบา ๆ แล้วหยดสารละลาย iodine ให้ทั่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ล้างสี crystal violet ออกด้วย acetone alcohol (ethylalcohol + acetone) ประมาณ 5-10 วินาที และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ย้อมทับด้วยสี safranin นาน 1 นาที และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ อีกครั้ง ผึ่งสไลด์ให้แห้งแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงสุด โดยทำการศึกษารูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรีย

2.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคใช้วิธี well diffusion assay โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบ 8 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TIRTS 118, *Salmonella enteritidis* DMST 15676, *Bacillus cereus* TISTR 121 และ *Vibrio cholera* DMST 5655 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ ส่วน *Listeria monocytogenes* DMST 1783 และ *Helicobacter pylori* DMST 20165 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BHI ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศและไร้อากาศตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบและเชื้อก่อโรคไปวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (Optical Density; OD₆₀₀) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A สำหรับเชื้อแบคทีเรียทดสอบและ 0.5 A สำหรับ

เชื้อก่อโรค นำเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมลงในอาหารวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเชื้อก่อโรค 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เมื่อผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเททับบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร MRS จากนั้นทำการเจาะหลุมบนอาหารด้วยเครื่องเจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6 มิลลิเมตร แล้วรองก้นหลุมด้วยอาหารวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร BHI ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบลงไป ในหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และอาหารเหลวสูตร MRS เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่เททับด้วยเชื้อก่อโรค *Helicobacter pylori* บ่มในสภาวะไร้อากาศ สังเกตและบันทึกขนาดวงใสที่เกิดขึ้นซึ่งเกิดจากกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียที่ทดสอบ แล้วนำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ไปทดสอบคุณสมบัติในขั้นต่อไป (ดัดแปลงจากวิธีการของ Petro *et al.*, 2005)

2.3 การศึกษาความสามารถในการเจริญได้ในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด 2.5

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ และนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบไปวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 2.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง โดยการเจือจางในสารละลาย peptone water เป็นลำดับขั้น (serial dilution) ครั้งละ 10 เท่า แล้วเลือกกระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ นำมาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมานับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS (ดัดแปลงจากวิธีการของ Arici *et al.*, 2004)

2.4 การศึกษาความสามารถในการเจริญได้ในอาหาร MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ได้

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ และนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบไปวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดชีวิตที่ 24 ชั่วโมง โดยการเจือจางในสารละลาย peptone water เป็นลำดับขั้น (serial dilution) แล้วเลือกกระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ นำมาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมา นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS (ดัดแปลงจากวิธีการของ Gagnon *et al.*, 2004)

2.5 การศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญนั้นมาฉีดอีกครั้งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร blood agar ที่มีเลือดมนุษย์ 5 เปอร์เซ็นต์ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นทำการสังเกตลักษณะการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะคือ แบบเบต้า แบบแอลฟา และแบบแกมมา ทำการบันทึกผลที่เกิดขึ้น

2.6 การศึกษาการต้านยาปฏิชีวนะ

การศึกษาคูณสมบัติของแบคทีเรียที่มีต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะใช้วิธี agar disc diffusion โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ และนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบไปวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A จากนั้นนำ

ไม้พ่นสาธิตจุ่มลงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่และนำไปทาบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร MRS นำ disc ที่มียาปฏิชีวนะประกอบไปด้วย chloramphenicol 30 µg, ampicillin 10 µg, erythromycin 15 µg, tetracycline 30 µg และ kanamycin 30 µg วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร MRS ซึ่งทำด้วยอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นเนื่องจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Arici *et al.*, 2004) ในการทดลองนี้ใช้ disc ยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นไม่เท่ากันเนื่องจากยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีความแรงของยาปฏิชีวนะไม่เท่ากัน ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้เป็นความเข้มข้นที่ยาปฏิชีวนะทุกชนิดมีความแรงเท่ากันอีกทั้งยังเป็นความเข้มข้นที่ใช้ทั่วไปภายในห้องปฏิบัติการ (www.oxoid.com)

3. การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco™) ที่มี fetal calf serum 10 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) 1% และ non-essential amino acid 1 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตรโดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 15 วัน เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะเกาะเกือบเต็ม (subconfluent) เพื่อให้ได้เซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ดีและมีความสามารถในการเจริญสูง (high viability) ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต้องทำเซลล์มะเร็งลำไส้ซึ่งเป็นเซลล์เกาะผิวให้แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร DMEM โดยใช้วิธี trypsinization ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เอนไซม์ trypsin-EDTA ย่อยเซลล์ให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ ทำโดยเริ่มจากการล้างอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกทิ้งไปและเติมเอนไซม์ trypsin-EDTA ลงไปประมาณ 2 มิลลิลิตร เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาให้เอนไซม์กระจายทั่วครอบคลุมเซลล์ ประมาณ 30 วินาที คุณเอนไซม์ละลายทิ้งไป จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น

เวลา 10 นาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร DMEM ลงไป ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดูดเป่าสารละลายเซลล์ขึ้นลงเบา ๆ 3-4 ครั้ง เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากการเกาะติดกัน นำไปนับจำนวนเซลล์เริ่มต้น

3.2 การเตรียมแบคทีเรียที่มีชีวิต (live whole cell)

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ นำอาหารที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่มาวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A จากนั้นทำการดูดอาหารที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ และมีค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

3.3 การเตรียม cultured medium จากแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ นำอาหารที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่มาวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A จากนั้นทำการดูดอาหารที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ และมีค่าความขุ่นอยู่ที่ 1.00 A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ และนำเอาอาหารที่มีแบคทีเรียที่เจริญอยู่มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใส (supernatant) ของแบคทีเรียออกมา นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ที่มีขนาดรูกรองประมาณ 0.2 ไมโครเมตร เก็บในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการทดสอบต่อไป

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งลำไส้โดยใช้วิธี MTT assay

เจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม cultured medium ของแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้างต้น (ข้อ 3.3) ลงในภาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญของเซลล์ Caco-2 โดยใช้วิธี MTT assay เริ่มจากการล้างเซลล์ที่มี cultured medium ของแบคทีเรีย ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO) ปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan ทิ้งไว้นาน 5 นาทีและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm ซึ่งใช้ blank คือ สารละลาย MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รวมอยู่กับสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และกลุ่มควบคุมคือ เซลล์ที่ไม่มีการเติม cultured medium ของแบคทีเรีย โดยกลุ่มควบคุมให้คิดการเจริญของเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเซลล์} = (A_t / A_c) \times 100$$

โดยที่

A_t เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

A_c เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion

เจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในภาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม cultured medium ของแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้างต้น (ข้อ 3.3) และแบคทีเรียที่มีชีวิต (live whole cell) ที่เตรียมได้จากข้างต้น (ข้อ 3.2) ในภาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญของเซลล์ Caco-2 โดยใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ เริ่มจากการนับเซลล์แขวนลอย ดูดเซลล์แขวนลอยจากภาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ใส่ในหลอด microtube ขนาด

1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และเติมสีย้อม trypan blue ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป ในหลอดนั้น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที แล้วเปิดดูคราประมาณ 10 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงตรงช่องระหว่างตัวสไลด์กับ cover slip ของ hemocytometer นำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเซลล์ที่รอดชีวิตจะ ไม่มีการติดสีย้อม trypan blue และเซลล์ที่ตายจะมีการติดสีย้อม trypan blue ส่วนการนับเซลล์เกาะผิวต้องทำการย่อยเซลล์โดยใช้เอนไซม์ trypsin-EDTA ก่อน และนำมานับจำนวนเซลล์ซึ่งใช้วิธีการเดียวกันกับเซลล์แขวนลอย นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์} = (\text{เซลล์ที่รอดชีวิต} / (\text{เซลล์ที่รอดชีวิต} + \text{เซลล์ตาย})) \times 100$$

3.6 การศึกษาประสิทธิภาพการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์ Caco-2

เชื้อจากเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ควบเซลล์แขวนลอยใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 48 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 15 วันแล้วทำการเปลี่ยนอาหารในถาดหลุม 24 หลุม เป็นอาหาร non-supplemented DMEM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งนำไปวัดค่าความขุ่นโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) โดยให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ที่ 0.50 A นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้ยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ออกไป และทำการเติม สาร Triton-X 100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 15 นาที เพื่อให้เซลล์ Caco-2 แฉก ทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 โดยการเจือจางในสารละลาย peptone water เป็นลำดับขั้น (serial dilution) แล้วเลือกกระดပ်ความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ นำมาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมานับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS ทำการ

เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นกับจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 (ดัดแปลงจากวิธีการของ Gangnon *et al.*, 2004 และ Maragkoudakis *et al.*, 2006

4. การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในส่วนของยีน 16S rRNA

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่เก็บรักษาในกลีเซอรอลมาจัดลงบนอาหารแข็งสูตร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง ทำการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture characteristic) ของแบคทีเรีย และนำโคโลนีของแบคทีเรียมาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ ผึ่งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเชื้อให้ติดกับสไลด์แน่นขึ้น (heat fix) ทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) โดยย้อมด้วยสี crystal violet ให้ทั่วรอยเชื่อนาน 1-2 นาที เทสีทิ้ง และล้างสีออกด้วยน้ำประปาเบา ๆ แล้วหยดสารละลาย iodine ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสารละลาย iodine ทิ้ง และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ล้างสี crystal violet ออกด้วย acetone alcohol (ethylalcohol + acetone) ประมาณ 5-10 วินาที และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ ย้อมทับด้วยสี safranin นาน 1 นาที และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ อีกครั้ง ผึ่งสไลด์ให้แห้งแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงสุด โดยทำการศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย

4.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในส่วนของยีน 16S rRNA

4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแบคทีเรียเจริญไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้งไป แล้วนำตะกอนของแบคทีเรียที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Mobio DNA extraction kit) ตามขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำ bead solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเขย่าแรง ๆ (vortex) เป็นเวลา 5-10 วินาที ย้ายสารละลายนั้นใส่ลงใน bead ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมน้ำ MD1 solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเขย่าแรง ๆ (vortex) เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000

รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนใสด้านบนปริมาตร 350 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เดิม MD2 solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าแรง ๆ (vortex) เป็นเวลา 5-10 วินาที นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5-10 นาที ย้ายส่วนใสด้านบนปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ขนาด 2 มิลลิลิตร เดิม MD3 solution ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วเขย่าแรง ๆ (vortex) เป็นเวลา 5-10 วินาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 675 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด filter นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง เดิม MD4 solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไป ย้าย filter ใส่ลงในหลอดใหม่ จากนั้น เดิม MD5 solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณขึ้น 16S rRNA ต่อไป

4.2.2 การเพิ่มปริมาณขึ้น 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณขึ้นในส่วน of 16S rRNA โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ universal primer คือ 27F (forward primer) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ 520R (reverse primer) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3' (Operon, Germany) เพื่อเพิ่มปริมาณขึ้น 16S rRNA ที่ลำดับเบสในตำแหน่ง V₁-V₃ ซึ่งมีลำดับเบสประมาณ 500 คู่เบส โดย primer ทั้งสองนี้มีลำดับเบสตรงกับบริเวณอนุรักษ์ของขึ้น 16S rRNA ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR โดยให้มีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

Master mix	ปริมาตร 25 ไมโครลิตร
27F primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
520R primer (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์)	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
Genomic DNA (ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	ปริมาตร 17 ไมโครลิตร
ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณขึ้น 16S rRNA โดยใช้	

เครื่อง PCR Sprint Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้

Initial denatureation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
{ Denaturation Annealing Extension	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
Terminating	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis) ตามขั้นตอนดังนี้คือ เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำไปหลอมให้ละลาย และนำเจลที่ได้มาเทใน apparatus รอให้เจลแข็งตัว และนำเจลไปวางในเครื่อง run gel เท 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอดังนี้คือ ใช้ DNA marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปิดฝาเครื่องและตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 20 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 10 นาที จากนั้นนำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยเครื่อง Transluminator

4.2.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

โดยใช้ชุด TaKaRa SUPREC™-PCR ตามขั้นตอนดังนี้ ปิเปิด PCR product มาปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในคอลัมน์ นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวที่อยู่ในหลอด microcentrifuge tube ที่ทิ้ง แล้วเติม TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ดูก้อนลงและดูดบริเวณเยื่อกรองในคอลัมน์ให้หลุดออกมา คั่วคอลัมน์ลงในหลอด centrifuge อันใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะได้ PCR product บริสุทธิ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อไปทำการหาลำดับเบสของยีนในส่วน 16S rRNA โดยบริษัท Frist Base Laboratories Company ประเทศมาเลเซีย นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ the national Center for Biotechnology Information; NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งจะช่วยให้ทราบ genus และ species ของแบคทีเรียได้

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มโดยวิธี Duncan's multiple range test



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลของเด็กทารกและนํ้านมหมัก

จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลของเด็กทารก ซึ่งเก็บตัวอย่างจากในจังหวัด เชียงใหม่ จำนวน 17 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จำนวน 82 ไอโซเลต ส่วนการแยกแบคทีเรียจากนํ้านมจากฟาร์มโคนมในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 4 ตัวอย่าง และนํ้านมที่ผ่านการต้มแล้วจากร้านขายนมสดในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จำนวน 55 ไอโซเลต ดังนั้นได้แบคทีเรียทั้งหมด 137 ไอโซเลต

2. การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของแบคทีเรีย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลเด็กทารก แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม จำนวน 77 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน จำนวน 5 ไอโซเลต การแยกแบคทีเรียจากนํ้านมจากฟาร์มโคนมได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน จำนวน 5 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม จำนวน 33 ไอโซเลต ส่วนการแยกแบคทีเรียจากร้านขายนมสดได้เป็น แบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน จำนวน 8 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม จำนวน 9 ไอโซเลต สรุปได้ดังตาราง 3

ตาราง 3 รูปร่างและจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	แกรมบวก		
		รูป ท่อน	รูป กลม	รวม
มูลเด็กทารก จากโรงพยาบาล ในจังหวัดเชียงใหม่	17	5	77	82
น้ำนมดิบ จากฟาร์มโคนม ในจังหวัดเชียงใหม่	4	5	33	38
น้ำนม จากร้านขายนมสด ในจังหวัดเชียงใหม่	3	8	9	17
รวม	24	18	119	137

2.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค 8 สายพันธุ์คือ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholera* โดยวิธี well diffusion assay พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลต จาก 137 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก 15 ไอโซเลต คือ MC31, MC32, MC41, MC51, MC52, MC53, MC71, MC101, MC102, MC111, MC112, MC116, MC118, MC157 และ MC158 นอกจากนั้นเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมหมัก 5 ไอโซเลต คือ RM11, RM12, RM24, RM28, และ RM34

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* สูงสุดคือ 15.67 มิลลิเมตร แบคทีเรียไอโซเลต MC51 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* สูงสุดคือ 21.67 มิลลิเมตร แบคทีเรียไอโซเลต MC52 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* สูงสุดคือ 18.33 มิลลิเมตร แบคทีเรียไอโซเลต MC52 และ MC53 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* สูงสุดคือ 16.67 มิลลิเมตร แบคทีเรียไอโซเลต MC52 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สูงสุดคือ 24.67 มิลลิเมตร แบคทีเรียไอโซเลต MC52 และ MC53 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Salmonella enteritidis* สูงสุดคือ 16.67 มิลลิเมตร แบคทีเรียไอ

โชนิต MC52 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* สูงสุดคือ 24.00 มิลลิเมตร และแบคทีเรียโชนิต MC157 ให้บริเวณการยับยั้งเชื้อ *Vibrio cholera* สูงสุดคือ 23.33 มิลลิเมตร ดังแสดงตาราง 4 ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคท้องร่วง โรคอาหารเป็นพิษ และลำไส้อักเสบ รวมไปถึง โรคมะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งลำไส้ การเกิดโรคมะเร็งลำไส้ส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยหากในลำไส้มีเชื้อก่อโรคที่สามารถผลิต carcinogen, co-carcinogen และ pro-carcinogen ได้เป็นจำนวนมากจะส่งผลให้มีสารก่อมะเร็งในร่างกายมากขึ้น จนก่อให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ในที่สุด (Drasar and Hill, 1974) มีรายงานว่า bifidobacteria ในลำไส้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งในการเจริญของ *E.coli* และ *clostridium* จากการทำให้สภาวะในลำไส้มีค่าความเป็นกรดต่ำลงลง ซึ่งทำให้ลดการผลิตสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จากเชื้อก่อโรคพวกนี้ได้ (Kulkarni and Reddy, 1994) Klingberk *et al.* (2005) ได้ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของโปรไบโอติกที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก Scandinavian พบว่ามีแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้คือ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Yersenia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* และ Jacobsen *et al.* (1999) รายงานว่าได้ทำการคัดเลือก *Lactobacillus* 47 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยใช้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเป็นขั้นตอนหนึ่งในการคัดเลือก พบว่า *Lactobacillus* DSM 1244 ให้ผลดีที่สุดคือสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 7 สายพันธุ์ คือ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersenia enterocolitica* โดยให้บริเวณยับยั้งที่มากกว่า 5 มิลลิเมตร

ตาราง 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญในระบบทางเดินอาหาร 8 สายพันธุ์ (Mean $\pm$ SE, n = 3)

แบคทีเรีย	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)							
	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. cholera</i>
MC31	14.7 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 0.9	18.3 $\pm$ 1.2	20.0 $\pm$ 0.6	19.7 $\pm$ 0.9
MC32	14.7 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.6	20.3 $\pm$ 1.5	16.3 $\pm$ 1.5	19.3 $\pm$ 2.7	22.0 $\pm$ 1.5
MC41	14.0 $\pm$ 1.0	13.7 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.6	22.0 $\pm$ 0.6	17.0 $\pm$ 1.0	20.3 $\pm$ 4.2	22.7 $\pm$ 1.5
MC51	13.3 $\pm$ 0.3	21.7 $\pm$ 1.7	11.0 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.6	22.3 $\pm$ 1.2	19.7 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 2.7	21.0 $\pm$ 4.0
MC52	15.7 $\pm$ 0.3	18.7 $\pm$ 0.3	18.3 $\pm$ 0.3	16.7 $\pm$ 0.3	24.7 $\pm$ 0.3	20.3 $\pm$ 0.3	24.0 $\pm$ 0.6	19.3 $\pm$ 0.3
MC53	15.0 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 0.6	18.0 $\pm$ 0.6	16.7 $\pm$ 0.3	23.7 $\pm$ 0.3	20.0 $\pm$ 0.6	22.7 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 0.3
MC71	15.00 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 0.6	21.0 $\pm$ 1.0	17.7 $\pm$ 1.5	20.3 $\pm$ 0.9	23.0 $\pm$ 0.6
MC101	13.7 $\pm$ 0.9	18.0 $\pm$ 1.0	15.0 $\pm$ 0.0	11.7 $\pm$ 0.3	21.7 $\pm$ 0.9	17.7 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 1.2
MC102	12.0 $\pm$ 0.6	21.0 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 0.9	22.0 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 0.7	18.7 $\pm$ 3.2
MC111	11.7 $\pm$ 0.3	18.0 $\pm$ 0.0	11.0 $\pm$ 0.0	14.7 $\pm$ 1.2	23.7 $\pm$ 0.9	16.7 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.0	22.3 $\pm$ 0.3
MC112	13.0 $\pm$ 0.0	13.3 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 0.3	21.3 $\pm$ 1.2	17.3 $\pm$ 1.2	17.0 $\pm$ 2.1	18.3 $\pm$ 0.9
MC116	13.0 $\pm$ 0.0	21.0 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 0.0	11.7 $\pm$ 0.3	19.0 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 1.0	11.7 $\pm$ 0.3	18.3 $\pm$ 2.4

ตาราง 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญในระบบทางเดินอาหาร 8 สายพันธุ์ (Mean $\pm$ SE, n = 3) (ต่อ)

แบคทีเรีย	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)							
	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. cholera</i>
MC118	13.0 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 0.0	20.67 $\pm$ 1.3	14.00 $\pm$ 0.6	12.0 $\pm$ 0.0	20.3 $\pm$ 3.7
MC157	12.3 $\pm$ 0.3	20.7 $\pm$ 2.3	14.7 $\pm$ 0.3	16.0 $\pm$ 1.5	21.67 $\pm$ 0.9	19.00 $\pm$ 0.6	16.0 $\pm$ 1.5	23.3 $\pm$ 0.7
MC158	12.3 $\pm$ 0.9	16.3 $\pm$ 1.2	11.7 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.3	21.00 $\pm$ 0.6	14.67 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.3	16.3 $\pm$ 2.0
RM11	11.7 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.0	11.7 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.6	17.67 $\pm$ 0.3	14.33 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.7	12.7 $\pm$ 0.3
RM12	14.3 $\pm$ 0.7	13.7 $\pm$ 0.3	14.7 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 0.6	16.00 $\pm$ 1.0	14.33 $\pm$ 0.3	14.7 $\pm$ 0.3	13.7 $\pm$ 0.7
RM24	11.7 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.0	15.3 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.6	15.67 $\pm$ 0.7	14.33 $\pm$ 0.3	13.7 $\pm$ 0.9	12.7 $\pm$ 0.3
RM28	14.7 $\pm$ 0.3	15.3 $\pm$ 0.7	16.3 $\pm$ 0.7	13.7 $\pm$ 0.9	16.67 $\pm$ 0.3	15.33 $\pm$ 0.3	18.7 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 0.6
RM34	11.3 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.9	12.0 $\pm$ 0.6	11.3 $\pm$ 0.3	14.67 $\pm$ 0.3	13.33 $\pm$ 0.3	14.3 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 0.3

ในระบบทางเดินอาหารของคนเรามีจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ซึ่งอาจมีเกือบจะ 100 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันจากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ 10^{10} - 10^{12} cfu/ml (Simon and Gorbach, 1984) จุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กับร่างกายและจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อก่อโรค มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้สมดุลจุลินทรีย์ในร่างกายไม่มีความเหมาะสม เช่น การบริโภคอาหาร สภาพอากาศ อายุ การรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะ อาการเจ็บป่วย ความเครียด การดำรงชีวิต ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้อาจนำไปสู่การป่วยเป็นโรคท้องร่วง ลำไส้อักเสบ หรือโรคมะเร็งลำไส้ การปรับสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกายนี้เรียกว่า “eubiosis” (Sanderson and Walker, 1993) Chukeatirote, 2003 รายงานว่าหากในร่างกายคนเรามีจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับร่างกาย เช่น แบคทีเรียแกรมบวก *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จะส่งผลให้ขาดวงการก่อโรคของเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งกลไกต่าง ๆ อาจประกอบไปด้วย การแก่งแย่งอาหารกับเชื้อก่อโรค การแย่งพื้นที่ยึดเกาะภายในลำไส้ รวมไปถึงการผลิตสารต่าง ๆ ที่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคเหล่านี้ การยับยั้งของแบคทีเรียกลุ่ม LAB ที่มีต่อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2), กรดอินทรีย์ (organic acids) หรือสารแบคทีริโอซิน (bacteriocin) โดยตัวเซลล์ของ LAB เอง (Lorca *et al.*, 2001, Silvia and Nakaia, 2003)

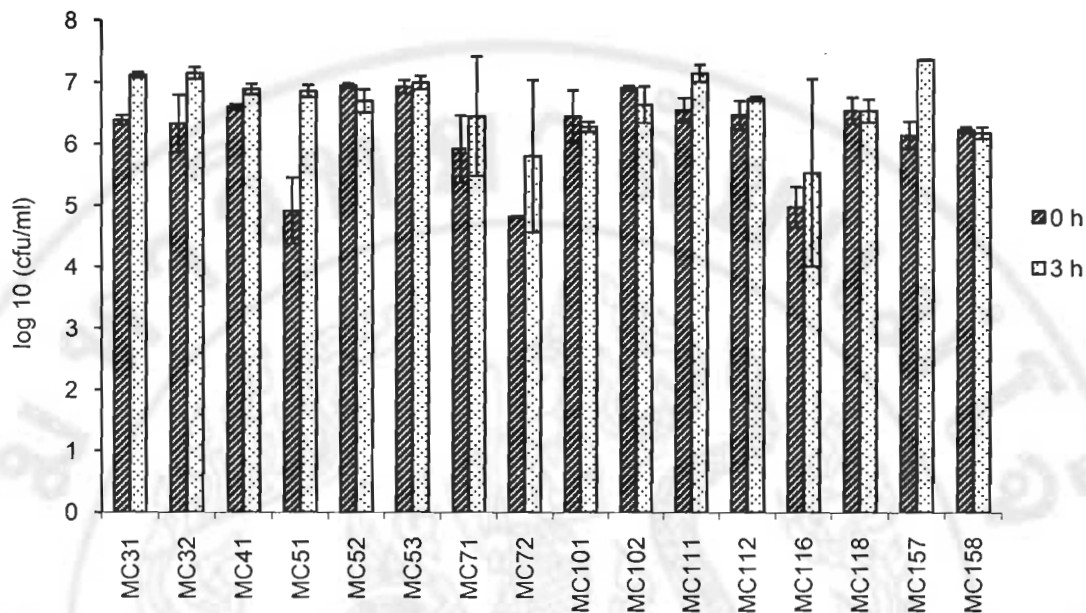
ในกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกลุ่ม LAB จะเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ขึ้นมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดค่า (pH) ลดลง ซึ่งชนิดและระดับของกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเจริญเติบโต (Lindgren and Dobrogosz 1990) กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วทำให้ค่าความเป็นกรดค่า (pH) ลดลงนี้จะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะเป็นกรดได้ เพราะ H^+ อีออนจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ cytoplasm มีสภาพเป็นกรดสูง (Kashket, 1987) ซึ่งส่งผลให้ electrochemical proton gradient ภายในเซลล์จุลินทรีย์เสียไปด้วย (Smulders *et al.* 1986, Earnshaw 1992) นอกจากกรดอินทรีย์แล้วแบคทีเรียกลุ่ม LAB ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้อีกด้วยโดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ flavoprotein oxidases หรือ nicotinamide adenine hydroxy dinucleotide (NADH) peroxidase ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอนุมูล

อิสระเช่น superoxide ($O_2^{\cdot -}$) และ hydroxyl ($OH^{\cdot}$) ซึ่งมีผลไปทำลายดีเอ็นเอได้ (Byczkowski and Gessner, 1988) แบคทีเรียโอซินเป็นสารอีกตัวหนึ่งที่แบคทีเรียกลุ่ม LAB สามารถผลิตได้และมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันหรือใกล้เคียงกันได้ (Vuyst and Vandamme, 1994) โดยแบคทีเรียโอซินนี้จะเป็นสารประกอบเปปไทด์ที่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ทำให้เซลล์เสียสมดุลศักย์ไฟฟ้า และเกรเดียนต์ ความเป็นกรดต่าง ซึ่งทำให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Bruni and Montville 1993, Abee 1995)

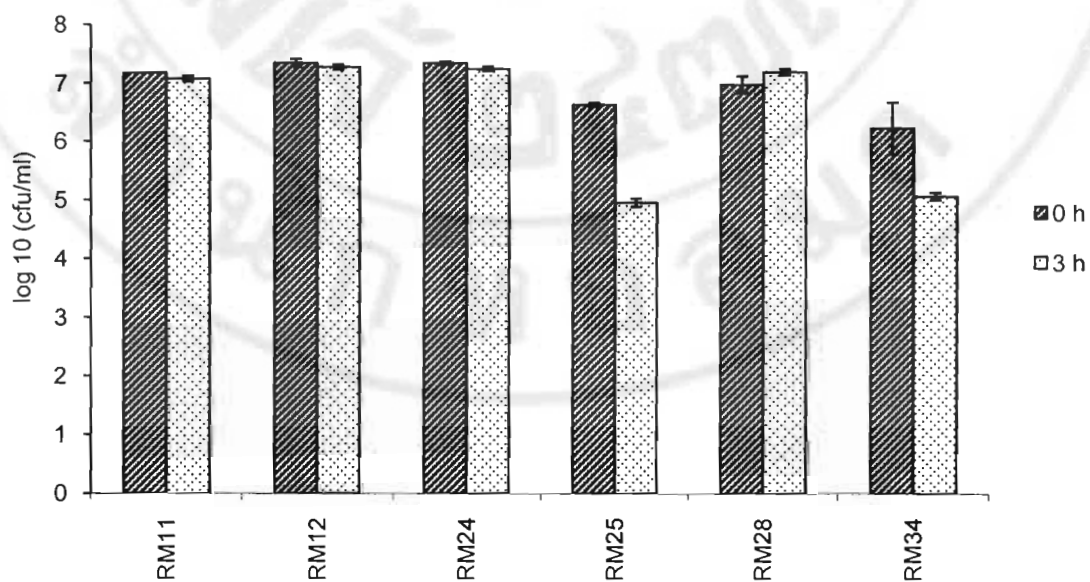
2.3 ความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรด พีเอช 2.5

มีการศึกษามากมายที่ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนกรดจากการทดลองโดยใช้ phosphate buffer saline (PBS) ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างเพื่อใช้แทนสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในกระเพาะอาหาร (Conway *et al.*, 1987; Mayara-Makinen *et al.*, 1983; Goldin *et al.*, 1992; Marteau *et al.*, 1997) ดังนั้นการทดลองนี้ได้้นำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ มาศึกษาความสามารถในการทนทานได้ในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด 2.5 จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียจำนวน 22 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด 2.5 คือแบคทีเรียจากอุจจาระเด็กจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ MC31, MC32, MC41, MC51, MC52, MC53, MC71, MC101, MC102, MC111, MC112, MC116, MC118, MC157, และ MC158 นอกจากนั้นเป็นแบคทีเรียจากน้ำนมหมักจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ RM11, RM12, RM24, RM28, และ RM34 โดยทุกไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด 2.5 ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ละไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตเรียงลำดับจากสูงไปต่ำดังนี้คือ ไอโซเลต MC51 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 142 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 4.9 ไปเป็น 6.9 log cfu/ml รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต MC157 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 120 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.1 ไปเป็น 7.4 log cfu/ml ไอโซเลต MC32 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 114 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.3 ไปเป็น 7.2 log cfu/ml ไอโซเลต MC116 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 114 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 5.0 ไปเป็น 5.5 log cfu/ml ไอโซเลต MC31 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 111 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.4 ไปเป็น 7.1 log cfu/ml ไอโซเลต MC111 มีอัตราการรอดชีวิตคือ

110 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.6 ไปเป็น 7.1 log cfu/ml ไอโซเลต MC41 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 105 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.6 ไปเป็น 6.9 log cfu/ml ไอโซเลต MC71 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 109 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 5.9 ไปเป็น 6.5 log cfu/ml ไอโซเลต MC112 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 104 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.5 ไปเป็น 6.7 log cfu/ml, ไอโซเลต RM28 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 101 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 7.0 ไปเป็น 7.2 log cfu/ml ไอโซเลต MC53 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 101 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 7.0 ไปเป็น 7.0 log cfu/ml ไอโซเลต MC118 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.5 ไปเป็น 6.6 log cfu/ml ไอโซเลต RM12 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.4 ไปเป็น 7.3 log cfu/ml ไอโซเลต RM11 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.2 ไปเป็น 7.1 log cfu/ml ไอโซเลต MC158 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.2 ไปเป็น 6.2 log cfu/ml ไอโซเลต RM24 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.4 ไปเป็น 7.3 log cfu/ml ไอโซเลต MC101 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.5 ไปเป็น 6.3 log cfu/ml ไอโซเลต MC52 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 97 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.0 ไปเป็น 6.7 log cfu/ml ไอโซเลต MC102 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 97 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.0 ไปเป็น 6.6 log cfu/ml และแบคทีเรียที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำที่สุดได้แก่ ไอโซเลต RM34 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 82 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.2 ไปเป็น 5.1 log cfu/ml ดังแสดงภาพ 3 และ 4



ภาพ 3 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลเด็กทารก) ที่รอดชีวิตในสารละลายฟอสเฟต
บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด pH 2.5 ที่ 0 ชั่วโมง และที่ 3 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SE, n = 3)



ภาพ 4 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากนํ้านมหมัก) ที่รอดชีวิตในสารละลายฟอสเฟต
บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด pH 2.5 ที่ 0 ชั่วโมง และที่ 3 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SE, n = 3)

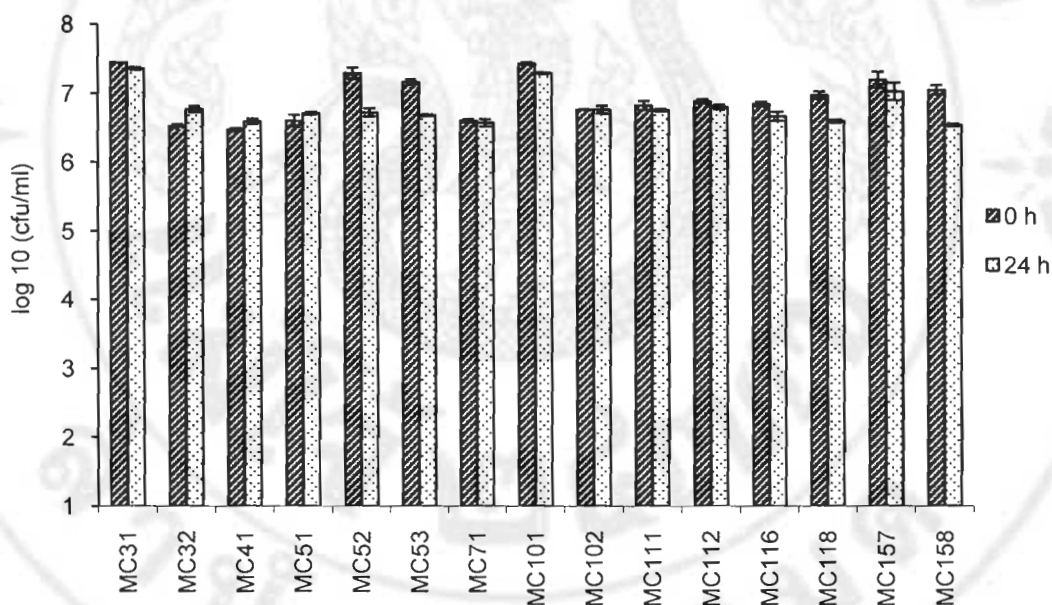
คุณสมบัติการทนกรดเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เนื่องจากคุณสมบัตินี้จะสามารถทำให้เรามั่นใจได้ว่าจุลินทรีย์โปรไบโอติกของเรามีชีวิตรอดผ่านไปถึงกระเพาะอาหารได้ (Prasad *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2002) ซึ่งภายในกระเพาะอาหารมีค่าความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 2.5-3.5 (Holzapfel *et al.*, 1998) การที่กระเพาะอาหารมีค่าความเป็นกรดเนื่องจากการสร้างกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เปปซิน ซึ่งเมื่อเรารับประทานอาหารเข้าไป อาหารจะสามารถอยู่ในกระเพาะอาหารประมาณ 3-4 ชั่วโมง จุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารที่เข้าสู่ร่างกายและไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะเป็นกรดได้จะถูกทำลายเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรค (Zhu *et al.*, 2006) เมื่อเรารับประทานอาหารเข้าไปจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะอาหารสูงขึ้นอยู่ที่ประมาณ 3.0-4.5 แบคทีเรียที่ปนเปื้อนเข้าไปด้วยจะปกป้องตัวเองจากสภาวะความเป็นกรดโดยจะจับกับองค์ประกอบในอาหาร (Rosina, 1982) การทนในสภาวะเป็นกรดของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับความสามารถในการปรับระดับกรดหรือด่างให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (buffering capacity) ภายในเซลล์ของแบคทีเรียและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนเมมเบรน (membrane protein) (Booth, 1985) Pennachai *et al.* (2003) รายงานว่า *Lactobacillus* 28 ไอโซเลตที่แยกได้จากไส้กรอกหมักจำนวน 10 ตัวอย่าง มีความสามารถในการรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการบ่มในสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด 2.5 นาน 3 ชั่วโมง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมี *Lactobacillus* 14 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการรอดชีวิตมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* Strompfova *et al.* (2004) รายงานว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ enterococci 7 สายพันธุ์ มีความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะเป็นกรด พิเศษเท่ากับ 3 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 76-87 เปอร์เซ็นต์

2.4 ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

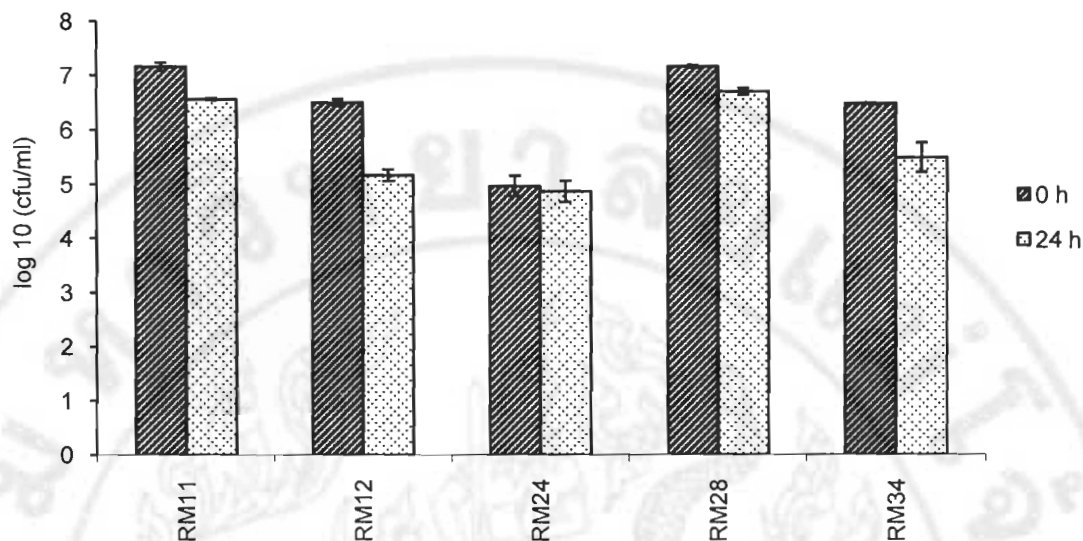
ในการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนทานต่อเกลือน้ำดีได้สามารถใช้ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อจำลองสภาวะในลำไส้ได้ (Gilliland *et al.*, 1984) ซึ่งการทนทานต่อเกลือน้ำดีเป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เนื่องจากคุณสมบัตินี้จะทำให้จุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตภายในลำไส้

เล็กได้ (Coppola *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1998) จากการนำแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบการทนทานต่อสภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2.5 จำนวน 20 ไอโซเลต มาทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ที่มีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 15 ไอโซเลตคือ MC31, MC32, MC41, MC51, MC52, MC53, MC71, MC101, MC102, MC111, MC112, MC116, MC118, MC153, MC157, และ MC158 นอกจากนั้นเป็นแบคทีเรียจากน้ำนมหมักจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ RM11, RM12, RM24, RM28, และ RM34 โดยทุกไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือแร่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ละไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตเรียงลำดับจากสูงไปต่ำดังนี้คือ ไอโซเลต MC32 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 104 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.5 ไปเป็น 6.8 log cfu/ml รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต MC41 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 102 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.5 ไปเป็น 6.6 log cfu/ml ไอโซเลต MC51 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 102 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.6 ไปเป็น 6.7 log cfu/ml ไอโซเลต MC102 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.8 ไปเป็น 6.8 log cfu/ml ไอโซเลต MC71 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.6 ไปเป็น 6.6 log cfu/ml ไอโซเลต MC111 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.8 ไปเป็น 6.8 log cfu/ml ไอโซเลต MC112 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.9 ไปเป็น 6.8 log cfu/ml ไอโซเลต MC31 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.5 ไปเป็น 7.4 log cfu/ml, ไอโซเลต MC101 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.4 ไปเป็น 7.3 log cfu/ml ไอโซเลต RM24 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 98 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 5.0 ไปเป็น 4.9 log cfu/ml ไอโซเลต MC157 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 98 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.2 ไปเป็น 7.0 log cfu/ml ไอโซเลต MC116 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 97 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.8 ไปเป็น 6.7 log cfu/ml ไอโซเลต MC118 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.0 ไปเป็น 6.6 log cfu/ml ไอโซเลต RM28 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 94 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.16 ไปเป็น 6.7 log cfu/ml ไอโซเลต MC53 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 93 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.2 ไปเป็น 6.7

log cfu/ml ไอโซเลต MC52 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 92 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.3 ไปเป็น 6.7 log cfu/ml ไอโซเลต MC158 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 93 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.0 ไปเป็น 6.5 log cfu/ml ไอโซเลต RM34 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 85 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.5 ไปเป็น 5.5 log cfu/ml ไอโซเลต RM12 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.5 ไปเป็น 5.2 log cfu/ml และ ไอโซเลต RM11 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 76 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 6.6 ไปเป็น 5.0 log cfu/ml ดังแสดงในภาพ 5 และ 6



ภาพ 5 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากมูลของเด็กทารก) ที่รอดชีวิตในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3% ที่ 0 ชั่วโมงและ ที่ 24 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SE, n = 3)



ภาพ 6 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (แยกได้จากน้ำมันหมัก) ที่รอดชีวิตในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3% ที่ 0 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SE, n = 3)

น้ำดี (Bile) เป็นสารละลายสีเหลืองเขียวซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ เกลือน้ำดี (bile salt) คอล레스เตอรอล (cholesterol) ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และรงควัตถุในน้ำดี (bile pigment) (Carey *et al.*, 1994; Hofmann, 1994) น้ำดีถูกสังเคราะห์ขึ้นที่เซลล์ตับแล้วถูกนำไปเก็บไว้ที่ถุงน้ำดี และจะถูกปล่อยสู่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม (duodenum) หลังจากมีอาหารเข้าไป สารตั้งต้นในการผลิตเกลือน้ำดีคือ cholesterol ในตับ จะถูกเปลี่ยนเป็น cholic acid และ chenodeoxycholic acid ซึ่งจะทำปฏิกิริยารวมตัว (conjugate) กับกรดอะมิโน glycine หรือ taurine ได้เป็น glycocholate และ taurocholate แล้วรวมตัวกับ Na^+ และ K^+ เกิดเป็นเกลือน้ำดี ซึ่งโมเลกุลนี้สามารถเกาะกับโมเลกุลของไขมันเกิดเป็น micelles ที่ดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กได้ดี (Begley *et al.*, 2006) หน้าที่ของเกลือน้ำดีคือเป็นตัว detergent (Emulsifying factor) ทำให้ surface tension ของ fat particle ลดลง และมีความสำคัญในการย่อยอาหารไขมัน จากคุณสมบัติการเป็น detergent ของเกลือน้ำดีทำให้เกลือน้ำดีมีกิจกรรมด้านจุลินทรีย์โดยการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ (Begley *et al.*, 2005) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ดีนั้นควรมีความสามารถในการย่อยสลายเกลือน้ำดีโดยเอนไซม์ bile salt hydrolase เพื่อให้อยู่รอดในระบบทางเดินอาหารได้ กิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase มักตรวจพบใน *Lactobacillus* และ *Enterococcus* (Begley *et al.*, 2006) การที่ LAB

มีกิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase จะช่วยให้ต้านทานความเป็นพิษจากการรวมตัวของเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนคูโอดินัมและเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญภายในลำไส้ด้วย (De Smet *et al.*, 1995) ซึ่งเอนไซม์ bile salt hydrolase จะมีฤทธิ์ไปย่อยเกลือน้ำดีโดยไปตัดพันธะเปปไทด์ของเกลือน้ำดีทำให้กำจัดหมู่ของกรดอะมิโนออกจากแกนสเตอรอยด์ ทำให้เกลือน้ำดีนั้นไม่เป็นพิษกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Begley *et al.*, 2006) Klingberk *et al.* (2005) รายงานเกี่ยวกับการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก scandinavian พบว่าเมื่อทดสอบการรอดชีวิตในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โปรไบโอติกส่วนใหญ่มีความสามารถในการรอดชีวิต 86 เปอร์เซ็นต์

2.5 การทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

ในการทดลองนี้ได้นำแบคทีเรีย 20 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 15 ไอโซเลตคือ MC31, MC32, MC41, MC51, MC52, MC53, MC71, MC101, MC102, MC111, MC112, MC116, MC118, MC153, MC157, และ MC158 นอกจากนั้นเป็นแบคทีเรียจากนํ้านมหมักจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ RM11, RM12, RM24, RM28, และ RM34 มาทำการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลตให้การแตกของเม็ดเลือดแดงชนิดแกมมา (γ -hemolysis) คือ ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ดังแสดงในตาราง 5

กิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเป็น virulence factor ของเชื้อก่อโรค ทำให้จุลินทรีย์สามารถหาเหล็กได้สะดวกขึ้นและเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะโลหิตจางและการบวมในโฮสต์ เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่จะผลิต toxin ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลาย cell membrane ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสลายเรียกว่าเกิด β -hemolysis (Vesterlund *et al.*, 2007) Maragkoudakis *et al.*, 2006 รายงานว่า *Lactobacillus* 29 ไอโซเลต ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม เมื่อนำมาทดสอบกิจกรรม hemolytic โดยการฉีดเชื้อบนอาหารแข็ง Columbia ที่มีเลือดมนุษย์ผสมอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า *Lactobacillus* ไม่มีกิจกรรม hemolytic ให้การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ชนิดแกมมา (γ -hemolysis) และแอลฟา (α -hemolysis)

2.6 การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบการดื้อยาของแบคทีเรียที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการคัดเลือกโปรไบโอติก เนื่องจากคุณสมบัตินี้มีความเกี่ยวข้องกับการเลือกใช้โปรไบโอติกได้อย่างเหมาะสมและปลอดภัย การดื้อยาของแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ intrinsic (natural) resistance หมายถึงเชื้อแบคทีเรียดื้อยาอยู่แล้วตามธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อนั้นไม่มีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลินทรีย์นั้น หรือมีกลไกการป้องกันไม่ให้นั้นจับกับเป้าหมายในการออกฤทธิ์ได้ ทำให้เชื้อไม่เคยไวต่อยานั้น อีกประเภทคือ acquired resistance หมายถึง การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นภายหลัง จากเดิมที่เคยไวต่อยานั้นมาก่อน (Kaye *et al.*, 2004) การที่แบคทีเรียมีคุณสมบัติในการดื้อยานี้จะทำให้แบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่อร่างกายของเรามีการบำบัดโรคโดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Aysun and Candan., 2003) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะยังสามารถก่อประโยชน์ให้กับร่างกายต่อไปได้

ในการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MC31, MC32, MC51, MC52, MC53, MC101, MC157, RM11, RM12, RM24, RM28 มีการดื้อยา 1 ชนิดคือ kanamycin และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดคือ chloramphenical, ampicillin, erythromycin และ tetracycline ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต MC41, MC7, MC102, MC111, MC112, MC116, MC118, MC158 และ RM34 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิด ดังแสดงในตาราง 5 ซึ่งการที่แบคทีเรียนี้มีคุณสมบัติในการดื้อยาอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียสามารถสร้างกลไกของการดื้อยาได้โดยแบ่งเป็น 3 วิธีคือการสร้างเอนไซม์ไปทำลายหรือทำให้ยาด้านจุลชีพไม่ออกฤทธิ์ การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพ และการป้องกันไม่ให้ยาด้านจุลชีพเข้าไปในบริเวณที่มีเป้าหมายของการออกฤทธิ์โดยเพิ่มกระบวนการขับยาออก (efflux) หรือลดการแพร่ผ่านของยาเข้าเซลล์ (Shales *et al.* 1997) การนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้จำเป็นจะต้องแน่ใจว่าแบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถส่งผ่านยีนดื้อยาเหล่านี้ไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้ เพื่อป้องกันการดื้อยาของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ซึ่งอาจมีการทดลองเพิ่มเติมเมื่อต้องการนำแบคทีเรียนี้ไปใช้จริง Charteris *et al.* (1998) รายงานว่า lactobacilli ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการดื้อยาอยู่แล้วในธรรมชาติ ซึ่งเป็นชนิดที่ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้

ตาราง 5 กิจกรรมการต้านยาปฏิชีวนะและการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรีย

haemolysis		ยาปฏิชีวนะ				
		Chloramphenical	Ampicillin	Erythromycin	Tetramycin	Kanamycin
		30 µg	10 µg	15 µg	30 µg	30 µg
MC31	γ	S	S	S	S	R
MC32	γ	S	S	S	S	R
MC41	γ	S	S	S	S	S
MC51	γ	S	S	S	S	R
MC52	γ	S	S	S	S	R
MC53	γ	S	S	S	S	R
MC71	γ	S	S	S	S	S
MC101	γ	S	S	S	S	R
MC102	γ	S	S	S	S	S
MC111	γ	S	S	S	S	S
MC112	γ	S	S	S	S	S
MC116	γ	S	S	S	S	S
MC118	γ	S	S	S	S	S
MC157	γ	S	S	S	S	R
MC158	γ	S	S	S	S	S
RM11	γ	S	S	S	S	R
RM12	γ	S	S	S	S	R
RM24	γ	S	S	S	S	R
RM28	γ	S	S	S	S	R
RM34	γ	S	S	S	S	S

หมายเหตุ γ คือ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ γ-haemolysis

S คือ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ

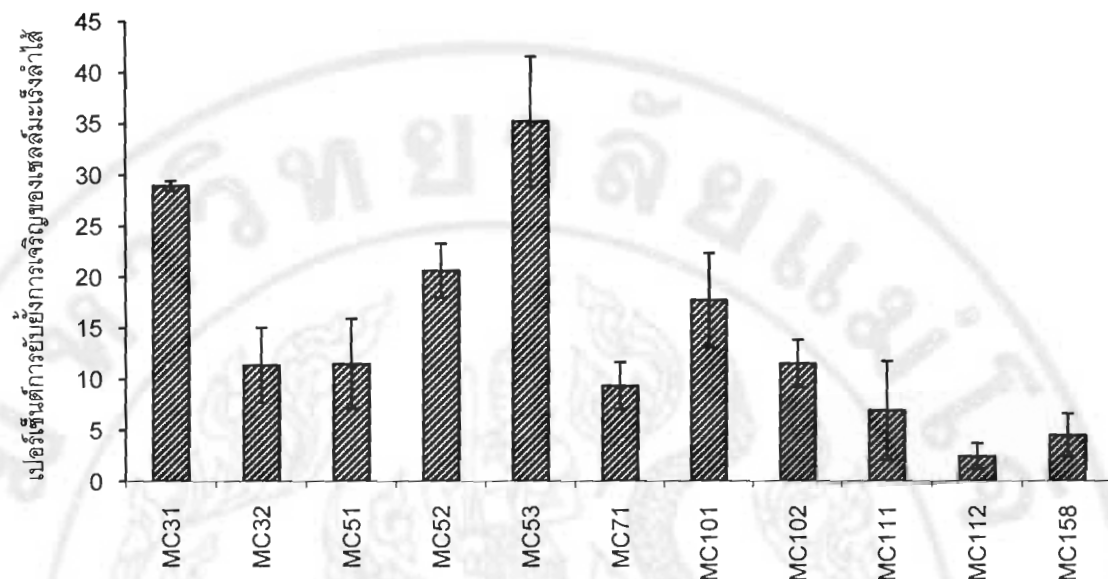
R คือ มีความต้านทานยาปฏิชีวนะ

3. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

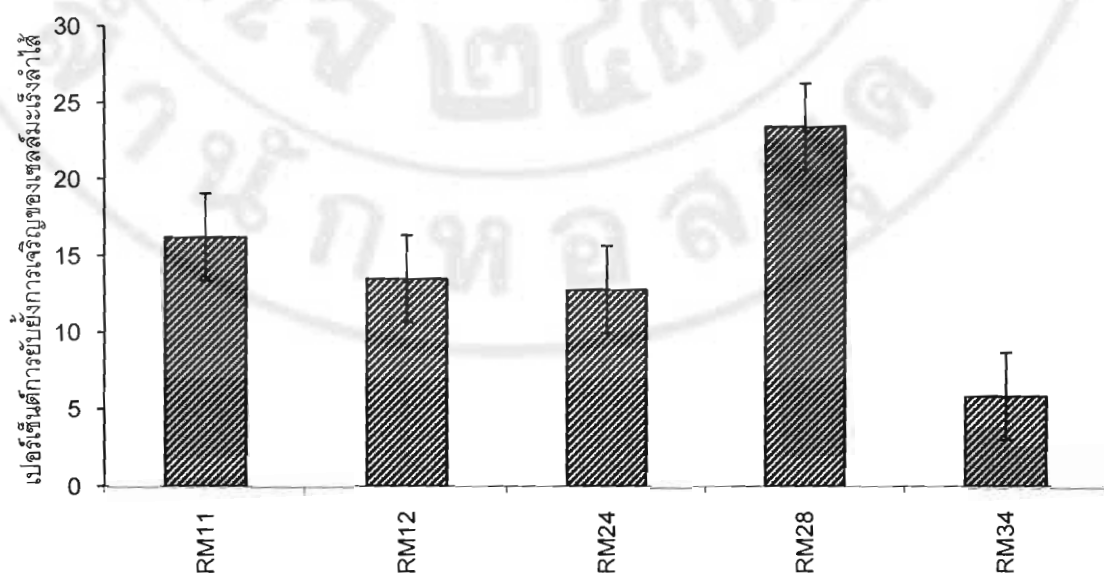
3.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยใช้ cultured medium โดยใช้วิธี MTT assay

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกการมีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกทั้งหมด 20 ไอโซเลต มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ โดยมีหลักการดังนี้คือเซลล์มีชีวิต จะมี mitochondrial dehydrogenase ที่จะเปลี่ยน MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองให้เป็น formazan ที่มีสีฟ้าและไม่ละลายน้ำ เมื่อละลายตะกอน formazan ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (dimethylsulfoxide; DMSO) จะสามารถวัดความเข้มสีที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมได้ ปริมาณ dehydrogenase จะคงที่ ดังนั้นปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้สูงสุดคือ 35 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ MC31 และ RM28 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้เท่ากับ 29 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียอีก 13 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้โดยเรียงลำดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้จากสูงไปต่ำดังนี้คือ MC52, MC101, RM11, RM12, RM24, MC102, MC51, MC32, MC71, MC111, RM34, MC158 และ MC112 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังนี้คือ 21, 18, 16, 14, 13, 12, 12, 11, 9, 7, 6, 5 และ 2 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 7 และ 8 แบคทีเรียที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้แก่ MC41, MC116, MC118 และ MC157



ภาพ 7 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของ
แบคทีเรีย (ที่แยกได้จากมูลของเด็กทารก) โดยใช้วิธี MTT assay (Mean $\pm$ SE, n = 3)



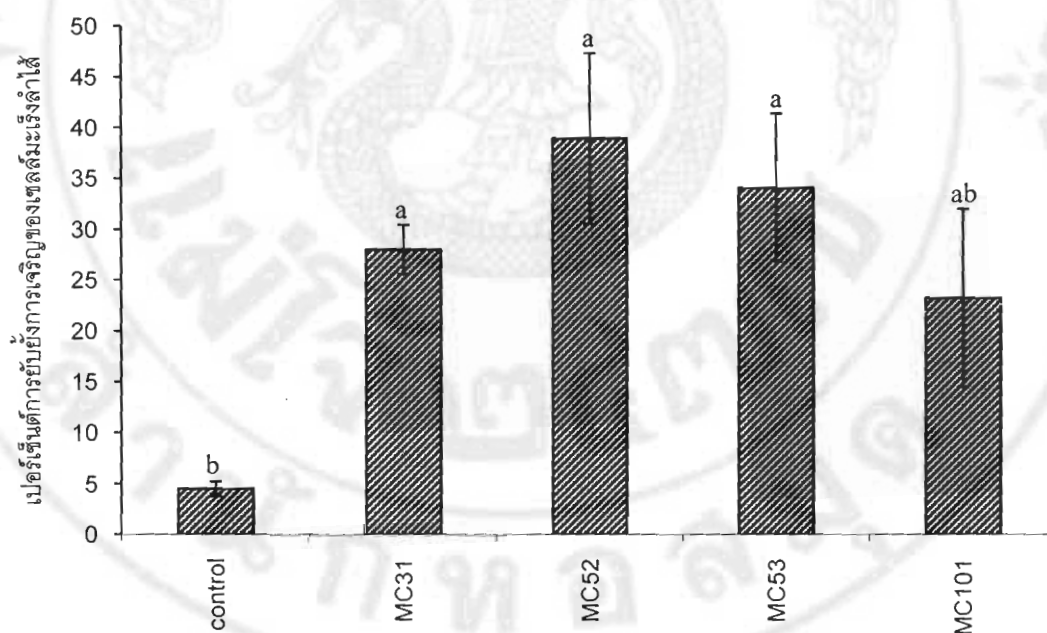
ภาพ 8 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของ
แบคทีเรีย (ที่แยกได้จากน้ำนมหมัก) โดยใช้วิธี MTT assay (Mean $\pm$ SE, n = 3)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่รายงานถึงกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดย LAB จำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นการใช้เซลล์แบคทีเรีย ผงเซลล์ของแบคทีเรีย และส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์แบคทีเรีย ล้วนแต่มีกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ทั้งนั้น (Hirai *et al.*, 1987; Sakamoto & Konishi, 1988) ซึ่งมีงานวิจัยต่าง ๆ มากมายที่พบกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากส่วนต่าง ๆ ของแบคทีเรีย เช่น ส่วนของเปปติโดไกลแคนที่แยกได้จาก *Bacillus infantis* strain ATCC 15697 (Sekine *et al.*, 1985) และ *Lactobacillus casei* (Fichera & Giese, 1994), ส่วนของโพลีแซ็กคาไรด์ที่ได้มาจาก *Lactobacillus* cultures (Oda *et al.*, 1983), ส่วนของไกลโคโปรตีนใน supernatant ของ *Lactobacillus* cultures (Manjunath & Ranganathan, 1989) รวมไปถึงการพบกิจกรรมการยับยั้งสารก่อมะเร็งใน supernatant ของ *Lactobacillus* cultures อีกด้วย (Park & Rhee, 2001) Ewaschuk *et al.* (2006) รายงานว่า conjugate linoleic acid ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโปรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. longum* และ *Streptococcus thermophilus*) มีกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HT-29 และ Caco-2 ใช้วิธีการวิเคราะห์คือวิธี MTT assay และวิธี DNA laddering ซึ่ง conjugate linoleic acid นี้จะทำการแยกจาก supernatant ของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยใช้วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี conjugate linoleic acid นี้จะไปมีผลทำให้เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ caspase 3 และ caspase 9 อีกทั้งยังลดการแสดงออกของ Bcl-2 ทำให้เกิดการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง (Miller *et al.*, 2002)

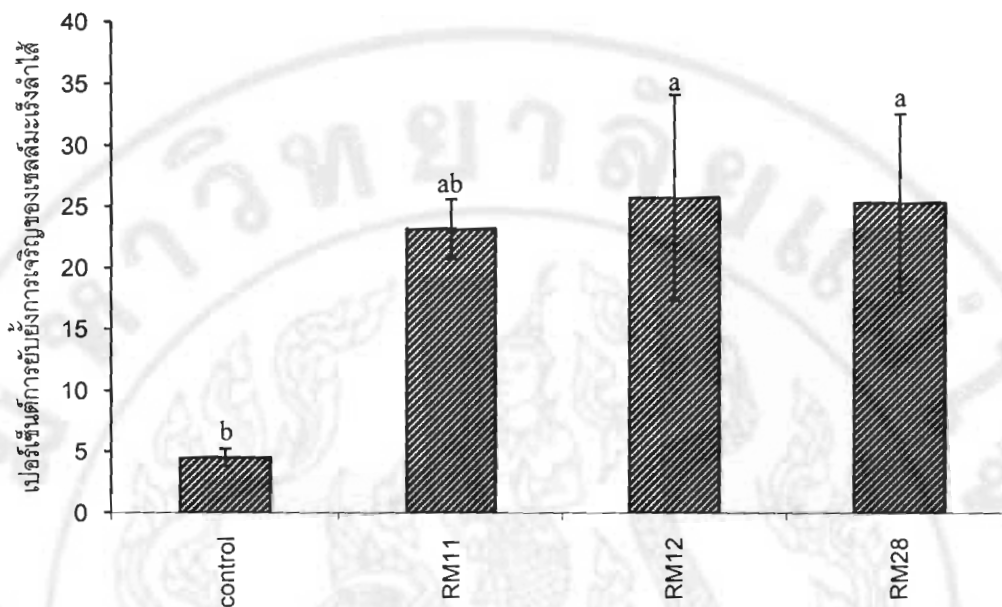
3.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยใช้ cultured medium ของแบคทีเรีย โดยวิธี Trypan Blue exclusion

ในขั้นตอนนี้จะทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดีที่สุดจำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งมีช่วงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 14-35 เปอร์เซ็นต์ มาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อ เพื่อเป็นการยืนยันผลจากการทดสอบโดยวิธี MTT assay ซึ่งใช้วิธี Trypan Blue exclusion คือเป็นการนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer chamber ทำการย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan Blue นับแยกเซลล์เป็นเซลล์ตาย ซึ่งเซลล์เป็นจะไม่ได้ติดสีย้อม ส่วนเซลล์ตายจะติดสีย้อม Trypan Blue เป็นสีน้ำเงิน แล้วนำจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ โดย

วิธีนี้เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้วัดการเจริญของเซลล์ได้ นำจำนวนเซลล์ที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ซึ่งได้ผลดังนี้คือ แบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงสุดคือ 39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ MC52, MC31, RM12, RM28, MC102 และ RM11 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังนี้คือ 34., 28, 26, 25, 23 และ 23 ตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมเซลล์มีอัตราการตาย 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test พบว่าในกลุ่มทดลองนั้นมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพ 9 และ 10



ภาพ 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของแบคทีเรีย (ที่แยกได้จากมูลของเด็กทารก) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion (Mean $\pm$ SE, $n = 3$) แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยอักษรที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

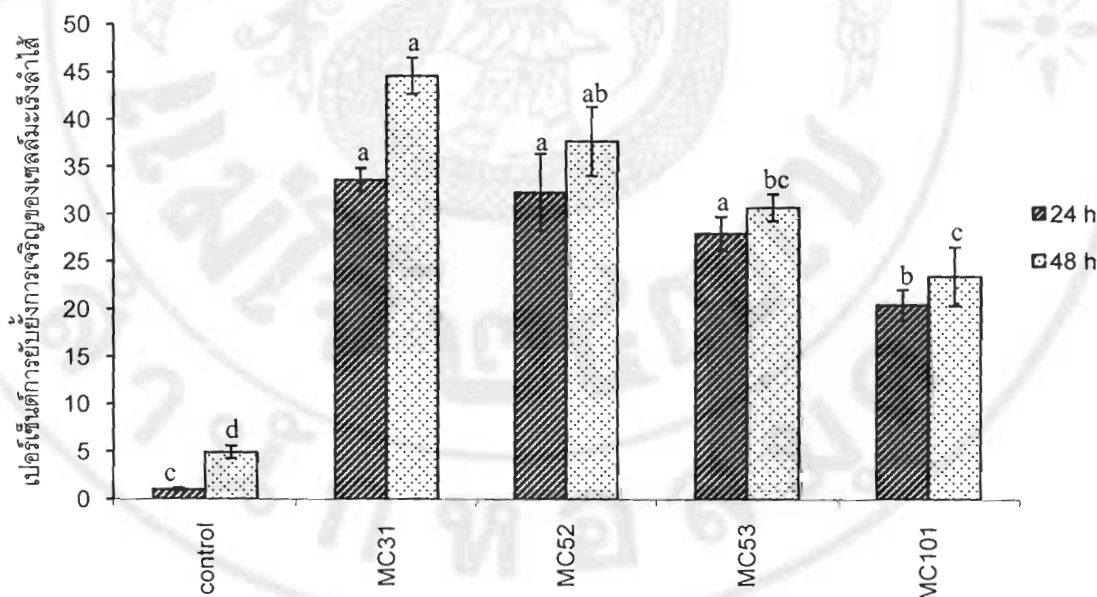


ภาพ 10 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับ cultured medium ของแบคทีเรีย (ที่แยกได้จากน้ำนมหมัก) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion (Mean $\pm$ SE, n = 3) แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยอักษรที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

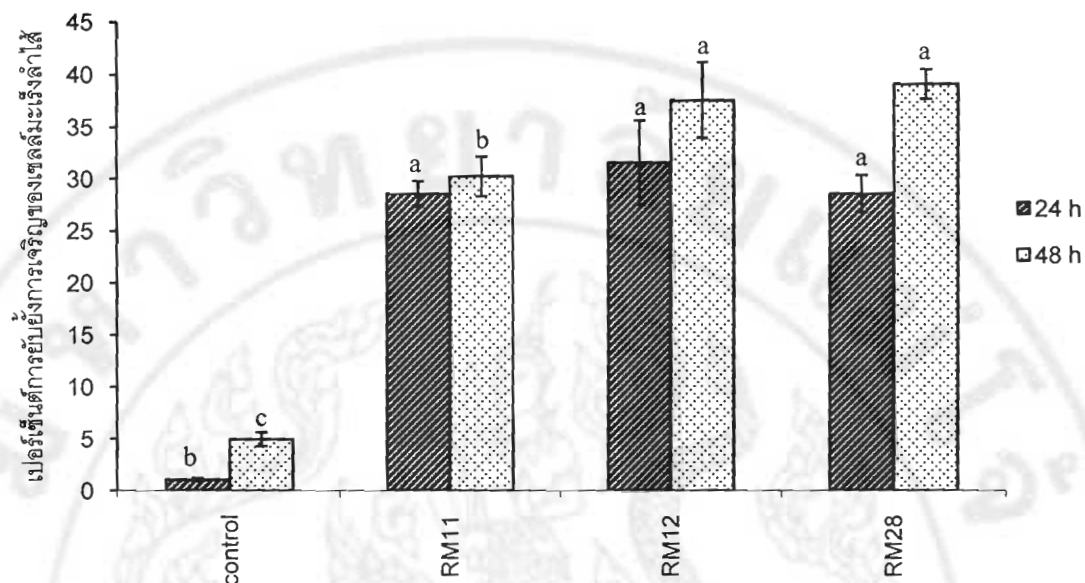
3.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้โดยเซลล์ของแบคทีเรีย (live whole cell) โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion

ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้โดยเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion นำจำนวนเซลล์ที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ซึ่งการทดลองแบ่งการบ่มร่วมกันระหว่างเซลล์มะเร็งลำไส้กับเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังนี้คือ ที่ 24 ชั่วโมง แบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ 34 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลต MC52, RM12, RM28, RM11, MC53 และ MC101 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังนี้คือ 32, 32, 29, 29, 28 และ 20 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์แบคทีเรีย เซลล์มะเร็งลำไส้

มีอัตราการตายคือ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ 45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลต RM28, MC52, RM12, MC53, RM11 และ MC101 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังนี้คือ 39, 38, 38, 31, 30 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเซลล์แบคทีเรีย เซลล์มะเร็งลำไส้มีอัตราการตายคือ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test พบว่าในกลุ่มทดลองนั้นมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพ 11 และ 12



ภาพ 11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรีย (ที่แยกได้จากมูลของเตี๊ยกทารก) เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Trypan Blue exclusion (Mean $\pm$ SE, $n = 3$) แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยอักษรที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน



ภาพ 12 เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรีย (ที่แยกได้จากน้ำนมหมัก) เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงโดยใช้วิธี Trypan Blue exclusion (Mean $\pm$ SE, $n = 3$) แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยอักษรที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

ในงานวิจัยนี้นอกจากจะใช้ cultured medium ของแบคทีเรียในการศึกษากิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้แล้ว ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมคือการใช้เซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้อีกด้วย จากผลการทดลองพบว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตนั้นให้ผลของการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ดีกว่าการใช้ supernatant ของแบคทีเรีย และการบ่มร่วมกันระหว่างเซลล์มะเร็งลำไส้กับเซลล์ของแบคทีเรียที่ 48 ชั่วโมง จะมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าการบ่มร่วมกันที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่เซลล์แบคทีเรียมีการผลิตกรดต่างๆ ออกมามากขึ้น ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียด ชักนำไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lan *et al.* (2006) ซึ่งทำการศึกษากิจกรรมการฆ่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของแบคทีเรีย *Propionibacterium freudenreichii* ภายในห้องปฏิบัติการพบว่าสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ของแบคทีเรียคือ short chain fatty acid (SCFA), acetate และ propionate ซึ่งการหลั่งกรดต่างๆ ของ *Propionibacterium* นี้จะมีผลชักนำให้เซลล์ HT-29 เกิดการ

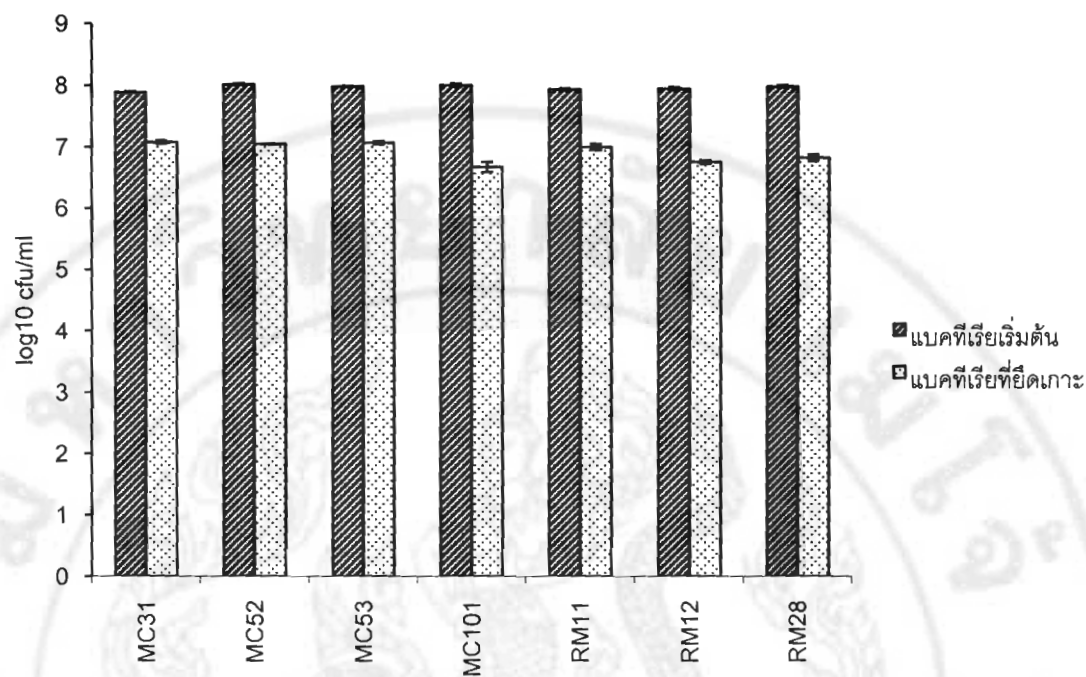
ตายแบบอะพอพโทซิส และพบว่าในการทดลองที่ pH เท่ากับ 6.0-7.5 จะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสที่เวลามากกว่า 96 ชั่วโมง แต่ถ้าในการทดลองมี pH เท่ากับ 5.5 จะมีผลทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสอย่างรวดเร็วที่เวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง Zebala *et al.* (2001) รายงานว่า lactic acid bacteria 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากคนเรา คือ *Lactobacillus salivarius* และ *Enterococcus faecium* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ myeloma ได้ โดยเซลล์มีการเจริญลดลงเหลือเพียง 16.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้เซลล์แบคทีเรีย 10^8 cfu/ml นอกจากการใช้ supernatant และเซลล์ของแบคทีเรียแล้วยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้ส่วนต่าง ๆ ของแบคทีเรียในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอีกด้วย เช่น Lee *et al.* (2004) ศึกษาการใช้ส่วนของ cytoplasmic fraction ของ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* และ *Bifidobacterium longum* ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง SNUC 2A, SNU-1, NIH/3T3 และ Jurket cell โดยใช้วิธีวิเคราะห์คือ crystal violet assay พบว่า cytoplasmic fraction ของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ทุกชนิด Kim *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษา LAB 10 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์แบคทีเรีย, cytoplasmic fraction และ peptidoglycan จากการทดลองพบว่า cytoplasmic fraction มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร ในขณะที่ peptidoglycan จะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์กระเพาะปัสสาวะมีกิจกรรมการเจริญช้าลง

4. ประสิทธิภาพการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2

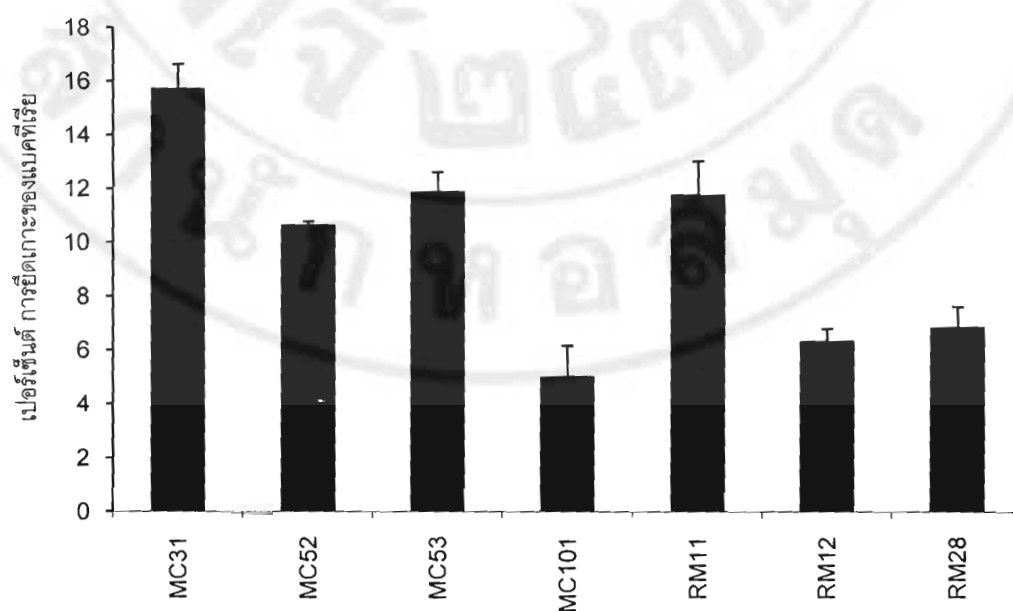
การที่แบคทีเรียมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับ intestinal epithelial cells จะทำให้แบคทีเรียนั้นสามารถสร้างประโยชน์ให้กับร่างกายของโฮสต์ได้ดียิ่งขึ้น (Forestier *et al.*, 2001) และการที่แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับลำไส้นี้เป็นคุณสมบัติที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียภายในระบบทางเดินอาหาร (Lehto and Salminen, 1997) อีกทั้งยังเป็นการป้องกันการติดเชื้อจากเชื้อก่อโรคได้อีกทางหนึ่งเนื่องจากแบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านี้จะไปแย่งพื้นที่ยึดเกาะบริเวณทางเดินอาหารเพื่อไม่ให้เชื้อก่อโรคมีพื้นที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ (Collado *et al.*, 2006) เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการยึดเกาะของแบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมจริงเป็นเรื่องที่ปฏิบัติได้ยากโดยเฉพาะในคนเรา (Tuomola and salminen, 1998) จึงทำให้มีการศึกษาหลายงานที่ศึกษาแบบจำลองการยึดเกาะของแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์ต้นตอที่มีคุณสมบัติ

เป็นเซลล์มะเร็ง เช่น เซลล์ Caco-2 มาใช้ในการศึกษากลไกการยึดเกาะนี้ (Greene and Klaenhammer, 1994) โดยเซลล์ Caco-2 เป็นเซลล์ที่แยกได้จากลำไส้ของคนที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Fogh *et al.*, 1977) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐานที่เหมาะสมจะแสดงลักษณะเป็น mature enterocytes (Pinto *et al.*, 1983)

ในการทดลองนี้ได้ใช้เซลล์ Caco-2 เป็นแบบจำลองในการศึกษาคุณสมบัติการยึดเกาะของแบคทีเรียเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีคุณสมบัติการยึดเกาะได้สูงสุดคือ 16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $7.9 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $7.1 \log \text{ cfu/ml}$ รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.0 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $7.1 \log \text{ cfu/ml}$ แบคทีเรียไอโซเลต RM11 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.0 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $7.0 \log \text{ cfu/ml}$ แบคทีเรียไอโซเลต MC52 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.0 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $7.1 \log \text{ cfu/ml}$ แบคทีเรียไอโซเลต RM28 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.0 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $6.8 \log \text{ cfu/ml}$ แบคทีเรียไอโซเลต RM12 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.0 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $6.8 \log \text{ cfu/ml}$ แบคทีเรียไอโซเลต MC101 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $8.0 \log \text{ cfu/ml}$ และจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะ $6.7 \log \text{ cfu/ml}$ ดังแสดงในภาพ 13 และ 14 ซึ่งจากผลการทดลองคล้ายกับงานวิจัยของ Tuomola และ salminen (1998) ที่ศึกษาการยึดเกาะของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* พบว่าเมื่อใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น $1 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ จะมีจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้อยู่ระหว่าง 1.4×10^7 ถึง $2.6 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะจะมีค่าอยู่ระหว่าง 2.6 ถึง 14.4 เปอร์เซ็นต์



ภาพ 13 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 (Mean $\pm$ SE, n = 5)



ภาพ 14 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์ Caco-2 (Mean $\pm$ SE, n = 5)

กลไกการของ LAB ที่ใช้ในการยึดเกาะกับ epithelial cell เกี่ยวข้องกับบริเวณผิวของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน จึงทำให้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีกลไกการยึดเกาะที่แตกต่างกันออกไป กระบวนการยึดเกาะของแบคทีเรียประกอบไปด้วย passive force, electrostatic interactions, hydrophobic, steric forces, lipoteichoic acids และความจำเพาะเจาะจงของโครงสร้าง (Survin, 2003) ส่วนประกอบของแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะส่วนใหญ่เป็น โปรตีนที่มี molecular mass 29 kDa ซึ่งแยกได้จากผิวของแบคทีเรียและ supernatant ของแบคทีเรีย (Blobberg *et al.*, 1993; Rojas & Conway, 1996; Rojas & Conway, 2002) มีรายงานว่า การยึดเกาะของ *L. johnsonii* กับเซลล์ Caco-2 เกี่ยวข้องกับกรด lipothicoic ซึ่งแยกได้จากผนังเซลล์และ supernatant ของแบคทีเรีย (Granato *et al.*, 1999) ส่วนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของแบคทีเรานั้น ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางเคมีกายภาพ รวมไปถึงค่าความเป็นกรดต่างอีกด้วย (Pennachai *et al.*, 2005)

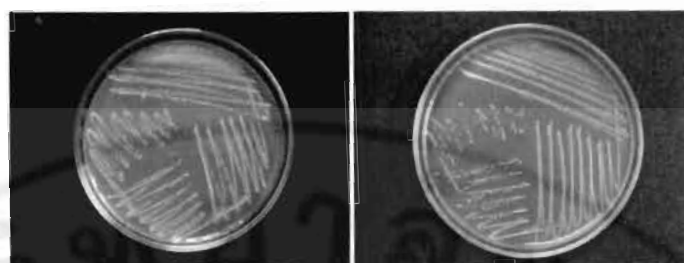
5. ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12, และ RM28

5.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีลักษณะคล้ายกันคือ เป็นโคโลนีขนาดเล็กประมาณ 1 มิลลิเมตร สีขาวขุ่น ผิวหน้าและขอบโคโลนีเรียบ เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ มาทำการศึกษารูปร่าง การติดสีแกรม และการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า ผลการทดลองแสดงดังตาราง 6 และภาพที่ 12 และ 13

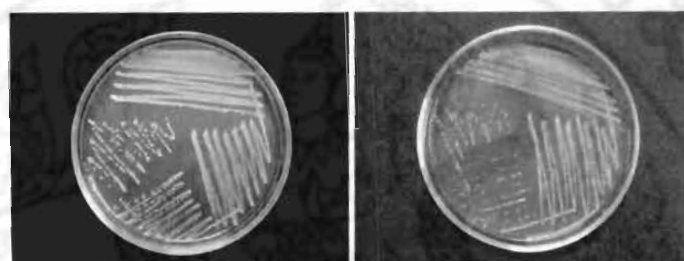
ตาราง 6 ลักษณะการตัดสินใจแบบการตัดสินใจที่มีประสิทธิภาพในการจัดการของเซลล์มะเร็งได้

ไอโซเลต	การตัดสินใจ	รูปร่าง	การจัดเรียงตัวของเซลล์	ความยาว (ไมครอน)	ความกว้าง (ไมครอน)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ไมครอน)
MC31	บวก	กลม	คู่	-	-	1
MC52	บวก	ท่อน	เดี่ยว คู่ เส้นสาย	3	1	-
MC53	บวก	ท่อน	เดี่ยว คู่ เส้นสาย	2	1	-
MC101	บวก	กลม	คู่	-	-	1
RM11	บวก	กลม	คู่	-	-	1
RM12	บวก	ท่อน	เดี่ยว คู่ เส้นสาย	3	1	-
RM28	บวก	ท่อน	เดี่ยว คู่ เส้นสาย	3	1	-



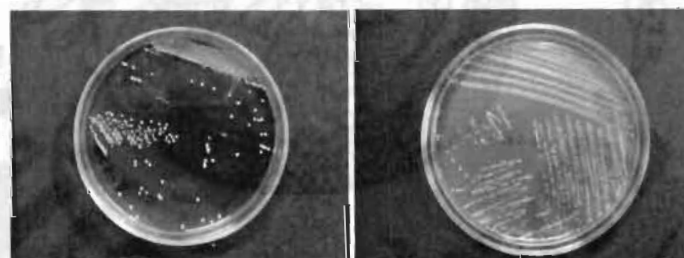
(ก)

(จ)



(ข)

(ฉ)



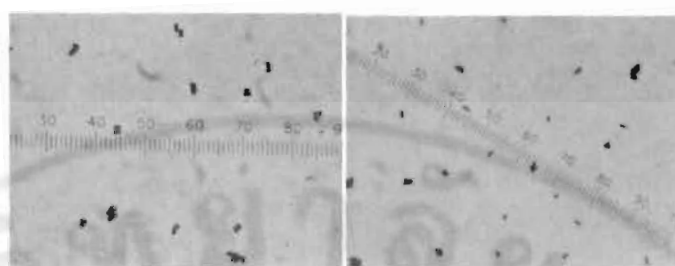
(ค)

(ช)



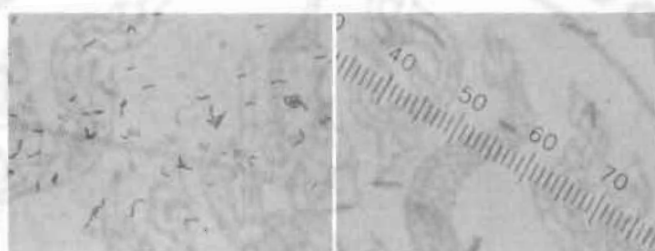
(ง)

ภาพ 15 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งชนิด MRS ของแบคทีเรียไอโซเลต MC31 (ก), MC52 (ข), MC53 (ค), MC101 (ง), RM11 (จ), RM12 (ฉ) และ RM28 (ช)



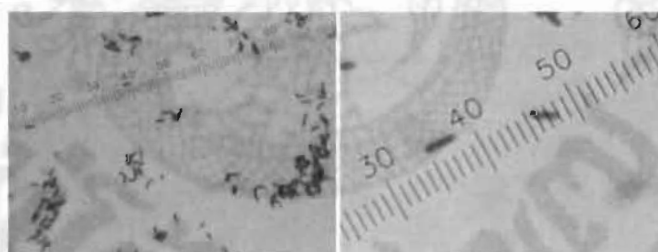
(ก)

(ข)



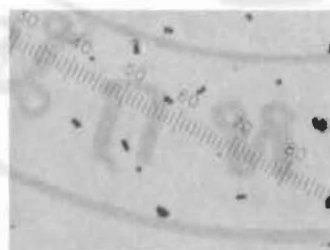
(ค)

(ง)



(จ)

(ฉ)



(ซ)

ภาพ 16 รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไฮโซเลต MC31 (ก), MC52 (ข), MC53 (ค), MC101 (ง), RM11 (จ), RM12 (ฉ) และ RM28 (ซ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า

5.2 ผลการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

จากการนำแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดีที่สุดที่สุดมาสกัด DNA โดยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป และนำ genomic DNA ที่ได้มาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณยีน 16S rRNA ที่ลำดับเบสในตำแหน่ง V_1 - V_3 โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ 27F และ 520R จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA ของแบคทีเรีย พบว่า DNA ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงดังภาพ 19 นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ TaKaRa SUPREC™-PCR แล้วนำ PCR product ที่บริสุทธิ์นี้ไปหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งได้ลำดับเบส ดังภาพภาคผนวก 1 ถึงภาคผนวก 14 จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit ซึ่งได้ลำดับเบสแสดงดังภาพ 20 ถึง 33 นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ได้ผลดังนี้คือแบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Pediococcus pentosaceus* 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลต MC52 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Lactobacillus salivarius* 99.8 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. salivarius* 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลต MC101 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Enterococcus faecium* 99.8 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลต RM11 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *E. faecium* 99.8 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียไอโซเลต RM12 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. fermentum* 100 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลต RM2-8 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. fermentum* 99.6 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 7 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA

ไอโซเลต	แบคทีเรีย	Accession number	Identities	% Homology
MC31	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EU082192.1	496/496	100
MC52	<i>Lactobacillus salivarius</i>	EU559602.1	483/484	99.8
MC53	<i>Lactobacillus salivarius</i>	EU559602.1	485/485	100
MC101	<i>Enterococcus faecium</i>	AB362603.1	479/480	99.8
RM11	<i>Enterococcus faecium</i>	AB362603.1	477/478	99.8
RM12	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AP008937.1	491/491	100
RM28	<i>Lactobacillus fermentum</i>	AP008937.1	491/493	99.6

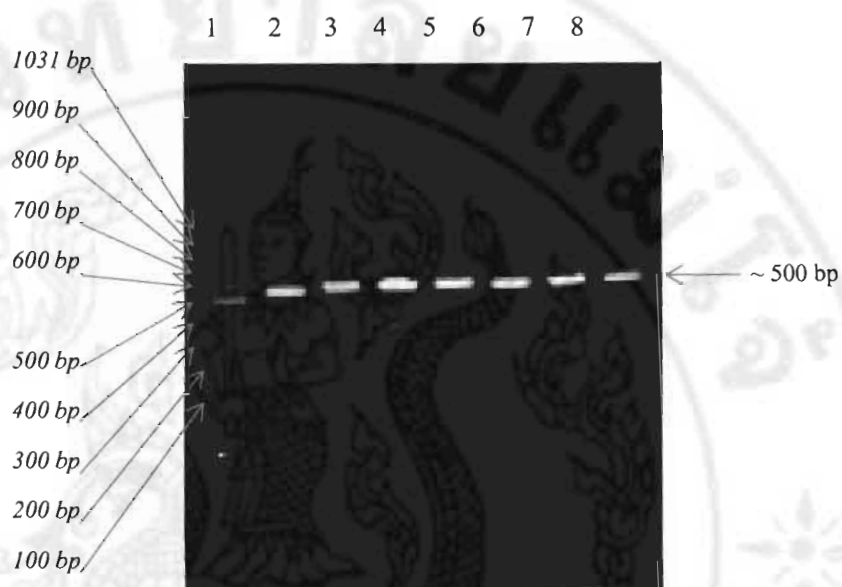
P. pentosaceus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่ 4 เป็น microflora lactic acid bacteria ที่พบในระบบทางเดินอาหาร ลำไส้ใหญ่ มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารเช่น การผลิตเนยแข็ง การหมักเนนม ในกระบวนการหมักได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถทนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดได้เป็นอย่างดี (Axelsson, 1998; Garvie, 1986) Garner *et al.* (2004) รายงานว่า *P. pentosaceus* มีกิจกรรมการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การยับยั้งเซลล์มะเร็ง และการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

L. salivarius เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน Martin *et al.* (2006) แยก *L. salivarius* จากอุจจาระของเด็กทารกที่มีอายุ 1 เดือน และศึกษาคุณสมบัติพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารได้ อีกทั้งยังมีการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 และ HT-29 ได้เป็นอย่างดี

E. faecium เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักพบในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ และใช้ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกอย่างแพร่หลาย มีคุณสมบัติในการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารได้และมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด (Stromfova *et al.*, 2004)

L. fermentum เป็นแบคทีเรียกลุ่ม LAB มีรูปร่างเป็นแท่งกึ่งกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นเส้นสาย โคลินีมีขนาดเล็ก ส่วนใหญ่พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชและสัตว์ ซึ่ง

L. fermentum มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก มีการประยุกต์ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของผู้หญิง (Gardiner *et al.*, 2002)



ภาพ 17 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งลำดับเบส บริเวณ V_1 - V_3

Lane 1 คือ DNA marker

Lane 2 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต MC31

Lane 3 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52

Lane 4 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต MC53

Lane 5 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต MC101

Lane 6 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต RM11

Lane 7 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต RM12

Lane 8 คือ ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียไอโซเลต RM28

[illegible]

ภาพ 19 ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC31

ภาพ 20 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ที่จะนำไป
เทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R
ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit

[illegible]

ภาพ 21 ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC52

5'TACCGCGGCCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTCAGATACCGTCAAG
GGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAA
AACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTC
CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCA
CCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT
AATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACC
ATGCGGTTTTGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
ATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCTTCTTTTCCGGTGGAG
CAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCNCAG
CGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTG3'

ภาพ 24 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC101 ที่จะนำไป
เทียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R
ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit

```
> ddb|AB562605.1| Enterobacter faecium gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:
NR10_0214
Length=1555

Score = 861 bits (1854), Expect = 0.0
Identities = 478/490 (97%), Gaps = 0/490 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CTCTCTGTCAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAA
401
Subject 512 CTCTCTGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAA
453

Query 401 AACAGAGTTTTACGATCCGAAAGCTTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTC
420
Subject 451 AACAGAGTTTTACGATCCGAAAGCTTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTC
469

Query 121 CGTCCATTGCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT
160
Subject 392 CGTCCATTGCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT
333

Query 181 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
240
Subject 392 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
418

Query 241 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
300
Subject 272 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
243

Query 301 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
360
Subject 212 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
283

Query 361 TCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
420
Subject 152 TCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
93

Query 421 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
480
Subject 92 CCGGATGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTG
33
```

ภาพ 25 ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต MC101

5'ACCGCGGCGGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGG
 ATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAA
 CCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC
 TACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACC
 CTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAA
 TGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAAACCAT
 GCGGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGAT
 GGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCACTCTTCTTTTTCCGGTGGAGCA
 AGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTATTAGGCACCCCGCCAGCGTT
 CGTCCTGAGCCAGGTCCAAACTCTGA3'

ภาพ 26 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM11 ที่จะนำไป
 เปรียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R
 ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit

```
> [gb] AB362609.1 Enterococcus faecium gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:
NR010114
Length=1335

Score = 857 bits (95%), Expect = 1.0
Identities = 477/478 (99%), Gaps = 0/478 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAAC 60
      |||
Sbjct 309 TCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAAC 450

Query 61 AGAGTTTACGATCCGAAAAAGCTTCTCTCACTCAGCGGCGGCTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC 120
      |||
Sbjct 449 AGAGTTTACGATCCGAAAAAGCTTCTCTCACTCAGCGGCGGCTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC 490

Query 121 CCATTGCGGAGATTCCCTATCTGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 180
      |||
Sbjct 389 CCATTGCGGAGATTCCCTATCTGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 330

Query 191 AATATGCGGAGATCAAGCTTCTCAAGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 240
      |||
Sbjct 329 AATATGCGGAGATCAAGCTTCTCAAGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 270

Query 241 CACCAAGTAGTAAATGCAAGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 300
      |||
Sbjct 249 CACCAAGTAGTAAATGCAAGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 210

Query 301 ATCAAAACCATGCGGCTTCTGATTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGAT 360
      |||
Sbjct 209 ATCAAAACCATGCGGCTTCTGATTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGAT 180

Query 361 GCTTCTGATGCGGAGGTTACCGCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 420
      |||
Sbjct 149 GCTTCTGATGCGGAGGTTACCGCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 80

Query 421 TGGAGCTTATGCTGCGGCTGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 478
      |||
Sbjct 59 TGGAGCTTATGCTGCGGCTGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 32
```

ภาพ 27 ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลต RM11

5'ACCGCGGCCGGTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTATCTGGTTAAATACCGTCAACG
 TATGAACAGTTACTCTCATACGTGTTCTTCTTTAAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAA
 CCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGGAAGATTCC
 CTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAG
 TCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTA
 ATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT
 ATGCGAACAACGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTT
 CTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAATCT
 ATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTTCGACTTGCATGTATTAG
 GCACACCCCCCGGCGTTCATCCTGAACCAGGATAAAAACTAATGA3'

ภาพ 30 ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลด RM28 ที่จะนำไป
 เปรียบความเหมือนใน GenBank ซึ่งได้จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก primer 27F และ 520R
 ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit

```
> F012AF008231.1 [O] Saccharobacillus fermentans IFD 1986 DNA, complete genome
Length=2093622

Features in this part of subject sequence:
  rRNA-5S rRNA-23S rRNA
  Score = 481 bits (97%), Expect = 0.0
  Identical to = 481/481 (100%), gaps = 0/481 (0%)
  Strand=Plus/Minus

Query 2      TTTTCTTAATATACCTGACCTATGACCAATTAACCTGATACCTGTTCTTTTACCAAC  61
Sbjct  274028  TTTTCTTAATATACCTGACCTATGACCAATTAACCTGATACCTGTTCTTTTACCAAC  274064

Query 62     AATGCTTACGACCGGAAAGCATTTTCAATGACGCGGTGTTTCTTCAATGAGCGTTGCG  121
Sbjct  373683  AATGCTTACGACCGGAAAGCATTTTCAATGACGCGGTGTTTCTTCAATGAGCGTTGCG  373699

Query 112    CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  181
Sbjct  274028  CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  274064

Query 162    CTGTTGCGGACCAAAATCTATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTT  241
Sbjct  274043  CTGTTGCGGACCAAAATCTATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTT  274084

Query 212    CAGTTCGAGGAGTACCTACGTGTTACTACCCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAAT  301
Sbjct  274043  CAGTTCGAGGAGTACCTACGTGTTACTACCCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAAT  274084

Query 312    AATGCTTACGACCGGAAAGCATTTTCAATGACGCGGTGTTTCTTCAATGAGCGTTGCG  381
Sbjct  274028  AATGCTTACGACCGGAAAGCATTTTCAATGACGCGGTGTTTCTTCAATGAGCGTTGCG  274064

Query 412    CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  461
Sbjct  274028  CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  274064

Query 462    AATGCTTACGACCGGAAAGCATTTTCAATGACGCGGTGTTTCTTCAATGAGCGTTGCG  521
Sbjct  274028  AATGCTTACGACCGGAAAGCATTTTCAATGACGCGGTGTTTCTTCAATGAGCGTTGCG  274064

Query 482    CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  581
Sbjct  274028  CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  274064

Query 482    CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  581
Sbjct  274028  CCAATGCGGAGCTTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTT  274064
```

ภาพ 31 ชื่อของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสคล้ายกับแบคทีเรียโอโซเลด RM28

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากมูลทหารกและน้ำนมหมัก ได้แบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งหมด 137 ไอโซเลต เป็นรูปร่างท่อน 18 ไอโซเลต และรูปร่างกลม 119 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, และ *Vibrio cholera*) ความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรด pH 2.5 ความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะ แล้วเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ดี 20 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี MTT assay

2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี MTT assay ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดีที่สุด 7 ไอโซเลต คือ MC53, MC31, RM28, MC52, MC101, RM11 และ RM12 ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังนี้คือ 35, 29, 23, 21, 18, 16 และ 14 ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตมาขึ้นชั้นประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยวิธี Trypan Blue exclusion พบว่าเมื่อบ่ม cultured medium ของแบคทีเรียร่วมกับเซลล์มะเร็งลำไส้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงสุดคือ 39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มตัวเซลล์ของแบคทีเรีย (live whole cell) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด คือ 34 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุด คือ 45 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตนี้ยังมีประสิทธิภาพการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้ดีอีกด้วย

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย 7 ไอโซเลตดังนี้ MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12 และ RM28 โดยทำการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MC31 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *P. pentosaceus* 100 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียไอโซเลต MC52 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. salivarius* 99.8 เปอร์เซ็นต์
 แบคทีเรียไอโซเลต MC53 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. salivarius* 100 เปอร์เซ็นต์
 แบคทีเรียไอโซเลต MC101 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *E. faecium* 99.8 เปอร์เซ็นต์
 แบคทีเรียไอโซเลต RM11 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *E. faecium* 99.8 เปอร์เซ็นต์
 แบคทีเรียไอโซเลต RM12 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. fermentum* 100 เปอร์เซ็นต์
 และแบคทีเรียไอโซเลต RM2-8 มีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *L. fermentum* 99.6 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรีย 7 ไอโซเลตคือ MC31, MC52, MC53, MC101, RM11, RM12 และ RM28 มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในรูปของเซลล์แบคทีเรียหรือนำแบคทีเรียไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่าง ๆ ได้

ข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ มีข้อเสนอแนะว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

1. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ด้วยวิธีการอื่น ๆ เพิ่มเติมเช่น การตรวจรูปสัณฐานของเซลล์ การตรวจการแตกหักของดีเอ็นเอ เป็นต้น
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งตับ เป็นต้น
3. ควรมีการศึกษานำแบคทีเรียไปใช้ในรูปแบบต่าง ๆ อาจเป็นในรูปของตัวเซลล์แบคทีเรีย หรือนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่าง ๆ

บรรณานุกรม

อมรชัย หาญผดุงธรรมะ. 2542. มะเร็งลำไส้ใหญ่. นิตยสารใกล้หมอ 23(10):48-50

Alam, M., T. Midtvedt, and A. Uribe. 1994. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. **J. Gastroenterol.** 29: 445-451.

Alak, J.I., B.W. Wolf, E.G. Mduruwa, G.E. Pimentel-Smith, and O. Adeyemo. 1997. Effect of *Lactobacillus reuteri* on intestinal resistance to cryptosporidium parvum infection in a murine model of acquired immunodeficiency syndrome. **J. Infect. Dis.** 175: 218-221.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **New York: Marcel Dekker.** 1-72.

Ann, C., J.T. Michael, J.C. Cari, L. Marjorie, J.J. Eric , W.D. Flanders, R. Carmen , S. Rashmi, and E.C. Eugenia. 2005. Meat consumption and risk of colorectal cancer. **JAMA.** 293: 172-182 .

Arici, M., B. Bilgin , O. Sagdic, and C. Ozdemir. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiol.** 21(1): 19-24.

Arihara, K., H. Ota, M. Itoh, Y. Kondo, T. Sameshima, H. Yamanaha, M. Akimoto, S. Kanai and T. Miki. 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **J. Food. Sci.** 63(3): 544-547.

Arimochi H., T. Kinouchi, K. Kataoka *et al.* 1997. Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethaneinduced aberrant crypt foci in the rat colon. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 238: 753-757.

Ashe, P.C., and D.M., Berry. 2003. Apoptotic signaling cascades. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 12(2): 199-214.

Ayebo, A.D., I.A. Angelo and K.M. Shahani. 1980. Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon fecal flora and enzyme activity in humans. **Milchwissenschaft.** 35: 730-733.

Aysun, C. and G. Candan. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains.

Food. Microbiol. 20: 511-518.

Bai J., and A.J. Odin. 2003. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. **Autoimmun. Rev.** 2(1): 36-42.

Baricault, L., G. Denariáz, J-J Houri, *et al.* 1995. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. **Carcinogenesis.** 16: 245-252.

Begley, M., C.G.M. Gahan, and C. Hill. 2005. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 625-651.

Begley, M., C. Hill and G.C. Gahan. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 1729-1738.

Bernet, M.F., D. Brassart, J.R. Neeser, and A.L. Servin. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibit cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut.** 35: 483-489.

Bengmark, S., and L. Gianotti. 1996. Nutritional support to prevent and treat multiple organ failure. **World J. Surg.** 20: 474-481.

Bengmark, S. 1996. Ecnutrition and health maintenance: a new concept to prevent inflammation, ulceration and sepsis. **Clin. Nutr.** 15: 1-10.

Blomberg, L., A. Henriksson and L.P. Conway. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. **Appl Environ. Microbiol.** 59: 34-39.

Blount, B.C., M.M. Mack, C. Wehr, J. MacGregor, R. Hiatt, G. Wang, S.N. Wickramasinghe, R. B. Everson, and B. N Ames. 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 3290-3295.

- Bras M., B. Queenan, and A. Susin. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different models of dying. **Biochemistry**. 70(2): 284-293.
- Brennan, M., B. Wanismail, and B. Ray. 1993. Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. **J. Food Prot.** 46: 887-892.
- Brian, C.C., J. Bu-Tian, D. Qi, G. Gloria, K.M. Joseph, G. Yu-Tang , F.F. Joseph, and C. Wong-Ho. 2003. Dietary Factors and Risk of Colon Cancer in Shanghai, China. **Cancer. Epidem. Biomar.** 12: 201-208.
- Bruce, W.R. 1987. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. **Cancer Res.** 47: 4237-4242.
- Bruni, M.E.C. and T.J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 59(9): 3003-3010.
- Bingham, S.A. 1999. High-meat diets and cancer risk. **Proc. Nutr. Soc.** 58: 243-248.
- Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiol. Rev.** 49: 359-378.
- Byczkowski, J. and T. Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. **Int. J. Biochem.** 20: 569-580.
- Carey, M.C., and W.C. Duane. 1994. Enterohepatic circulation. **Raven. Press.** 719-738.
- Cebra, J.J., S.B. Periwal, G. Lee, F. Lee, and K.E. Shroff. 1998. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. **Dev. Immunol.** 6: 13-8.
- Chateau, N., M.A. Deschamps, and H.A. Sassi. 1994. Heterogenetly of bile salt resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. **Lett. Appl. Microbiol.** 18: 42-44.
- Challa, A., D.R. Rao, C.B. Chawan and L. Shackelford. 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis.** 18: 517-521.
- Charteris, W.P., M.P. Kelly, L. Morelli, K.J. Collins. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J. Food Prot.** 61: 1636-1643.

- Chukeatirote, E. 2003. Potential use of probiotics Songklanakarin. **J. Sci. Technol.** 25(2): 275-282.
- Clarke N., P. Germain, L. Altucci, and H. Gronemeyer. 2004. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert. Rev. Mol. Med.** 6(25): 1-23.
- Cremonini, F., F. Canducci, S. Di Caro, L. Santarelli, A. Armuzzi, G. Gasbarrini, *et al.* 2001. *Helicobacter pylori* treatment: a role of probiotics? **Dig Dis.** 19: 144-147.
- Collado, C.M., J. Meriluoto, and S. Salminen. 2006. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food. Res. Int.** 40: 629-636.
- Coppola, R., M. Nanni, M. Iorizzo, A. Sorrentino, E. Sorrentino, and L. Grazia. 1997. Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. **J. Dairy Res.** 64: 305-310.
- Conly, J.M., K. Stein, L. Worobetz, and S. Rutledge-Harding. 1994. The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. **Am. J. Gastroenterol.** 89: 915-923.
- Conway, P.L., L. S. Corback, and R.B. Glodin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. **J. Dairy Sci.** 70: 1-20.
- Cummings, J.H., E.W. Pomare, W.J. Branch, C.P. Naylor, and G.T. Mac. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut.** 28: 1221-1227.
- Cunningham-Rundles, S., S. Bengmark, R. Johann-Liang, F. Marshall, L. Metakis, C. Califano, *et al.* 2000. Probiotics and immune response. **Am. J. Gastroenterol.** 95(Suppl): S22-S5.
- De Smet, I., L. Hoorde, M.V. Woestyne, H. Christians, W. Verstrate. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.** 79: 292-301.

- De Thonel A., and E.J. Eriksson. 2005. Regulation of death receptors-relevance in cancer therapies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 207(2): 123-132.
- Desagher S., and C.J. Martinou. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends. Cell. Biol.** 10(9): 369-377.
- Drasar, B.S. and M.J. 1974. Hill, Human Intestinal Flora. **Academic Press Inc.**
- Elmer, G.W., C.M. Surawiz, and L.V. Mc Farland. 1996. Biotherapeutic agents: a neglected modality for the treatment of selected intestinal and vaginal infection. **JAMA.** 275: 870-876.
- Erkkila, S. and E. Petaja. 2000. Screening of commercial meat starter culture at low pH in the presence of bile salt for potential probiotic use. **J. Meat Science.** 55: 297-300.
- Ewaschuk, B.J., J. W. Walker, H. Diaz, and K. L. Madsen. 2006. Bioproduction of Conjugated Linoleic Acid by Probiotic Bacteria Occurs In Vitro and In Vivo in Mice. *J. nutri.* 1483-1487.
- Fang, W-F and H.W. Strobel. 1987. Activation of carcinogens and mutagens by rat colon mucosa. **Cancer Res.** 38: 2939-2944.
- Gangnon, M., E.E. Kheadr, G.E. Blay, and I. Fliss. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **Int. J. Food Microbiol.** 92 : 69-78.
- Fearon, E.R. and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.** 61: 759-767.
- Fichera, G.A. and G. Giese. 1994. Non-immunologically-mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. **Cancer Lett.** 85: 93-103.
- Fogh, J., M.J. Fogh, and T. Orfeo. 1977. One hundred and twentyseven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **J. Natl. Cancer Inst.** 59: 221-226.

- Forestier, C., C. De Champs, C. Vatoux, and B. Joly. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. **Res. Microbiol.** 152: 167-173.
- Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future development. **IFI NR.** 3: 23-26.
- Gardiner, *et al.* 2002. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human Vagina as Demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 9(1): 92-96.
- Garvie, E.I. 1986. Genus *Pediococcus*, In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2: 1075-1079.
- Granato, D., F. Perotti, I. Masserey and *et al.* 1999 Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* Lal to human enterocyte-like Caco-2 cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1071-1077.
- Gerhardsson, M., B. Floderus, and S.E. Norell. 1998. Physical activity and colon cancer risk. **Int. J. Epidemiol.** 17: 743-746.
- Gibson, P.R., I. Moeller, O. Kagelari, M. Folino, and G.P. Young. 1992. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic marker of differentiation in neoplastic and nonneoplastic colonic epithelial cells in vitro. **J. Gastroenterol Hepatol.** 7: 165-172.
- Gilliland, S.E. and L.M. Speck. 1989. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* forward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. **J. Food Prot.** 40: 280-283.
- Gilliland, S.E., E.T. Staley, and J.L. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lact. acidophilus* used as a dietary adjunct. **J. Dairy. Sci.** 67: 3045-3051.
- Giovannucci, E., E.B. Rimm, M.J. Stampfer, G.A. Colditz, A. Ascherio, and W.C. Willett. 1994. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. **Cancer Res.** 54: 2390-2397.

- Gionchetti, P., F. Rizzello, U. Helwig, A. Benture, K.M. Lammers, P. Brigidi, *et al.* 2003. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind placebo controlled trial. **Gastroenterology**. 124: 1202-1209.
- Greene, J. D., and R.T. Klaenhammer. 1994. Factors involed in adherence of Lactobacilli to human Caco-2 cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4487-4494.
- Goldbohm, R.A., P.A. van der Brandt, P. van't Veer, H.A.M. Brants, E. Dorant, F. Sturmans, and R.J.J. Hermus. 1994. A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the risk of colon cancer. **Cancer Res.** 54: 718-723.
- Goldin, B.R. and S.L. Gorbach. 1984. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and Lactobacillus: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. **J. Natl. Cancer Inst.** 73: 689-695.
- Goodlett, C.R., and H.K. Horn. 2001. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. **Alcohol. Res. Health.** 25(3): 175-184.
- Gorbach, S.L., T. Chang, and B. Goldin. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. **Lancet.** 2(8574): 1519.
- Goldin, B., S. Gorbach, M. Saxelin, S. Barakat, L. Gualtieri, and S. Salminen. 1992. Survival of *Lactobacillus* GG in human gastrointestinal tract. **Digest. Dis. Sci.** 37: 121-128.
- Guarner, C. and G. Soriano. 1997. Spontaneous bacterial peritonitis. **Semin. Liver Dis.** 17: 203-217.
- Guarner, F. and J.R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. **Lancet.** 361:512-519.
- Guandalini, S., L. Pensabene, M.A. Zikri , J.A. Dias, L.G. Casali, H. Hoekstra, *et al.* 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. **J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.** 30: 54-60.
- Guarino, A. 1998. Effects of probiotics in children with cystic fibrosis. **Gastroenterol Int.** 11(Suppl): 91.

- Harwood S.M., M.M. Yaqoob, and A.D. Allen. 2005. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. **Ann. Clin. Biochem.** 42(6): 415-431.
- Helbock, H.J., K.B. Beckman, M.K. Shigenaga, P.B. Walter, A.A. Woodall , H.C. Yeo, and B.N. Ames. 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxodeoxy guanosine and 8-oxo-guanine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 288–293.
- Henderson, B.E., R.K. Ross, and M.C. Pike. 1991. Toward the primary prevention of cancer. **Science.** 254: 1131–1338.
- Hilton, E., H.D. Isenberg, P. Alperstein, K. France , and M.T. Borenstein. 1992. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. **Ann. Intern. Med.** 116: 353-357.
- Hilton, E., P. Kowalski , C. Singer, and M. Smith. 1997. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in travelers. **J Travel Med.** 4: 41-43.
- Hirai, O., T. Fujitsu, J. Mori, H. Kikuchi, S. Koda, M. Fujioka and Y. Morimoto. 1987. Antitumor activity of purified arabinogalactanpeptidoglycan complex of the cell wall skeleton of *Rhodococcus lentifragmentus*. **J. Gen. Microbiol.** 133: 369–373.
- Hofmann, A.F. 1994. Bile acids. **Raven Press.** 677–718.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International. **J. Food. Microbiol.** 41: 85-101.
- Hu W., and J.J. Kavanagh. 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet. Oncol.** 4(12): 721-729.
- Isolauri, E., T. Arvola , Y. Sutus, E. Moilanen, and S. Salminen. 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clin. Exp. Allergy.** 30: 1604-1610.

- Jackson, T.G., G.R.J. Taylor, A.M. , Clohessy, and C.M. William. 1999. The effects of the daily intake of insulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. **Br. J. Nutr.** 89: 23-30.
- Jacobsen, C.N., V.R. Nielsen, A.E. Hayford, P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A.P. Paerregaard, B. Sandstro, M. Tvede and M. Jakobsen. 1999. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. **Appl. Environ. Microb.** 65: 4949–4956.
- Janne, P.A. and R.J. Mayer. 2000. Chemoprevention of colorectal cancer. **N. Engl. J. Med.** 342: 1960-1968.
- Joanne, R.L. 2004. Microbial Degradation Products Influence Colon Cancer Risk: the Butyrate Controversy. **J. Nutr.** 134: 479-482.
- Kaila, M., E. Isolauri, E. Soppi, E. Virtanen, S. Laine, and H. Arvilommi. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human strain. **J. Internation Pediatric Research Foundation.** 32(2): 141-144.
- Kalliomaki, M., S. Salminen , H. Arvilommi, P. Kero , P. Koskinen, and E. Isolausi. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. **Lancet.** 357: 1076-1079.
- Kashket, E.R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS. Microbiol. Rev.** 46: 233-244.
- Kaye, K.S., J.J. Engemann, S.H. Fraimow, *et al.* 2004. Pathogens resistant to antimicrobial agents:epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 18: 467-511.
- Klingberg T.D., L. Axelsson, K. Naterstad, D. Elsser, B.B. Budde. 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. **Int. J. Food. Microbiol.** 105: 419– 431.

- Kim Y.J., H. J. Woo, Y. S. Kim and H. J. Lee. 2002. Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. **Biotechnol. Lett.** 24: 1431–1436.
- Kontula, P., J. Jaskali, L. Nollet, D.I. Smet, V.A. Wright, K. Poutanen and M.T. Sandholm. 1998. The colonization of simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product effect on gastrointestinal microbiota. **J. Appl. Microbiol Biotechnol.** 50: 246-252.
- Kulkarni, N. and B.S. Reddy. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. Proceedings of the Society of Experimental. **Biology and Medicine.** 207: 278–283.
- Kulkarni, N. and B.S. Reddy. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. **P. Soc. Exp. Biol. Med.** 207: 278–283.
- Lan, A., D. L. Gossmann, C. Lemaire, C. Brenner, and et al. 2006. Acidic extracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis to necrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-products of the human probiotic propionibacteria. **Apoptosis.** 12: 573-591.
- Lee W.J., J. G. Shin, E. H. Kim, H. E. Kang, I. B. Yim, J. Y. Kim, H. G. Joo and H. J. Woo. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects *in vivo* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. **J. Vet. Sci.** 5: 41–48.
- Lee, N.K., J.S. Park, E. Park and H.D. Paik. 2007. Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestinal. **Lett. Appl. Microbiol.** 44(3): 274-278.

- Lehto, E. M., and J.S. Salminen. 1997. Inhibition of salmonella thyphimurium adhesion to Caco-2 cell culture by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? **Immunol. Med. Microbiol.** 18: 125-132.
- Lidbeck, A., U. Geltner-Allinger, K.M. Orrhage *et al.* 1991. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal bile acids in colon cancer patients. **Microb. Ecol. Health Dis.** 4: 81-88.
- Lievin, V., I. Peiffer, S. Hudaulf, F. Rochat, D. Brassart, J.R. Neeser, *et al.* 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut.** 47: 646-652.
- Lichtman, S.M. 2001. Bacterial translocation in humans. **J. Ped. Gastroenterol Nutr.** 33: 1-10.
- Lin, H.C., B.H. Su, A.C. Chen, T.W. Lin, C.H. Tsai, T.F. Yeh, *et al.* 2005. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. **Pediatrics.** 115: 1-4.
- Lindgren, S.F., and J.W. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 149-164.
- Lorca, G.L., T. Wadstrom, F.G. Valdez and A. Ljungh. 2001. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. **Curr Microbiol.** 42: 39-44.
- MacGregor, J.T., R. Schlegel, C.M. Wehr, P. Alperin, and B.N. Ames. 1990. Cytogenetic damage induced by folate deficiency in mice is enhanced by caffeine. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 9962-9965.
- Manjunath, N., B. Ranganathan. 1989. A cytotoxic substance produced by a wild culture of *Lactobacillus casei* D-34 against tumor cells. **Indian J. Exp. Biol.** 27: 141-145.
- Maragkoudakis, P.A., G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot and E. Tsakalidou. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strain isolated from dairy product. **Int. Dairy. J.** 16: 189-199.

- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and Huis In't Veld, J. H. J. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **J. Dairy. Sci.** 80: 1031-1037.
- Majamaa, H. and E. Isolauri. 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.** 99: 179-185.
- Martín, R., E. Jiménez, M. Olivares, M.L. Marín, L. Fernández, J. Xaus and J.M. Rodríguez. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. **Int. J. Food. Microbiol.** 112: 35-43
- Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Int. J. Food. Microbiol.** 41: 133-140.
- Mayara-Makinen, A., M. Manninen, and H. Gyllenberg. 1983. The adhesion of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. **J. Appl. Bacteriol.** 55: 241-245.
- Mc, L.V., C.M. Surawicz, R.N. Greenberg, R. Fekety, G.W. Elmer, K.A. Moyer, et al. 1994. A randomized placebocontrolled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile*. **JAMA.** 271: 1913-1918.
- Miller, A., C. Stanton C and R. Devery. 2002. Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12- conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. **Anticancer Res.** 22: 3879-3887.
- Mirian, B., P.W. Matty, F.P.M. Anton, J.S. Leo, D.H. Femke, M.J.M. Guido, H.F.M. Marjolein, P. Adriaan, R.A. Goldbohm and A. Piet. 2004. Fat and *K-ras* mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. **Carcinogenesis.** 25: 1619-1628.
- Miyazawa, E., A. Iwabuchi, and T. Yoshida. 1996. Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. **Nutr Rev.** 16: 603-613.

Modler, G.W., R.C. McKellar and M. Yaguchi. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors.

Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. 23: 29–41.

Morotomi, M. and M. Mutai. 1986. In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. **J. Natl. Cancer Inst.** 77: 195–201.

Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe and F. Tsuchiya. 1983. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. **Agric. Biol. Chem.** 47: 1623–1625.

Orrhage, K., E. Sillerstrom, and J.A. Gustafsson *et al.* 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation Research.** 311: 239–248.

Orrhage, K., A. Annas, C.E. Nord, *et al.* 2002. Effects of lactic acid bacteria on the uptake and distribution of the food mutagen Trp-P-2 in mice. **Scand. J. Gast.** 37: 215–221.

Ouwehand, A.C. and L.P. Conway. 1996. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus. **J. Appl. Bacteriol.** 80: 311–318.

Oxoid Limited. 2008. Product List 2008/09. [online]. Available http://www.oxoid.com/UK/blue/pdf/prod_list/ProdList2008.pdf (28 November 2008).

Park, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. S., & Shin, D. H. 2002. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi. **J. Agr. Food. Chem.** 50: 2531–2536.

Park, H.S., Lee, S.H. and Uhm, T.B. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. **Kor. J. Food Nutr.** 27: 433–440.

Park, H.D. and H.C. Rhee. 2001. Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from *kimchi* Korean fermented vegetables. **Biotechnol. Lett.** 23: 1583–1589.

- Pennacchia C., D. Ercolini, G. Blaiotta, O. Pepe, G. Mauriello, F. Villani. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat. Science.** 67: 309-317.
- Petros, A.M., Z. Georgia , M. Christos, K. George , P. Bruno, and T. Effie. 2005. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **Int. Dairy J.** 16: 189-199.
- Pinto, M., S. Robine-Leon, D.M. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assmann and K. Haffen. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biol. Cell.** 47: 323-330.
- Prasad, J., H. Gill, J. Smart, and K.P. Gopal. 1998. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **Int. Dairy. J.** 8: 993-1002.
- Pochapin, M. 2000. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. **Am. J. Gastroenterol.** 95(Suppl): S11-S3.
- Pool-Zobel, B.L., C. Neudecker, I. Domizlaff, et al. 1996. *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. **Nut. Cancer.** 26: 365-380.
- Regula, K.M., K. Ens, and A.L. Kirshenbaum. 2003. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 35(6): 559-567.
- Rafter, J. 2003. Probiotics and colon cancer. **Best. Pract. Res. Cl. Ga.** 17: 849-859.
- Rafter, J. and B. Glinghammar. 1998. Interactions between the environment and genes in the colon. **Eur. J. Cancer Prev.** 7(Suppl): S69-S74.
- Reddy, G.V., B.A. Friend , K.M. Shahani and R.E. Farmer. 1983. Antitumor activity of yogurt components. **J. Food Prot.** 46: 8-11.
- Reddy, B.S. 1998. Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies. **Br. J. of Nutr.** 80: S219-S223.

- Rojas, M. and L.P. Conway. 1996. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. **J. Appl. Bacteriol.** 81: 474–480.
- Rojas, M., F. Ascencio, and L.P. Conway. 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 2330–2336.
- Rosina, A. 1982. **Human Intestinal Flora in Health and Disease**. PhD thesis, University of Liverpool.
- Rowland, I.R., C.J. Rumney, J.T. Coutts and L.C. Lievense. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**. 19: 281–285.
- Rowland, I.R. and P. Grasso. 1975. Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. **Appl. Microbiol.** 29: 7–12.
- Rowland, I.R., C.J. Rumney, J.T. Coutts and L.C. Lievense. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**. 19: 281–285.
- Saavedra, J. M., N.A. Bauman, I. Oung, J.A. Perman, and R.H. Yolken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum*, and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea, and shedding of rotavirus. **Lancet**. 344: 1046-1049.
- Sakamoto, K. and K. Konishi 1988 Antitumor effect of normal microflora on Ehrlich Ascites Tumor. **Jpn. J. Cancer Res.** 79: 109–116.
- Salminen and A. Von Wright (eds). 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Salminen, S., C. Bouley, and M.C. Boutron-Ruault. 1998. Cummings JH, Franck A, Gibson GR, *et al.* Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.** 80(Suppl): S147-S71.

- Sanderson, I.R. and W.A. Walker. 1993. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). **Gastroenterology**. 104: 622-639.
- Schiffrin, E.J., F. Rochat, H. Link-Amster, *et al.* 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **J. Dairy Sci.** 78: 491-496.
- Schultz, M. and B. Sartor. 2000. Probiotics and inflammatory bowel diseases. **Am. J. Gastroenterol.** 95(Suppl): S19-S21.
- Sekine, K., T. Toida, M. Saito *et al.* 1985. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. **Cancer Res.** 45: 1300-1307.
- Sekine, K., T. Toida, M. Saito, M. Kuboyama, T. Kawashima, and Y. Hashimoto. 1985. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. **Cancer Res.** 45: 1300-1307.
- Servin, A.V. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best. Pract. Res. Cl. Ga.** 17:741-754.
- Shanahan, F. 2001. Probiotics in inflammatory bowel disease. **Gut.** 48: 609.
- Shanahan, F. 2001. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, Immunotherapeutics, and ecotherapeutics. **Gastroenterol.** 120: 622-35.
- Shales, D.M., N.D. Gerding, F.J. John, *et al.* 1997. Society of Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. **Clin Infect Dis.** 25: 584-599.
- Shirota, M. 1992. *Lactobacillus* in health and disease. Japan: Yakult Honsha Co., Ltd.

- Slattery, M.L., M.C. Schumacher, K.R. Smith, D.W. West, and N. Abd-Eghany. 1998. Physical activity, diet, and risk of colon cancer in Utah. **Am. J. Epidemiol.** 128: 989-999.
- Silvia, A. and S.K.J. Nakaia. 2003. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. **Int. J. Food. Microbiol.** 86: 249-255.
- Smulders, F.J.M., P. Barendsen, G.J. van Logtestijn, A.A.D. Mossel, and M.G. van Der Marel. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. **J. Food Technol.** 21: 419-436.
- Simon, G.L. and S.L. Gorbach. 1984. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterol.** 86: 174-193.
- Singh, J., A. Rivenson, M. Tomita, S. Shimamura, N. Ishibashi, and B.S. Reddy. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acidproducing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis.** 18: 833-841.
- Strompfova V., A. Laukova, A.C. Ouwehand. 2004. Selection of *enterococci* for potential canine probiotic additives. **Vet. Microbiol.** 100: 107-114.
- Swidsinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidsinski, V. Laening-Baucke, M. Ortner, *et al.* 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol.** 122: 44-54.
- Sylvia, K.W., R. Chan and O. Lech. 2006. Induction of Programmed Cell Death by Probiotic Bacteria. **DRTC Dairy Day.** 43.
- Tannock, I.F., P.R. Hill, G.R. Bristow, and L. Harrington. 2005. The Basic science of oncology. 4th ed.: **McGraw-Hill Companies Inc.** Canada.
- Thomas, M.R., S.C. Litin, D.R. Osmon, and A.P. Corr, and A.L. Weaver, and C.M. Lohse. 2001. Lack of effect of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebocontrolled trial. **Mayo. Clin. Proc.** 76: 883-889.

- Toit, M., A. M.C., Franz, T.M.L. Dick, U. Schillinger, P. haberer, B. Warlies, F. Ahrens and H. W. Holzapfel. 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol level, faeces pH and faeces moisture content. **J. Food Microbiol.** 40: 93-104.
- Toumola, E.M., and J.S. Salminen. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. **Int. J. Food. Microbiol.** 41: 45-51.
- Thun, M.J., E.E. Calle, M.M. Namboodiri, W.D. Flanders, R.J. Coates, T. Byers, P. Boffetta, L. Garfinkel, and C.W.J. Heath. 1992. Risk factors for fatal colon cancer in a large prospective study. **J. Natl. Cancer Inst.** 84: 1491-500.
- Weisburger, J.H. and E.L. Wynder. 1987. Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action and prevention. In De Vita VT, Hellman S & Rosenberg SA (eds) Important Advances in Oncology. Philadelphia: **JB. Lippincott.** 197-220.
- Willett, W. C., M. J. Stampfer, G. A. Colditz, B. A. Rosner, and F. E. Speizer. 1990. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. **N. Engl. J. Med.** 323: 1664-1672.
- Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B.L. Pool-Zobel. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** 73(Suppl): S451-S5.
- Won, C.C., P.M. Hyoun, H.S. Ho, W.S. Gyu, S.M. Kyung, I.J. Jun, H.S. Gil, K.J. Hark, J. J. Soon, K.H. Young. 2007. Microorganism *Pediococcus pentosaceus* EROM101, having immune enhancement, anticancer and antimicrobial activities. **United States Patent.**
- Van Leeuwen, P.A., M.A. Boermeester, A.P. Houdijk, C.C. Ferwerda, M.A. Cuesta, S. Meyer, *et al.* 1994. Clinical significance of translocation. **Gut.** 35(Suppl): S28-S34.
- Vanderhoof, J.A., D.B. Whitney, D.L. Antonsen, T.L. Hanner, J.V. Lupo and R.J. Young. 1999. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. **J Pediatr.** 135: 564-568.

- Venitt, S. 1988. Mutagens in human faeces and cancer of the large bowel. In Rowland IR (ed.) *Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*. **London: Academic Press**. 399–460.
- Vesterlund S., V. Vankerckhoven, M. Saxelin, H. Goossens, S. Salminen, and A. C. Ouwehand. 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **Int. J. Food. Microbiol.** 116: 325-331.
- Vuyst, D.L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology*, **Genet. Appl.** 91-142.
- Younes, H., C. Coudray, J. Bellanger, C. Demigne, Y. Rayssiguier, and C. Remesy. 2001. Effects of two fermentable carbohydrate (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. **Br. J. Nutr.** 86: 479-485.
- Zabala, A., M.R. Martoan, A.I. Haza, L. Fernaandez, J.M. Rodroaguez and P. Morales. 2001. Anti-proliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 287-292.
- Zhang, X.B. and Y. Ohta. 1993. Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. **Can. J. Microbiol.** 39: 841–845.
- Zhu, H., C.A. Hart, D. Sales² and N.B. Roberts. 2006. Bacterial killing in gastric juice – effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.** 55: 1265–1270.





ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหารเหลวสูตร Nutrient Broth (NB)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Merck ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Meat extract	3.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม

ชั่งอาหาร NB สำเร็จรูปจำนวน 8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็งสูตร Nutrient Agar (NA)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Merck ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Meat extract	3.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม

ชั่งอาหาร NB สำเร็จรูปจำนวน 8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำ 15 กรัม ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำอาหารที่ผสมเข้ากันแล้วไปต้มเพื่อให้ผงละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลวสูตร Brain heart infusion (BHI)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Casein peptone	14.5	กรัม
Brain heart infusion from solids	10.0	กรัม
Animal tissue peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	3.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม

ซังอาหาร BHI สำเร็จรูปจำนวน 37 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็งสูตร Brain heart infusion (BHI)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Casein peptone	14.5	กรัม
Brain heart infusion from solids	10.0	กรัม
Animal tissue peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	3.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม

ซังอาหาร BHI สำเร็จรูปจำนวน 37 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำ 15 กรัม ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำอาหารที่ผสมเข้ากันแล้วไปต้มเพื่อให้ผงละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลวสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (MRS)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Glucose	20.0	กรัม
Meat peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม

Manganese sulfate 0.05 กรัม

ซังอาหาร MRS สำเร็จรูปจำนวน 55 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็งสูตร De Man, Rogaso and Sharpe (MRS)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Glucose	20.0	กรัม
Meat peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม

ซังอาหาร MRS สำเร็จรูปจำนวน 55 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
เติมผงวุ้น 15 กรัม ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำอาหารที่ผสมเข้ากันแล้วไปต้มเพื่อให้ผงวุ้น
ละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น
เวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 และ 5 นอร์มอล

HCl จาก stock มีความเข้มข้น 37.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ 12.2 นอร์มอล

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 12.2 นอร์มอล ดังนี้

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 1 \times 100 &= 12.2 \times V_2 \\ V_2 &= 8.20 \end{aligned}$$

ดังนั้นปีเปตสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 12.2 นอร์มอล ปริมาตร 8.20 ลิตร มาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 12.2 นอร์มอล ดังนี้

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 5 \times 100 &= 12.2 \times V_2 \\ V_2 &= 40.98 \end{aligned}$$

ดังนั้นปีเปตสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 12.2 นอร์มอล ปริมาตร 40.98 ลิตร มาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

NaOH มี Mw. = 40.0 กรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการชั่ง NaOH จำนวน 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายหมด ทำการปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เตรียมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 20 \times 100 &= 80 \times V_2 \\ V_2 &= 25 \end{aligned}$$

ดังนั้นปีเปตกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 3 \times 100 &= 37 \times V_2 \\ V_2 &= 8.10 \end{aligned}$$

ดังนั้นปีเปตสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8.10 ลิตร มาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5. เตรียมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เตรียมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 70 \times 100 &= 95 \times V_2 \\ V_2 &= 73.68 \end{aligned}$$

ดังนั้นปีเปตเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 73.68 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ประกอบด้วย

Sodium chloride ($NaCl$)	9	กรัม/ลิตร
Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	9	กรัม/ลิตร
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม/ลิตร

ทำการชั่งสารแต่ละตัวตามสูตรข้างต้น ละลายน้ำในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำการปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร

7. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)

ประกอบด้วย

Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)	13.4	กรัม
Fetal calf serum	10	เปอร์เซ็นต์
Non essential amino acid	1	เปอร์เซ็นต์

Penicillin-Streptomycin	1	เปอร์เซ็นต์
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)	0.74	กรัม

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป DMEM 13.4 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อละลายอาหารนั้น นำไปกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Fetal calf serum 100 มิลลิลิตร, Non essential amino acid 10 มิลลิลิตร, Penicillin-Streptomycin 10 มิลลิลิตร, Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) 0.74 กรัม นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร และนำมากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน

8. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Non-Supplement-DMEM

ประกอบด้วย

Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)	13.4	กรัม
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)	0.74	กรัม

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป DMEM 13.4 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อละลายอาหารนั้น นำไปกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) 0.74 กรัม นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร และนำมากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน

9. เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO

ชั่งสาร MTT จำนวน 2.5 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นกวนให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง

10. เตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ทำการเตรียมเจลที่ใช้สำหรับทำ electrophoresis โดยชั่งผงวุ้นอะกาโรส 1.5 กรัม ละลายใน TAE buffer ความเข้มข้นเท่ากับ 1X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลาย

11. เตรียมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ผสมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

12. เตรียม TAE buffer ความเข้มข้น 1X

เตรียม TAE buffer ความเข้มข้น 1X จาก TAE buffer ความเข้มข้น 50X ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

TAE buffer ความเข้มข้น 50X มีส่วนประกอบ ดังนี้

Tris base	242	กรัม
-----------	-----	------

Gracial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8)	100	มิลลิลิตร

$$\begin{aligned}
 C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\
 1 \times 500 &= 50 \times V_2 \\
 V_2 &= 10
 \end{aligned}$$

ดังนั้นเปิด TAE buffer ความเข้มข้น 50X ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

13. เตรียม TE buffer (pH 7.5)

ประกอบด้วย

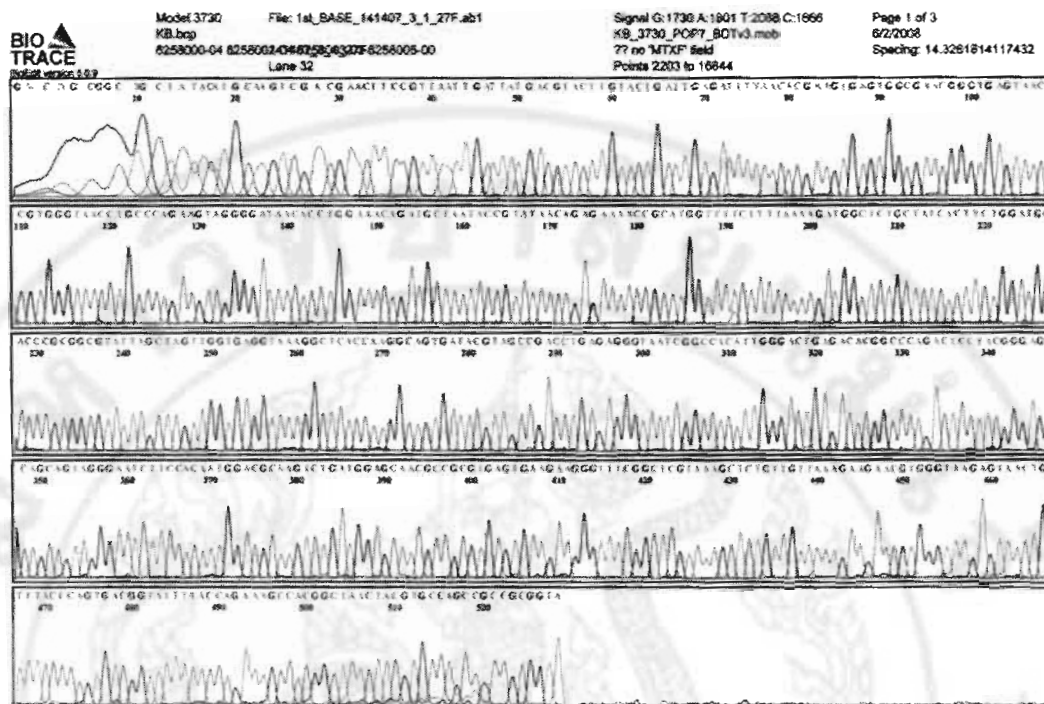
Tris abse	10	mM
EDTA	1	mM

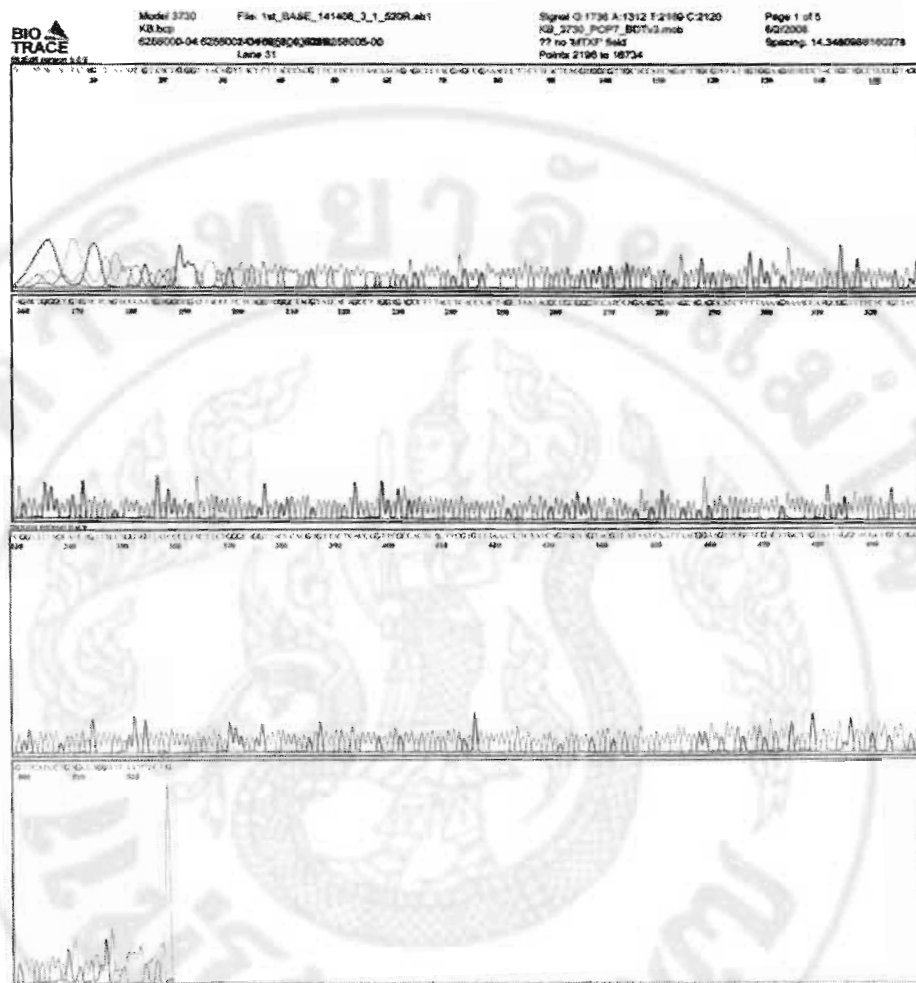
ชั่ง Tris base จำนวน 0.12 กรัมและ EDTA จำนวน 0.0372 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค

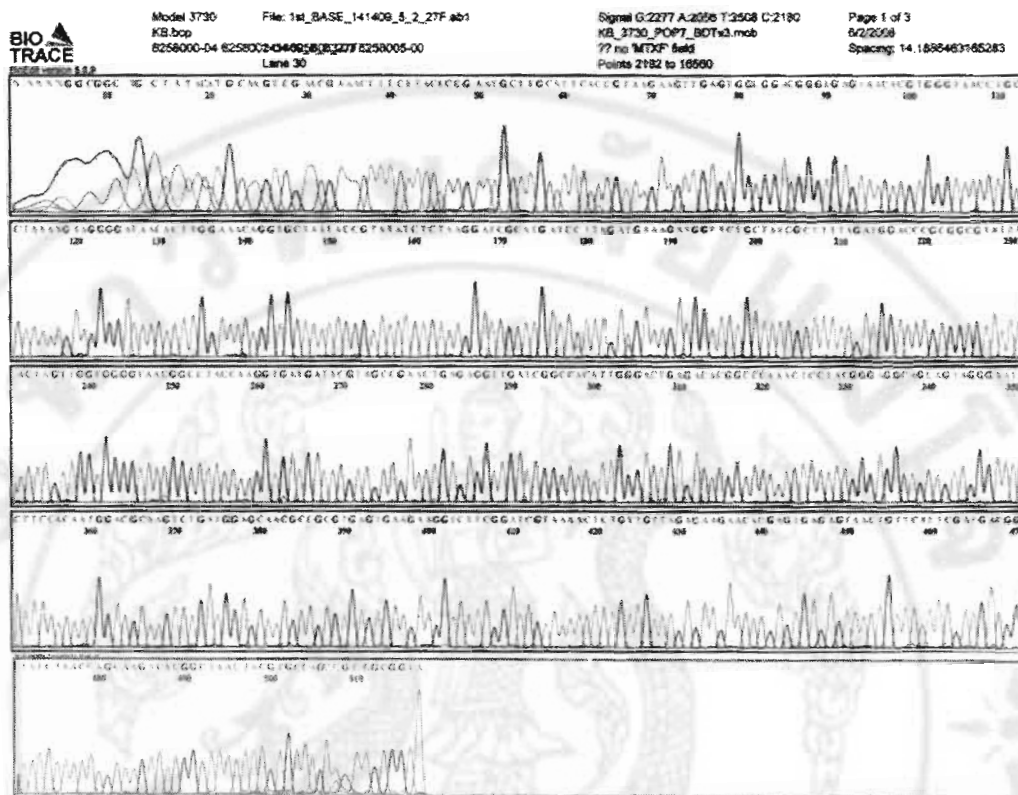
ลำดับเบสของ DNA ในส่วน 16S rRNA



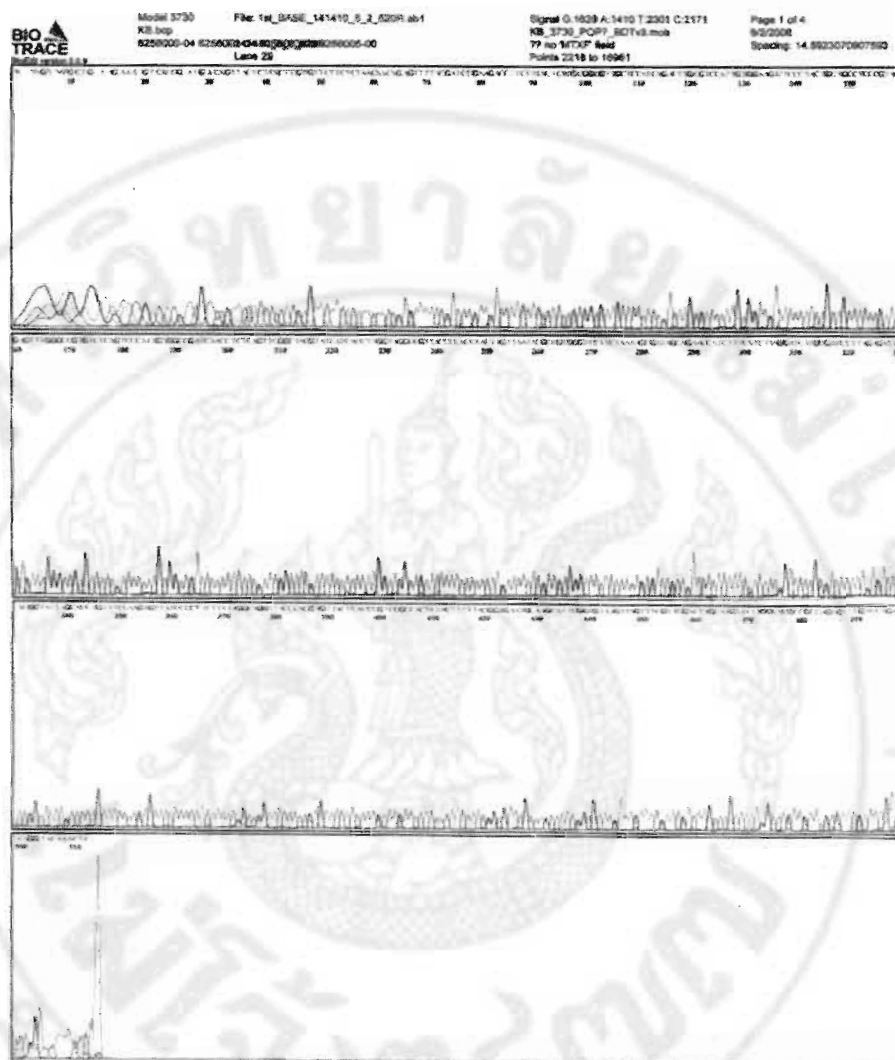


5'NNNNATCGGTATACCGTCACTGGGTAACAGTTACTCTTACCCACGTTCTTCTTTAA
 CAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGA
 CTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGT
 CTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCACTGCCTTGGTG
 AGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAGAAGTGATAGCAG
 AGCCATCTTTTAAAAGAAAACCATGCGGTTTTCTCTGTTATACGGTATTAGCATCTGT
 TTCCAGGTGTTATCCCCTACTTCTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGC
 CACTCACTTCGTGTTAAAATCTCAATCAGTACAAGTACGTCATAATCAATTAACGGA
 AGTTCGTTTCGACTTGATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATC
 AAACCTCTG3'

ภาพภาคผนวก 2 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต MC31 ที่ได้จาก primer

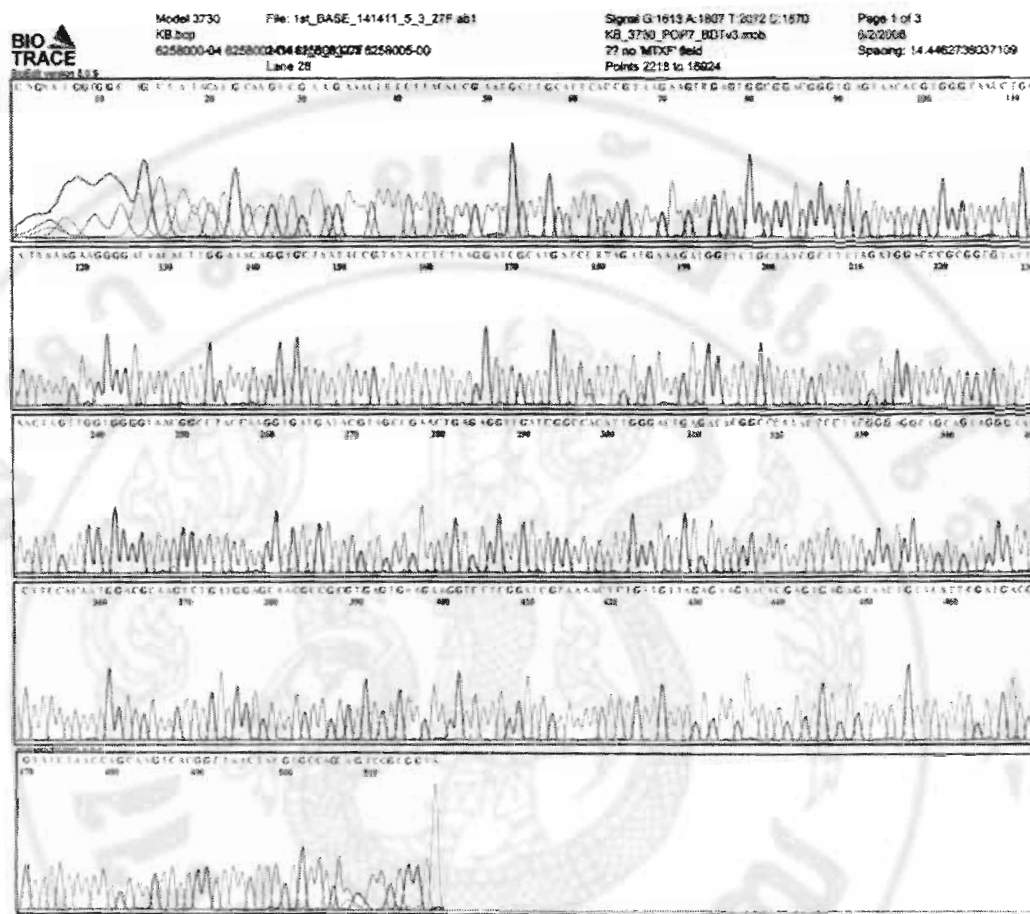


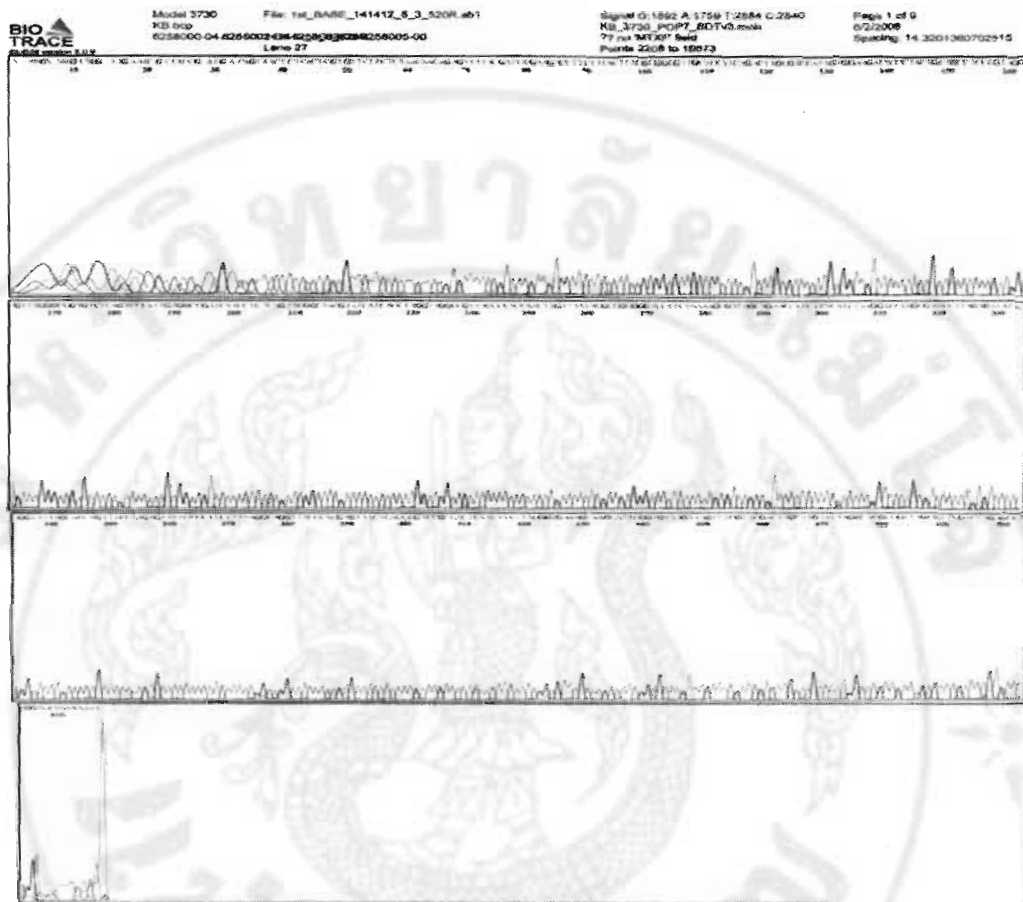
5'NNNNNGGCGGCTGCTATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTT
GCATTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
TAAAAGAAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATC
GCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTA
TTAAGTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAG
GATTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACT
GTTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCCGGC
GGTAA3'



5'NNNNGNNATGCTGCAGAACGTCATCGATGACAGTACTCTCACTCGTGTTCCTTCTC
 AACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCA
 GACTTGCCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGT
 GTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGG
 TAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATAGC
 AGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGTATTAGCACC
 GTTTCOAAGTGTTATCCCCTTCTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
 GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCCGGTGTAAAGAAAGTTTCGTTTCGACT
 TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGTACAAACTC3'

ภาพภาคผนวก 4 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC52 ที่ได้จาก primer

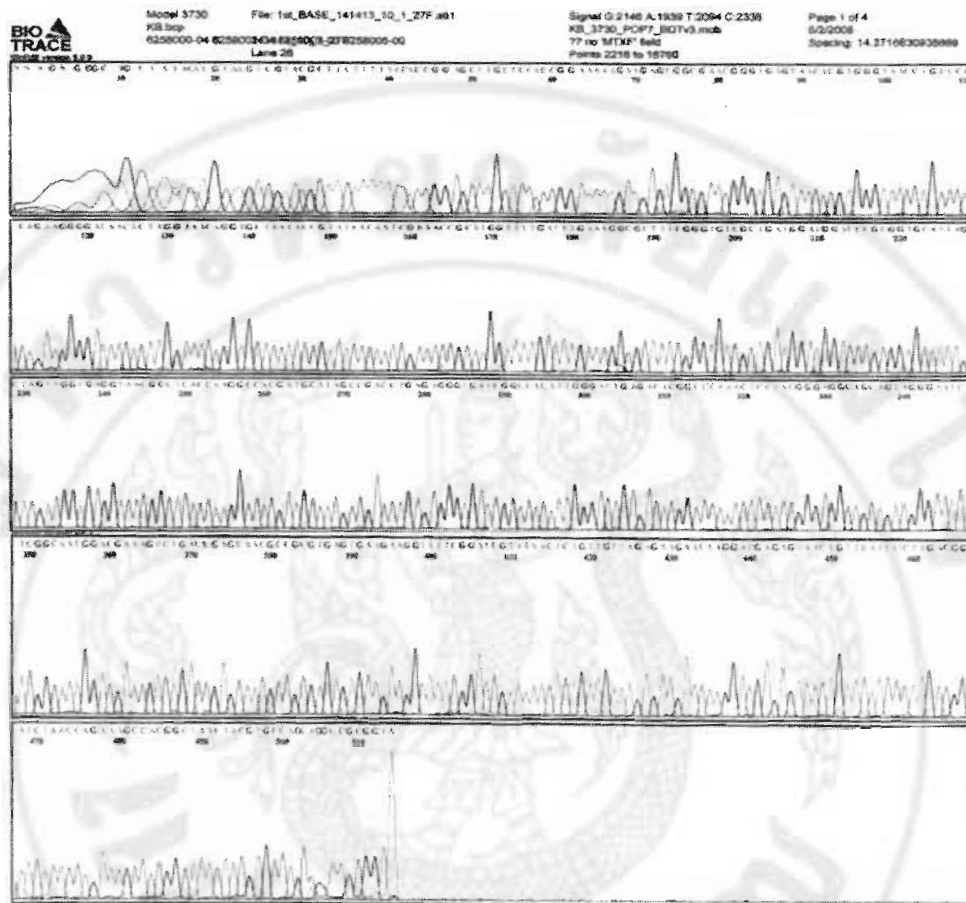




5'NNNNGNNATGCTGGTAGAACCGTCATCGATGACAGTTACTCTCACTCGTGTTCTTC
TCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCAT
CAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCC
GTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTT
GGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
GCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGTATTAGCA
CCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGT
CCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTCG
CTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGTAACAAAACAAAA
3'

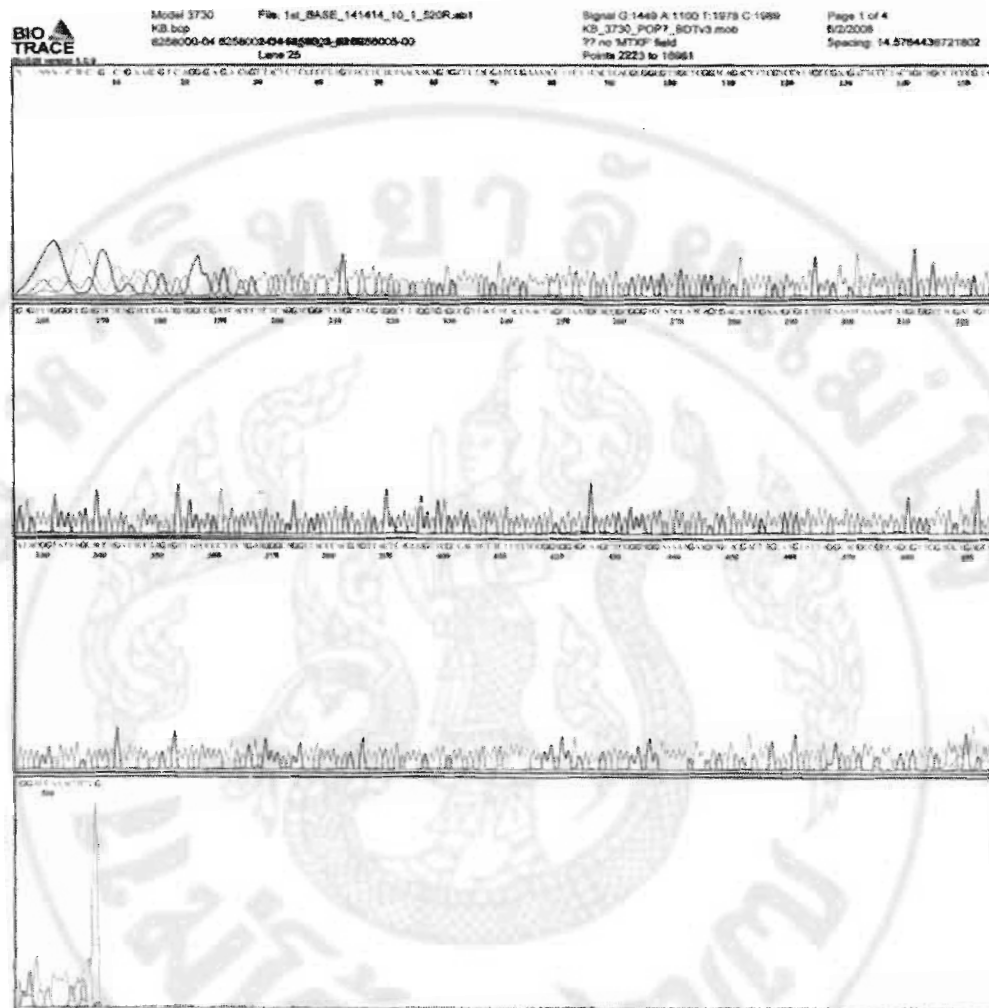
ภาพภาคผนวก 6 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC53 ที่ได้จาก primer

520R



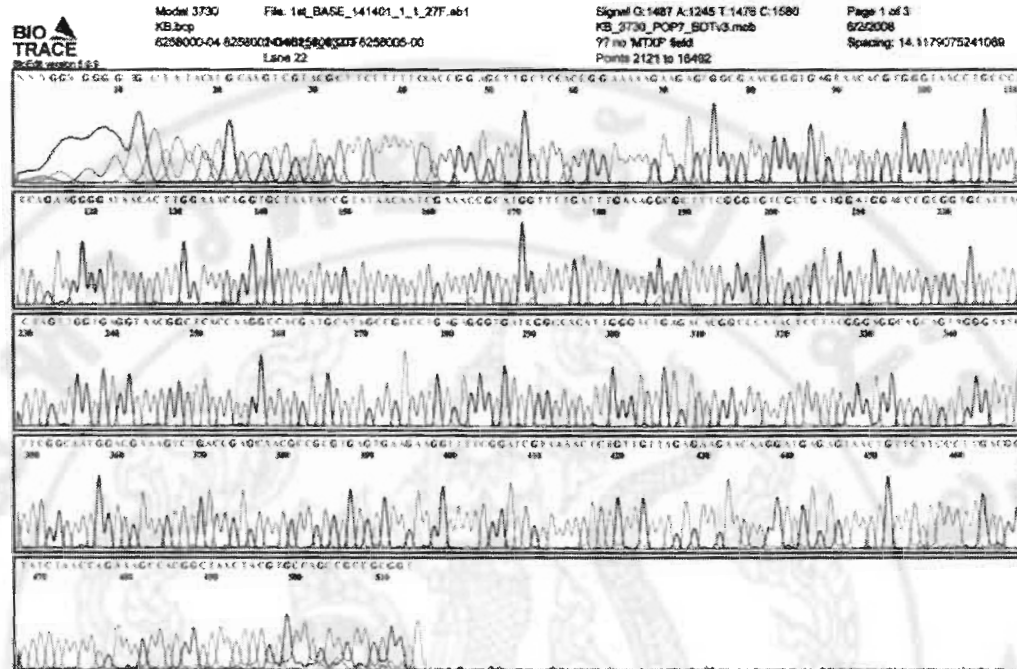
5'NNNGNGGGCTGCTATACATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCC
 ACCGGA AAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA
 GAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCAT
 GGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG
 GTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
 AGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGT
 TCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGGCCG
 CGGTA3'

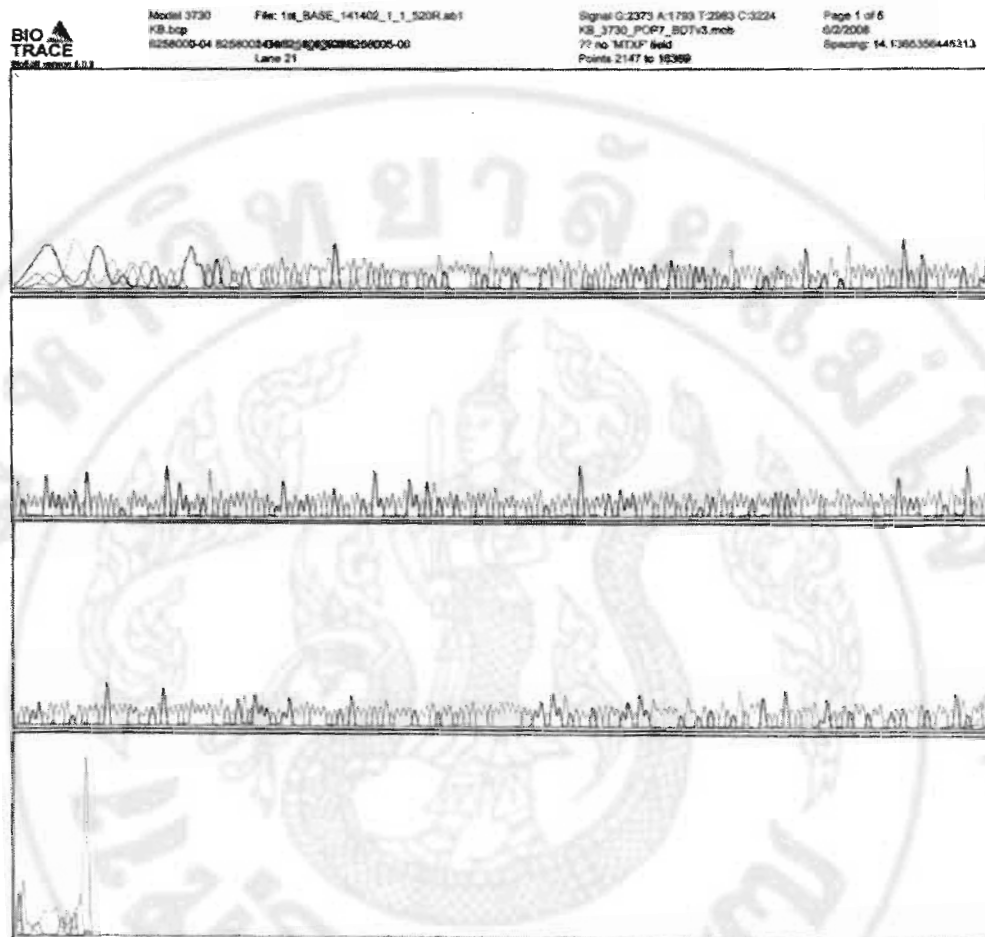
ภาพภาคผนวก 7 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลต MC101 ที่ได้จาก primer



5'NNNNCTTCGCAGAACCGTCAGGGAGACAGTTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAAACCATGCGGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTG3'

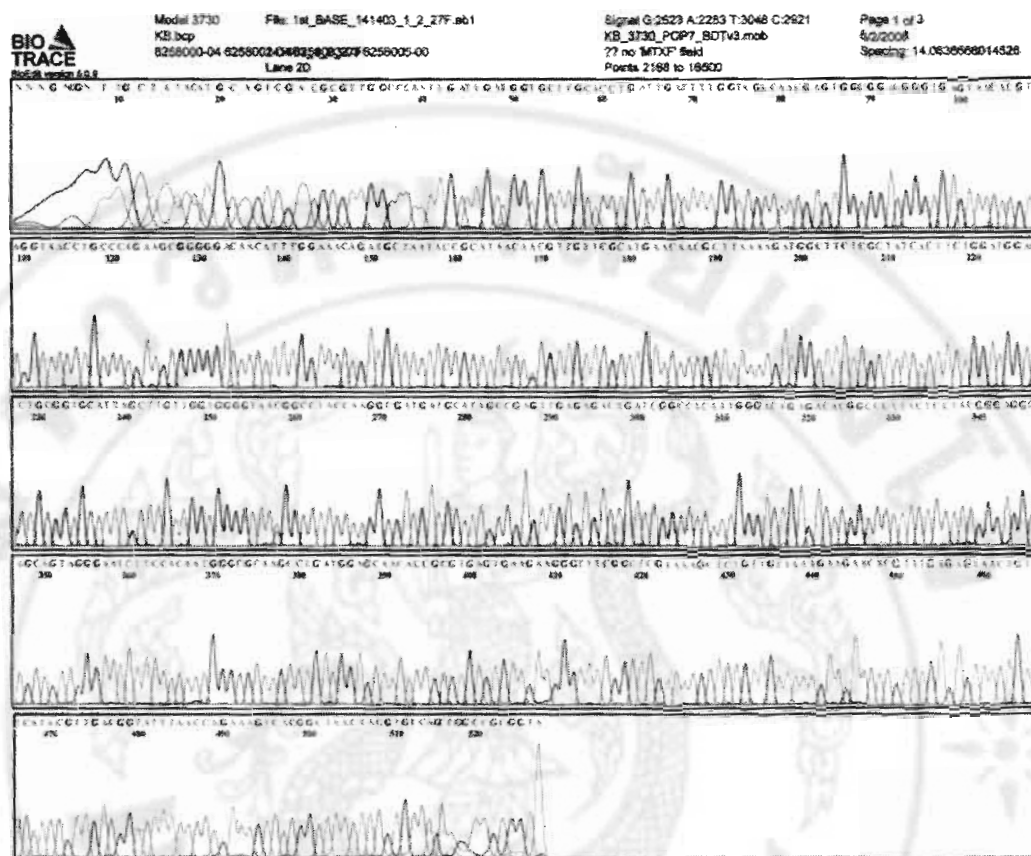
ภาพภาคผนวก 8 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MC101 ที่ได้จาก primer





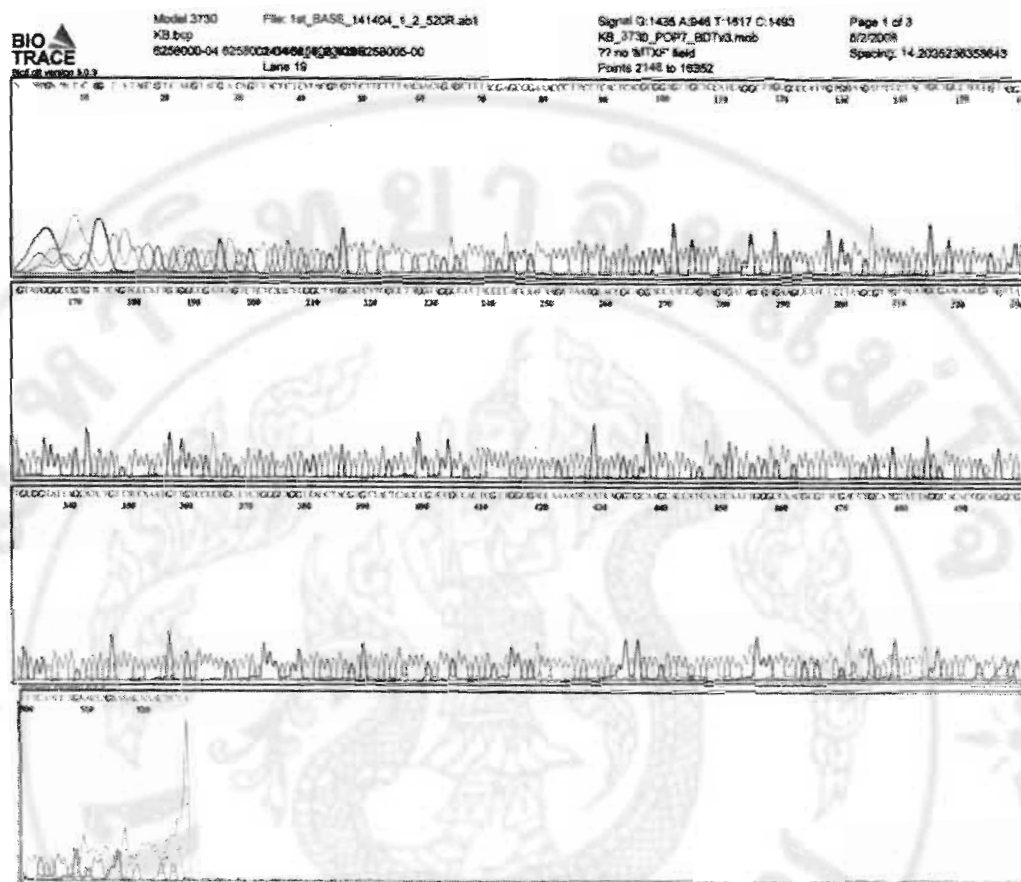
5'NNNNNNNTCGGTAGAACGTCAGGGAGACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAA
 CAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGA
 CTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGT
 CTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTG
 AGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCG
 AAAGCGCCTTTCAAATCAAAACCATGCGGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTG
 TTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTTCG
 CCACTCTTCTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGGAAAAAGAAGCGTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGTCCAAACTCTGA3'

ภาพภาคผนวก 10 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโอโซเลต RM11 ที่ได้จาก primer



5'NNNGNCGNTTGCTATAACATGCAGTCGACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTT
 GCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTA
 ACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA
 CGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGAC
 CTGCGGTGCATTAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGC
 CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGC
 GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTAAAGAAGAACACGTATG
 AGAGTAACTGTTTACATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCCGGCCGCGGTA3'

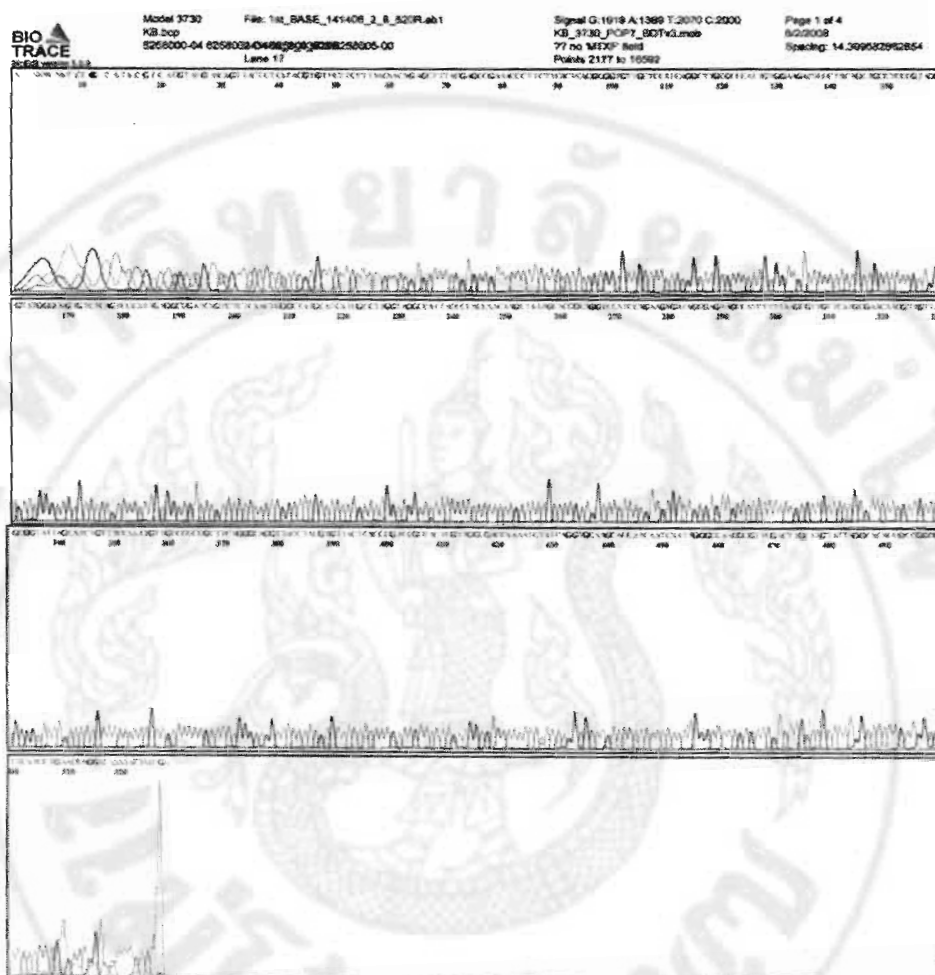
ภาพภาคผนวก 11 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM12 ที่ได้จาก primer



5'NNNNGNNNTCGGTATACCGTCACGTATGACAGTTACTCTCATACGTGTTCTTCTTTA
 ACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAG
 GCTTGCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTG
 TCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGT
 AGGCCATTACCCACCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCG
 AGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGTTGTTATGCGGTATTAGCATC
 TGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTC
 CGCCACTCGTTGGCGACCAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCC
 AACGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAACCAGAAA
 ACAAACTCTA3'

ภาพภาคผนวก 12 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM12 ที่ได้จาก primer

ภาพภาคผนวก 13 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไฮโซเลต RM28 ที่ได้จาก primer



5'NNNNNNATCTGGTATACGTCACGTATGAACAGTTACTCTCATACGTGTTCTTCTTTA
 ACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAG
 GCTTGCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTG
 TCTCAGTCCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGT
 AGGCCATTACCCACCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCG
 AGAAGCCATCTTTTAAGCGTTGTTTCATGCGAACAACGTTGTTATGCGGTATTAGCATC
 TGTTTCCAAATGTTGTCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTC
 CGCCACTCGTTGGCGACCAAAATCTATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCC
 AACGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGCGGCTTCATCCTGAACCAGGAT
 AAAAATAATGA3'

ภาพภาคผนวก 14 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RM28 ที่ได้จาก primer



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวผ่องพรรณ	บุญประสม
เกิดเมื่อ	20 ธันวาคม 2526	
สถานที่เกิด	จังหวัดปทุมธานี	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษา โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2548	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2551	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการฝึกงาน	พ.ศ. 2547	นักศึกษาฝึกงาน บริษัทไทยออยล์ จำกัด (มหาชน) จังหวัดชลบุรี
ผลงานทางวิชาการ	พ.ศ. 2549	การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมักเสริมโปร ไบโอติกแบคทีเรีย การประชุมวิชาการครั้งที่ 7 (ภาคบรรยาย) มหาวิทยาลัยแม่โจ้
	พ.ศ. 2551	การศึกษาคุณสมบัติของ <i>Lactobacillus fermentum</i> CFM12 เพื่อประยุกต์ใช้เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 1 (ภาคบรรยาย) มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่
	พ.ศ. 2551	การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของ โปรไบโอติก แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยแม่โจ้