วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3 เล่ม 2 (65-72)

การตรวจหาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในแหนมเนื้อโค ด้วยวิธีพีซีอาร์อาร์เอพีดี

Detection of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter culture in beef Nham by PCR-RAPD technique

สุกัญญา วาวงค์[1,2] คมแข พิลาสมบัติ[3] นวลพรรณ งามยี่สุ่น[4] และอดิศร เสวตวิวัฒน์[5]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมลงในแหนมเนื้อโค ซึ่งหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน คัดแยกแบคทีเรีย กรดแลกติกจากตัวอย่างแหนมที่ใส่กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จำนวน 60 ไอโซเลท จากนั้นจำแนกชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้โดยการวิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์อาร์เอพีดี (PCR-RAPD) ผลการศึกษาพบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกได้จากกระบวนการหมักแหนมวันที่ 2 และ 3 มีความคล้ายคลึงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 คือ มีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสามขนาด โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 bp, 750 bp และ 1200 bp เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* พบว่ามีชิ้นยีน *pediocin PA-1* ที่มีขนาด 300 bp เกิดขึ้น และเมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่ามีความเหมือนกับ *P. pentosaceus* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จึงกล่าวได้ว่า กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถมีชีวิตรอดในแหนม จนถึงวันที่สามของการหมัก

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลกติก, กล้าเชื้อ, พีซีอาร์อาร์เอพีดี

Abstract

The objective of this study was to detect starter culture growth of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 during fermentation process of beef Nham, product was incubated for 3 days at 30°C. A total of 60 lactic acid bacteria isolates were collected from Nham during fermented process. These colonies were further characterized for *P. pentosaceus* TISTR 536 fingerprint by PCR-RAPD technique. The results showed 3 distinct DNA bands of 700 bp, 750 bp and 1200 bp which were corresponding to DNA fingerprint of the starter culture. Moreover, a bacteriocin gene, *pediocin PA-1*, was also detected by PCR with product of 300 bp. Nucleotides sequence of the isolates were analysed and identified as 99 % homology with *P. pentosaceus*. Therefore, *P. pentosaceus* TISTR 536 can be survive until the third day of Nham fermentation process.

Keywords: Lactic acid bacteria, starter culture, PCR-RAPD

[1]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE)

[3]สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[4]สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[5]สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อที่ได้รับความนิยมในประเทศไทย ซึ่งหมักโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ การหมักแหนมตามสภาพธรรมชาติ (natural fermentation) เป็นการหมักโดยอาศัยอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม และแบคทีเรียกรดแลกติกตามธรรมชาติ ซึ่งมักได้ผลผลิตที่มีลักษณะไม่คงที่ และไม่สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบมักมีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากแหล่งต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อกระบวนการหมักของแหนม ส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนม ดังนั้นการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมสามารถทำได้โดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เข้ามาช่วยในกระบวนการผลิต โดยในการทดลองครั้งนี้ได้นำกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่คัดแยกได้จากแหนมมาใช้ โดยเชื้อดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* (Swetwiwathana *et al.,* 2002) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย และเชื้อก่อโรค เช่น *Listeria monocytogenes* เป็นต้น (Swetwiwathana, 2005) นอกจากนี้เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ยังมีคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกโดยมีความสามารถทนความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 2 ขึ้นไป มีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารจำลองโดยสามารถทนเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (Swetwiwathana *et al.,* 2009) ดังนั้นจึงได้นำเชื้อดังกล่าวมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม การนำเชื้อดังกล่าวมาเป็นกล้าเชื้อจำเป็นจะต้องตรวจสอบว่า เชื้อนั้นสามารถมีชีวิตรอดในกระบวนการหมักแหนมได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD) ซึ่งเป็นวิธีทางชีวโมเลกุลที่มีความน่าเชื่อถือ มีความถูกต้องและ แม่นยำ โดยการใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆ เพียงชนิดเดียว ประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดๆ แบบลูกโซ่โดยการจับแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2552) เป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงออกจากกันได้ ดังนั้นการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้จะช่วยทำให้ทราบบทบาทและการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักแหนม ซึ่งจะทำให้เข้าใจในกระบวนการหมัก และสามารถควบคุมกระบวนการผลิตให้เป็นไปตามความต้องการได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการนำเทคนิควิธี PCR-RAPD มาใช้ในการตรวจสอบการอยู่รอดของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในแหนมเนื้อโค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างแหนม

เตรียมแหนมน้ำหนัก 6 กิโลกรัม ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้คือ เนื้อโคบด 5 กิโลกรัม ข้าวสุก 400 กรัม กระเทียมสด 400 กรัม ผงเพรก (โซเดียมไนไตรท์ 0.5%) 110 กรัม ฟอสเฟต 20 กรัม น้ำตาลทราย 20 กรัม และ โมโนโซเดียม กลูตาเมท 10 กรัม ผสมส่วนผสมทั้งหมดแล้วนวด เป็นเวลา 10 นาทีจนส่วนผสมเหนียวจึงใส่กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จำนวน 10^6 cfu/g ที่เตรียมไว้อัดแหนมลงไส้พลาสติกแท่งมัดปลายทั้งสองด้านด้วยเครื่องมัดไส้กรอก (Max, Japan)

2. การเตรียมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

ถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลว MRS broth (Merck, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง (Swetwiwathana, 2005)

3. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหนม (Pilasombut, 2009)

โดยการนำตัวอย่างแหนม 25 กรัม มาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมนำไป spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน สุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี โดยสุ่มจำนวน 20 โคโลนีต่อวัน จากนั้นนำมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการ streak plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น stock culture ในกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นสุดท้าย 15 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. การตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลกติกโดยเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอพีดี

โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-3 (5'-AGTCAGCCAC-3') (Oneca *et al*., 2003) ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย กรดแลกติกเข้าจับแบบสุ่ม ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 10x PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 10 µM Primer OPA – 3, 5U/µl Taq DNA polymerase โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1x 2 mM 400 µM 0.4 µM และ 0.1 µM ตามลำดับ น้ำกลั่นปริมาณ 18 ไมโครลิตร และ Colony template ปริมาณรวม 25 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตามด้วยรอบของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 45 รอบ และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บผลผลิต (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล (Vivantis, Malaysia) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

5. การสกัดดีเอ็นเอ

ดัดแปลงจากวิธีของ Carolissen-Mackay *et al*. (1997) โดยนำเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยง แล้วเติมสารละลาย A (TE buffer, เปอร์เซ็นต์ 6.7) แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme (Sigma, U.S.A) ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม SDS ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ RNase (Fermentas, U.S.A) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol: chloroform (1: 1) (Merk, Germany) และตกตะกอนดีเอ็นเอในส่วนใสด้วย isopropanol (Invitrogen, U.S.A) ปริมาณ 2 เท่าของปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำให้แห้งและละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

6. การตรวจสอบยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1*

โดยใช้ไพรเมอร์ Pedi_1F (5'-GAGTGGGAACTAGAATAAGCGCGTA-3') และ Pedi_1R (5'-TTACTCTTA TTCATAAAATCACCCC-3') (Swetwiwathana, 2005) ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างสาร แบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีดังนี้ 10X PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 10 µM Primer Pedi_1F และ Pedi_1R และ 5U/µl Taq DNA polymerase โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1x, 2 mM, 400 µM, 0.4 µM และ 0.05 µM ตามลำดับ, น้ำกลั่นปริมาณ 16.25 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณรวม 25 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และตามด้วยรอบของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

7. การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA

7.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ นำไอโซเลทเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA ที่มีขนาด 1,500 bp จากดีเอ็นเอของไอโซเลทที่พบชิ้นยีน แบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* ที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย BSF8/20 (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') และREVB(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Kanokratana *et al*., 2004) ซึ่งเป็น universal primer ของแบคทีเรีย โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที จำนวน 35 รอบ คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์เช่นเดียวกับการสกัดดีเอ็นเอ

8. การถ่ายทอดยีน 16S rDNA และตรวจสอบโคลนที่ได้

เมื่อตรวจสอบพบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการแล้ว ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Favor Prep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) นำดีเอ็นเอที่แยกออกจากเจล เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas, U.S.A.) นำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α ที่มีสภาพเป็นคอมพีเทนต์เซลล์โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) (Sambrook *et al*., 2001) ตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค Blue – White screening โดยคัดเลือกโคลนจากการแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงในลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และเปลี่ยนสีของโคโลนีจากการย่อยซับสเตรท X – Gal (Vivantis, Malaysia) นำโคลนที่คัดเลือกได้มาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดแยก พลาสมิดสำเร็จรูป FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan) ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *XbaI* (Vivantis, Malaysia) และ *BamHI* (Vivantis, Malaysia) ที่จะแยกเฉพาะส่วนของยีนออกมา นำโคลนที่มีขนาดยีนสอดแทรกที่ถูกต้อง ไปตรวจสอบส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลกติกโดยเทคนิคพีซีอาร์อาร์เอพีดี

จากการสุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหนมที่ผ่านกระบวนการหมัก 3 วัน ทำการสุ่มมาทั้งหมด 60 โคโลนี โดยสุ่มวันละ 20 โคโลนี และใช้ไพรเมอร์ OPA-3 ในการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมเข้าไปในแหนม ผลการทดลองพบว่าในวันแรกของกระบวนการหมักไม่พบไอโซเลทใดที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *P. pentosaceus* TISTR 536 จากทั้งหมด 20 โคโลนี แต่พบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอโซเลทที่ได้จากกระบวนการหมักแหนมวันที่ 2 จำนวน 10 โคโลนีจากทั้งหมด 20 โคโลนี (ไอโซเลท 21-40) (Figure 1(B)) และวันที่ 3 จำนวน 11 โคโลนีจากทั้งหมด 20 โคโลนี (ไอโซเลท 41-60) (Figure 1(C)) คล้ายคลึงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จึงคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเกิดขึ้นสามแถบ ได้แก่แถบขนาดประมาณ 700 bp, 750 bp และประมาณ 1200 bp จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในกระบวนการหมักวันแรก เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่ากล้าเชื้อที่เติมเข้าไปยังไม่เจริญ หรือมีจำนวนไม่มากพอ และอาจสุ่มโคโลนีไม่ทั่วถึง จึงสุ่มตรวจไม่พบ อย่างไรก็ตามการศึกษาต่อไปจะต้องทำการยืนยันชนิดของเชื้อที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเหมือนกันกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากแหนมของ Kunawasen (2000) พบเชื้อ *P. pentosaceus* เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก 84 ชั่วโมง และ Varnam and Sutherland (1995) พบ *Pediococcus* ในช่วงสุดท้ายของกระบวนการหมักตามธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

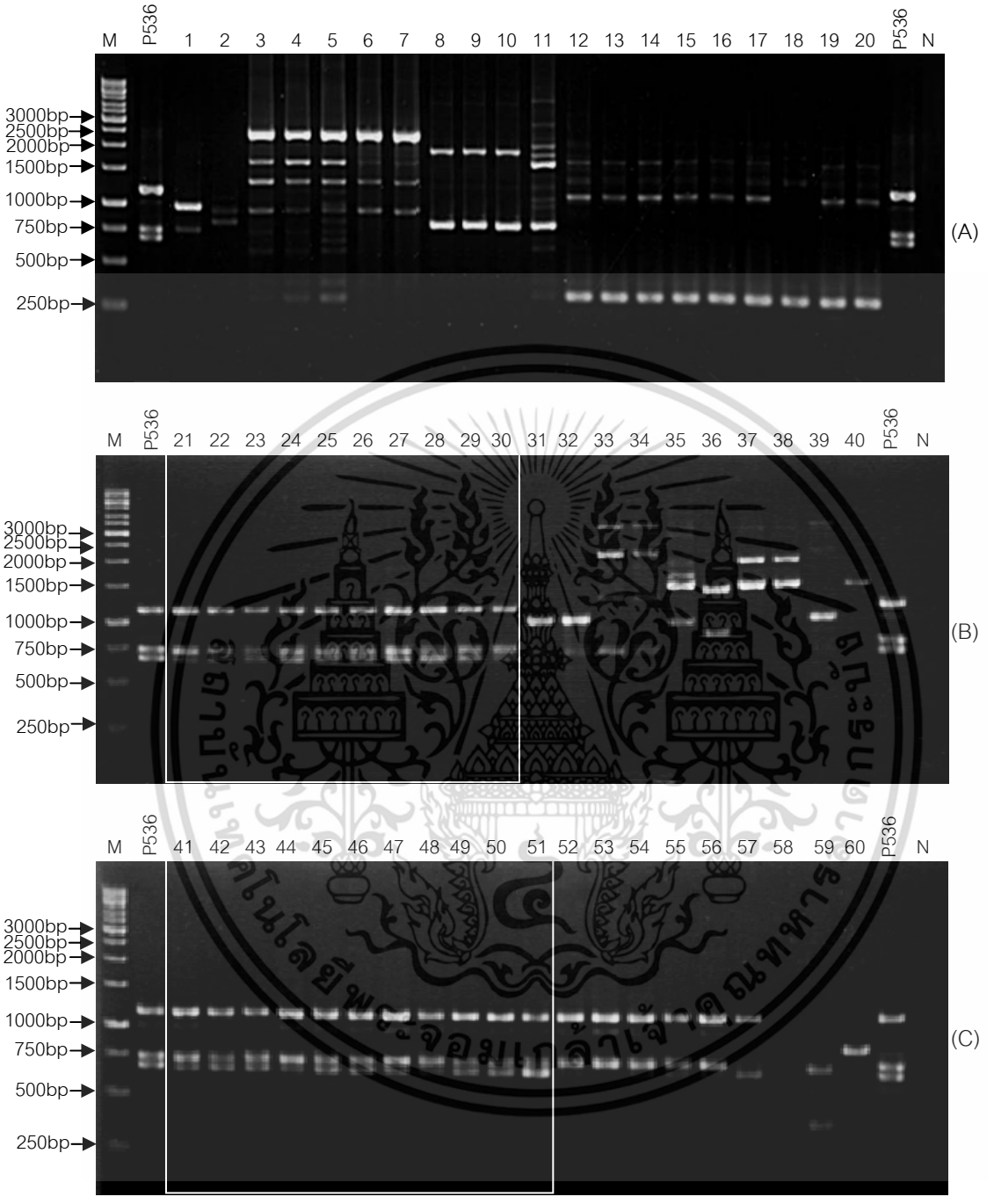

Figure 1 DNA fingerprint of amplified single colony of Nham inoculated with *P. pentosaceus* TISTR 536 using OPA-03 primer at day 1-3 of fermentation process. Lane M = DNA standard 1 kb Ladder; P536 = DNA fingerprint of *P. pentosaceus* TISTR 536; (A) lane 1-20 = DNA fingerprint of single colony at day 1 of fermentation; (B) lane 21-40 = DNA fingerprint of single colony at day 2 of fermentation; (C) lane 41-60 = DNA fingerprint of single colony at day 3 of fermentation; N = Negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การตรวจสอบยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1*

สุ่มเชื้อไอโซเลท 21-24 (Figure 1(B)) และ 41-44 (Figure 1(C)) มาตรวจสอบยีนแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* ที่สร้างโดย *P. pentosaceus* TISTR 536 เพื่อยืนยันว่าไอโซเลทดังกล่าวน่าจะเป็นกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมเข้าไปในแหนม ผลการทดลองพบว่า จากการใช้ไพรเมอร์ Pedi_1F และ Pedi_1R ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน *pediocin PA-1* พบชิ้นยีนมีขนาด 300 bp ซึ่งสอดคล้องกับ Swetwiwathana (2005) ได้ใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันนี้สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน *pediocin PA-1* จากเชื้อ *P. pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 536 พบว่ายีนมีขนาด 300 bp (Figure 2)

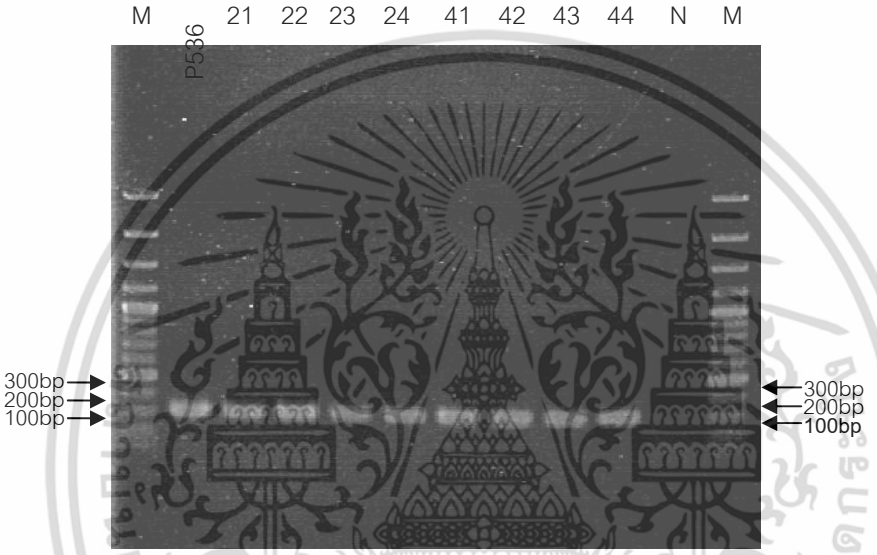

Figure 2 Showing the DNA product of *P. pentosaceus* TISTR 536 after PCR reaction, using specific primer Pedi_1F and Pedi_1R to amplify *pediocin PA-1* gene. Lane M = DNA standard 100 bp Ladder; P536 = *pediocin PA-1* gene of *P. pentosaceus* TISTR 536; lane 21-24 = *pediocin PA-1* gene isolated at day 2 of fermentation; lane 41-44 = *pediocin PA-1* gene isolated at day 3 of fermentation, lane N = Negative control

3. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

จากการสุ่มไอโซเลทที่ 21 และ 41 (จาก Figure 1) เพื่อนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ ความเหมือนกับสายพันธุ์ *P. pentosaceus* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (Accession No. AB481102.1 วันที่ 9/01/54) (Figure 3)

ในกระบวนการหมักแหนมวันที่ 2 และ 3 นั้น พบไอโซเลทที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่มีชิ้นยีน *pediocin PA-1* จำนวน 10 และ 11 ไอโซเลทจากจำนวนเชื้อเริ่มต้นทั้งหมด 1.45×10^7 cfu/g และ 1.38×10^7 cfu/g ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแบ่งเพลทอาหารเป็น 6 ส่วน ส่วนละ 20 โคโลนีโดยประมาณ ดังนั้นกล่าวได้ว่า สามารถพบการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในกระบวนการหมักวันที่ 2 ได้ 6×10^6 cfu/g หรือ 41.37 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเชื้อทั้งหมดในกระบวนการหมักวันที่ 2 และในกระบวนการหมักวันที่ 3 ได้ 6.6×10^6 cfu/g หรือ 47.82 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเชื้อทั้งหมดในกระบวนการหมักวันที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

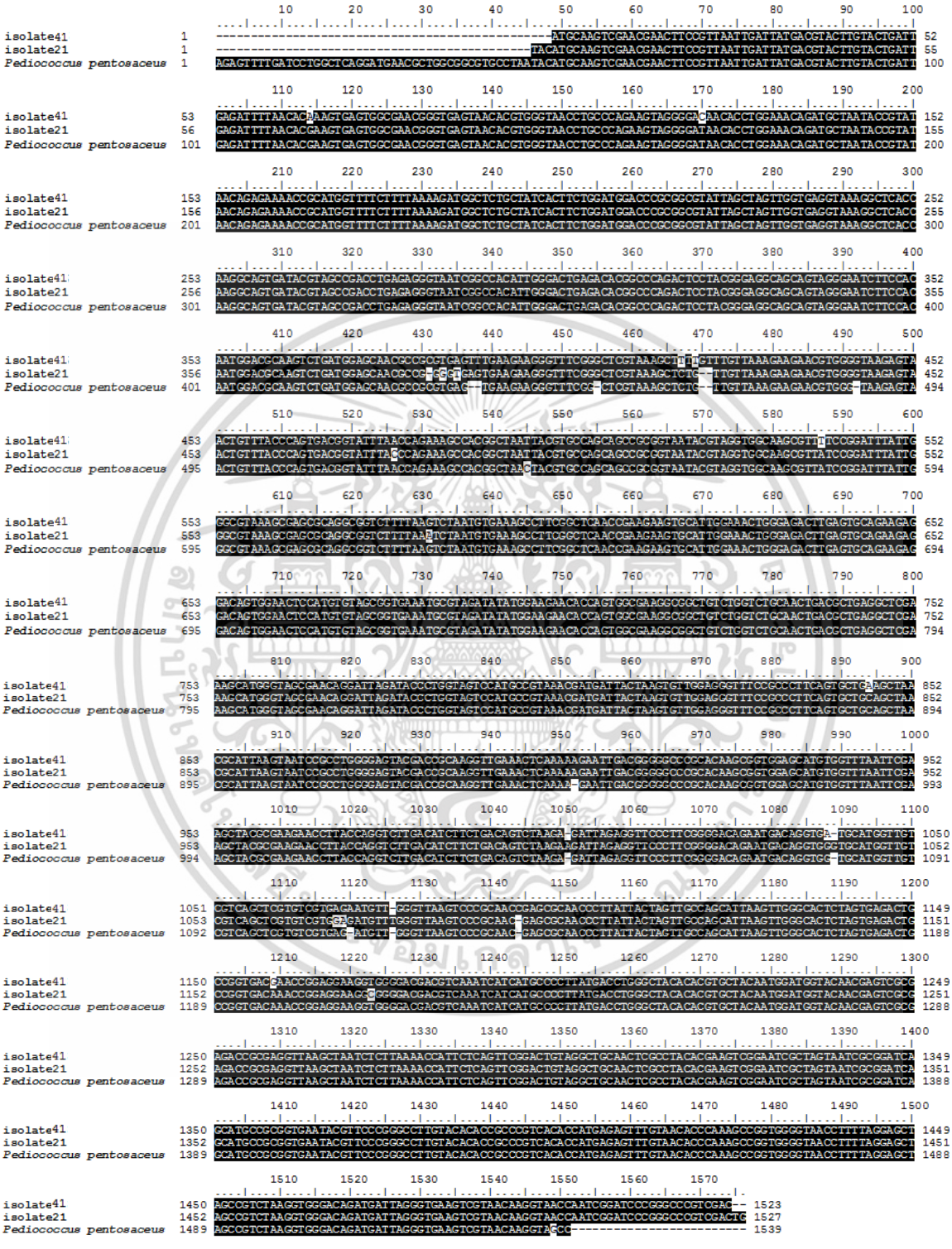

Figure 3 Neucleotide alignment sequence of isolate 21 and 41. A black background indicates neucleotide conserved residues. (Accession No. AB481102.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในกระบวนการหมักแหนมนั้น ตรวจพบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในวันที่ 2 และ 3 ของกระบวนการหมักแหนม ในขณะเดียวกันไอโซเลทดังกล่าวยังตรวจพบยีน *pediocin PA-1* ที่สร้างโดยกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 แสดงให้เห็นว่า เชื้อสามารถมีชีวิตรอดในระหว่างกระบวนการหมักไปจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักแหนมเนื้อโค ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมเนื้อโคได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์โดยความร่วมมือของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังร่วมกับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Carolissen-Mackay, V., G. Arendse and J.W. Hasting. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. Int. J. Food Microbiol. 34: 1-16. .

Oneca, M., A. Irigoyen, M. Ortigosa and P. Torre. 2003. PCR and RAPD identification of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. FEMS. Microbiol. Letters. 227: 271-277.

Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit and L. Eurwililaichitr. 2004. Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. J. Basic Microbiol. 44: 430-444.

Kunawasen, S. 2000. Molecular Typing of Lactic acid Bacteria Isolated During Nham Fermentation. Bangkok: Mahidol University.

Pilasombut, K., A.Swetwiwathana, R. Sitthigripong and J. Sethakul. 2009. Screening of bacteriocin-like inhibitory substance from lactic acid bacteria for fermented meat starter culture. Paper presented at 55th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). August, 2009. Copenhagen, Denmark.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.

Swetwiwathana, A., T. Zendo, N. Lotong, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2002. Characterization and identification of thermotolerant pediocin – producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) isolated from nham. (Thai fermented meat). Absract : The 3rd JSPSRIRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. 17-21 November 2002. Chiang Mai, Thailand. 45.

Swetwiwathana, A. 2005. Microbiological Quality Enhancement of Thai Fermented Meat Product (Nham) Using Nham-associated Pediocin Producing Lactic Acid Bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536). Philosophy Degree Thesis. Japan: Kyushu University.

Swetwiwathana, A., K. Pilasombut and J. Sethakul. 2009. An *in-vitro* screening of isolated bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Thai fermented meat for probiotic prospect. In the 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. August 26 - 28, 2009. Khon Kean, Thailand.

Varnam, A.H. and J. P. Sutherland. 1995. Meat and Meat Product. Chapman and Hall, London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้