การใช้เทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์ตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกบางชนิดในโยเกิร์ต

Using Duplex Polymerase Chain Reaction Technique for Detection of Some Lactic Acid Bacteria in Yoghurt

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

หทัยรัตน์ แสงด้วง และ ธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

เทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์แบบไม่สกัดแยกดีเอ็นเอได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในโยเกิร์ต โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* ผลการวิจัยพบว่าเทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความจำเพาะต่อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* สูงและมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวในโยเกิร์ต 10^4 เซลล์/กรัม

คำสำคัญ: ดูเพล็กซ์พีซีอาร์ แบคทีเรียแลคติก โยเกิร์ต

Abstract

Duplex polymerase chain reaction (dPCR) technique without DNA extraction has been developed to detect *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in yoghurt. Two primer pairs were designed for amplified DNA fragments of *16S rDNA*. The results showed that the new method of duplex PCR technique in this study was specific to *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* with the sensitivity at 10^4 cells/g.

Keywords: duplex PCR, lactic acid bacteria, yoghurt

1. บทนำ

นมเปรี้ยว (fermented milk) คือผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid) เป็นหลัก โดยมีจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักมีชีวิตเหลืออยู่หรือไม่ก็ได้ ซึ่งมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 2146-2546 ที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121 ตอนที่ 29ง วันที่ 8 เมษายน 2547 [1] ได้กำหนดนมเปรี้ยวเป็น 5 ประเภท คือ (1) โยเกิร์ต (yoghurt) (2) โยเกิร์ตปรุงแต่ง (flavored yoghurt) ซึ่งปรุงแต่งกลิ่น รส สี หรือผสมวัตถุอื่นที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ (3) นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (drinking yoghourt) ซึ่งเจือจางและปรุงแต่งกลิ่น รส สี หรือผสมวัตถุอื่นที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ (4) นมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ (pasteurized drinking yoghourt) ซึ่งทำลายจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการพาสเจอไรซ์และมีจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักมีชีวิตเหลืออยู่จำนวนหนึ่ง และ (5) นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยูเอชที (UHT drinking yoghourt) ซึ่งทำลายจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการยูเอชที (ultra-heat treatment)

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตนมเปรี้ยวส่วนใหญ่คือแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) ได้แก่ *Lactobacillus*, *Streptococcus, Bifidobacterium, Sporolactobacillus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* แบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างกรดแลคติกจากการย่อยน้ำตาลแลคโตสที่มีอยู่ในน้ำนม ปัจจุบันมีผู้นิยมบริโภคนมเปรี้ยวอย่างแพร่หลาย ฉะนั้นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและประโยชน์ต่อผู้บริโภคเป็นสำคัญ โดยสำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม [1] ได้กำหนดคุณลักษณะทางเคมีและทางจุลชีววิทยาของโยเกิร์ตว่าต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 3.0 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด (คำนวณเป็นกรดแลคติก) ไม่น้อยกว่า 0.6 เปอร์เซ็นต์ และจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทำให้เกิดกรดไม่น้อยกว่า 10^7 โคโลนี/กรัม ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งหมดตรวจสอบด้วย standard method for the examination of dairy products [2] ซึ่งเป็นการตรวจสอบเชื้อแบบดั้งเดิมที่ได้รับการยอมรับเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2-3 วัน

ปัจจุบันมีวิธีตรวจสอบรวดเร็ว (rapid detection) สำหรับแบคทีเรียในอาหารและน้ำหลายวิธี อย่างไรก็ตามแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะ โดยต้องมีแบคทีเรีย 10^4-10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก ดังนั้นการประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจมากขึ้น พีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสคิดค้นโดย Karry Mullis ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1985 เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ขึ้นภายในหลอดทดลองในช่วงเวลาสั้นๆ [3] ซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ มีขั้นตอนน้อย และใช้เวลาน้อย ดังนั้นจึงนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในโยเกิร์ต โดยพัฒนาวิธีตรวจสอบที่ให้ผลรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 โยเกิร์ต

ตัวอย่างโยเกิร์ตที่จำหน่ายแพร่หลายตามร้านสะดวกซื้อในประเทศไทย 10 ยี่ห้อ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดของแบคทีเรียแลคติกในโยเกิร์ตที่จำหน่ายแพร่หลายตามร้านสะดวกซื้อในประเทศไทย

ยี่ห้อ	ชนิดของแบคทีเรียแลคติก
A	*L. casei* และ *S. thermophilus*
B	*Bifidobacterium bifidum*
C-E	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus*
F	*Bifidobacterium bifidum* และ *L. acidophilus*
G	*Bifidobacterium animalis*, *S. thermophilus* และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
H	*L. lactis*
I	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus*
J	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus*

2.2 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ *16S rDNA* ใน *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus* โดยออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) หมายเลข X52654 (gi:43981) และหมายเลข X68418 (gi:312116) ของ GenBank ตามลำดับ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ขนาด 19-21 เบส จำนวน 2 คู่ คือ (1) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ *16S rDNA* ใน *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ประกอบด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) ที่มีลำดับเบสเป็น 5′- ACA TGA ATC GCA TGA TTC AAG -3′ กับไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) ที่มีลำดับเบสเป็น 5′- ACT CGG CTA CGC ATC ATT G -3′ และ (2) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ *16S rDNA* ใน *S. thermophilus* ประกอบด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดที่มีลำดับเบสเป็น 5′- TTA TTT GAA AGG GGC AAT TGC -3′ กับไพรเมอร์รีเวิร์สที่มีลำดับเบสเป็น 5′- TGA ACT TTC CAC TCT CAC AC -3′ โดยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด มีค่า Tm ประมาณ 58 องศาเซลเซียส [4,5]

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

เจือจางตัวอย่างโยเกิร์ตด้วย peptone water ทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} และ 10^{-10} ตามลำดับ นำไปทำพีซีอาร์และนำไปตรวจนับเชื้อด้วยวิธี plate count บนอาหาร deMan Rogosa Sharpe (MRS) agar

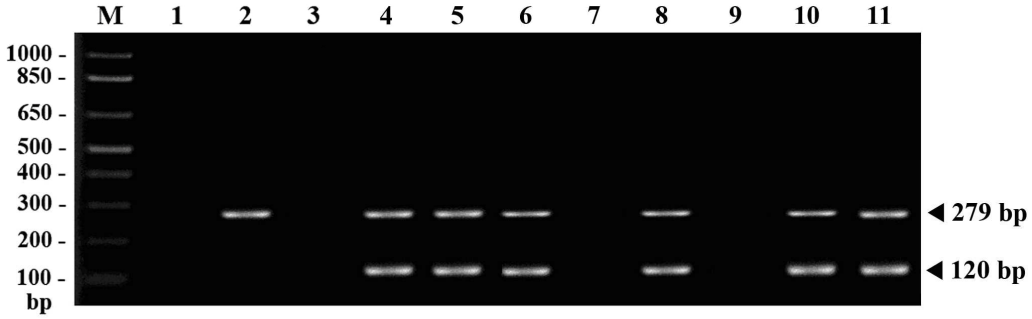
2.4 การทำพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* ในแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างโยเกิร์ตที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil) 0.5 ยูนิต มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ(3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1.8 เปอร์เซ็นต์ [6,7]

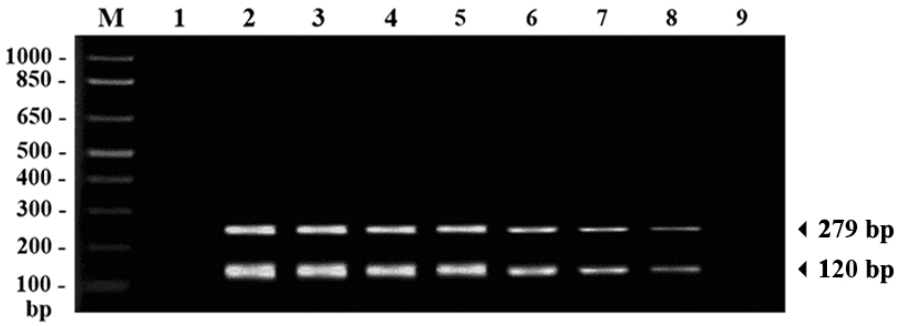
3. ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *16S rDNA* ปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 120 คู่เบส ในตัวอย่างที่มี *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 279 คู่เบส ในตัวอย่างที่มี *S. thermophilus* แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและไพรเมอร์รีเวิร์สที่ ออกแบบจากชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* มีความจำเพาะต่อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus* โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับบทความวิจัยของ Furet และคณะ (2004) [4]

เมื่อตรวจนับแบคทีเรียด้วยวิธีด้วยวิธี plate count บนอาหาร MRS agar แล้วนำตัวอย่างโยเกิร์ตที่มีแบคทีเรียความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4} และ 10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวแต่ละความเข้มข้นในปริมาตร 1 ไมโครลิตร จะมีแบคทีเรีย 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2}, 10 และ 1 เซลล์ ตามลำดับ พบว่าตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4}, 10^{3}, 10^{2} และ 10 เซลล์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 120 และ 279 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีแบคทีเรีย 1 เซลล์ และตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีความไวต่อแบคทีเรียถึง 10 เซลล์/ปฏิกิริยา เช่นเดียวกับบทความวิจัยของ นฤมลและธีระชัย (2552a และ 2552b) [8,9] ซึ่งเทียบเท่ากับโยเกิร์ตที่มี *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ/หรือ *S. thermophilus* 10^{4} เซลล์/กรัม



รูปที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* ซึ่งตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ขนาด 120 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *S. thermophilus* ขนาด 279 คู่เบส [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Techologies, USA); 1 คือตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-11 คือตัวอย่างโยเกิร์ตยี่ห้อ A-J ตามลำดับ]



รูปที่ 2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* ในตัวอย่างโยเกิร์ตที่มีแบคทีเรียความเข้มข้นต่างๆ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Techologies, USA); 1 คือตัวอย่างที่ไม่มีแบคทีเรีย; 2-9 คือตัวอย่างที่มีแบคทีเรียความเข้มข้น 10^{10}, 10^{9}, 10^{8}, 10^{7}, 10^{6}, 10^{5}, 10^{4} และ 10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ]

4. สรุป

การวิจัยนี้ได้ประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus* ในโยเกิร์ต ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ได้สกัดแยกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อนการทำพีซีอาร์ โดยเทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* และมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียสูง รวมทั้งมีความไวของการตรวจสอบแบคทีเรียในโยเกิร์ต 10^{4} เซลล์/กรัม นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ภายในเวลา 4-5 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าค่อนข้างรวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเดิม

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับการสนับสนุนจากกลุ่มวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว.-สกอ. (ศาสตราจารย์ ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส และคณะ)

6. เอกสารอ้างอิง

[1] สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, นมเปรี้ยว, กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ, 5 น., 2547.

[2] Marshall, R.T., Standard Method for the Examination of Dairy Products, 16th Ed, American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 1-18, 1993.

[3] Mullis, K. and Faloona, F., Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Methods Enzymol.,Vol. 155, pp. 335-350, 1987.

[4] Furet, J.P., Quénée, P. and Tailliez, P., Molecular Quantification of Lactic Acid Bacteria in Fermented Milk Products Using Real-time Quantitative PCR, Int. J. Food Microbiol., Vol. 97, pp. 197-207, 2004.

[5] นฤมล ธนานันต์ พรพรรณ กลิ่นกลั่น และธีระชัย ธนานันต์, การตรวจสอบแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกบางชนิดในนมเปรี้ยวพร้อมดื่มด้วยวิธีดูเพล็กซ์พีซีอาร์, น. 231-235, *ใน* การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16: พันธุศาสตร์...แก้วิกฤตพลังงานชาติ, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, 2552.

[6] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Melecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

[7] นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, การตรวจสอบแบคทีเรีย *E. coli* ในน้ำด้วยเทคนิคดูเพล็กซ์พีซีอาร์, Thai J. Genet., 1(2), น. 109-113, 2551.

[8] นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์, การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจ สอบแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* ในหอยนางรม, *ใน* การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, น. 236-240, 2552.

[9] นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์, การประยุกต์เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาในน้ำดื่ม, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 17(2), น. 37-42, 2552.