รายงานวิจัย

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักไทย เพื่อผลิตเป็นกล้าเชื้อในการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยาของการผลิตอาหารหมักไทย และการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก

Potential of using isolated bacteriocin-producing lactic acid bacteria from thai fermented products as starter cultures for microbiological improvement of traditional thai fermented products and as probiotic for animal feed production

โดย

ผศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2547

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัย

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักไทย เพื่อผลิตเป็นกล้าเชื้อในการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยาของการผลิตอาหารหมักไทย และการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก

Potential of using isolated bacteriocin-producing lactic acid bacteria from thai fermented products as starter cultures for microbiological improvement of traditional thai fermented products and as probiotic for animal feed production

โดย

ผศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

RCH
GR
121
01885
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 64433
วัน,เดือน,ปี 11 ก.ย. 2549

b 11648685
i.....

โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2547
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2547 โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนให้ทุนวิจัยในหัวข้อดังกล่าว รวมทั้งอนุเคราะห์สถานที่ดำเนินการวิจัยจนงานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.นันทนา สีสุข ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ช่วยในด้ายคัดแยกและตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียแลกติก คุณลีลาวดี แสงสุก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยในการทดสอบการต้านสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ คุณวิเชียร สีสุข จากบริษัท ยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารสัตว์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) และ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) เพื่อเป็นเชื้อเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้

ข้อมูลบางส่วนของงานวิจัยนี้ ได้นำไปเผยแพร่ในรูปแบบ poster presentation ในการประชุม International Congress of Meat Science and Technology ครั้งที่ 51 ที่ Baltimore, Maryland, USA ระหว่างวันที่ 7 – 12 สิงหาคม 2548 ในหัวข้อ **Screening of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Fermented Meat in Acidic broth and the presence of bile salts for Probiotic Prospect** ซึ่งผู้วิจัยได้แนบเนื้อหาการนำเสนอที่ได้รับตีพิมพ์ลงใน Proceedings ในซีดีของการประชุมในหน้าถัดไปไว้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	1.1 บทนำ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
2	วารสารปริทัศน์	3
	2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก	3
	2.2 วัตถุประสงค์ในการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์	4
	2.3 หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี	4
	2.4 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์	4
	2.5 ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี	5
	2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก	6
	2.7 ความต้องการโปรไบโอติก	8
	2.8 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก	8
	2.9 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย	13
	2.10 รูปแบบของการใช้สารสริมชีวนะในอาหารสัตว์	13
	2.11 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ	14
	2.12 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก	14
	2.13 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติคผสมในอาหารสัตว์	15
3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	16
	3.1 ตัวอย่างอาหารหมัก เชื้อจุลินทรีย์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
	3.2 อุปกรณ์	17
	3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	19
4	ผลการทดลองและวิจารณ์	23
	4.1 การตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินและความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นใน MRS broth	23
	4.2 การตรวจสอบยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดสอบและการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้น	24
	4.3 คุณสมบัติการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในกระเพาะอาหาร	25
	4.4 คุณสมบัติการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหาร	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่		หน้า
4	4.5 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ต่อการต้านสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคของคนและสัตว์	28
	4.6 สรุปผลการทดลอง	29
	4.7 เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก	15
4.1	สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่มีโอกาสสร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินบนอาหารเพาะเชื้อ BSM	24
4.2	การตรวจยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินและการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักผลิตออกมาใน MRS broth	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เปรียบเทียบคุณสมบัติและการทำงานของโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ	5
2.2	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติก	7
2.3	สารเสริมชีวนะที่จำหน่ายทางการค้า	9
3.1	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับตรวจสอบการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักประเภทเนื้อของไทยและสภาวะ การเพาะเลี้ยงก่อนนำมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบ	18
4.1	ผลการยับยั้งเชื้อจากสารแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากแหนม (TISTR536, N100 และ N190) และไส้กรอกอีสาน (RS-49 และ RS-54) ผลิตขึ้น เทียบกับเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหารสัตว์ (LAB1 และ LAB4)	23
4.2	ความเข้มข้น (arbitary unit, AU/ml) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแลกติก ที่คัดแยกได้จากแหนมและไส้กรอกอีสานต่อเชื้ออินดิเคเตอร์ต่าง ๆ เมื่อบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ ใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	25
4.3	ผลของพีเอชกับเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ทำการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติก (เชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3-5 x 10^6 cfu/มิลลิลิตร) หลังการบ่มเพาะเชื้อใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง	27
4.4	ผลของเกลือน้ำดีกับเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ทำการศึกษาคุณสมบัติของการเป็น โปรไบโอติก (เชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3-5 x 10^6 cfu/มิลลิลิตร) หลังการบ่มเพาะเชื้อใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง	28
4.5	การต้านสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกที่มีแนวโน้มในการใช้เป็นโปรไบโอติก ในอาหาร	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีอยู่มากมายหลายชนิด อาทิเช่นอาหารหมักจากข้าว ได้แก่ ขนมจีน ข้าวหมาก ฯลฯ อาหารหมักจากเนื้อ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกอีสาน ปลาร้า ฯลฯ และอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์อาหารหมักไทยโดยมากมักเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลกติก โดยไม่มีการควบคุมคุณภาพการหมักจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกอย่างจริงจัง แต่ในระยะสิบกว่าปีที่ผ่านมานี้ได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อกลับไปใช้ในการผลิตอาหารหลายชนิด (De Vuyst และ Vandamme, 1994; Lücke, และ Hechelmann, 1987; Hammes, และ Knauf, 1994; Hammes, และ Tichaczek, 1994) รวมถึงในกลุ่มอาหารหมักพื้นเมืองของไทย (Lotong และคณะ, 1987; Lotong, และ Swetwiwathana, 1990; Swetwiwathana และคณะ, 2003; Swetwiwathana และคณะ, 2004) ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมใช้ในการผลิตเป็นกล้าเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ไทยให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น โดยมุ่งเน้นถึงการยอมรับในรสชาติ ลักษณะปรากฏหลังจากใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อควบคุมคุณภาพการหมัก และที่สำคัญอย่างยิ่งคือ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งมุ่งเน้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในระหว่างการหมัก โดยมีวัตถุประสงค์ในการใช้เป็นกล้าเชื้อหมักอาหารเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์หมักที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเป็นโปรไบโอติกในอาหารสำหรับการบริโภคของมนุษย์ รวมถึงการผลิตเป็นเชื้อสำหรับผสมในอาหารสัตว์โดยมีวัตถุประสงค์ให้เป็นโปรไบโอติกในตัวสัตว์ที่บริโภคอาหารสัตว์นั้น ๆ (Fuller, 1989)

การผลิตอาหารสัตว์ในปัจจุบัน มักจะมุ่งเน้นถึงคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารสัตว์ต่อสัตว์ที่จะใช้เป็นอาหารเพื่อการบริโภคของมนุษย์ การผลิตโดยทั่วไปจะมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่จัดว่าเป็นโปรไบโอติก เช่น เชื้อในกลุ่มแบซิลลัส รวมถึงแบคทีเรียแลกติก โดยที่จะให้อาหารสัตว์ที่สัตว์บริโภคสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารและจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตให้มากที่สุด โดยที่เชื้อในกลุ่มแบซิลลัสจะเป็นกลุ่มที่ให้เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสเพื่อช่วยย่อยอาหารให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ และสัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้ทันที ส่วนแบคทีเรียแลกติกจะเป็นกลุ่มที่ช่วยในการหมักน้ำตาลอาหารให้มีรสชาติที่เปรี้ยว เป็นที่น่าบริโภคและสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้เร็ว ในขณะเดียวกันเชื้อในกลุ่มดังกล่าวยังสามารถสร้างสมดุลย์ของลำไส้สัตว์ช่วยจัดเชื้อที่ไม่เป็นประโยชน์ โดยเฉพาะ เชื้อในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้ของสัตว์ ถูกขับออกจากลำไส้สัตว์ได้โดยง่าย ส่งผลให้สัตว์ที่เลี้ยงปลอดโรค มีสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตได้เต็มที่จากอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยง (Fuller, 1989) ซึ่งถ้ากลุ่มแบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคด้วยแล้ว ยิ่งน่าจะช่วยในเรื่องของการกำจัดแบคทีเรียที่ก่อโรคในลำไส้สัตว์ได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้น การศึกษาวิจัยในหัวข้อดังกล่าวจึงมุ่งเน้นที่จะนำเอาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากอาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของไทย เช่น ไส้กรอกอีสาน แหนม เป็นต้น มาทำการศึกษาหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ รวมถึงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากแหนมและทดสอบแล้วว่าผลิต pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ nisin Z จาก *Lactococcus lactis* (Swetwiwathana และคณะ, 2003) เพื่อทดสอบเบื้องต้นต่อความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นอาหารสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรไบโอติกเทียบกับเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหารสัตว์ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากบริษัทที่นำเข้าอาหารสัตว์ ทั้งนี้เพื่อหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติกในโอกาสต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1.2.1 หาแบคทีเรียแลกติกกลุ่มที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพสูงจากอาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของไทย ได้แก่ ไส้กรอกอีสาน เทียบกับแบคทีเรียแลกติกกลุ่มที่สร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแหนม

1.2.2 นำกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินที่คัดเลือกได้จากอาหารหมักทั้งสองมาตรวจสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคในสัตว์ เพื่อเป็นข้อมูลในการเพิ่มปริมาณเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่เลือกใช้เป็นอาหารโปรไบโอติก หลังจากมีการให้ยาปฏิชีวนะสัตว์เพื่อการรักษา

1.2.3 ทดสอบความทนต่อกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ความเข้มข้นในระดับพีเอชต่าง ๆ รวมถึงทดสอบการทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ของกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินที่คัดเลือกได้จากอาหารหมักทั้งสองทั้งนี้เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ทนกรดในกระเพาะอาหารสัตว์เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotic) หรือสารเสริมชีวนะ จัดเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะสมดุล ช่วยให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น ไม่มีปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การดื้อยา หรือสารตกค้าง ใช้ได้กับสัตว์หลายประเภท

คำว่าโปรไบโอติก (Probiotic) มาจากภาษากรีก แปลว่า "เพื่อชีวิต" Lilly และ Stillwell (1965) เป็นบุคคลแรกที่นำมาอธิบายสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงมีความหมายตรงกันข้ามกับคำว่า "Antibiotic" หรือสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายเพิ่มเติม คือ

Parker (1974) เป็นคนแรกที่ใช้คำว่า Probiotic เพื่ออธิบายถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการป้อนสัตว์ โดยให้คำจำกัดความว่า "จุลินทรีย์ หรือ สารที่ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล"

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา หรือ FDA (The United States Food and Drug Administration) ได้เปลี่ยนมาใช้คำว่า DFM (Direct – Fed Microbial) แทนคำว่า Probiotic และได้ให้ความหมายว่าเป็นแหล่งของจุลินทรีย์มีชีวิต ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ นอกจาก FDA และ AAFCO (The Association of American Feed Control Official) ได้จัดให้จุลินทรีย์ DFM เป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) ingredients เป็น Food and Food Additive ที่ปลอดภัยสามารถเป็นอาหารของมนุษย์ได้โดยผ่านการพิจารณาจากนักเภสัชกรและนักพิษวิทยาแล้ว

Fuller (1989) ทบทวนคำจำกัดความ และกล่าวว่า Probiotic คือ "อาหารเสริม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ โดยปรับปรุงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ให้สมดุล"

โปรไบโอติกในความหมายของ ศิริรัตน์ และ ฐิติพงศ์ (2540) ผู้นำเสนอผลงาน "Probiotic BS-11" ซึ่งเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ในบ่อกุ้ง ได้กล่าวให้ความหมายไว้ว่า "โปร" คือ การเตรียม "ไบโอติก" คือ ชีวิต ดังนั้นความหมายของโปรไบโอติก คือ การเตรียมพร้อมให้สิ่งมีชีวิตมีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งจุลินทรีย์จากคำจำกัดความ นั่นคือจุลินทรีย์ที่เมื่อผู้บริโภคเข้าไปแล้ว สามารถเข้าไปเกาะผิวหน้าของทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ตาย แล้วผลิตสารบางอย่างเพื่อเป็นการแก่งแย่งกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีการให้ความหมายของโปรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดจำเพาะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (โดยเฉพาะ *Lactobacillus* sp.) แล้วเสริมในอาหารสัตว์มีผลทำให้การเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ

2.2 วัตถุประสงค์ในการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์

ความต้องการใช้จุลินทรีย์ในฟาร์มเกษตรกรรมต่าง ๆ ซึ่งมีการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากมักจะเกิดปัญหาภาวะโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ อันมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง การใช้โปรไบโอติกเพื่อให้มีกลไกควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคภายในลักษณะการควบคุมโดยชีววิธี (Biological control) แบบเดียวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกจึงมีความมุ่งหมายเพื่อ

- เพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตขึ้น
- เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น โดยไปเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายอาหารหรือช่วยสลายอาหารที่ย่อยยาก
- ทำให้ผลผลิตต่าง ๆ จากสัตว์ในฟาร์มสูงขึ้น

2.3 หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

2.3.1 ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคโดย

- สร้างสาร Antibacterial substance
- ขัดขวางเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
- สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหารได้

2.3.2 ช่วยระบบย่อยอาหารโดย

- สร้าง Lactic acid ทำให้กระเพาะมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารดีขึ้น
- สร้างน้ำย่อย เช่น Pectinase , Cellulase
- ลดพิษของ amine และ แอมโมเนีย

2.3.3 กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคโดย

- มีการสร้างสาร Antibody มากขึ้น
- เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ใน การกินจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค หรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

2.4 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์

2.4.1 ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนการใช้สารปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ที่อาจเกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรค และสารตกค้าง

2.4.2 ช่วยให้ระบบย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้น

2.4.3 ป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ซึ่งโปรไบโอติกจะมีคุณสมบัติที่ดีแตกต่างจากสารปฏิชีวนะดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติและการทำงานของโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	สารปฏิชีวนะ
คุณสมบัติ 1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต 2. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. ไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์ 5. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์	คุณสมบัติ 1. เป็นสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ 2. ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. อาจทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์ 5. อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์
การออกฤทธิ์ 1. สร้างกรดและลด pH ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 2. ทำงานเจาะจงเฉพาะที่ 3. แบ่งตัวเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและแย่งจับพื้นที่บริเวณทางเดินอาหารกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	การออกฤทธิ์ 1. ยับยั้งการสร้างโปรตีน DNA , RNA ของเซลล์สิ่งมีชีวิต 2. พื้นที่การทำงานกว้าง 3. ไม่มีการเพิ่มจำนวน

ที่มา : อภิศุภร (2542)

2.5 ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น และมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่มีพิษ (non- pathogenic , non- toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ได้ และสามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานได้ในสภาพที่เก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานหลังจากทำการกวนผสมกับอาหารสัตว์ เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อน , แรงอัดเพื่อการอัดเม็ดและสภาพที่เป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation

7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์

8. ราคาไม่แพง

9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร

10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้

12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้

2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็ก ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกซึ่งมีผลทางอ้อมต่อผลผลิตสัตว์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.6.1 จุลินทรีย์บางชนิดสร้างจุลินทรีย์และสารที่ไม่ทราบชนิด ซึ่งไม่เพียงแต่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารสัตว์ แต่ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยและยังให้กรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีน เมไทโอนิน เพื่อเป็นต้นกำเนิดในการสร้างโปรตีนและไขมัน

2.6.2 จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอมไซม์เฉพาะเจาะจงที่จะย่อยส่วนประกอบเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ซึ่งสัตว์และจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่สามารถนำไปใช้ต่อได้ จุลินทรีย์สร้างเอมไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส ไซลาเนส ไลเพส โพนทีเอส บีต้า-กลูคาเนส แอนิเลส ซึ่งช่วยในการย่อยอาหารได้

2.6.3 จุลินทรีย์สามารถสร้างสารปรุงแต่งพิเศษและสารหอมระเหยซึ่งสามารถส่งเสริมการกินอาหารทำให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้น

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกโดยสร้างโคโลนี ทุกพื้นที่ของทางเดินอาหารและเคลื่อนที่จากปากไปสู่ปลายทางคือทวารจะไม่เคลื่อนที่ย้อนทาง บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่เหล่านี้ ช่วยย่อยอาหารและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกันและระหว่าง จุลินทรีย์กับ host จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้าง acetate lactata propionate volatile acid วิตามิน เอมไซม์ สารต้านแบคทีเรียและสารประกอบเคมีที่ไม่ทราบชนิด

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนี้อาจเป็นแบคทีเรีย รา หรือ ยีสต์ ซึ่งคุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์จะแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติก

ชนิดจุลินทรีย์	หน้าที่เพื่อผลิต
Bacillus subtilis	Amylase, Protease
Bifidobacterium bifidum	Lactic and Formic acid, Glycosidase, Urease
Lactobacillus acidophilus	Acidophilin, Glycosidase, Lactic acid
Lactobacillus casei	Oxidation/Reduction potential
Lactobacillus lactis	Amylase, Protease, Hydrogen peroxide
Streptococcus diacetyllactis	Acetic acid, Diacetyl, Bile transformation
Yeast *(Saccharomycer cerevisiae)*	Amylase, Protease, Lipase, Cellulase, B-complex
Fungal*(Aspergillus oryzae* or *A.niger)*	Amylase, Protease, Lipase, Cellulase, B-complex

ที่มา : Kung (1990)

สารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์หลายด้าน แต่การใช้โปรไบโอติกจะต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยมีระดับการใช้ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU (colony forming unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กรัม จุลินทรีย์ที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 มีดังนี้

- แบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus coagulan* , *B. lentus* , *B. licheniformis* , *B. pumilus* , *B. subtilis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารปฏิชีวนะ) , *B. subtilis* BN , *B. toyo* , *Bacteroides amylophilus* , *Bacteroides ruminicola* , *Bacteroides suis* , *Bifidobacterium adolescentis* , *Bifidobacterium animalis* , *Bifidobacterium bifidum* , *Bifidobacterium infantis* , *Bifidobacterium longum* , *Bifidobacterium chamophilus* , *Lactobacillus bulgaricus* , *L. cellobiosus* ,*L.curatus* , *L. delbruekii* ,*L. fermentum*, *L. helveticus* , *L.lactis* , *L.plantarum* , *L.reuterii* , *Leuconostoc mesenteroides* , *Pediococcus acidilactici* , *P. cerevisiae* ,*P. pentosaceus*, *Propionibacterium shemanii* , *Lactococcus cremoris* , *L. diacetylactis* , *Enterococcus faccium* , *Streptococcus faecium cernelle* 68 , *S. intermedius* และ *S. thermophilus*

- เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *A. oryzae*

- ยีสต์ ได้แก่ *Candida pintolepessi* , *Saccharomyces cerevisiae*

โดยที่เชื้อหลายชนิด ได้มีบริษัทหลายแห่งนำมาผลิตเป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่เรียกว่าเป็นสารเสริมชีวนะจำหน่ายทางการค้าเพื่อใช้ผสมในอาหารสัตว์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ความต้องการโปรไบโอติก

สภาพปัจจุบันสิ่งมีชีวิตมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เป็นธรรมชาติ ซึ่งต้องมีการปฏิบัติตนอย่างระมัดระวังหรือการดูแลอนามัยที่ดี มีข้อจำกัดมากมายเกี่ยวกับการบริโภคหรือการกินอาหารที่ไม่เป็นธรรมชาติ มีภาวะกดดัน มีโอกาสสัมผัสหรือมีการเลี้ยงดูของแม่และลูกน้อยลง ภาวะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายจุลินทรีย์ ภาวะกดดันรวมทั้งความเครียด ล้วนมีผลต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ทั้งสิ้น โดยมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมคือ อาจทำให้จุลินทรีย์มีองค์ประกอบที่ผิดเปลกไปจากเดิม มีบางอย่างบกพร่อง อันมีผลต่อการแสดงออกถึงความต้านทานโรคลดลง มีความไวต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค มีผลต่อการเจริญเติบโตในวัยอ่อนลดลง

การใช้โปรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้มีการเสริมสร้างหรือซ่อมแซมฟื้นฟูในส่วนที่บกพร่องต่าง ๆ เหล่านี้ให้กลับคืนสู่สภาพเดิมปกติ เพื่อทำหน้าที่ปกป้องและควบคุมจุลินทรีย์อื่น ๆที่บุกรุกได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพเท่าเดิม ซึ่งมีความแตกต่างจากการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งมุ่งไปที่การให้การรักษาและมีการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยไม่ได้คำนึงถึงผลข้างเคียงที่ตามมา

2.8 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

2.8.1 การผลิตสารต่อต้านจุลชีพ

2.8.1.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ กรดแลกติกและกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกเป็นตัวยับยั้งที่แรงที่สุดและมีช่วงของการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ ราและแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity

เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์มีผลทำลายเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวจุลินทรีย์นั้นๆ แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีรายงานว่า สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus* ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus sake*ที่แยกจากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium*และ *Staphylococcus aureus* ได้ นอกจากนี้ *Enterococcus* ก็สามารถกรดแลกติกได้

2:8.1.2ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

มีรายงานว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.12 มิลลิโมล / ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *lactococci* ได้ร้อยละ 50 และความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมล / ลิตร จะทำให้เซลล์ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.1.3 คาร์บอนไดออกไซด์

ส่วนมากคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลคติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้วิธีเมตาบอลิซึมอื่นๆก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอมไซม์ของกระบวนการ Decarboxylation และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน ก็เป็นเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป ที่ความเข้มข้นสูงสามารถป้องกันอารเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

2.8.1.4 ไดอะซิติล

มีรายงานว่าไดอะซิติลมีฤทธิ์ต่อต้าน *Bacillus* sp. แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างไดอะซิติลได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* นอกจากนี้ยังพบว่าไดอะซิติลยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกกลไกยับยั้งของไดอะซิติลคาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ยึดกับตรงตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จีนีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหรือเอมไซม์

2.8.1.5 สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่มีคุณสมบัติว่องไวที่ pH ต่ำ เสถียรต่อความร้อน มีฤทธิ์ในการทำงานได้กว้างและละลายได้ในอะซิโตน จำแนกสารได้ 2 ชนิดคือ Reuterin ซึ่งสร้างโดย *Lactobacillus Reuterin* ซึ่งประจำอยู่ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ Reuterin สามารถยับยั้งแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และไวรัสได้ โดยจะไปทำปฏิกิริยาต่อต้านกับหมู่ sulfhydryl ของเอนไซม์โบนิวคลีโอไทด์ รีดักเทส ซึ่งสำคัญสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ DNA ส่วนสารอีกชนิดคือ 2-pyrorolidone-5-carboxylic acid (pca) ซึ่งสร้างโดย *Lactobacillus casei.,Pseudoplantarum* spp. และ *Streptococcus bovis* ซึ่งสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis, Enterobacter colacae* และ *Pseudomonas putida* ได้

2.8.1.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรม การดัดแปลงหลังผ่านกระบวนการการแปลรหัสทางพันธุกรรม และกลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซินแบ่งได้เป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

Class I : Lantibiotic

- Nisin เป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็น food additive ในอุตสาหกรรมอาหารมาก ที่สำคัญได้แก่ nisin A และ nisin Z

Nisin A ควบคุมการสร้างยีนโดย Nis A ขนาด 174 bp โมเลกุลของ pre- nisin เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 57 ตัว เกิดขึ้นมาหลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม และเปลี่ยนมาอยู่ในรูป pro- nisin เมื่อตัดกรดอะมิโนตรง leader peptide ของ pre- nisin ออกไป 3 ตัว โมเลกุลสมบูรณ์ที่พร้อมจะทำงานได้ต้องผ่านกระบวนการ dehydration ก่อน จะได้ลักษณะโมเลกุลมีประจุบวกและไม่ชอบน้ำ โมเลกุลที่ได้มีขนาดเล็ก และมักพบอยู่ 2 โมเลกุล ที่มีความเสถียร nisin-A มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ที่ไวต่อสารชนิดนี้ให้ตายได้ใน 1 นาที โดย nisin จะเป็นทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างโมเลกุลของ nisin และเยื่อหุ้มเซลล์ บางครั้งเกิดจากประจุบวกของ nisin ทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ nisin จะแทรกเข้าไปภายใน จะทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ เป็นผลให้สารประกอบน้ำหนักโมเลกุลต่ำภายในเซลล์ไหลออกมาอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ nisin ยังไปลดประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วย nisin สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารในห่วงโซ่อิเล็กตรอนได้ เป็นผลให้การรับออกซิเจนถูกยับยั้ง เซลล์ที่ไวต่อ nisin จึงไม่สามารถรับพลังงานไปใช้ในการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม chealating agent จะช่วยให้เซลล์แบคทีเรียแกรมลบ มีความไวต่อ nisin โดยสารนี้จะไปรบกวนสภาพความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ ยอมให้แบคเทอริโอซินเข้าไปในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม

Nisin Z มีคุณสมบัติแพร่ผ่านวุ้นได้ดี และแสดงกิจกรรมทางชีววิทยาเช่นเดียวกับ nisin A แตกต่างกันที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 ของสายเปปไทด์ โดย Nisin Z จะมี histidine แทนที่ตำแหน่ง aspartate ของ nisin A และจากการศึกษาพบว่า *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* สายพันธุ์ NSC1 สามารถผลิตไนซินชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนที่27 เป็นแอสพาราจีน จึงพิสูจน์ว่าเป็นไนซินชนิดz สำหรับโครงสร้างปฐมภูมิของ nisin A และ nisin Z

- Lactocin S เป็น lantibiotic ที่ผลิตโดย *Lactobacillus sake* โมเลกุลที่สามารถทำงานได้จะเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยอะมิโน 37 ตัว และอยู่กับ lanthionine 2 กลุ่ม

- Lactocin 481 ผลิตโดย *Lactobacillus lactis* โครงสร้างปฐมภูมิของ Lactocin 481 ไม่มีความสัมพันธ์กับ nisin เมื่อพัฒนาเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์พร้อมทำงาน จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน 27 ตัว และแสดงลักษณะของ lanthionine ด้วย

Class II : Small heat-stable bacteriocin

ขนาดโมเลกุลจะเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 และ 57 ตัวตามลำดับจะออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม แบคเทอริโอซินในคลาสนี้ได้แก่

- Lactococcin A มีตำแหน่งของยีนที่สร้างบน conjugative plasmid p9B4 โมเลกุลที่พัฒนาจนสามารถทำงานได้ เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วนกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว 5 ตัว สำหรับกลไกการทำงานของมันจะเหมือนกับ nisin, Lactococcin A จะออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเซลล์มีความไวต่อสาร โดยจะไปรบกวนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำขนาดเล็ก Lactococcin A จะเกิดอันตรกิริยากับ receptor ที่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดรู แต่การเกิดรูโดย Lactococcin A จะไม่ขึ้นอยู่กับความต่างศักย์ไฟฟ้าบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์

- Lactococcin B เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 47 ตัวกลไลการทำงานของ Lactococcin B จะคล้ายกับ Lactococcin A ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Lactococcin B อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับ Lactococcin A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lactococcin M ยีนที่เกี่ยวกับการสร้างสารจะอยู่บน conjugative plasmid p9B4 เช่นเดียวกับ Lactococcin A และ B

- Lactacin F เป็นแบคเทอริโอซิน ที่สร้างโดย *Lactobacillus acidophilus* 11088 (NCK88) มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่เสถียรและทนทานต่อความร้อนสามารถทนต่อการนึ่งฆ่าเชื้อโรคอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีขนาดโมเลกุล 180 kDa.มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลมมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้ง *Lactobacillus acidophilus , L . fermentum ,Enterococcus faecalis , L.delbrueckii subsp.lactis* และ *L. delbrueckii subsp.bulgaricus* อย่างไรก็ตาม Lactacin F สามารถถูกทำลายโดย proteinaseK, subtilisin, trypsin และ ficin แต่ไม่ได้รับผลกระทบจาก lysozyme , lipase

- Lactococcin G เป็นแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการทำงานโดยอาศัยเปปไทด์ ที่มีความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 39 และ 35 ตัว เปปไทด์ทั้งสองมีประจุสูง จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์

- Small heat-stable กลุ่มอื่นๆ ได้แก่ pediocinPA-1 และ pediocin AcH,leucocinA-UAL,mesentercin Y105,sakacin A, sakacin Pและ curvacinA แบคเทอริโอซินเหล่านี้จะเป็นเปปไทด์สวยตรงที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36-44 ตัว มีรายงานว่า pediocin PA-1 ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียที่ไวต่อสาร ยับยั้งจุลชีพชนิดนี้

Class III :Large heat-labile bacteriocin

ที่มีการค้นพบคือ helveticin J ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* 481 เป็นโปรตีนขนาด 37 kDa มีฤทธิ์ในการยับยั้งและควบคุมการสร้างโปรตีนโดยยีน hlyJ กลไกการทำงานจะต่างจาก Class I และ II ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินใน Class นี้ได้แก่ caseicin 80,lacticin Aและ B และ acidophilin A

จากการศึกษาพบว่า *Lactobacilli* และ *Streptococci* สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพที่โมเลกุลใหญ่พวก acidolin และ nisin ได้

2.8.2 การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ควบคุมพื้นที่ของเซลล์เยื่อบุระบบทางเดินอาหาร เป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E.coli* และ*Salmonella* กลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกรดแลคติคเจริญติดกับผนังลำไส้แล้วสามารถเพิ่มจำนวนแล้วเพาะตัวในส่วน lumen ของสัตว์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาตัวอย่างกระเพาะอาหารหมู และในกระเพาะพักและกระพุ้งก้นของไก่ ต่อมาแบคทีเรียกรดแลคติคจะยึดครองบริเวณ receptor ที่ผิวเซลล์ ทำให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคถูกกำจัดออกไปจากทางเดินอาหาร

แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค *E.coli* ยึดเกาะที่เซลล์เป้าหมายด้วย Proteinaceous projection (pili) ส่วน *Lactobacilli* จะยึดเกาะที่ผนังลำไส้ด้วย extracellular substance ซึ่งประกอบด้วย polysaccharide,protein,lipid และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipoteichoic acid สำหรับ lipoteichoic acid จะเป็นโพลิเมอร์ของ glycerolphosphate ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ *Lactobacilli*

2.8.3 กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน แบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกเมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกายคนหรือสัตว์ นอกจากจะผลิตสารต่าง ๆ ที่ช่วยในการยับยั้งและทำลายจุลชีพในลำไส้ที่ไม่ต้องการและก่อให้เกิดโรคได้แล้ว ตัวเซลล์และสารต่าง ๆ ที่เชื้อผลิตขึ้นในร่างกายยังช่วยในการกระตุ้นให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันมากขึ้นในการต้านจุลินทรีย์ที่อาจเป็นอันตรายที่ปนเปื้อนในระบบทางเดินอาหารได้

2.9 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย

กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย (Mode of action of live bacterial culture) ที่เป็นสารเสริมชีวนะ สามารถจะอธิบายได้ว่า เมื่อสัตว์กินจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมชีวนะเข้าไป แบคทีเรียนั้นจะแพร่พันธุ์และก่อตัวที่ผิวทางเดินอาหาร เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งสัตว์กินเข้าไปภายหลังเจริญเติบโตและเกาะที่ผนังลำไส้ยากมากขึ้น เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย จะสร้างกรดอินทรีย์ (organic acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลให้ pH ในระบบทางเดินอาหารเปลี่ยน ซึ่งผลดังกล่าวไม่เหมาะสมกับการคงตัวหรือการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหรือแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเอมไซม์ เช่น เชื้อ *Lactobacilli* สามารถสร้างเอมไซม์แลกเทส (lactase) และอะไมเลส (amylase) ทำให้ร่างกายได้รับเอมไซม์มากขึ้น เป็นผลทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น โดยมีการทำงานเป็นแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ของ เอมไซม์ในทางเดินอาหารและกระบวนการย่อยอาหาร แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างวิตามิน บี 12 ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น เนื่องจากวิตามินดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน การสร้างโปรตีน การเปลี่ยนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยการให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อลูกสัตว์แรกเกิดจำนวนมากก่อสร้างสารจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ อาจช่วยสัตว์สร้างจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และช่วยควบคุมหรือขจัดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค การแข่งขันเพื่อยับยั้งการออกฤทธิ์โดย Fox (1988) และ Stark และ Wilkinson (1989) ได้วิจัยการแข่งขัน การเกาะ การจับหรือการก่อตัวในทางเดินอาหารของ *Lactobacilli* และแบคทีเรียก่อโรคเพื่อครอบครองทางเดินอาหาร การป้องกันพิษของแอมีน (amine) และก๊าซแอมโมเนีย (ammonia) เนื่องจากโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเอมายและก๊าซแอมโมเนียโดยการเพิ่ม metabolic activity ของเชื้อ *E.coli* เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจง (Non-specific immunomodulators) ในมดลูกสุกรที่กิน *Lactobacilli* พบว่า *Lactobacilli* จะทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน(immunomodulators)โดยกระตุ้นภูมิต้านมานบางชนิดในทางเดินอาหาร

2.10 รูปแบบของการใช้สารสริมชีวนะในอาหารสัตว์

การใช้สารเสริมชีวนะหรือ โปรไบโอติก จะมีผลดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ แต่สารเสริม ชีวนะยังมีราคาสูง เพราะว่าสารเสริมชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์ผลิตอยู่ในรูปสารผสมในปัจจุบันที่นำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อจะใช้จึงนำไปผสมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูป ก่อนที่จะนำไปให้สัตว์กิน ทำให้เกษตรกรอาจไม่นิยมใช้ แต่โรงงานผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปที่มีสารเสริมชีวนะผสมแทนการใช้สารปฏิชีวนะได้ การใช้สารเสริมชีวนะในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดให้มีเชื้อจุลินทรีย์ไม่น้อยกว่า 1 x 10^5 CFU ต่อน้ำหนักอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป 1 กรัม จุลินทรีย์สารเสริมชีวนะที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์มี 2 รูปแบบ คือ การใช้เซลล์ที่มีชีวิต (vegetative form) และ การใช้ในลักษณะของสปอร์ (endospore form) ซึ่งพบว่าการให้เซลล์ที่มีชีวิต นิยมใช้ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือสัตว์สี่กระเพาะ เช่น วัว หรือ ควาย มากกว่าสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น ไก่ สุกร หรือ เป็ด ทั้งนี้เพราะสภาพที่เป็นกรดทางเดินอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว จะทำให้เชื้อที่มีชีวิตเปลี่ยนแปลงได้ก่อนที่จะผ่านไปถึงลำไส้ ทำให้สารเสริมชีวนะนั้นไม่สามารถให้ประโยชน์กับสัตว์เต็มที่ ดังนั้นลักษณะที่เหมาะสมกับสัตว์กระเพาะเดี่ยวควรจะเป็นการให้ในรูปสปอร์ เพราะสามารถทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะได้ดี และทนต่อความร้อน นอกจากนี้ความร้อนและความชื้นในขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์ในกระบวนการอัดเม็ด (pellet) จะมีผลต่อลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตด้วย เช่นกัน

2.11 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะนั้น สามารถพิจารณาได้ต้องเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรค โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เจ้าบ้าน สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง เช่น กระเพาะอาหารและสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งน้ำดีหลั่งมาจากตับอ่อน สามารถเพิ่มจำนวนและมีเมตาบอลิซึมในระบบทางเดินอาหารได้ ผลิตกรดอินทรีย์และสารต้านจุลชีพ ซึ่งมีผลลดจุลินทรีย์เกิดโรค เพาะเลี้ยงง่ายและเพิ่มจำนวนได้เร็ว ตลอดจนมีอัตราการรอดชีวิตสูง เมื่อเก็บรักษาระยะเวลานาน ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเป็นจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมได้ ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานสลายพิษของเชื้อโรคหรือสารต้านโภชนะตัวอื่นๆที่อยู่ในอาหาร เช่น *Lactobacillus*

2.12 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก

การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกนั้น สิ่งสำคัญประกอบด้วย 2 ประการคือ()

1. เป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วๆไปและมีความปลอดภัยตลอดระยะเวลาในการใช้ทั้งระยะสั้นและระยะยาว ตามมาตรฐาน GRAS (Generally Recoqnized As Safe Microorganism)

2. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความเฉพาะเจาะจง คือจุลินทรีย์ที่จะพิจารณาต้องระบุกลุ่มเป้าหมายที่จะนำไปใช้ให้ชัดเจนว่าในคนหรือสัตว์ประเภทใด ชนิดใด จุลินทรีย์นั้นจึงจะออกฤทธิ์หรือมีเมตาบอลิซึมให้ประโยชน์ตามที่ต้องการได้ และการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณเนื้อเยื่อใด ในสัตว์ชนิดใดก็มักแสดงผลบวกกับผู้ให้อาศัยชนิดเดียวกันด้วย ซึ่งอาจจะใช้ไม่ได้ผลกับสัตว์ชนิดอื่น ซึ่งมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ด้านสรีระของเยื่อบุผิว ระบบการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารในกระเพาะและลำไส้ รวมทั้งการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังภายในร่างกาย การขยายพันธุ์ การได้ผลบวกในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการณ์ อาจจะไม่ได้ผลบวกในการทดลองกับสัตว์ทดลองหรือผลบวกทางคลีนิคก็เป็นได้ เนื่องจากสภาวะแตกต่างกัน

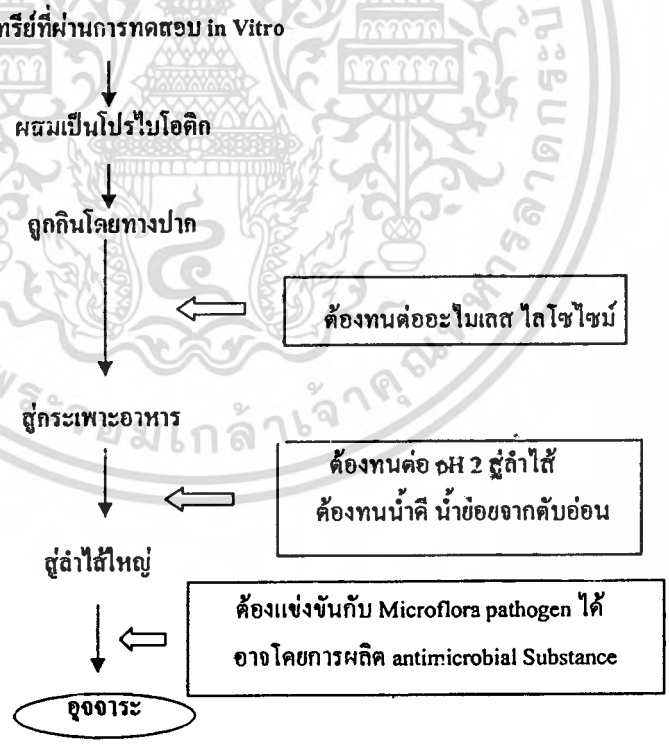
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการใช้โปรไบโอติกเพื่อให้ผลตามที่มุ่งหวังนั้น จุลินทรีย์ที่ผ่านจากปากเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของร่างกายจะต้องรอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณต่าง ๆ หรือจุดจำเพาะเจาะจงที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ พร้อม ๆ มีการแข่งขันเจริญเติบโตกับ จุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ มีการขยายผ่านพันธุ์และผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นในห้องปฏิบัติการณ์ จะต้องได้รับการทดสอบจนมั่นใจในสัตว์ทดลองและในผู้บริโภค ดังแสดงในภาพที่ 2.1

2.13 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติคผสมในอาหารสัตว์

ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์สามารถสรุปได้ดังนี้

- ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนสารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ ซึ่งอาจพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง
- ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารสัตว์ดีขึ้น ทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในนมดีขึ้น
- ใช้ป้องกันโรคต่างๆเนื่องจากโปรไบโอติคทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ลดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์ เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้สูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
- ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอก โดยโปรไบโอติคจะช่วยยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอก และลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน
- ยับยั้งการสร้างคลอเรสเตอรอล
- ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ
- FDA ยอมรับว่าเป็นGRAS



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

ที่มา : วลัยพร (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างอาหารหมัก เชื้อจุลินทรีย์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 ตัวอย่างอาหารหมัก

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่มีจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้องในระหว่างการหมักได้แก่ ไส้กรอกอีสาน

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่

- แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากแหนม 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีรายงานยืนยันแล้วว่าสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ (Swetwiwathana, 2005; Swetwiwathana และคณะ, 2004) ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (ผลิต pediocin PA-1), *Lactococcus lactis* strain N100 และ N190 (ผลิต nisin Z)
- แบคทีเรียแลกติกที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์ 2 สายพันธุ์ซึ่งได้รับการเอื้อเฟื้อจากบริษัท ยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด ได้แก่*Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) และ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)
- จุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบยืนยันการสร้างแบคเทอริโอซินของกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานและแหนม ซึ่งมีสภาพการเพาะเลี้ยงก่อนนำมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบยืนยันดังแสดงในตารางที่ 3.1

3.1.3 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

- TSBYE [Trypticase soy broth (Difco) + 0.6 % Yeast extract (Difco)] สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์
- MRS medium (Oxoid) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์
- MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$ สำหรับการเพาะแยกหาเชื้อแบคทีเรียแลกติก
- MRS agar + 1.0 % $CaCO_3$ (deep tube) สำหรับเก็บเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้เพื่อทดสอบหาสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน
- Lactobacilli agar AOAC (LAA, Difco) สำหรับการตรวจสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิต
- API 50 CHL test kit (BioMorieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA)
- Bacteriocin screening medium (BSM) สำหรับตรวจสอบเบื้องต้นการผลิตสารแบคเทยริโอซินของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยมีองค์ประกอบดังนี้ 2 g/l glucose, 2 g/l meat extract, 10 g/l tryptone, 4 g/l yeast extract, 1 ml/l Tween 80, 2 g/l citric acid diammonium salt, 0.2 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 0.05 g/l $MnSO_4.4H_2O$, 8.7 g/l $K_2HPO_4.3H_2O$, 8 g/l KH_2PO_4 and 15 g/l agar (Tichaczek et al., 1992; Swetwiwathana, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.1.4 สารเคมี

- 6 M HCl
- 5 N NaOH
- diluent (sterile 0.85% normal saline, 0.85% NSS)
- Gram stains
- Bile salt (Sigma)
- antibiotics จาก Oxoid (Gentamicin, Clindamycin, Cephalothin, Tetracycline, Chloramphenicol, Penicillin G, Sulphamethoxalzole, Oxacillin and Erythromycin)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ในการแยกหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

- เครื่องตีบดอาหาร stomacher
- ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 35 – 37° ซ
- candle jar
- ตู้อบลมร้อน
- ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8° ซ สำหรับเก็บเชื้อและตัวอย่างอาหาร
- autoclave
- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง และ ปิเปต)
- เครื่องชั่งสาร
- ห่วง (loop) และเข็ม (needle) สำหรับเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงแกส

3.2.2 อุปกรณ์ในการตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักเนื้อของไทย

- ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 35 – 37° ซ
- candle jar
- เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง และ ปิเปต)
- เครื่องชั่งสาร
- water bath อุณหภูมิ 50° ซ
- vortex mixer
- low temperature centrifuge
- pH meter

64433
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 : สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับตรวจสอบการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักประเภทเนื้อของไทยและสภาวะการเพาะเลี้ยงก่อนนำมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบ

สายพันธุ์จุลินทรีย์อินดิเคเตอร์ [n]	อาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ
Bacillus circulans JCM 2504 ^{T}	TSBYE [*], 30°C, aerobic
B. coagulans JCM 2257 ^{T}	TSBYE, 37°C, aerobic
B. subtilis JCM 1465 ^{T}	TSBYE, 30°C, aerobic
Enterococcus faecalis JCM 5803 ^{T}	TSBYE, 37°C, aerobic
Escherichia coli JM 109	TSBYE, 37°C, aerobic
Kokuria varians LTH 1545	TSBYE, 30°C, aerobic
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	MRS [n], 30°C, anaerobic
L. plantarum ATCC 14917 ^{T}	MRS, 30°C, anaerobic
L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157 ^{T}	MRS, 30°C, anaerobic
Lactococcus lactis subsp. *lactis* ATCC 19435 ^{T}	MRS, 30°C, anaerobic
L. lactis subsp. *lactis* NCDO 497	MRS, 30°C, anaerobic
L. lactis subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638	MRS, 30°C, anaerobic
L. lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L	MRS, 30°C, anaerobic
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124 ^{T}	MRS, 30°C, anaerobic
Listeria innocua ATCC 33090 ^{T}	TSBYE, 37°C, aerobic
L. monocytogenes ATCC 19117	TSBYE, 37°C, aerobic
Micrococcus luteus IFO 12708	TSBYE, 37°C, aerobic
Pediococcus pentosaceus JCM 5885	MRS, 30°C, anaerobic
P. pentosaceus JCM 5890 ^{T}	MRS, 30°C, anaerobic
Salmonella anatum WHO-BKK	TSBYE, 37°C, aerobic
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* ATCC 12600 ^{T}	TSBYE, 37°C, aerobic
S. carnosus LTH 2102	TSBYE, 37°C, aerobic

[n] ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md; JCM, Japanese Culture of Microorganisms, Wako, Japan; JM, commercial strain from Toyobo, Osaka, Japan; LTH, Lebensmitteltechnologie Hohenheim University, Stuttgart, Germany, TUA, Tokyu University of Agriculture, Tokyo, Japan; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; WHO-BKK, World Health Organization, Salmonella-Shigella Center, Bangkok, Thailand.

[*] TSBYE, Trypticase soy broth (Difco) + 0.6 % Yeast extract (Difco) [n] MRS medium (Oxoid)

- ตู้ปลอดเชื้อ larmina flow
- 0.20 μm pore-size sterile polysulfone membrane (Cica, Tokyo)
- ห่วง (loop) และเข็ม (needle) สำหรับเขี่ยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตะเกียงแกส
- titer plate
- ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8°ซ

3.2.3 อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบความคงทนของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินในสภาพกระเพาะและลำไส้จำลอง

- ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 35 – 37°ซ
- candle jar
- เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ (ฟลาส์ก จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง และ ปิเปต)
- slide
- เครื่องชั่งสาร
- ห่วง (loop) และเข็ม (needle) สำหรับเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงแกส
- กล้องจุลทรรศน์

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ใช้ในการศึกษาหาแบคทีเรียแลกติก

ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่จำหน่ายตามท้องตลาดในเขตลาดกระบังและอำเภอเมืองอุบลราชธานีจำนวน 10 ตัวอย่าง บรรจุในกระติกเก็บตัวอย่างรักษาความเย็นด้วยน้ำแข็ง เพื่อที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินในห้องปฏิบัติการโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

3.3.1.1 นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ได้มาทำการชั่งในถุงปลอดเชื้อสำหรับ stomacher 25 กรัมต่อตัวอย่าง เจือจางตัวอย่างอาหารด้วย sterile 0.85% NSS 225 มิลลิลิตร

3.3.1.2 ตีบดตัวอย่างอาหารและ 0.85% NSS ให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher นาน 1 นาที

3.3.1.3 เจือจางตัวอย่างอาหารที่ได้แบบ 10 fold dilution ให้ได้ในระดับ $10 - 10^6$ จากนั้นนำแต่ละระดับความเจือจางไปทำการตรวจนับปริมาณเชื้อบนอาหาร MRS agar + 0.5% $CaCO_3$

3.3.1.4 บ่มเพาะจานเพาะเชื้อทั้งหมดในสภาพ microaerobe โดยใช้ candle jar (อดิศร, 2541) ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.1.5 ตรวจนับเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นโซนใส และสุ่มคัดเลือกเชื้อที่ให้ลักษณะดังกล่าวในระดับความเจือจางที่มีเชื้ออยู่ในช่วง 30 – 300 โคโลนี มา 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง-เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อใส่ใน MRS agar + 1.0% $CaCO_3$ที่เตรียมไว้แบบ deep tube บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บหลอดเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8° ซ สำหรับการตรวจสอบหาสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินได้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากไส้กรอกอีสาน 100 สายพันธุ์ ที่เก็บอยู่ใน MRS agar + 1.0% $CaCO_3$ และเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแหนม (Swetwiwathana, 2005; Swetwiwathana และคณะ, 2004) ได้แก่ pediocin PA-1 producer (*P. pentosaceus* TISTR 536), nisin Z producer (*Lc. lactis* strain N100 และ N190) รวมทั้งแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์จากบริษัท ยูเนี่ยน เคสแทป จำกัด ได้แก่ *Lb. acidophilus* (LAB 1) และ *P. acidilactici* (LAB 4) มาทำการตรวจสอบหาเชื้อที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน และดูความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 3.1) โดยวิธี direct method ดังนี้

3.3.2.1 นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่จะทำการทดสอบทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงใน MRS broth และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.2.2 นำเชื้ออินดิเคเตอร์ที่จะใช้ทดสอบมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารและบ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้ออินดิเคเตอร์นั้น ๆ ตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2.3 นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกในข้อ 3.3.2.1 มาทำการ spot เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร bacteriocin screening medium (BSM) ตามจำนวนอินดิเคเตอร์ที่จะใช้ทดสอบ บ่มเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาพ microaerobe ใน candle jar (อดิศร, 2541)

3.3.2.4 ถ่ายเชื้ออินดิเคเตอร์ที่เจริญ 24 ชั่วโมงในข้อ 3.3.2.2 โดยให้มีปริมาณเชื้อ 2 % ในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Lactobacilli agar AOAC (LAA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวอยู่ใน water bath อุณหภูมิ 50°ซ

3.3.2.5 เขย่าหลอด LAA ที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์ในข้อ 3.3.2.4 อย่างรวดเร็วด้วย vortex mixer จากนั้นรีบเทอาหาร LAA ดังกล่าวลงบนอาหาร BSM ที่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก ในข้อ 3.3.2.3 ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร BSM

3.3.2.6 รอจนอาหารแข็งตัว จากนั้นทำการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาพและอุณหภูมิที่เหมาะสมของชนิดเชื้ออินดิเคเตอร์ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

3.3.2.7 ทำการตรวจสอบผลโดยดูการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่ทำการ spot ลงในอาหาร BSM วัดขนาดความกว้างของโซนใส และจดบันทึกชนิดเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ให้โซนใสกับโคโลนีแบคทีเรียแลกติกที่ทำให้เกิดโซนใสกับเชื้ออินดิเคเตอร์ โดยที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีแนวโน้มในการผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบในตารางที่ 3.1 ได้มากกว่า 5 สายพันธุ์ หรือ สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Staph. aureus, Lis. monocytogenes* เป็นต้น หรือ แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli, Salm. anatum* จะเป็นเชื้อเป้าหมายที่จะนำไปศึกษาต่อในการทดลองต่อไป

3.3.3 การตรวจสอบยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดสอบและการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้น

3.3.3.1 นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ทดสอบแล้วว่ามีการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ให้ผลบวกจากโซนใสที่ปรากฏในขั้นตอนการตรวจสอบหาเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ตามชนิดอาหารและสภาพการบ่มเพาะเชื้อที่ระบุในตารางที่ 3.1

3.3.3.3 ทำการถ่ายเชื้อที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในปริมาณ 0.2 % ลงในอาหาร LAA ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่หลอมเหลวใน water bath 50° ซ ทำการเขย่าให้เชื้อกระจายทั่ว LAA ด้วย vortex mixer อย่างรวดเร็วและเทให้ทั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผิวหน้าอาหาร Trypticase soy agar + 0.6 % yeast extract (TSAYE) รอจนอาหารแข็งตัว แล้วระเหยหยดน้ำที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.4 ทำการเหวี่ยงปั่นแยกเชื้อที่เจริญในข้อ 3.3.3.1 จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทำการปรับให้ได้ค่าพีเอชประมาณ 6.3-6.5 ด้วย 8 M HCl หรือ 5 N NaOH จากนั้นทำการกรองด้วย 0.20 μm pore-size sterile polysulfone membrane (Cica, Tokyo) นำส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อเก็บไว้ในหลอดปราศจากเชื้อและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8° ซ เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินต่อไป

3.3.3.5 ทำการเจือจางของเหลวที่ปราศจากเชื้อในข้อ 3.3.3.4 แบบ 2 fold dilution ให้ได้ในระดับที่พอเหมาะ (เจือจางประมาณ 10 ระดับ) นำตัวอย่างที่เจือจางได้ทั้งหมดและในทุกระดับความเจือจาง หยดลงบนอาหารที่เททับด้วยเชื้ออินดิเคเตอร์ในข้อ 3.3.3.3 ที่ต้องการทำการตรวจสอบในปริมาตร 10 μl ต่อระดับความเจือจางต่อแต่ละเชื้ออินดิเคเตอร์

3.3.3.6 รอจนหยดของเหลวที่จะตรวจสอบแบคเทอริโอซินบนผิวอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์แห้ง จึงทำการบ่มเพาะเชื้อแต่ละอินดิเคเตอร์ในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละอินดิเคเตอร์ตามตารางที่ 3.1

3.3.3.7 อ่านผลค่าการยับยั้งเชื้อ (titer) ตามระดับความเจือจางสูงสุดที่ของเหลวตัวอย่างปราศจากเชื้อที่ทำการทดสอบหาแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ต่าง ๆ ได้ (เริ่มจาก 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256) นำค่าความเจือจางที่ยับยั้งได้สูงสุดมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้ใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นค่า arbitary unit (AU) ต่อมิลลิลิตรของเหลวปราศจากเชื้อที่มาทำการทดสอบ

3.3.4 ศึกษาคุณสมบัติการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในกระเพาะอาหาร

3.3.4.1 การศึกษาดังกล่าวดัดแปลงมาจากวิธีของ Erkkilä และ Petäjä (2000) โดยการปรับพีเอชของ MRS broth ให้อยู่ในระดับ 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 ด้วย 8 M HCl and 5 N NaOH.

3.3.4.2 นำเชื้อที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีที่แยกจากไส้กรอกอีสาน และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (ผลิต pediocin PA-1), *Lactococcus lactis* strain N100 และ N190 (ผลิต nisin Z) ที่แยกได้จากแหนม รวมถึงแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์ 2 สายพันธุ์ซึ่งได้รับการเอื้อเฟื้อจากบริษัท ยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) และ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับพีเอชในระดับต่าง ๆ โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในแต่ละหลอดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในแต่ละระดับพีเอชประมาณ 1 x 10^6 cfu/ml บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.4.3 ตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในแต่ละระดับพีเอชของ MRS broth โดยการทำ 10 fold dilution pour plate technique ด้วย MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย (candle jar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.5 ศึกษาคุณสมบัติการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.1 การศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวดัดแปลงจากวิธีการศึกษาของ Gilliland และคณะ (1984) และ Erkkilä และ Petäjä (2000) โดยเตรียม MRS broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับ 0, 0.3, 0.6 และ 1.0 % และปรับค่าพีเอชของ MRS broth ทุกความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 8.0

3.3.5.2 นำเชื้อที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีที่แยกจากไส้กรอกอีสาน และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (ผลิต pediocin PA-1), *Lactococcus lactis* strain N100 และ N190 (ผลิต nisin Z) ที่แยกได้จากแหนม รวมถึงแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์ 2 สายพันธุ์ซึ่งได้รับการเอื้อเฟื้อจากบริษัท ยูเนี่ยน แคสแทป จำกัด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) และ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ทำการเติมเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในแต่ละหลอดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในแต่ละหน่วยที่ทำการทดสอบ ประมาณ 1 x 10^6 cfu/ml บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.5.3 ตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในแต่ละระดับพีเอชของ MRS broth โดยการทำ 10 fold dilution pour plate technique ด้วย MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย (candle jar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.6 ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ต่อการต้านสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคของคนและสัตว์

3.3.6.1 การศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวดำเนินการตามวิธีของ NCCLS (1999) ที่ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เชื้อโรคลำไส้ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนกรด-ด่าง และ เกลือน้ำดี มาเพาะเลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

3.3.6.2 นำเชื้อที่เจริญในข้อ 3.3.6.1 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน MRS agar โดยใช้วิธีเกลี่ยเพาะเชื้อให้ทั่วอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ โดยทำการเกลี่ยเชื้อละ 3 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.3.6.3 นำแผ่นสารปฏิชีวนะที่มักใช้ในการรักษาโรคในคนหรือสัตว์ในกลุ่มสารต่าง ๆ อันได้แก่ Gentamicin, Clindamycin, Cephalothin, Tetracycline, Chloramphenicol, Penicillin G, Sulphamethoxalzole, Oxacillin และ Erythromycin ซึ่งเป็นแผ่นสารปฏิชีวนะสำเร็จรูป จาก Oxoid มาวางลงบนจานเพาะเชื้อในข้อ 3.3.6.2 โดยใช้ 3 แผ่นของชนิดสารปฏิชีวนะต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ วางห่างกันพอประมาณ จนครบ 9 ชนิดสารปฏิชีวนะต่อเชื้อที่ทำการทดสอบ

3.3.6.4 นำจานเพาะเชื้อที่ทำการวางสารปฏิชีวนะที่ทำการศึกษาทั้งหมดไปบ่มภายใต้สภาวะที่มีอากาศน้อย (candle jar) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.6.5 ทำการอ่านผลดูการยับยั้งการเจริญรอบแผ่นสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ โดยเปรียบเทียบรัศมีการยับยั้งรอบแผ่นสารปฏิชีวนะกับค่าที่กำหนดใน NCCLS (1999) รายงานผลการยับยั้งที่มีรัศมีวงกว้างเป็น sensitive (S) รัศมีการยับยั้งปานกลาง เป็น intermediate (I) และไม่พบการยับยั้งเป็น resistant (R)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินและความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นใน MRS broth

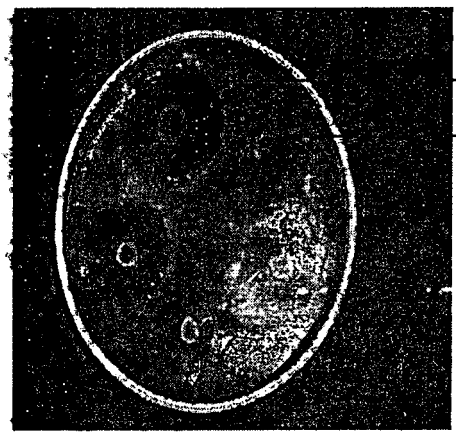
จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานที่จำหน่ายตามท้องตลาดในเขตลาดกระบังและอำเภอเมืองอุบลราชธานีจำนวน 10 ตัวอย่าง รวม 100 สายพันธุ์ มาทำการตรวจหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินกับเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้น 9 สายพันธุ์ เทียบกับ pediocin PA-1 producer (*P. pentosaceus* TISTR 536) nisin Z producer (*Lc. lactis* subsp. *lactis* N 100 และ N 190) ที่แยกได้จากแหนม และแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากอาหารสัตว์ของบริษัท ยูเนี่ยนแคสแทป (LAB 1 และ LAB 4) โดยวิธี direct method (ตารางที่ 4.1) ด้วยการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ BSM ซึ่งเป็นอาหารที่ดัดแปลงมาจาก MRS agar โดยการลดปริมาณน้ำตาลในอาหารและเพิ่มสารบัฟเฟอร์ในปริมาณมาก เพื่อให้มั่นใจว่า โซนใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อนั้น (ภาพที่ 1) เป็นโซนใสที่เกิดจากผลของแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น ไม่ใช่จากความเป็นกรดที่เชื้อผลิตขึ้นจากน้ำตาลที่มีในอาหาร (Swetwiwathana, 2005; Tichaczek และคณะ, 1992) พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานมีเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ RS-49 และ RS-54 ที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ตารางที่ 4.1 ผลการยับยั้งเชื้อจากสารแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากแหนม (TISTR536, N100 และ N190) และไส้กรอกอีสาน (RS-49 และ RS-54) ผลิตขึ้น เทียบกับเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหารสัตว์ (LAB1 และ LAB4)

Indicator strain	RS-49	RS-54	TISTR536	N100	N190	LAB1	LAB4
Enterococcus faecalis	+	+	+	+	+	-	-
Escherichia coli	+	+	+	+	+	-	-
Lactobacillus sakei subsp. *sakei*	+	+	+	+++	+++	-	-
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	+	+	-	-	-	-	-
Listeria innocua LTH 3096	++	++	++	+	+	-	-
Pediococcus pentosaceus JCM 5885	+	+	+	+++	+++	-	-
P. pentosaceus JCM 5890	-	-	+	++	++	-	-
Salmonella anatum	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	+	+	-	+	+	-	-

- = ไม่มีโซนของการยับยั้งเชื้อ
+ = มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อที่มีรัศมี 1-5 มม.
++ = มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อที่มีรัศมี 6-10 มม.
+++ = มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อที่มีรัศมี >10 มม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



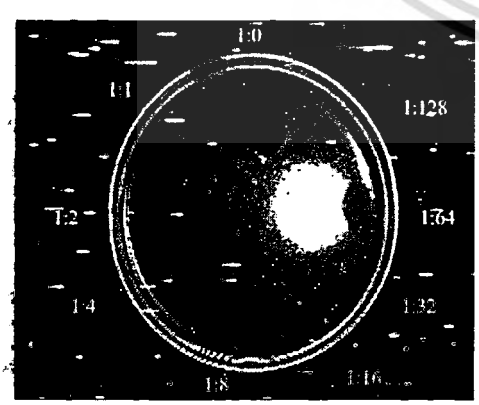
โคโลนีที่อาจมีการผลิตสารยับยั้งแบคเทอริโอซิน

โคโลนีที่ไม่ผลิตสารยับยั้งแบคเทอริโอซิน

ภาพที่ 4.1 : สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่มีโอกาสสร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินบนอาหารเพาะเชื้อ BSM

4.2 การตรวจสอบยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดสอบและการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้น

เมื่อนำเชื้อต่าง ๆ ที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อไทยทั้งสองชนิดมาตรวจสอบยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินโดยการปรับพีเอชของ MRS broth หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมงให้ได้พีเอชประมาณ 6.3-6.5 รวมทั้งหาปริมาณความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่แต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นในระหว่างเพาะเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการเจือจางส่วนใสของ MRS broth ที่ทำการปรับพีเอชและทำให้ปราศจากเชื้อหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ แบบ 2 fold dilution โดยดูการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่มากขึ้น (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.2) พบว่า แบคเทอริโอซิน ของ RS-49 และ RS-54 สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์เหมือนกันและในความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบอำนาจในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับ pediocin PA-1 ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 โดยมีความแตกต่างกันเล็กน้อยตรงที่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก RS-49 และ RS-54 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. pentosaceus* JCM 5885 *P. pentosaceus* JCM 5890 ^{T} และ *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124 ^{T} จึงเป็นไปได้ที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานสายพันธุ์ RS-49 และ RS-54 ซึ่งจากการศึกษารูปสัณฐานทางกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (gram positive rod) จะผลิตสารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม pediocin มากกว่าในกลุ่มไนซิน



ภาพที่ 4.2 : การตรวจยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินและการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักผลิตออกมาใน MRS broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 : ความเข้มข้น (arbitary unit, AU/ml) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากเทนมและไส้กรอกอีสานต่อเชื้ออินดิเคเตอร์ต่าง ๆ เมื่อบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Indicator	TISTR536	RS-49	RS-54	N100	N190
P. pentosaceus JCM 5885	400	0*	0*	200	800
P. pentosaceus JCM 5890 ^{T}	200	0*	0*	200	200
Lb. plantarum ATCC 8014	0	0	0	400	800
Lb. plantarum ATCC 14917 ^{T}	6,400	200	200	200	800
Lb. sakei subsp. *sakei* JCM 1157 ^{T}	6,400	400	400	3,200	6,400
Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 19435 ^{T}	0	0	0	100	200
Lc. lactis subsp. *lactis* JCM 7638	0	0	0	0	0
Lc. lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L	1,600	200	200	200	800
Leuconostoc mesenteroides JCM 6124 ^{T}	1,600	0*	0*	800	1,600
Micrococcus luteus IFO 12708	0	0	0	400	1,600
Listeria innocua ATCC 33090 ^{T}	3,200	400	400	400	1,600
Listeria innocua LTH 3096	6,400	400	400	400	800
Enterococcus faecalis JCM 5803 ^{T}	1,600	200	200	400	800
Kokuria varians LTH 1545	800	200	200	400	400
Staphylococcus carnosus LTH 2102	0	0	0	3,200	3,200
S. aureus subsp. *aureus* ATCC 12600 ^{T}	0	0	0	200	400
Bacillus circulans JCM 2504 ^{T}	0	0	0	1,600	6,400
B. coagulans JCM 2257 ^{T}	0	0	0	1,600	6,400
B subtilis JCM 1465 ^{T}	0	0	0	800	800
Escherichia coli JCM 109	0	0	0	0	0

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md; JCM, Japanese Culture of Microorganisms, Wako, Japan; JM, commercial strain from Toyobo, Osaka, Japan; LTH, Lebensmitteltechnologie Hohenheim University, Stuttgart, Germany; TUA, Tokyu University of Agriculture, Tokyo, Japan; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; WHO-BKK, World Health Organization, Salmonella-Shigella Center, Bangkok, Thailand.

* ความแตกต่างในการยับยั้งเชื้อเมื่อเทียบกับแบคเทอริโอซินจาก *P. pentosaceus* TISTR536

4.3 คุณสมบัติการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในกระเพาะอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของพีเอชที่ทำการปรับด้วยกรด (HCl) และ ด่าง (NaOH) ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินในกลุ่มที่คัดแยกได้จากอาหารหมักประเภทเนื้อ เช่น แหนม (TISTR 536, N 100 และ N 190) ไส้กรอกอีสาน (RS-49 และ RS-54) เทียบกับกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัทผลิตอาหารสัตว์ (LAB1 และ LAB4) (ตารางที่ 4.3) พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lb. acidophilus* (LAB1) ที่ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท และ *Lc. lactis* N100 และ N 190 ที่แยกได้จากแหนมในระดับ 3-5 x 10^6 cfu/มิลลิลิตร ไม่สามารถทนต่อกรดในระดับพีเอช 2 และ 3 ได้ ในระยะเวลาการบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แต่เชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถทนได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีพีเอช 4 และเชื้อทั้งสามดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 5-8 ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม *P. acidilactici* จากบริษัท (LAB4) *P. pentosaceus* TISTR 536 จากแหนม และ สายพันธุ์ RS-49 และ RS-54 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน ยังคงทนและตรวจพบในอาหาร MRS broth ที่พีเอช 2 และ 3 ได้เมื่อผ่านการบ่มไป 18 ชั่วโมง และเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ดี ในอาหาร MRS broth ที่มีค่าพีเอชตั้งแต่ 4 ขึ้นไป ซึ่งจากขั้นตอนการศึกษานี้ สามารถคัดเลือกในขั้นต้นได้ว่า หากจะมีการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มที่ผลิตแบคเทอริโอซินมาใช้ในการผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวต้องมีความสามารถในการทนกรดหรือเจริญได้ดีในช่วงที่เป็นกรดได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวจะต้องถูกบริโภคเข้าไปในกระเพาะอาหารของคนและสัตว์ก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ซึ่งสภาพของกระเพาะคนและสัตว์นี้ จะมีพีเอชอยู่ในช่วง 2-8 ตามแต่ปริมาณอาหารที่สัตว์บริโภคเข้าไปในขณะนั้น หรืออยู่ในสภาพที่มีการว่างเว้นจากการบริโภคอาหารนานเพียงใด กล่าวคือ ถ้าคนหรือสัตว์ท้องว่างเป็นเวลานาน สภาพพีเอชในกระเพาะซึ่งเกิดจากกรดเกลือ HCl จะมีปริมาณอาจมีความเป็นกรดสูง พีเอชต่ำได้ถึง 2 และถ้าคนหรือสัตว์มีการบริโภคอาหารมาก หรือมีการบริโภคอาหารบ่อย สภาพกรดเกลือในกระเพาะได้ทำปฏิกริยากับอาหารที่บริโภคเข้าไป ความเป็นกรดก็จะลดน้อยลง ค่าพีเอชก็จะสูงขึ้น ซึ่งค่าพีเอชที่ต่ำนี้ ถ้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกนี้สามารถทนสภาวะในช่วงพีเอชต่ำ ๆ ได้นานหรือสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชต่ำ ๆ ได้ดี จะทำให้เชื้อดังกล่าวมีโอกาสรอดอยู่ในปริมาณมากและเข้าสู่ลำไส้เล็กที่มีค่าความเป็นด่างสูง (พีเอชประมาณ 8) ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน เช่น *P.pentosaceus* TISTR 536 จากแหนม และเชื้อสองสายพันธุ์ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (RS-49 และ RS-54) รวมถึง สายพันธุ์ *P. acidilactici* ที่ได้จากบริษัทผลิตอาหารสัตว์ (LAB4) จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีโอกาสนำมาใช้ในการผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่จะนำมาใช้สำหรับอาหารคนหรืออาหารสัตว์ในโอกาสต่อไป

4.4 คุณสมบัติการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหาร

สำหรับการศึกษาถึงผลความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีต่อเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแหนม ไส้กรอกอีสาน และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารสัตว์ (ตารางที่ 4.4) พบว่า เชื้อที่ศึกษาทั้งหมดที่มีปริมาณเริ่มต้นในช่วง 3-5 x 10^6 cfu/มิลลิลิตร สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นในระดับ 0.3 % ใน MRS broth ที่บ่มในอุณหภูมิ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง ได้ดี แต่เชื้อ *P. acidilactici* (LAB4) จากอาหารสัตว์ สามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ดีที่สุด โดยที่เชื้อลดลงในหลอดเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.6 % เพียง 2 log cycle หลังจากบ่มที่ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง และเชื้อยังคงเหลือรอดในหลอด MRS broth ที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 1.0 % หลังจากการบ่ม 18 ชั่วโมงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิเดียวกัน ส่วนเชื้อ *Lb. acidophilus* (LAB1) ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่แยกได้จากแหนม จะมีความคงทนต่อสภาพเกลือน้ำดีรองลงมา กล่าวคือเชื้อทั้งสองสามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ในระดับ 0.6 % โดยยังพบเชื้อหลงเหลืออยู่หลังการบ่มที่ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้ออื่น ๆ ที่สร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแหนมและไส้กรอกอีสาน ตรวจไม่พบเชื้อในช่วงการบ่มที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าว เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงถึง 0.6 %

ตารางที่ 4.3 ผลของพีเอชกับเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ทำการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติก (เชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3-5 x 10^6 cfu/มิลลิลิตร) หลังการบ่มเพาะเชื้อใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง

Strain	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH6	pH 8
LAB 1	0	0	1.3×10^7	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
LAB 4	800	6.2×10^5	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
TISTR 536	100	2.5×10^5	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
N 100	0	0	1.0×10^6	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
N 190	0	0	1.2×10^6	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
RS-49	50	1.5×10^4	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
RS-54	50	2.1×10^4	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$

LAB 1 = *Lb. acidophilus*, LAB 4 = *P. acidilactici*, TISTR 536 = *P. pentosaceus*, N 100 and N 190 = *Lc. lactis*

RS-49 and RS-54 = gram positive rod (Unidentified species)

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงอาจสรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มที่คัดแยกได้จากอาหารสัตว์ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัททั้งสองสายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์โปรไบโอติก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAB4 ซึ่งนอกจากจะทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงได้ดีแล้ว เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวยังสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดที่พีเอชต่ำ ๆ ได้ดี และเจริญได้ที่พีเอช 4 ขึ้นไป จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถทนต่อความเป็นกรดในสภาพของกระเพาะอาหารของคนและสัตว์ได้ดีและมีโอกาสที่จะผ่านเข้าสู่ลำไส้ได้ในปริมาณมาก ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นสูง ๆ ได้ ซึ่งโดยปกติแล้ว ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารในช่วงปลายกระเพาะอาหารและช่วงต้นของลำไส้เล็กจะอยู่ระหว่าง 0.3-0.6 % (Fuller, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของเกลือน้ำดีกับเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ทำการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติก (เชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3-5 x 10^6 cfu/มิลลิลิตร) หลังการบ่มเพาะเชื้อใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 35-37° ซ 18 ชั่วโมง

Strain	bile salts concentration (%)			
	0	0.3	0.6	1.0
LAB 1	> 10^8	2.5 x 10^2	30	0
LAB 4	> 10^8	6.0 x 10^6	1.2 x 10^4	140
TISTR 536	> 10^8	7.2 x 10^4	170	0
N 100	> 10^8	5.5 x 10^2	0	0
N 190	> 10^8	2.4 x 10^2	0	0
RS-49	> 10^8	3.2 x 10^3	0	0
RS-54	> 10^8	2.7 x 10^3	0	0

LAB 1 = *Lb. acidophilus*, LAB 4 = *P. acidilactici*, TISTR 536 = *P. pentosaceus*, N 100 and N 190 = *Lc. lactis*
RS-49 and RS-54 = gram positive rod (Unidentified species)

สำหรับเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านไทยนั้น พบว่า สายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่แยกได้จากแหนม จะมีโอกาสใช้ในการผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมในอาหารคนและสัตว์ได้ เนื่องจากเชื้อดังกล่าวเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ทนสภาพความเป็นกรดที่พีเอชต่ำได้ดี เจริญได้ที่พีเอช 4 ขึ้นไป และทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีโดยเหลือรอดได้ใน MRS broth ที่มีเกลือน้ำดีสูงถึง 0.6 % ได้นาน 18 ชั่วโมง จึงเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งซึ่งอาจใช้เป็นประโยชน์ในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมในอาหารของคนและสัตว์มากกว่าอีกหลายสายพันธุ์ เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในระหว่างการเจริญ

4.5 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ต่อการต้านสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคของคนและสัตว์

จากการศึกษาการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีแนวโน้มใช้ผลิตเป็นโปรไบโอติกในอาหารคนและสัตว์ ซึ่งพบว่า แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่แยกได้จากแหนม และสองสายพันธุ์ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัทที่ผลิตอาหารสัตว์ คือ *Lb. acidophilus* (LAB1) และ *P. acidilactici* (LAB4) เป็นสายพันธุ์ที่มีความเป็นไปได้ต่อการนำไปผลิตเป็นอาหารโปรไบโอติก เนื่องจากทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้สูงและเจริญได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง ดังนั้น จึงได้นำทั้งสามสายพันธุ์มาทำการศึกษาถึงการต้านสารปฏิชีวนะที่มักใช้ในการรักษาโรคของคนและสัตว์ ได้แก่ Gentamicin, Clindamycin, Cephalothin, Tetracycline, Chloramphenicol, Penicillin G, Sulphamethoxalzole, Oxacillin และ Erythromycin ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลเสริมในโอกาสที่จะนำเชื้อกลุ่มดังกล่าวไปใช้เสริมรวมกับสารปฏิชีวนะที่เชื้อสามารถทนได้ และเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อให้การบริโภคอาหารเสริมโปรไบโอติกในคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสัตว์เป็นไปอย่างมีประโยชน์และมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการศึกษาการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อกลุ่มดังกล่าว (ตารางที่ 4.5) พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งสามสายพันธุ์สามารถต้านการทำลายของสารปฏิชีวนะ Sulphamethoxalzole ได้ นอกจากนี้ *Lb. acidophilus* (LAB1) ยังสามารถต้านการทำลายของ Tetracycline ได้ดี สำหรับ *P. acidilactici* (LAB4) สามารถต้านการทำลายของ Oxacillin และ Gentamycin ส่วน *P. pentosaceus* TISTR 536 นอกจากจะต้านการทำลายของ Sulphamethoxalzole, Oxacillin และ Gentamycin ได้เช่นเดียวกับ *P. acidilactici* (LAB4) แล้ว ยังสามารถต้านการทำลายของ Penicillin G อีกหนึ่งสารด้วย

ตารางที่ 4.5 การต้านสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกที่มีแนวโน้มในการใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหาร

เชื้อสายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ								
	P	OX	TE	DA	E	SXT	C	KF	CN
LAB 1	S	S	R	I	S	R	S	S	I
LAB 4	S	R	I	I	S	R	S	S	R
TISTR 536	R	R	I	S	S	R	S	S	R

LAB 1 = *Lb. acidophilus*, LAB 4 = *P. acidilactici*, TISTR 536 = *P. pentosaceus* TISTR 536

I = intermediate, R = resistant, S = sensitivity

P =Penicillin G, OX = Oxacillin, TE = Tetracycline, DA = Clindamycin, E = Erythromycin,

SXT = Sulphamethoxalzole, C = Chloramphenicol, KF = Cephalothin, CN = Gentamycin

นอกจากข้อมูลข้างต้นจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเชื้อแบคทีเรียแลกติกเป็นอาหารเสริมโปรไบโอติกควบคู่กับสารยับยั้งที่เชื้อสามารถต้านการถูกทำลายเพื่อประโยชน์ในการรักษาคนและสัตว์ที่จะบริโภคอาหารเสริมโปรไบโอติกอย่างมีประโยชน์แล้ว ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนให้แก่ผู้ผลิตที่อาจจะคิดผลิตอาหารเสริมเชื้อโปรไบโอติก กลุ่มดังกล่าวเพียงอย่างเดียว โดยอาจเป็นข้อมูลเสริมการขายในกรณีที่คนหรือสัตว์ที่บริโภคอาหารโปรไบโอติกดังกล่าวและมีการใช้สารในกลุ่มที่สามารถทำลายเชื้อโปรไบโอติกเหล่านี้ในการรักษาโรค ให้มีการบริโภคอาหารที่มีเชื้อโปรไบโอติกเพิ่มเติม หลังการหยุดให้สารปฏิชีวนะในการรักษา

4.6 สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารหมักไทยในกลุ่มไส้กรอกอีสาน 100 สายพันธุ์ เทียบกับแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มที่ผลิต pediocin PA-1 (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) และในกลุ่มที่ผลิต nisin Z (*Lactococcus lactis* N100 และ N190) ที่คัดแยกได้จากแหนม พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 2 สายพันธุ์ (RS-49 และ RS-54) ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่มีแนวโน้มในการผลิตแบค- เทอริโอซินมายับยั้งเชื้อในกลุ่มอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยสารที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้แตกต่างจาก pediocin PA-1 และ nisin Z ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองของไทย กล่าวคือ *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactis* N100 และ N190 ที่แยกได้จากแหนม และ RS-49 และ RS-54 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานมาทำการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลองของการทนสภาพความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่อาจพบได้ในกระเพาะและลำไส้ของมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไป เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติการผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถทนสภาพต่าง ๆ ในกระเพาะและลำไส้ได้ดี อันมีผลจ่อเนื่องต่อความเป็นไปได้ของการนำเชื้อกลุ่มดังกล่าวไปผลิตเป็นอาหารสัตว์โปรไบโอติก เทียบกับเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่ผสมในอาหารสัตว์ที่จำหน่ายทางการค้าจากบริษัท พบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิต pediocin PA-1 ซึ่งคัดแยกได้จากแหนมเป็นเชื้อที่ทนต่อสภาพความเป็นกรดต่ำได้นาน กล่าวคือ เหลือรอดอยู่ในช่วงพีเอช 2-3 ได้มากและเจริญได้ในช่วงพีเอช 4-8 ได้ดี พอ ๆ กับ *P. acidilactici* (LAB4) ที่ได้จากบริษัท นอกจากนี้ เชื้อสายพันธุ์ที่ผลิต pediocin PA-1 ดังกล่าวยังสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่สูงได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทยด้วยกันสายพันธุ์อื่น ๆ คือ เชื้อดังกล่าวสามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.6 % ที่พีเอช 8 ได้นานถึง 18 ชั่วโมง พอ ๆ กับ *P. acidilactici* (LAB4) และ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1) และเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ สามารถทนต่อการทำลายของสารปฏิชีวนะในกลุ่ม penicillin, oxacillin, sulphamethoxalzole และ gentamycin ดังนั้น *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิต pediocin PA-1 ซึ่งคัดแยกได้จากแหนม จึงเป็นเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีแนวโน้มในการผลิตร่วมใช้ในอาหารคนกรืออาหารสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นเชื้อเสริมในอาหารที่ให้คุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในอนาคต

4.7 เอกสารอ้างอิง

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ฐิติพงศ์ ธนะรัชตีการนนท์. 2540. การใช้แลกติกแอสิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่. จุฬาวิจัย. 6(6) : 10-13.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2541. เปรียบเทียบการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทางการค้าบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่บ่มในสภาพบรรยากาศต่าง ๆ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 16 (2) : 15-22.

De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic and Professional Publishers, London.

Erkkilä, S., and Petäjä, E. 2000. Screening of Commercial Meat Starter Cultures at Low pH and in the Presence of Bile Salts for Potential Probiotic Use. Meat Science. 55 : 297 – 300.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. J. Appl. Bacteriol. 66 : 365 – 378.

Gilliland, S. E., and Speck, M. 1977. Deconjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 15 – 18.

Goldin, B., and Gorbach, S. 1992. Probiotics for Humans. In : R. Fuller, Probiotics – the scientific basis (pp. 335 – 376). London : Chapman and Hall.

Hammes, W. P., and Knauf, H. J. 1994. Starters in the Processing of Meat Products. Meat Sci. 36 : 155 - 168.

Hammes, W. P., and Tichaczek, P. S. 1994. The Potential of Lactic Acid Bacteria for the Production of Safe and Wholesome Food. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 198 : 193 - 201.

Lilly,D.M., and Stillwell, R.H. 1965. Probiotic : Growth Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science. 147 : 747 – 748.

Lotong, N., Sunthornandh, P., Daengsubha, W., and Utarapichat, O. 1987. Microbial Quality and Safety of the Traditional Fermented Pork : ii. Selection of Salmonella-inhibiting Lactic Acid Bacteria for Nham Fermentation. ASEAN-Thailand Food Technology Research and Development Project, Annual Report.

Lotong, N., and Swetwiwathana, A. 1990. Microbial Quality and Safety of the Traditional Fermented Pork II : Production of Salmonella-free Nham using Starter Cultures. Report of ASEAN-Thailand Food Technology Research and Development Project 1985-1990. p. 87 - 97.

Lücke, F. -K., and Hechelmann, H. 1987. Starter Cultures for Dry Sausage and Raw Ham. Fleischwirtschaft. 67 : 307 – 314.

NCCLS. 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS document M31-A. NCCLS, Wayne, Pa.

Parker, R.B. 1974.Probiotic, the other half of the antibiotics story . Amm.Nutr&Health. 29 : 4-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Swetwiwathana, A. 2005. Microbiological Quality Enhancement of Thai Fermented Meat Product (Nham) Using Nham –associated Pediocin-producing Lactic Acid Bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536). Ph.D. Thesis. Laboratory of Microbial Technology, Division of Microbial Science and Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, Japan.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2003. Screening of Bacteriocin-producing Bacteria Associated in Nham (Traditional Thai Fermented Meat). The 49th International Congress of Meat Science and Technology ((ICoMST) Proceeding. P. 322 - 324. August 31 – September 5, 2003. Sao Paulo, Brazil.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2004. Identification of Pediocin PA-1 Producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 Isolated from Nham (Thai Fermented Meat). The 50th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) Proceeding (in CD). August 8-13, 2004 Helsinki, Finland.

Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., and Hammes., W. P. 1992. Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH 673. System. Appl. Microbiol. 15 : 460 - 468.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

51st International Congress
of Meat Science and Technology

2005 USDA

Book of Abstracts

Baltimore, Maryland USA
August 7–12, 2005

Exploring the Wide World of Meat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

Table of Contents

Monday, August 8, 2005

POSTER PRESENTATIONS

Animal Welfare and Environment 1

Consumer Topics 4

Meat and Meat Product Quality Session I – Genetics, Feeding, Pre-rigor 4

Production Systems and Meat Quality Session I 24

Production Systems and Meat Quality Session II 31

Tuesday, August 9, 2005

POSTER PRESENTATIONS

Meat Processing and Packaging Session I 39

Meat Processing and Packaging Session II 48

Meat Safety Session I 60

Meat and Meat Product Quality Session II – Instrument Grading, Muscle Characterization, Consumers 70

Meat Safety Session II 85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thursday, August 11, 2005

POSTER PRESENTATIONS

Meat and Meat Product Quality Session III – Flavor, Enhancement, Microbiological Quality 93

Muscle Biology and Biochemistry Session I 109

Muscle Biology and Biochemistry Session II 117

RECIPROCATION SESSIONS

Reciprocation Session I - Allergen Control 126

Reciprocation Session II - Best Practices for SRM Removal 126

Reciprocation Session IV - Pork Quality 127

Reciprocation Session VI - Physiological Beef Maturity 127

Friday, August 12, 2005

POSTER PRESENTATIONS

Meat and Meat Product Quality Session IV – Oxidation and Stability 128

Author Index 143

Sponsor Information 149

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Monday, August 8, 2005

POSTER PRESENTATIONS

Animal Welfare and Environment

M1 Effect of chassis vibration during road transport on cattle welfare and meat quality. M. Honkavaara*[1], E. Helynranta[2], J.P. Ylönen[3], and T. Pudas[3]. [1]*Finnish Meat Research Institute, Hämeenlinna, Finland,* [2]*Meat Processing Company Atria Oy, Nurmo, Finland.* [3]*University of Oulu, Oulu, Finland*

Eighteen transports of a total of 486 animals were carried out by commercial vehicles. Journey time was from 0.3 to 13.2 hours. Chassis vibration was measured as vertical acceleration by a vibration logger installed on the frame of the vehicle. The heart rate of six animals was monitored on each journey. Vibration and heart rate data were stored every minute and combined for regression analysis. Welfare was evaluated by heart rate, blood serum creatine kinase activity (CK) before and after transport, and occurrence of carcass bruisings after slaughter. Meat quality was measured by post mortem pH value and tenderness. The measured accelerometer values indicated road quality differences between animal collection and transport of the fully loaded vehicle to the abattoir. During collection-related driving on small roads vibration was higher than during driving the full loaded vehicle on highways. Chassis vibration was lower in winter than in summer, perhaps due to the snow cover of the small roads near the farms. In most cases chassis vibration had no significant effect on the heart rate of cattle. Only 10 significant correlations between heart rate and vibration were found in the received data on 47 cattle. Nine correlations were positive ($r = 0.27 - 0.83$, $P<0.05 - 0.001$). But there was one negative correlation in one bull that developed DFD meat ($r = -0.37$, $P<0.001$). Moreover, it had the highest increase in CK activity from farm to unloading, and had slight bruising of the back. In this work, the occurrence of carcasses without any damages was highest after long transports (8 - 14 hours), lower after medium (3 - 8 hours) and lowest after short transports (0.3 - 3 hours). In this study, animals with a positive correlation between chassis vibration and heart rate produced normal meat quality. Ultimate pH value and tenderness of the *M. longissimus dorsi* varied from 5.56 to 5.66 and from 2.7 to 8.6 kg/cm^2, respectively. This suggests that from the animal welfare and meat quality point of view, external factors like animal handling at the farm, during loading, transport, unloading and lairage are more significant than chassis vibration during transport.

Key Words: Cattle transport, Vibration, Heart rate, Meat quality

M2 Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Thai fermented min acidic broth and the presence of bile salts for probiotic prospect. A. Swetwiwathana*[1], N. Srisuk[2], L. Sangsuk[3], N. Lotong[2], J. Nakayama[4], and K. Sonomoto[4]. [1]*King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, Thailand.* [2]*Kasetsart University, Bangkok, Thailand.* [3]*National Institute of Health, Nonthaburi, Thailand.* [4]*Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan.*

A probiotic is a culture of living microorganisms mainly lactic acid bacteria (LAB) or bifidobacterium. The colonisation of these strains in human and animals' gut prevents the growth of harmful bacteria by competitive exclusion and by the production of organic acids and antimicrobial compounds such as bacteriocins. In order to act as a probiotic, a strain must be able to survive the acidic conditions in the stomach and resist the bile acids at the beginning of small intestine. Since there are many LAB strains, which isolated from thai fermented meat products and revealed to produce bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). Thus, the survival or tolerant in the low pH and the presence of bile salts in MRS of three strains of BLIS-producing LAB isolated from thai fermented meat Nham designated as *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *Lactococcus lactis* strain N100 and N190 was studied and compared to those of two known non bacteriocin-producing LAB (*Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*) obtained from private animal feed company. The results revealed that both strains of *P. acidilactici* obtained from animal feed company and *P. pentosaceus* TISTR 536 isolated from Nham could grow in MRS broth under pH 4 – 8 and survive in MRS broth under pH 2 and 3 at 30°C for 18 h, while the other strains showed no survival under pH 2 and 3 at the same incubated condition. Both of *P. pentosaceus* TISTR 536 and *P. acidilactici* could also tolerate to the high concentration of bile salt in MRS broth (pH 8.0) up to 0.6 and 1.0 % respectively. These 2 strains implied the resistance to a wide range of clinical important antibiotic such as Gentamicin, Penicillin G Sulphamethoxazole and Oxacillin. The natural antibiotics resistance of these LAB, especially the bacteriocin-producing strain *P. pentosaceus* TISTR 536, may enable the development of antibiotic/probiotic combination therapies for such conditions as diarrhea and gastro-intestinal tract infection when using these strains as probiotic products.

Key Words: Bacteriocin-producing lactic acid bacteria, Probiotic, Thai fermented meat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

51st International Congress of Meat Science and Technology
August 7-12, 2005 – Baltimore, Maryland USA

SCREENING OF BACTERIOCIN-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THAI FERMENTED MEAT IN ACIDIC BROTH AND THE PRESENCE OF BILE SALTS FOR PROBIOTIC PROSPECT

Adisorn Swetwiwathana[1], Nanthana Srisuk[2], Leelawadee Sangsuk[3], Napha Lotong[2], Jiro Nakayama[4], and Kenji Sonomoto[4]

1. Department of Agro-industry, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) Bangkok, 10520 Thailand. *Email-address . adisorns@hotmail.com*
2. Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand.
3. National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Tiwanont rd., Nonthaburi, 11000. Thailand.
4. Laboratory of Microbial Technology, Division of Microbial Science and Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agricultural Graduate School, Kyushu University. 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

Key Words: bacteriocin-producing lactic acid bacteria, probiotic, Thai fermented meat

Introduction

A probiotic is a culture of living microorganisms mainly lactic acid bacteria (LAB) or bifidobacterium. The colonisation of these strains in human and animals' gut prevents the growth of harmful bacteria by competitive exclusion and by the production of organic acids and antimicrobial compounds such as bacteriocins etc (Fuller, 1989).

The acid and bile tolerances are two fundamental properties that indicate the ability of a probiotic microorganism to survive the passage through the gastrointestinal tract, resisting the acidic conditions in the stomach and the bile acids at the beginning of small intestine (Goldin and Gorbach, 1992; Holzapfel et al., 1998). The survival of bacteria in gastric juice depends on their ability to tolerate low pH. The pH of excreted HCl in stomach is 0.9. However, the presence of food raises the pH value to the level of pH 3. After the ingestion of food, it takes 2-4 h for the stomach to empty (Erkkilä and Petäjä, 2000).

For those bacteria that survive the environmental conditions of the stomach, the further challenge is bile secretion and bile salts in duodenum. Bile salts , which act as detergent-like substance, are synthesized from cholesterol in the liver, stored in the gall bladder, and released into the small intestine after ingestion of a fatty meal. This detergent is critical to microorganisms since their cell membranes are composed of lipids and fatty acids. However, some microorganisms are able to reduce this detergent effect by their ability to hydrolyse bile salts by bile salts hydrolase enzyme (BSH) and thus to decrease their solubility (Erkkilä and Petäjä, 2000). BSH activity has been found in many species including *Lactobacillus* (Gilliland and Speck, 1977). However, the resistance to bile salts varies a lot between the *Lactobacillus* species and even between strains, and the mechanism is still unknown (Erkkilä and Petäjä, 2000). The mean of bile salts as a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

critical concentration for the screening of a resistant probiotic strain is considered to be 0.3 % w/v (Gilliland, Stanley and Bush, 1984; Goldin and Gorbach, 1992).

Objectives

Since there are many LAB strains, which were isolated from thai fermented meat products (Nham) and revealed to produce bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) (Swetwiwathana et al, 2003). Thus, the aim of this study was to select BLIS-producing strains isolated from thai fermented meat products which could survive or tolerate the low pH and the presence of bile salts in MRS broth for potential probiotics use in human and animals. In addition, antibiotic susceptibility test of all studied LAB was also included in this study.

Methodology

Microorganisms :

- 3 strains of BLIS-producing LAB isolated from Nham [*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *Lactococcus lactis* strain N100 and N190] (Swetwiwathana et al, 2003).
- 2 LAB strains of *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) and *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) obtained from Union Castap Co.Ltd., Bangkok, Thailand.

Medium : MRS broth (Merck) was used for culturing of all LAB strains, **MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$** was used for LAB viable cells count and **MRS agar without $CaCO_3$** was used for study on antibiotic susceptibility for each studied LAB.

Effect of pH on the growth of LAB : A modified method of Erkkilä and Petäjä (2000) was applied in this study. Approximately 10^6 cfu/ml aliquot of an overnight LAB cultured was inoculated into an experimental series of 10 ml MRS broth with the following pH : pH to 2, 3, 4, 5, 6 and 8 (adjusted using 8 M HCl and 5 N NaOH). The tubes were incubated at 30° C for 18 h. The viable organisms in each pH broth were counted after 18 h of incubation on MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$ and incubated for 48 h at 30° C.

Effect of bile salts on the growth of LAB : A modified method of Gilliland et al. (1984) and Erkkilä and Petäjä (2000) was used in the study. Approximately 10^6 cfu/ml aliquot of an overnight LAB cultured was inoculated into an experimental series of 10 ml MRS broth (pH 8.0) with the concentration of 0, 0.3, 0.6 and 1.0 % bile salts. All tubes were incubated at 30° C for 18 h. The viable organisms of each bile salts concentration in MRS broth were counted after 18 h of incubation on MRS agar + 0.5 % $CaCO_3$ and incubated for 48 h at 30° C.

Antibiotic susceptibility test of LAB : Antimicrobial susceptibility of all studied LAB was determined by the disk-diffusion method with 9 clinically important antibiotics

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

from Oxoid (Gentamicin, Clindamycin, Cephalothin, Tetracycline, Chloramphenicol, Penicillin G, Sulphamethoxalzole. Oxacillin and Erythromycin) in accordance with the standard of the NCCLS (NCCLS, 1999).

Results & Discussion

Effect of pH on the growth of all studied LAB.

An initial load of 10^6 cfu/ml of each strain from 3 isolated strains of potent BLIS-producing LAB from Nham [*P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactis* strain N100 and N190] and 2 LAB strains [*Lb. acidophilus* and *P. acidilactici*] obtained from animal feed company were studied for ability to grow and tolerate acid in MRS broth under various pH (2 – 8) for 18 h at 30° C (Table 1). The results revealed that at pH 4 the number of cell of both strains of *Lc. lactis* (N100 and N 190) still remained at inoculated level, but both strains could grow well in MRS broth under pH 5 - 8. *Lb.* acidophilus and *P. acidilactici* (LAB 4) obtained from animal feed company, and *P. pentosaceus* TISTR 536 isolated from Nham could grow in MRS broth under pH 4 – 8. Both strains of *P. acidilactici* (LAB 4) and *P. pentosaceus* TISTR 536 could tolerate to the broth under pH 3 (a log cycle reduction of cell number) and pH 2 (cell number reduced from 10^6 cfu/ml to 10^2 cfu/ml) for 18 h of incubation at 30° C, while 3 strains of *Lb. acidophilus* (LAB 1) and *Lc. lactis* (N 100 and N 190) showed no growth under pH 2 and 3 at the same incubation period.

Table 1 : Number of lactic acid bacteria (initial load of 10^6 cfu/ml) after incubation for 18 h at 30° C in MRS broth at various pH

Strain	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH6	pH 8
LAB 1	0	0	1.3×10^7	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
LAB 4	800	6.2×10^5	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
TISTR 536	100	2.5×10^5	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
N 100	0	0	1.0×10^6	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$
N 190	0	0	1.2×10^6	$> 10^8$	$> 10^8$	$> 10^8$

LAB 1 = *Lb. acidophilus*, LAB 4 = *P. acidilactici*, TISTR 536 = *P. pentosaceus*
N 100 and N 190 = *Lc. lactis*

The results revealed that the strains of *P. acidilactici* (LAB 4) and *P. pentosaceus* TISTR 536 proved to be most acid tolerant. Little or no effect was seen at pH 3 with both

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

strains and the cells still remained under pH 2 for 18 h. The results are similar to those obtained by Erkkilä and Petäjä (2000) and Goldin et al (1992), who regarded *L. curvatus* (RM10), *P. acidilactici* (P2) and *Lactobacillus* GG as potentially probiotics. By this regard, it is implied that these 2 strains can be acted as probiotics.

Effect of bile salts on the growth of LAB

Study on the effect of bile salts on the growth of all studied LAB (Table 2) revealed that all studied LAB strain could tolerate to 0.3 % of bile salts in MRS broth. *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) exerted the most tolerant to the high concentration of bile salts (1.0 %). No effect was seen in MRS broth with 0.3 % bile salts after 18 h of incubation at 30° C, while the cell number of other strains were reduced to 2-4 log cycle in the same bile salts concentration. *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) and *P. pentosaceus* TISTR 536 could tolerate to 0.6 % bile salts at the same incubation period, but the strain exhibited a lower cell number when compared to the broth inoculated with *P pentosaceus* TISTR 536. There was no growth showed in the series broth of 0.6 and 1.0 % bile salts concentration for both strains of *Lc. lactis* N100 and N190.

Regarded to the earlier report of Gilliland et al. (1984) who stated that 0.3 % bile salts was the critical concentration for probiotics screening tolerant strains. Thus, all LAB strains in this study implied to be probiotics. However, from the aforementioned results of acid tolerant and high concentration of bile salts tolerant, both strains of *Pediococcus* spp (LAB 4 and TISTR 536) tend to be the best probiotics for human and animal when compared to the other strains.

Table 2 : Number of lactic acid bacteria (initial load of 10^6 cfu/ml) after incubation for 18 h at 30° C in MRS broth with 0, 0.3, 0.6 and 1.0 % of bile salts

Strain	bile salts concentration (%)			
	0	**0.3**	**0.6**	**1.0**
LAB 1	$> 10^8$	2.5×10^2	30	0
LAB 4	$> 10^8$	6.0×10^6	1.2×10^4	140
TISTR 536	$> 10^8$	7.2×10^4	170	0
N 100	$> 10^8$	5.5×10^2	0	0
N 190	$> 10^8$	2.4×10^2	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antibiotic susceptibility test of LAB.

For antibiotic susceptibility test (Table 3), it was revealed that all studied LAB could resist to Sulphamethoxazole. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 was the most resisted to a panel of tested antibiotics. The strain resisted to Gentamicin, Penicillin G, Sulphamethoxalzole and Oxacillin. *P. acidilactici* (LAB 4) resisted to Gentamicin, Oxacillin and Sulphamethoxalzole. Three strains of *Lb. acidophilus* (LAB 1) and *Lc. lactis* (N 100 and N 190) resisted only to Tetracycline and Sulphamethoxalzole.

Table 3 : Antimicrobial susceptibility of LAB

Strain	antibiotic								
	P	OX	TE	DA	E	SXT	C	KF	CN
LAB 1	S	S	R	I	S	R	S	S	I
LAB 4	S	R	I	I	S	R	S	S	R
TISTR 536	R	R	I	S	S	R	S	S	R
N 100	S	S	R	S	I	R	S	S	I
N 190	S	S	R	S	S	R	S	S	I

I = intermediate, R = resistant, S = sensitivity
P =Penicillin G, OX = Oxacillin, TE = Tetracycline, DA = Clindamycin, E = Erythromycin.
SXT = Sulphamethoxalzole, C = Chloramphenicol, KF = Cephalothin, CN = Gentamycin

With the results of the toleration to acid, high concentration of bile salts and antimicrobial agents of both strains of *Pediococcus* spp., we are confident to inform that both of these strains can be used as probiotics for humans and animals. Moreover, *P. pentosaceus* TISTR 536, which recently reported to produce pediocin PA-1 (Swetwiwathana et al., 2004) and resisted to wide range of clinically important antibiotics, may effective the development of antibiotic/probiotic combination therapies for such conditions as diarrhea and gastro-intestinal tract infection of various food-borne pathogens. These 2 strains have been taken into account in our further studies.

Conclusions

From this study, it is implied that two strains of *P. acidilactici* (LAB 4)obtained from animal feed company and bacteriocin-producing *P. pentosaceus* TISTR 536 isolated from Nham can be used for humans and animals as probiotic traits, due to the survival of both strains in the acidic conditions as presence in the stomach and resist the bile salts as presence at the beginning of small intestine. The natural resistance of these LAB to a wide range of clinically important antibiotics may enable the development of antibiotic/probiotic combination therapies for such conditions as diarrhea and gastro-intestinal tract infection, when using these strains as probiotic products.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acknowledgements

We thank Union Castap Co.Ltd., Bangkok, Thailand, for the strains support in this study. This work was supported by some grants from JSPS-NRCT

References

Erkkilä, S., and Petäjä. E. 2000. Screening of Commercial Meat Starter Cultures at Low pH and in the Presence of Bile Salts for Potential Probiotic Use. Meat Science. 55 : 297 – 300.

Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. J. of Appl. Bacteriol. 66 : 365-378.

Gilliland, S. E., and Speck, M. 1977. Deconjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli. Appl Environ. Microbiol. 33 : 15 – 18.

Gilliland, S., Staley, T., and Bush, L. 1984. Importance of Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as Dairy Adjunct. J. of Dairy Sci. 67 : 3045 – 3051.

Goldin, B., and Gorbach. S. 1992. Probiotics for Humans. In : R. Fuller, Probiotics – the scientific basis (pp. 335 – 376). London : Chapman and Hall.

Goldin, B., Gorbach, S., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., and Salminen, S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (Strain GG) in Human Gastrointestinal Tract. Digestive Diseases and Sciences. 37 : 121 – 128.

Holzapfel, W., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J. 1998. Overview of Gut Flora and Probiotics. Inter. J. of Food Microbiol. 41 : 85 – 101.

NCCLS. 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS document M31-A. NCCLS, Wayne, Pa.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2003. Screening of Bacteriocin-producing Bacteria Associated in Nham (Traditional Thai Fermented Meat). The 49th International Congress of Meat Science and Technology Proceedings Volume II. August 2003. Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2004. Identification of Pediocin PA-1 Producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 Isolated from Nham (Thai Fermented Meat). The 50th International Congress of Meat Science and Technology Proceedings. 8 – 13 August 2004. Helsinki. Finland.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้