

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 และ K7
เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม

PROBIOTIC PROPERTIES OF *Lactobacillus salivarius* K4 AND K7 AS
STARTER CULTURES FOR NHAM FERMENTATION



T110439



ฉพ.
วิ 468๓
2553

ตงหมุ.....
เลขทะเบียน **110439**
วัน,เดือน,ปี **- 2 พ.ย. 2553**

b. 122 56225
i.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-AG-M-101-057

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PROBIOTIC PROPERTIES OF *Lactobacillus salivarius* K4 AND K7 AS
STARTER CULTURES FOR NHAM FERMENTATION**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KMITL-2010-AG-M-101-057 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2010

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นการใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อ	คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ <i>Lactobacillus salivarius</i> K4 และ K7 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักแทนม
นักศึกษา	นางสาวรัชฎา นราแก้ว
รหัสประจำตัว	50065806
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2553
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. กมลแข พิลาสมบัติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ. ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน

บทคัดย่อ

Lactobacillus salivarius K4 และ K7 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ และสามารถสร้างสารแบคทีริโอซินไปยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 และศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกทำการศึกษาศามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส pH 4 การมีชีวิตรอดที่ pH 2, 2.5, 3 และ 3.5 การมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับน้ำดีสังเคราะห์ (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี ox-bile ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ และการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองที่น้ำย่อยของกระเพาะ pH 2, 3, 4 และ 7 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ผลทดลองพบว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH 3-3.5 ส่วน *Lb. salivarius* K7 สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH 2.5-3.5 น้ำดี ox-bile และน้ำดีไก่สดมีผลทำให้เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำดีสังเคราะห์ได้ ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถเจริญได้เล็กน้อย และเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยจำลองที่ pH 3, 4 และ 7 เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว สามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะ ไปถึงลำไส้จำลองได้ นอกจากนี้ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ยังสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียทำการศึกษา ความสามารถในการทนต่อไนไตรท์ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ศึกษาผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตแหมมเนื้อโค และยืนยันการตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR ผลการทดลอง พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถเจริญในสถานะที่มีไนไตรท์ได้ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถเจริญในสถานะที่มีไนไตรท์ได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 จากแบบจำลองการหมักแหมมที่เติมและไม่เติมกระเทียม มีการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน ในแบบจำลองการหมักแหมมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ดีที่สุดในเมื่อเทียบกับแบบจำลองการหมักแหมมที่เติมกระเทียม หรือกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียว การใช้กล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตแหมมเนื้อโค พบว่าในผลิตภัณฑ์แหมมที่มีการเติมกล้าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูง และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ให้ต่ำลงรวดเร็วกว่าแหมมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่ค่า pH ในช่วง 4 วันของการหมักยังคงมีค่าสูงกว่า 4.5 และเมื่อดูประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 พบว่าเมื่อทำการหมักแหมมเป็นเวลา 0-5 วันยังคงตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

การยืนยันผลการตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ในแบบจำลองการหมักแหมม และตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในตัวอย่างแหมมจริง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อที่ต้องการตรวจหาดังกล่าว ผลการทดลองพบว่าสามารถพบเชื้อทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวจากแบบจำลองการหมัก เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณเชื้อที่ตรวจพบมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับการตรวจเชื้อ โดยวิธีทางจุลชีววิทยา แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อ โดยใช้เทคนิค Real-time PCR จะตรวจพบเชื้อในปริมาณที่สูงกว่า ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากตัวอย่างแหมมจริงไม่สามารถกระทำได้นี้เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดอื่นๆ ที่พบมากในแหมมด้วย

Thesis Title	Probiotic Properties of <i>Lactobacillus salivarius</i> K4 and K7 as Starter Culture for Nham Fermentation
Student	Miss Thanrada Narakaew
Student ID.	50065806
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2010
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Komkhae Pilasombut
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nualphan Ngamyeesoon

ABSTRACT

Lactobacillus salivarius K4 and K7 were isolated from chicken intestine. These 2 strains produced bacteriocins against several bacteria. According to the effective inhibiting activities of these strains, its probiotic properties were therefore, further studied. The inhibition activity of cell free supernatant (CFS, pH 4) against indicator strains and strains survival *in vitro* study were determined at pH 2, 2.5, 3 and 3.5, concentration of bile salts at 0, 0.3, 0.6 and 1%, concentration of ox-bile at 0, 3, 6, 9 and 12%, and also fresh chicken bile in MRS at 3%. The percentage of cell survival in gastrointestinal tract model was performed at pH 2, 3, 4 and 7. Besides, antibiotic susceptibility for these strains was also study. Its antimicrobial activity showed that these strains inhibited both gram positive and negative in CFS. *Lb. salivarius* K4 could survive at pH 3-3.5, while *Lb. salivarius* K7 could survive at pH 2.5-3. These strains could survive in ox-bile concentration up to 12%. However, in the presence of 3% chicken bile revealed slightly decreased in cell number. *Lb. salivarius* K4 no survival was found in bile salts. These strains survived in gastrointestinal tract model at pH 3, 4 and 7. On the contrary, *Lb. salivarius* K4 and K7 were completely destroyed in the presence of gastric juice at pH 2. *Lb. salivarius* K4 and K7 was resistant to Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin and Streptomycin. This study indicated that *Lb. salivarius* K4 and K7 could be used as probiotic for food-industry in the future.

The effect of nitrite 100 ppm on growth of *Lb. salivarius* K4 and K7 was investigated.

The result found that these 2 strains could survive in the presence of nitrite lower than in control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

group. However, *Lb. salivarius* could grow in the presence of nitrite better than *Lb. salivarius* K4.

In order to investigate whether the rapid reduction of salmonellae concerned to the use of starter culture or the synergistic inhibitory effect between starter culture and garlic on salmonellae during Nham fermentation, an inhibitory effect of *Lb. salivarius* K4 or K7 and 5% of sterile fresh garlic on *S. Typhimurium* TISTR 292 which is contaminated in Nham product has been studied in the sterile condition of Nham Model Broth (NMB) with the same water activity value as Nham (0.97). The results confirmed that NMB fermented with 5% fresh garlic and *Lb. salivarius* K4 and K7 exhibited the best diminishment of *S. Typhimurium* TISTR 292 (within 24 hr of fermentation) compared to NMB with 5% fresh garlic or fermented with *Lb. salivarius* K4 or K7 alone.

The effect of *Lb. salivarius* K7 as starter culture on growth of salmonellae in Nham fermented with *Lb. salivarius* K7 and naturally fermented products (without using starter culture) was investigated. It was found that all Nham samples with starter cultures exerted a higher percentage of lactic acid and led to more rapid in pH reduction than those samples without starter cultures. However, pH value of Nham with *Lb. salivarius* K7 was higher than 4.5 in day 4 of fermentation. This can be explained that Nham fermented with starter culture revealed no inhibitory effect on *S. Typhimurium* TISTR 292 during Nham fermentation.

To analyze amount of *Lb. salivarius* K4 or K7 and *S. Typhimurium* TISTR 292 from Nham Model Broth and Nham products 16S rRNA genes were amplified from the DNA extract from all bacteria and analyzed by real-time PCR. Nham Model Broth was shown to contain these three strains using the 16S rRNA gene-based real-time PCR assay and the standard plate count method. The 16S rRNA gene-based real-time PCR assay could not detect *S. Typhimurium* TISTR 292 which is contaminated in Nham products but shown to contain this strain using standard plate count method.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับได้ออย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ. ดร. กมแข พิตาสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ. ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ส่งเสริมในเรื่องการเรียน และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ โดยความร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และ สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์ สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร และอาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณอังคณา ทุมดี คุณฉันทวัฒน์ อาชวาคม คุณพรชัย เหลืองวารี คุณอรุณวรรณ อินทร์ช่วย คุณปรมาภรณ์ เจ็ดวรรณะ และคุณภูวนาท สิงห์ขรณ์ รวมทั้งนักวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัย ทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องข้อมูล คำปรึกษา คอยให้กำลังใจ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ชาย และน้องสาว ที่คอยเป็นกำลังใจ เป็นที่ปรึกษาและให้การสนับสนุนในทุกเรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ธัญดา นราแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XI
สารบัญตารางผนวก.....	XIII
สารบัญภาพ.....	XVII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 วิวัฒนาการของแนวคิดเกี่ยวกับโปรไบโอติก.....	4
2.2 คำจำกัดความของโปรไบโอติก.....	4
2.3 คุณสมบัติของโปรไบโอติก.....	6
2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก.....	13
2.5 คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ <i>Lactobacillus salivarius</i>	16
2.6 การนำโปรไบโอติกไปใช้เป็นก้ำเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ.....	21
2.7 แหนม.....	22
2.8 Real-Time Polymerase Chain Reaction.....	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	26
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก.....	31
3.2.2.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด น้ำดีสังเคราะห์ และน้ำดี ox-bile.....	31
3.2.2.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีไก่สด....	31
3.2.2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7.....	31
3.2.2.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	32
3.2.2.5 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง.....	32
3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย.....	33
3.2.3.1 การทดสอบผลของการใช้ในไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักແມ່ນ.....	33
3.2.3.2 การทดสอบผลของการใช้กระเทียมและ <i>Lb. salivarius</i> K4 หรือ K7 ที่มีต่อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักແມ່ນ.....	33
3.2.3.3 การทดสอบผลของการใช้ <i>Lb. salivarius</i> K7 ที่มีต่อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในผลิตภัณฑ์ແມ່ນเนื้อโค	34
3.2.3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของตัวอย่างແມ່ນเนื้อโค.....	35
3.2.4 การตรวจสอบปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 และ <i>Lb. salivarius</i> โดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	36
3.2.4.1 การสกัด DNA ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 และ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักແມ່ນ.....	36
3.2.4.2 การสกัด DNA ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากตัวอย่างແມ່ນเนื้อโค.....	37
3.2.4.3 ไพรมเมอร์.....	37
3.2.4.4 ปฏิกริยา Real-time PCR.....	38
3.2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณ DNA เริ่มต้น.....	39
3.2.5 การวางแผนการทดลอง.....	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	42
4.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในคนและสัตว์.....	42
4.1.1 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด.....	42
4.1.2 ความสามารถในการเจริญในน้ำดีสังข์ ox-bile และน้ำดีไก่สด.....	42
4.1.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ โดยสาร ยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7.....	46
4.1.4 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการ ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ.....	48
4.1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะและลำไส้ จำลอง.....	51
4.2 ผลของการศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย.....	55
4.2.1 ผลของการใช้ในไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหนม.....	55
4.2.2 ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญ และการสร้างกรดแลคติกของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหนม.....	57
4.2.3 ผลของการใช้กระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K4 หรือ K7 ที่มีต่อการ เจริญของ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหนม.....	60
4.2.4 ผลของการใช้เชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ในการผลิตแหนม.....	65
4.2.4.1 ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนม.....	65
4.2.4.2 ค่า water activity ของผลิตภัณฑ์แหนม.....	67
4.2.4.3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของแหนมเนื้อโค.....	69
4.3 ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 จากแบบจำลองการ หมักแหนมโดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	71
4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R	71
4.3.2 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R.....	74
4.3.3 การทดสอบความไวของ Real-time PCR ในการตรวจจับ DNA.....	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.4 การออกแบบไพรเมอร์ K7F และ K7R.....	76
4.3.5 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ K7F และ K7R	79
4.3.6 การทดสอบความไวของ Real-time PCR ในการตรวจจับ DNA.....	80
4.3.7 ผลการตรวจปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 จากแบบจำลองการหมักหมมที่ทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน.....	82
4.4 ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมม โดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	89
4.4.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 16SF และ 16SR.....	89
4.4.2 การทดสอบความไวของ Real-time PCR ในการตรวจจับ DNA.....	90
4.4.3 ผลการใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และกระเทียม.....	91
4.4.4 ผลการใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และกระเทียม.....	94
4.4.5 ผลของการใช้เทคนิค Real-time PCR ต่อการวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกในหมมเนื้อโค.....	98
4.4.6 ผลของการใช้เทคนิค Real-time PCR ต่อการวิเคราะห์เชื้อ <i>Salmonella</i> ในหมมเนื้อโค.....	99
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	102
บรรณานุกรม.....	104
ภาคผนวก.....	114
ภาคผนวก ก.....	115
ภาคผนวก ข.....	124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

ประวัติผู้เขียน

หน้า

162



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คำจำกัดความของโปรไบโอติก.....	5
3.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	30
3.2	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 และ <i>Lb. salivarius</i>	38
3.3	แสดงการทำปฏิกิริยา Real-time PCR สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7.....	38
3.4	แสดงการทำปฏิกิริยา Real-time PCR สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292	39
4.1	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 เมื่อสัมผัสกับอาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH 2, 2.5, 3, 3.5 อาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของน้ำดี bile salts และอาหารเหลว MRS ที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ.....	44
4.2	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7.....	50
4.3	ความสามารถของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ.....	51
4.4	ค่า pH ของแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมและไม่เติมกระเทียม.....	58
4.5	ค่า pH ของแบบจำลองการหมักเหนมที่ใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4	63
4.6	ค่า pH ของแบบจำลองการหมักเหนมที่ใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7.....	64
4.7	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกระหว่างการหมักเหนมเนื้อโค.....	66
4.8	ค่า Water activity ของผลิตภัณฑ์เหนมเนื้อโค.....	69
4.9	ผลของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในเหนมเนื้อโค.....	71
4.10	ปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 จากแบบจำลองการหมักเหนมที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี Spread plate.....	84
4.11	แสดงปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 จากแบบจำลองการหมักเหนมที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี Real-time PCR.....	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.12	ปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 จากแบบจำลองการหมักแหนมที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี Spread plate.....	87
4.13	ปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 จากแบบจำลองการหมักแหนมที่ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	88
4.14	ปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแหนมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread plate.....	92
4.15	ปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแหนมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	93
4.16	ปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแหนมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread plate.....	95
4.17	ปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแหนมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	96
4.18	เทคนิค Real-time PCR ต่อการวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลกติกในแหนมเนื้อโค	99
4.19	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Salmonella</i> จากแหนมเนื้อโค 25 กรัม โดยวิธี positive-negative test	101
4.20	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Salmonella</i> จากแหนมเนื้อโค 25 กรัม โดยเทคนิค Real-time PCR.....	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก

ตาราง ผนวกที่		หน้า
ข1	ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการทนกรด	125
ข2	ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการเจริญ ในสภาวะที่มี bile salts ความเข้มข้นต่างๆ.....	125
ข3	ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการเจริญ ในสภาวะที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ.....	126
ข4	การเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ.....	126
ข5	การเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ.....	127
ข6	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในกระเพาะจำลองที่ pH 2 และค่าไส้จำลอง.....	128
ข7	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในกระเพาะจำลองที่ pH 3 และค่าไส้จำลอง.....	126
ข8	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในกระเพาะจำลองที่ pH 4 และค่าไส้จำลอง.....	130
ข9	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในกระเพาะจำลองที่ pH 7 และค่าไส้จำลอง.....	131
ข10	ผลของการใช้ไนโตรที่ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb.</i> <i>salivarius</i> K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักเหวม.....	132
ข11	ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ใน แบบจำลองการหมักเหวม.....	132
ข12	ค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติม และไม่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ <i>Lb.</i> <i>salivarius</i> K4.....	133
ข13	ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมและไม่เติมกระเทียม ร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4.....	133
ข14	ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ใน แบบจำลองการหมักเหวม.....	133
ข15	ค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติม และไม่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ <i>Lb.</i> <i>salivarius</i> K7.....	134

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากทางมหาวิทยาลัยฯ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก (ต่อ)

ตาราง ผนวกที่		หน้า
ข16	ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมและไม่เติมกระเทียม ร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7.....	134
ข17	ผลของการใช้กระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K4 ที่มีต่อการเจริญของ <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหวม.....	135
ข18	ค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหวมที่มีการเจริญของ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ที่เติมและไม่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และกระเทียม.....	136
ข19	ผลของการใช้กระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K7 ที่มีต่อการเจริญของ <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหวม.....	137
ข20	ค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหวมที่มีการเจริญของ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ที่เติมและไม่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และกระเทียม.....	138
ข21	ค่า Water activity ของเหวมและเหวมที่เติมกล้ำเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7.....	139
ข22	ค่า pH ของเหวมและเหวมที่เติมกล้ำเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7.....	140
ข23	เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของเหวมและเหวมที่เติมกล้ำเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7....	141
ข24	ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกระหว่างการหมักเหวม.....	142
ข25	แสดงปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 จากแบบจำลองการหมักเหวมที่ทำการ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	143
ข26	แสดงปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 จากแบบจำลองการหมักเหวมที่ทำการ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR.....	144
ข27	แสดงปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหวม ที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	145
ข28	แสดงปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหวม ที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	146
ข29	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ในแบบจำลอง การหมักเหวม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate.....	147

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก (ต่อ)

ตาราง ผนวกที่		หน้า
ข30	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ในแบบจำลองการหมักเหนม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR.....	148
ข31	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate.....	149
ข32	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR.....	150
ข33	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate.....	151
ข34	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR.....	152
ข35	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate.....	153
ข36	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR.....	154
ข37	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	154
ข38	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	155
ข39	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	155

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก (ต่อ)

ตาราง ผนวกที่		หน้า
ข40	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	155
ข41	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	156
ข42	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	156
ข43	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	157
ข44	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	157
ข45	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	158
ข46	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	158
ข47	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	159
ข48	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	159
ข49	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	160
ข50	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate.....	160
ข51	แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	161
ข52	แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR.....	161

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เซลล์ของ <i>Lb. salivarius</i> CRL 1098 ที่ถูกทดสอบด้วยกรดน้ำดี.....	8
2.2	ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้.....	11
2.3	การยึดเกาะกับเยื่อผิวกระเพาะพักของ ไก่ของ <i>Lb. salivarius</i> CTC 2197.....	19
4.1	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่ เวลาต่างๆ.....	45
4.2	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่ เวลาต่างๆ.....	46
4.3	การอยู่รอดผ่านกระเพาะ และลำไส้จำลองของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 เมื่อเลี้ยง ในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ.....	54
4.4	การอยู่รอดผ่านกระเพาะ และลำไส้จำลองของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 เมื่อเลี้ยง ในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ.....	55
4.5	ผลของ ไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ในแบบจำลองการหมักเหนม.....	56
4.6	ผลของ ไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม.....	57
4.7	จำนวนเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และปริมาณการสร้างกรดแลกติกในแบบจำลอง การหมักเหนมที่เติมและไม่เติมกระเทียม.....	59
4.8	จำนวนเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 และปริมาณการสร้างกรดแลกติกในแบบจำลอง การหมักเหนมที่เติมและไม่เติมกระเทียม.....	60
4.9	จำนวนเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมัก เหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4.....	63
4.10	จำนวนเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมัก เหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7.....	64
4.11	ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก และค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ เหนม.....	67
4.12	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA.....	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.13	ผลผลิต PCR ของยีน 16S rRNA ขนาด 151 bp โดยใช้ไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R.....	74
4.14	ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 โดยใช้ไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ในปฏิกิริยา Real-time PCR.....	75
4.15	ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 โดยใช้ไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ในปฏิกิริยา Real-time PCR.....	76
4.16	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA.....	77
4.17	ผลผลิต PCR ของยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R.....	79
4.18	ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (310 bp) ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพ a) และแสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA กับ copy number ของยีน 16S rRNA (ภาพ b).....	81
4.19	ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (310 bp) ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพ a) และแสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA กับ copy number ของยีน 16S rRNA (ภาพ b).....	82
4.20	ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 จากแบบจำลองการหมัก แหนม.....	86
4.21	ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp ของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 จากแบบจำลองการหมัก แหนม.....	89
4.22	ผลผลิต PCR ของยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR.....	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.23	ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (402 bp) ของเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพ a) และแสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA กับ copy number ของยีน 16S rRNA (ภาพ b).....	91
4.24	ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp ของเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแทนที่เดิมชื่อ <i>Lb. salivarius</i> K4.....	94
4.25	ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp ของเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแทนที่เดิมชื่อ <i>Lb. salivarius</i> K7.....	97

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น นมเปรี้ยว ซีอิ้ว แหนม ไส้กรอก สัตว์น้ำที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก ผัก และผลไม้ดอง (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และมนุษย์ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. salivarius* เป็นต้น (Slover. 2008) โดยแบคทีเรียดังกล่าวช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ปนเปื้อนมาในผลิตภัณฑ์ ด้วยสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่สร้างขึ้น เช่น กรดอะซิติก เอทานอล สารประกอบอะโรมาติก และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Leroy and De Vuyst. 2004)

Lb. salivarius เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จัดเป็น microflora ที่ช่วยในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ และยังพบว่า *Lb. salivarius* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* ยังจัดเป็นสารชีวภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารแทนการใช้สารเคมีได้อีกด้วย (Robredo and Torres. 2000)

จากการศึกษาเบื้องต้นของ Pilasombut (2006) ซึ่งได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ 2 สายพันธุ์คือเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน โดย *Lb. salivarius* K4 สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ Salivaricin B และ Salvicin K นอกจากนี้ยังพบยีนแบคเทอริโอซินที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับแบคเทอริโอซิน abp118 β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 Pilasombut et al. (2005) รายงานว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *E. faecalis* JCM 5803^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T นอกจากนี้ Pilasombut et al. (2006) พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สร้างแบคเทอริโอซิน abp118 β และสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *B. coagulans* JCM 2257^T ดังนั้นจากคุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มเติม โดยศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปร

ไบโอดีท และการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เพื่อที่จะนำเชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าวไปใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ และอุตสาหกรรมการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ มีความปลอดภัยทางด้านอาหาร และความสม่ำเสมอด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งปัจจุบันพบว่ายังมีการใช้ไม่แพร่หลายนัก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการเป็นโปรไบโอดีท
- 2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการนำมาเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์หมัก
- 3) เพื่อศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อในการผลิตหมัก

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

- 1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- 2) ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอดีทของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 โดยทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรด การเจริญในสภาวะที่มีน้ำดี bile salts, ox-bile และน้ำดีไก่ การเจริญในกระเพาะและลำไส้จำลอง ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียของเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวในแบบจำลองการหมักหมักของเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวโดยศึกษาความสามารถในการทนต่อไนไตรท์ ผลของกระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ผลของเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวร่วมกับกระเทียมและไนไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วจึงทำการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติดีที่สุดมา 1 ชนิดเพื่อใช้ในการหมักหมัก รวมทั้งศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางจุลชีววิทยา และการตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิค real-time PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบคุณสมบัติของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการเป็นโปรไบโอติก
- 2) สามารถนำเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในແຫນມ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิวัฒนาการของแนวคิดเกี่ยวกับโปรไบโอติก

Vasiljevic and Shah (2008) ได้อ้างคำกล่าวของ Ilya Metchnikoff ว่า ชาวชนบทของประเทศบัลแกเรีย มีอายุขัยเฉลี่ย 87 ปี และทุกๆ หนึ่งในพันคนจะมีอยู่ 4 คนที่มีอายุเกิน 100 ปี ทั้งนี้ความแตกต่างของวิถีชีวิตของพวกเขาที่สำคัญอย่างหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับคนในสมัยเดียวกันคือ คนส่วนใหญ่จะบริโภคนมหมัก โดย Metchnikoff ให้ข้อเสนอว่า ร่างกายมนุษย์จะมีสารพิษเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยที่สารพิษที่มีอยู่ในร่างกายถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อก่อโรคในลำไส้ และความต้านทานของร่างกายจะอ่อนแอลงเนื่องจากการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วของเชื้อเหล่านั้น ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการบริโภคนมเปรี้ยวและแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ซึ่ง เสาวนีย์ ธรรมสัจฉิ (2547) รายงานว่า ความนิยมและยอมรับการรักษาสุขภาพเช่นนี้เกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากแต่เดิมยังขาดข้อมูลหลักฐานประกอบสรรพคุณที่ชัดเจน อีกทั้งยังเชื่อว่าหากใช้เกินขนาดอาจทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคอีกด้วย ต่อมาเมื่อมีข้อมูลหลักฐานที่เชื่อถือได้มากขึ้น จึงเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป

2.2 คำจำกัดความของโปรไบโอติก

คำว่า “probitics” ตรงข้ามกับคำว่า “antibiotic” เป็นคำที่มาจากภาษากรีกคือ $\pi\rho\omicron$ และ $\beta\iota\omicron\tau\omicron\varsigma$ แปลว่า เพื่อชีวิต (for life) โปรไบโอติกมีหลายนิยามด้วยกัน (ตารางที่ 1) (Vasiljevic and Shah. 2008) โดยสรุปคือ โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือแร่ในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติก และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (อัจฉรา เพิ่ม. 2550)

ตารางที่ 2.1 คำจำกัดความของโปรไบโอติก

ปี ค.ศ.	คำจำกัดความ
1953	โปรไบโอติกอยู่ในอาหารประเภทผักในรูปของวิตามิน สารอะโรมาติก เอนไซม์ และสารอื่นๆ ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญของร่างกาย
1954	โปรไบโอติกตรงกันข้ามกับสารปฏิชีวนะ
1955	ผลกระทบที่เป็นอันตรายของสารปฏิชีวนะสามารถป้องกันได้โดยการรักษาด้วยโปรไบโอติก
1965	สารชนิดหนึ่งที่ถูกหั่นออกมาโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งแล้วไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ
1971	สารที่สกัดออกมาจากเนื้อเยื่อซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์
1973	สารประกอบที่ก่อให้เกิดความต้านทานต่อการติดเชื้อของเจ้าบ้าน แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง
1974	จุลินทรีย์และสารที่ช่วยให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
1992	จุลินทรีย์มีชีวิตที่ใช้เสริมลงในอาหารแล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยช่วยให้สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ดีขึ้น
1992	จุลินทรีย์ที่มีชีวิตชนิดเดียวหรือหลายชนิด ที่นำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์หรือมนุษย์ มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยช่วยปรับปรุงคุณสมบัติที่มีอยู่เดิมของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น
1996	จุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์นม ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและให้โภชนาการแก่เจ้าบ้าน
1996	จุลินทรีย์มีชีวิต ที่เมื่อได้รับในปริมาณที่แน่นอนจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ
1999	เซลล์จุลินทรีย์หรือส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและความปลอดภัยของเจ้าบ้าน
2001	ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในจำนวนที่เพียงพอ ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์เดิมของเจ้าบ้านและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านที่ได้รับเข้าไป
2002	จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vasiljevic and Shah (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

2.3.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกคือได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยต่อ
 รับประทาน (generally recognized as safe : GRAS) (Taranto *et al.* 2006)

2.3.2 ทนต่อสารหลังในระบบทางเดินอาหาร

การที่จะให้ผลที่เป็นประโยชน์ต่อรับประทานได้นั้น โปรไบโอติกต้องสามารถที่จะอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้ และมีปริมาณเพียงพอที่จะไปถึงลำไส้ใหญ่ นั่นหมายถึงว่าเชื้อโปรไบโอติกต้องทนกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ของกระเพาะอาหาร อยู่รอดและเจริญในสถานะที่มีกรดน้ำดี (Piano *et al.* 2006)

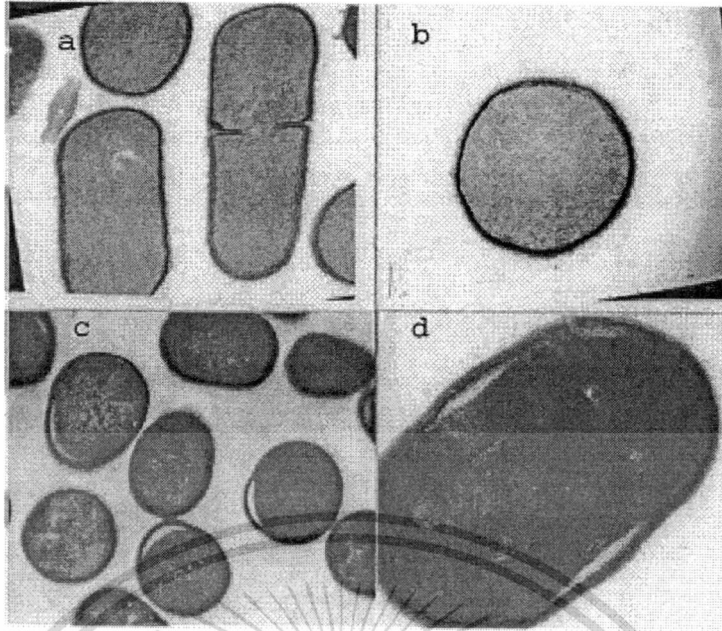
2.3.2.1 การอยู่รอดในระหว่างผ่านกระเพาะอาหาร

ผลที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์เดิมหรือสุขภาพที่แข็งแรงของสัตว์รับประทาน คือแบคทีเรียที่ยังคงอยู่รอดในระหว่างการลำเลียงผ่านกระเพาะและลำไส้ (Zárate *et al.* 2000) แต่ก่อนที่จะไปถึงลำไส้แบคทีเรียต้องผ่านกระเพาะซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการผ่านเข้าไปถึงลำไส้ (Morelli, 2007) น้ำย่อยที่ถูกหลั่งออกมาจากกระเพาะอาหารทุกวันเป็นสาเหตุในการทำลายจุลินทรีย์ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นความทนต่อน้ำย่อยจึงเป็นหลักการคัดเลือกโปรไบโอติกที่สำคัญ (Vinderola and Reinheimer, 2003; Succì *et al.* 2005) การอยู่รอดของของแบคทีเรียในน้ำย่อยของกระเพาะขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ถูกหลั่งออกมาจากกระเพาะอาหารมีพีเอช 0.9 เมื่อมีอาหารค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นถึงระดับพีเอช 3 เมื่ออาหารเข้าสู่ร่างกายจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะ 2-4 ชั่วโมง Lactobacilli ที่เจริญในไส้กรอกหมักอยู่รอดได้ดีกว่า Lactobacilli ที่สัมผัสกับพีเอชต่ำโดยตรง เนื่องจากไส้กรอกหมักประกอบด้วยเนื้อและไขมันห่อหุ้ม Lactobacilli ไว้ (Erkkilä and Petäjä, 2000) นอกจากนี้ Zárate *et al.* (2000) กล่าวว่า skim milk และ cheese juice ในหลอดทดลองให้ผลในการป้องกัน การเพิ่มพีเอชของน้ำย่อย เพิ่มการอยู่รอด และการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ของ propionibacteria Klingberg and Budde (2006) กล่าวว่า ความทนในกระเพาะอาหารของแบคทีเรียมีความจำเพาะกับรับประทานและมีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นเมื่อให้เชื้อแบบหมักในไส้กรอกหมัก

2.3.2.2 ความทนต่อกรดน้ำดี

เชื้อจุลินทรีย์เดิมที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารต้องเผชิญกับน้ำดีซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึม โคลเลสเตอรอลในตับ และมีบทบาทสำคัญในการย่อยไขมันเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแอมฟิพาติก (Taranto *et al.* 2006) น้ำดีจัดเป็นดีเทอร์เจนต์ต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยไขมันและกรดไขมัน อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยเกลือน้ำดีได้ด้วยเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) การละลายของเกลือไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำดีจึงลดลงทำให้ความเป็นดีเทอร์เจนต์ของเกลือน้ำดีลดลง การทำงานของ BSH พบในหลายสปีชีส์รวมทั้ง *Lactobacillus* การทนต่อน้ำดีมีความผันแปรมากระหว่างสายพันธุ์และชนิดของ *Lactobacillus* (Erkkilä and Petäjä. 2000) นอกจากนี้กรดน้ำดีสารผสม (conjugated bile acids) จะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแบบใช้และไม่ใช้อากาศที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารได้น้อยกว่ากรดน้ำดีอิสระ (free bile acids) การอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำดีสูงต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ เพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เช่น ระบบตอบสนองต่อความเครียด และการควบคุมกระบวนการทรานสคริปชันซึ่งมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ การเผาผลาญพลังงาน การขนส่งกรดอะมิโน และกรดไขมันหรือไอโซพรีน (Taranto *et al.* 2006) การทดสอบความทนต่อน้ำดีโดยทั่วไปจะทำการทดสอบด้วย porcine bile หรือ bovine bile (oxgall) 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Piano *et al.* 2006) ความสามารถในการอยู่รอดต่อการทำงานของน้ำดีเป็นหลักการทำงานที่ใช้เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ (Morelli. 2007) Taranto *et al.* (2006) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ deoxycholic acid (DCA) ซึ่งเป็นน้ำดีอิสระ และ taurine-conjugated (TDCA) ซึ่งเป็นน้ำดีสารผสมต่อ *Lb. reuteri* CRL 1098 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก พบว่า เซลล์ที่ทดสอบด้วย TDCA (ภาพที่ 1b) มีลักษณะเหมือนกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกทดสอบด้วยน้ำดี คือ เห็นขอบเขตของผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ชัดเจน (ภาพที่ 1a) ในขณะที่เซลล์ที่ทดสอบด้วย DCA เกิดความผิดปกติขึ้นที่โครงสร้างของผิวเซลล์ ที่เห็นได้ชัดคือ เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากผนังเซลล์ (ภาพที่ 1c-1d)



ภาพที่ 2.1 เซลล์ของ *Lb. reuteri* CRL 1098 ที่ถูกทดสอบด้วยกรดน้ำดี

- (a) กลุ่มควบคุม
- (b) ถูกทดสอบด้วย Taurodeoxycholate (conjugated bile acid)
- (c) และ (d) ถูกทดสอบด้วย deoxycholate (free bile acid)

ที่มา : Taranto *et al.* (2006)

2.3.3 สร้างสารที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ในอุตสาหกรรมอาหารหมักดองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย (starter culture) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการผลิต โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างกรด (rapid acidification) จากสารตั้งต้น (substrate) ผลผลิตที่ได้โดยส่วนใหญ่จะเป็นกรดแลคติก นอกจากนี้ยังสามารถสร้างกรดอะซิติก เอทานอล (ethanol) สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการผลิตสารดังกล่าวขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมด้วย นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารทดแทนการใช้สารเคมี เช่น โปแทสเซียมไนเตรด เป็นต้น จากการสร้างเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กหรือที่เรียกว่า แบคทีริโอซิน ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการสร้างวิตามินซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหาร การเลือกใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคได้อีกด้วย ดังนั้นการคัดเลือกและพัฒนาเชื้อเริ่มต้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (Leroy and De Vuyst, 2004) สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.1 การผลิตแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซิน คือสารประกอบประเภทโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย ซึ่งสร้างได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์สายเล็กๆ เป็นสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นบางชนิดได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแกรมบวกบางชนิดที่มีความจำเพาะน้อย จึงทำให้มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ ได้หลายชนิดมากขึ้น รวมทั้งชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และชนิดที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ด้วย จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารได้

2.3.3.2 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เนื่องจากการสร้างกรดอินทรีย์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก จะสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติกและกรดอะซิติก เป็นต้น เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของซบสเตรตต่ำลง ความเป็นกรดสูงและพีเอชต่ำ จึงมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545) Swetwivathana *et al.* (1999) กล่าวว่า กรดแลคติกที่สร้างจากคาร์โบไฮเดรตโดยตระกูลของ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. จะทำให้ pH ต่ำลง และไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว

2.3.3.3 การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

Otero and Nader-Macias (2006) ได้ทำการศึกษาการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ภายหลังการคลอด ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจาก *Lb. gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องคลอดของโค กระบือ พบว่า *Lb. gasseri* สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ปริมาณมาก เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ร่วมกับ *S. aureus* พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง การเจริญของ *S. aureus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดแลคติกที่หลั่งออกมาโดย *Lactobacilli* จะสามารถทำลายเซลล์ของ *S. aureus* ได้

2.3.3.4 การเกิดเอทานอล

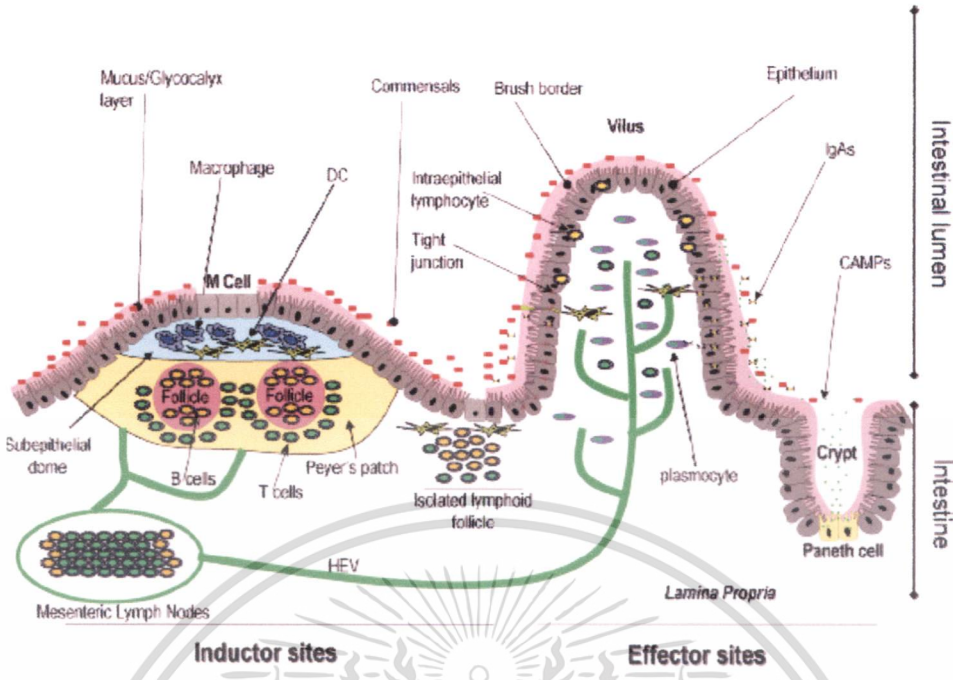
สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) รายงานว่า การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมน เททิฟในสภาวะที่ไม่มีอากาศทำให้เกิดเอทานอลขึ้น เอทานอลเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันเหนือแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต แม้ว่าเอทานอลที่เกิดขึ้นไม่มากนักก็ตาม นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีก แต่มีความสำคัญน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิต จนมีผลทำให้พีเอชของซบสเตรตลดลงมาอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 แลคติกเป็นกรดที่มีราคาแพงและนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผลิตอาหารและยา

2.3.4 การยึดเกาะกับลำไส้

ความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้เป็นหลักการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกที่สำคัญ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของสัตว์เจ้าบ้าน เช่นการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคหรือการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (Rinkinen *et al.* 2003) การยึดเกาะกับลำไส้ของโปรไบโอติกเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการสร้างโคโลนี เมื่อไปถึงลำไส้โปรไบโอติกต้องเกาะติดกับ brush border ของ microvilli หรือยึดเกาะกับชั้นเยื่อเมือก (mucus layer) โดยไม่ถูกปิดออกจากลำไส้ใหญ่จากการเคลื่อนไหวแบบ peristalsis องค์ประกอบของผิวเซลล์แบคทีเรียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์เยื่อเมือกในลำไส้ การยึดเกาะกับลำไส้มีนุษย์ของ *Lactobacilli* เกี่ยวข้องกับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่แตกต่างกัน บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบนี้มีผลต่อการยึดเกาะของ *Lactobacilli* กับเซลล์ของคลอดด้วย ซึ่งต่างกับกรด lipoteichoic ที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของ *Lactobacilli* กับเซลล์เยื่อเมือกของระบบขับถ่ายปัสสาวะ (Fernández *et al.* 2003) จากการศึกษาของ Fernández *et al.* (2003) พบว่าการยึดเกาะของ *Lb. gasseri* เกี่ยวข้องกับโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (อาจเป็นไกลโคโปรตีน) ในขณะที่ *Lb. acidophilus* จะขึ้นอยู่กับคาร์โบไฮเดรต และมีความสามารถในการยึดเกาะกับ caco-2 cells ได้แตกต่างกันมากในระหว่างสปีชีส์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rinkinen *et al.* (2003) ที่พบว่าคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลคติกมากกว่าชนิดของสัตว์เจ้าบ้าน

2.3.5 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์

สามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) แกมมาอินเตอร์เฟอรอน (gamma interferon) และส่งเสริมกิจกรรมของแมโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) โปรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ เนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อเมือก และถัดมาจนถึงเซลล์กล้ามเนื้อ (Madara. 1997) โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้โดยตัวโปรไบโอติก หรือชิ้นส่วนของโปรไบโอติก หรือสารเมตาบอไลต์ที่โปรไบโอติกสร้างขึ้น เรียกสิ่งเหล่านี้ว่า แอนติเจน เมื่อแอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อเมือก เป็น M cells (Laissue *et al.* 1993) M cells สามารถจับแอนติเจน เซลล์เยื่อเมือกที่ตายแล้ว (apoptosis) หรือแบคทีเรียจากช่องว่างในลำไส้ แล้วส่งเข้าไปยัง sub-epithelial dome ของ Peyer's patches เพื่อให้ถูกทำลายไปโดยแมโครฟาจ ดังภาพที่ 2 (Magalhaes *et al.* 2007)



ภาพที่ 2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้

ที่มา : Magalhaes *et al.* (2007)

2.3.6 ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

อัจฉรา เพิ่ม (2550) รายงานว่า บทบาทของ โคเลสเตอรอลในเลือด หากมีระดับสูงเกินไป มักจะทำให้คนเสี่ยงเส้นเลือดหัวใจอุดตันมากขึ้น แต่คนที่มีโคเลสเตอรอลสูง มักจะได้รับคำแนะนำให้พยายามลดระดับลง โดยมีงานวิจัยส่วนหนึ่งยืนยันว่าการใช้ *Lactobacillus* จะช่วยได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำกับคนและใช้สัตว์ทดลองอีกชนิดหนึ่ง คือ หมู ในปี พ.ศ. 2517 มีการวิจัยเกี่ยวกับชนเผ่ามาชายในแอฟริกา เพื่อศึกษาผลของอิมัลซิฟาย ที่เติมลงในน้ำมันต่อระดับโคเลสเตอรอล ผลการวิจัยแสดงว่า สารอิมัลซิฟายไม่ช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอล แต่น้ำมันที่ผ่านการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus* สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ ไม่ว่าจะเติมสารอิมัลซิฟายหรือไม่เติม ต่อมามีการวิจัยใน พ.ศ. 2522 โดยใช้กลุ่มอาสาสมัคร พบว่า เมื่อกลุ่มนี้บริโภคนมสดหรือไม่ได้บริโภคผลิตภัณฑ์นมหมัก โคเลสเตอรอลจะไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อบริโภคโยเกิร์ตติดต่อกัน 1 อาทิตย์ ระดับโคเลสเตอรอลจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด

จากการศึกษาของ Liong and Shah (2004) พบว่า ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจะมีระดับคอเรสเตอรอลต่ำ เนื่องจากการผลิตน้ำดีในตับของคนและสัตว์ใช้โคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โปรไบโอติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase; BSH) ทำให้เกิด free bile salt และ cholic acid ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมีการดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งผลให้มีการใช้โคเลสเตอรอลเพื่อสร้าง free bile salt และ cholic acid เพิ่มมากขึ้นในตับ ทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง

2.3.7 ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร

Biogenic amine เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างแบบ aliphatic, aromatic หรือ heterocyclic พบได้ในอาหารชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่จะถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่มีการดัดแปลงคาร์บอกซิล (decarboxylation) ออกจากกรดอะมิโน Histamine, tryptamine, tyramine, cadaverine, putrescine และ phenylethylamine ซึ่งพบว่าสารเหล่านี้ไม่เป็นที่ต้องการ เนื่องจากให้ผลลัพท์ที่เป็นพิษ (Ammor and Mayo. 2007) การบริโภคเอมีนเหล่านี้มากเกินไป สามารถทำให้เกิดโรคประสาท โรคกระเพาะ โรคลำไส้ และโรคความดันโลหิต (Suzzi and Gardini. 2003) แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากที่แยกได้จากเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อ สามารถดัดแปลงคาร์บอกซิลออกจากกรดอะมิโน สายพันธุ์ของ *Lb. curvatus* เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอก และมีการสร้างเอมีนปริมาณมาก (Bover-Cid and Holzappel. 1999) การคัดเลือกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการผลิตไส้กรอกหมักคือ แบคทีเรียกรดแลคติกต้องไม่ทำหน้าที่ในการดัดแปลงคาร์บอกซิลออกจากกรดอะมิโน การเจริญเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และการสร้างกรดจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีการสร้างเอมีนได้ (Ammor and Mayo. 2007) กล้าเชื้อที่ทำหน้าที่ในการออกซิเดสเอมีนอาจจะช่วยในการลด biogenic amine ที่ถูกสร้างขึ้นในระดับเนื้อเยื่อ (*in situ*) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรายงานแล้วว่ามีกิจกรรมนี้ ได้แก่ *Lb. plantarum* และ *Lb. casei* (Fadda *et al.* 2001)

2.3.8 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

Hirayama and Rafter (2000) รายงานว่า ยังไม่มีการทดลองโดยตรงที่แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการเกิดมะเร็งในมนุษย์อันเนื่องมาจากการบริโภคเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมหมักหรือไม่หมัก กลไกการยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามกลไกที่เป็นไปได้คือ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน การจับและย่อยทำลายสารก่อมะเร็ง การสร้างสารประกอบที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในลำไส้ใหญ่ Commane *et al.* (2005) กล่าวว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเป็นลำดับต่อเนื่อง ที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ การกระตุ้น และการขาดหายไปของ oncogenes และ tumour suppressor genes มีการรายงานในงานวิจัยจำนวนมาก ว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ไปรบกวนโอติกอาจจะช่วยลดความเสี่ยงในการมะเร็งได้ในระยะของการเกิดมะเร็งที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไปรไบโอ

ติก เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และผลิตกรดแลกติก ซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากกระบวนการหมักได้เมื่อมีคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมเป็นสารตั้งต้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิตี. 2547) ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสถานะที่ไม่มีอากาศ แต่สามารถมีชีวิตรอดได้ในสถานะที่มีอากาศ แบคทีเรียกรดแลกติกขาดไซโตโครม (cytochrome) และพอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่สร้างเอนไซม์อะซิติลโคเลสและออกซิเดส แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดได้รับออกซิเจนโดยผ่านเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (flavoprotein oxidases) และใช้ออกซิเจนนี้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือใช้เพื่อรีออกซิไดซ์ NADH ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการค้ำไฮโดรจีเนชันของน้ำตาล (สุเมธชา วัฒนสินธุ์. 2545) โปรไบโอติกบางชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการค้าแสดงในตารางที่ 2 แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีรายงานว่า เป็นโปรไบโอติกมีดังนี้คือ

2.4.1 *Streptococcus*

Burton *et al.* (2006) รายงานว่า *Streptococcus salivarius* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในช่องปาก และมีศักยภาพสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก โดย Burton *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาความปลอดภัยของ *S. salivarius* K12 พบว่า การได้รับ *S. salivarius* K12 เข้าสู่ร่างกายไม่ก่อให้เกิดอันตราย และจากการวิเคราะห์ทางชีวเคมี และโครงสร้างของยีนที่มีความเป็นพิษรุนแรง พบว่า *S. salivarius* K12 มีความเป็นเชื้อก่อโรคร้ายแรง และไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ที่มีสุขภาพดี

2.4.2 *Enterococcus*

Kolodjieva *et al.* (2006) รายงานว่า Enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยอยู่ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งได้มีการนำเชื้อชนิดนี้ไปใช้เป็นก้ำเชื้อแบคทีเรียสำหรับเสริมในอาหารในลักษณะของโปรไบโอติก Kolodjieva *et al.* (2006) ได้ทำการทดสอบลักษณะความเป็นพิษรุนแรง (ยีน: *gelE*, *sprE*, *esp*, *fsrB*, *asal*) ของ Enterococci พบว่า ลักษณะความเป็นพิษของ *E. faecium* ต่ำกว่า *E. faecalis*

2.4.3 *Lactococcus*

Kimoto-Nira *et al.* (2007) รายงานว่า lactococci มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และเป็น โปรไบโอติกที่มีศักยภาพ *Lactococcus* สายพันธุ์ 527 ยึดเกาะกับ Caco-2 cells ได้ดี *Lactococcus* สายพันธุ์ N7 สามารถกำจัดโคเลสเตอรอลได้มาก *Lactococcus* สายพันธุ์ G50 ช่วยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การยับยั้งการสร้าง IgE *Lactococcus* สายพันธุ์ N7 และ 527 ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตนมในญี่ปุ่นมาเป็นเวลา 50 ปี สายพันธุ์ G50 ที่แยกได้จากหญาสดต้องมีการทดสอบความปลอดภัยอย่างเข้มงวดเพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก

2.4.4 *Weissella*

Yeonhee (2005) รายงานว่า *Weissella kimchii* PL9023 สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ปริมาณมาก และให้ลักษณะที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกในผู้หญิง *W. kimchii* PL9023 ยับยั้งการเจริญ และการยึดเกาะของ *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากช่องคลอด ส่วนประกอบของผิวเซลล์ที่มีผลต่อการยึดเกาะของ *W. kimchii* PL9023 กับเยื่อผิวช่องคลอดคือไกลโคโปรตีน *W. kimchii* PL9023 ไม่สร้างสารเมตาบอไลต์ หรือเอนไซม์ที่เป็นอันตราย จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า *W. kimchii* PL9023 เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพสำหรับสุขภาพของช่องคลอด

2.4.5 *Lactobacillus*

จุลินทรีย์ *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ไม่ต้องการอากาศ และรูปร่างไม่แน่นอนแบบท่อนที่โดยปกติแล้วจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประเภทคาร์โบไฮเดรต และมีความสัมพันธ์กับระบบเมตาบอลิซึมของเจ้าบ้าน โดยตรง (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ ประกอบด้วย *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ของ *Lactobacilli* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารคือ *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* และ *Lb. salivarius* (Slover. 2008)

Lb. salivarius เป็นแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพชนิดหนึ่งได้แก่ สายพันธุ์ UCC118 เป็น *Lb. salivarius* สายพันธุ์ที่มีการศึกษามากที่สุด ไม่เพียงแต่มีการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น แต่ยังมีการศึกษาในสัตว์ด้วย ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์ในการเป็นโปรไบโอติก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทำให้ลดการเกิดอาการอักเสบ (Dunne et al. 2001)

ตารางที่ 2.2 โพรไบโอติกบางชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการค้า

สายพันธุ์	แหล่งที่มา
<i>Lb. acidophilus</i> LA1/LA5	Chr. Hansen
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> Lb12	
<i>Lb. paracasei</i> CRL431	
<i>B. animalis</i> ssp. <i>Lactis</i> Bb12	
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM [®]	Danisco
<i>Lb. acidophilus</i> La	
<i>Lb. paracasei</i> Lpc	
<i>B. lactis</i> HOWARU [™] /BI	
<i>Lb. acidophilus</i> LAFTI [®] L10	DSM Food Specialties
<i>B. lactis</i> LAFTI [®] B94	
<i>Lb. paracasei</i> LAFTI [®] L26	
<i>Lb. johnsonii</i> La1	Nestle
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-20621	Snow Brand Milk Products Co. Ltd.
<i>B. longum</i> SBT-29281	
<i>Lb. rhamnosus</i> R0011	Institute Rosell
<i>Lb. acidophilus</i> R0052	
<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult
<i>B. breve</i> strain Yakult	
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Foneterra
<i>Lb. rhamnosus</i> HN001 (DR20)	
<i>Lb. plantarum</i> 299V	Probi AB
<i>Lb. rhamnosus</i> 271	
<i>Lb. casei</i> Immunitas	Danone
<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)	
<i>Lb. rhamnosus</i> LB21	Essum AB
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	
<i>Lb. reuteri</i> SD2112	Biogaia
<i>Lb. rhamnosus</i> GG1	Valio Dairy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์	แหล่งที่มา
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College Cork
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co. Ltd.
<i>Lb. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory
<i>Lb. paracasei</i> F19	Medipharm

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vasiljevic and Shah (2008)

2.5 คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus salivarius*

Lb. salivarius เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถพบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จัดเป็น microflora ที่ช่วยในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ และยังพบว่า *Lb. salivarius* สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่จำเป็นต่อระบบทางเดินอาหารเพราะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ นอกจากนี้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* ยังจัดเป็นสารชีวภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารแทนการใช้สารเคมีได้อีกด้วย (Robredo and Torres, 2000) ผลจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า *Lb. salivarius* มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับสุกร (Nemcova *et al.* 1997) และไก่ (Garriga *et al.* 1998) มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ *Lb. salivarius* เป็นโปรไบโอติกเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella enteritidis* และ *E. coli* มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้สูง ทนต่อเกลือน้ำดีและสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (Nemcova *et al.* 1997; Garriga *et al.* 1998) *Lb. salivarius* ที่มีรายงานว่ามียุทธศาสตร์การเป็นโปรไบโอติก มีดังนี้คือ

2.5.1 การทนต่อสารหลังในระบบทางเดินอาหาร

Dunne *et al.* (2001) ได้แยกโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ โดยคัดเลือกประชากรจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่กับชิ้นส่วนของระบบทางเดินอาหารที่เดือนออกมา ทำการทดสอบแบคทีเรียทั้งหมด 1,500 ไอโซเลท ที่ได้จาก illum ตอนปลายของมนุษย์ ระหว่างจุลินทรีย์เหล่านี้ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* สายพันธุ์ UCC118 ถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาต่อไป โดยทดลองผสมในนมให้หนูกิน *Lb. salivarius* สายพันธุ์ UCC118 สามารถสร้างโคโลนีในระบบทางเดินอาหารของหนูได้ และศึกษาในคนโดยใช้อาสาสมัครสุขภาพดี 80 คน พบว่าโยเกิร์ตสามารถใช้เป็นพาหะในการส่ง สายพันธุ์ UCC118 เข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร การคัดเลือกโปรไบโอติกในหลอดทดลองอาจจะ

สะท้อนให้เห็นถึงผลลัพธ์ในร่างกายของเจ้าบ้าน เช่น การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์เดิมในระบบทางเดินอาหาร

Martín *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษา *Lb. salivarius* CETC 5713 ที่แยกจากอุจจาระของทารกที่กินนมแม่อายุ 1 เดือน ในสภาวะของระบบทางเดินอาหารจำลอง สารหลังที่ใช้ไม่มีไลโซไซม์หรืออะไมเลสเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสารหลังจากน้ำลายไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของ *Lactobacilli* ที่ระดับสรีรวิทยา จากการศึกษาพบว่า *Lb. salivarius* CETC 5713 มีอัตราการอยู่รอดประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์

2.5.2 การสร้างแบคทีเรียโอซิน

Ocana *et al.* (1999) ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 ที่แยกได้จากช่องคลอดของมนุษย์ พบว่ามีผลต่อการยับยั้ง *E. faecalis*, *E. faecium* และ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค จากผลการทดลองยังพบอีกว่า โปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติในการทนความร้อน สามารถยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียอื่นๆ ได้ ซึ่ง *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกได้

Flynn *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษากลุ่มของแบคทีเรียโอซินอื่นในกลุ่มของ *Lb. salivarius* UCC118 ซึ่งแยกได้จากลำไส้เล็กส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารของมนุษย์ พบว่า *Lb. salivarius* UCC118 สร้างแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน คือ $abp118\beta$ และ α Presalivarin B ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118 จะมีลำดับอะมิโนคล้ายกับแบคทีเรียโอซิน Salivarin B ที่รายงานโดย Cataloluk (2001) ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อ *Lb. salivarius* M7 จากหินปูนของสัตว์ฟันแทะ แต่อย่างไรก็ตาม Presalivarin B ที่พบใน *Lb. salivarius* UCC118 ไม่มีผลต่อการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ Salivarin B ที่ได้จาก *Lb. salivarius* M7 มีผลในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งต่อมา Dunne *et al.* (2001) ได้นำสายพันธุ์ UCC118 มาศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

Pilasombut (2006) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ และพบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยพบแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 2 ชนิด คือ Salivarin B และ Salvicin K นอกจากนี้ยังพบยีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ $abp118\beta$ ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118 ซึ่งพบว่า แบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lec. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^T, *E. faecalis* JCM5803^T, *B. coagulans* JCM2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC11547^T

Pilasombut *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและคัดเลือก *Lb. salivarius* K7 จากลำไส้ไก่ พบว่า *Lb. salivarius* K7 มีคุณสมบัติในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อเอกสา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lb. sakei subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lec. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^T และ *B. coagulans* JCM2257^T และได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน โดยการแยกสารแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ และศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดยวิธี Edman degradation พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K7 มีลำดับอะมิโนคล้ายกับลำดับอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน abp118β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118

Stem *et al.* (2006) ได้ทำการแยก Bacteriocin OR-7 จาก *Lb. salivarius* strain NRRL B-30514 และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ ion-exchange และ hydrophobic-interaction chromatography จากการหาลำดับอะมิโนของ OR-7 (KTYYGTVNGVH CTKNSLWGWKRLKNMKEYDQN TTYMGRLQDI LLGWATGA FGKTFH) ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้ว่า OR-7 อยู่ในกลุ่ม class IIa bacteriocin ซึ่งคล้ายกับ Acidocin A ที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* แต่ OR-7 มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ และจัดว่าเป็น antibacterial อีกชนิดหนึ่ง จากนั้นได้ทำการศึกษาต่อโดยการนำโปรตีนที่ได้ไปผสมกับอาหารไก่ และจัดกลุ่มการทดลอง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *Campylobacter jejuni* ในระบบย่อยอาหาร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* NRRL B-30514 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. jejuni* ในระบบย่อยอาหารได้

2.5.3 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการเกิดกรดอินทรีย์

Aiba *et al.* (1998) ได้ทำการทดสอบเชื้อ Lactobacilli ในการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ในหลอดทดลองและในหนูที่ติดเชื้อ *H. pylori* พบว่า *Lactobacillus salivarius* สามารถสร้างกรดแลกติกได้ปริมาณสูงจึงยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้อย่างสมบูรณ์ การนำ *Lb. salivarius* ไปใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อการยับยั้ง *H. pylori* และลดการอักเสบ ได้รับการยืนยันอีกครั้งจากการทดลองในร่างกายโดยใช้หนูที่ติดเชื้อ *H. pylori*

Murry *et al.* (2004) ทำการศึกษา *Lb. salivarius* และ *Lb. plantarum* ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกทางการค้า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli*, *S. typhimurium* และ *Clostridia perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองจากอาหารไก่ได้ โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* และ *Lb. plantarum* มีการหมักสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตแล้วผลิตกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรดเบสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองจากอาหารไก่ลดลง ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่เจริญ

2.5.4 การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

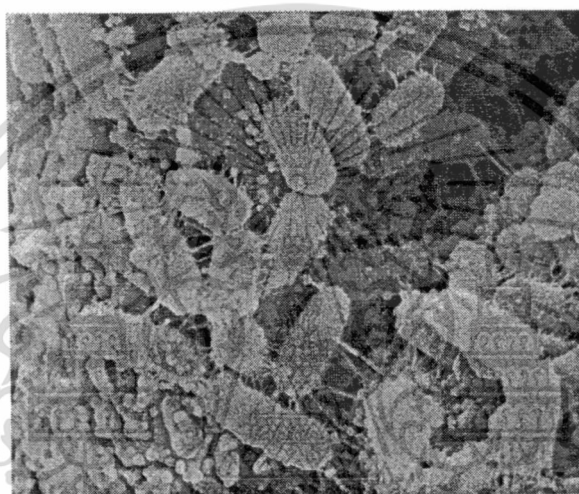
Martin *et al.* (2006) ศึกษาการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Lb. salivarius* CECT 5713 ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกที่กินนมแม่อายุ 1 เดือน พบว่า *Lb. salivarius* CECT 5713

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถสร้าง L-lactate, acetate และ hydrogen peroxide ไปยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

2.5.5 การยึดเกาะกับลำไส้

Garriga *et al.* (1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ *Lb. salivarius* ที่แตกต่างกัน 8 ชนิด พบว่า สามารถยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในลำไส้ มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุผิวของไก่ได้ดี (ภาพที่ 2.3) ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เช่น โมเนนซิน ทนต่อเกลือน้ำดีและที่พีเอช 3.0



ภาพที่ 2.3 การยึดเกาะกับเยื่อบุผิวกระเพาะพักของ ไก่ของ *Lb. salivarius* CTC 2197

ที่มา : Garriga *et al.* (1998)

2.5.6 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์

Peran *et al.* (2005) ทำการสังเกตผลลัพธ์ในการยับยั้งสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบและกลไกของ *Lb. salivarius* ssp. *salivarius* CECT 5713 ใน trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model ของหนูที่มีอาการลำไส้ใหญ่อักเสบ การได้รับ *Lb. salivarius* ssp. *salivarius* CECT 5713 ซึ่งเป็นโปรไบโอติก จะช่วยให้เนื้อเยื่อที่ถูกทำให้อักเสบใน TNBS model ของหนูที่มีอาการลำไส้ใหญ่อักเสบหายเป็นปกติได้ง่ายขึ้น ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงการสร้างสารตัวกลางที่มีผลต่อการตอบสนองที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น สารที่หลั่งออกมาจากเซลล์ อันประกอบด้วย tumor necrosis factor α (TNF- α) และ nitric oxide (NO) Peran *et al.* (2005) ได้สันนิษฐานว่าผลลัพธ์ที่เป็นประโยชน์นี้ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ทำให้เกิดการอักเสบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.7 การลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

Bae *et al.* (2002) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* เพื่อใช้เสริมในผลิตภัณฑ์นมหมักเพื่อสุขภาพ โดยคัดเลือก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* จากอุจจาระของผู้ที่มีสุขภาพดี 80 คน ที่ทนกรดและน้ำดีใน lactobacilli MRS broth ไปทำการทดลองในหลอดทดลองเพื่อประเมินความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอล พบว่าโคเลสเตอรอลใน lactobacilli MRS broth ลดลง 23-38 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.5.8 การลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร

Martin *et al.* (2006) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lb. salivarius* CECT 5713 ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกที่กินนมแม่อายุ 1 เดือน พบว่าไม่สร้าง biogenic amines

2.5.9 การลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

O'Mahony *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองใช้ *Lb. salivarius* ssp. *salivarius* UCC118 ซึ่งเป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารให้หนูกิน เพื่อประเมินผลของการบริโภคโปรไบโอติกที่มีต่อจุลินทรีย์เดิมในระบบทางเดินอาหาร การพัฒนาของเนื้องอก และอาการลำไส้ใหญ่อักเสบของหนูที่ถูกทำให้สลบด้วย IL-10 วิธีการทดลองคือ ศึกษาในหนู 20 ตัว แบ่งเป็นหนู 10 ตัวได้กินนมที่มีโปรไบโอติก และอีก 10 ตัว ได้กินนมธรรมดาที่ไม่มีโปรไบโอติก เป็นเวลา 16 สัปดาห์ วิเคราะห์จุลินทรีย์ในอุจจาระทุกสัปดาห์เพื่อนับจำนวน UCC118 ที่เป็นโปรไบโอติก Lactobacilli ทั้งหมด *Clostridium perfringens*, *bacteroides*, *coliforms*, *bifidobacteria* และ *enterococci* และฆ่าหนูเพื่อนำลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่มาวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbiologically) และจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (histologically) จากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ *Lb. salivarius* UCC118 จากอุจจาระของหนูทั้งหมดในกลุ่มที่ได้กินอาหาร โปรไบโอติก แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับอาหารโปรไบโอติกมี coliform และ enterococci ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หนูทดสอบมีจำนวนของ *C. perfringens* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มทดสอบที่ใช้โปรไบโอติกไม่พบการตายที่เกิดจากลำไส้ใหญ่อักเสบอย่างรุนแรงในขณะที่พบในกลุ่มควบคุม 2 ตัว หนูในกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติกมีการพัฒนาของมะเร็ง 1 ตัวเท่านั้น แต่ในกลุ่มควบคุมมีถึง 5 ตัว หนูทดสอบมีการอักเสบของเยื่อหุ้มลำไส้ใหญ่ต่ำกว่าหนูในกลุ่มควบคุม O'Mahony *et al.* (2001) สรุปว่า การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้โดย Lactobacilli ที่เป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และการอักเสบของเยื่อหุ้มลำไส้

2.6 การนำไปโปรไบโอติกไปใช้เป็นกรดเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ

กรดเชื้อแบคทีเรีย (starter culture) คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมาก ซึ่งอาจจะประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพียง 1 ชนิด หรือมากกว่า 1 ชนิดก็ได้ โดยการเติมกรดเชื้อใส่ลงในวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารหมัก (ประมวล ทรายทอง, 2551) กรดเชื้อแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มรสชาติ ความปลอดภัย และการเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างสารประกอบอะโรมา (aroma compound) สารแบคทีเรียโอซิน หรือสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ช่วยพัฒนาสีของเนื้อหมัก ไม่สร้างเอมีนหรือสารประกอบที่เป็นพิษอื่นๆ (Leroy *et al.* 2006) Swetwivathana *et al.* (1998) รายงานว่า ได้มีการนำกรดเชื้อมาใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ เพื่อช่วยให้ช่วงเวลาการทำให้สุกสั้นลง ให้ความคุ้มครองการพัฒนาของสี เพิ่มรสชาติ และได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัย กรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นโดยกรดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่า pH ต่ำลง จึงส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์เกิดรสชาติเปรี้ยว Erkkilä and Petäjä (2000) รายงานว่า กรดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก มีผลต่อลักษณะสัมผัส รสชาติ อายุการเก็บรักษา และความปลอดภัยของไส้กรอกแห้ง แบคทีเรียเหล่านี้จะปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยส่วนใหญ่แล้วในปัจจุบัน โปรไบโอติกจะถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์นมซึ่งเป็นเนื้อเดียวกัน ในอนาคตโปรไบโอติกอาจถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ โปรไบโอติกมากขึ้น ซึ่งกรดเชื้อโปรไบโอติกจะแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ และเจริญเพิ่มจำนวนซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคด้วย

Erkkilä *et al.* (2001a) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการหมักของโปรไบโอติก ได้แก่ *Lb. rhamnosus* GG, LC-705 และ E-97800, *P. pentosaceus* E-90390 และ *Lb. plantarum* E-98098 ในกระบวนการผลิตไส้กรอกแห้ง โดยทำการศึกษาความสามารถในการสร้างกรดแลคติก biogenic amines ได้แก่ histamine หรือ tyramine เบื้องต้นในอาหารเหลว MRS และทำการวิเคราะห์โดยใช้ high-performance liquid chromatography ซึ่งจากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าว สามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงกว่าหรือเท่ากับกลุ่มควบคุม ไม่สร้างสารเอมีน ในระหว่างการหมักไส้กรอกแห้งจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.5-7.0 log cfu/g ถึง 8.0-9.0 log cfu/g โดย *P. pentosaceus* เจริญได้ดีที่สุด ค่า pH ของไส้กรอกหมักลดลงจาก 5.6 ถึง 4.9-5.0

Erkkilä *et al.* (2001b) ทำการศึกษาการผลิตไส้กรอกแห้งโดยใช้โปรไบโอติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. rhamnosus* GG, E-97800 และ LC-705 และกรดเชื้อทางการค้า 1 ชนิด คือ *P. pentosaceus* ใช้เป็นกลุ่มควบคุม จากการศึกษาพบว่า ในระหว่างกระบวนการหมักจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เติมลงไปมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นจาก 7 log cfu/g ถึง 8-9 log cfu/g และค่า pH ลดลงจาก 5.6 ถึง 4.9-5.0 จากการทดสอบทางด้านรสชาติ พบว่า ไส้กรอกหมักที่เติมเชื้อ *Lb. rhamnosus* LC-705 มี

รสชาติคือยกว่าไส้กรอกในกลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า *Lb. rhamnosus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ GG และ E-97800 มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในการผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้ง

Muthukumarasamy and Holley (2007) ได้ทำการศึกษาผลของการเติมโปรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lb. reuteri* และ *Bifidobacterium longum* ร่วมกับกล้าเชื้อในเนื้อคือ *P. pentosaceus* และ *S. carnosus* ที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* 0157 : H7 ในไส้กรอกหมักแบบแห้ง โดยหมักไส้กรอกไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 26 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 88 เปอร์เซ็นต์ และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 วัน ในระหว่างการหมักทำการวิเคราะห์ค่า pH ค่า water activity (A_w) โปรตีน ความชื้น และจำนวนจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่า ค่า pH และค่า A_w ลดลงจาก 5.7 และ 0.98 ถึง 4.9 และ 0.88 ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้จำนวน *E. coli* 0157 : H7 ลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก

2.7 แหนม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (2547) ได้ให้นิยามของแหนมว่า หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมูและหนังหมู อาจมีหูหมู จมูกหมูอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้ง 2 อย่างผสมอยู่ แล้วเติมเครื่องปรุงรุ่มห่อเป็นมัดหรือบรรจุในภาชนะบรรจุ หมักจนได้รสเปรี้ยว สำหรับคุณลักษณะทั่วไปของแหนมนั้น แหนมต้องมีเนื้อแน่นและคงรูป ส่วนประกอบต่างๆ ต้องผสมกันอย่างทั่วถึง มีสีชมพูตามธรรมชาติของแหนมที่พร้อมบริโภค มีกลิ่นและรสชาติ ปราศจากกลิ่นแปลกปลอม เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น ห้ามใช้วัตถุเจือปนในอาหารอื่นใด นอกจากชนิดและปริมาณที่กำหนดดังต่อไปนี้ ฟอสเฟตในรูปของโมโน- ได- และพอลิของเกลือ โซเดียมหรือโพแทสเซียมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันในผลิตภัณฑ์สำเร็จ (คำนวณจากฟอสฟอรัสทั้งหมดในรูป P_2O_5) ให้ใช้ได้ไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โซเดียมหรือโพแทสเซียมไนเตรดให้ใช้ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือโซเดียมหรือโพแทสเซียมไนไตรต์ ไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างต้องไม่เกิน 4.6 จุลินทรีย์ที่อาจมีในแหนมต้องไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดดังต่อไปนี้ เชื้อ *Salmonella* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม เชื้อ *Staphylococcus aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม เชื้อ *Clostridium perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม พยาธิ *Trichinella spiralis* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม เชื้อราต้องน้อยกว่า 10 โคลิโคนต่อตัวอย่าง 1 กรัม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (2548) ได้ให้นิยามของแหนมเนื้อว่า หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเนื้อวัว หรือเนื้อควายที่ตัดแต่งเอามันและพังศึคออกมาล้างทำความสะอาด แล้วบดหรือหั่นเป็นชิ้นผสมกับเกลือ เติมน้ำตาลหรือข้าวเหนียวสุก และกระเทียมบด อาจเติมน้ำตาล ผสมให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้ากัน อาจตกแต่งด้วยพริก ห่อเป็นมัด หมักในระยะเวลาที่เหมาะสมจนมีรสเปรี้ยว ลักษณะทั่วไปคือ ต้องแน่น คงรูป กรณีหั่นเป็นชิ้น ต้องยังคงสภาพเป็นชิ้น ไม่ยุ่ย มีการกระจายของส่วนประกอบที่ใช้ค่อนข้างสม่ำเสมอ ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของแฮมเนื้อ ต้องมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของแฮมเนื้อ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นหืน กลิ่นสาบ ต้องมีรสเปรี้ยวเค็มกลมกล่อม ความเป็นกรด-ด่างต้องไม่เกิน 4.6 ต้องไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม เชื้อ *Staphylococcus aureus* ต้องไม่เกิน 100 โคลโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ยีสต์และราต้องน้อยกว่า 100 โคลโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม พยาธิ *Taenia saginata* และ *Gnathostoma spinigigrum* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม

เนื่องจากพฤติกรรมในการบริโภคแฮมนั้น นิยมบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อน จึงเป็นความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับอันตรายจากเชื้อที่อาจก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในแฮมได้ เช่น เชื้อ *Salmonella* สำหรับรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์แฮม อติสร เสวต วิวัฒน์ (2533) ได้ทำการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในแฮม 56 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* ทั้งหมด 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมากที่สุดได้แก่ *S. Derby* และ *S. Anatum* พบถึง 20.50 และ 14.72 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่ตรวจตามลำดับ ต่อมา อติสร เสวตวิวัฒน์ และอรุณ บำงตระกูล นนท์ (2539) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในแฮมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพฯ จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มากถึง 30 ตัวอย่าง

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีการศึกษาเกี่ยวกับแฮมในด้านต่างๆ มากมาย ซึ่งส่วนมากจะเน้นงานวิจัยในด้านการใช้เกลือเพื่อความปลอดภัยในการผลิตแฮม รวมถึงคุณภาพที่ดีของแฮมเมื่อใช้เกลือในการผลิต เพื่อปรับปรุงคุณภาพทั้งในแง่ของกระบวนการผลิต และความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ได้แก่ Noonpakdee *et al.* (2003) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีอยู่ในแฮมเพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่า เชื้อ *Lb. lactis* WNC 20 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* และ *S. aureus* ความสามารถของ *Lb. lactis* WNC 20 ในการสร้างสารแบคเทอริโอซินจึงน่าจะมีประโยชน์ในการปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก นอกจากนี้ Swetwivathana *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาผลของกระเทียมและไนไตรท์ที่มีต่อการผลิต Pediocin PA-1 ของ *P. pentosaceus* TISTR 536 และการเจริญของ *S. Anatum* ในสภาวะการหมักแฮมจำลอง พบว่ากระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ช่วยให้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เจริญได้ดีทั้งในที่มืดและไม่มืด ไนไตรท์ เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้ใส่กระเทียม และเมื่อใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไนไตรท์ 125 ppm และ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถลดจำนวนของ *S. Anatum* ได้ภายใน 30 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 Real-Time Polymerase Chain Reaction

ความสำเร็จของเทคนิค real-time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่างๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุม อุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็น แหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products ดังนั้นการทำ real-time PCR จึง เป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาตร DNA โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจ PCR products จะกระทำหลังจากปฏิกิริยา การเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว การที่สามารถตรวจวัด PCR products ได้เกิดจากการทำให้ PCR products สามารถเกิดสัญญาณการเรืองแสงได้ ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 4 วิธีใหญ่ๆ คือ การใช้ SYBR Green I dye การใช้ probes ติดฉลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) (วีระพงษ์ ลุกลิตานนท์. 2553)

2.8.1 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้เทคนิค real-time PCR

Salmonellosis เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทั่วโลก เนื่องจากทำให้เกิดอาการอาหาร เป็นพิษในมนุษย์ ซึ่งเกี่ยวเนื่องมาจากการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ ใน หลายประเทศเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ จึงได้มีความสนใจเพิ่มขึ้นในการพัฒนาเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัย ที่มีความจำเพาะสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ใน อาหาร (Malomy *et al.* 2004) ซึ่งการตรวจสอบที่รวดเร็วจึงช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนของ อาหารและการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ การใช้เทคนิค Traditional microbiological เช่น ISO method 6579 ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารต้องใช้เวลาจนถึง 5 วัน กว่าจะได้ผลลัพธ์ (Hein *et al.* 2006) ซึ่งการใช้เทคนิค real-time PCR สามารถได้ผลลัพธ์ภายใน 12 ชั่วโมง และได้ ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคในตัวอย่างอาหารทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (Ellingson *et al.* 2004)

Ellingson *et al.* (2004) ได้พัฒนาเทคนิค real-time quantitative PCR เพื่อใช้สำหรับ ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยทำการเพาะเชื้อ *Salmonella* spp. ใน ผลิตภัณฑ์เนื้อวัวสด และผลิตภัณฑ์เนื้อวัวพร้อมรับประทาน จากนั้นทำการสกัด genomic DNA เพื่อใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มปริมาณในเครื่องมือ LightCycler PCR โดยทำการออกแบบ PCR primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *sipB* และ *sipC* 251 เบส และ ออกแบบ Fluorescently-labeled hybridization probes เพื่อให้จับที่บริเวณยีน *sipB* และ *sipC* จาก การศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้ในปริมาณต่ำถึง 1 CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลลัพธ์ที่ได้จากการใช้เทคนิค real-time PCR สอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี immunoprecipitate และ traditional culture เทคนิค real-time PCR เป็นการใช้ LightCycler ซึ่งสามารถตรวจและยืนยันการมีหรือไม่มี *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวดิบ และพร้อมรับประทาน ได้ภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งมีความไวสูงเมื่อเทียบกับการตรวจหาเชื้อโดยใช้วิธี traditional culture และ Enzyme immunoassays (EIA)

Catarame *et al.* (2006) ได้พัฒนาเทคนิค real-time PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA หรือ ยีน *invA* ใน LightCycler (Roche, Mannheim, Germany) สำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และได้ทำการเปรียบเทียบกับการใช้วิธี conventional International Organization for Standardization (ISO) culture โดยทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ใน เนื้อโคไอร์แลนด์ เนื้อไก่เนื้อสุกร และเนื้อไก่วงง นำตัวอย่างเนื้อทั้งหมด (n=100) ที่ผ่านการใช้อาหารคัดเลือก (selective enrichment) ไปตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ดังนี้คือ (1) นำไปสกัด DNA และวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค real-time PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA หรือ *invA* ของเชื้อ *Salmonella* spp. และ (2) นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือก และจำแนกเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี immunological และ sub-typing จากการทดลองพบว่า จากเนื้อทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบ 5 ตัวอย่างที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ซึ่งตรวจพบ โดยเทคนิค real-time PCR สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และโดยวิธี standard culture และมีเพียง 2 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* จากการตรวจโดยเทคนิค real-time PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *invA* การตรวจโดยการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA จะมีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ได้เทียบเท่ากับวิธี standard culture ที่ใช้กันในปัจจุบัน แต่การใช้เทคนิค real-time PCR จะมีความรวดเร็วมากกว่า

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (DWYER instruments INC, USA)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (BD, Scientific promotion CO., LTD.)
3. เครื่องเขย่า (Shaking Incubator: VS-8408 SFN, Korea)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge CR 3i, France)
5. เครื่องวัดค่า pH (EUTECH PC 510)
6. เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Fx-2000i, Japan)
7. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (KMC-1300V, Korea)
8. ไมโครเวฟ (TRX-249M, Korea)
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (High-Pressure Steam Sterilizer ES-315, Japan)
10. ไมโครปิเปต (Biopipette autoclavable, Labnet)
11. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Angle Technology CO., Ltd., Thailand)
12. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven: Memmert, Belgium)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)
14. เครื่องตีบดตัวอย่าง (Stomacher Bag Mixer 400 interscience, France)
15. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultrospec 1100 *pro*, England)
16. ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (GelMate 2000, Japan)
17. เครื่องถ่ายภาพเจล (GeneGenius, A division of synoptics LTD.)
18. Real-time PCR Detector (Chromo4™ System, BIO-RAD, USA)
19. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

1. MRS broth (Merck, Germany)
2. Agar (Criterion, U.S.A.)
3. Tryptic soy broth (Merck, Germany)
4. Yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)

5. Beef extract (Scharlau Chemie S.A., Spain)
6. Tryptone (BIO BASIC INC, Canada)
7. Peptone (Merck, Germany)
8. XLD agar (Merck, Germany)
9. Salmosyst broth base, SB (Merck, Germany)
10. Salmosyst selective supplement tablet, SBST (Merck, Germany)

3.1.3 สารเคมี

1. Glucose (Ajax Finechem, Australia)
2. CaCO₃ (Scharlau Chemie S.A., Spain)
3. โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)
4. โซเดียมไนไตรท์ (Merck, USA)
5. โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Carlo Erba Reagent, Italy)
6. โซเดียมแอสคอบาท (Metha Group Trading Ltd., Part., Thailand)
7. กลีเซอรอล (APS Finechem, Australia)
8. น้ำมันพาราฟิน (Metha Group Trading Ltd., Part., Thailand)
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)
10. กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)
11. แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
12. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Merck, Germany)
13. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Ajax Finechem, Australia)
14. Pepsin (Fluka, Switzerland)
15. Pancreatin (Fluka, Switzerland)
16. Bile salts (Sigma, New Zealand)
17. Ox-bile (Fluka, France)
18. น้ำดีไก่สด (โรงฆ่าไก่ จังหวัด ฉะเชิงเทรา)

3.1.4 ยาปฏิชีวนะ

1. Ampicillins ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
2. Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
3. Cephalothin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Erythromycin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
5. Gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
6. Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
7. Nalidixic acid ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
8. Neomycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
9. Nitrofurantoin ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
10. Norfloxacin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
11. Novobiocin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
12. Oxolinic acid ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
13. Tetracyclin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
14. Sulfamethoxazole/Trimethoprim ความเข้มข้น 25/1.5 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
15. Oxytetracyclin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
16. Penicillin G ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
17. Amoxycillin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
18. Streptomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)

3.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและตรวจสอบ DNA

1. phenol (amresco, USA)
2. chloroform (LAB-SCAN LTD., Ireland)
3. absolute ethanol (Merck, Germany)
4. Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์
5. Agarose (SeaKem, USA)
6. Ethidium bromide
7. KAPA SYBR FAST qPCR (kapabiosystems, USA)
8. อะกาโรสเจล (Vivantis, Malaysia)
9. Proteinase K (Sigma, U.S.A.)
10. Lysozyme (Sigma, U.S.A.)
11. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (Univar, Australia)
12. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Research organic Inc., U.S.A.)
13. Sodium dodecyl sulfate (SDS, Bio Basic Inc., U.S.A.)
14. Sucrose (Bio Basic Inc., U.S.A.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. Standard DNA 1 Kb ladder (Vivantis, Malaysia)

16. ดีเอ็นเอ ไพรมอร์ (Fermentus, U.S.A.)

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.2.1.1 *Lb. salivarius* K4 และ K7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่และผลิตแบคทีเรียโอซิน (Pilasombut. 2006) เลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth (Merck, Germany) เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่เชื้อ 500 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB-YE [Tryptic soy broth (Merck, Germany) ที่มีส่วนผสมของ yeast extract 0.6 เปอร์เซ็นต์ (BIO BASIC INC, Canada)] เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่เชื้อ 500 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.1.3 แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งแบคทีเรีย ได้มาจากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แบคทีเรียทดสอบและสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)	สภาวะการเจริญ
Lactic acid bacteria			
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	30	anaerobic
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30	anaerobic
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37	anaerobic
<i>Lactococcus cremoris</i> TISTR 1344	MRS	30	anaerobic
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30	anaerobic
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30	anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37	anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37	anaerobic
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	30	aerobic
Other gram positive bacteria			
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	TSB-YE	37	aerobic
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB-YE	37	aerobic
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB-YE	37	aerobic
<i>Brochotrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TSB-YE	26	aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB-YE	37	aerobic
Other gram negative bacteria			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TSB-YE	26	aerobic
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB-YE	26	aerobic
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR 1321	NB	30	aerobic
<i>Salmonella</i> Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37	aerobic
<i>Escherichia coli</i> TISTR 780	TSB-YE	37	aerobic

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville. Md

JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

NRBC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

TSB-YE = Tryptic soy broth ที่มีส่วนผสมของ Yeast extract 0.6 เปอร์เซ็นต์

MRS = de Man Rogosa and Sharpe

NB = Nutrient broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ทำการศึกษาดังต่อไปนี้

3.2.2.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด น้ำดีสังเคราะห์ และน้ำดี Ox-bile วิธีการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด คัดแปลงมาจากวิธีของ Hyronimus *et al.* (2000) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ค่าต่างๆ คือ 2, 2.5, 3 และ 3.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (กลุ่มควบคุมคืออาหารที่ไม่ปรับ pH; pH 6 ± 0.2) รวมถึงอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีสังเคราะห์ (Sigma, New Zealand) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ ox-bile (Fluka, France) ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ (ปรับ pH 8) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง โดยวิธีการ spread plate

3.2.2.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีไก่สด วิธีการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีไก่ คัดแปลงมาจากวิธีของ Gilliland *et al.* (1984) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) และอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีน้ำดีไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) บ่มทั้ง 2 ชุดทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง และหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี spread plate

3.2.2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

1) การเตรียมสารละลายใสปราศจากเซลล์ (Cell-free supernatant, CFS) ถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออก แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ (CFS ไม่ได้ปรับ pH เนื่องจากต้องการหาผลของสารยับยั้งที่เชื้อสร้างขึ้นต่อเชื้อเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ)

2) ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn (Ennahar *et al.* 1999) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปล่อยให้แห้งประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นหยดสารละลายใส่ปราศจากเซลล์ (pH 4) ที่ผ่านการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวอาหาร ร่องนสารละลายซึมผ่านรูนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ดังตารางที่ 3.1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกต บริเวณใส (clear zone)

3.2.2.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ทำตามวิธีการของ Quinn *et al.* (1994) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน ทำการ swab เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS จนทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ ลงบนอาหารที่มีเชื้ออยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มียอกซิเจนนาน 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ Ampicillins (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Cephalothin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Gentamycin (10 µg), Kanamycin (30 µg), Nalidixic acid (30 µg), Neomycin (30 µg), Nitrofurantoin (300 µg), Norfloxacin (10 µg), Novobincin (5 µg), Oxolinic acid (2 µg), Tetracyclin (30 µg), Sulfamethoxazole/Trimethoprim (25 µg/1.5 µg) และ Oxytetracyclin (30 µg)

3.2.2.5 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง ถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายเซลล์แบคทีเรียในน้ำย่อยสังเคราะห์ (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO₃ 45 mM และ pepsin 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 2, 3, 4 และ 7 โดยใช้ HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอด หลังจากผ่านไป 180 นาที ในกระเพาะอาหารจำลอง จากนั้นนำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที (4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) เทน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง นำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ไปแขวนลอยในของเหลวในลำไส้จำลอง (pancreatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ bile salts 0.15 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 8 โดยใช้ NaOH) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (37 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

เอกสารรายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml (Zárate *et al.* 2000) วัตถุประสงค์โครงการค่า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย

3.2.3.1 การทดสอบผลของการใช้ในไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหมน (Nham model broth, NMB) (Swetwivathana *et al.* 1999)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหมน (วิธีการเตรียมแสดงในผนวก ก) ขวดละ 100 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แบ่งแบบจำลองการหมักแหมนออกเป็น ไม่เติมและเติมโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ppm โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหมน มีองค์ประกอบดังนี้

ขวดที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

ขวดที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับการเติมโซเดียมไนไตรท์ 100 ppm

3.2.3.2 การทดสอบผลของการใช้กระเทียมและ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ที่มีต่อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหมน (Swetwivathana *et al.* 1999)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหมน ขวดละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และดูดสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ppm โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหมน มีองค์ประกอบดังนี้

ขวดที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

ขวดที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ขวดที่ 3 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

ขวดที่ 4 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

ขวดที่ 5 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5

เปอร์เซ็นต์ (วิธีการเตรียมกระเทียมสดปลอดเชื้อแสดงในภาคผนวก ก)

ขวดที่ 6 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำมันพาราฟินทุกขวด นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า pH ปริมาณกรดแลกติก และตรวจหาปริมาณของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE Agar และ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย MRS agar และทำการยืนยันเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยการสุมโคโลนีไปวางบนอาหาร XLD agar ถ้าเป็นเชื้อ *Salmonella* จะให้โคโลนีเป็นสีชมพูใส มีจุดดำตรงกลาง

3.2.3.3 การทดสอบผลของการใช้ *Lb. salivarius* K7 ที่มีต่อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในผลิตภัณฑ์หมักเนื้อโค (ดัดแปลงจาก Swetwivathana *et al.* 2007)

เตรียมหมักซึ่งมีส่วนผสมดังนี้คือ เนื้อโคสด 3.8 กิโลกรัม เอ็นโคสุก 1.2 กิโลกรัม ข้าวสุก 400 กรัม กระเทียมสด 400 กรัม เกลือไนไตรท์ 110 กรัม ฟอสเฟต 20 กรัม น้ำตาลทราย 20 กรัม โมโนโซเดียมกลูตาเมต 10 กรัม ผสมส่วนผสมทั้งหมดแล้ววนจนส่วนผสมเหนียว อัดหมักปริมาณ 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกขนาด 10 x 14 เซนติเมตร คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติที่สุดมา 1 สายพันธุ์ คือ *Lb. salivarius* K7 แบ่งตัวอย่างหมักทั้งหมดออกเป็น 4 ตัวอย่างดังนี้คือ

ตัวอย่างที่ 1 ไม่เติมเชื้อ ใช้เป็นกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างที่ 2 เติ้มเชื้อ *Lb. salivarius* K7 (10^6 cfu/g)

ตัวอย่างที่ 3 เติ้มเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 (10^2 cfu/g)

ตัวอย่างที่ 4 เติ้มเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ผสมให้เชื้อเข้ากันกับหมักจากด้านนอกถุง จากนั้นรีดเอาอากาศออก มัดให้แน่น และปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน หลังจากการหมักวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 นำหมักแต่ละตัวอย่างออกมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของตัวอย่างหมัก

3.2.3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของตัวอย่างหมักเนื้อโค

1. วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติก (ดัดแปลงจาก AOAC. 1984 โดย นภา โล่ห์ทอง. 2529)

ชั่งตัวอย่างหมัก 3 กรัม บดให้ละเอียด (แบบจำลองการหมักหมัก 3 มิลลิลิตร) เติมน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดเพื่อไล่คาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำน้ำใส่ที่ได้ไปเติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลิน 2-3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติจะเกิดสีชมพู คำนวณปริมาณกรดแลกติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลกติก} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1,000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

$$1,000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้

2. การวัดค่า pH (ดัดแปลงจาก AOAC. 1984 โดย นภา โล่ห์ทอง 2529)

นำตัวอย่างหมัก 10 กรัม มาบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร วัดด้วยเครื่อง pH meter

3. การวัดค่า water activity (ตามคู่มือการใช้งานของเครื่องวัดหาค่า a_w รุ่น LabMASTER a_w)

4. วิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างเหนม

4.1 ตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก (AOAC. 2006)

สุ่มตัวอย่างเหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยสารละลายเปปโตน ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเปปโตน ที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นดูดสารละลายเปปโตน ที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS Agar ที่เติม CaCO_3 (0.5 เปอร์เซ็นต์) spread ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ นับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี

4.2 ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* (AOAC. 2006)

ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่มีอยู่ในตัวอย่างเหนม โดยนำตัวอย่างเหนม 25 กรัม ใส่ลงใน salmosyst broth base (SB) 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจาก SB 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม salmosyst selective supplement table (SBST) 1 เม็ด เขย่าให้เม็ด SBST ละลายใน SB จนหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเจือเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็งโดยใช้ XLD agar และ SS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางเซโรโลยี

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และเชื้อ *Lb. salivarius* โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

3.2.4.1 การสกัด DNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหนม (Cocolin *et al.* 2001)

นำตัวอย่างจากแบบจำลองการหมักเหนมตั้งแต่การหมักวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่บรรจุ glass bead ที่ฆ่าเชื้อ 0.5 กรัม จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 30 วินาทีสลับกับการแช่น้ำแข็ง 30 วินาที ทำซ้ำ 3 รอบ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอยเซลล์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้งเพื่อเก็บตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย 10% sucrose ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย breaking buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ proteinaseK ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อบ่มครบเวลาตามกำหนดจึงเติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วนความเข้มข้น 25 : 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที แล้วแช่น้ำแข็งอีก 30 วินาที ทำซ้ำ 3 รอบ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บสารละลายใสด้านบน ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ไปใส่หลอดใหม่ แล้วจึงเติม absolute ethanol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 2 ถึง 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืนเพื่อตกตะกอน DNA นำไปปั่นเหวี่ยงแยก DNA ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งเพื่อเก็บ DNA และทำการล้างตะกอน DNA ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมานำไปปั่นเหวี่ยงแยก DNA ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลาย DNA โดยเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที [ทำการวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้แผ่นวุ้นอะกาโรส (agarose gel) 1.0 เปอร์เซ็นต์ หากความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์]

3.2.4.2 การสกัด DNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากตัวอย่างແໜ່ນນ້ອ (Cocolin *et al.* 2001)

นำตัวอย่างແໜ່ນนั้ตั้งแต่การหมักวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ทำการสุ่มตัวอย่างละ 10 กรัม มาผสมกับ saline peptone water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่อง stomacher นาน 2 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่บรรจุ glass bead ที่ฆ่าเชื้อ 0.5 กรัม จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 30 วินาที สลับกับการแช่น้ำแข็ง 30 วินาที ทำซ้ำ 3 รอบ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้งเพื่อเก็บตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย 10% sucrose ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย breaking buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ proteinaseK ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อบ่มครบเวลาตามกำหนดจึงเติมสารละลาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phenol : chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วนความเข้มข้น 25 : 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาทีแล้วแช่น้ำแข็งอีก 30 วินาที ทำซ้ำ 3 รอบ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บสารละลายในสไลด์ด้านบนปริมาตร 300 ไมโครลิตร ไปใส่หลอดใหม่ แล้วจึงเติม absolute ethanol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา 2 ถึง 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืนเพื่อตกตะกอน DNA นำไปปั่นเหวี่ยงแยก DNA ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งเพื่อเก็บ DNA และทำการล้างตะกอน DNA ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับป้อนำไปปั่นเหวี่ยงแยก DNA ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลาย DNA โดยเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที [ทำการวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้แผ่นวุ้นอะกาโรส (agarose gel) 1.0 เปอร์เซ็นต์ หาความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์]

3.2.4.3 ไพรมเมอร์

ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และเชื้อ *Lb. salivarius* แสดงดังตารางที่ 3.2 โดยไพรมเมอร์ที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้มาจาก Catarama *et al.* (2006) ส่วนไพรมเมอร์ Sali_F และ Sali_R และไพรมเมอร์ K7f และ K7R ซึ่งใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ทำการออกแบบไพรมเมอร์โดยทำการเปรียบเทียบ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากนั้นเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW ใน BioEdit version 7.0.8 แล้วออกแบบไพรมเมอร์โดยเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และมีขนาดผลผลิตของยีนไม่เกิน 400 bp

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ *Lb. salivarius*

ไพรเมอร์	จุลินทรีย์	ลำดับเบส	ขนาดยีน (bp)
16SF	<i>S. Typhimurium</i>	5'-ACGGTAACAGGAAG(AC)AG-3'	402
16SR	<i>S. Typhimurium</i>	5'-TATTAACCACAACACCT-3'	402
K7F	<i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7	5'-CACATTGGGACTGAGACACG-3'	310
K7R	<i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7	5'-TAAGCCGAAGGCTTTCACAT-3'	310
Sali_F	<i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7	5'-CTTTCCTTACACCGAATGCTTGC-3'	151
Sali_R	<i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7	5'-TCATCTAAGGATCATGCGATCC-3'	151

3.2.4.4 ปฏิบัติการ Real-time PCR

เพิ่มปริมาณ และตรวจหา DNA ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ใน LightCycler instrument (Chromo4™ System, BIO-RAD) ซึ่งในการทำปฏิบัติการ Real-time PCR ประกอบด้วยส่วนผสมต่อ 1 หลอดดังนี้

- | | |
|---------------------------------------------------------|---------------|
| 1. KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Bio-Rad iCycler™ | 10 ไมโครลิตร |
| 2. Primer F (10 ไมโคร โมล) | 0.4 ไมโครลิตร |
| 3. Primer R (10 ไมโคร โมล) | 0.4 ไมโครลิตร |
| 4. น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ | 7.2 ไมโครลิตร |
| 5. สารละลาย DNA | 2 ไมโครลิตร |
| รวมปริมาตร | 20 ไมโครลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนดังกล่าวลงในหลอด Capillaries tube นำไป centrifuge ประมาณ 10-20 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมตกอยู่ก้นหลอด หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง LightCycler โดยมีรอบการทำ Real-time PCR ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4

ตารางที่ 3.3 แสดงการทำปฏิบัติการ Real-time PCR สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของ *Lb. salivarius* K4 และ K7

โปรแกรม	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)
Enzyme activation (1 รอบ)	95	180
Amplification (40 รอบ)	95	3
	58	20
	72	60
Melting-curve analysis	60 – 95, read every 0.2 °C	2

ตารางที่ 3.4 แสดงการทำปฏิกิริยา Real-time PCR สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของ

S. Typhimurium TISTR 292

โปรแกรม	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)
Enzyme activation (1 รอบ)	95	180
Amplification (40 รอบ)	95	3
	44	20
	72	1
Melting-curve analysis	60 – 95, read every 0.2 °C	2

3.2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณ DNA เริ่มต้น

นำเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 หรือ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมมาตรวจหาปริมาณเชื้อโดยวิธี standard plate count จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาสกัด DNA ตามวิธีการของ Cocolin *et al.* (2001) นำ DNA ที่สกัดได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของ DNA ลดลง 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วนำไปเพิ่มปริมาณควบคู่ไปกับ DNA ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ (unknown DNA) ข้อมูลที่ได้จาก DNA มาตรฐาน จะถูกนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อนำมาเทียบกับ DNA ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ และคำนวณหาปริมาณ DNA เริ่มต้น

3.2.5 การวางแผนการทดลอง

ใช้การจัดกลุ่มทดลองแบบ 4 x 4 แฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (4 x 4 factorial in completely randomized design, CRD) โดยทำการศึกษاثิพผลของ 2 ปัจจัยที่มีต่อปริมาณการตรวจพบเชื้อจากแบบจำลองการหมักหมมที่วิเคราะห์โดยวิธี Spread plate และด้วยเทคนิค Real-time PCR

ปัจจัยที่ 1 คือ กลุ่มการทดลองมีทั้งหมด 4 กลุ่มการทดลองได้แก่

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ประกอบด้วย

กลุ่มทดลองที่ 1 แบบจำลองการหมักหมมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4

กลุ่มทดลองที่ 2 แบบจำลองการหมักหมมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292

กลุ่มทดลองที่ 3 แบบจำลองการหมักหมมที่เติมกระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius*

K4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มทดลองที่ 4 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ประกอบด้วย

กลุ่มทดลองที่ 1 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

กลุ่มทดลองที่ 2 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

กลุ่มทดลองที่ 3 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius* K7

กลุ่มทดลองที่ 4 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ประกอบด้วย

กลุ่มทดลองที่ 1 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติม *S. Typhimurium* TISTR 292

กลุ่มทดลองที่ 2 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติม *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4

กลุ่มทดลองที่ 3 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

กลุ่มทดลองที่ 4 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ประกอบด้วย

กลุ่มทดลองที่ 1 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติม *S. Typhimurium* TISTR 292

กลุ่มทดลองที่ 2 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติม *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับ *Lb. salivarius* K7

กลุ่มทดลองที่ 3 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

กลุ่มทดลองที่ 4 แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการหมักแหนม เป็นระยะเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้จะถูกนำมาแปลงข้อมูลให้อยู่ในค่าลอการิทึม ($y = \log x$) นำข้อมูลจำนวนเชื้อมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนด้วย General Linear Models (GLM) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Square Means ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์
สำเร็จรูป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในคนและสัตว์

4.1.1 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรดของ *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^{10} cfu/ml) และ *Lb. salivarius* K7 (เชื้อเริ่มต้น 10^9 cfu/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 3.0 และ 3.5 โดยมีการเจริญของเชื้อถึง 7.23 และ 7.63 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2.0 และ 2.5 ส่วนความสามารถในการทนกรดของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 พบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2.5, 3 และ 3.5 โดยมีการเจริญของเชื้อเท่ากับ 2.65, 7.11 และ 7.23 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Vinderola and Reinheimer, 2003) ซึ่งค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะอาจจะแตกต่างกันตั้งแต่ 2.0-3.5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการกินอาหาร ระยะการเจริญหรือชนิดของสัตว์ โดยพบว่าค่า pH ในกระเพาะแท้และก้นของไก่ มีค่าตั้งแต่ 2.5-4.74 และการย่อยอาหารจะใช้เวลา 1-3 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร (Musikasang *et al.* 2009) จากการศึกษาความสามารถในการทนกรดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยพิจารณาจากค่า pH ภายในระบบทางเดินอาหารของไก่ พบว่า *Lb. salivarius* K4 มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงที่ pH 3.0-3.5 แต่ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH ต่ำกว่า 3.0 ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จะสามารถอยู่รอดได้เมื่อผ่านกระเพาะแท้และก้นของไก่ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วงดังกล่าว ในขณะที่ภายในกระเพาะอาหารของคนมีค่า pH อยู่ระหว่าง 1.0-2.5 (McDowell and McLeod, 2007) แต่อย่างไรก็ตาม Erkkilä and Petäjä (2000) รายงานว่าเมื่อมีอาหารค่า pH ในกระเพาะอาหารจะเพิ่มขึ้นถึงระดับ pH 3 และอาหารจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารของมนุษย์นาน 2-4 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่า *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถมีชีวิตรอดในสภาวะดังกล่าว

4.1.2 ความสามารถในการเจริญในน้ำดีสังเคราะห์ ox-bile และน้ำดีไก่สด

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีชนิดต่างๆ พบว่า *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^{12} cfu/ml) ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดีสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตาม

เอกสา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก็ตาม พบว่า *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^{10} cfu/ml) สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ คือ 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^7 cfu/ml) สามารถอยู่รอดได้เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดเป็นเวลา 0, 1.5, 2, 3 และ 24 ชั่วโมง จะมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตลดลงจากปริมาณเชื้อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับน้ำดี เท่ากับ 0.38, 0.18, 0.21, 0.23 และ 2.91 log cfu/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1) ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 (เชื้อเริ่มต้น 10^9 cfu/ml) จะมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตลดลงจากปริมาณเชื้อในกลุ่มควบคุม เมื่อสัมผัสกับ bile salts ที่มีความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 6.75, 8.14 และ 8.86 log cfu/ml ตามลำดับ และสามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับ ox-bile ความเข้มข้น 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 6 log cfu/ml ส่วนที่ความเข้มข้นของ ox-bile 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 5 log cfu/ml (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้เชื้อ *Lb. salivarius* K7 (เชื้อเริ่มต้น 10^7 cfu/ml) สามารถอยู่รอดได้เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำดีเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแรก พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K7 จะมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างต่อเนื่องจนถึง 1.5 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นจนถึง 24 ชั่วโมงของการสัมผัสกับน้ำดี พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง เชื้อลดลงจากกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1.26 log cfu/ml (ภาพที่ 4.2)

ซึ่งความสามารถในการอยู่รอดภายใต้การทำงานของน้ำดีเป็นหลักการทั่วไป ที่ใช้เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติก เนื่องจากน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ (Taranto *et al.* 2006) น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Noriega *et al.* 2004) ส่วนในลำไส้เล็กของไก่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 10-11 มิลลิโมลต่อกิโลกรัมของอาหารที่กิน (Knarreborg *et al.* 2003) สัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบของน้ำดีแตกต่างกัน เช่น ในไก่มีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในโคมีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ และในคนมีเกลือน้ำดี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 16-27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกลือน้ำดีที่มี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ จะมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มากกว่าเกลือน้ำดีที่มี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเกลือน้ำดีที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น taurine conjugate จึงผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง (Oomen *et al.* 2004) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบน้ำดีต่างชนิดกันคือ น้ำดี bile salts, ox-bile และน้ำดีไก่สด ทั้งนี้เพื่อเป็นการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เพื่อนำไปใช้ในคน และสัตว์ ซึ่งจากการศึกษา พบว่า bile salts ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำดี สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ได้ ในขณะที่ ox-bile และน้ำดีไก่สด มีผลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

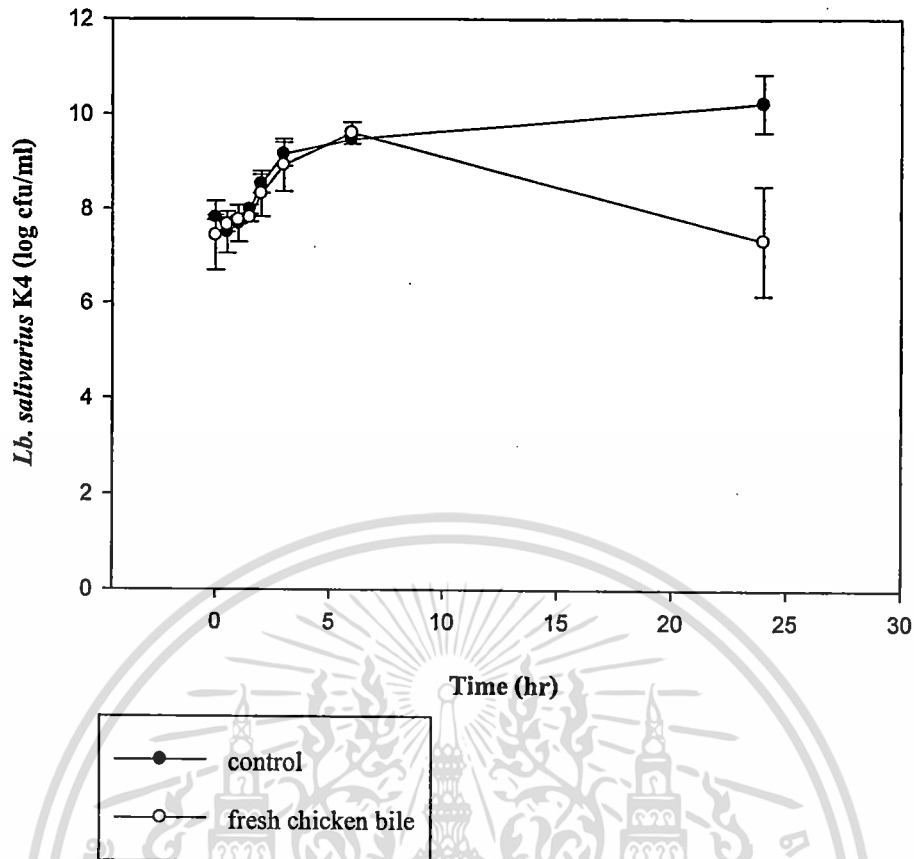
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การลดลงของเชื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวไปใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์ ซึ่งจากการศึกษาของ Ehrmann *et al.* (2002) ซึ่งได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* TMW 1.970 และ TMW 1.992 ในการทนต่อ taurocholic acid ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และ ox gall ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า taurocholic acid ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวลดลงเพียงเล็กน้อย ส่วน ox gall ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ที่มีชีวิตรอด เมื่อสัมผัสกับอาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH 2, 2.5, 3, 3.5 อาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของน้ำดี bile salts และอาหารเหลว MRS ที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

กลุ่มทดลอง	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (log cfu/ml)	
	<i>Lb. salivarius</i> K4	<i>Lb. salivarius</i> K7
pH value		
Control (6.5)	10.45±0.04	9.28±0.04
2.0	< 10	< 1
2.5	< 10	2.65±0.14
3.0	7.23±0.17	7.11±0.03
3.5	7.63±0.12	7.23±0.04
Bile salts concentration (%)		
0	11.55±1.80	9.32±0.13
0.3	< 10	3.86±0.68
0.6	< 10	1.77±0.01
1	< 10	1.39±0.01
Ox-bile concentration (%)		
0	10.77±0.03	9.17±0.04
3	6.48±0.18	5.30±0.10
6	6.91±0.30	6.30±0.20
9	7.47±0.25	6.82±0.19
12	6.43±0.26	6.62±0.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ

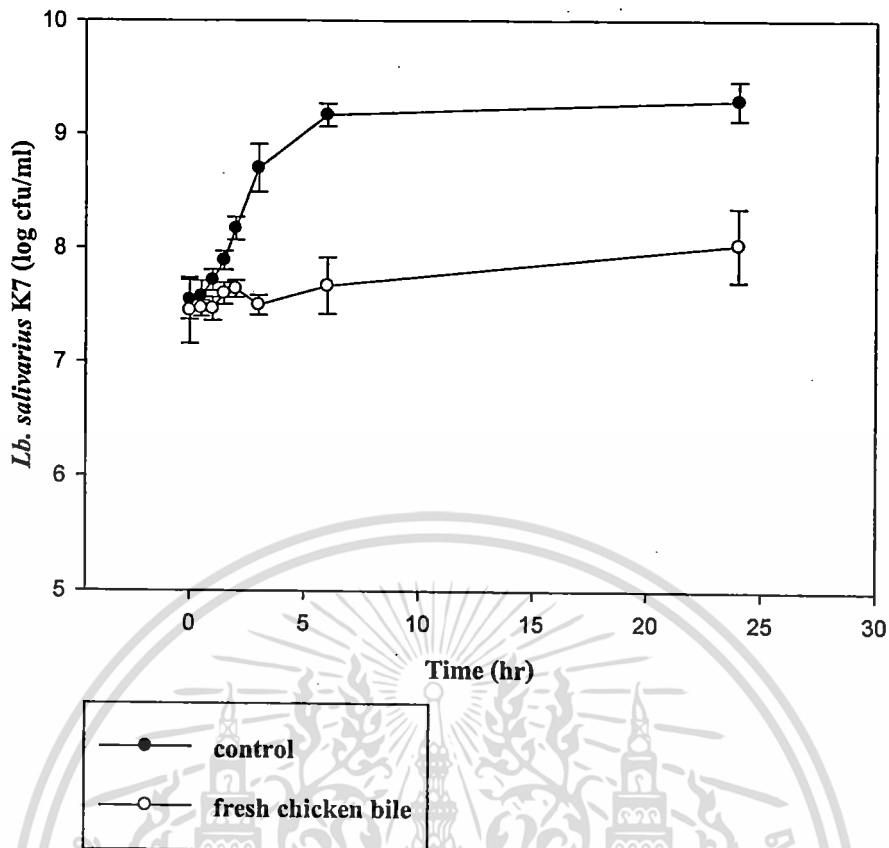
หมายเหตุ : control

หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K4

ในกลุ่มควบคุม

Fresh chicken bile หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K4

เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ : control

หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K7
ในกลุ่มควบคุม

Fresh chicken bile หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K7
เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์

4.1.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 พบว่า สารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด คือ ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T และ *Br. campestris* NBRC 11547^T และในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ เชื้อ *P. fluorescens* JCM 5963^T, *P. fluorescens* TISTR 358, *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ส่วนสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

salivarius K7 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกได้ แต่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้เช่นเดียวกับสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 คือสามารถยับยั้งเชื้อ *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T, *Br. campestris* NBRC 11547^T นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ เชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 (ตารางที่ 4.2)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกจะได้กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยเกิดควบคู่กับการลดลงของค่า pH ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากกรดอินทรีย์ทั้งกรดอะซิติกและกรดแลกติก เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดได้ ส่งผลให้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มี pH สูงกว่าภายนอก และเกิดการแตกตัวของกรดให้อิออนลบและโปรตอน ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นเช่น substrate translocation และ oxidative phosphorylation (อรวรรณ ละอองคำ, 2546) Murry *et al.* (2004) รายงานว่า การยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *C. perfringens* เกิดจากค่า pH ที่ลดลง กรดแลกติก และกรดอะซิติกที่สร้างโดย *Lb. salivarius* และ *Lb. plantarum* นอกจากนี้ Pitasombut *et al.* (2005b) พบว่า สารยับยั้งที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ไก่โฮเลท J9-2, J6-1, D2-6, D3-9, D1-8, D7-3, D2-8, I4-9, I4-8, C4-4 และ C3-3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. Enteritidis* DMST 17368 ได้ และ Lan *et al.* (2003) รายงานว่า สารยับยั้งที่สร้างโดย *Lb. salivarius* subsp. *salicinii* JCM 1230 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ได้มากกว่า *E. coli*

โดยทั่วไปความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลกติกมักเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ ที่ส่งผลให้เกิดการลดลงของ pH (Gonzalez *et al.* 2007) โดยระดับและชนิดของกรดอินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติก องค์ประกอบในการเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไคอะซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Lindgren and Dobrogosz. 1990)

โดยส่วนใหญ่กรดอินทรีย์จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Makras and Vuyst. 2006) ส่วนแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน (Leroy and De Vuyst. 1999) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลกติกภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ flavoprotein oxidases หรือ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) peroxidase การยับยั้งแบคทีเรียโดย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจจะเกิดจากการเพอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เยื่อหุ้มซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่องว่างเพิ่มขึ้น (Condon. 1987)

Pilasombut *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาโดยทำการปรับค่าความเป็นกรดและค่าของสารละลายไฮโปรอสเฟอไรต์ให้มีความเหมาะสม 6 ก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่ได้เกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *E. faecalis* JCM 5803^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochothrix campestris* NBRC 11547^T นอกจากนี้ Pilasombut *et al.* (2006) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *B. coagulans* JCM 2257^T เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งการทดลองไม่ได้ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายไฮโปรอสเฟอไรต์ให้มีความเหมาะสม 6 ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจึงเกิดจากการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์และแบคทีเรียโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลจากการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์และแบคทีเรียโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้มากกว่าผลของแบคทีเรียโอซินเพียงอย่างเดียว

4.1.4 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 18 ชนิด ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่นำมาใช้ในการรักษาคน และสัตว์ จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถถูกยับยั้งการเจริญได้โดยยาปฏิชีวนะ Ampicillins, Cephalothin, Erythromycin, Nitrofurantoin, Penicillin G, Amoxycillin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (ตารางที่ 4.3)

ยาปฏิชีวนะบางชนิดเช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์เติบโตเร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมาจึงปรากฏว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริม เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงอย่างกว้างขวาง ซึ่งบ่อยครั้งเกิดปัญหาขึ้น เนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินไปที่กำหนด การใช้นานเกินไปโดยไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า เป็นต้น ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อคือยาที่ใช้ยาบางชนิดขึ้น โดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคนิโคเนะ จึงทำให้เกิด

เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคนิโคเนะ จึงทำให้เกิด
ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาการรักษาในภายหลัง นอกจากนี้การที่สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะบ่อยเกินไปทำให้เสียสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ความผิดปกติสามารถก่อผลร้ายต่อสัตว์ได้ ดังนั้นจึงต้องหาสิ่งมาทดแทนในลักษณะเดียวกัน คือ โปรไบโอติก ปรากฏว่าใช้เป็นสิ่งเสริมในอาหารสัตว์ที่ให้ประโยชน์ได้ เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ แต่ไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาและการดื้อยาตามมา (อัจฉรา เพิ่ม. 2550)

มีรายงานว่า การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีพื้นฐานมาจาก 2 ปัจจัยด้วยกันคือ การมียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และการปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ ยีนต้านทานที่มีอยู่เองของแบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ โดยไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นๆ ได้ ส่วนความต้านทานที่แบคทีเรียได้รับมาอาจมีการถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นได้ ความต้านทานที่ได้รับมาช่วยให้แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้เนื่องจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจีโนม หรือการได้รับยีนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะช่วยให้เกิดการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียได้ เนื่องจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการเข้าจับของยาปฏิชีวนะ ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไปสู่สัตว์และมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักซึ่งไม่ผ่านความร้อนก่อนการบริโภคจึงเป็นพาหะที่สำคัญต่อการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียไปสู่เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในสัตว์และในระบบทางเดินอาหารมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียกรดแลคติกไปสู่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (Mathur and Singh. 2005) Lactobacilli บางสายพันธุ์มียีนต้านทานที่มีอยู่เองซึ่งสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ bacitracin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim/sulphamethoxazole และ vancomycin (Danielsen and Wind. 2003) นอกจากนี้หลายๆ สายพันธุ์ของ *Lb. salivarius* มียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นยีนที่มีอยู่เอง และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin (Elisha and Courvalin. 1995) และ D'Aimmo *et al.* (2007) รายงานว่า ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติก เป็นความสามารถของเชื้อในการที่จะอยู่รอดได้เมื่อเจ้าบ้านได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

จุลินทรีย์ทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)	กิจกรรมการยับยั้ง	
			K4	K7
Lactic acid bacteria				
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	30	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30	+	-
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37	-	-
<i>Lactococcus cremoris</i> TISTR 1344	MRS	30	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37	-	-
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	30	-	-
Other gram positive bacteria				
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	TSB-YE	37	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB-YE	37	+	+
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB-YE	37	+	+
<i>Brochothrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TSB-YE	26	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB-YE	37	-	-
Other gram negative bacteria				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TSB-YE	26	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB-YE	26	+	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR 1321	NB	30	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37	+	+
<i>Escherichia coli</i> TISTR 780	TSB-YE	37	-	-

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville. Md

JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

NRBC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

+ = Inhibition zone

- = No inhibition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (µg)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)			<i>Lb. salivarius</i> K4		<i>Lb. salivarius</i> K7	
		R	I	S	ขนาดวงใส (mm)	ความสามารถในการต้านทาน	ขนาดวงใส (mm)	ความสามารถในการต้านทาน
Ampicillins	10	≤11	12-13	≥14	25	S	25	S
Chloramphenicol	30	≤12	13-17	≥18	16	I	16	I
Cephalothin	30	≤14	15-17	≥18	28	S	28	S
Erythromycin	15	≤13	14-22	≥23	26	S	26	S
Gentamycin	10	≤12	13-14	≥15	8	R	8	R
Kanamycin	30	≤13	14-17	≥18	0	R	0	R
Nalidixic acid	30	≤13	14-18	≥19	0	R	0	R
Neomycin	30	≤12	13-16	≥17	9	R	9	R
Nitrofurantoin	300	≤14	15-16	≥17	26	S	26	S
Norfloxacin	10	≤17	18-21	≥22	0	R	0	R
Novobiocin	5	≤12	13-16	≥17	15	I	15	I
Oxolinic acid	2	≤10	-	≥11	0	R	0	R
Tetracyclin	30	≤14	15-18	≥19	8	R	8	R
Sulfamethoxazole/	25/1.5	≤10	11-15	≥16	16	S	16	S
Trimethoprim								
Oxytetracyclin	30	≤14	15-18	≥19	8	R	8	R
Penicillin G	10	≤19	-	≥28	28	S	28	S
Amoxycillin	10	≤13	-	≥18	26	S	26	S
Streptomycin	10	≤11	12-14	≥15	0	R	0	R

หมายเหตุ : R = Resistant
 I = Intermediate
 S = Susceptible
 - = No established range.

4.1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลอง

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการมีชีวิตรอดผ่านน้ำย่อยกระเพาะ และน้ำย่อยลำไส้จำลอง โดยน้ำย่อยจำลองที่ใช้ทดสอบ มีค่า pH ต่างๆ ได้แก่ 2, 3, 4 และ 7 จากการทดลองพบว่า *Lb. salivarius* K4 และ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยของกระเพาะที่มีค่า pH 2 ได้ ดังนั้นจึงไม่มีชีวิตเหลือรอดไปยังลำไส้ ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้น แต่พบว่า จำนวนเชื้อลดลงเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะเป็นเวลานานขึ้น โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดเพียง 4.40 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในสื่อใดๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

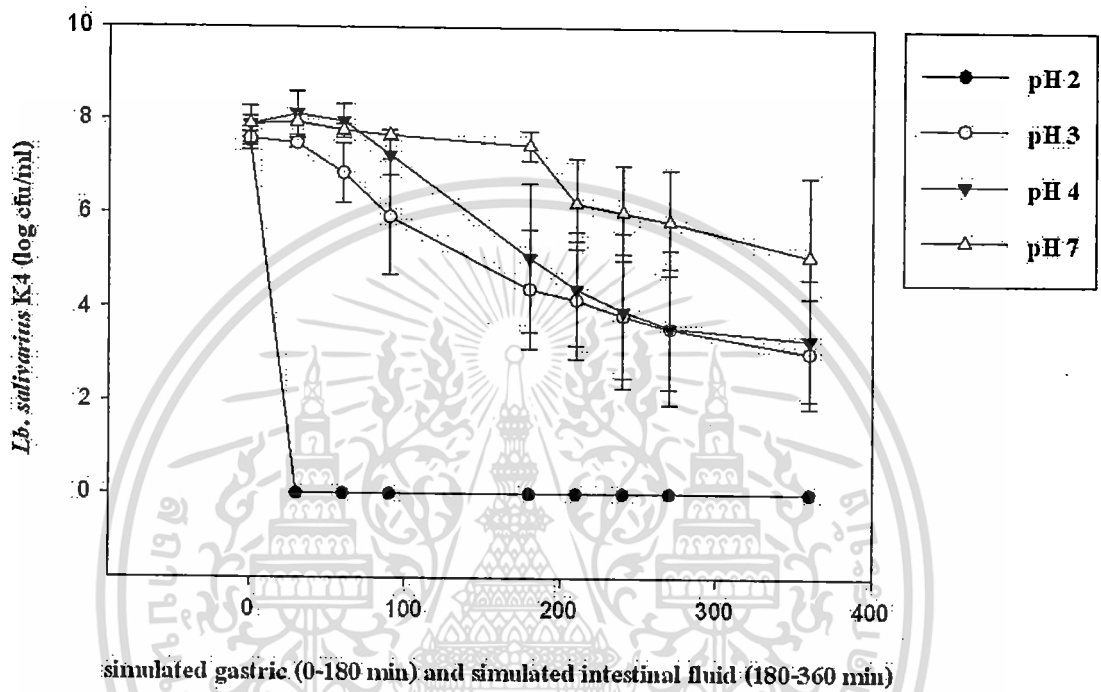
บริโภคในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งในสภาวะที่มีอาหารจะช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ดีขึ้นเนื่องจากอาหารและส่วนผสมในอาหารจะช่วยทำให้ค่า pH ภายในกระเพาะอาหารเพิ่มสูงขึ้นถึงระดับ pH 7 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อในน้ำย่อยกระเพาะจำลองที่มีค่า pH ต่างๆ คือ pH 2, 3, 4 และ 7

เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้จำลอง แต่มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยเป็นเวลานานขึ้น (ภาพที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ) ในลำไส้เล็กประกอบด้วยเกลือน้ำดีและ pancreatin ในลำไส้เล็กมีค่า pH ประมาณ 8.0 (Huang and Adams. 2004) เกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็วเป็นเหตุให้โปรตีนแทรกที่เยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) แยกออกมา ซึ่งส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาและเซลล์ตายไปในที่สุด (Begley *et al.* 2005) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่อยู่ภายในลำไส้ก็สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase) (Knarreborg *et al.* 2003) ทำให้น้ำดีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง แบคทีเรียจึงสามารถทนต่อน้ำดีได้ (Erkkilä and Petäjä. 2000)

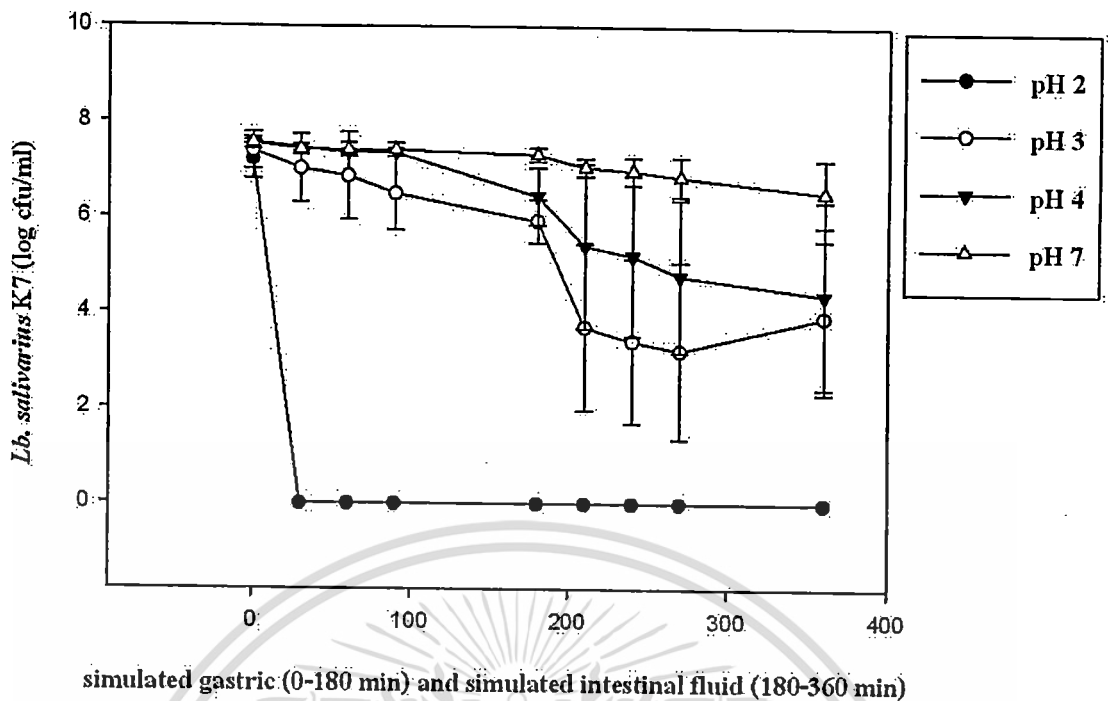
จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า สอดคล้องกับการทดลองของ Zárate *et al.* (2000) ที่พบว่า การย่อยที่ pH 4 ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของ propionibacteria ที่ทำการทดสอบ และ *P. acidipropionici* Q4 เท่านั้นที่ไวต่อการย่อยที่ pH 3 และที่ pH 2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างรวดเร็ว ในระหว่างการทดลองในกระเพาะ และ Huang and Adams (2004) ได้ทำการศึกษาผลของค่า pH ที่แตกต่างกันของน้ำย่อยในกระเพาะจำลองต่อการมีชีวิตรอดของ propionibacteria 13 ชนิด ซึ่งแยกได้จากนมโค โดยทำการทดสอบเป็นเวลา 180 นาที พบว่า propionibacteria ทั้ง 13 ชนิด สามารถมีชีวิตรอดได้ที่น้ำย่อยในกระเพาะ pH 4 ในขณะที่ในน้ำย่อย pH 3 มี propionibacteria ที่สามารถมีชีวิตรอดได้อยู่ 10 ชนิด ในขณะที่ในน้ำย่อย pH 2 ทุกสายพันธุ์มีชีวิตรอดลดลง เช่นเดียวกับ Zárate *et al.* (2000) ที่พบว่า propionibacteria 4 สายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากนมโค สามารถมีชีวิตรอดได้ที่น้ำย่อย pH 4 และมี 1 สายพันธุ์มีชีวิตรอดลดลงเพียงเล็กน้อยที่น้ำย่อย pH 3 และทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าว มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องที่น้ำย่อย pH 2

โดยปกติแบคทีเรียกรดแลคติกจะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยในกระเพาะอาหารจะมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยกว่า 3 log cfu/ml ในลำไส้เล็กส่วนไอเลียม (ileum) 2-5 log cfu/ml และในลำไส้ใหญ่ 4-9 log cfu/ml (Erkkilä and Petäjä. 2000) ซึ่งการที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านได้นั้น โปรไบโอติกต้องสามารถอยู่รอดได้ในระหว่างผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหาร และลำไส้ในปริมาณตั้งแต่ 6-9 log cfu/ml (Zárate *et al.* 2000) และจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า เมื่อมีเชื้อเริ่มต้น 7 log cfu/ml เมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะที่ pH 3, 4 และ 7 พบว่าเมื่อไปถึงลำไส้ *Lb. salivarius* K4 มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 2, 4 และ 4 log cfu/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 1, 3 และ 4 log cfu/ml ดังนั้นถ้า

จะให้ปริมาณเชื้อเหลือมากพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้านควรเติมเชื้อทั้ง 2 ชนิดในปริมาณเริ่มต้น $10 \log \text{cfu/ml}$ จากผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งสองชนิดสามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 ขึ้นไป จึงมีแนวโน้มว่า เชื้อทั้งสองชนิดสามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้



ภาพที่ 4.3 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ



ภาพที่ 4.4 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ

4.2 ผลของการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย

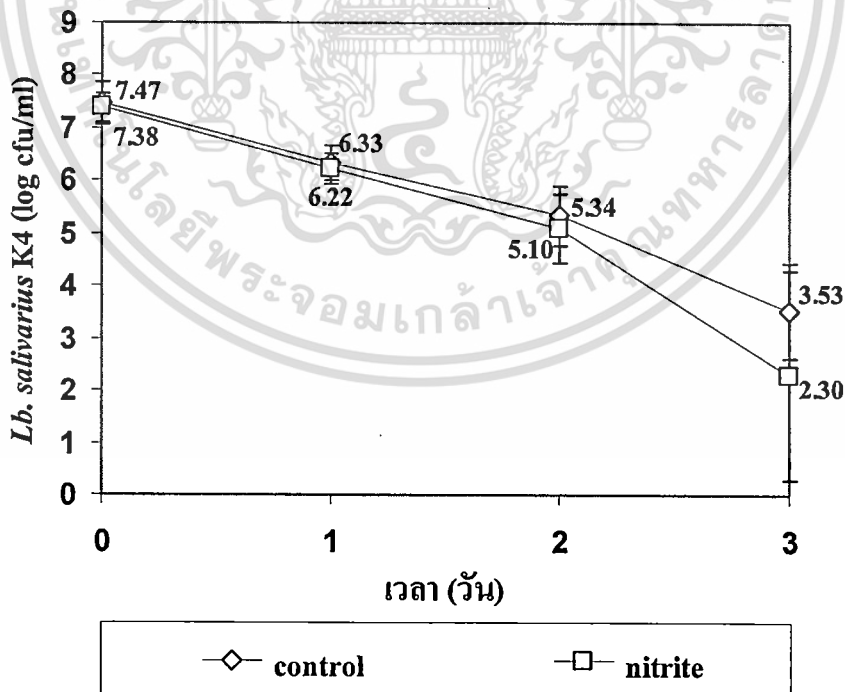
4.2.1 ผลของการใช้ในไตรที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหมน

ไนไตรท์ถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเพื่อช่วยพัฒนาสีของผลิตภัณฑ์ ช่วยป้องกันการหืนของไขมัน ช่วยให้เกิดรสชาติเค็ม และช่วยในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonellae* และ *Clostridia* ความเข้มข้นของไนไตรท์ที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 20-200 ppm ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Leroy and De Vuyst, 1999) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการทนต่อไนไตรท์ เพื่อคัดเลือกเชื้อดังกล่าวสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหมน จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อไนไตรท์ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหมน โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น แบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 และแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm พบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมและไม่เติมไนไตรท์ มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในกลุ่มที่ไม่ได้เติมไนไตรท์เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไตรที่มีชีวิตรอดสูงกว่าเชื้อในกลุ่มที่เติมไนไตรท์ลงไป คือ ในกลุ่มที่ไม่ได้เติมไนไตรท์เชื้อมีชีวิตรอด $3.53 \log \text{ cfu/ml}$ ในขณะที่เชื้อในกลุ่มที่เติมไนไตรท์ลงไปมีชีวิตรอดเพียง $2.30 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก (ภาพที่ 4.5) ในทำนองเดียวกัน เชื้อ *Lb. salivarius* K7 ทั้งกลุ่มที่เติมและไม่เติมไนไตรท์มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของกระบวนการหมักเช่นเดียวกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมไนไตรท์ลงไป พบว่าเชื้อในกลุ่มที่ทำการเติมไนไตรท์ลงไปจะมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตต่ำกว่า คือในกลุ่มที่ไม่เติมไนไตรท์มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด $6.98 \log \text{ cfu/ml}$ ส่วนเชื้อในกลุ่มที่เติมไนไตรท์ลงไปมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดเพียง $4.65 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก (ภาพที่ 4.6)

ไนไตรท์ช่วยส่งเสริมความเป็นพิษของกรดแลคติก ถ้าความสามารถในการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียลดลง ก็จะเกิดการสะสมของไนไตรท์ที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งไนไตรท์สะสมอยู่นี้จะไปรบกวนกระบวนการ active transport ของเซลล์ (Leroy and De Vuyst, 1999)

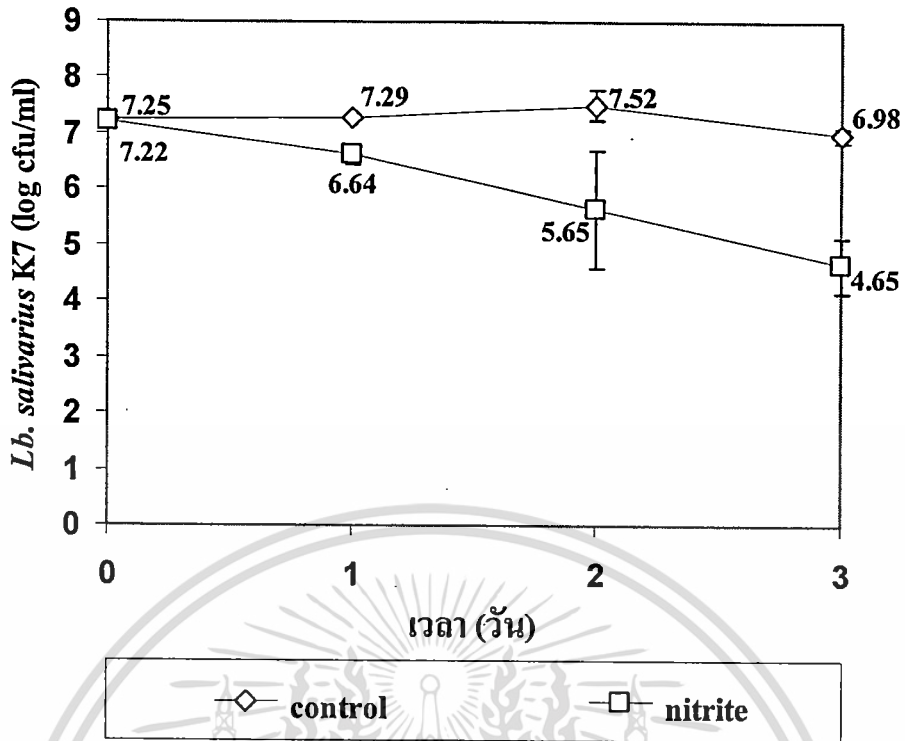
จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะสังเกตเห็นได้ว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ทนต่อไนไตรท์ที่เติมลงในแบบจำลองการหมักหมกความเข้มข้น 100 ppm ได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กล่าวคือ เชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีชีวิตรอดถึง $4.65 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก ในขณะที่เชื้อ *Lb. salivarius* K4 มีชีวิตรอดเพียง $2.30 \log \text{ cfu/ml}$ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตหมกต่อไป



ภาพที่ 4.5 ผลของไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius*

K4 ในแบบจำลองการหมักหมก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ผลของไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักแหนม

4.2.2 ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอด และการสร้างกรดแลกติก ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหนม

จากการศึกษาผลของกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นการจำลองสถานะการนำไปใช้ในแหนมจริง โดยสูตรทั่วไปของแหนมมักใช้กระเทียมประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาผลของกระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถเจริญได้ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมและไม่เติมกระเทียมแต่มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการหมักเป็นเวลา 3 วัน โดยในวันที่ 1, 2 และ 3 ของการหมักปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อต่ำกว่าปริมาณเชื้อในแบบจำลองการหมักแหนมที่ไม่ได้เติมกระเทียมในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก (ภาพที่ 4.7) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ตลอดระยะเวลาในการหมักแหนมเป็นเวลา 3 วันแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมมีค่า pH ลดลง (ตารางที่ 4.4) และมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าแบบจำลองการหมักแหนมที่ไม่เติมกระเทียม (ภาพที่ 4.7) ซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณเชื้อดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในวันที่ 0 และ 1 ของการหมัก ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียมมีปริมาณสูงกว่าปริมาณเชื้อใน

แบบจำลองการหมักแหนมที่ไม่เติมกระเทียม ดังนั้นจึงส่งผลให้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 ใน

เอกลาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมสร้างกรดแลกติกได้สูงในช่วงแรกของการหมัก และกรดแลกติกยังคงอยู่ในแบบจำลองการหมักแหมนตลอดระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 3 วัน ส่วนผลของกระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K7 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ในแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมและไม่เติมกระเทียมแต่มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2 วันของการหมัก และในวันที่ 3 ของการหมักเชื้อสามารถเจริญได้เพิ่มขึ้นจากการหมักวันที่ 2 ในวันที่ 1 และ 2 ของการหมักปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมมีปริมาณสูงกว่าปริมาณเชื้อในแบบจำลองการหมักแหมนที่ไม่เติมกระเทียม และตลอดระยะเวลาในการหมักแหมนเป็นเวลา 3 วันแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมมีค่า pH ลดลงต่ำกว่า (ตารางที่ 4.4) และมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่ไม่เติมกระเทียม (ภาพที่ 4.8) ซึ่งจากการศึกษาของ Verluyten *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาผลของกระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก โดยทำการศึกษาในสภาวะการหมักเนื้อจำลอง พบว่า กระเทียม 0.35 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เชื้อ *Lb. curvatus* LTH 1174 มีการเจริญลดลง 1.5 log cfu/ml ใน 28 ชั่วโมงแรกแต่หลังจากนั้นเชื้อสามารถกลับมาเจริญได้อีก

ตารางที่ 4.4 ค่า pH ในแบบจำลองการหมักแหมนที่เติม และไม่เติมกระเทียม

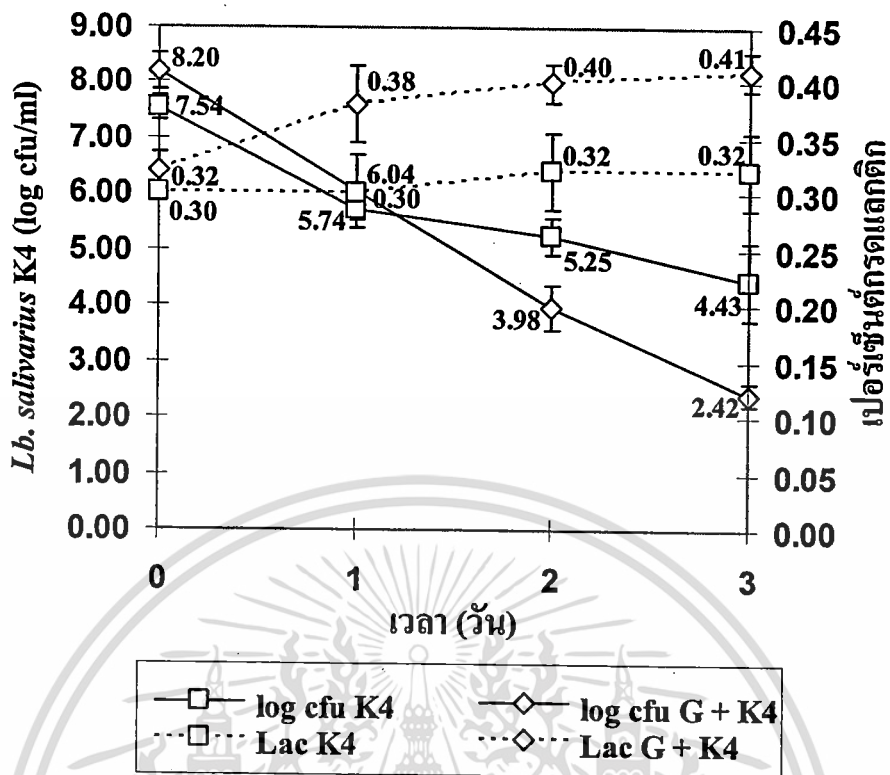
แบบจำลองการหมักแหมน	ค่า pH			
	จำนวนวันในการหมัก (วัน)			
	0	1	2	3
K4	5.64±0.11	5.34±0.21	5.20±0.17	5.11±0.16
G + K4	5.31±0.37	4.68±0.22	4.62±0.16	4.50±0.06
K7	5.80±0.10	5.05±0.09	4.96±0.06	4.88±0.04
G + K7	5.78±0.10	4.85±0.24	4.68±0.26	4.61±0.24

หมายเหตุ : K4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4

G + K4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียม

K7 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7

G + K7 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียม



ภาพที่ 4.7 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และปริมาณการสร้างกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักแฮมที่เติมและไม่เติมกระเทียม

หมายเหตุ : log cfu K4

หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4

log cfu G + K4

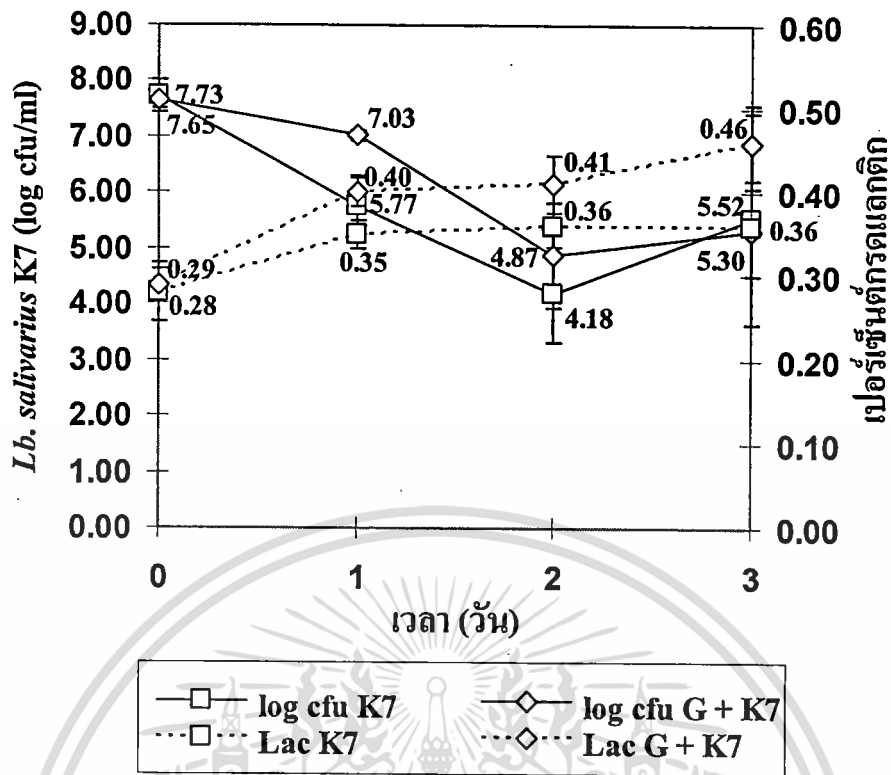
หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักแฮมที่เติมกระเทียม

Lac K4

หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักแฮมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4

Lac G + K4

หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักแฮมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียม



ภาพที่ 4.8 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ ปริมาณการสร้างกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักหมักเหนมที่เติม และไม่เติมกระเทียม

หมายเหตุ : log cfu K7

หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7

log cfu G + K7

หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมกระเทียม

Lac K7

หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

Lac G + K7

หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียม

4.2.3 ผลของการใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม

ผลของการใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม เทียบกับ แบบจำลองการหมักเหนมที่เติมกระเทียม หรือ เชื้อ *Lb. salivarius* K4 เพียงอย่างเดียว จากการศึกษาพบว่า การใช้กล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือกระเทียมเพียงอย่างเดียวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลังวันแรมสี่สิบเก้าปีแรกซึ่งให้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์จากเอกสารนี้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 เจริญได้ลดลงในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ส่วนการใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการหมักแบบจำลองการหมักแหมน (ภาพที่ 4.9) เช่นเดียวกับผลของการใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่พบว่า การใช้กล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 หรือกระเทียมเพียงอย่างเดียวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก ส่วนการใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการหมัก (ภาพที่ 4.10) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Swetwathana *et al.* (1999) ที่พบว่า การใช้กล้าเชื้อ *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* และ *P. acidilactici* ร่วมกับกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ในวันแรกของการหมัก

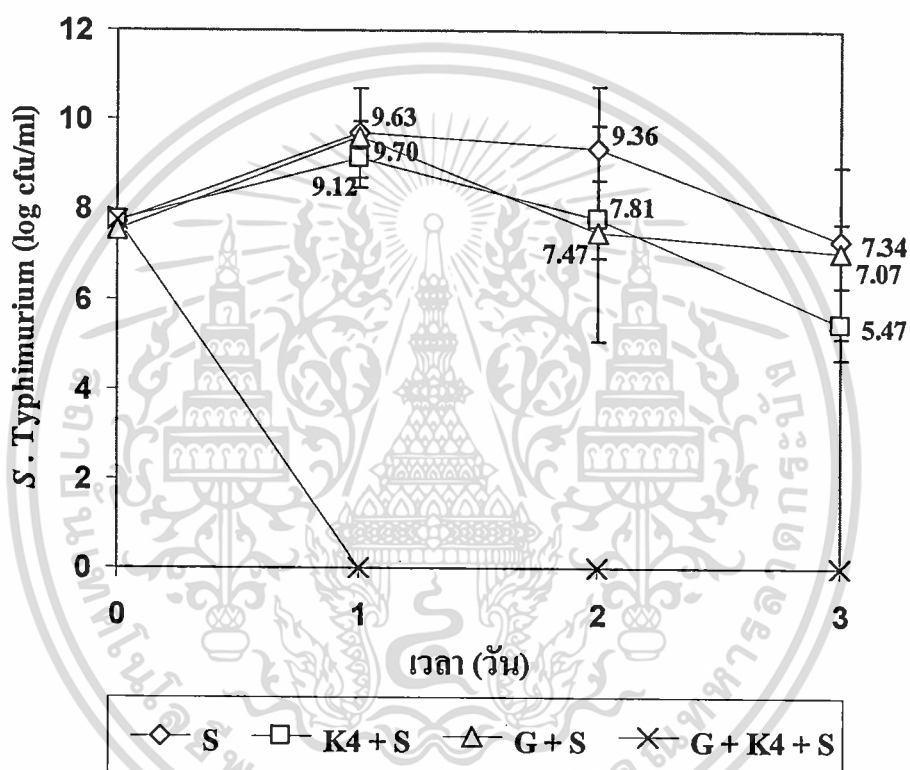
เป็นที่น่าสังเกตว่า การใช้ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ กระเทียมมีผลในการทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก ในขณะที่ค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สูงกว่าค่า pH ของกลุ่มทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 4.5) ส่วนค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius* K7 มีค่าสูงกว่าค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากผลการทำงานร่วมกันของกระเทียม แบคทีเรียโอซิน และกรดอินทรีย์ที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกมักเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ ที่ส่งผลให้เกิดการลดลงของ pH (Gonzalez *et al.* 2007) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไดอะซีทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน (Lindgren and Dobrogosz. 1990) ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด คือ Salivaricin B และ Salivicin K (Pilasombut. 2006) และเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน abp118α ได้ (Pilasombut. 2006) และในกระเทียมยังประกอบด้วยสาร allicin ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Swetwathana *et al.* 1999) กระเทียมที่โตเต็มที่จะมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น cysteine sulfoxides และเมื่อถูกสับให้ละเอียดเอนไซม์ allinase จะถูกปล่อยออกมา ซึ่งเอนไซม์ allinase จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน cysteine sulfoxides เป็น thiosulfonates ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา เป็นสารระเหย สร้างกลิ่น และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Benkeblia. 2004) กระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคในอาหารจำนวนมากทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจาก allicin ที่พบในกระเทียมจะทำให้ปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับโปรตีนที่มีส่วนประกอบของ thiol และสามารถผ่านเข้าสู่ Phospholipids

bilayers ได้อย่างอิสระ และสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีองค์ประกอบของ thiol ที่อยู่ในเซลล์ได้ (Verluyten *et al.* 2004) ซึ่งผลการทำงานร่วมกันของสารต่างๆ นี้อาจมีผลทำให้จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดไปได้ภายใน 24 ชั่วโมง มีรายงานเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียโอซินและกระเทียมในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรค (Kim *et al.* 2008) นอกจากนี้ Swetwivathana *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาผลการทำงานร่วมกันของ pH ที่ต่ำโดยใช้กรดแลคติก ร่วมกับแบคทีเรียโอซิน pediocin PA-1 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Anatum* จากการศึกษาพบว่า เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่ถูกทำลาย และทำการศึกษาในแบบจำลองการหมักแฮมโดยใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกลูต้าเชื้อที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน pediocin จากการศึกษาพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ดีกว่าแบบจำลองการหมักแฮมที่ไม่เติมกลูต้าเชื้อ และแบบจำลองการหมักแฮมที่เติมกลูต้าเชื้อที่ไม่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

เมื่อพิจารณาถึงแบบจำลองการหมักแฮมที่มีการเติมกระเทียมอย่างเดียว หรือแบบจำลองการหมักแฮมที่มีการเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 เพียงอย่างเดียว พบว่า แบบจำลองการหมักแฮมที่มีการเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ผลดีรองจากการเติมทั้งกระเทียมและเชื้อ เนื่องด้วยการทำงานร่วมกันของกระเทียม แบคทีเรียโอซิน และกระเทียม จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ดีกว่าแบบจำลองการหมักแฮมที่ไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

ตารางที่ 4.5 ค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่ใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4

แบบจำลองการหมักแหมน	ค่า pH			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
S	5.86±0.08	4.31±0.10	4.12±0.05	4.07±0.10
K4 + S	5.65±0.06	4.34±0.07	4.17±0.03	4.08±0.10
G + S	5.70±0.07	5.04±0.67	4.84±0.74	4.32±0.06
G+ K4 + S	5.38±0.33	4.71±0.27	4.65±0.24	4.47±0.14



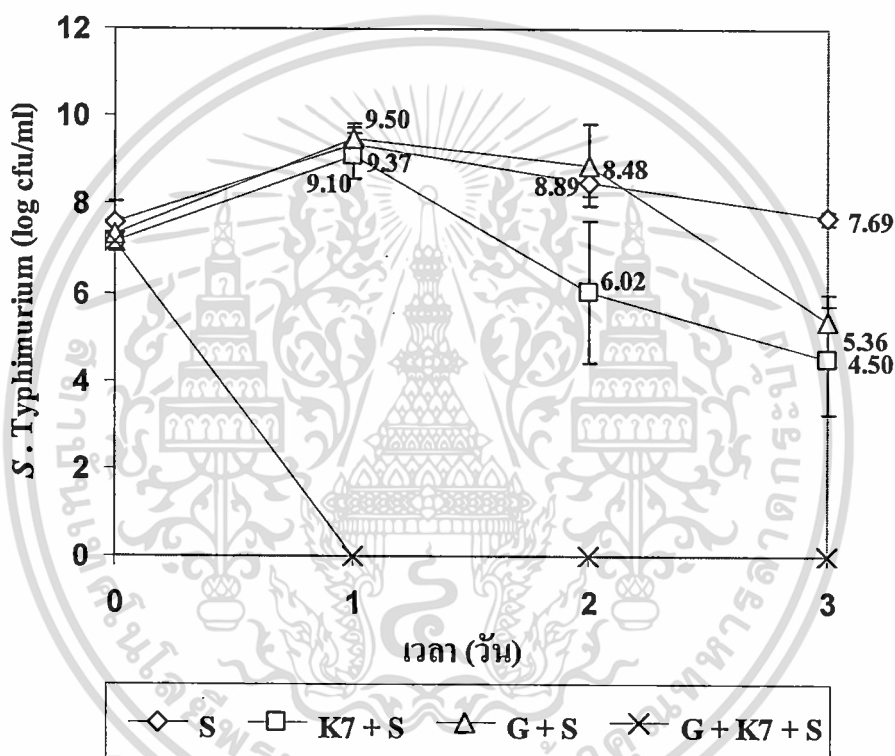
ภาพที่ 4.9 จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมักแหมน

- หมายเหตุ :
- S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 - K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 - G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 - G + K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมมที่ใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K7

แบบจำลองการหมัก แหมม	ค่า pH			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
S	5.89±0.03	4.48±0.08	4.16±0.04	4.11±0.03
K7 + S	5.81±0.10	4.26±0.09	3.99±0.04	3.83±0.06
G + S	5.87±0.09	5.08±0.56	4.86±0.71	4.81±0.70
G+ K7 + S	5.74±0.16	4.72±0.46	4.59±0.32	4.58±0.33



ภาพที่ 4.10 จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมักแหมม

- หมายเหตุ :
- S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 - K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 - G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 - G + K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ *salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลของการใช้เชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตแฮมเนื้อโค

4.2.4.1 ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของผลิตภัณฑ์แฮมเนื้อโค

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และคุณสมบัติการเป็นกล้ำเชื้อของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 พบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรด ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดี และสามารถอยู่รอดได้ภายในระบบทางเดินอาหารจำลอง ทนต่อไนไตรท์ และมีการเจริญในสภาวะของแบบจำลองการหมักแฮมเนื้อโคดีกว่า *Lb. salivarius* K4 ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เพื่อนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการเป็นกล้ำเชื้อในการหมักแฮม จากการศึกษาทดลองผลิตแฮมโดยแบ่งตัวอย่างแฮมออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำการหมักโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลงไป และกลุ่มที่ทำการหมักโดยเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลงไป 10^6 cfu/g แล้วทำการหมักเปรียบเทียบกับแฮมแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกล้ำเชื้อ พบว่า ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของแฮมที่เติมกล้ำเชื้อลงไปในส่วนผสม กับแฮมที่ทำการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.11) กล่าวคือ หลังจากทำการหมักแฮมได้ 0-3 วัน พบว่า การหมักแฮมที่มีการเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จะทำให้เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้น และค่า pH ลดลงต่ำกว่าแฮมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ ในวันที่ 4-5 ของการหมักแฮมจะสังเกตเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก และค่า pH ไม่มากนัก และเมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกระหว่างการหมักแฮม พบว่า แฮมที่หมักโดยเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลงไปนั้น ในวันที่ 0 จะมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่าแฮมที่ทำการหมักโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ ทั้งนี้เนื่องมาจากการเติมกล้ำเชื้อในตอนเริ่มต้นการหมัก ทำให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ แบคทีเรียกรดแลคติกเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลกติกจากกระบวนการหมัก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญในปริมาณมากกว่านี้ ทำให้มีการสร้างกรดแลคติกในปริมาณมาก จึงส่งผลให้ค่า pH ลดต่ำลงมากกว่าการหมักที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ แต่หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกของแฮมทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.7) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงค่า pH และปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรกของการหมักแฮม อาจเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณมากได้ใช้คาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้ปริมาณมากในช่วง 3 วันแรกของการหมักแฮม หลังจากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มที่เติมกล้ำเชื้อ มีปริมาณไม่เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อจึงทำให้สามารถสร้างกรดแลกติกและทำให้ค่า pH ลดลงใกล้เคียงกัน

แต่อย่างไรก็ตาม บุษกร อุดรภิชาติ (2547) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักแฮมคือ แบคทีเรียกรดแลคติก โดยในระยะแรกของการหมัก (ประมาณ 1-2 ชั่วโมง) พบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อซึ่งได้แก่ แบคทีเรียรูปท่อนและรูปกลม ดิคลีสแกรมบวกและแกรมลบ

ซึ่งมีทั้งพวกที่สร้างกรดได้ และพวกที่ทำให้อาหารเน่าเสียแบบต่างๆ หลังการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

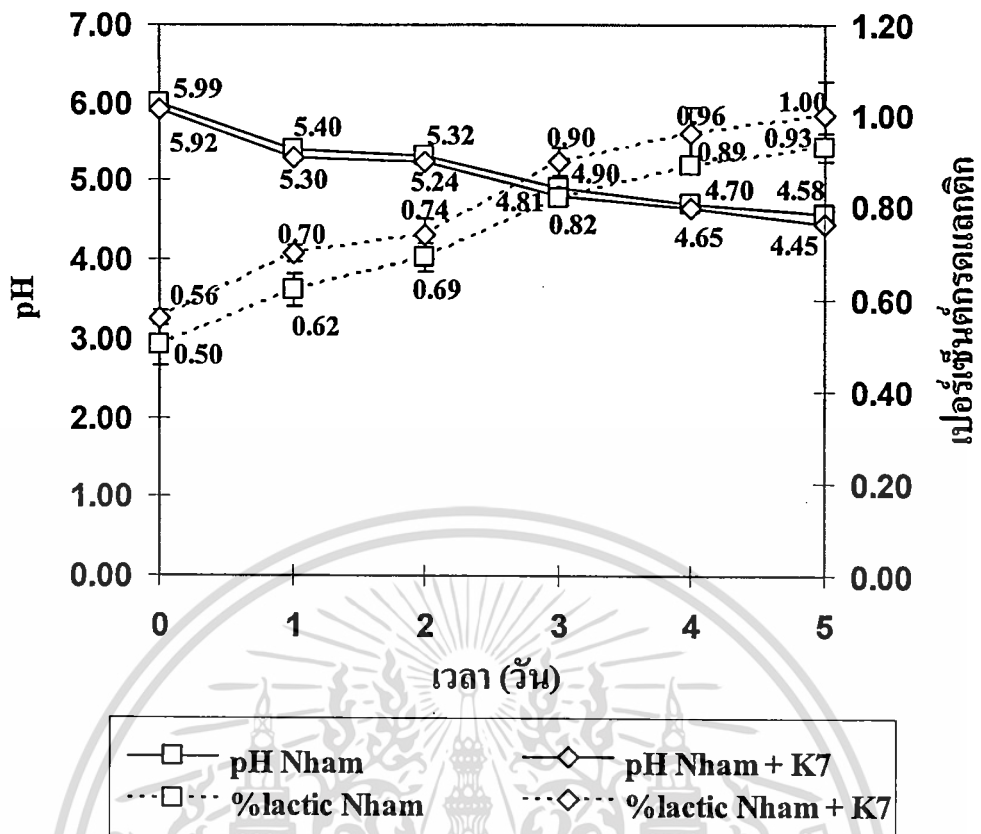
ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่พบในระยะแรกบางชนิดจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดีและเติบโตในที่มีออกาศน้อย ได้แก่เชื้อ homofermentative cocci ได้แก่เชื้อ *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* เป็นจำนวนมากเติบโตไปพร้อมๆ กับเชื้อ heterofermentative lactobacilli (ได้แก่ *Lb. brevis*) ซึ่งเชื้อ homofermentative cocci จะใช้น้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลกติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้ pH ลดลงจากเดิมในระยะ 3 วันแรกของการหมัก ต่อมาในวันที่ 4 ของการหมักจะพบเชื้อ heterofermentative lactobacilli ก็คือเชื้อ *Lb. plantarum* เติบโตมากขึ้นและสร้างกรดออกมา ในขณะที่ยังเหลือเชื้อ *Pediococcus* และ heterofermentative lactobacilli อยู่บ้าง ระดับ pH ของหมักในวันที่ 4 มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 และมีกรดแลกติกสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า pH ที่ต่ำและเปอร์เซ็นต์กรดที่สูง จะทำให้จุลินทรีย์บางชนิด รวมทั้งแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ *Salmonella* ตายเกือบหมด แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ค่า pH ของหมักที่ทำการหมักตามธรรมชาติเป็นเวลา 0-5 วัน พบการลดลงของค่า pH จาก 5.99 เป็น 4.58 ในวันที่ 5 ของการหมักหมัก ส่วนค่า pH ของหมักที่ทำการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 พบการลดลงของค่า pH จาก 5.92 เป็น 4.45 ในวันที่ 5 ของการหมักหมัก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากล้าเชื้อที่เติมลงไปนั้น ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนมากพอที่จะสร้างกรด และทำให้ค่า pH ลดลงต่ำกว่า 4.5 ได้ภายในวันที่ 3 และ 4 ของการหมัก จึงอาจส่งผลให้ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรคที่พบในหมักอย่าง *Salmonella* ให้หมดไปได้ภายในระยะเวลาการหมักหมักเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 4.7 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกระหว่างการหมักหมักเนื้อโค

เวลา (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก (log cfu/g)		
	Nham	Nham + K7	Nham + K7 + S
0	5.72±0.11	6.76±0.15	6.75±0.19
1	8.77±0.09	8.93±0.05	8.83±0.04
2	8.94±0.09	9.11±0.08	9.11±0.04
3	9.14±0.06	9.25±0.03	8.94±0.03
4	8.53±0.06	8.69±0.15	8.54±0.03
5	8.63±0.12	8.77±0.06	8.78±0.06

หมายเหตุ : Nham หมายถึง หมักที่หมักโดยไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 หมายถึง หมักที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 + S หมายถึง หมักที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292



ภาพที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์แหนม

หมายเหตุ : %lactic Nham หมายถึง เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนม

%lactic Nham + K7 หมายถึง เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของผลิตภัณฑ์
แหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

pH Nham หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนม

pH Nham + K7 หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนม
ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

4.2.4.2 ค่า water activity (A_w) ของผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค

ผลของการวิเคราะห์ค่า water activity พบว่า แหนมที่มีการเติมกล้ำเชื้อ และไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 นั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ การหมักในวันที่ 1-3 พบว่า ค่า water activity ของแหนมทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ส่วนการหมักในวันที่ 4-5 จะพบว่าค่า water activity เพิ่มขึ้นสูงกว่าการหมักในวันที่ 0-3 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 เนื่องจากเมื่อทำการบรรจุแหนมในถุงพลาสติกแล้วมัดให้แน่นเพื่อให้เกิดการหมักแบบไม่มีอากาศ เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นเนื้อ โคนและส่วนผสมต่างๆ เกาะตัวกัน ทำให้มีน้ำที่เกิดจากกระบวนการ

ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักบางส่วนออกมาอยู่ในอุณหภูมิต่ำและไม่สามารถซึมผ่านออกไปด้านนอกได้ ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ค่า water activity จึงทำให้เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แหนมทั้งที่เดิมและไม่เดิมกล้าเชื้อลงไป มีค่า water activity เพิ่มขึ้น

ค่า water activity (A_w) เป็นดัชนีที่บอกว่ำน้ำนั้นเป็นน้ำที่นำไปใช้ได้โดยจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ของจุลินทรีย์ต้องการ A_w มากกว่า 0.9 (ดวงพร กันธ โชติ. 2545) ค่า A_w ของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 1.00 และจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญในน้ำบริสุทธิ์นั้นได้ตามปกติ จุลินทรีย์มีค่า A_w ที่สูงสุด (maximum) ที่เหมาะสม (optimum) และที่ต่ำสุด (minimum) สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น อย่างไรก็ตาม สิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการแปรรูปอาหารก็คือ การป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้วิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ก็คือ การปรับค่า A_w ของอาหารให้มีค่าที่ต่ำกว่าค่า A_w ที่ต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์ในแต่ละชนิดจะเจริญได้ เมื่อพิจารณาถึงผลของการเจริญเติบโตพบว่า ถ้าในอาหารชนิดนั้นมีค่า A_w ที่ต่ำกว่าค่า A_w ที่ต่ำที่สุดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์นั้นจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่ถ้าอาหารนั้นมีค่า A_w ที่ต่ำกว่า A_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จะทำให้จุลินทรีย์นั้นเจริญอยู่ในช่วง lag phase ที่ยาวนานกว่าปกติ และอัตราในการเจริญเติบโตก็ช้าลงกว่าเดิม ดังนั้นในการยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารจึงจำเป็นต้องลดค่า A_w ของอาหารนั้นให้ต่ำกว่าค่า A_w ที่ต่ำที่สุดของจุลินทรีย์ เพื่อลดการเสื่อมเสียของจุลินทรีย์ อาหารสดทั้งผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ รวมทั้งสัตว์ปีกและปลา มีค่า A_w อยู่ระหว่าง 0.97-1.00 ซึ่งเป็นสภาพที่เกื้อหนุนให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้เป็นส่วนใหญ่ (วรารุณี ครุสง. 2538) ซึ่งหมกทั่วไปจะมีค่า A_w เท่ากับ 0.97 และจากการทดลอง พบว่าแหนมที่เดิมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-5 วัน จะมีค่า A_w ระหว่าง 0.967-0.983 ดังนั้นจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แต่อย่างไรก็ตามค่า A_w ในช่วงดังกล่าวนี้ยังส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคร้าย *Salmonella* และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียสามารถเจริญได้ด้วย ซึ่งจะต้องทำการศึกษาผลของการเดิมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการหมักแหนมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Salmonella* เพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและทำให้ได้แหนมที่มีความปลอดภัย

ตารางที่ 4.8 ค่า water activity (A_w) ของผลิตภัณฑ์แฮมเนื้อ โค

เวลา (วัน)	ค่า water activity (A_w)	
	Nham	Nham + K7
0	0.965±0.005	0.967±0.008
1	0.963±0.007	0.959±0.003
2	0.977±0.007	0.970±0.022
3	0.980±0.002	0.975±0.003
4	0.965±0.001	0.965±0.004
5	0.982±0.008	0.983±0.005

หมายเหตุ : Nham หมายถึง แฮมที่หมักโดยไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 หมายถึง แฮมที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

4.2.4.3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แฮมเนื้อโค

การศึกษานี้ได้ทำการหาวิธีการที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ โดยนำกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *Lb. salivarius* K7 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ (Pilasombut *et al.* 2006) และมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติก (Narakaew *et al.* 2009) มาใช้ในการผลิตแฮมโดยให้มีเชื้อเริ่มต้นการหมักในปริมาณ 10^6 cfu/g การทดลองแบ่งตัวอย่างแฮมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หมักโดยไม่เติมกล้ำเชื้อ กลุ่มที่ทำการหมักโดยเติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นในปริมาณ 10^2 cfu/g และกลุ่มที่ทำการหมักโดยเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/g ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ปริมาณ 10^2 cfu/g จากการทดลอง พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ทุกวันของการหมัก (ตารางที่ 4.9)

Swetwivathana *et al.* (2007) ได้ทำการทดลองโดยใส่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน Pediocin PA-1 และ *P. pentosaceus* JCM 5890 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแบคทีเรียโอซิน ในการหมักแฮม พบว่าการใส่กล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/g สามารถลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 8-10 cfu/g ได้หมดในวันที่ 4, 5 และ 6 ของการหมัก โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.56, 4.44 และ 4.25 ตามลำดับ และลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 80-100 cfu/g หมดในวันที่ 5 และ 6 ส่วนการใส่กล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5890 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/g สามารถลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 8-10 cfu/g ได้หมดในวันที่ 5 และ 6 ของการหมัก โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.42 และ 4.24 ตามลำดับ และลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 80-100 cfu/g หมดในวันที่ 6 ของการหมักแฮม ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้จากการศึกษานี้ที่ พบว่าแฮมที่เติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถ

ลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ปริมาณเริ่มต้น 100 cfu/g ให้หมดไปได้ภายในวันที่ 5 ของการหมักแหมน โดยแหมนที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-5 วัน มีค่า pH เท่ากับ 5.92, 5.30, 5.24, 4.81, 4.65 และ 4.45 ตามลำดับ ทั้งนี้ถึงแม้ค่า pH ในวันที่ 5 ของการหมักแหมนจะมีค่าต่ำกว่า 4.5 แต่ยังคงตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* อยู่ ทั้งนี้เนื่องมาจากค่า pH ในช่วงแรกของการหมักแหมนลดต่ำลงช้าทำให้เชื้อ *S. Typhimurium* สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นถึงแม้ค่า pH ในวันที่ 5 จะลดลงถึง 4.45 ก็อาจมีปริมาณกรดไม่มากพอที่จะทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ ซึ่งการที่ค่า pH ลดต่ำลงช้านี้อาจเนื่องมาจากกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่เติมลงไปมีปริมาณน้อย หรือเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะของการหมักแหมน เนื่องจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เป็นเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสภาวะของแหมนอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อชนิดนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในแบบจำลองการหมักแหมน พบว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับไนโตรที่ 100 ppm และกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของค่า pH ระหว่างแหมนและแบบจำลองการหมักแหมน พบว่าแบบจำลองการหมักแหมนมีการลดลงของ pH ต่ำลงรวดเร็วกว่าการลดลงของ pH ในแหมน กล่าวคือ แบบจำลองการหมักแหมนที่ทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน มีค่า pH เท่ากับ 5.74, 4.72, 4.59 และ 4.58 ตามลำดับ ซึ่ง Swetwathana *et al.* (1999) รายงานว่า ในผลิตภัณฑ์แหมนจะใช้เวลาการหมักเพื่อลดเชื้อ *S. Anatum* ให้หมดไปนานกว่าผลที่ได้จากการศึกษาในแบบจำลองการหมักแหมน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกิจกรรมการยับยั้งของไนโตรที่ที่ถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์ อาจจะลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่าในแบบจำลองการหมักแหมน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาเคมีกับส่วนผสมบางชนิดในแหมน กิจกรรมการยับยั้งของไนโตรที่ที่ลดลงนี้จะไปทำให้การยับยั้งเชื้อก่อโรคลดลง ทำให้ *S. Anatum* สามารถเจริญได้ในระยะแรกของการหมักแหมนจากการที่การยับยั้งเชื้อก่อโรคจะเกิดจากการสร้างกรดแลกติกของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ดังนั้นความแตกต่างของค่า pH ที่ลดลงในแหมน และแบบจำลองการหมักแหมนมีผลต่อการลดลงของ *S. Anatum* เนื่องจากค่า pH ของแหมนจะลดลงช้ากว่าในแบบจำลองการหมักแหมน จึงส่งผลให้การลดเชื้อ *Salmonella* ให้หมดไปจากแหมนเกิดขึ้นช้าตามไปด้วย และ พรพิมล เทียนทอง (2548) รายงานว่า เชื้อ *Salmonella* จะถูกยับยั้งโดยสารต่างๆ ที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นได้มากหรือน้อยเพียงใดนั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณที่เชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่ด้วย

ตารางที่ 4.9 ผลของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่มีต่อการยับยั้ง *S. Typhimurium* TISTR 292 ในແໜມเนื้อโค

เวลา (วัน)	การตรวจพบเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292		
	Nham	Nham + S	Nham + K7 + S
0	-	+	+
1	-	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	-	+	+

หมายเหตุ : Nham หมายถึง แໜມທີ່หมักโดยไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 Nham + S หมายถึง แໜມທີ່หมักโดยเติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 Nham + K7 + S หมายถึง แໜມທີ່หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

4.3 ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R

ทำการออกแบบไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R โดยทำการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่กลุ่ม *Lb. salivarius* แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ที่พบในແໜມ เชื้อก่อโรคและเชื้อที่ทำให้เนื้อเน่าเสีย จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW ใน BioEdit version 7.0.8 และทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ *Lb. salivarius* ซึ่งมีขนาดผลผลิต PCR เท่ากับ 151 bp ดังแสดงในภาพที่ 4.12

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Yersinia				ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAGT					AGTTTACTAC	
Salmonella										
Pseudomonas	TGGAGTTTGAATCCTGGCTCAG						AT.AC..G..CT		T.C.CCT.GA	
Acinetobacter	GAGTTTGACCTGGCTCAG				T		GGAA..G..		..C..G...	
Moraxella							A..ATGA.T..TC.		..C..G...G	
K7	AGAGTTTGA TTATGGCTCAGGAC			GT	T	A	A..AA.CTTTCTTAC	ACCGAAT.C..G.ATT		
K4	AGTTTGA TCATGGCTCAGGAC			GT	T		A..AA.CTTTCTTAC	ACCGAAT.C..G.ATT		
Pedicoccus					CT	T	A	AACTTCC.TTAATTGATTATGACGT.C..G.ACTGAA		
Lactobacillus	AGAGTTTGA TCCTGGCTCAGGAC			GT	T		AGCAGAACC..C	AGA.....T.GGT		
Listeria	GAGTTTGA TCATGGCTCAGGAC			GT	T		A..AACCGAC...AG	..C..G..CT		
Campylobacter					GT	T	A..AGATT	..C..G...T		
Escherichia	AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG						A..TAACA.G AAC	..C..G..GT		
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Yersinia	TTTGCC	GGCGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG	GATCTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGC							
Salmonella										
Pseudomonas	T.C				C.A.A		G.A.T	C	GTTCC	G.AGC
Acinetobacter	C.G	AC.T			CT.A.A		AT.A.T	C	AT.C	G.AT
Moraxella	A.AT	.ATT.T	A		CT.A.A		AT.A.T	C	TCC	G.A.G
K7	CACCG.AAGA	A.TT.T			CACG..TA.C		A.AA.A	ACT		A.GT
K4	CACCG.AAGA	A.TT.T			CACG..CA.C		A.AA.A	ACT		A.GT
Pedicoccus	TGAGATT..AA.A	CGAA.T	T		CACG..TA.C		CAGAA.CA	AC		A.AT
Lactobacillus	AATGACGC.G.GG	AC			CACG..GA.C		CC.A.TCT	C.ACT		A.GT
Listeria	TTC.GA.G	TT.T			CACG..CA.C		TAA.TT	C.G		C.GG
Campylobacter	..AA	TCTT.T	C		A.A.CTA		CT.C.A	C	AGT.A	T.ACT
Escherichia	T.CGCTG	A..T			A.A					

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Yersinia	ATG	ACCTCGTAAGAGCAAAGT	GGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTC							
Salmonella enteri										
Pseudomonas	..A C	GTC.TACG.GAG.....T.....A.....	T..A...G..T..G.C.....	T...A...A....					
Acinetobacter	..A	CGTC.TACG.GAG...C A.....TG..T.ATA...G..T.AG.C.....	T.....A...CT						
Moraxella	..A	CGTCTTACGAGAG...A.....	G.T..TA.CT...T.ATA...G..T.AG.C.....	T.....A...CT						
K7	..ATCTCTAAGGATCGCATGATC.TT..AT,AAA..TGG.TCT..AT..TT.TA...G...GCGGC.T...A...T.....C...CT									
K4	..ATCTCTAAGGATCGCATGATC.TTG,AT,AAA..TGG.TCT..AT..TT.TA...G...GCGGC.T...A...T.....C...CT									
Pediococcus	..AACAGAGAA.A.CGCCTG,TTTCTT.TAAAA..TGGCTCT..AT.A.TTCT...G...GCGGC.C.....T...A...C....									
Lactobacillus	..AAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAA.G.GGCCTAAG.GT..T..G...GC...GCGGT.C.....T...AA...C...T									
Listeria	..AATAACAAGCGTTCGCATGAC..CTGT.T.AAA..GG.TTC.G..GT.A.TTA.A...GG...GCGGT.C.....T...A...CT									
Campylobacter	..A	CT.CTTCTTA.CAT...TTAA.T.GGGAAA.TT.TT..G...A...GG.T.T.T.T.C.....T...A.....								
Escherichia	..AAC	GTCGCA...C...A.....	TT..TG.....							

ภาพที่ 4.12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Campylobacter* และ *Escherichia* ด้วยโปรแกรม ClustalW ใน BioEdit (version 7.0.8)

4.3.2 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R

เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ที่ออกแบบ โดยทดสอบกับ DNA ที่สกัดได้จากเชื้อชนิดอื่นๆ อีก 13 ชนิดดังแสดงในภาพที่ 4.13 เมื่อนำไพรเมอร์คู่นี้มาทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจผลด้วย gel electrophoresis พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA ขนาด 151 bp ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เท่านั้นแต่จะเห็นแถบ DNA เป้าหมายจางมาก โดยจากภาพที่ 4.13 จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA ของเชื้ออื่นๆ ที่ทำการทดสอบได้จึงนำไพรเมอร์คู่นี้มาใช้ในการหาปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7



ภาพที่ 4.13 ผลผลิต PCR ของชิ้น 16S rRNA ขนาด 151 bp โดยใช้ไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R

แถบที่ M = 100 bp DNA ladder

แถบที่ 1 = *Lactobacillus salivarius* K4

แถบที่ 2 = *Lactobacillus salivarius* K7

แถบที่ 3 = *Pediococcus pentosaceus* TISTR 292

แถบที่ 4 = *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T

แถบที่ 5 = *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T

แถบที่ 6 = *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T

แถบที่ 7 = *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T

แถบที่ 8 = *Streptococcus* sp. TISTR 1030

แถบที่ 9 = *Listeria innocua* ATCC 33090^T

แถบที่ 10 = *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T

แถบที่ 11 = *Staphylococcus aureus* TISTR 118

แถบที่ 12 = *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358

แถบที่ 13 = *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

แถบที่ 14 = *Salmonella* Typhimurium TISTR 292

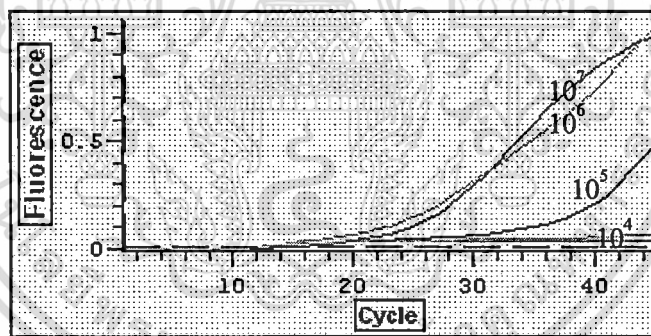
แถบที่ 15 = *Escherichia coli* TISTR 780

แถบที่ N = Negative control

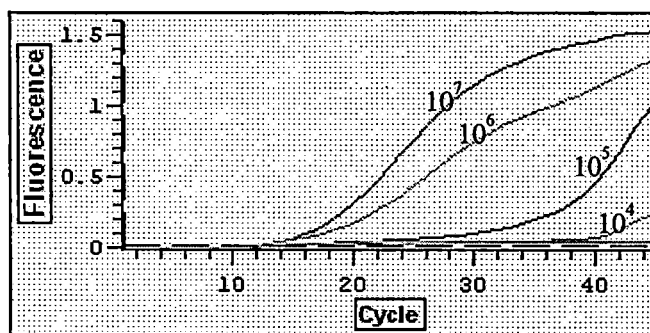
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การทดสอบความไวของ Real-time PCR ในการตรวจจับ DNA

เมื่อนำไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ให้มีความเจือจางลดลงเป็น 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 ซึ่งจะเท่ากับปริมาณเชื้อที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate คือ 10^7 , 10^6 , 10^5 และ 10^4 log cfu/ml ตามลำดับ และจากการทำปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่าการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA คือการเพิ่มปริมาณ DNA ของปริมาณเชื้อที่ 10^7 log cfu/ml ควรจะเพิ่มในอัตราสูงสุด รองลงมาเป็น DNA ของปริมาณเชื้อที่ 10^6 , 10^5 และ 10^4 log cfu/ml ตามลำดับ แต่จากภาพที่ 4.14 และ 4.15 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณ DNA ของปริมาณเชื้อที่ 10^7 และ 10^6 เพิ่มในอัตราใกล้เคียงกัน รองลงมาเป็น DNA ของปริมาณเชื้อที่ 10^5 และ 10^4 log cfu/ml ซึ่งเพิ่มในอัตราใกล้เคียงกัน จากการเพิ่มปริมาณผลผลิต Real-time PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนของความเข้มข้นของ DNA จึงทำให้ไม่สามารถทำ standard curve ได้ ดังนั้นถ้านำไพรเมอร์คู่นี้ไปใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR จะทำให้การคำนวณปริมาณของตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นผิดพลาดได้ ดังนั้นไพรเมอร์คู่นี้จึงไม่เหมาะที่จะนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาณในปฏิกิริยา Real-time PCR จึงต้องทำการเปลี่ยนไพรเมอร์ใหม่



ภาพที่ 4.14 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยใช้ไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ในปฏิกิริยา Real-time PCR

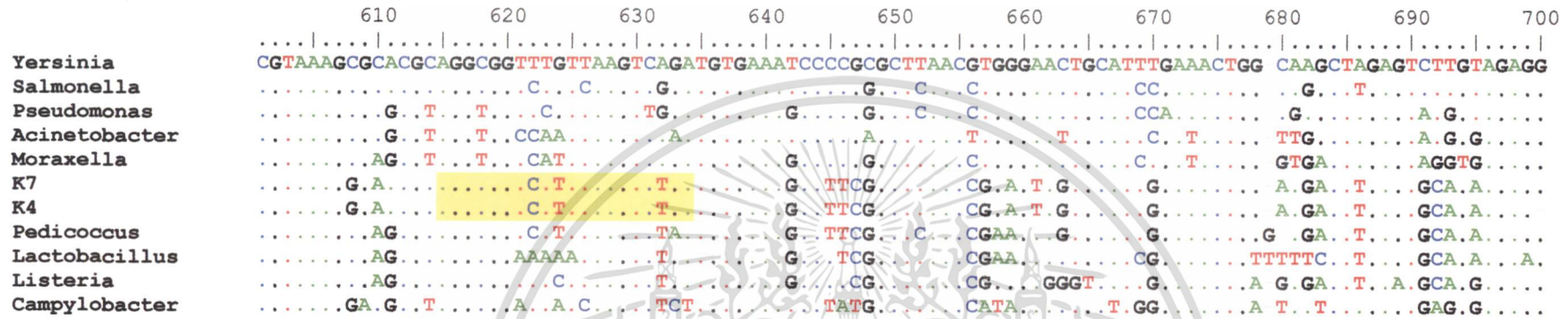


ภาพที่ 4.15 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 โดยใช้ไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ในปฏิกิริยา Real-time PCR

4.3.4 การออกแบบไพรเมอร์ K7F และ K7R

เนื่องจากไพรเมอร์ Sali_F และ Sali_R ไม่เหมาะที่จะนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ในปฏิกิริยา Real-time PCR จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ K7F และ K7R โดยทำการเปรียบเทียบ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่กลุ่ม *Lb. salivarius* แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ที่พบในແໜ່ນເຂົ້ອກໍ່โรคและเชื้อที่ทำให้เนื้อเน่าเสีย จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW ใน BioEdit version 7.0.8 และทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ *Lb. salivarius* ซึ่งมีขนาดผลผลิต PCR เท่ากับ 310 bp ดังแสดงในภาพที่ 4.16

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
										
Yersinia	ACCTAGGGCACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG										
Salmonella											
Pseudomonas	..A.	G..A.	T	T
Acinetobacter	..A.	TG..G.	T	C	G
Moraxella	..A.	TG..G.	T	G	C
K7	..A.	T..T..A.G.	..C.AA	T..T.G.	T	G	C..A.	A.....C..C
K4	..A.	T..T..A.G.	..C.AA	T..T.G.	T	G	C..A.	A.....C..C
Pedicoccus	..A.	T..G.G.	..C.AC	G.A.T.G.	T..G	C	A.....C..C
Lactobacillus	..A.	T..G.A.	..C.AGT	AC..T.G.	T..G	C	A.....C..C
Listeria	..A.	G..A.	..C.AC	G	T.G.	G	C.....A.....C..C
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
										
Yersinia	CACAAATGGGCGCAAGCCCTGATGCATCCATGCCCGTGTGTGAAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCAGTTCGTGTTAATAG										
Salmonella											
Pseudomonas	G	A	C	G	T	A
Acinetobacter	G	G.G	..C	G	TT	A
Moraxella	G	A	C	G	TT	A
K7	A	T	G	G	A	C	A
K4	A	T	G	G	A	C	A
Pedicoccus	A	T	G	G	A	C	A
Lactobacillus	A	T	G	G	A	C	A
Listeria	G	A	A	T	C	G	G
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
										
Yersinia	CACGATTGATTG ACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG										
Salmonella											
Pseudomonas	T	CGC	CA	A	C	G
Acinetobacter	T	C	GTT	CGA	T	T
Moraxella	T	C	AGCCC	CTA	T	T
K7	G	TTC	CGA	G	TCTAACC	GC	TCA
K4	G	TTC	CGA	G	TCTAACC	GC	TCA
Pedicoccus	G	TTC	CGC	G	T	TAACC
Lactobacillus	G	CT	AT	G	A	TAACC
Listeria	G	CTTG	CCC	G	TCTAACC	GA	CA



ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* และ *Listeria* ด้วยโปรแกรม ClustalW ใน BioEdit (version 7.0.8)

4.3.5 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ K7F และ K7R

เมื่อนำไพรเมอร์ K7F และ K7R มาทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจผลด้วย gel electrophoresis พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ซึ่งมีขนาด 310 bp แต่ไม่จำเพาะต่อเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เท่านั้น โดยจากภาพที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยได้แก่ *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lb. plantarum* ATCC 14917^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *E. faecalis* JCM 5803 แต่อย่างไรก็ตามไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ (ภาพที่ 4.17) นอกจากนี้จากภาพที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าเกิดแถบ DNA ที่ไม่ใช่ผลผลิต PCR ที่ต้องการเกิดขึ้น โดยผลผลิตที่ต้องการคือแถบ DNA ขนาด 310 bp ซึ่งอาจเกิดจากสารเคมีและองค์ประกอบในการทำ PCR ของไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่เหมาะสม อีกทั้งยังพบว่ายีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์จึงทำได้ยากเนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จะมีการจับข้ามสปีชีส์ และในปฏิกิริยา Real-time PCR ยังมีข้อจำกัดของขนาดผลผลิต PCR ก็ต้องมีขนาดไม่เกิน 400 bp ถ้าขนาดผลผลิต PCR มีความยาวมากเกินไปจะทำให้มีโอกาสในการแปรผลผิดพลาดสูง



ภาพที่ 4.17 ผลผลิต PCR ของยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R

แถบที่ M = 100 bp DNA ladder

แถบที่ 1 = *Lactobacillus salivarius* K4

แถบที่ 2 = *Lactobacillus salivarius* K7

แถบที่ 3 = *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

แถบที่ 4 = *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T

แถบที่ 5 = *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T

แถบที่ 6 = *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T

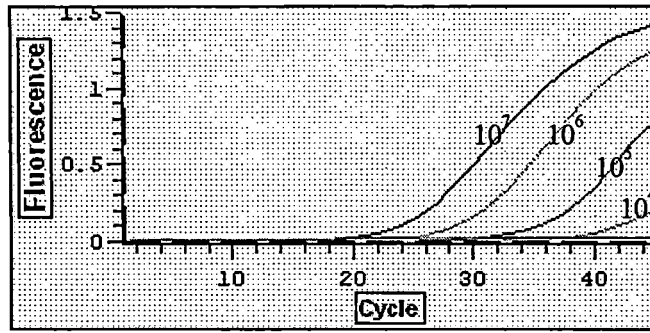
แถบที่ 7 = *Streptococcus* sp. TISTR 1030

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

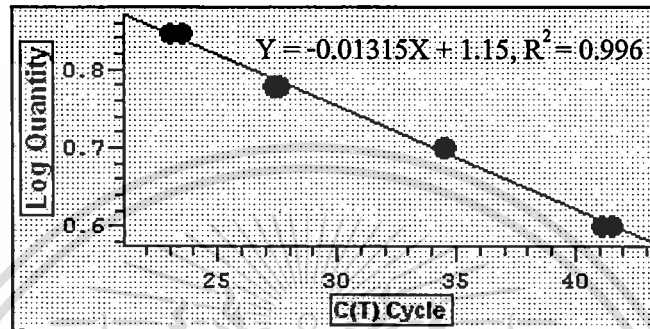
- แถบที่ 8 = *Listeria innocua* ATCC 33090^T
 แถบที่ 9 = *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T
 แถบที่ 10 = *Staphylococcus aureus* TISTR 118
 แถบที่ 11 = *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358
 แถบที่ 12 = *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321
 แถบที่ 13 = *Salmonella* Typhimurium TISTR 292
 แถบที่ 14 = *Escherichia coli* TISTR 780
 แถบที่ N = Negative control

4.3.6 การทดสอบความไวของ Real-time PCR ในการตรวจจับ DNA

เมื่อนำไพรเมอร์ K7F และ K7R ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 ซึ่งที่ระดับความเจือจางดังกล่าวจะเท่ากับเชื้อที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate คือ 10^7 , 10^6 , 10^5 และ 10^4 log cfu/ml ตามลำดับ พบว่าการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA จึงสามารถทำ standard curve (ภาพที่ 4.18 และ 4.19) เพื่อคำนวณปริมาณ DNA จากตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นได้ อีกทั้งในแบบจำลองการหมักหมนมได้ทำการควบคุมให้มีเฉพาะเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ไพรเมอร์คู่นี้ไปใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 จากแบบจำลองการหมักหมนม

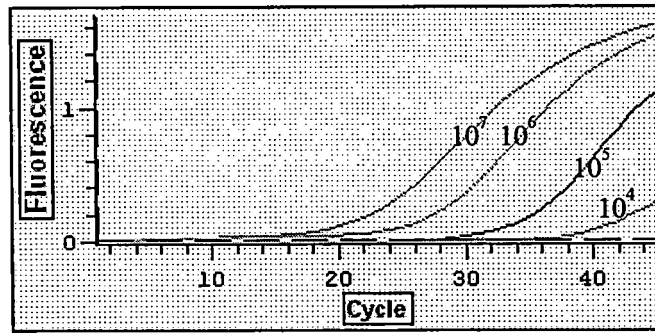


(a)

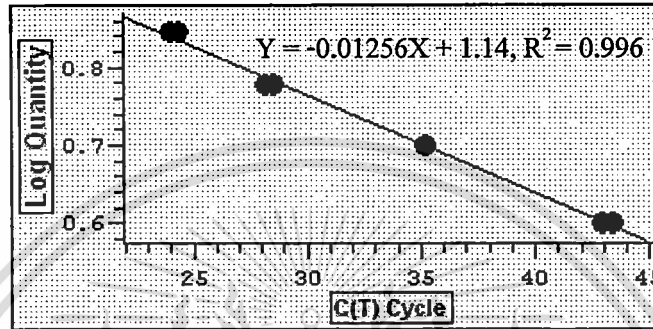


(b)

ภาพที่ 4.18 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (310 bp) ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพ a) และแสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA (10-fold dilution series) (แกน Y) กับ copy number (threshold cycle) ของยีน 16S rRNA (แกน X) (ภาพ b)



(a)



(b)

ภาพที่ 4.19 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (310 bp) ของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพ a) และแสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA (10-fold dilution series) (แกน Y) กับ copy number (threshold cycle) ของยีน 16S rRNA (แกน X) (ภาพ b)

4.3.7 ผลการตรวจปริมาณเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 และ K7 จากแบบจำลองการหมักหมกหมกที่ทำกรหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 จากแบบจำลองการหมักหมกหมก โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น แบบจำลองการหมักหมกหมกที่เดิมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 แบบจำลองการหมักหมกหมกที่เดิมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 แบบจำลองการหมักหมกหมกที่เดิมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 และแบบจำลองการหมักหมกหมกที่เดิมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 และทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 โดยวิธี spread plate และด้วยเทคนิค Real-time PCR จากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยวิธี spread plate พบว่า ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จากตัวอย่างที่เดิมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เพียงอย่างเดียวมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่ามีอิทธิพลร่วมของกลุ่มทดลองต่างๆ และระยะเวลาการหมัก โดยในวันที่ 2 และ 3 ของการ

หมัก กลุ่มทดลองที่มีการเติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมกระเทียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.10) ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบแถบ DNA ขนาด 310 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่ต้องการ (ภาพที่ 4.18) และพบว่าปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เพียงอย่างเดียวมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นเชื้อ *Lb. salivarius* K4 มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีอิทธิพลร่วมของกลุ่มทดลองต่างๆ และระยะเวลาการหมัก โดยในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก กลุ่มที่เติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมกระเทียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.11)

จากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 โดยวิธี spread plate พบว่า ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในกลุ่มที่เติมและไม่เติมกระเทียมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และไม่มีอิทธิพลร่วมของกลุ่มทดลองต่างๆ และระยะเวลาการหมัก (ตารางที่ 4.12) ส่วนการตรวจปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบ แถบ DNA ขนาด 310 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่ต้องการ (ภาพที่ 4.19) และพบว่าปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในกลุ่มที่เติมและไม่เติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.12)

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR ให้ผลค่อนข้างไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate แต่ปริมาณเชื้อที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค Real-time PCR มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าปริมาณเชื้อที่วิเคราะห์โดยวิธี spread plate ทั้งนี้เนื่องมาจากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate เป็นการตรวจปริมาณของเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้น บางครั้งเชื้อที่บาดเจ็บอาจไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการตรวจโดยวิธี spread plate จะบอกได้เฉพาะเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้น ในแบบจำลองการหมักหมนมอาจมีเชื้อบางส่วนที่ตายไปแล้ว DNA ของเชื้อยังอยู่ ซึ่งการตรวจโดยวิธี Real-time PCR จะตรวจ DNA จึงอาจทำให้พบปริมาณที่มากกว่าเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate

ตารางที่ 4.10 ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จากแบบจำลองการหมักแทนมที่ทำกรวิเคราะห์
โดยวิธี Spread plate (LSM±SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
K4	7.54±0.34 ^B	5.74±0.34 ^{hi}	5.25±0.34 ^{hi}	4.43±0.34 ^{jk}	5.74±0.17 ^a
K4 + S	7.94±0.34 ^B	4.26±0.34 ^k	3.12±0.34 ^{lm}	4.72±0.42 ^{ik}	5.04±0.18 ^b
G + K4	8.20±0.34 ^B	6.04±0.34 ^h	3.98±0.34 ^{kl}	2.42±0.34 ^m	5.16±0.17 ^b
G + K4 + S	7.95±0.34 ^B	5.84±0.34 ^h	4.34±0.34 ^{jk}	2.75±0.34 ^m	5.22±0.17 ^b
ค่าเฉลี่ย	7.91±0.17 ^c	5.47±0.17 ^d	4.17±0.17 ^c	3.48±0.18 ^f	

หมายเหตุ : K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

c, d, e และ f ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

a และ b ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

g, h, i, j, k, l และ m ในแนวตั้งและแนวนอนคือค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error

ตารางที่ 4.11 ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จากแบบจำลองการหมักหมนมที่ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR (LSM±SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
K4	6.58±0.05 ⁿ	7.43±0.05 ^h	6.50±0.05 ⁿ	5.81±0.05 ^o	6.58±0.03 ^b
K4 + S	6.82±0.05 ^{lm}	7.45±0.05 ^h	7.18±0.05 ^{ij}	7.21±0.05 ^{ij}	7.16±0.03 ^a
G + K4	7.33±0.05 ^{hi}	7.79±0.05 ^g	6.91±0.05 ^{kl}	6.81±0.05 ^{lm}	7.21±0.03 ^a
G + K4 + S	7.15±0.05 ^j	7.93±0.05 ^g	6.75±0.05 ^m	6.98±0.05 ^k	7.20±0.03 ^a
ค่าเฉลี่ย	6.97±0.03 ^d	7.65±0.03 ^c	6.83±0.03 ^c	6.70±0.03 ^f	

หมายเหตุ: K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292

G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.* *Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

c, d, e และ f ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

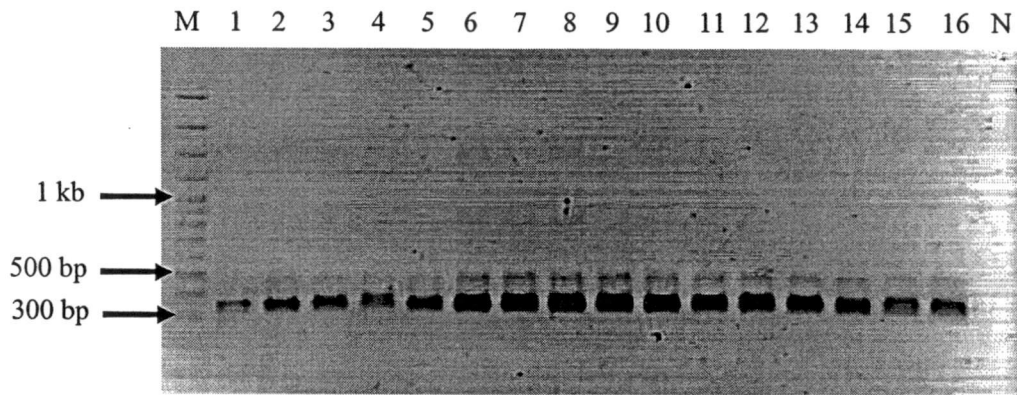
a และ b ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

g, h, I, j, k, l, m, n และ o ในแนวตั้งและแนวนอนคือค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จากแบบจำลองการหมักเหวม (NMB) ที่ทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

แถบที่ M = 100bp DNA ladder

แถบที่ 1-4 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 5-8 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 9-12 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมแล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 13-16 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ N = Negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากแบบจำลองการหมักแทนที่ทำการวิเคราะห์
โดยวิธี Spread plate (LSM±SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
K7	7.73±0.45	5.77±0.45	4.18±0.45	5.52±0.45	5.80±0.22 ^b
K7 + S	7.65±0.45	7.26±0.45	6.75±0.45	6.45±0.45	7.03±0.22 ^a
G + K7	7.65±0.45	7.03±0.45	4.87±0.45	5.30±0.45	6.22±0.22 ^b
G + K7 + S	7.64±0.45	7.08±0.45	4.34±0.45	4.25±0.55	5.97±0.24 ^b
ค่าเฉลี่ย	7.67±0.22 ^c	6.79±0.22 ^d	5.04±0.22 ^e	5.48±0.24 ^e	

หมายเหตุ : K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4
 K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์
 G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์
 c, d และ e ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
 a และ b ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
 LSM = Least Squares Means
 SE = Standard Error

ตารางที่ 4.13 ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากแบบจำลองการหมักแทนที่ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR (LSM±SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
K7	6.74±0.06 ^m	7.66±0.06 ^{ji}	7.49±0.06 ^{jk}	6.46±0.06 ⁿ	7.08±0.03 ^c
K7 + S	6.82±0.06 ^m	7.94±0.06 ^h	7.66±0.06 ^{ji}	7.54±0.06 ^{jk}	7.49±0.03 ^a
G + K7	6.79±0.06 ^m	7.80±0.06 ^{hi}	7.57±0.06 ^{jk}	7.43±0.06 ^{kl}	7.40±0.03 ^{ab}
G + K7 + S	6.89±0.06 ^{lm}	7.56±0.06 ^{jk}	7.56±0.06 ^{jk}	7.33±0.06 ^l	7.33±0.03 ^b
ค่าเฉลี่ย	6.81±0.03 ^e	7.74±0.03 ^d	7.57±0.03 ^e	7.19±0.03 ^f	

หมายเหตุ: K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแทนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

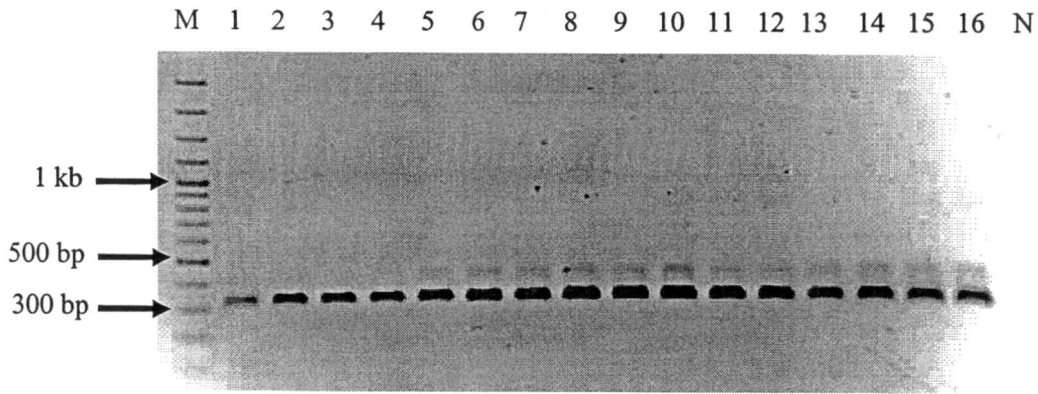
d, e, f และ g ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

a, b, และ c ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

h, i, j, k, l, m, และ n ในแนวตั้งและแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error



ภาพที่ 4.21 ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากแบบจำลองการหมักเหวม (NMB) ที่ทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

แถบที่ M = 100bp DNA ladder

แถบที่ 1-4 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 5-8 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 9-12 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมแล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

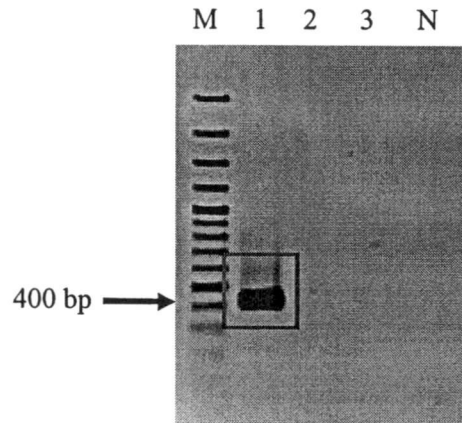
แถบที่ 13-16 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ N = Negative control

4.4 ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

4.4.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 16SF และ 16SR (Catarame *et al.* 2006)

เมื่อนำไพรเมอร์ 16SF และ 16SR มาทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจผลด้วย gel electrophoresis พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ซึ่งมีขนาด 402 bp ของเชื้อ *Salmonella* โดยจากภาพที่ 4.22 จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ได้



ภาพที่ 4.22 ผลผลิต PCR ของยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR

แถบที่ M = 100 bp DNA ladder

แถบที่ 1 = *Salmonella* Typhimurium TISTR 292

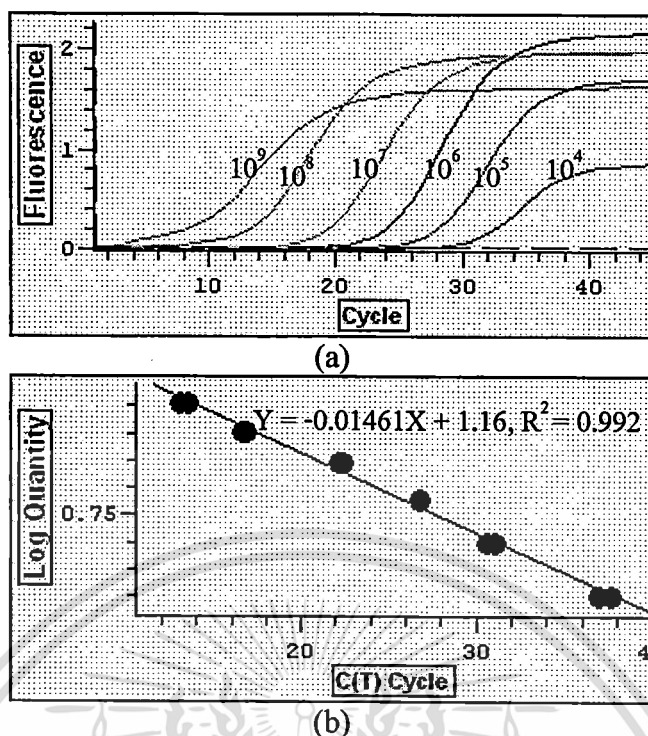
แถบที่ 2 = *Lactobacillus salivarius* K4

แถบที่ 3 = *Lactobacillus salivarius* K7

แถบที่ N = Negative control

4.4.2 การทดสอบความไวของ Real-time PCR ในการตรวจจับ DNA

และเมื่อนำไพรเมอร์ 16SF และ 16SR ไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292. ในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้มีความเจือจางลดลงเป็น 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate จะเท่ากับ 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 และ 10^4 log cfu/ml ตามลำดับ พบว่าการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA จึงสามารถทำ standard curve ได้ (ภาพที่ 4.23) อีกทั้งไพรเมอร์คู่นี้ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 (ภาพที่ 4.22) ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์คู่นี้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในปฏิกิริยา Real-time PCR



ภาพที่ 4.23 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA (402 bp) ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพ a) และแสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA (10-fold dilution series) (แกน Y) กับ copy number (threshold cycle) ของชิ้น 16S rRNA (แกน X) (ภาพ b)

4.4.3 ผลการใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

จากแบบจำลองการหมักหมมที่ทำกรหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และกระเทียม

จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมม โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น แบบจำลองการหมักหมมที่เดิมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 แบบจำลองการหมักหมมที่เดิมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 แบบจำลองการหมักหมมที่เดิมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และแบบจำลองการหมักหมมที่เดิมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยวิธี spread plate และด้วยเทคนิค Real-time PCR จากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate พบว่า ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากตัวอย่างที่เดิมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 เพียงอย่างเดียวมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อระยะเวลาการหมักหมมเพิ่มขึ้นปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีอิทธิพลระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และระยะเวลาการหมัก (ตารางที่ 4.14) ส่วนการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Real-time

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR พบแถบ DNA ขนาด 402 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่ต้องการ พบปริมาณเชื้อสอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate กล่าวคือ ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากตัวอย่างที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 เพียงอย่างเดียวมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามในการหมักวันที่ 2 และ 3 ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 มีจำนวนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และมีอิทธิพลร่วมของกลุ่มทดลองต่างๆ และระยะเวลาการหมัก โดยในวันที่ 2 และ 3 ของการหมักกลุ่มที่เติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เติมกระเทียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมกหมนที่ทำกรหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread plate (LSM \pm SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
S	7.71 \pm 0.64	9.70 \pm 0.64	9.36 \pm 0.64	7.34 \pm 0.64	8.52 \pm 0.32 ^a
K4 + S	7.74 \pm 0.64	9.12 \pm 0.64	7.81 \pm 0.64	5.47 \pm 0.64	7.54 \pm 0.32 ^b
G + S	7.54 \pm 0.64	9.63 \pm 0.64	7.47 \pm 0.64	7.07 \pm 0.64	7.93 \pm 0.32 ^{ab}
G + K4 + S*	7.76*	< 10*	< 10*	< 10*	
ค่าเฉลี่ย	7.67 \pm 0.37 ^{de}	9.48 \pm 0.37 ^c	8.21 \pm 0.37 ^d	6.63 \pm 0.37 ^c	

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

c, d และ e ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

a, b ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

* คือ ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติเนื่องจากไม่มีการเจริญของเชื้อ

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error

ตารางที่ 4.15 ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักแหมนที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR (LSM±SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
S	6.16±0.06 ⁿ	9.10±0.06 ^h	8.91±0.06 ⁱ	8.87±0.06 ⁱ	8.26±0.03 ^a
K4 + S	6.17±0.06 ⁿ	8.86±0.06 ⁱ	8.82±0.06 ⁱ	8.73±0.06 ⁱ	8.14±0.03 ^b
G + S	6.15±0.06 ⁿ	9.14±0.06 ^h	6.44±0.06 ^{lm}	6.27±0.06 ^{mn}	6.99±0.03 ^c
G + K4 + S	6.88±0.06 ^j	6.68±0.06 ^k	6.32±0.06 ^{lm}	6.49±0.06 ^{kl}	6.59±0.03 ^d
ค่าเฉลี่ย	6.34±0.03 ^b	8.44±0.03 ^c	7.62±0.03 ^f	7.59±0.03 ^f	

หมายเหตุ : S

หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K4 + S

หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S

หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S

หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

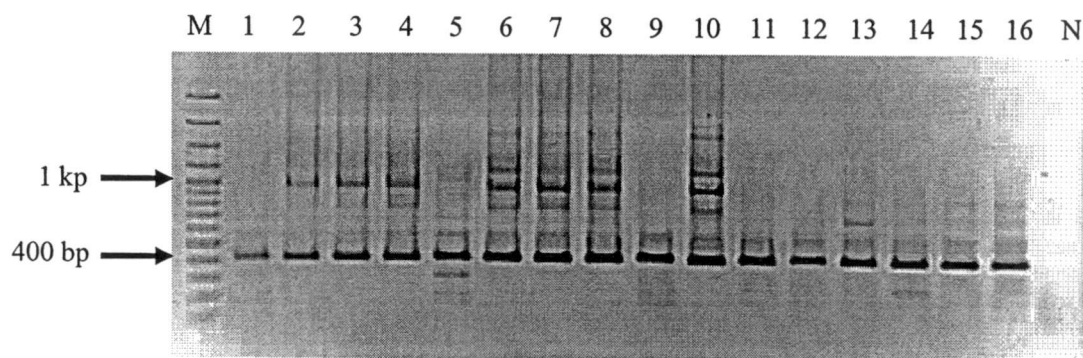
e, f และ g ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

a, b, c และ d ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

h, i, j, k, l, m และ n ในแนวตั้งและแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error



ภาพที่ 4.24 ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหวม (NMB) ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

แถบที่ M = 100bp DNA ladder

แถบที่ 1-4 = NMB ที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

ตามลำดับ

แถบที่ 5-8 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 9-12 = NMB ที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับกระเทียมแล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 13-16 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ N = Negative control

4.4.4 ผลการใช้เทคนิค Real-time PCR ตรวจปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

จากแบบจำลองการหมักเหวมที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และกระเทียม

จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหวมโดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น แบบจำลองการหมักเหวมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แบบจำลองการหมักเหวมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 แบบจำลองการหมักเหวมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยวิธี spread plate และด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp (ภาพที่ 4.25) จากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate พบว่า ตัวอย่างที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 มีปริมาณ *S. Typhimurium* TISTR 292 ต่ำกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ 2 และ 3 ของการหมักเชื้อ *S.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Typhimurium TISTR 292 มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีอิทธิพลร่วมของกลุ่มทดลองต่างๆ และระยะเวลาการหมัก โดยในวันที่ 2 และ 3 ของการหมักปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.16) ส่วนการตรวจปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีปริมาณเชื้อใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณเชื้อลดลงแต่ยังคงมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.17) นอกจากนี้ปริมาณที่ตรวจพบโดยวิธี Real-time PCR ยังมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่ตรวจพบสูงกว่าปริมาณเชื้อที่ตรวจพบโดยวิธี spread plate อีกด้วย

ตารางที่ 4.16 ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักແໜ່ນທີ່ทำการหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread plate (LSM±SE)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
S	7.59±0.41 ^{hi}	9.37±0.41 ^b	8.48±0.41 ^{gh}	7.69±0.41 ^{hi}	8.28±0.20 ^a
K7 + S	7.25±0.41 ⁱ	9.45±0.41 ^b	6.94±0.41 ⁱ	4.44±0.41 ^j	7.02±0.20 ^b
G + S	7.30±0.41 ^{hi}	9.50±0.41 ^b	8.89±0.41 ^b	5.36±0.41 ^j	7.76±0.20 ^a
G + K7 + S*	7.13*	< 10*	< 10*	< 10*	
ค่าเฉลี่ย	7.38±0.23 ^e	9.44±0.23 ^c	8.10±0.23 ^d	5.83±0.23 ^f	

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักແໜ່ນที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักແໜ່ນที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง แบบจำลองการหมักແໜ່ນที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักແໜ່ນที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

c, d, e และ f ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

a, และ b ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

g, h, i และ j ในแนวตั้งและแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<0.05)

* คือไม่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติเนื่องจากการไม่มีการเจริญของเชื้อ

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมกที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และกระเทียม โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR (LSM±SE)

Treatment	Real time PCR (log cfu/ml)				ค่าเฉลี่ย
	จำนวนวันในการหมัก				
	0	1	2	3	
S	6.51±0.07 ^{mmo}	8.41±0.07 ^{jk}	8.47±0.07 ^{ijk}	8.31±0.07 ^k	7.92±0.03 ^b
K7 + S	6.62±0.07 ^{hmn}	8.69±0.07 ^{gh}	8.52±0.07 ^{hij}	8.39±0.07 ^{jk}	8.05±0.03 ^a
G + S	6.41±0.07 ^o	8.66±0.07 ^{ghi}	8.79±0.07 ^g	8.49±0.07 ^{hijk}	8.09±0.03 ^a
G + K7 + S	6.44±0.07 ^{no}	6.82±0.07 ^l	6.66±0.07 ^{lm}	6.43±0.07 ^{no}	6.59±0.03 ^c
ค่าเฉลี่ย	6.49±0.03 ^f	8.14±0.03 ^d	8.11±0.03 ^d	7.90±0.03 ^e	

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมกที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

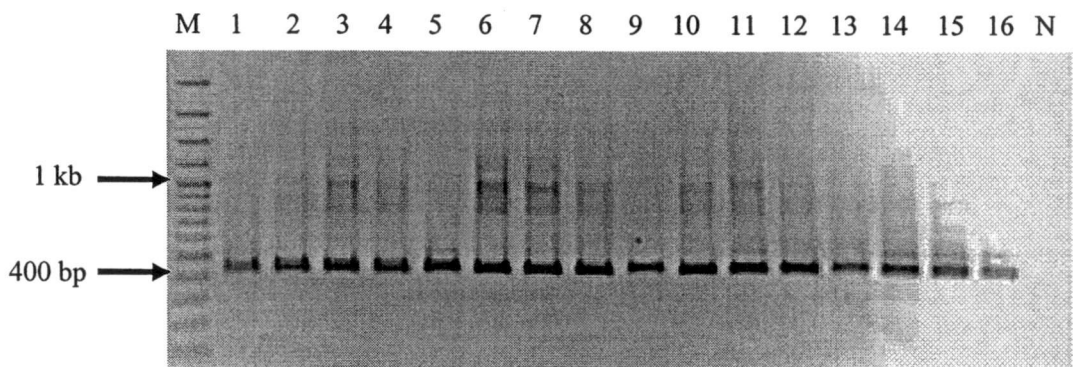
d, e และ f ในแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

a, b และ c ในแนวตั้งคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

g, h, i, j, k, l, m, n และ o ในแนวตั้งและแนวนอนคือ ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

LSM = Least Squares Means

SE = Standard Error



ภาพที่ 4.25 ผลผลิต Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR เพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA ขนาด 402 bp ของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมนม (NMB) ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

แถบที่ M = 100bp DNA ladder

แถบที่ 1-4 = NMB ที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน

ตามลำดับ

แถบที่ 5-8 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 9-12 = NMB ที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับกระเทียมแล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ 13-16 = NMB ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วันตามลำดับ

แถบที่ N = Negative control

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักหมนมกลุ่มทดลองต่างๆ โดยใช้เทคนิค Real-time PCR มีแนวโน้มในการตรวจพบปริมาณเชื้อดังกล่าวสูงกว่า ปริมาณเชื้อที่ทำการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate ยกเว้นผลการตรวจปริมาณเชื้อในวันที่ 0 ที่บางกลุ่มทดลองพบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ได้ปริมาณเชื้อต่ำกว่าการวิเคราะห์โดยวิธี spread plate อาจเกิดจากความผันแปรของ DNA ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการสกัด DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรม สารเคมีต่างๆ ซึ่งใช้ในการสกัด DNA เช่น Phenol, SDS และ EDTA ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Real-time PCR ได้ และอาจนำไปสู่การแปรผลการวิเคราะห์ที่ผิดพลาด ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัด DNA ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง นับว่ามีส่วนช่วยทำให้ DNA ที่สกัดได้มีทั้งปริมาณและคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณของสารพันธุกรรมได้ (ขนิษฐา วงศ์วัฒนะรัตน์ และคณะ 2553) และความผันแปรของ DNA ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่าย หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต หากมีข้อผิดพลาดประการใด ขออภัยเป็นอย่างสูง และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค Real-time PCR อาจเกิดเนื่องจากการตรวจพบ DNA ที่ได้จากเซลล์ที่บาดเจ็บหรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Hee-Jin *et al.* 2008) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการนำ ethidium bromide monoazide มาประยุกต์ใช้กับ Real-time PCR เพื่อลดสัญญาณของแบคทีเรียที่ตายแล้วและ DNA อิสระที่พบในตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ (Hein *et al.* 2006)

4.4.5 ผลของการใช้เทคนิค Real-time PCR ต่อการวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมเนื้อโค

จากการตรวจหาปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น แฮมที่ทำกรหมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แฮมที่ทำกรหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และแฮมที่ทำกรหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักแฮมที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0-5 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากผลิตภัณฑ์แฮมด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ K7F และ K7R ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ได้ขนาดของผลผลิต PCR เท่ากับ 310 นอกจากนี้ไพรเมอร์คู่นี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp ของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ได้เช่น *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lb. plantarum* ATCC 14917^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *E. faecalis* JCM 5803 เมื่อนำไพรเมอร์คู่นี้ไปใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp ของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp จาก DNA ที่สกัดได้จากแฮมทุกกลุ่มการทดลอง ได้แก่ แฮมที่ทำกรหมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แฮมที่ทำกรหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และแฮมที่ทำกรหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 (ตารางที่ 4.18)

บุษกร อุดรภิชาติ (2545) รายงานว่า จุลินทรีย์ที่พบในระยะแรกของการหมักแฮมคือแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ต่อมาในวันที่ 4 ของการหมักจะพบเชื้อ *Lb. plantarum* เติบโตมากขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้อาจเป็นการตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ที่พบมากในแฮมนอกเหนือจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์แฮม โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในแฮมได้แก่ *P. pentosaceus* และ *Lb. plantarum*

ตารางที่ 4.18 เทคนิค Real-time PCR ต่อการวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลกติกในแฮมเนื้อโค

เวลา (วัน)	การตรวจพบยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp		
	Nham	Nham + K7	Nham + K7 + S
0	+	+	+
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+

หมายเหตุ: + หมายถึง พบยีน 16S rRNA ขนาด 310 bp
 Nham หมายถึง แฮมที่ทำการหมักตามธรรมชาติ
 Nham + K7 หมายถึง แฮมที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 + S หมายถึง แฮมที่ทำการหมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

4.4.6 ผลของการใช้เทคนิค Real-time PCR ต่อการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ในแฮมเนื้อโค

จากการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในแฮมเนื้อโคโดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็นแฮมที่ทำการหมักตามธรรมชาติ (กลุ่มควบคุม) แฮมที่ทำการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แฮมที่ทำการหมักโดยเติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และแฮมที่ทำการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-5 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยวิธี positive-negative test และด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR (Catarama *et al.* 2006) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ขนาด 402 bp จากการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยวิธี positive-negative test พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้จากตัวอย่างแฮมที่ทำการหมักโดยเติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และตัวอย่างแฮมที่ทำการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ทุกวันตั้งแต่วันที่ 0-5 ของกระบวนการหมักแฮม (ตารางที่ 4.19) แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยวิธี positive-negative test จะบอกได้แค่เพียงว่าพบหรือไม่พบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 แต่ไม่สามารถทราบปริมาณ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์แฮมในแต่ละวันที่ทำการหมักได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากผลิตภัณฑ์แฮมด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 (ตารางที่ 4.19)

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี positive-negative test นั้นจะมีขั้นตอนของการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณและช่วยให้เซลล์ที่บาดเจ็บสามารถกลับมาเจริญได้อีก (pre-enrichment) แต่เนื่องจากขั้นตอนของการ pre-enrichment จะทำให้การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีอยู่จริงในผลิตภัณฑ์หมนมผิดพลาดได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากผลิตภัณฑ์หมนมด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยไม่ผ่านขั้นตอนของการ pre-enrichment และในขั้นตอนของการสกัด DNA จากผลิตภัณฑ์หมนมได้ทำการสุ่มตัวอย่างหมนมมาตัวอย่างละ 10 กรัม และนำมาผสมใน saline peptone water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์ของเชื้อแขวนลอยอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลว จากนั้นทำการคูดของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาทำการสกัด DNA และนำ DNA ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการสุ่มตัวอย่างมาสกัด DNA ดังกล่าวได้ตัวอย่างส่วนที่ไม่มีเชื้ออยู่จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่ปนเปื้อนอยู่ในหมนมได้ หรืออาจเนื่องมาจากขั้นตอนการสกัด DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรม (Martin *et al.* 2006) หรืออาจเป็นสารเคมีต่างๆ ซึ่งใช้ในการสกัด DNA เช่น Phenol, SDS และ EDTA ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Real-time PCR ได้ และอาจนำไปสู่การแปรผลการวิเคราะห์ที่ผิดพลาด (ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และคณะ 2553) ประสิทธิภาพของวิธีการสกัด DNA นับว่ามีความสำคัญมากต่อการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เนื่องจากว่ามีสารมากมายหลายชนิดซึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในขั้นตอนการตรวจที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการสกัด DNA เนื่องจากในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจะมี complex matrices สูงมาก รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถที่จะไปรบกวนความสามารถในการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค Real-time PCR (Martin *et al.* 2006)

ตารางที่ 4.19 ผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากແໜ່ນเนื้อโค 25 กรัม โดยวิธี Positive-negative test

เวลา (วัน)	การตรวจพบเชื้อ <i>Salmonella</i>			
	Nh	Nh + K7	Nh + S	Nh + K7 + S
0	-	-	+	+
1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+

ตารางที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากແໜ່ນเนื้อโค 25 กรัม ด้วยเทคนิค Real-time PCR

เวลา (วัน)	การตรวจพบเชื้อ <i>Salmonella</i>			
	Nh	Nh + K7	Nh + S	Nh + K7 + S
0	-	-	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-

หมายเหตุ:	-	หมายถึง ไม่พบเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292
	+	หมายถึง พบเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292
	Nh	หมายถึง แໜ່ນที่ทำการหมักตามธรรมชาติ
	Nh + K7	หมายถึง แໜ່ນที่หมัก โดยเติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7
	Nh + S	หมายถึง แໜ່ນที่ทำการหมัก โดยเติมเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292
	Nh + K7 + S	หมายถึง แໜ່ນที่ทำการหมัก โดยเติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ร่วมกับ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถทนต่อกรดได้โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ทนต่อน้ำดี bile salts โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถเจริญได้เลย ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เจริญได้บ้างเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในน้ำดี ox-bile และน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ สารยับยั้งที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบ โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T, *Br. campestris* NBRC 11547^T, *P. fluorescens* JCM 5963^T, *P. fluorescens* TISTR 358, *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T, *Br. campestris* NBRC 11547^T, *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ไม่สามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ได้เมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะที่ pH 2 และเมื่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดสัมผัสกับน้ำย่อยที่ pH 3, 4 และ 7 เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ได้แต่จะมีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อค่า pH ของย่อยในกระเพาะลดลง และเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะและลำไส้จำลองเป็นเวลานานขึ้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 มีแนวโน้มที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกได้

2. การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกรดน้ำเชื้อ

จากการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกรดน้ำเชื้อของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญในสภาวะที่มีไนโตรเจนความเข้มข้น 100 ppm และในสภาวะที่มีกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ได้ลดลงตลอดการหมักเป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในสภาวะที่มีกระเทียม และไนโตรเจนได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และเมื่อใช้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับกระเทียมพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด

เอกสารไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากคุณสมบัติของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่สามารถทนต่อกรด น้ำดี อยู่รอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง ทนต่อกระเทียม และไนไตรท์ได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จึงคัดเลือกเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มาเป็นกล้าเชื้อในการทำหมักเนื้อโค และจากการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตหมักเนื้อโค พบว่าในผลิตภัณฑ์หมักที่มีการเติมกล้าเชื้อค่า pH ของหมักยังคงลดต่ำลงช้าจึงไม่สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในระยะเวลาการหมักหมัก 5 วัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถเจริญเพิ่มในจำนวนในหมักได้ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้แยกได้จากลำไส้ไก่ ดังนั้นสถานะของหมักจึงไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในน้ำดี ox-bile และน้ำดีไก่สด จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป

การยืนยันผลการตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่าสามารถพบเชื้อทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวจากแบบจำลองการหมัก โดยปริมาณเชื้อที่ตรวจพบมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับการตรวจเชื้อ โดยวิธีทางจุลชีววิทยา แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิค Real-time PCR จะตรวจพบเชื้อในปริมาณที่สูงกว่าการตรวจพบปริมาณเชื้อโดยวิธีทางจุลชีววิทยา เนื่องจากการตรวจเชื้อโดยวิธีทางจุลชีววิทยาเป็นการตรวจปริมาณเชื้อที่มีชีวิต ส่วนการตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR เป็นการตรวจ DNA ของเชื้อ ซึ่งจะรวมทั้งเชื้อที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากตัวอย่างหมักจริงไม่สามารถกระทำได้อาจเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA ของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดอื่นๆ ที่พบมากในหมักด้วย และไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งอาจเนื่องมาจากขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างมาสกัด DNA ไม่ทั่วถึงพอ หรืออาจเป็นสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการสกัด DNA ไปยับยั้งการทำงานของ Taq DNA polymerase ในปฏิกิริยา Real-time PCR นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์หมักยังมีเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ อีกเป็นจำนวนมากซึ่งอาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องการด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้

บรรณานุกรม

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ อัญชลี ศรีสุวรรณ และกิตติศักดิ์ กิริตยะอังกูร. 2551. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป. ผลงานวิจัยใช้ได้จริงจากห้องสู่ห้าง ครั้งที่ 2. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ฐาปนา เภมณีพิฐพนธ์. 2551. “การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรมเมอร์เชิงซ้อนเพื่อการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2529. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุษกร อุดรพิชาติ. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. 425 หน้า.

ประมวล ทรายทอง. 2551. Starter Culture สู่อุตสาหกรรมการหมักในอนาคต. ปีที่ 38 ฉบับที่ 3. [Online]. Available : http://www.ifrpd.Ku.Ac.Th/pr/pramuan_radio52.pdf. 25-02-10

ปรีดา ตันจักร. 2550. “การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2547. แหนมเนื้อ. มพช. 470/2547. 5 หน้า.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2548. แหนม. มพช. 418/2548. 6 หน้า.

วีรพงศ์ ลุฑิตานนท์. 2553. Real Time Polymerase Chain Reaction. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วราวุฒิ ครุสง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ : เชลล์และผลิตภัณฑ์ของเชลล์.

กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. “ผลของการใช้กลูต้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซาลโมเนลลาในการหมักแหนม.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บำรุงระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542. ผลของน้ำสกัดกระเทียมต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแฮม (ในหลอดทดลอง). *อาหาร*. 29(2) : 107-115.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. แบคทีเรียแลคติก. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

อรรวรรณ ละอองคำ. 2546. "การจำแนกเชื้อและการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติก." *วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.*

Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A. and Koga, Y. 1998. "Lactic Acid-Mediated Suppression of *Helicobacter pylori* by the Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* as a Probiotic in a Gnotobiotic Murine Model." *The American J. Gastroenterol.* 93(11) : 2097-2101.

Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. "Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update." *Meat Sci.* 76 : 138-146.

AOAC. 2006. "Chapter 17 AOAC Official Method 966.23c-24." 5-6. in Horwitz, W. and Latimer, G.W. *Official methods of analysis of AOAC international*. Maryland: AOAC international.

Bae, H.C., Nam, M.S. and Lee, J.Y. 2002. "Probiotic characterization of acid- and bile-tolerant *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* from Korean faeces." *Asian-australasian J. Anim. Sci.* (Abstract).

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

Benkeblia, N. 2004. "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)." *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 37 : 263-268.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria." *Int. J. Food Microbiol.* 53 : 33-41.

Burton, J.P., Wescombe, P.A., Moore, C.J., Chilcott, C.N. and Tagg, J.R. 2006. "Safety Assessment of the Oral Cavity Probiotic *Streptococcus salivarius* K12." *Appl. Envir. Microbiol.* 72(4) : 3050-3053.

Cataloluk, O. 2001. "Molecular characterization of the gene encoding for the Salivaricin B activity and its Flanking Sequences." *Turk J. Biol.* 25 : 379-386.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Catarama, T.M.G., O'Hanlon, K.A., McDowell, D.A., Blair, I.S. and Duffy, G. 2006. "Comparison of a real-time polymerase chain reaction assay with a culture method for the detection of *Salmonella* in retail meat samples." **J. Food Safety**. 26 : 1-15.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C. and Rowland, I. 2005. "The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics." **Mutat. Res.** 591 : 276-289.
- Condon, S. 1987. "Responses of lactic acid bacteria to oxygen." **FEMS Microbiol. Lett.** 46 : 269-280.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. 1987. "Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells." **J. Dairy Sci.** 70(1) : 1-12.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2001. "Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian Sausages." **Appl. Environ. Microbiol.** 67(11) : 5113-5121.
- Danielsen, M. and Wind, A. 2003. "Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents." **Int. J. Food Microbiol.** 82 : 1-11.
- D'Aimmo, M.R., Modesto, M.R.M. and Biavati, B. 2007. "Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products." **Int. J. Food Microbiol.** 115 : 35-42.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins J.K. 2001. "In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with in vivo findings." **Am. J. Clin. Nutr.** 73 : 386S-392S.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. And Vogel, R.F. 2002. "Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry." **J. Appl. Microbiol.** 92 : 966-975.
- Elisha, B.G. and Courvalin, P. 1995. "Analysis of genes encoding d-alanine: d-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp." **Gene.** 152 : 79-83.
- Ellingson, J.L.E., Anderson, J.L., Carlson, S.A. and Sharma, V.K. 2004. "Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products." **Mol. Cell. Probes.** 18 : 51-57.

- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Investigation of bacteriocin production and purification from Nukadoko isolates displaying antimicrobial activity." **Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria**. 10 : 29-36.
- 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 Sci**. 55 : 297-300.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T. and Suihko, M-L. 2001a. "Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures." **Meat Sci**. 58 : 111-116.
- Erkkilä, S., Suihko, M-L., Eerola, S., Petäjä, E. and Mattila-Sandholm, T. 2001b. "Dry sausage fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* strains." **Meat Sci**. 64 : 205-210.
- Fadda, S., Vignolo, G. and Oliver, G. 2001. "Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains." **Biotechnol. Lett.** (Abstract).
- Fernández, M.F., Boris, S. and Barbés, C. 2003. "Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract." **J. Appl. Microbiol**. 94 : 449-445.
- Flynn, S., Sinderen, D.V., Thornton, G.M., Holo, H., Nes I.F. and Collins, J.K. 2002. "Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118." **Microbiol**. 148 : 973-984.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. 1998. "Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts." **J. Appl. Microbiol**. 84 : 125-132.
- Gilliland, S.E., Stanley, T.E. and Bush, L.J. 1984. "Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct." **J. Dairy Sci**. 67 : 3045-3051.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. 2007. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity." **Food Contr**. 18 : 716-722.
- Hirayama, K. and Rafter, J. 2000. "The role of probiotic bacteria in cancer prevention." **Microbes Infect**. 2 : 681-686.
- Huang, Y. and Adams, M.C. 2004. "In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria." **Int. J. Food Microbiol**. 91 : 253-260.
- Hyronimus, B., Marrec, C.L., Sassi, A.H. and Deschamps, A. 2000. "Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol**. 61 : 193-197.

- Kim, E.L., Choi, N.H., Bajpai, V.K. and Kang, S.C. 2008. "Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk." **Food Chemistry**. 110 : 375-382.
- Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., Suzuki, I., Tsuji, N.M., Kurisaik, J. and Ohmomo, S. 2007. "REVIEW *Lactococcus* sp. As Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria." **JARQ**. 41(3) : 181-189.
- Klingberg, T.D. and Budde, B.B. 2006. "The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 109 : 157-159.
- Knarreborg, A., Ricarda, M., Jensen, S.K. and Jensen, B.B. 2002. "Quantitative determination of bile hydrolase activity in bacteria isolated from the intestine of chickens." **Appl. Environ. Microbiol.** 68(12) : 6425-6428.
- Knarreborg, A., Jensen, S.K. and Engberg, R.M. 2003. "Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured in vitro and in vivo." **J. Nutr. Biochem.** 14 : 259-265.
- Kolodjjeva, V., Yafaev, R., Yermolenko, E. and Suvorov, A. 2006. "Incidence of virulence determinants in enterococcal strains of probiotic and clinical origin." **Int. Congress Series**. 1298 : 367-369.
- Laissue, J.A., Chappuis, B.B., Müller, C., Reubi, J.C. and Gebbers, J.O. 1993. "The intestinal immune system and its relation to disease." **Dig. Dis.** (Abstract).
- Lan, P.T.N., Binh, L.T. and Benno, Y. 2003. "Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 49 : 29-36.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 1999. "The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation." **Appl. Environ. Microbiol.** 65(12) : 5350-5356.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." **Trends in Food Sci. Technol.** 15 : 67-78.
- Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L. 2006. "Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation." **Int. J. Food Microbiol.** 106 : 270-285.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations." **FEMS Microbiol. Rev.** 87 : 149-163.

- Liong, M.T. and Shah, N.P. 2005. "Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains." **Int. Dairy J.** 15 : 391-398.
- Madara, J.L. 1997. "Immunology: The chameleon within: Improving antigen." **J. Sci.** 277(5328) : 910-911.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I. and Girardin, S.E. 2007. "The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens." **Semin. Immunol.** 19 : 106-115.
- Makras, L. and Vuyst, L.D. 2006. "The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids." **Int. Dairy J.** 16 : 1049-1057.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and Huis In't Veld, J.H.J. 1997. "Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile." **J. Dairy Sci.** 80(6) : 1031-1037.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. and Rodríguez, J.M. 2006. "*Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair." **Int. J. Food Microbiol.** 112 : 35-43.
- Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Pla, M. And Aymerich, T. 2006. "Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by Real-time PCR." **Appl. Environ. Microbiol.** 72(9) : 6040-6048.
- Mathur, S. and Singh, R. 2005. "Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review." **Int. J. Food Microbiol.** 105 : 281-295.
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M. 1990. "Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 2120-2124.
- McDowell, A. and McLeod, B.J. 2007. "Physiology and pharmacology of the brushtail possum gastrointestinal tract: Relationship to the human gastrointestinal tract." **Adv. Drug Deliv. Rev.** 59 : 1121-1132.
- Morelli, L. 2007. "In vitro assessment of probiotic bacteria : From survival to functionality." **Int. Dairy J.** 17 : 1278-1283.

- Murry, A.C., Hinton, A. and Morrison, H. 2004. "Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*." **Int. J. Poul. Sci.** 3(9) : 603-607.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2009. "Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 25 : 1337-1345.
- Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. 2007. "Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria." **Food Microbiol.** 24 : 82-88.
- Narakaew, T., Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N. and Swetwiwathana, A. 2009. Preliminary characterization of *Lactobacillus salivarius* K7 for probiotic properties. Pp. 1-10. in: Proceedings of the 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.
- Nemcova, R., Laukova, A., Gancarcikova, S. and Kastel, R. 1997. "In vitro studies of porcine lactobacilli for possible probiotic use." **Berl. Munch. Tieraztl. Wschr.** (Abstract).
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. "Isolation of nisin-producing *Lactobacillus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional thai fermented sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 81(2) : 137-145.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A. and Reyes-Gavilan, C.G. 2004. "Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacteriu*." **Int. J. Food Microbiol.** 92 : 79-86.
- Ocana, V.S., Holgado, A.A.P.D.R. and Nader-Macias, M.E. 1999. "Characterization of a Bacteriocin-like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain." **Appl. Envir. Microbiol.** 65(12) : 5631-5635.
- O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee G. O'Sullivan, G., Shanahan, F. and Collins, J. 2001. "Probiotic impact on microbial flora, inflammation and development in IL-10 knockout mice." **Alimentary Pharmacology & Therapeutics.** (Abstract).

- Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Van de Kamp, E., Pereboom, D.P.K.H., De Zwart, L.L. and Sips, A.J.A.M. 2004. "Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model." **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 46 : 183-188.
- Otero, M.C., and M.E. Nader-Macias. 2006. "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle." **Anim. Reprod. sci.** 96 : 35-46.
- Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Diaz-Ropero, M.P., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A. and Galvez, J. 2005. "Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius ssp. Salivarius*, in the TNBS model of rat colitis." **World J. Gastroenterol.** 11(33) : 5185-5192.
- Piano, M.D., Morelli, L., Strozzi, GP., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballaré, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garello, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M. and Capurso, L. 2006. "Probiotics : from research to consumer." **Dig. Liver dis.** 2 : S248-S255.
- Pilasombut, K., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwathana, A., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Sakpuaram, T. 2005. "Screening and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestine." **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** (39) : 612-621.
- Pilasombut, K., Tanjak, P. and Nitisinprasert, S. 2005. "Screening lactic acid bacteria isolated from chicken intestine for use as probiotic." **Eight Symposium on Lactic Acid Bacteria. Abstracts.**
- Pilasombut, K. 2006. "Purification and characterization of bacteriocins by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine." Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.
- Pilasombut, K., Sakpuaram, T., Wajjwalku, Nitisinprasert, S., Swetwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine." **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 28(Suppl.) : 121-132.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter G.R. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology.** London WC1W9LB, England.

- Rinkinen, M., Weatermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. 2003. "Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus." **Vet. Microbiol.** 97 : 55-61.
- Robredo, B. and Torres, C. 2000. "Bacteriocin Production by *Lactobacillus salivarius* of Animal Origin." **J. Clin. microbiol.** 38 : 3908-3909.
- Slover, C.M. 2008. "Lactobacillus : a review." **Clin. Microbiol. Newsletter.** 30(4) : 23-27.
- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. and Seal, B.S. 2006. "Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system." **Antimicrob. Agents Chemother.** 50(9) : 3111-3116.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. and Coppola, R. 2005. "Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese." **FEMS Microbiol. Lett.** 244 : 129-137.
- Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. "Biogenic amines in dry fermented sausages: a review." **Int. J. Food Microbiol.** 88 : 41-54.
- Swetwiwathana, A., Leutz, U. and Fischer, A. 1998. "Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures." **Fleischwirtschaft.** 78 : 294-298.
- Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N. and Fischer, A. 1999. "Controlling the growth of *Salmonella anatum* in nham; Effect of meat starter cultures, nitrate, nitrite and garlic." **Fleischwirtschaft.** 79(9) : 124-128.
- Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2007. "Effect of Pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation." **Fleischwirtschaft.** 22 : 46-49.
- Taranto, M.P., Perez-Martinez, G. and de Valdez, G.F. 2006. "Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration." **Res. Microbiol.** 157 : 720-725.
- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2008. "Review Probiotics-From Metchnikoff to bioactives." **Int. Dairy J.** 18 : 714-728.

- Verluyten, J., Leroy, F. And De Vuyst, L. 2004. "Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and curvacin A production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. **Appl. Environ. Microbiol.** 70(8) : 4807-4813.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. "Lactic acid starter and probiotic bacteria : a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance." **Food Res. Int.** 36 : 895-904.
- Walker, D.K. and Gilliland, S.E. 1992. "Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*." **J. Dairy Sci.** 76(4) : 956-961.
- Yeonhee, L. 2005. "Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women." **FEMS Microbiol. Lett.** (Abstract).
- Zárate, G., Chaia, A.P., González, S. and Oliver, G. 2000. "Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids." **J. Food Prot.** 63(9) : 1214-1221.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 MRS broth

Peptone from casein	10.0 กรัม
Meat extract	8.0 กรัม
Yeast extract	4.0 กรัม
D(+)-Glucose	20.0 กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0 กรัม
Tween 80	1.0 กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0 กรัม
Sodium acetate	1.0 กรัม
Magnesium sulfate	0.2 กรัม
Manganese sulfate	0.04 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

หมายเหตุ

อาหารเหลว MRS ที่มี pH เป็นกรด เตรียมโดยใช้ 1M HCl ปรับ pH ของอาหารเหลว MRS เป็น 2, 2.5, 3 และ 3.5

อาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้น้ำดีไก่สดซึ่งทำการหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งแล้วมาผสมในอาหารเหลว MRS

อาหารเหลว MRS ที่มี ox-bile เตรียมโดยใช้ ox-bile ผสมลงในอาหารเหลว MRS ให้มีความเข้มข้น 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับ pH เป็น 8 ด้วย 5M NaOH

1.2 MRS agar

Peptone from casein	10.0 กรัม
Meat extract	8.0 กรัม
Yeast extract	4.0 กรัม
D(+)-Glucose	20.0 กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0 กรัม
Tween 80	1.0 กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0 กรัม
Sodium acetate	1.0 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Magnesium sulfate	0.2 กรัม
Manganese sulfate	0.04 กรัม
Calcium carbonate	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3 Tryptic Soy Broth (TSB)

Peptone from casein	17.0 กรัม
Peptone from soymeal	3.0 กรัม
D(+)-glucose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
di-potassium hydrogen phosphate	2.5 กรัม
Yeast extract	6.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 Tryptic Soy Agar (TSA)

Peptone from casein	17.0 กรัม
Peptone from soymeal	3.0 กรัม
D(+)-glucose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
di-potassium hydrogen phosphate	2.5 กรัม
Yeast extract	6.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.5 Salmosyst Broth Base

Peptone from casein	5.0 กรัม
Peptone from meat	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Calcium carbonate	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.6 Salmosyst Selective Supplement

Potassium tetrathionate	0.2 กรัม
OX bile	0.08 กรัม
Brilliant green	0.0007 กรัม
Calcium carbonate	0.1 กรัม

Preliminary Enrichment

นำตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในอาหาร Salmosyst Broth Base ที่เตรียมไว้ 225 มิลลิลิตร
นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง

Selective Enrichment

คัดสารละลาย Preliminary Enrichment มาปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติม Salmosyst
Selective Supplement tablet 1 เม็ด เขย่า 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจในขั้นตอน selective plating ต่อไป

1.7 Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar

Yeast extract	3.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
D(+)-xylose	3.75 กรัม
Lactose	7.5 กรัม
Sucrose	7.5 กรัม
L(+)-Lysine	5.0 กรัม
Sodium deoxycholate	1.0 กรัม
Sodium thiosulfate	6.8 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.8 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar-agar	14.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดโดยการต้มให้เดือด

1.8 Triple Sugar Iron (TSI) agar slant

Peptone from casein	15.0 กรัม
Peptone from meat	5.0 กรัม
Meat extract	3.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Lactose	10.0 กรัม
Sucrose	10.0 กรัม
D(+)-glucose	1.0 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.5 กรัม
Sodium thiosulfate	0.5 กรัม
Phenol red	0.024 กรัม
Agar-agar	12.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.9 Lysine-Indole-Motility (LIM) medium

Peptone from meat	5.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
D(+)-glucose	1.0 กรัม
L-lysine monohydrochloride	10.0 กรัม
Sodium thiosulfate	0.04 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.5 กรัม
Bromocresol purple	0.02 กรัม
Agar-agar	12.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์

2.1 Peptone

Peptone	1 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. แบบจำลองกระเพาะอาหาร (simulated gastric juice)

NaCl	125 mM
KCl	7 mM
NaHCO ₃	45 mM
Pepsin	3 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

หมายเหตุ ปรับ pH เป็น 2, 2.5, 3, 4 และ 7 ด้วย 1M HCl

4. แบบจำลองลำไส้ (simulated intestinal fluid)

Pancreatin	0.1 กรัม
Bile salts	0.15 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

หมายเหตุ ปรับ pH เป็น 8 ด้วย 5N NaOH

5. สูตรอาหารในการเตรียมแบบจำลองการหมักแทนนม (Nham model broth, NMB)

Beef extract	10 กรัม
Tryptone	10 กรัม
Sodium ascorbate	0.5 กรัม
Sodium tri-polyphosphate	3 กรัม
Glucose	10 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaCl	25	กรัม
Sodium nitrite	0.100	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ ใช้ กลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวปรับค่า A_{260} ให้มีค่าเท่ากับ 0.97
ปรับค่า pH ด้วย HCl ให้มีค่า 6.0
ที่มา : Swetwivathana *et al.* (1998)

5.1 การเตรียมกระเทียมสดปลอดเชื้อ

ปอกเปลือกกระเทียมสดแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นนำกระเทียมที่ได้ไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ตัดกระเทียมเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว และนำกระเทียมที่ได้ใส่ลงในแบบจำลองการหมักเห็ดหมักปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัด DNA

6.1 Saline peptone water

Peptone	0.1	กรัม
NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.0		

6.2 Breaking buffer

2% Triton X-100
1% Sodium Dodecyl Sulphate
100 mM NaCl
10 mM Tris pH 8.0
1 mM EDTA pH 8.0

7. สารเคมีที่ใช้ละลาย DNA

7.1 TE buffer

0.1 mM EDTA pH 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 mM Tris	
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

8. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาด DNA

8.1 10X TBE stock solution	1000 มิลลิลิตร
Tris base	108 กรัม
Boric acid	55 กรัม
EDTA	5.84 กรัม

6. วิธีการหาน้ำหนักแห้งน้ำดีไก่สด (AOAC, 1995 โดย ศรีสฤต วรจันทร์. 2538)

6.1 นำขวดซึ่งเข้าอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบ ใส่ในโหลดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งจนได้น้ำหนักแน่นอน

6.2 ชั่งตัวอย่างน้ำดีไก่สดที่ต้องการวิเคราะห์ (ปริมาตร 30 ml) ใส่ลงในขวดซึ่งที่ทราบน้ำหนักแน่นอนนั้น

6.3 นำขวดซึ่งมีตัวอย่างน้ำดีไก่สด ไปอบในตู้อบแห้งที่ตั้งอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง

6.4 นำขวดซึ่งออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นในโหลดูดความชื้น เมื่อเย็นแล้วรีบนำไปชั่งน้ำหนัก

6.5 นำขวดซึ่งกลับเข้าอบในตู้อบ โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 9.1-9.4 จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ แสดงว่าน้ำได้ระเหยออกจากตัวอย่างไปหมดแล้ว จากนั้นนำไปคำนวณ % ความชื้น และ % วัตถุแห้ง จากสูตร

% ความชื้น

$$= \frac{\text{น้ำหนักขวดซึ่งและตัวอย่างก่อนการอบ} - \text{น้ำหนักขวดซึ่งและตัวอย่างภายหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์}} \times 100$$

% วัตถุแห้ง

$$= \frac{\text{น้ำหนักขวดซึ่งและตัวอย่างภายหลังการอบ} - \text{น้ำหนักขวดซึ่ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์}} \times 100$$

6.6 คำนวณน้ำดีไค้สด 3 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) จากสูตร

$$\text{ปริมาตรน้ำดีที่จะใช้} = \frac{\text{เปอร์เซนต์น้ำดีที่จะใช้} \times \text{ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะเตรียม}}{\text{เปอร์เซนต์วัตถุแห้งของน้ำดี}}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข1 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการทนกรด

เชื้อทดสอบ	จำนวนซ้ำ	เชื้อเริ่มต้น	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (Log cfu/ml)				
			pH				
			control	2	2.5	3	3.5
<i>Lb. salivarius</i> K4	1	10.71	10.49	0.00	0.00	7.12	7.59
	2	10.55	10.44	0.00	0.00	7.15	7.54
	3	10.76	10.41	0.00	0.00	7.43	7.76
	เฉลี่ย	10.67	10.45	0.00	0.00	7.23	7.63
<i>Lb. salivarius</i> K7	1	9.54	9.25	0.00	2.59	7.12	7.23
	2	9.64	9.27	0.00	2.81	7.14	7.27
	3	9.83	9.33	0.00	2.54	7.08	7.19
	เฉลี่ย	9.67	9.28	0.00	2.65	7.11	7.23

ตารางผนวกที่ ข2 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการเจริญในสภาวะที่มี bile salts ความเข้มข้นต่างๆ

เชื้อทดสอบ	จำนวนซ้ำ	เชื้อเริ่มต้น	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (Log cfu/ml)			
			% bile salts			
			0	0.3	0.6	1
<i>Lb. salivarius</i> K4	1	10.30	9.66	0.00	0.00	0.00
	2	14.27	13.25	0.00	0.00	0.00
	3	12.72	11.73	0.00	0.00	0.00
	เฉลี่ย	12.43	11.55	0.00	0.00	0.00
<i>Lb. salivarius</i> K7	1	9.25	9.21	4.34	1.77	1.38
	2	9.22	9.28	3.38	1.76	0.00
	3	9.56	9.47	0.00	0.00	0.00
	เฉลี่ย	9.34	9.32	2.57	1.18	0.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข3 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการเจริญใน
สภาวะที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ

เชื้อทดสอบ	จำนวนซ้ำ	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (Log cfu/ml)					
		เชื้อเริ่มต้น	% ox-bile				
			0 (control)	3	6	9	12
<i>Lb. salivarius</i> K4	1	10.92	10.79	6.65	7.20	7.40	6.70
	2	10.92	10.77	6.30	6.93	7.74	6.18
	3	10.85	10.74	6.48	6.60	7.26	6.40
	เฉลี่ย	10.90	10.77	6.48	6.91	7.47	6.43
<i>Lb. salivarius</i> K7	1	9.57	9.17	5.06	6.32	6.61	6.79
	2	9.64	9.13	5.43	6.09	6.97	6.68
	3	9.76	9.20	5.41	6.48	6.89	6.40
	เฉลี่ย	9.66	9.17	5.30	6.30	6.82	6.62

ตารางผนวกที่ ข4 การเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา
ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (Log CFU/ml)							
	ชุดทดลองควบคุม				ชุดทดลองที่มีน้ำดีไก่ 3 %			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	7.84	7.77	7.85	7.82	6.60	7.73	7.98	7.44
0.5	7.00	7.65	7.85	7.50	7.66	7.51	7.81	7.66
1	7.94	7.24	7.88	7.69	7.71	7.72	7.86	7.76
1.5	7.98	7.89	8.09	7.99	7.88	7.72	7.84	7.81
2	8.68	8.61	8.31	8.53	8.45	8.73	7.79	8.32
3	9.40	9.19	8.90	9.16	9.06	9.40	8.32	8.93
6	9.42	9.42	9.57	9.47	9.42	9.56	9.86	9.61
24	10.31	10.81	9.60	10.24	8.31	7.65	6.04	7.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข5 การเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (Log CFU/ml)							
	ชุดทดลองควบคุม				ชุดทดลองที่มีน้ำดีไก่ 3 %			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	7.49	7.41	7.74	7.55	7.16	7.45	7.74	7.45
0.5	7.48	7.53	7.73	7.58	7.42	7.44	7.55	7.47
1	7.76	7.61	7.78	7.72	7.44	7.38	7.58	7.47
1.5	7.82	7.87	7.98	7.89	7.50	7.61	7.69	7.60
2	8.26	8.06	8.19	8.17	7.63	7.57	7.72	7.64
3	8.88	8.75	8.47	8.70	7.41	7.51	7.58	7.50
6	9.07	9.27	9.16	9.17	7.48	7.58	7.95	7.67
24	9.26	9.48	9.14	9.29	8.29	8.13	7.67	8.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข 6 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในกระเพาะที่ pH 2 และลำไส้จำลอง

เชื้อทดสอบ	pH	จำนวนซ้ำ	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง (log cfu/ml)					จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (log cfu/ml)					
			เชื้อเริ่มต้น	เวลา (นาที)				0	เวลา (นาที)				
				0	30	60	90		180	0	30	60	90
<i>Lb. salivarius</i> K4	2	1	7.71	7.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		2	7.59	7.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		3	7.85	7.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		เฉลี่ย	7.72	7.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lb. salivarius</i> K7	2	1	7.77	6.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
		2	7.76	7.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
		3	7.64	7.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
		เฉลี่ย	7.72	7.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางผนวกที่ ๗ จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในกระเพาะที่ pH 3 และลำไส้จำลอง

เชื้อทดสอบ	pH	จำนวนซ้ำ	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง (log cfu/ml)					จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (log cfu/ml)					
			เชื้อเริ่มต้น	เวลา (นาที)				0	เวลา (นาที)				
				0	30	60	90		180	0	30	60	90
<i>Lb. salivarius</i> K4	3	1	7.82	7.87	7.59	7.40	6.30	4.30	3.02	3.00	2.50	2.30	2.20
		2	7.92	7.45	7.40	6.15	4.56	3.19	4.20	4.00	3.80	3.50	3.00
		3	7.51	7.46	7.49	7.04	6.93	5.72	5.66	5.51	5.18	4.89	3.87
		เฉลี่ย	7.75	7.59	7.49	6.86	5.93	4.40	3.45	2.51	1.69	2.30	1.29
<i>Lb. salivarius</i> K7	3	1	7.22	6.95	6.21	5.81	5.65	5.71	3.60	3.30	2.90	2.30	2.78
		2	7.39	7.62	7.35	7.29	7.15	5.63	3.71	2.18	2.00	2.00	0.00
		3	7.70	7.59	7.50	7.48	6.70	6.46	5.91	5.61	5.32	5.34	5.06
		เฉลี่ย	7.41	7.39	7.02	6.86	6.50	5.93	4.41	3.70	3.41	3.21	2.61

ตารางผนวกที่ ข 8 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในกระเพาะที่ pH 4 และลำไส้จำลอง

เชื้อทดสอบ	pH	จำนวนซ้ำ	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง (log cfu/ml)					จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (log cfu/ml)					
			เชื้อเริ่มต้น	เวลา (นาที)				0	เวลา (นาที)				
				0	30	60	90		180	0	30	60	90
<i>Lb. salivarius</i> K4	4	1	7.43	8.33	7.86	7.82	6.85	3.27	3.15	3.11	2.18	2.00	2.00
		2	7.58	7.55	8.68	8.37	7.72	6.21	5.85	4.58	4.18	3.45	3.35
		3	7.71	7.79	7.79	7.68	7.18	5.74	5.69	5.52	5.46	5.30	4.62
		เฉลี่ย	7.57	7.89	8.11	7.96	7.25	5.09	4.88	4.40	3.94	3.58	3.32
<i>Lb. salivarius</i> K7	4	1	7.63	7.56	7.49	7.39	7.27	5.91	4.48	3.70	3.60	3.40	2.70
		2	7.67	7.54	7.37	7.34	7.34	6.34	5.69	5.37	5.02	4.42	3.94
		3	7.69	7.60	7.53	7.32	7.44	7.09	6.97	7.16	6.97	6.53	6.54
		เฉลี่ย	7.66	7.57	7.46	7.35	7.35	6.54	5.71	5.41	5.20	4.78	4.39

ตารางผนวกที่ ข 9 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในกระเพาะที่ pH 7 และลำไส้จำลอง

เชื้อทดสอบ	pH	จำนวนซ้ำ	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง (log cfu/ml)					จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (log cfu/ml)					
			เชื้อเริ่มต้น	เวลา (นาที)				0	เวลา (นาที)				
				0	30	60	90		180	0	30	60	90
<i>Lb. salivarius</i> K4	7	1	7.97	8.09	8.26	7.89	7.73	7.38	5.71	5.20	5.15	5.15	4.39
		2	7.79	7.81	7.85	7.75	7.74	7.79	7.64	6.32	5.81	5.21	3.91
		3	7.62	7.81	7.72	7.66	7.54	7.19	7.18	7.14	7.12	7.12	7.04
		เฉลี่ย	7.79	7.90	7.94	7.77	7.67	7.45	6.89	6.22	6.04	5.82	5.06
<i>Lb. salivarius</i> K7	7	1	7.63	7.53	7.39	7.43	7.49	7.48	7.32	7.28	7.30	7.33	7.23
		2	7.49	7.44	7.33	7.25	7.25	7.25	7.21	6.96	6.74	6.68	5.83
		3	7.64	7.67	7.53	7.54	7.50	7.22	7.14	6.95	6.91	6.57	6.52
		เฉลี่ย	7.59	7.55	7.42	7.41	7.41	7.27	7.22	7.06	6.98	6.86	6.53

ตารางผนวกที่ ข10 ผลของการใช้ในไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม

เชื้อทดสอบ	เวลา (วัน)	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (log cfu/ml)							
		เติมไนไตรท์ 100 ppm/ml				ไม่เติมไนไตรท์			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
<i>Lb. salivarius</i> K4	เชื้อเริ่มต้น	7.52	7.34	7.32	7.39	7.52	7.7	7.12	7.45
	0	7.65	7.37	7.13	7.38	7.63	7.76	7.02	7.47
	1	6.43	6.35	5.89	6.22	6.48	6.56	5.96	6.33
	2	5.56	5.41	4.34	5.10	5.54	5.79	4.70	5.34
	3	0.00	3.30	3.59	2.30	2.60	3.58	4.40	3.53
<i>Lb. salivarius</i> K7	เชื้อเริ่มต้น	7.23	7.22	7.38	7.28	7.20	7.33	7.31	7.28
	0	7.22	7.12	7.32	7.22	7.16	7.32	7.26	7.25
	1	6.56	6.84	6.51	6.64	7.23	7.32	7.31	7.29
	2	4.95	5.15	6.86	5.65	7.76	7.56	7.24	7.52
	3	4.30	4.45	5.20	4.65	6.85	6.98	7.12	6.98
ตารางผนวกที่ ข11	ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 ในแบบจำลองการหมักเหนม								
เวลา (วัน)	<i>Lb. salivarius</i> K4 (Log CFU/ml)				เติมกระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K4 (Log CFU/ml)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	
เชื้อเริ่มต้น	7.97	8.27	7.95	8.06	7.90	8.53	7.72	8.05	
0	7.70	7.30	7.62	7.54	8.57	8.12	7.90	8.20	
1	5.73	5.56	5.92	5.74	6.04	6.69	5.39	6.04	
2	5.40	5.47	4.87	5.25	3.53	4.13	4.29	3.98	
3	5.21	3.90	4.19	4.43	2.30	2.65	2.30	2.42	

ตารางผนวกที่ ข12 ค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เดิม และไม่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4

เวลา (วัน)	<i>Lb. salivarius</i> K4				เติมกระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K4			
	(pH)				(pH)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	5.52	5.73	5.68	5.64	5.47	4.89	5.57	5.31
1	5.15	5.56	5.31	5.34	4.64	4.49	4.92	4.68
2	5.00	5.31	5.29	5.20	4.59	4.48	4.80	4.62
3	4.93	5.21	5.19	5.11	4.57	4.47	4.47	4.50

ตารางผนวกที่ ข13 ปริมาณกรดแลคติกในแบบจำลองการหมักเหวมที่เดิม และไม่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4

เวลา (วัน)	<i>Lb. salivarius</i> K4				เติมกระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K4			
	Lactic acid (%)				Lactic acid (%)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.33	0.33	0.32
1	0.30	0.30	0.30	0.30	0.36	0.42	0.36	0.38
2	0.36	0.30	0.30	0.32	0.39	0.42	0.39	0.40
3	0.36	0.30	0.30	0.32	0.42	0.42	0.39	0.41

ตารางผนวกที่ ข14 ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเหวม

เวลา (วัน)	<i>Lb. salivarius</i> K7				เติมกระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K7			
	(Log CFU/ml)				(Log CFU/ml)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
เชื้อเริ่มต้น	7.65	7.62	7.90	7.72	7.56	7.40	7.77	7.58
0	7.84	7.41	7.93	7.73	7.49	7.69	7.78	7.65
1	5.23	5.81	6.28	5.77	6.95	7.01	7.13	7.03
2	3.85	3.54	5.16	4.18	4.70	4.02	5.90	4.87
3	7.47	5.41	3.69	5.52	4.73	4.98	6.20	5.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข15 ค่า pH ในแบบจำลองการหมักแทนมที่เต็ม และไม่เต็มกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7

เวลา (วัน)	<i>Lb. salivarius</i> K7				เต็มกระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K7			
	(pH)				(pH)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	5.92	5.73	5.76	5.80	5.90	5.72	5.73	5.78
1	5.12	4.94	5.08	5.05	4.97	5.00	4.57	4.85
2	5.02	4.90	4.97	4.96	4.60	4.97	4.46	4.68
3	4.85	4.87	4.93	4.88	4.58	4.86	4.39	4.61

ตารางผนวกที่ ข16 ปริมาณกรดแลคติกในแบบจำลองการหมักแทนมที่เต็ม และไม่เต็มกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7

เวลา (วัน)	<i>Lb. salivarius</i> K7				เต็มกระเทียมร่วมกับ <i>Lb. salivarius</i> K7			
	Lactic acid (%)				Lactic acid (%)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	0.30	0.24	0.30	0.28	0.30	0.27	0.30	0.29
1	0.36	0.36	0.33	0.35	0.39	0.39	0.42	0.40
2	0.36	0.36	0.36	0.36	0.39	0.39	0.45	0.41
3	0.36	0.36	0.36	0.36	0.45	0.42	0.51	0.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข 17 ผลของการใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม

เวลา (วัน)	S				K4 + S				G + S				G + K4 + S			
	(Log CFU/ml)				(Log CFU/ml)				(Log CFU/ml)				(Log CFU/ml)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
เชื้อเริ่มต้น	7.25	7.81	7.74	7.27	7.42	7.87	7.53	7.27	7.14	7.87	7.68	7.23	7.21	7.18	7.69	7.36
0	7.83	7.64	7.67	7.71	7.91	7.75	7.56	7.74	7.44	7.59	7.60	7.54	7.91	7.71	7.65	7.76
1	10.79	8.83	9.48	9.70	9.72	9.20	8.44	9.12	9.99	9.36	9.53	9.63	0.00	0.00	0.00	0.00
2	10.97	8.51	8.59	9.36	8.79	7.49	7.16	7.81	9.65	7.89	4.88	7.47	0.00	0.00	0.00	0.00
3	7.18	7.06	7.77	7.34	6.29	4.72	5.41	5.47	8.82	5.02	7.36	7.07	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

ตารางผนวกที่ ข 18 ค่าความเป็นกรด-ด่างในแบบจำลองการหมักหมมที่มีการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่เติม และไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ ระยะเวลา

เวลา (วัน)	S				K4 + S				G + S				G + K4 + S			
	(pH)				(pH)				(pH)				(pH)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	5.95	5.83	5.79	5.86	5.66	5.71	5.59	5.65	5.62	5.75	5.72	5.70	5.51	5.01	5.62	5.38
1	4.35	4.39	4.20	4.31	4.35	4.41	4.27	4.34	5.05	4.36	5.70	5.04	4.71	4.44	4.97	4.71
2	4.07	4.15	4.15	4.12	4.14	4.19	4.19	4.17	4.55	4.28	5.68	4.84	4.62	4.43	4.90	4.65
3	3.96	4.13	4.14	4.07	3.97	4.14	4.14	4.08	4.39	4.28	4.28	4.32	4.62	4.34	4.44	4.47

หมายเหตุ :
 S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

ตารางผนวกที่ ข 19 ผลของการใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K7 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม

เวลา (วัน)	S (Log CFU/ml)				K7 + S (Log CFU/ml)				G + S (Log CFU/ml)				G + K7 + S (Log CFU/ml)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
	เชื้อเริ่มต้น	7.29	7.87	7.28	7.81	7.57	7.64	7.08	7.76	7.45	7.60	7.94	7.66	7.53	7.38	7.98
0	7.04	7.97	7.75	7.59	7.06	7.09	7.35	7.17	7.05	7.14	7.72	7.30	7.08	7.18	7.13	7.13
1	9.22	9.10	9.78	9.37	9.09	8.58	9.63	9.10	9.40	9.23	9.87	9.50	0.00	0.00	0.00	0.00
2	8.67	8.13	8.64	8.48	5.13	5.08	7.85	6.02	9.92	8.13	8.62	8.89	0.00	0.00	0.00	0.00
3	7.69	7.54	7.85	7.69	3.08	5.29	5.12	4.50	5.85	4.66	5.57	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ :
 S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

ตารางผนวกที่ ข 20 ค่าความเป็นกรด-ด่างในแบบจำลองการหมักเหนมที่มีการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่เติม และไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ ระยะเวลา

เวลา (วัน)	S				K7 + S				G + S				G + K7 + S			
	(pH)				(pH)				(pH)				(pH)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	5.91	5.85	5.91	5.89	5.92	5.72	5.80	5.81	5.95	5.78	5.88	5.87	5.91	5.72	5.59	5.74
1	4.57	4.41	4.46	4.48	4.36	4.19	4.22	4.26	4.97	5.69	4.59	5.08	5.05	4.92	4.20	4.72
2	4.17	4.12	4.20	4.16	3.94	4.00	4.02	3.99	4.44	5.68	4.45	4.86	4.67	4.87	4.24	4.59
3	4.13	4.08	4.13	4.11	3.88	3.77	3.84	3.83	4.40	5.62	4.41	4.81	4.66	4.86	4.22	4.58

หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีระยะเวลา 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีระยะเวลา 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

ตารางผนวกที่ ข21 ค่า water activity (A_w) ของเหวม และเหวมที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7

ตัวอย่างเหวม	เวลา (วัน)	water activity (A_w)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
เหวม (กลุ่มควบคุม)	0	0.966	0.969	0.959	0.965
	1	0.971	0.961	0.958	0.963
	2	0.969	0.979	0.982	0.977
	3	0.979	0.983	0.979	0.980
	4	0.966	0.965	0.965	0.965
	5	0.991	0.975	0.980	0.982
เหวมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7	0	0.961	0.963	0.976	0.967
	1	0.957	0.957	0.963	0.959
	2	0.979	0.987	0.945	0.970
	3	0.975	0.977	0.972	0.975
	4	0.961	0.967	0.968	0.965
	5	0.979	0.988	0.981	0.983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข22 ค่า pH ของແ່ນມແລະແ່ນມທີ່ເຕີມຄຳເຂົ້າ *Lb. salivarius* K7

ຕ້ວຍ່າງແ່ນມ	ເວລາ (ວັນ)	ຄ່າ pH			
		ຊ້ຳທີ່ 1	ຊ້ຳທີ່ 2	ຊ້ຳທີ່ 3	ເລຕີຍ
ແ່ນມ (ກຸ່ມຄວບຄຸມ)	0	6.00	5.97	6.00	5.99
	1	5.38	5.44	5.38	5.40
	2	5.35	5.24	5.37	5.32
	3	4.87	4.94	4.88	4.90
	4	4.69	4.72	4.68	4.70
	5	4.58	4.65	4.51	4.58
ແ່ນມທີ່ເຕີມເຂົ້າ <i>Lb. salivarius</i> K7	0	5.78	5.99	5.98	5.92
	1	5.27	5.31	5.31	5.30
	2	5.27	5.23	5.23	5.24
	3	4.79	4.85	4.8	4.81
	4	4.57	4.66	4.71	4.65
	5	4.51	4.34	4.50	4.45

ເອກສານນີ້ເປັນເອກສານທີ່ສວນໄວ້ສຳລັບການໃຊ້ງານເພື່ອການສຶກສາເທົ່ານັ້ນ ມີອຸນຸຍາດໃຫ້ນຳໄປໃຊ້ປະໂຫຍດດ້ານການຄ້າ ມີຖ້າກຳລັງ ທັງສິນ ອີກທັງຫ້າມມີໃຫ້ດັດແປງເນື້ອ ແລະຕ້ອງອ້າງອິງເຊື່ອມເອກສານທຸກຄັ້ງທີ່ມີການນຳໄປໃຊ້

ตารางผนวกที่ ข23 เปอร์เซ็นกรดแลคติกของແ່ນມແລະແ່ນມທີ່ເຕີມเกลือ *Lb. salivarius* K7

ตัวอย่างແ່ນມ	เวลา (วัน)	เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
ແ່ນມ (กลุ่มควบคุม)	0	0.45	0.51	0.54	0.50
	1	0.60	0.60	0.66	0.62
	2	0.66	0.69	0.72	0.69
	3	0.81	0.81	0.84	0.82
	4	0.87	0.90	0.90	0.89
	5	0.90	0.93	0.96	0.93
ແ່ນມທີ່ເຕີມเกลือ <i>Lb. salivarius</i> K7	0	0.54	0.57	0.57	0.56
	1	0.72	0.69	0.69	0.70
	2	0.72	0.72	0.78	0.74
	3	0.90	0.87	0.93	0.90
	4	0.96	0.90	1.02	0.96
	5	0.99	0.93	1.08	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข24 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกระหว่างการหมักแหนม

ตัวอย่างแหนม	จำนวนวัน	จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก (log cfu/ml)			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
แหนม (กลุ่มควบคุม)	0	5.61	5.82	5.73	5.72
	1	8.76	8.86	8.68	8.77
	2	9.01	8.83	8.97	8.94
	3	9.11	9.21	9.11	9.14
	4	8.59	8.51	8.48	8.53
	5	8.65	8.51	8.74	8.63
แหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7	0	6.89	6.79	6.59	6.76
	1	8.94	8.97	8.88	8.93
	2	9.20	9.06	9.06	9.11
	3	9.28	9.22	9.25	9.25
	4	8.84	8.55	8.69	8.69
	5	8.77	8.82	8.71	8.77
แหนมที่เติมเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K7 ร่วมกับ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292	0	6.55	6.92	6.79	6.75
	1	8.85	8.85	8.78	8.83
	2	9.14	9.07	9.11	9.11
	3	8.94	8.91	8.97	8.94
	4	8.56	8.51	8.56	8.54
	5	8.78	8.72	8.83	8.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางนวกที่ ข25 แสดงปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จากแบบจำลองการหมักหมนมที่ทำกร
วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

จำนวน วัน	K4			K4 + S			G + K4			G + K4 + S		
	Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0	6.55	6.61	6.58	6.81	6.83	6.82	7.20	7.46	6.33	7.07	7.23	6.15
1	7.41	7.44	7.43	7.41	7.48	7.44	7.78	7.89	7.83	7.92	7.93	7.92
2	6.51	6.49	6.50	7.18	7.17	7.17	6.89	6.93	6.91	6.69	6.81	6.75
3	5.82	5.79	5.81	7.26	7.16	7.21	6.84	6.77	6.81	7.00	6.96	6.98

หมายเหตุ : K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระทบ 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระทบ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข26 แสดงปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จากแบบจำลองการหมักเหวมที่ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

จำนวน วัน	K7			K7 + S			G + K7			G + K7 + S		
	Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0	6.72	6.75	6.73	6.68	6.95	6.82	6.71	6.86	6.79	6.83	6.94	6.89
1	7.64	7.68	7.66	7.92	7.95	7.93	7.79	7.81	7.80	7.52	7.59	7.55
2	7.48	7.49	7.49	7.64	7.68	7.66	7.58	7.56	7.57	7.53	7.58	7.55
3	6.63	6.28	6.46	7.61	7.47	7.54	7.46	7.40	7.43	7.36	7.30	7.33

หมายเหตุ : K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข27 แสดงปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหวม
 ที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และกระเทียม โดยทำการ
 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

จำนวน วัน	S			K4 + S			G + S			G + K4 + S		
	Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0	6.14	6.17	6.16	6.14	6.20	6.17	6.10	6.19	6.14	6.92	6.83	6.87
1	8.99	9.21	9.10	8.79	8.92	8.85	9.12	9.15	9.13	6.70	6.65	6.67
2	8.86	8.95	8.91	9.01	8.62	8.81	6.42	6.46	6.44	6.31	6.32	6.32
3	8.84	8.90	8.87	8.72	8.74	8.73	6.25	6.29	6.27	6.52	6.45	6.49

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข28 แสดงปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 จากแบบจำลองการหมักเหวม
 ที่ทำการหมักร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และกระเทียม โดยทำการ
 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

จำนวน วัน	S			K7 + S			G + S			G + K7 + S		
	Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml			Log CFU/ml		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0	6.51	6.51	6.51	6.61	6.63	6.62	6.38	6.43	6.40	6.46	6.42	6.44
1	8.36	8.45	8.40	8.64	8.74	8.69	8.70	8.62	8.66	6.81	6.83	6.82
2	8.29	8.65	8.47	8.46	8.57	8.52	8.83	8.75	8.79	6.68	6.64	6.66
3	8.16	8.46	8.31	8.35	8.43	8.39	8.51	8.47	8.49	6.47	6.38	6.42

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเหวม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	15	158.18	10.55	30.16	<0.0001
Error	31	10.84	0.35		
Total	46	169.02			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	3	3.52	1.17	3.35	0.0313
Day	3	128.69	42.89	122.68	0.0001
Treatment x Day	9	19.88	2.21	6.32	0.0001

C.V. = 11.17%, R-Square = 0.94, Root MSE = 0.59

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักเหวมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักแหนม และระยะเวลาในการหมักโดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	15	8.06	0.54	94.95	0.0001
Error	16	0.09	0.01		
Total	31	8.15			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	3	2.26	0.75	133.32	0.0001
Day	3	4.23	1.41	249.28	0.0001
Treatment x Day	9	1.56	0.17	30.72	0.0001

C.V. = 1.07%, R-Square = 0.99, Root MSE = 0.08

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแหนมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเหวม และระยะเวลาในการหมักโดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	15	74.36	4.96	8.33	0.0001
Error	31	18.45	0.59		
Total	46	92.81			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	3	10.54	3.51	5.91	0.0026
Day	3	52.16	17.39	29.22	0.0001
Treatment x Day	9	11.66	1.29	2.18	0.0522

C.V. = 12.32%, R-Square = 0.80, Root MSE = 0.77

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292
Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักเหวมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเหวม และระยะเวลาในการหมักโดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	15	5.84	0.39	46.14	0.0001
Error	16	0.14	0.01		
Total	31	5.98			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	3	0.72	0.24	28.35	0.0001
Day	3	4.14	1.38	163.63	0.0001
Treatment x Day	9	0.98	0.11	12.92	0.0001

C.V. = 1.25%, R-Square = 0.98, Root MSE = 0.09

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักเหวมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหวม และระยะเวลาในการหมักโดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	11	50.99	4.64	3.83	0.0029
Error	24	29.04	1.21		
Total	35	80.03			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	2	5.97	2.98	2.47	0.1062
Day	3	38.19	12.73	10.52	0.0001
Treatment x Day	6	6.83	1.14	0.94	0.4849

C.V. = 14.70%, R-Square = 0.95, Root MSE = 0.95

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักเหวมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหวม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	15	51.44	3.43	419.14	0.0001
Error	16	0.13	0.01		
Total	31	51.57			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	3	16.57	5.52	675.27	0.0001
Day	3	18.09	6.03	737.36	0.0001
Treatment x Day	9	16.77	1.86	227.69	0.0001

C.V. = 1.21%, R-Square = 0.99, Root MSE = 0.09

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักเหวมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักเหวมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหมนม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Spread plate

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	11	84.45	7.68	15.49	<0.0001
Error	24	11.90	0.50		
Total	35	96.34			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	2	9.63	4.81	9.71	0.0008
Day	3	61.03	20.34	41.05	<0.0001
Treatment x Day	6	13.79	2.30	4.64	0.0029

C.V. = 9.82%, R-Square = 0.98, Root MSE = 0.61

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมและ *S. Typhimurium* TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแหมนมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหนม และระยะเวลาในการหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR

Source	df	SS	MS	F	Pr<F
Model	15	31.25	2.08	233.72	0.0001
Error	16	0.14	0.01		
Total	31	31.39			
Source	df	Type III SS	MS	F	Pr<F
Treatment	3	16.57	4.16	466.52	0.0001
Day	3	18.09	4.95	555.00	0.0001
Treatment x Day	9	16.77	0.44	49.02	0.0001

C.V. = 1.23%, R-Square = 0.99, Root MSE = 0.09

หมายเหตุ Treatment หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมมี 4 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เติมเชื้อ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292 กลุ่มที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ร่วมกับกระเทียม และกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียมและ

S. Typhimurium TISTR 292

Day หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแหนมมี 4 วันคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

ตารางผนวกที่ ข37 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Treatment	LSMean	Number	1	2	3	4
K4	5.74	1	.	0.8080	0.0225	0.5554
G + K4 + S	5.22	2	.	.	0.0388	0.4107
G + K4	5.16	3	.	.	.	0.0064
K4 + S	5.01	4

หมายเหตุ : K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292

G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S.*

Typhimurium TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข38 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักหมมต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
0	7.91	1	.	0.0001	0.0001	0.0001
1	5.47	2	.	.	0.0001	0.0001
2	4.17	3	.	.	.	0.0236
3	3.58	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักหมม

ตารางผนวกที่ ข39 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR

Treatment	LSMean	Number	1	2	3	4
G + K4	7.21	1	.	0.8701	0.0001	0.2490
G + K4 + S	7.20	2	.	.	0.0001	0.3182
K4 + S	7.16	3	.	.	.	0.0001
K4	6.58	4

หมายเหตุ : K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักหมมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักหมมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักหมมที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข40 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักหมมต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
1	7.65	1	.	0.0001	0.0023	0.0001
0	6.97	2	.	.	0.0001	0.0001
2	6.83	3	.	.	.	0.0026
3	6.70	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักหมม

ตารางผนวกที่ ข41 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Treatment	LSMean	Number	1	2	3	4
K7 + S	7.03	1	.	0.2392	0.1990	0.0148
G + K7	6.22	2	.	.	0.9421	0.0008
G + K7 + S	5.83	3	.	.	.	0.0005
K7	5.80	4

หมายเหตุ : K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข42 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักแหมนต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
0	7.67	1	.	0.0087	0.0001	0.0001
1	6.79	2	.	.	0.0001	0.0001
3	5.38	3	.	.	.	0.2978
2	5.04	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักแหมน

ตารางผนวกที่ ข43 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR

Treatment	LSMean	Number	1	2	3	4
K7 + S	7.49	1	.	0.1762	0.0001	0.0644
G + K7	7.39	2	.	.	0.0001	0.0036
G + K7 + S	7.33	3	.	.	.	0.0001
K7	7.08	4

หมายเหตุ : K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์
 G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข44 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักแหมนต่อปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
1	6.81	1	.	0.0001	0.0001	0.0001
2	7.57	2	.	.	0.0019	0.0001
3	7.19	3	.	.	.	0.0001
0	6.70	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักแหมน

ตารางผนวกที่ ข45 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Treatment	LSMean	Number	1	2	3
S	8.53	1	.	0.3927	0.1946
G + S	7.93	2	.	.	0.0373
K4 + S	7.54	3	.	.	.

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข46 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักแหมนต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
1	9.48	1	.	0.0018	0.3003	0.0563
2	8.21	2	.	.	0.0222	0.0001
0	7.67	3	.	.	.	0.0053
3	6.63	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักแหมน

ตารางผนวกที่ ข47 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี Real-time PCR

Treatment	LSMean	Number	1	2	3	4
S	8.26	1	.	0.0001	0.0001	0.0001
K4 + S	8.14	2	.	.	0.0001	0.0001
G + S	6.99	3	.	.	.	0.0217
G + K4 + S	6.59	4

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K4 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ กระทบ 5 เปอร์เซ็นต์
 G + K4 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระทบ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข48 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักแหมนต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี Real-time PCR

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
1	8.44	1	.	0.0001	0.0001	0.0001
2	7.62	2	.	.	0.0001	0.0001
3	7.59	3	.	.	.	0.5166
0	6.34	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักแหมน

ตารางผนวกที่ ข49 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Treatment	LSMean	Number	1	2	3
S	8.28	1	.	0.0164	0.0839
G + S	7.76	2	.	.	0.0002
K7 + S	7.02	3	.	.	.

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข50 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักแหมนต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Spread plate

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
1	9.44	1	.	0.0001	0.0393	0.0001
2	8.10	2	.	.	0.0005	0.0001
0	7.38	3	.	.	.	0.0001
3	5.83	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักแหมน

ตารางผนวกที่ ข51 แสดงอิทธิพลของกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR

Treatment	LSMean	Number	1	2	3	4
G + S	8.09	1	.	0.0001	0.0001	0.0001
K7 + S	8.05	2	.	.	0.5010	0.0033
S	7.92	3	.	.	.	0.0141
G + K7 + S	6.59	4

หมายเหตุ : S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K7 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์
 G + K7 + S หมายถึง แบบจำลองการหมักแหมนที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ข52 แสดงอิทธิพลของระยะเวลาในการหมักแหมนต่อปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี Real-time PCR

Day	LSMean	Number	1	2	3	4
1	8.14	1	.	0.0001	0.0001	0.0001
2	8.11	2	.	.	0.4691	0.0001
3	7.90	3	.	.	.	0.0005
0	6.49	4

หมายเหตุ 0, 1, 2 และ 3 หมายถึง ระยะเวลาในการหมักแบบจำลองการหมักแหมน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวธัญรดา นราแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด	19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527
ที่อยู่	42/2 ม. 10 ต. วังเย็น อ. แปลงยาว จ. ฉะเชิงเทรา 24190
ประวัติการศึกษา	2548 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2553 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทาง การเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ความชำนาญพิเศษ	Microbial Biotechnology
ผลงานทางวิชาการ	Narakaew, T., K. Pilasombut, A. Ngamyeesoon and A. Swetwiwathana. 2009. Preliminary characterization of <i>Lactobacillus salivarius</i> K7 for probiotic properties. Pp. 1-10. in: Proceedings of the 3 rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนัก พัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ทุนสนับสนุนจากศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ โดยความ ร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)