สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การคัดแยกและศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล

# ISOLATION AND STUDY OF THE POTENTIAL BACTERIAL STRAINS PROBIOTIC PROPERTIES TO PRODUCE UNSATURATED FATTY ACID PRODUCTION FROM DIGESTIVE TRACT OF MARINE FISH

T132475

ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์

THITIRAT RATTANAWIWAN

วพ. จ3617 2556
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....132475
วัน,เดือน,ปี.....18 ก.ค. 2557
b.12609791
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-AG-M-081-149

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ISOLATION AND STUDY OF THE POTENTIAL BACTERIAL STRAINS PROBIOTIC PROPERTIES TO PRODUCE UNSATURATED FATTY ACID PRODUCTION FROM DIGESTIVE TRACT OF MARINE FISH

THITIRAT RATTANAWIWAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL-2013-AG-M-081-149

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**COPYRIGHT 2013**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**คณะเทคโนโลยีการเกษตร**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

---

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** การคัดแยกและศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล

Isolation and Study of the Potential Bacterial Strains Probiotic Properties to Produce Unsaturated Fatty Acid Production from Digestive Tract of Marine Fish

**นักศึกษา** นางสาวฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์

**รหัสประจำตัว** 52641004

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์การประมง

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** -

| คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ | | ลายมือชื่อ |
|---|---|---|
| รศ.ดร.สมชาย | หวังวิบูลย์กิจ | |
| ดร.พิกุล | จิรวาณิชไพศาล | |
| รศ.ดร.นงนุช | เลาหะวิสุทธิ์ | |
| ดร.อนัญญา | เจริญพรนิพัทธ | |
| ผศ.ดร.อัจฉรี | เรืองเดช | |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

**วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ** 15 ตุลาคม 2556 เวลา 09.00-12.00 น.

**สถานที่สอบ** ณ ห้องประชุม A209 (ชั้น 2 ตึกเจ้าคุณทหาร)

**คณบดีรับรองแล้ว**

**(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)**

**คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร**

**วันที่ 24 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2556**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การคัดแยกและศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล |
| **นักศึกษา** | นางสาวฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ |
| **รหัสประจำตัว** | 52641004 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | วิทยาศาสตร์การประมง |
| **พ.ศ.** | 2556 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | รศ.ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ |


## บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของตัวอย่างปลาทะเลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกได้ 100 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จากปลากดทะเล 35 ไอโซเลท ปลาทรายแดง 30 ไอโซเลท ปลาทู 11 ไอโซเลท และปลากระบอก 24 ไอโซเลท และนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างในช่วง 2-10 ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ และ ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ พบเชื้อที่มีคุณสมบัติ 5 ไอโซเลท ได้แก่ Ba1, Ba9, Tb11, Ma9 และ Mu7 โดยแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด oleic ได้มากที่สุด และสามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ระหว่าง 0.0113 – 0.055 mg/g และกรดไขมันชนิด DHA ได้ 0.0331 – 0.0217 mg/g จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อในขั้นต่อไปโดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท Tb11 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด โดยยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124 $^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942, *Leuconostoc cremoris, Lactobacillus plantarum* TISTR 8104, *Brochotrix campeatris* NBRC 11547 $^{T}$, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693$^{T}$ และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 จึงคัดเลือกไอโซเลท Tb11 มาทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกต่อไป เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ไปทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเจริญได้สูงสุดที่เวลา 22 ชั่วโมง การจำแนกชนิดของเชื้อจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่า ไอโซเลท Tb11 ถูกจำแนกเป็น *Lactococcus lactis* ssp lactis1 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ของ *L.lactis* spp. lactis Tb11 พบว่า มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 2-10



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทนต่อสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 1-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และทนต่อน้ำดีสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3, 4 และ 7 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดจากกระเพาะผ่านไปยังลำไส้ได้ การศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงพบว่า ที่เวลา 80 วินาที *L.lactis* spp. lactis Tb11 สามารถมีชีวิตรอดได้ในอุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส คือ 94.67, 31.34 และ 31.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *L.lactis* spp. lactis Tb11 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จากการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง *L.lactis* spp. lactis Tb11 ไม่สามารถย่อยโปรตีน ไขมันและแป้งได้ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพบว่า *L.lactis* spp. lactis Tb11 มีความสามารถในการต้านทานต่อ Gentamycin, Naldixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis** | Isolation and study of the potential bacterial strains probiotic properties to produce unsaturated fatty acid from digestive tract of marine fish |
| **Student** | Miss Thitirat Rattanawiwan |
| **Student ID.** | 52641004 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Program** | Fisheries Science |
| **Year** | 2013 |
| **Thesis advisor** | Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavisuti |


## ABSTRACT

Lactic acid bacteria was isolated from digestive tract of marine fish using selective medium MRS. One houndred isolates were obtained from sea catfish (*Arius maculates*), ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*), mackerel (*Rastrelliger brachysoma*) and mullet (*Mugil sinviridis*). All isolates were screened for tolerance to various pH ranges from 2 to10, NaCl concentrations from 1 to 5% (w/v) and bile salt at concentrations of 0.3, 0.6 and 0.9% (w/v). Previous results showed that five isolates of lactic acid bacteria namely Ba1, Ba9, Tb11, Ma9 and Mu7 may have probiotic properties. In the present study found the highest of oleic fatty acid. The fatty acid composition of the 5 isolates were EPA 0.0113-0.0055 mg/g dry cell and DHA 0.0331 – 0.0217 mg/g dry cell. These 5 isolates were then examined for their ability to inhibit the other indicator bacteria. Isolate Tb11 was found to inhibit the indicator strains of *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124 $^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942, *Leuconostoc cremoris, Lactobacillus plantarum* TISTR 8104, *Brochotrix campeatris* NBRC 11547 $^{T}$, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693$^{T}$ and *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358. The optimum growth for Tb11 was 30°C for 22 hour and based on several characteristics such as morphology, physiology and biochemistry Tb11 was identified as *Lactococcus lactis* ssp lactis1. The preliminary properties necessary for a probiotic bacterium was test under various conditions and *L.lactis* spp. lactis Tb11 could grow at pH ranges from 2-10, at concentrations of NaCl from 1-5% (w/v) and at bile salt concentrations up to 0.9%(w/v). *L.lactis* spp. lactis Tb11 survived in the gastrointestinal tract model at pH 3, 4 and 7. The tolerance to high temperatures up to 60-80°C was also tested and the results showed that the percentage survival of *L.lactis* spp. lactis Tb11 at


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60, 70 and 80°C for 80 seconds were 95, 31 and 32, respectively. Moreover *L.lactis* spp. lactis Tb11 can grow under both aerobic and anaerobic conditions. *L.lactis* spp. lactis Tb11 could not digest protein, lipid and starch. It was resistant to Gentamycin, Naldixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid and Sulfamethoxazole/Trimethoprim.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ ให้กำลังใจ และ ช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ถูกต้องสมบูรณ์ และ ดร.จตุพร บัณฑิต ที่มอบแนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์นี้ พร้อมทั้งคำปรึกษา ข้าพเจ้าขอกราบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สมชาย หวังวิบูลย์กิจ ผศ.ดร.อัจฉรี เรืองเดช ดร.อนัญญา เจริญพรนิพัทธ และ ดร.พิกุล จิรวาณิชไพศาล ที่ได้ให้ความกรุณา ให้คำแนะนำ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ ที่ช่วยแนะนำเทคนิคและวิธีการทำการทดลองให้สมบูรณ์แบบ คอยให้คำปรึกษาแนะนำเป็นอย่างดี รวมถึงอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในการทดลองต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆปริญญาโท ที่คอยช่วยเหลือเวลาทำงานทดลอง ทั้งยังให้กำลังใจ เป็นที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และเพื่อนคนอื่นทุกคนที่คอยให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวรัตนวิวัลย์ ที่คอยให้กำลังใจ ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดของข้าพเจ้า และมอบโอกาสทางการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้าโดยตลอดมา

ขอมอบคุณความดีที่มีอยู่ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แก่ผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จไปอีกขั้นของชีวิต ขอขอบพระคุณทุกท่าน

ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


หน้า

บทคัดภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก..... 3

2.2 แบคทีเรียสกุล *Lactococcus*..... 5

2.3 โปรไบโอติกในสัตว์น้ำ..... 6

2.4 คุณสมบัติของโปรไบโอติก..... 10

2.5 การทำงานของโปรไบโอติก..... 11

2.6 แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลา..... 12

2.7 ไขมัน..... 13

2.8 กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสำคัญต่อสัตว์น้ำ..... 15

2.9 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว..... 17

2.10 แหล่งคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว..... 20

2.11 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว... 22



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| บทที่ 3 | วิธีดำเนินการวิจัย..... | |
| | 3.1 ตัวอย่างปลา..... | 24 |
| | 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้ง..... | 24 |
| | 3.3 อุปกรณ์และสารเคมี..... | 24 |
| | 3.4 วิธีดำเนินการทดลอง..... | 28 |
| | 3.6 สถานที่ทำการวิจัย..... | 35 |
| | 3.6 ระยะเวลาการดำเนินงาน..... | 35 |
| บทที่ 4 | ผลการทดลอง..... | 36 |
| | 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล..... | 36 |
| | 4.2 องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้..... | 38 |
| | 4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ..... | 40 |
| | 4.4 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ..... | 43 |
| | 4.5 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก..... | 45 |
| | 4.5.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ..... | 45 |
| | 4.5.2 การศึกษาทางชีวเคมี..... | 46 |
| | 4.6 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก..... | 49 |
| | 4.6.1 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด-ด่าง..... | 49 |
| | 4.6.2 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์..... | 50 |
| | 4.6.3 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์..... | 50 |
| | 4.6.4 ความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง..... | 51 |
| | 4.6.5 ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง..... | 53 |
| | 4.6.6 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน..... | 53 |
| | 4.6.7 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง..... | 54 |
| | 4.6.8 ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ..... | 54 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| บทที่ 5 | วิจารณ์ผลการทดลอง..... | 56 |
| บทที่ 6 | สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... | 67 |
| บรรณานุกรม..... | | 70 |
| ภาคผนวก..... | | 77 |
| ประวัติผู้เขียน..... | | 90 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในระดับจีนัส..... | 7 |
| 2.2 | ลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียสกุล *Lactococcus*..... | 8 |
| 2.3 | แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ..... | 9 |
| 2.4 | แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบจากระบบทางเดินอาหารของปลา..... | 13 |
| 2.5 | กรดไขมันอิ่มตัวชนิดต่างๆ..... | 14 |
| 2.6 | กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ..... | 15 |
| 2.7 | องค์ประกอบของกรดไขมัน (%wt) จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล..... | 19 |
| 2.8 | แหล่งที่มาของการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน..... | 21 |
| 3.1 | ชนิดเชื้อแบคทีเรียทดสอบและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ..... | 27 |
| 4.1 | จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลาทะเลชนิดต่างๆ..... | 38 |
| 4.2 | องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติก..... | 39 |
| 4.3 | การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11..... | 42 |
| 4.4 | ลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11..... | 45 |
| 4.5 | ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11.. | 46 |
| 4.6 | ความสามารถในการต้านทาต่อยาปฏิชีวนะของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11..... | 54 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | โครงสร้างของไนซิน..... | 6 |
| 2.2 | จำลองการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค.... | 11 |
| 2.3 | โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ในกลุ่ม n-3 (a) และ n-6 (b)..... | 17 |
| 2.4 | แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA)..... | 18 |
| 2.5 | สรุปต้นกำเนิดชีวสังเคราะห์ของสายโซ่กรดไขมัน Acyl ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย..... | 20 |
| 2.6 | อัตราการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันในโรติเฟอร์ที่ได้รับแบคทีเรียที่ระยะเวลาต่างๆ..... | 23 |
| 4.1 | รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Ba1 กำลังขยาย 100X..... | 37 |
| 4.2 | รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Ba9 กำลังขยาย 100X..... | 37 |
| 4.3 | รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb1 กำลังขยาย 100X..... | 37 |
| 4.4 | รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Ma9 กำลังขยาย 100X..... | 38 |
| 4.5 | รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Mu7 กำลังขยาย 100X..... | 38 |
| 4.6 | แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ที่สามารถสร้างกรดยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ด้วยวิธี direct method โดยแบคทีเรียทดสอบคือ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM $1157^T$ (A), *Leuconostoc cremoris* (B), P2 = Positive control..... | 41 |
| 4.7 | การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... | 43 |
| 4.8 | การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... | 44 |
| 4.9 | ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการเจริญเติบโตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11..... | 49 |
| 4.10 | ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11... | 50 |
| 4.11 | ผลของน้ำดีสังเคราะห์ต่อการเจริญเติบโตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11..... | 51 |
| 4.12 | แสดงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 เมื่อทดสอบน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 2, 3, 4 และ 7 ในกระเพาะจำลองนาน 180นาที และในลำไส้จำลองนาน 180 นาที..... | 52 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.13 | อัตราการรอดชีวิตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที..... | 53 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไขมัน เป็นสารอาหารที่ให้พลังงานสูง และสามารถสะสมไว้ได้ภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการเป็นโครงสร้างของเยื่อเซลล์ (biomembrane) ไขมันทุกชนิดมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ซึ่งกรดไขมันชนิดนี้ มีจุดหลอมเหลวสูง เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ จึงมีสภาพเป็นไข ปลาไม่สามารถย่อยและนำกรดไขมันอิ่มตัวมาใช้ เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น ที่มีอุณหภูมิในร่างกายใกล้เคียงกับอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งค่อนข้างต่ำ ทำให้ปลาไม่สามารถย่อยและนำกรดไขมันอิ่มตัวไปใช้ได้ดี กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อการดำรงชีพและการเจริญเติบโตของปลา กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ในสัตว์น้ำมี 3 กลุ่ม คือ กลุ่มกรด oleic (n 9) กลุ่มกรด linoleic (n 6) และกลุ่มกรด linolenic (n 3) โดยกรดไขมันในกลุ่ม n 3 และ n 6 นี้สัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ และจำเป็นต้องได้รับ หากขาดจะทำให้ร่างกายของสัตว์น้ำขาดความสมดุล ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเสริมกรดไขมันเหล่านี้เข้าไปให้เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำ (Yanes-Roca *et al.* 2009)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์และสิ่งมีชีวิตเล็กๆจำพวก จุลสาหร่าย แบคทีเรียและรา ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้มักอยู่ในรูปของน้ำมัน หรือเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Gill and Vallivety. 1997) ในปัจจุบันได้เริ่มมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม n 3 และ n 6 เนื่องจากแบคทีเรียนับว่ามีบทบาทสำคัญในลำดับห่วงโซ่อาหาร โดยมีหน้าที่เป็นกำลังการผลิตในขั้นที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีการสร้างกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของเซลล์นี้จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถจะทำให้ได้กรดไขมันจำเป็นออกมาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ร่วมกับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในด้านการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่สัตว์น้ำในวัยอ่อน (วิกรมนัส เอื้อวิทูทิช และคณะ. 2544 : Nichols *et al.* 1997) สำหรับการนำแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีการนำแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นโปรไบโอติก โดยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ โดยการแย่งพื้นที่ยึดเกาะบริเวณพื้นผิวผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้าน พร้อมทั้งกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค ส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (Balcazar *et al.* 2006) และยังช่วยในการลดการใช้สารปฏิชีวนะ ทำให้ลดการตกค้างของสารปฏิชีวนะทั้งในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกด้วย จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียนับว่ามีบทบาทสำคัญในการเป็นชีวภาพบำบัด เช่นการใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ การใช้ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียใส่ลงไปในน้ำหรืออาหารเพื่อเป็นการป้องกันโรค และเพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำเติบโตได้ดีขึ้นด้วย (Balcazar *et al.* 2006) การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล เพื่อศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบของเซลล์ จากปลาทะเลซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกและยังสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญบางชนิด โดยมุ่งหวังให้สามารถนำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกและมีกรดไขมันสำคัญบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่คัดแยกได้นี้ไปใช้ประโยชน์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล

1.2.2 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันจากเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากการคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล

## 1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 คาดว่าจะพบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB) จัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae สามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมและรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson. 1998) สามารถสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาลและสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ substrate – level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามิน กรดอะมิโน ไพริมิดีน เพปโตน แมงกานีส อะซิเตต และ ทวีน 80 เป็นต้น LAB สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน หรือ มีออกซิเจนเล็กน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright. 1993) LAB จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม homofermentative และกลุ่ม heterofermentative เดิมมีการจัดแบ่ง LAB เป็น 4 สกุล คือ *Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc* และ *Lactobacillus* แต่ในปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ 12 สกุล โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์จากคุณสมบัติต่างๆ ได้ดังนี้

2.1.1 *Pediococcus* เซลล์เป็นรูปกลม เรียงตัวกันเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน (tetraed) เคยมีการเข้าใจว่ามีการแบ่งระนาบเดียวให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างแคปซูลโคโลนีมีขอบเรียบ กลม สีไม่แตกต่างกัน เป็นพวกที่สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ทำให้เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลกติกไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารจะเจริญตามรอยแทง (stab) และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอด

2.1.2 *Streptococcus* โดยปกติเซลล์เป็นรูปกลมหรือไข่ มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายเมื่อเติบโตในอาหารเหลว เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งที่ที่มีออกซิเจน (aerobe) บริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) บางชนิดต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญ เมื่อหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลกติกเป็นสารอาหารหลัก ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักกรดอินทรีย์ได้ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญปกติประมาณ 37 องศาเซลเซียส

2.1.3 *Lactobacillus* เซลล์รูปท่อนยาว ท่อนสั้น คอคโคบาซิไล (Coccobacilli) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และจะติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เป็นพวกที่ทนกรด (aciduric) พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญคือ 5.5-6.2 อัตราการเจริญลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง ต้องการออกซิเจนน้อย การสร้างสารสีพบได้น้อยมาก ถ้าพบจะมีสีเหลืองส้มจนถึงสีแดงอิฐ

2.1.4 *Leuconostoc* เซลล์อาจเป็นรูปกลม โดยมากเป็นรูปรี โดยเฉพาะเมื่อเติบโตในอาหารแข็ง การเรียงตัวมักเป็นคู่หรือเป็นสาย เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมักน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร มักต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญเติบโต

2.1.5 *Carnobacterium* เซลล์เป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เดิมจัดอยู่ในพวก Lactobacilli เป็นเชื้อที่มีขนาดสารพันธุกรรม (phylogeny) ใกล้เคียงกับ Enterococci และ Vagococci มากกว่า Lactobacilli มีการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถสร้างก๊าซจากการหมักน้ำตาลกลูโคส เชื้อ *Carnobacterium* แตกต่างจาก Lactobacilli ตรงที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารอะซิเตต (acetate medium) และไม่สามารถสังเคราะห์กรดโอเลอิก (oleic acid)

2.1.6 *Lactococcus* เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากสกุล *Streptococcus* เซลล์เป็นรูปกลมหรือรูปไข่ อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก ไม่มีแคปซูลและเคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2.1.7 *Vagococcus* เซลล์เป็นรูปกลมหรือรูปไข่ ท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก เซลล์อยู่เป็นแบบเดี่ยวๆ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2.1.8 *Weissella* เป็นแบคทีเรียที่มีเซลล์รูปร่างกลม แยกกลุ่มออกมาจาก *Leuconostoc paremesenteroides* เป็นเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* มีปริมาณเบสก้วนีนและไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 37-37 เปอร์เซ็นต์โมล

2.1.9 *Enterococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม มีจำนวนมากกว่า 22 สายพันธุ์ เดิมได้รวมแบคทีเรียในสกุลนี้ไว้กับ fecal Streptococci 2 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus bovis* และ *Streptococuus equines* แต่ในปัจจุบันได้มีการแยกออกมาแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.10 *Bifidobacterium* ประกอบด้วยสมาชิกอย่างน้อย 27 สายพันธุ์ ลักษณะโดยทั่วไป มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่ค่าพีเอช 5-8

2.1.11 *Tetragenococcus* ในกลุ่มนี้เซลล์จะมีการแบ่งตัวในลักษณะเดียวกับ *Pediococcus* เนื่องจากเดิมนั้นคือ สายพันธุ์ *P.halophilus* และได้ถูกนำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ได้สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล *Enterobacterium* และ *Carnobacterium* มากกว่าในสกุลเดิม

2.1.12 *Propinobacterium* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน มีการเรียงตัวเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ พบได้เกือบทุกส่วนของร่างกายโดยทั่วไปไม่เป็นเชื้อก่อโรค เช่น *Propinobacterium freudeureichii*

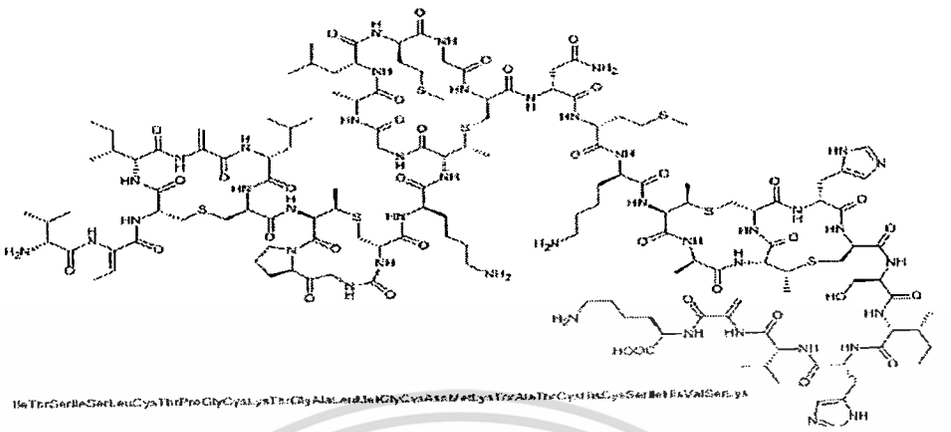
## 2.2 แบคทีเรียสกุล *Lactococcus*

แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือไข่ มีขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร สามารถสร้างกรดแลกติกได้ในปริมาณมาก ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* (รวมไปถึง subsp. *cremoris* และ *hordniae*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* และ *L.raffinolactis* และสามารถจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* ได้ดังตารางที่ 2.2 แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* สามารถคัดแยกได้จากธัญพืช สัตว์ และในลำไส้ของมนุษย์ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococci* เป็นแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อหมักในผลิตภัณฑ์นมหมัก สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ในทางการค้านิยมใช้ *L.lactis* subsp. *lactis* และ *cremoris* ซึ่งความแตกต่างของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้จะแตกต่างกันที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. lactis* มีความสามารถในการทนเกลือ และสามารถไฮโดรไลซิสอาร์จีนีน ในขณะที่สายพันธุ์ *cremoris* ไม่สามารถทำได้ (Salminen *et al.* 2012) โดย อัญชลินทร์ สิงห์คำ และ จีรชัย กาญจนพฤฒิพงศ์ (2551) ทำการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกจากน้ำนมดิบของแพะในเขตภาคกลาง สามารถคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* ได้ 5.13 เปอร์เซ็นต์ และจำแนกเป็นสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ได้ 4 ไอโซเลต ซึ่งทุกไอโซเลทสามารถหมักน้ำตาลแลกโทสได้

แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินซึ่งในปัจจุบันมีขายในรูปผงแห้งในชื่อที่รู้จักกันดี คือ ไนซิน (nisin) มีชื่อทางการค้าว่า Nisaplin™ โดยสารไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ในอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภทชีส นม และอาหารกระป๋อง ซึ่ง Nisaplin™ เป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและยาว่าสามารถใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550) โดยพบว่าไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดรวมไปถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค



**ภาพที่ 2.1** โครงสร้างของไนซิน
**ที่มา:** อรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2550)

## 2.3 โปรไบโอติกในสัตว์น้ำ

LAB เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลา ซึ่งชนิดและปริมาณของแบคทีเรียดังกล่าวจะส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำโดยตรง จึงได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มจำนวนของ LAB เข้าไปภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ (Ringo and Gatesoupe. 1998) ซึ่งอาจทำได้ 3 วิธี คือ การเติม LAB ลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาโดยตรง โดยการเติมจุลินทรีย์ลงสู่บ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะเข้าไปเปลี่ยนแปลงหรือแทนที่แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในน้ำและในตะกอนดิน เพื่อเพิ่มความหลากหลายของจำนวนจุลินทรีย์และทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพที่ดีขึ้นด้วย (Moriaty. 1998) การนำ LAB มาผสมกับอาหารของสัตว์น้ำ และ การให้อาหารสัตว์น้ำซึ่งมีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของ LAB การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในสัตว์น้ำจะมีหลักการที่แตกต่างจากการใช้โปรไบโอติกในสัตว์บกและมนุษย์ กล่าวคือ การพัฒนาตัวอ่อนของมนุษย์และสัตว์บกจะอยู่ในรก (amnion) แต่ตัวอ่อนของสัตว์น้ำจะพัฒนาตัวอ่อนอยู่ในสภาวะแวดล้อมภายนอก ซึ่งในระยะดังกล่าวนี้ เป็นระยะที่ระบบภูมิคุ้มกันและระบบการย่อยอาหารยังไม่สมบูรณ์ดี ดังนั้นการให้โปรไบโอติกในระยะนี้จึงเป็นระยะที่ดีที่สุด (Gatesoupe. 1999)

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพสัตว์ให้ดีขึ้น (นวลจันทร์ พารักษา. 2533; Kontula *et al.* 1998) โดยแบคทีเรียชนิดที่มีคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ แสดงในตารางที่ 2.3 สำหรับการเสริมแบคทีเรียในอาหารสัตว์จะเสริมใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.1** การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในระดับจีนัส

| Family | Genera | shape | $CO_2$ from Glucose | Growth at 10°C | Growth at 45°C | Growth in 6.5% NaCl | Growth in 18% NaCl | Growth at pH 4.4 | Growth at pH 9.6 | Type of Lactic acid |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aerococcaceae | *Aerococcus* | Cocci (tetrads) | - | + | - | + | - | - | + | L |
| Carnobacteriaceae | *Carnobacterium* | Rods | - | + | - | ND | - | ND | - | L |
| Enterococcaceae | *Enterococcus* | Cocci | - | + | + | + | - | + | + | L |
| | *Tetrageonococcus* | Cocci (tetrads) | | + | - | + | + | -Variable | + | |
| | *Vagococcus* | Cocci | | + | - | - | - | | - | |
| Lactobacillaceae | *Lactobacillus* | Rods | Variable | Variable | Variable | Variable | - | Variable | - | D, L, DL |
| | *Pediococcus* | Cocci (tetrads) | - | Variable | Variable | Variable | - | + | - | L, DL |
| Leuconostocaecae | *Leuconostoc* | Cocci | + | + | - | Variable | - | Variable | - | D |
| | *Oenococcus* | | + | + | - | Variable | - | Variable | - | D |
| | *Weissella* | | + | + | - | Variable | - | Variable | - | D, DL |
| Streptococcaceae | *Lactococcus* | Cocci | - | + | - | - | - | Variable | - | L |
| | *Streptococcus* | | - | - | Variable | - | - | - | - | L |

**ที่มา:** Salminen *et al.* (2012)

**ตารางที่ 2.2** ลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียสกุล *Lactococcus*

| | *L.lactis* | *L.garvieae* | *L.piscium* | *L.plantarum* | *L.raffinolactis* | *L.chungangensis* | *L.fujiensis* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Growth at 4 °C | - | - | + | - | - | + | ND |
| Growth at 40 °C | Occasionally | + | - | - | - | - | + |
| Growth at 4% NaCl | + | Occasionally | ND | + | - | - | - |
| Lactose fermentation | + | + | + | - | - | - | - |
| Mannitol fermentation | - | Occasionally | + | + | ND | ND | + |
| Raffinose fermentation | - | - | + | - | + | - | ND |
| Starch fermentation | ± | - | - | - | ± | ND | + |
| Hydrolysis of aesculin | - | + | + | + | - | + | ND |

**ที่มา:** Salminen *et al.* (2012)

รูปแบคทีเรียชนิดเคลือบ (micro encapsulate) เพื่อป้องกันการถูกทำลายจากภายนอก และเพื่อให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่ได้ในขบวนการผลิตอาหาร แบคทีเรียที่ใช้เสริมในอาหารสัตว์มักใช้ Lactoacillus และ Streptocccus เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Streptococcus faecium* การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารจะทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียจะผลิตกรดโดยเฉพาะกรดแลกติก ช่วยในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบทางเดินอาหาร ทำให้สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งการเสริมแบคทีเรียในอาหารจะมีประสิทธิภาพสูงในสัตว์วัยอ่อน (นฤมล อัศวเกศมณี. 2549)

**ตารางที่ 2.3** แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

| LAB isolate used | Host | Way of administration |
|---|---|---|
| *Lac. lactis and Lb. bulgaricus* | Turbot, larvae | Enrichment of rotifers and *Artemia* |
| *Lb. plantarum* | Atlantic halibut | Addition to culture water |
| *Lb. acidophilus* and *Str. thermophilus* | Nile tilapia, fry | Addition to diet |
| *Lb. rhamnosus* | Rainbow trout | Addition to diet |
| *Lactobacillus* sp. DS-12 | Flounder, juvenile | Addition to diet |
| *Carnobacterium* spp. | Turbot, larvae | Enrichment of rotifers |
| *C. divergens* | Atlantic salmon | Addition to diet |
| *C. divergens* | Turbot, larvae | Addition to culture water |
| *P. acidilactici* | Pollack, larvae | Enrichment of *Artemia* |
| *Ent. faecium* M-74 | Sheat fish, fry | Addition to diet |
| *Ent. faecium* | Israeli carp, adult | Addition to diet |
| *Ent. faecium* | Israeli carp, juvenile | Addition to diet |
| *Ent. faecium* | Sheat fish, fry | Addition to diet |
| *Str. thermophilus* | Turbot, larvae | Enrichment of rotifer |

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Salmenen *et al.* (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกต้องผ่านการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย โดยไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องมีความปลอดภัย ต้องมีความสัมพันธ์เกื้อกูลหรือสายพันธุ์เดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์เจ้าบ้าน (Salminen *et al.* 1998)

2.4.2 ควรมีความสามารถในการทนกรดและน้ำดีในกระเพาะอาหารได้ดี รวมทั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ โดยในระบบการย่อยอาหารของปลา ประกอบด้วยอวัยวะหลัก 3 ส่วน คือ กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) และ ไส้ติ่ง (pyloric caeca) ซึ่งในกระเพาะอาหารของปลานั้นมีค่าความเป็นกรดด่างที่เป็นสภาวะที่เป็นกรด (อยู่ในช่วง 2-4) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การทำงานของเอนไซม์เปปซิน (pepsin) และในส่วนของลำไส้นั้นจะมีสภาวะที่เป็นกลางถึงด่าง (ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 7-11) โดยชนิดของเอนไซม์ที่พบในระบบการย่อยอาหารของปลานั้นจะขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกินอาหารของปลา (Jobling. 1995)

2.4.3 สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านและสามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) โดยการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหารเป็นไปอย่างปกติ (Fuller. 1993)

2.4.4 มีการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี (antibody) มากขึ้น สามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และช่วยในการส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage เพื่อช่วยในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller. 1993)

2.4.5 เมื่อเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน (นวลจันทร์ พารักษา. 2533)

2.4.6 ต้องมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง เนื่องจากในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์มีปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น กระบวนการให้ความร้อน ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำและตายลง ดังนั้นคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของแบคทีเรีย จึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโปรไบโอติก (Desmond *et al.* 2002)

2.4.7 ไม่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และต้องเป็นสายพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย (กิจการ ศุภมาตย์. 2541)

2.4.8 สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น โฟเลท (folate) ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง วิตามินบี2 กรดไขมันและกรดอะมิโน (Fuller. 1993)

2.4.9 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Fuller. 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

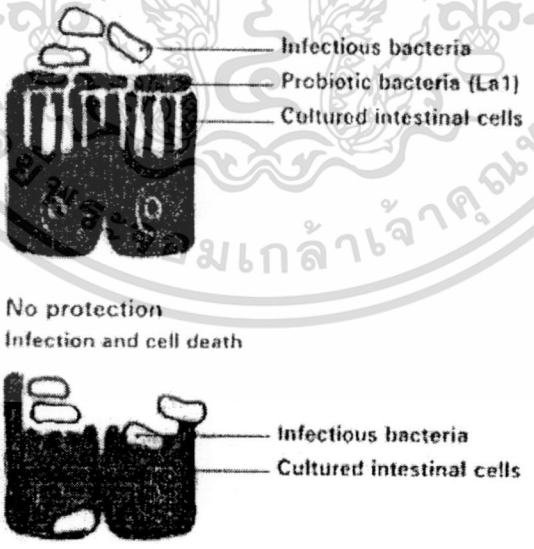
2.4.10 มีความคงทนต่อสภาพแห้งได้นาน สามารถนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์ (อัจฉรา เพิ่ม. 2549)

2.4.11 ปรับปรุงคุณภาพน้ำ ทำให้น้ำที่ปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนน้อยลง มีการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (อัจฉรา เพิ่ม. 2549)

## 2.5 การทำงานของโปรไบโอติก

2.5.1 มีการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ การทดลองโดย Ziauddin *et al.* (1993) พบว่า กรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียก่อโรค ที่ระดับความเข้มข้นของกรดแลกติก 1.5-2.5 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Bacillus, E. coli, Salmonella, Staphylococcus* และ *Streptococcus* ได้อย่างสมบูรณ์

2.5.2 การยึดเกาะกับผนังลำไส้ มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เจ้าบ้าน โดยเมื่อสัตว์ได้รับโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายแล้ว โปรไบโอติกจะผ่านกระเพาะอาหารไปเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหารและมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อบุผนังลำไส้ โดยแทรกตัวอยู่ตามที่ร่องผนัง (villi) ทำให้ช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากระบบทางเดินอาหาร และส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้ macrophage เดินทางออกมาเป็นจำนวนมาก จึงช่วยระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งทำงานได้ดียิ่งขึ้น (Fuller. 1993)




**ภาพที่ 2.2** จำลองการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค
**ที่มา:** Nestle (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 ช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ โดยมากจะพบในแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะในสกุล *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถควบคุมปริมาณของเสียที่เป็นสารอินทรีย์ได้ โดยการเปลี่ยนให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้โปรไบโอติกแบคทีเรีย ยังมีคุณสมบัติในการเป็น nitrifying bacteria ที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์ในน้ำ และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำได้อีกด้วย (อัจฉรา เพิ่ม. 2549)

## 2.6 แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลา

ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็นที่อาศัยอยู่ในน้ำ โดยชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารจะมีผลต่อสุขภาพของปลา เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการช่วยดูดซับสารอาหาร และปรับสมดุลของจุลินทรีย์ (microbial balance) นอกจากนี้ยังมีกลไกในการขัดขวางการเข้ายึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด โดย Ringo and Gatesoupe (1998) ได้รายงานว่าพบกลุ่ม LAB เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในลำไส้ของปลาที่มีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งพบว่า LAB ที่พบในระบบทางเดินอาหารของปลานั้นมาจากน้ำ ตะกอนดิน รวมไปถึงอาหารที่ปลาได้รับอีกด้วย (Sugita *et al.* 1997) LAB สามารถพบได้ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ ในปัจจุบันนั้นได้มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางสายพันธุ์ของ LAB เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ ซึ่งรวมไปถึงการศึกษาถึงความสามารถของ LAB ในการยับยั้งสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในปลา

Ringo and Gatesoupe (1998) ได้รวบรวมผลการศึกษาชนิดของ LAB จากอวัยวะส่วนต่างๆ ของปลาแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 2.4 LAB ที่พบในระยะต่างๆของปลา สามารถแบ่งออกได้เป็น

2.6.1 ระยะวัยอ่อน (larval stage) ในระยะนี้ระบบการย่อยอาหารของสัตว์น้ำในวัยอ่อน ยังพัฒนาได้ไม่สมบูรณ์ ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่จะพบในสัตว์น้ำวัยอ่อนนั้นจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ การให้โปรไบโอติกแก่สัตว์น้ำในระยะนี้จึงเป็นระยะที่เหมาะสม เนื่องจากทำให้ตัวอ่อนแข็งแรงขึ้น ส่วน LAB จะพบน้อยมากในระยะสัตว์น้ำวัยอ่อน (Ringo and Gatesoupe. 1998)

2.6.2 ระยะวัยรุ่น (juveniles and ongrowing fish) เป็นระยะที่อวัยวะภายในของปลาพัฒนาขึ้นอย่างสมบูรณ์มีการแบ่งแยกออกเป็นส่วนอย่างชัดเจน ซึ่งในระบบทางเดินอาหารประกอบไปด้วย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ไส้ติ่ง ลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็ก และจะพบว่ามี LAB อยู่เพียง 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียที่อยู่ในระบบย่อยอาหารนี้ถูกทำลายด้วยกรดที่อยู่ในกระเพาะอาหาร (Ringo. 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.4** แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบจากระบบทางเดินอาหารของปลา

| Fish Species/family | Lactic acid bacteria isolated from | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Whole intestinal tract | Stomach | Small intestine | Large intestine | Feces |
| ***Lactobacillus* sp.** | | | | | |
| Arctic charr (*S. alphinus*) | + | + | + | + | + |
| Atlantic salmon (*Sal. salar*) | | + | + | + | |
| ***L. plantarum*** | | | | | |
| Arctic charr | | + | + | + | + |
| Saithe (*G. virens*) | + | | | | |
| ***Carnobacterium* sp.** | | | | | |
| Arctic charr | | + | + | + | + |
| Atlantic salmon | | + | + | | |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | + | | | | |
| ***Streptococcus* sp.** | | | | | |
| Arctic charr | | + | + | + | |
| Salmonids | + | | + | + | |
| European eel (*Ang. anguilla*) | + | | | | |

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Ringo and Gatesoupe (1998)

## 2.7 ไขมัน (Lipids)

ไขมัน (lipid) จัดเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน พบในพืชและสัตว์ ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซิโตน เป็นต้น ไขมันมีหน้าที่เป็นโครงสร้างของเยื่อเซลล์ (biomembrane) ไขมันทุกชนิดมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ และยังเป็นแหล่งพลังงานของร่างกาย รวมทั้งยังเป็นแหล่งกำเนิดกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ไขมันเป็นแหล่งพลังงานที่ได้มีการศึกษากันอย่างมากที่สุด เนื่องจากพบว่าเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเยื่อเซลล์ในสัตว์น้ำหลายชนิด โดยเฉพาะกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid: PUFA) ทำให้มีการศึกษาถึงกรดไขมันชนิดนี้กันอย่างมาก กรดไขมันจัดเป็นกรดคาร์บอกซิลิค (carboxylic acid) ที่มีหมู่ –COOH เพียงหมู่เดียวต่อกับไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สายยาวเส้นตรง กรดไขมันที่พบในธรรมชาติ มักจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นจำนวนคู่ และมักพบในรูปกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) เล็กน้อย แต่ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่พบในรูปที่ละลายในไขมัน (saponifiable lipid) โดยกรดไขมันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.7.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยว ทำให้คาร์บอนโมเลกุลจับกับไฮโดรเจนเต็มที่ แล้วไม่สามารถจับกับไฮโดรเจนเพิ่มได้อีก กรดไขมันที่อิ่มตัวเมื่อมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเพิ่มขึ้น จะมีจุดหลอมเหลวสูงขึ้น ทำให้เป็นสาเหตุหนึ่งที่สัตว์น้ำย่อยกรดไขมันที่อิ่มตัวได้ไม่ดี และสัมประสิทธิ์การย่อยมีค่าลดต่ำลง กรดไขมันที่อิ่มตัวส่วนใหญ่จะพบในไขมันหรือน้ำมันจากสัตว์ ซึ่งจะมีสภาพเป็นไขหรือแข็งตัวเมื่ออุณหภูมิต่ำลง

2.7.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีพันธะคู่ ทำให้คาร์บอนในโมเลกุลสามารถจับกับไฮโดรเจนเพิ่มได้อีก กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนพันธะคู่เพิ่มขึ้นจะมีจุดหลอมเหลวต่ำลง ทำให้สัตว์น้ำสามารถย่อยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวได้ดีและมีค่าสัมประสิทธิ์การย่อยสูงขึ้นเพราะสัตว์น้ำเป็นสัตว์เลือดเย็นมีอุณหภูมิร่างกายเท่ากับอุณหภูมิน้ำ จึงสามารถย่อยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวซึ่งอยู่ในสภาพของเหลวได้ดี กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว นิยมเขียนสัญลักษณ์ย่อเป็นชื่อโอเมกา (omega name) ความหมายของสัญลักษณ์ดังกล่าว คือ ตัวเลขแรก หมายถึง จำนวนคาร์บอนทั้งหมดที่มีในกรดไขมัน และตัวเลขที่สอง หมายถึง จำนวนพันธะคู่ทั้งหมดที่มีในกรดไขมัน โดย n หรือ W (omega) จะแสดงถึง ตำแหน่งพันธะคู่ตัวแรกที่ปรากฏในไขมัน นับจากด้านปลายเมธิล การบอกตำแหน่งพันธะคู่เป็นระบบ n หรือ W ทำให้ทราบว่ากรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวชนิดนั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือไม่

**ตารางที่ 2.5** กรดไขมันอิ่มตัวชนิดต่างๆ

| ชื่อสามัญ | สูตร | สัญลักษณ์ย่อ | จุดหลอมเหลว (°C) |
|---|---|---|---|
| กรดบิวไทริค (butyric) | $C_4H_8O_2$ | 4:0 | -7.9 |
| กรดคาโพรอิค (caproic) | $C_6H_{12}O_2$ | 6:0 | -3.4 |
| กรดคาไพรลิค (capryic) | $C_8H_{16}O_2$ | 8:0 | 16 |
| กรดคาพริค (capric) | $C_{10}H_{20}O_2$ | 10:0 | 31 |
| กรดลอริค (lauric) | $C_{12}H_{24}O_2$ | 12:0 | 44 |
| กรดไมริสติค (myristic) | $C_{14}H_{28}O_2$ | 14:0 | 54 |
| กรดปาลมิติค (palmitic) | $C_{16}H_{32}O_2$ | 16:0 | 63 |
| กรดสเตียริค (stearic) | $C_{18}H_{36}O_2$ | 18:0 | 70 |
| กรดอะราชิดิค (arachidic) | $C_{20}H_{40}O_2$ | 20:0 | 76 |
| กรดลิกโนเซริค (lignoceric) | $C_{24}H_{48}O_2$ | 24:0 | 86 |

**ที่มา:** วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.6** กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ

| ชื่อสามัญ | สูตร | สัญลักษณ์ย่อ | จุดหลอมเหลว (°C) |
|---|---|---|---|
| กรดปาลมิโตเลอิค (palmitoleic) | $C_{16}H_{30}O_2$ | 16:1 n7 | 0.5 |
| กรดโอเลอิค (oleic) | $C_{18}H_{34}O_2$ | 18:1 n9 | 13.4 |
| กรดไลโนเลอิค (linoleic) | $C_{18}H_{32}O_2$ | 18:2 n6 | -5 |
| กรดไลโนเลนิค (linolenic) | $C_{18}H_{30}O_2$ | 18:3 n6 | -11 |
| กรดอะราชิโดนิค (arachidonic) | $C_{20}H_{32}O_2$ | 20:4 n6 | -49.5 |
| กรดคลูปาโนโดนิค(clupanodonic) | $C_{20}H_{34}O_2$ | 22:3 n5 | -78 |

**ที่มา:** วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2536)

## 2.8 กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสำคัญต่อสัตว์น้ำ

กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวในสภาพธรรมชาติมีหลายชนิด แต่ทว่ากรดไขมันที่นักโภชนาการอาหารสัตว์น้ำศึกษากันอย่างมาก ได้แก่ กรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid: PUFA) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 18, 20 และ 22 อะตอม และจะมีพันธะคู่ตั้งแต่ 2-6 คู่ กรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูงที่พบแพร่หลายในองค์ประกอบของเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำนั้นมีอยู่ 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มสามารถสร้างหรือสังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่นได้จากสารตั้งต้นโดยการเติมคาร์บอน (elongation) และการเติมพันธะคู่ (desaturation) สำหรับกรดไขมันทั้ง 3 กลุ่มนี้ ได้แก่

2.8.1 กลุ่มกรดโอเลอิค (oleic acid series) หรือกลุ่มโอเมกา-9 (n-9 หรือ w-9) กรดไขมันในกลุ่มนี้มีสารตั้งต้นเป็น 18:1 n-9 ซึ่งจะนำมาใช้สังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่นๆ เช่น 18:2 n-9, 20:1 n-9, 20:2 n-9 เป็นต้น

2.8.2 กลุ่มไลโนเลอิค (linoleic acid series) หรือกลุ่มโอเมกา-6 (n-6 หรือ w-6) กรดไขมันกลุ่มนี้มีสารตั้งต้นเป็น 18:2 n-6 ซึ่งจะนำมาใช้สังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่นๆ เช่น 18:3 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6 เป็นต้น กรดไขมันเหล่านี้ส่วนใหญ่จะพบมากในน้ำมันจากพืช โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณหากรดไขมันแต่ละชนิดนิยมแสดงกรดไขมันทั้งหมดออกมาเป็นผลรวมของโอเมกา-6

2.8.3 กลุ่มไลโนเลนิค (linolenic acid series) หรือกลุ่มโอเมกา-3 (n-3 หรือ w-3) กรดไขมันกลุ่มนี้มีสารตั้งต้นเป็น 18:3 n-3 ซึ่งจะนำมาใช้สังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่นๆ เช่น 18:4 n-3, 20:3 n-3, 20:4 n-3, 20:5 n-3, 22:5 n-3 เป็นต้น กรดไขมันเหล่านี้ส่วนใหญ่จะพบมากในน้ำมันจากสัตว์และนิยมแสดงผลรวมเป็นโอเมกา-3 อย่างไรก็ตามทางด้านอาหารสัตว์น้ำถือว่ากรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential fatty acid หรือ EFA) ของสัตว์น้ำ มี 2 ชนิด ได้แก่ กรดไลโนเลอิคและกรดไลโนเลนิค เพราะสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน 2 ชนิดนี้เองได้ จำเป็นต้องได้รับจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเท่านั้น ซึ่งสัตว์น้ำที่ไม่ได้รับกรดไขมันเหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตช้าสำหรับกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในเนื้อเยื่อปลาจะเป็นกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ขึ้นมาโดยการเพิ่มจำนวนคาร์บอนและเพิ่มจำนวนพันธะคู่ ดังต่อไปนี้

2.8.3.1 การเพิ่มจำนวนคาร์บอน (elongation) จัดเป็นการสังเคราะห์กรดไขมันขึ้น โดยการนำเอาคาร์บอนมาต่อกันทีละ 2 คาร์บอนจนได้กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนมากขึ้น

(1) กรดไขมันกลุ่มโอเมกา -9 เริ่มจาก 18:1 n 9 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:1 n 9 และ 22:1 n 9 หรือ 18:2 n 9 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:2 n 9 และ 22:2 n 9 หรือ 20:3 n 9 ถูกสังเคราะห์เป็น 22:3 n 9

(2) กรดไขมันกลุ่มโอเมกา -6 เริ่มจาก 18:2 n 6 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:2 n 6 และ 22:2 n 6 หรือ 18:3 n 6 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:3 n 6 และ 22:3 n 6 หรือ 20:4 n 6 ถูกสังเคราะห์เป็น 22:4 n 6

(3) กรดไขมันกลุ่มโอเมกา -3 เริ่มจาก 18:3 n 3 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:3 n 3 และ 22:3 n 3 หรือ 18:4 n 3 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:4 n 3 และ 22:4 n 3 หรือ 20:5 n 3 ถูกสังเคราะห์เป็น 22:5 n 3

2.8.3.2 การเพิ่มจำนวนพันธะคู่ (desaturation) จัดเป็นการสังเคราะห์กรดไขมันขึ้น โดยการเพิ่มพันธะคู่ครั้งละ 1 คู่เข้าไปในกรดไขมันทำให้ได้กรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่มากขึ้น

(1) กรดไขมันกลุ่มโอเมกา -9 เริ่มจาก 18:1 n 9 ถูกสังเคราะห์เป็น 18:2 n 9 หรือ 20:1 n 9 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:2 n 9 และ 20:3 n 9 หรือ 22:1 n 9 ถูกสังเคราะห์เป็น 22:2 n 9, 22:3 n 9 หรือ 22:4 n 9

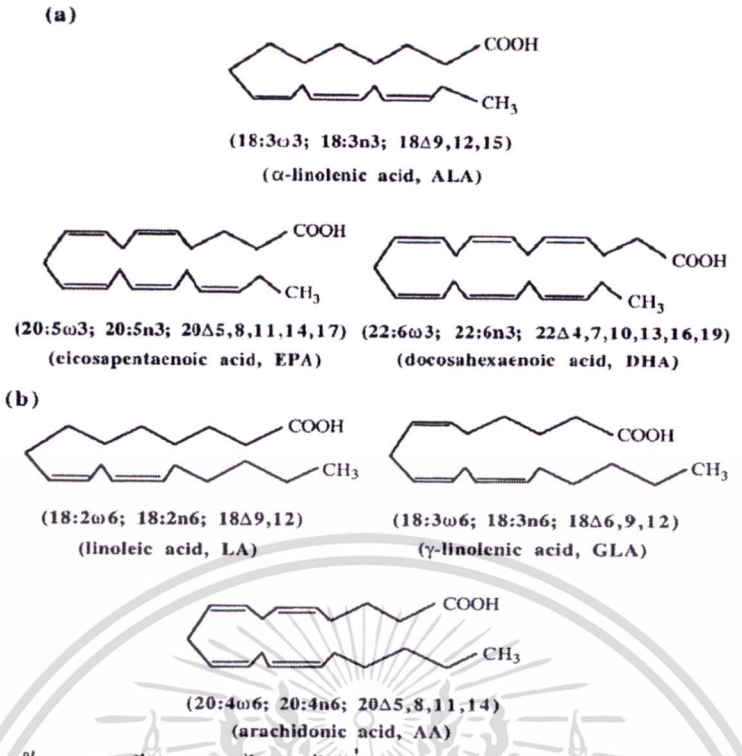
(2) กรดไขมันกลุ่มโอเมกา -6 เริ่มจาก 18:2 n 6 ถูกสังเคราะห์เป็น 18:3 n 6 หรือ 20:2 n 6 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:3 n 6 และ 20:4 n 6 หรือ 22:2 n 6 ถูกสังเคราะห์เป็น 22:3 n 6, 22:4 n 6 และ 22:5 n 6

(3) กรดไขมันกลุ่มโอเมกา -3 เริ่มจาก 18:3 n 3 ถูกสังเคราะห์เป็น 18:4 n 3 หรือ 20:3 n 3 ถูกสังเคราะห์เป็น 20:4 n 3 และ 20:5 n 3 หรือ 22:3 n 3 ถูกสังเคราะห์เป็น 22:4 n 3, 22:5 n 3 และ 22:6 n 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง





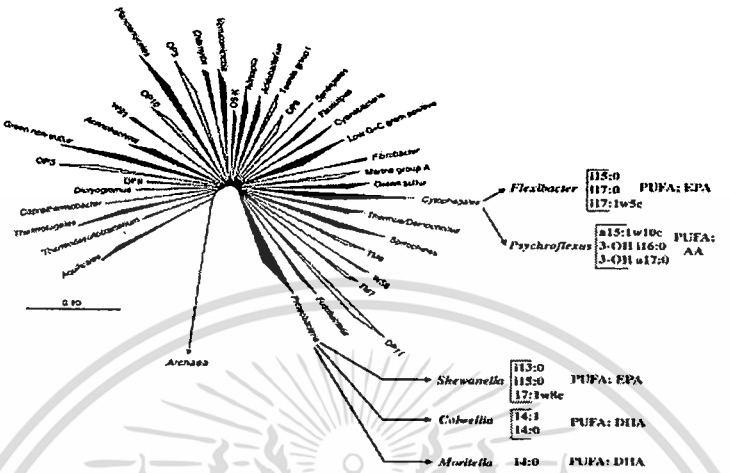

**ภาพที่ 2.3** โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ในกลุ่ม n-3 (a) และ n-6 (b)
**ที่มา:** Russell and Nichols (1999)

## 2.9 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และสิ่งมีชีวิตเล็กๆจำพวก จุลสาหร่าย แบคทีเรียและรา โดยกรดไขมันเหล่านี้จะอยู่ในรูปของน้ำมัน (storage oils) หรือเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (membrane lipids) ในรูปของ esters, ether, glycerides, glycolipids, phospholipids, phosphonolipids, sulpholipids และ lipoproteins (Gill and Valivety. 1997) ซึ่งในปัจจุบันจึงได้เริ่มมีการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เนื่องจากว่าแบคทีเรียนับว่ามีบทบาทในการเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารในทะเลและมีบทบาทในการเป็นกำลังการผลิตขั้นที่ 2 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่สร้างกรดไขมันดังกล่าวเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้ได้กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงได้อย่างไม่จำกัด ซึ่งการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้ สามารถที่จะควบคุมสภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อให้มีการสร้างกรดไขมันที่สำคัญบางชนิดเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในสัดส่วนหรือความเข้มข้นที่สูงกว่ากรดไขมันชนิดอื่นๆ (วิกรมนัส เอื้อวิทูทิช และคณะ. 2544) โดยได้มีการค้นพบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดไขมันจำเป็นในกลุ่มไลโนเลนิค คือกรดไขมันชนิด eicosapentaenoic acid (EPA) ซึ่งได้จากเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
132475

จำพวก *Flexibacter, Vibrio, Shewanella* (Nichols *et al.* 1997) และจากการค้นพบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงนี้ จึงทำให้เริ่มมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดย Russell and Nichols (1999) ได้รายงานองค์ประกอบกรดไขมันในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากในทะเล ตารางที่ 2.7




**ภาพที่ 2.4** แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA)
**ที่มา:** Nichols and McMeekin (2002)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถมีชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่รุนแรง (extreme environment) ได้ เช่น อุณหภูมิสูงมากหรือต่ำมาก หรือสภาวะที่มีเกลือที่มีความเข้มข้นสูงมาก โดยภายใต้สภาวะที่รุนแรงต่างๆนี้ โดยปกติจะไม่เหมาะสมกับการดำเนินชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั่วๆไป เช่น ในระดับที่อุณหภูมิต่ำมาก จะมีผลทำให้ membrane ของเซลล์แข็งตัวได้ อีกทั้งอุณหภูมิต่ำยังทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาต่างๆที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ช้าลงหรืออาจถึงขั้นอันตรายได้ ยกตัวอย่างเช่นในกลุ่มของแบคทีเรียพวก psychrophiles เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีเฉพาะในที่อุณหภูมิต่ำ และระดับอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถแบ่งตัวได้ คือ ไม่สูงกว่า 20 องศาเซลเซียส เรียกว่า psychrophile ในขณะที่แบคทีเรียที่มีระดับอุณหภูมิสูงสุดที่จะยังคงแบ่งตัวได้ที่ระดับสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส เรียกว่า psychrotroph โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้แล้วจะพบแบคทีเรียจำพวกนี้ได้ง่ายในอาหาร โดยติดมากับน้ำ ดิน อากาศ แบคทีเรียเหล่านี้จะมี cell membrane ที่ประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอัตราที่สูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ทั้งนี้เพื่อให้ membrane ยังคงสภาพได้ ไม่แข็งตัว ซึ่งเป็นการปรับตัวที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus, Listeria, Vibrios* บางสายพันธุ์, *Pseudomonas* และ *Brevibacterium* นอกจากนี้อาจยังมีการปรับตัวในด้านอื่นด้วย เช่นใน *Pseudomonas* สายพันธุ์หนึ่ง เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำจะทำการสร้างเอนไซม์ $C_{16:0}$ desaturase ออกมามากขึ้น เป็นต้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547)

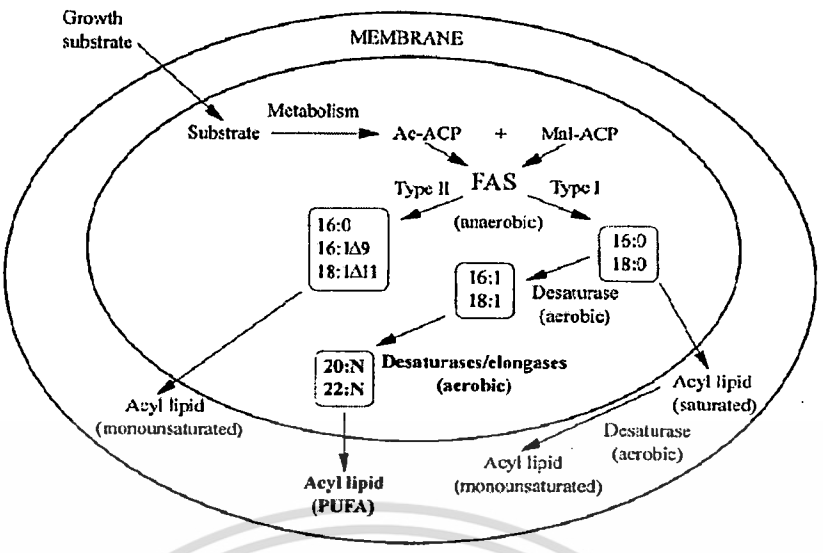
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.7** องค์ประกอบของกรดไขมัน (%wt) จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล

| Fatty acid | *Shewanella gelidimarina* ACAM 456 | *Shewanella hanedai* | *Shewanella putrefaciens* NCIB 10472 | *Colwellia psychrerythraeas* |
|---|---|---|---|---|
| 12:0 | 0·7 | 0·2 | - | - |
| i13:0 | 15·8 | 6·4 | 2·1 | <1 |
| 13:0 | 1·3 | 0·2 | 2·4 | - |
| i14:0 | 0·6 | 0·3 | 16·2 | <1 |
| 14:1 n7 | 0·8 | TR | 0·7 | 6·5 |
| 14:1 n5 | 0·1 | - | - | <1 |
| 14:0 | 4·4 | 9·3 | 1·0 | 6·4 |
| i15:0 | 8·3 | 8·5 | 9·2 | - |
| 15:0 | 6·7 | 4·1 | 3·4 | 6·7 |
| 15:1 n8 | 1·7 | 0·1 | 4·7 | 1·2 |
| 15:1 n6 | 1·7 | 0·3 | 0·6 | 0·2 |
| 16:0 | 6·4 | 13·6 | 6·1 | 30·0 |
| 16:1 n7 | 27·4 | 29·0 | 13·0 | 33·4 |
| i17:0 | 0·1 | 1·4 | 0·9 | <1 |
| 17:0 | 0·5 | 0·8 | 4·0 | 0·1 |
| 17:1 n8 | 4·2 | 1·0 | 8·9 | 0·6 |
| 17:1 n6 | 0·8 | 0·5 | 2·5 | 0·4 |
| 18:0 | 0·1 | 0·3 | 2·4 | 1·2 |
| 18:1 n9 | 0·3 | 0·5 | 2·3 | 0·6 |
| 18:1 n7 | 1·0 | 3·0 | 3·6 | 1·2 |
| 18:4 n3 | 0·3 | - | - | - |
| 20:4 n3 | 0·3 | - | - | - |
| 20:5 n3 | 16·0 | 20·2 | - | 0·7 |
| 22:6 n3 | - | - | - | 6·8 |
| Other | 0·2 | 0·3 | 10·2 | 2·3 |
| Total | 100·0 | 100·0 | 100·0 | - |

**ที่มา:** Russell and Nichols (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 2.5** สรุปต้นกำเนิดชีวสังเคราะห์ของสายโซ่กรดไขมัน Acyl ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย
**ที่มา:** Russell and Nichols (1999)

## 2.10 แหล่งคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

จากการค้นพบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) ทำให้เริ่มมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันในกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น Yazawa *et al.* (1988) ได้เริ่มศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 7,391 สายพันธุ์ และพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้จำนวน 112 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้ปลา Pacific mackerel *Pneumatophorus japonica* สามารถผลิตกรดไขมันจำเป็นชนิด EPA ได้ในปริมาณสูงที่สุดในการทดลองคือ 3.8-10mg/dry cells ต่อมา Jotensen and Landfald (1997) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และ ปลา จากแหล่งอาศัยต่างๆ ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (PUFA) นี้ประมาณ 4-75 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ นั้น ทำการคัดแยกเชื้อได้จากหอยสองฝา คือ *Chlamys islandica* ซึ่งสามารถผลิตกรดไขมันจำเป็นชนิด EPA ได้17 สายพันธุ์ และสามารถผลิตกรดไขมันจำเป็นชนิด docosahexaenoic acid (DHA) ได้ 13 สายพันธุ์ คัดแยกได้จาก *Astarte* sp. ซึ่งสามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA 7 สายพันธุ์ และ สามารถผลิตกรดไขมันชนิด DHA ได้ 5 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่ได้จากการคัดแยกในกลุ่มของ Amphipod คือ *Gammarus wilkitzkii* ซึ่งสามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ 3 สายพันธุ์ และ สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันชนิด DHA ได้ 10 สายพันธุ์ Nichols (2003) ได้ศึกษาแหล่งที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากใต้ทะเล โดยพบว่าแหล่งที่สามารถพบเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดไขมันนี้ได้นั้น ได้จากตะกอนดิน ก้อนน้ำแข็ง รวมไปถึงสัตว์ที่อาศัยอยู่ใต้ท้องทะเลอีกด้วย โดยมีการแยกกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) และ แบคทีเรียที่ต้องการเกลือจากน้ำทะเลในการเจริญ (halophilic) ตาราง 2.8 นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้เช่นกัน ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้เมื่ออยู่ในภายใต้แรงดันที่สูงมากกว่า 1 atm (barophilic) พบในทะเลลึกจากการคัดแยกได้จากตะกอนดิน (Delong *et al.* 1997)

**ตารางที่ 2.8** แหล่งที่มาของการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

| Species | Psychrophilic | Halophilic | PUFA | Environment source |
|---|---|---|---|---|
| Shewanella | | | | |
| *S. benthica* | + | + | + | Holourithan intestine |
| *S. frigidimarina* | -/+ | - | + | Sea ice, Antarctica |
| *S. gelidimarina* | + | + | + | Sea ice, Antarctica |
| *S. hanedai* | + | + | + | Sediment, Arctic |
| *S. japonica* | -/+ | - | + | Sediment, mussels |
| *S. oneidensis* | - | - | + | Squid gland |
| *S. violacea* | + | + | + | Deep-sea |
| Colwellia | | | | |
| *C. demingiae* | + | + | + | Sea ice, Antarctica |
| *C. hornerae* | + | + | + | Sea ice, Antarctica |
| *C. maris* | + | + | + | Sea water, Japan |
| *C. psychroerythraca* | + | + | + | Flouder eggs |
| *C. psychrotropica* | + | + | + | Burton |
| *C. rossensis* | + | + | + | Lake,Antarctica |
| Moritella | | | | Sea ice, Antarctica |
| *M. japonica* | + | + | + | Deep-sea |
| *M. marina* | + | + | + | Sea water |
| *M. viscosus* | + | + | nd | Fish |

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Nichols (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.8 (ต่อ)** แหล่งที่มาของการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

| Species | Psychrophilic | Halophilic | PUFA | Environment source |
|---|---|---|---|---|
| *M. vasanoii* | + | + | + | Deep-sea |
| Psychromonas | | | | |
| *P. antarcticus* | + | + | nd | Sea ice, Antarctica |
| *P. kaikoae* | + | + | + | Deep-sea |
| *P. marina* | + | + | + | Seawater |
| Psychroflexus | | | | |
| *Ps. Gondwanense* | - | - | - | Burton Lake, Antarctica |
| *Ps. Toquis* | + | + | + | Sea ice, Antarctica |
| Photobacterium | | | | |
| *Pb. Profundum* | + | + | + | Deep-sea |

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Nichols (2003)

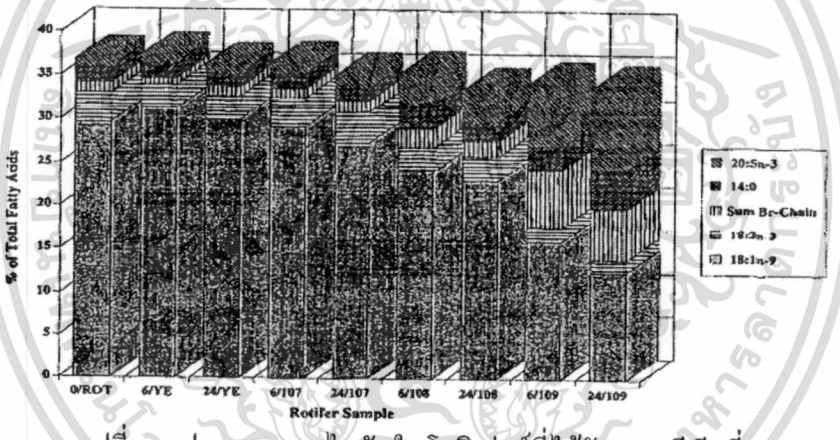
## 2.11 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในฟาร์มนิยมใช้อาหารธรรมชาติเพื่ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากอาหารธรรมชาติหรืออาหารมีชีวิตมีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนี้อาหารในธรรมชาติยังมีสารซึ่งช่วยในการป้องกันโรค ซึ่งปลาไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ตามธรรมชาติ (นฤมล อัศวเกศมณี. 2549) สารธรรมชาติเหล่านี้เมื่อลูกปลาได้รับจึงเปรียบเสมือนเป็นตัวที่จะเสริมให้มีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น โดยตัวอย่างอาหารธรรมชาติ นั้นเช่น กลุ่มแบคทีเรียและโปรโตซัว อาร์ทีเมีย โรติเฟอร์ ไรแดง คลอเรลลา เป็นต้น การนำมาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนได้เริ่มมีการศึกษากันมากขึ้น เนื่องจากในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้แก่สัตว์น้ำในวัยอ่อนด้วยสาหร่าย ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวสูงนี้ ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงค่อนข้างยุ่งยาก และมีปัจจัยหลายๆอย่างที่ต้องมีการควบคุมและได้รับการจัดการที่ดีพอ เช่น การให้แสงสว่างที่เพียงพอ การให้ออกซิเจนแก่สาหร่าย Nichols *et al.* (1996) จึงได้ทำการทดลองโดยการนำเชื้อ Antarctic bacterium ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้ มาเป็นอาหารแก่โรติเฟอร์ จากผลการทดลองพบว่า จะสามารถเพิ่มปริมาณของกรดไขมันชนิด EPA ในตัวโรติเฟอร์ได้ เมื่อโรติเฟอร์ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูง แสดงในภาพที่ 2.6 จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า หากมีการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้มาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยง โดยการนำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA และ DHA มาใช้ร่วมกับอาหารธรรมชาติของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์น้ำวัยอ่อนจะเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่สัตว์ทะเล ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง นอกจากนี้หากมีการพบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง แล้วอาจพบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกอีกด้วย (Nichols *et al.* 1996) ซึ่งในปัจจุบันแบคทีเรียถูกนำมาใช้มากขึ้นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยการเติมลงในน้ำหรือการเติมผ่านอาหารมีชีวิต เช่น อาร์ทีเมียและโรติเฟอร์ เนื่องจากอาร์ทีเมียมีการกินอาหารแบบการกรองและไม่เลือกอาหาร (Gomez-Gil *et al.* 2000)

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2536) กล่าวว่า อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลามีผลโดยตรงต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อเยื่อปลา เพราะปลาจะนำกรดไขมันในอาหารไปใช้ หรือสะสมในเนื้อเยื่อ ปลาที่กินอาหารที่มีกรดไขมันกลุ่ม n 3 เป็นองค์ประกอบอยู่มากก็จะมีกรดไขมันกลุ่ม n 3 เป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับปลาที่กินอาหารที่มีกรดไขมันกลุ่ม n 6 เป็นองค์ประกอบ ก็จะมีกรดไขมันกลุ่ม n 6 ในเนื้อเยื่อ ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันในอาหารแต่ละชนิดที่ปลากินเข้าไปจะมีความแตกต่างกัน เช่น แพลงก์ตอนพืช ไดอะตอม สาหร่ายสีเขียว แบคทีเรีย และแพลงก์ตอนสัตว์




**ภาพที่ 2.6** อัตราการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันในโรติเฟอร์ที่ได้รับแบคทีเรียที่ระยะเวลาต่างๆ
**ที่มา:** Nichols *et al.* (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 ตัวอย่างปลา

ระบบทางเดินอาหารของปลาทะเลชนิดต่างๆ จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ได้แก่

1. ปลากดทะเล จำนวน 12 ตัว
2. ปลาทู จำนวน 10 ตัว
3. ปลาทรายแดง จำนวน 12 ตัว
4. ปลากระบอก จำนวน 11 ตัว

## 3.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้ง

ได้จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แสดงในตาราง 3.1

## 3.3 อุปกรณ์และสารเคมี

3.3.1 อุปกรณ์

3.3.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ยี่ห้อ Astech รุ่น ABS 1200 A

3.3.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Helton รุ่น Universal 16 R

3.3.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Mikro รุ่น 200R

3.3.1.4 เครื่องเขย่า (shaking incubator) ยี่ห้อ LMS scientific รุ่น vs-8480 SF

3.3.1.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50

3.3.1.6 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter teledo รุ่น PB 1502-5

3.3.1.7 เตาไมโครเวฟ ยี่ห้อ Turbora รุ่น TRX-2590

3.3.1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น Genysis 10 Vis.

3.3.1.9 ตู้แช่แข็ง ยี่ห้อ Mitsubishi รุ่น MR-F36E-GY

3.3.1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB-14

3.3.1.11 กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพดิจิตอล ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX 51

3.3.1.12 ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ SANYO รุ่น MIR-262

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.13 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ ยี่ห้อ SANYO

3.3.1.14 ตู้อบฆ่าเชื้อ ยี่ห้อ MMM รุ่น Verticell

3.3.1.15 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ Ultra Basic รุ่น UB-10

3.3.1.16 hot plate ยี่ห้อ E.G.O.

3.3.1.17 anaerobic jar

3.3.1.18 vortex mixer

3.3.1.19 micropipette

3.3.1.20 เครื่องแก้ว

3.3.1.21 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon

3.3.1.22 เครื่อง GAS CHROMATOGRAPH (GC) รุ่น PR2100 บริษัท Perichrom

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 Man Rogosa and Sharpe agar (MRS) (Merck)

3.3.2.1 Man Rogosa and Sharpe broth (MRS) (Merck)

3.3.2.3 Agar powder (Difco)

3.3.2.4 Yeast extract (Merck)

3.3.2.5 Tryptic soy agar + 0.5% Yeast extract (TSAYE)

3.3.2.6 Tryptic soy broth + 0.5% Yeast eatract (TSBYE)

3.3.2.7 Nutrient agar

3.3.2.8 Nutrient broth

3.3.3 สารเคมี

3.3.3.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.3.3.2 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCo_3$)

3.3.3.3 กลีเซอรอล (Glycerol)

3.3.3.4 milk agar (Difco)

3.3.3.5 starch agar (Difco)

3.3.3.6 tributyrin (Fluka)

3.3.3.7 bile salt (Himedia)

3.3.3.8 pepsin

3.3.3.9 pancreatin

3.3.3.10 ซัลฟิวริก แอซิด ($H_2SO_4$)

3.3.3.11 แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.12 สีย้อมสำหรับย้อมแกรม

3.3.3.13 ชุดจำแนกชนิดแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CH (BioMeriux)

3.3.3.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.3.3.15 โบรอนไตรฟลูออไรด์ ($BF_3$)

3.3.4 ยาปฏิชีวนะ

3.3.4.1 Ampicillins 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.2 Chloramphenicol 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.3 Cephalothin 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.5 Erythomycin 15 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.6 Gentamycin 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.7 Kanamycin 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.8 Naldixic acid 30 ไมโคกรัมต่อแผ่น

3.3.4.9 Neomycin 30 ไมโคกรัมต่อแผ่น

3.3.4.10 Nitrofurantion 300 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.11 Norfloxacin 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.12 Novabicin 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.13 Oxolinic acid 2 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.14 Tetracyclin 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.15 Sulfamethoxazole / trimethoprim 25 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.3.4.16 Oxytetracyclin 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.1** ชนิดเชื้อแบคทีเรียทดสอบและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

| Indicator strains | Media | Temperature (°C) | Condition |
|---|---|---|---|
| **Lactic acid bacteria group** | | | |
| *Lactobacillus sakei* TISTR 890 | MRS | 37 | Anaerobic |
| *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$ | MRS | 30 | Anaerobic |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124$^{T}$ | MRS | 30 | Anaerobic |
| *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942 | MRS | 30 | Anaerobic |
| *Leuconostoc cremoris* | MRS | 30 | Anaerobic |
| *Lactobacillus plantarum* TISTR 8104 | MRS | 30 | Anaerobic |
| *Enterococcus faecalis* TISTR 888 | MRS | 37 | Anaerobic |
| *Enterococcus faecalis* JCM 5803$^{T}$ | MRS | 37 | Anaerobic |
| **Other gram positive bacteria group** | | | |
| *Bacillus coagulans* TISTR 1447 | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| *Brochotrix campeatris* NBRC 11547$^{T}$ | TSB-YE | 26 | Aerobic |
| *Staphylococcus aureus* TISTR 118 | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| **Other gram negative bacteria group** | | | |
| *Salmonella typhimurium* | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| *Streptococcus sp.* TISTR 1030 | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| *Escherichia coli* JCM 109 | TSB-YE | 27 | Aerobic |
| *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693$^{T}$ | TSB-YE | 26 | Aerobic |
| *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 | TSB-YE | 26 | Aerobic |
| *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 | NB | 30 | Aerobic |

JCM = Japanese culture of Microroganism, Wako, Japan

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

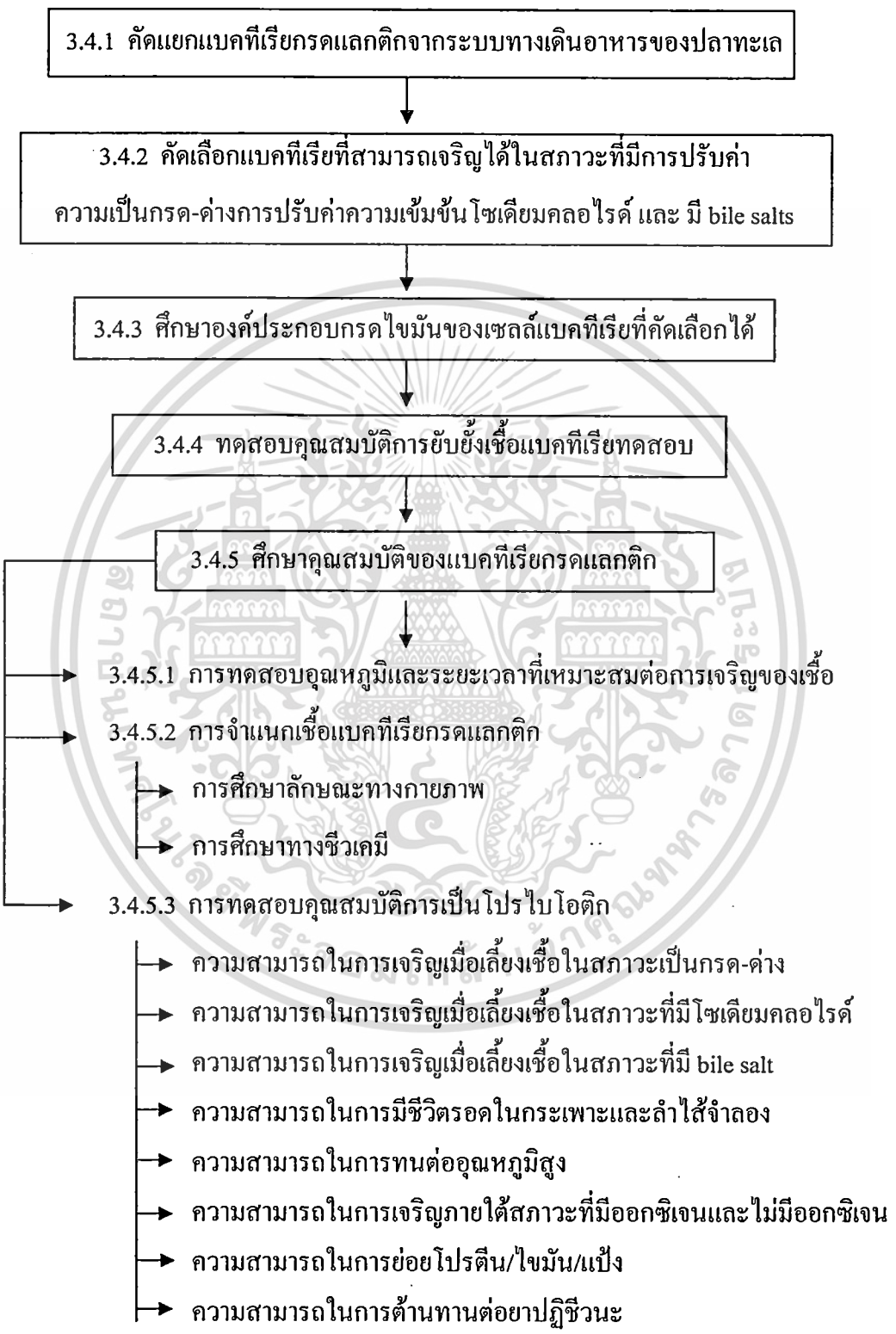
TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

TSB-YE= Tryptic soy broth (Himedia, India) + 0.5% Yeast extract (Merck, Germany)

NB = Nutrient broth MRS = De Man Rogosa and Sharpe (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.4 วิธีดำเนินการทดลอง




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหาร**

นำตัวอย่างระบบทางเดินอาหารของปลาทะเลชนิดต่างๆ โดยนำของเหลวที่อยู่ในกระเพาะอาหารน้ำหนัก 1 กรัม มาทำการเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับความเจือจาง $10^{-1}$ จากนั้นดูดเชื้อจากหลอดขั้นต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดถัดไปซึ่งมีตัวเจือจางอยู่ 9 มิลลิลิตร จะได้เป็นระดับความเจือจางที่ $10^{-2}$ ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนได้ระดับความเจือจางที่ $10^{-6}$ จากนั้นดูดสารละลายในแต่ละระดับความเจือจาง 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงในจานเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกเบื้องต้น ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อ นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (แบบไม่ใช้อากาศ) ตรวจนับเชื้อบนจานเพาะเชื้อ เลือกนับจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบๆโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเป็น stock culture โดยใส่กรีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร รวมกับแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับในการศึกษาครั้งต่อไป

**3.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก**

นำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 2-10, อาหาร MRS ที่มีการปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร MRS ที่มีการเติม bile salts ที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของเชื้อ และคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้เพื่อทำการศึกษาต่อไป

**3.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของเชื้อแบคทีเรีย**

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้เลี้ยงลงบนอาหารเหลว MRS เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยถ่ายเชื้อจาก stock culture 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อล้างเซลล์ ประมาณ 2-3 ครั้ง เก็บเกี่ยวเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) โดยใช้ตัวอย่างแห้งสกัด 0.1 กรัม สกัดด้วย chloroform/methanol 2:1 การวิเคราะห์กรดไขมัน (FAME) ใช้สารละลาย NaOH 0.5 N ใน MeOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Borontrifuoride ($BF_3$) 10 เปอร์เซ็นต์ ใน methanol ละลาย FAME ด้วย hexane 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดย Condition เครื่อง GC ที่ใช้วิเคราะห์ มีดังนี้

Capillary column BPX-70 : (ขนาด 120 m x 0.25 mm ; film thickness 0.25 mm)

Oven temperature : step temperature 60-220 องศาเซลเซียส

FID Detector temperature : 260 องศาเซลเซียส

Injector temperature : 240 องศาเซลเซียส

Carrier gas : He

Flow rate carrier gas : 230 kPa

**3.4.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายของแบคทีเรียกรดแลกติก**

การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย โดยวิธี direct method นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้มาปลูกเชื้อแบบจุด (spot inoculate) บนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเตรียมเชื้อทดสอบลงบนอาหารเหลว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งหลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงบนจานเพาะเชื้อเป้าหมายที่เตรียมไว้ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว แล้วนำไปบ่มตามอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด (ตารางที่ 3.1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียกรดแลกติก สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ พร้อมวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

**3.4.5 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติก**

**3.4.5.1 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ**

การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ดัดแปลงจาก Rumjuankiat *et al.* (2553) โดยการนำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยวิธีการ spread plate

**3.4.5.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก**

(1) การศึกษาลักษณะทางกายภาพ โดยการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาทดสอบ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1.1) การตรวจการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย saflanin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วจึงนำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะ รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(1.2) การทดสอบคะตะเลส

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยวิธีการของ Collins *et al.* (1998) หยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและแห้ง ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ผสมให้เข้ากัน ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

(1.3) การทดสอบการเคลื่อนที่

การทดสอบการเคลื่อนที่ โดยวิธีการของ Collins *et al.* (1998) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS แล้ว stab บนอาหาร motility test จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าเจริญไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่ามีความสามารถในการเคลื่อนที่

(1.4) การทดสอบการสร้างก๊าซ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS โดยใส่หลอดดักก๊าซ (Durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

(1.5) การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ โดยวิธีการของ Salminen and Wrigth (1993) โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญทุก 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นตัวปรับค่าศูนย์

(1.6) การทดสอบการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 4.4 และ 9.6

การทดสอบการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 4.4 และ 9.6 โดยวิธีการของ Salminen and Wrigth (1993) โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH เป็น 4.4 และ 9.6 ด้วย 1N NaOH นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24 และ 48 ชั่วโมง โดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH เป็น 4.4 และ 9.6 เป็นตัวปรับค่าศูนย์ ตามลำดับ

(1.7) การทดสอบการทนเกลือ

การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ โดยวิธีการของ Salminen and Wrigth (1993) โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญทุก 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นตัวปรับค่าศูนย์ ตามลำดับ

(2) การศึกษาทางชีวเคมี

การศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลกติกที่วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันและมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติกด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อเขี่ยโคโลนีจำนวน 3-5 โคโลนีลงในหลอดน้ำกลั่น เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยให้มีความขุ่นเทียบกับ 2McFarland จากนั้นถ่ายเชื้อจากสารแขวนลอยลงในหลอดอาหารของ API 50 CH medium เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมชุดทดสอบโดยเรียงชุดทดสอบลงบนถาด ดูด API 50 CH medium ที่มีเชื้ออยู่ ใส่ลงไปในชุดทดสอบทุกช่อง เมื่อดูดอาหารใส่ในช่องทุกช่องแล้ว ให้เททับด้วยน้ำมันพาราฟิน จากนั้นนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากการบ่มที่ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม api*web*™ stand alone V 1.2.1 (Biomerieux, France) โดยอ่านผลบวกจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงน้ำเงินเป็นเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 ซึ่งเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นดำ แสดงว่าผลเป็นบวก ถ้าอาหารเป็นสีม่วงน้ำเงิน แสดงว่าผลเป็นลบ หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรือ อ่านผลไม่ชัดเจน ให้ใส่เครื่องหมายคำถาม

**3.4.5.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก**

(1) ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด-ด่าง

การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด-ด่าง ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.*(1999) โดยนำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml)

(2) ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์

การทดสอบความในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยนำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml)

(3) ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์

การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ดัดแปลงจาก Hyronimus *et al.* (2000) โดยนำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับความเข้มข้นของน้ำดีสังเคราะห์เป็น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml)

(4) ความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลองดัดแปลงจาก Zarate *et al.* (2000) ถ่ายเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นละลายเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์แล้วใส่สารละลายลงในน้ำย่อยสังเคราะห์ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count เชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์จะนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 90 และ 180 นาที หลังจากผ่านไป 180 นาที ในกระเพาะจำลอง นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเชื้อตกตะกอนให้เทน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง แล้วนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ไปละลายลงในของเหลวลำไส้จำลอง ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 90 และ 180 นาที แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด สามารถคำนวณได้โดย

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด = ปริมาณเชื้อรอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ 0, 90 และ 180 นาที (Log CFU/ml) x 100 / ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log CFU/ml)

(5) ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง นำเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที วัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยวิธี standard plate count แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด สามารถคำนวณได้โดย

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด = ปริมาณเชื้อรอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที (Log CFU/ml) x 100 / ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log CFU/ml)

(6) ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ดัดแปลงจาก Toit (1998) โดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 หลอด โดยแบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็นการบ่มแบบไม่ใช้อากาศโดยใส่ลงใน anaerobic jar และ ชุดที่ 2 บ่มแบบใช้อากาศ ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 2 สภาวะ

(7) ความสามารถในการย่อยโปรตีน

การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน โดยวิธีการของ Michale and Pelezar (1995) โดยเลี้ยงเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยวิธีการ streak plate ลงบนอาหารแข็ง milk agar ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วตรวจผลถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี

(8) ความสามารถในการย่อยไขมัน

การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมัน โดยวิธีการของ Michale and Pelezar (1995) โดยเลี้ยงเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมงจากนั้นเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติม tributyrin 1 เปอร์เซ็นต์ ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วตรวจผลถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนี

(9) ความสามารถในการย่อยแป้ง

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยวิธีการของ Michale and Pelezar (1995) โดยเลี้ยงเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมงจากนั้นเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการ streak plate ลงบนอาหาร starch agar ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นบ่มเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้งโดยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

(10) ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธีการของ Quinn *et al.* (1994) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน ทำการ swab เชื้อด้วยไม้ที่ส่วนปลายพันด้วยสำลีปลอดเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำแผ่นยาปฏิชีวนะวางไว้ด้านบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสแล้วเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน แสดงผลเป็น susceptible (S), intermediate (I) หรือ resistant (R)

## 3.6 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.7 ระยะเวลาดำเนินงาน

ใช้ระยะเวลาการดำเนินงาน 1ปี 8 เดือน เริ่มการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 55 – เดือนกันยายน 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

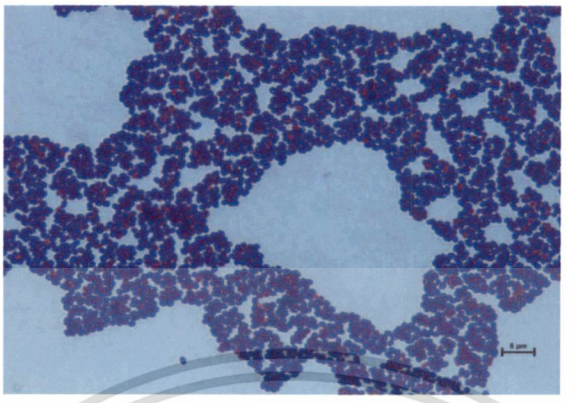
## 4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล

การนำตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาทะเล ได้แก่ ปลากดทะเล (*Arius maculates*) ปลาทรายแดง (*Nemipterus hexodon*) ปลาทู (*Rastrelliger brachysoma*) และ ปลากระบอก (*Mugil sunviridis*) จำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท (ตารางภาคผนวกที่ 1) เมื่อทำการทดสอบคุณสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น โดยการคัดเลือกไอโซเลทที่มีคุณสมบัติต่อการทนต่อสภาวะที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์และสภาวะที่มี bile salts ได้ดีในระดับหนึ่ง พบว่า มี 5 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ ไอโซเลท Ba1 และBa9 จากปลากดทะเล ไอโซเลท Tb11 จากปลาทรายแดง, ไอโซเลท Ma9 จากปลาทู และ ไอโซเลท Mu7 จากปลากระบอก จากการตรวจการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า เซลล์ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไอโซเลท Tb11 และ Ma9 มีรูปร่างกลม ส่วนไอโซเลท Ba1, Ba9 และ Mu7 มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น โดยไอโซเลทที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.1

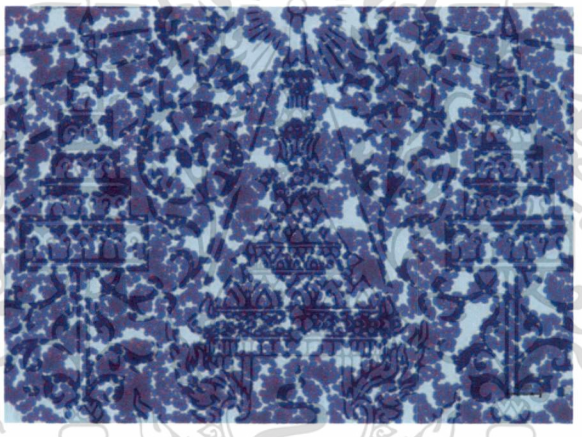
**ตารางที่ 4.1** จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลาทะเลชนิดต่างๆ

| ชนิดปลา | จำนวนตัวอย่าง | จำนวนไอโซเลท |
|---|---|---|
| ปลากดทะเล (Ba) | 11 | 35 |
| ปลาทรายแดง (Tb) | 12 | 30 |
| ปลาทู (Ma) | 10 | 11 |
| ปลากระบอก (Mu) | 12 | 24 |
| **รวม** | **45** | **100** |

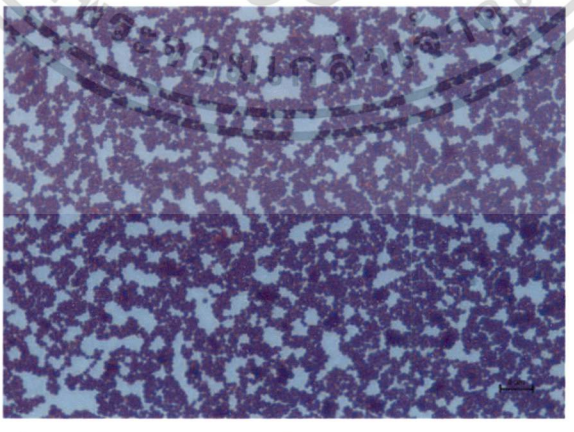
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 4.1** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Ba1 กำลังขยาย 100X

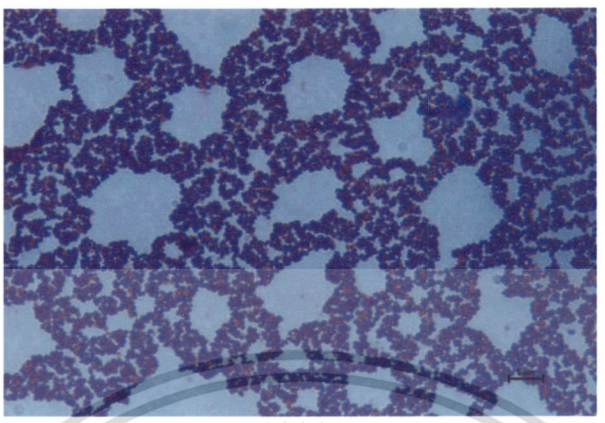


**ภาพที่ 4.2** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Ba9 กำลังขยาย 100X

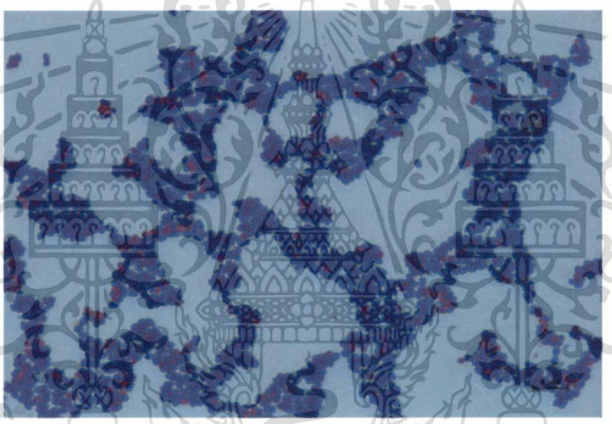


**ภาพที่ 4.3** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 กำลังขยาย 100X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 4.4** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Ma9 กำลังขยาย 100X



**ภาพที่ 4.5** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Mu7 กำลังขยาย 100X

## 4.2 องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น ได้แก่ ไอโซเลท Ba1, Ba9, Tb11, Ma9 และ Mu7 ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 4.2 โดยพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Ba1 สามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ 0.0071 mg/g DHA 0.0306 mg/g, ไอโซเลท Ba9 ผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ 0.0055 mg/g DHA 0.0221 mg/g, ไอโซเลท Tb11 ผลิตกรดไขมันชนิด EPAได้ 0.0074 mg/g DHA 0.0217 mg/g, ไอโซเลท Ma9 ผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ 0.0113 mg/g DHA 0.0248 mg/g และ ไอโซเลท Mu7 ผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ 0.0076 mg/g DHA 0.0331 mg/g โดยกรดไขมัน oleic เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบได้สูงสุดในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** องค์ประกอบกรดไขมันของแบคทีเรียกรดแลกติก

| | | Fatty acid (mg/g) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fatty acid | Ma9 | Mu7 | Ba1 | Ba9 | Tb11 |
| C8 | Caprylic acid | 0.0027 | 0.0031 | 0.0015 | 0.0020 | 0.0022 |
| C10 | Capric acid | 0.0061 | 0.0064 | 0.0073 | 0.0105 | 0.0071 |
| C11 | Undecanoic acid | 0.0025 | 0.0033 | 0.0010 | 0.0009 | 0.0014 |
| C12 | Lauric acid | 0.0324 | 0.0295 | 0.0667 | 0.0420 | 0.0543 |
| C13 | Tridecanoic acid | 0.0044 | 0.0039 | 0.0033 | 0.0025 | 0.0028 |
| C14:0 | Myristic acid | 0.1055 | 0.0939 | 0.1995 | 0.1899 | 0.6096 |
| C14:1 | Mysistoleic acid | 0.0114 | 0.0095 | 0.0075 | 0.0047 | 0.0056 |
| C15:0 | Pentadecanoic acid | 0.0223 | 0.0188 | 0.0323 | 0.0260 | 0.0313 |
| C15:1 | *cis* -10-Pentadecenoic acid | 0.0056 | 0.0033 | 0.0105 | 0.0153 | 0.0145 |
| C16:0 | Palmitic acid | 0.9327 | 0.7332 | 1.9973 | 1.1990 | 2.7142 |
| C16:1 | Palmitoleic acid | 0.0810 | 0.0729 | 0.1733 | 0.0947 | 0.0908 |
| C17:0 | Heptadecanoic acid | 0.0326 | 0.0292 | 0.0758 | 0.0298 | 0.0383 |
| C18:0 | Steric acid | 0.2202 | 0.1955 | 0.4566 | 0.2301 | 0.4058 |
| C18:1n9t | Elaidic acid | 0.0190 | 0.0171 | 0.0982 | 0.2587 | 0.3031 |
| C18:1n9c | Oleic acid | 0.4555 | 0.2981 | 0.9623 | 0.2787 | 1.0219 |
| C18:2n6t | Linolelaidic acid | 0.1592 | 0.0043 | 0.0184 | 0.0106 | 0.0084 |
| C18:2n6c | Linoleic acid | 0.0294 | 0.0341 | 0.0973 | 0.0346 | 0.0671 |
| C18:3n6 | γ-Linolenic acid | 0.0089 | 0.0046 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| C18:3n3 | Linolenic acid | 0.0060 | 0.0045 | 0.0121 | 0.0069 | 0.0028 |
| C20:0 | Arachidic acid | 0.0308 | 0.0300 | 0.0302 | 0.0234 | 0.0387 |
| C20:2 | *cis*-11,14-Eicosadienoic acid | 0.0089 | 0.0101 | 0.0126 | 0.0163 | 0.0511 |
| C21:0 | Heneicosanoic acid | 0.0056 | 0.0073 | 0.0064 | 0.0053 | 0.0058 |
| C20:3n6 | *cis*-8,11,14-Eicosatrienoic acid | 0.0064 | 0.0060 | 0.0015 | 0.0033 | 0.0047 |
| C20:3n3 | *cis*-11,14,17-Eicosatrienoic acid | 0.0155 | 0.0049 | 0.0046 | 0.0566 | 0.0024 |
| C20:4n6 | Arachidonic acid | 0.0040 | 0.0000 | 0.0037 | 0.0035 | 0.0040 |
| C22:0 | Behenic acid | 0.0351 | 0.0355 | 0.0334 | 0.0261 | 0.0337 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

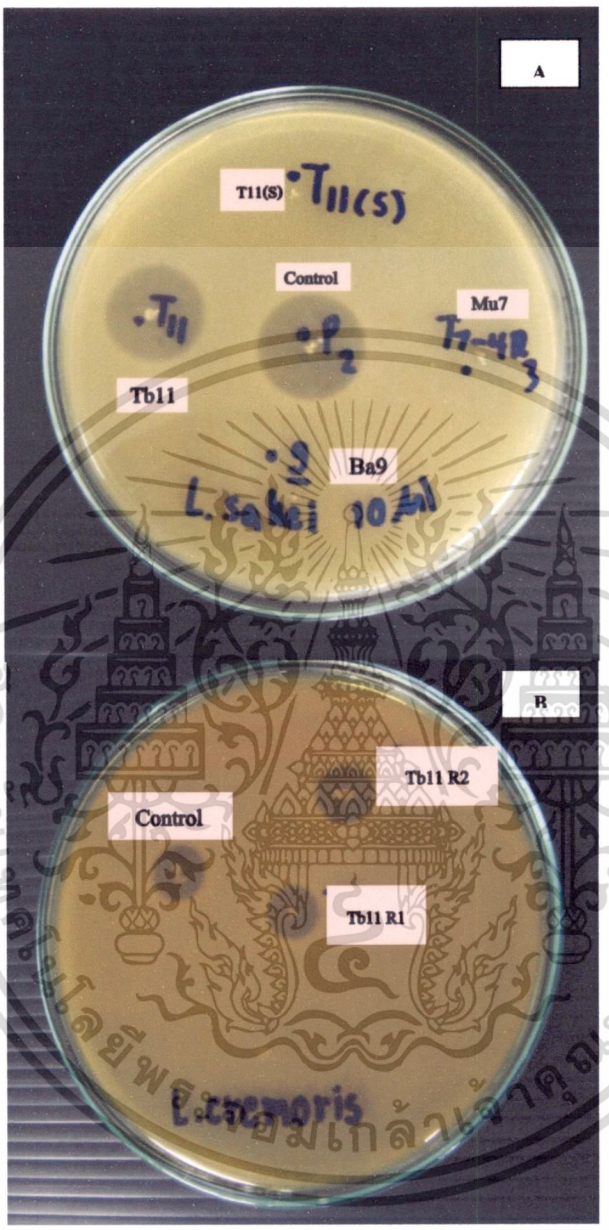
**ตารางที่ 4.2 (ต่อ)** องค์ประกอบกรดไขมันของแบคทีเรียกรดแลกติก

| | Fatty acid (mg/g) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fatty acid | Ma9 | Mu7 | Ba1 | Ba9 | Tb11 |
| C22:1n9 | Erucic acid | 0.0032 | 0.0088 | 0.0100 | 0.0287 | 0.0107 |
| C22:2 | *cis*-13,16-Docosadienoic acid | 0.0108 | 0.0175 | 0.0253 | 0.0228 | 0.0081 |
| C20:5n3 | *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA) | 0.0113 | 0.0076 | 0.0071 | 0.0055 | 0.0074 |
| C23:0 | Tricosanoic acid | 0.0068 | 0.0062 | 0.0030 | 0.0028 | 0.0035 |
| C24:0 | Lignoceric acid | 0.0206 | 0.173 | 0.0190 | 0.0154 | 0.0180 |
| C24:1 | Nervonic acid | 0.0165 | 0.0038 | 0.0032 | 0.0119 | 0.0194 |
| C22:6n3 | *cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA) | 0.0248 | 0.0331 | 0.0306 | 0.0221 | 0.0217 |

## 4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้ต่อการทนต่อความเป็นกรด-ด่าง ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ และทนต่อน้ำดีสังเคราะห์ทั้งหมด 5 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยบันทึกผลจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อทดสอบ แสดงในภาพที่ 4.6 ซึ่งในการทดสอบ เชื้อที่ใช้ในการทดสอบนั้นประกอบไปด้วยเชื้อก่อโรคและเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จากผลการทดลองพบว่า มี 3 ไอโซเลทที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลท Tb11, Ba9 และ Mu7 อย่างไรก็ตามเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติก เหล่านี้ส่วนใหญ่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบไม่คงตัว เมื่อทำการทดลองไปได้ระยะหนึ่งพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อลดลงค่อนข้างมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการทดสอบเฉพาะแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 เท่านั้น และจากการผลทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124 $^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942, *Leuconostoc cremoris, Lactobacillus plantarum* TISTR 8104, *Brochotrix campeatris* NBRC 11547$^{T}$, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693$^{T}$ และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 แสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.6** แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ที่สามารถสร้างกรดยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี direct method โดยชนิดแบคทีเรียทดสอบ คือ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$ (A) *Leuconostoc cremoris* (B), P2= Positive control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

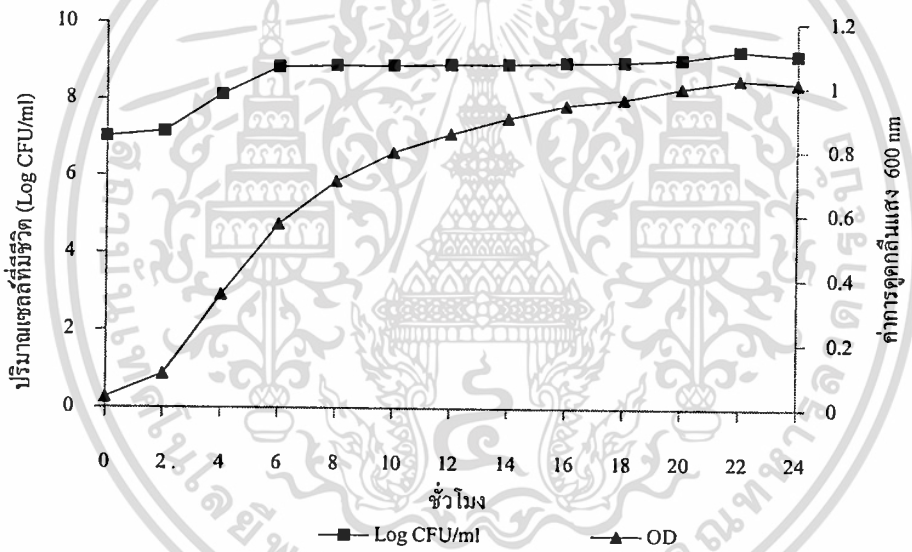
**ตารางที่ 4.3** การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11

| Indicator strains | Media | Temperature (°C) | Zone diameter (mm) |
|---|---|---|---|
| **Lactic acid bacteria group** | | | |
| *Lactobacillus sakei* TISTR 890 | MRS | 37 | 5 |
| *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^T$ | MRS | 30 | 18 |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124$^T$ | MRS | 30 | 3 |
| *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942 | MRS | 30 | 8 |
| *Leuconostoc cremoris* | MRS | 30 | 9 |
| *Lactobacillus plantarum* TISTR 8104 | MRS | 30 | 4 |
| *Enterococcus faecalis* TISTR 888 | MRS | 37 | - |
| *Enterococcus faecalis* JCM 5803$^T$ | MRS | 37 | - |
| **Other gram positive bacteria** | | | |
| *Bacillus coagulans* TISTR 1447 | TSB-YE | 37 | - |
| *Brochotrix campeatris* NBRC 11547$^T$ | TSB-YE | 26 | 2 |
| *Staphylococcus aureus* TISTR 118 | TSB-YE | 37 | - |
| **Other gram negative bacteria** | | | |
| *Salmonella typhimurium* | TSB-YE | 37 | - |
| *Streptococcus sp.* TISTR 1030 | TSB-YE | 37 | - |
| *Escherichia coli* JCM 109 | TSB-YE | 37 | - |
| *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693$^T$ | TSB-YE | 26 | 9 |
| *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 | TSB-YE | 26 | 6 |
| *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 | NB | 30 | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.4 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการสุ่มตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงและวัดการเจริญของเชื้อ ผลการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 4.7 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อระยะเวลานานขึ้นค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการนับจำนวนเชื้อพบว่า ในชั่วโมงที่ 0-2 เชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะที่เรียกว่า lag phase โดยมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 7.033-7.164 Log CFU/ml และเข้าสู่ช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 2-6 ซึ่งในระยะนี้เชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วและจะเข้าสู่ช่วงคงที่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งเป็นระยะที่อัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย โดยในชั่วโมงที่ 22 ไอโซเลท Tb11 มีค่าการเจริญสูงที่สุด ซึ่งมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 9.281 Log CFU/ml และเข้าสู่ระยะ death phase ในชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป

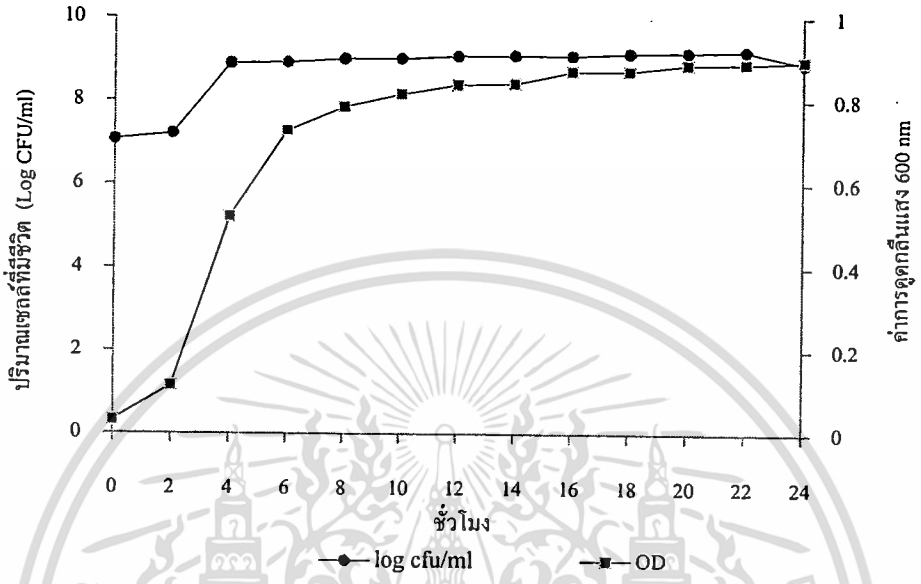



**ภาพที่ 4.7** การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างวัดค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วงเวลาพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลานานขึ้น (ภาพที่ 4.8) และจากการนับจำนวนเชื้อพบว่า ในชั่วโมง 0-2 เป็นช่วงที่แบคทีเรียอยู่ในระยะ lag phase โดยมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 7.064-7.204 Log CFU/ml และจะเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 2-6 ซึ่งในระยะนี้เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยมีปริมาณเชื้อสูงขึ้นถึง 8.926 Log CFU/ml จากนั้นจะเข้าสู่ระยะคงที่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 6 เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นไป โดยในชั่วโมงที่ 22 ไอโซเลท Tb11 มีค่าการเจริญสูงที่สุด ซึ่งมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 9.202 Log CFU/ml และจะเข้าสู่ระยะ death phase ในชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป




**ภาพที่ 4.8** การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท Tb11 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มากกว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 ผลการทดลองพบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียของทั้งอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณลดลง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียเริ่มมีการตาย จากผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราการมีชีวิตรอดมากกว่า โดยมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 9.174 Log CFU/ml ในขณะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 8.897 Log CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

### 4.5.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ โดยศึกษาการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ การเคลื่อนที่ การเกิดปฏิกิริยาคะตะเลส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่างๆและความสามารถในการทนเกลือ แสดงในตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** ลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11

| การทดสอบ | ผลการทดสอบ |
|---|---|
| การติดสีแกรม | บวก |
| การเกิดคะตะเลส | ไม่เกิดคะตะเลส |
| รูปร่าง | กลม |
| การเคลื่อนที่ | ไม่เกิดการเคลื่อนที่ |
| การสร้างก๊าซ | homofermentative |
| อุณหภูมิที่เจริญเติบโต | |
| 10 องศาเซลเซียส | + |
| 37 องศาเซลเซียส | + |
| 45 องศาเซลเซียส | - |
| ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ | |
| 6.5 เปอร์เซ็นต์ | + |
| 18 เปอร์เซ็นต์ | + |
| ค่าความเป็นกรดและด่าง | |
| 4.5 | + |
| 9.6 | + |

หมายเหตุ + มีการเจริญเติบโต - ไม่มีการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.5.2 การศึกษาทางชีวเคมี**

การศึกษาทางชีวเคมีเป็นการตรวจสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CH เมื่ออ่านผลที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด และนำไปประมวลผลผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป พบว่าไอโซเลท Tb11 ถูกจัดจำแนกเป็น *Lactococcus lactis* ssp lactis1 ที่ระดับความถูกต้อง (% identification) 99.8 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11

| | คาร์โบไฮเดรต | Tb11 |
|---|---|---|
| 0 | Control | - |
| 1 | Glycerol | - |
| 2 | Erythritol | - |
| 3 | D-arabinose | - |
| 4 | L-arabinose | + |
| 5 | D-ribose | + |
| 6 | D-xylose | + |
| 7 | L-xylose | - |
| 8 | D-adonitol | - |
| 9 | Methyl-βD-xylopyranoside | - |
| 10 | D-galactose | + |
| 11 | D-glucose | + |
| 12 | D-fructose | + |
| 13 | D-mannose | + |
| 14 | L-sorbose | - |
| 15 | L-rhamnose | - |
| 16 | Dulcitol | - |
| 17 | Inositol | - |
| 18 | D-mannitol | + |

+ ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้, - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้, ? ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.5 (ต่อ)** ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11

| | คาร์โบไฮเดรต | Tb11 |
|---|---|---|
| 19 | D-sorbitol | - |
| 20 | Methyl-αD-mannopyranoside | - |
| 21 | Methyl-αD-glucopyranoside | - |
| 22 | N-acetylglucosamine | + |
| 23 | Amygdalin | + |
| 24 | Arbutin | + |
| 25 | Esculin | + |
| 26 | Salicin | + |
| 27 | Cellubiose | + |
| 28 | Maltose | + |
| 29 | Lactose | + |
| 30 | Melibiose | - |
| 31 | Sucrose | + |
| 32 | Trehalose | + |
| 33 | Inulin | - |
| 34 | Melezitose | - |
| 35 | Raffinose | - |
| 36 | Starch | + |
| 37 | Glycogen | - |
| 38 | Xylitol | - |
| 39 | Gentiobiose | + |
| 40 | D-turanose | - |
| 41 | D-lyxose | - |
| 42 | D-tagalose | - |
| 43 | D-fucose | - |

+ ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้, - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้, ? ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.5 (ต่อ)** ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11

| | คาร์โบไฮเดรต | Tb11 |
|---|---|---|
| 44 | L-fucose | - |
| 45 | D-arabitol | - |
| 46 | L-arabitol | - |
| 47 | Gluconate | ? |
| 48 | 2-keto-gluconate | - |
| 49 | 5-keto-gluconate | - |

+ ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้, - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้, ? ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

**Very good indentification of Tb11**

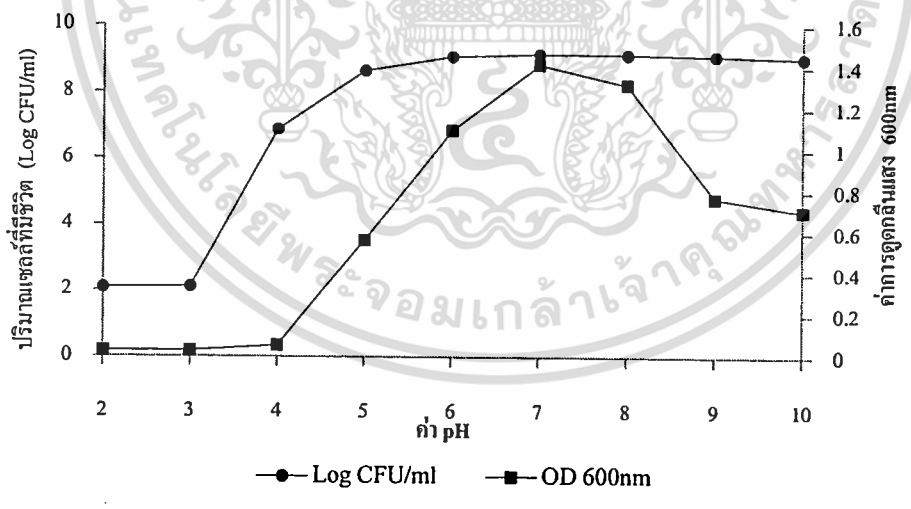
| **Significant taxa** | **%ID** | **T** | **Test against** |
|---|---|---|---|
| *Lactococcus lactis* ssp lactis1 | 99.8 | 0.86 | |
| **Next taxon** | **%ID** | **T** | **Test against** |
| *Lactococcus lactis* ssp lactis2 | 0.1 | 0.41 | LARA 4% DXYL 1% MAN 20% SAC 20% |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.6 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

### 4.6.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด-ด่าง

การนำเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tb11,ไอโซเลท Ba1, Ba9, Ma9 และ Mu7 มาเลี้ยงในสภาวะที่เป็นกรด-ด่างพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างที่ 2-10 โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 จากปลาทรายแดงสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุด จากนั้นนับจำนวนเชื้อของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ด้วยวิธีการ spread plate ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีค่าการเจริญเพิ่มมากขึ้นตามระดับของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มสูงขึ้น (ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงระหว่าง 2-7) และสามารถเจริญได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.152 Log CFU/ml และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มสูงขึ้น (8.0-10) ผลปรากฏว่าความสามารถในการเจริญลดลงตามระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มสูงขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.9 เมื่อนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด-ด่าง ในช่วงระหว่าง 2-7 ค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มสูงขึ้น ในช่วงระหว่าง 8.0-10 ผลปรากฏว่ามีแนวโน้มลดลง

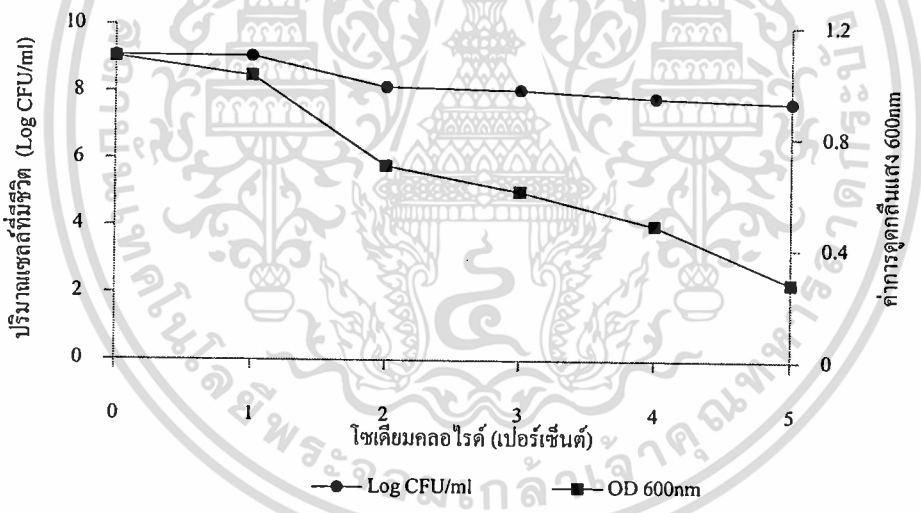



**ภาพที่ 4.9** ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการเจริญเติบโตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.6.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์**

การศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว MRS พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 เมื่อเลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ที่มีระดับความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีค่าการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 4 ไอโซเลท ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.071 Log CFU/ml ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และลดลงตามลำดับโดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 7.732 Log CFU/ml ส่วนการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีค่าการเจริญที่สูงกว่าในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.082 Log CFU/ml แสดงดังภาพที่ 4.10 เมื่อนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ ค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มลดลง แต่ในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์นั้น พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด เท่ากับ 1.085



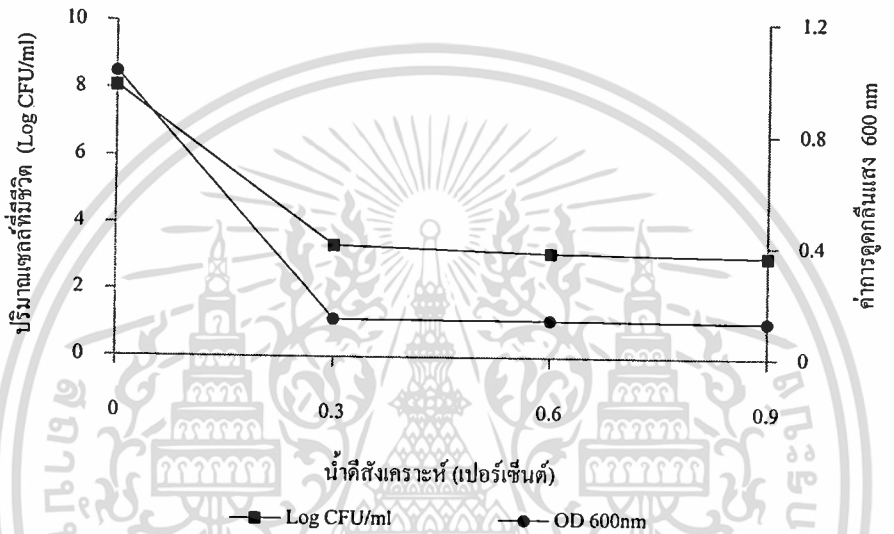

**ภาพที่ 4.10** ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

**4.6.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์**

การศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับระดับความเข้มข้นของน้ำดีสังเคราะห์ที่ระดับ 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้นได้สูงถึง 0.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.029 log CFU/ml แสดงดัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.11 ซึ่งพบว่าการเจริญจะมีค่าลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงจะมีแนวโน้มลดลง โดย *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.128



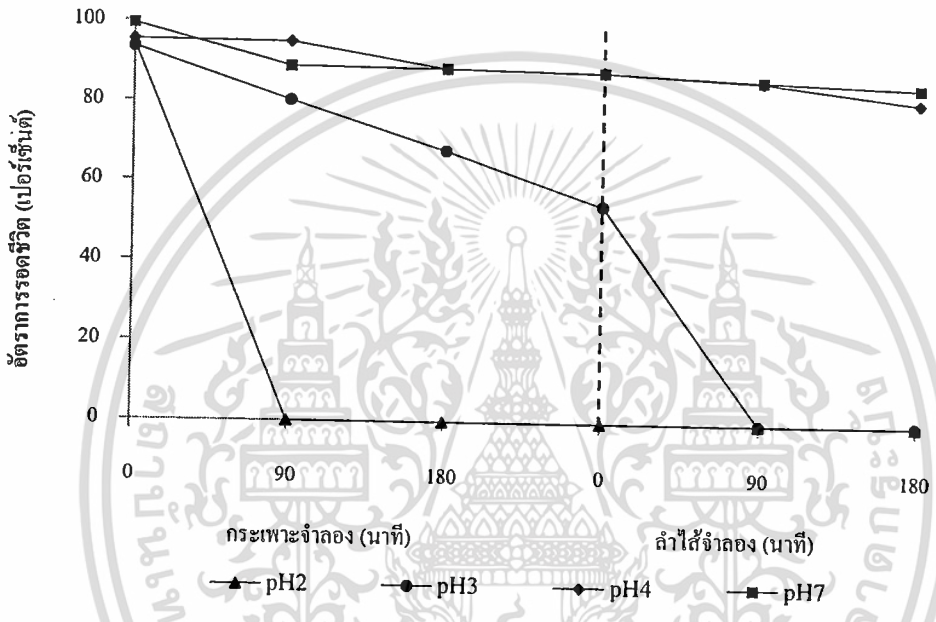

**ภาพที่ 4.11** ผลของน้ำดีสังเคราะห์ต่อการเจริญเติบโตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

### 4.6.4 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยน้ำย่อยจำลองที่ใช้ในการทดสอบมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับ 2, 3, 4 และ 7 ผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 และเมื่อทดสอบกับน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้นกว่าเดิม โดยสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลองได้นาน 180 นาที มีปริมาณเซลล์ เท่ากับ 6.590 Log CFU/ml หลังจากนั้นเมื่อผ่านไป 180 นาทีในกระเพาะจำลอง ผลปรากฏว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดลดลง จนกระทั่งไม่พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดเหลืออยู่ และเมื่อนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มาทดสอบในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 และ 7 ผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตรอดได้นานกว่าเมื่อทดสอบในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 และ 3 โดยพบว่าในน้ำย่อยจำลองที่ระดับค่าความเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด-ด่างเท่ากับ 4 *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตรอดได้ในกระเพาะจำลอง นาน 180 นาที โดยมีปริมาณเซลล์ เท่ากับ 8.296 Log CFU/ml และสามารถมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยมีปริมาณเซลล์ลดลง เท่ากับ 7.698 Log CFU/ml ส่วนในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตรอดได้ในกระเพาะจำลอง นาน 180 นาที มีปริมาณเซลล์ เท่ากับ 8.320 Log CFU/ml และในลำไส้จำลอง เมื่อเวลาผ่านไปนาน 180 นาที มีปริมาณเซลล์ลดลง เท่ากับ 8.0 Log CFU/ml



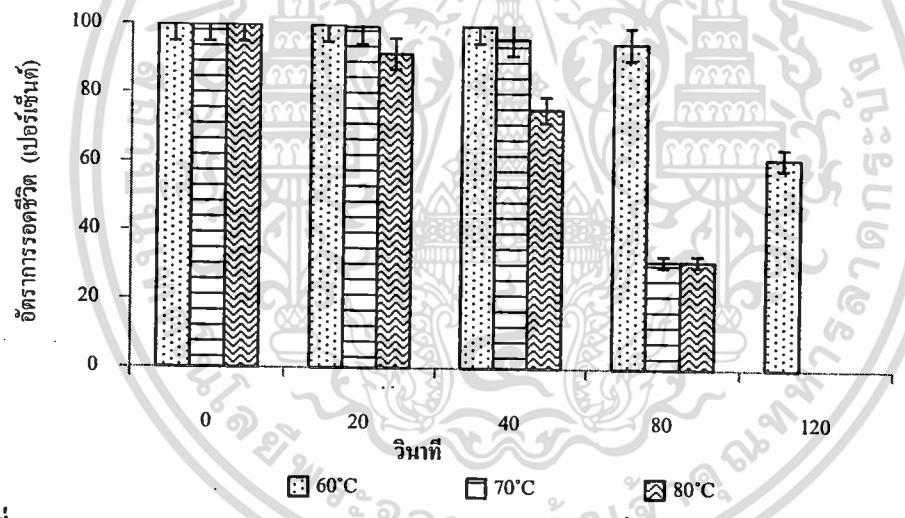

**ภาพที่ 4.12** แสดงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 เมื่อทดสอบน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 2, 3, 4 และ 7 ในกระเพาะจำลองนาน 180นาที และในลำไส้จำลองนาน 180 นาที

เมื่อนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 มากที่สุด รองลงมาคือ ในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4, 3 และ 2 ตามลำดับ โดยในลำไส้จำลองเมื่อเวลาผ่านไป180 นาที พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และ 4 มีอัตราการมีชีวิตรอด เท่ากับ 85.15 และ 81.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงในภาพที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.6.5 การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณภูมิสูง**

การศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงโดยนำเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มาทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที จากผลการทดลอง พบว่า ที่เวลา 0 วินาทีของทุกอุณหภูมิ มีอัตราการรอดชีวิต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าอุณหภูมิอื่นๆ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในช่วง 100 – 61.39 เปอร์เซ็นต์ เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่า ที่เวลา 120 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 0 โดยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดตั้งแต่วินาทีที่ 20 – 120 อยู่ในช่วง 99.26-0.00 เปอร์เซ็นต์ เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดตั้งแต่วินาทีที่ 20 – 120 อยู่ในช่วง 91.50-0.00 เปอร์เซ็นต์ เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า อัตราการรอดชีวิตจะลดน้อยลงตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.13




**ภาพที่ 4.13** อัตราการรอดชีวิตของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที

**4.6.6 การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน**

การศึกษาความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มภายใต้สภาวะ 2 สภาวะ คือ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ใน anaerobic jar และ บ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และเมื่อนำอาหารเหลว MRS ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *L. lactis* ssp. *lactis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tb11 ที่บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.053 และ เชื้อแบคทีเรีย *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ที่บ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.080 ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

**4.6.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน/ไขมัน/แป้ง**

การศึกษาความสามารถในการย่อยโปรตีน บนอาหาร milk agar การย่อยไขมัน บนอาหาร tributyrin agar และ การย่อยแป้ง บนอาหาร starch agar โดยสังเกตการเกิดบริเวณใส (clear zone) หากมีการย่อย และการทดสอบการย่อยแป้งหากมีการย่อย เมื่อหยดสารละลายไอโอดีน อาหารจะต้องไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไม่สามารถย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งได้

**4.6.8 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ**

ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ที่คัดแยกได้จากปลาทรายแดง แสดงผลในตารางที่ 4.6 พบว่า มีความสามารถในการต้านทานต่อ Gentamycin, Naldixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim แต่ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ถูกยับยั้งการเจริญด้วยยาปฏิชีวนะ Ampicillins, Chloramphenicol, Cephalothin, Erythomycin, Nitrofurantion, Novabicin, Tetracyclin และ Oxytetracyclin

**ตารางที่ 4.6** ความสามารถในการต้านทาต่อยาปฏิชีวนะของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

| Antibiotic agents | Disk content(μg) | Zone diameter | | | *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R | I | S | Zone diameter (mm) | Acceptable inhibitory |
| Ampicillins | 10 | ≤ 11 | 12-13 | ≥14 | 30 | S |
| Chloramphenicol | 30 | ≤ 12 | 13-17 | ≥18 | 30 | S |
| Cephalothin | 30 | ≤ 14 | 15-17 | ≥18 | 30 | S |
| Erythomycin | 15 | ≤ 13 | 14-22 | ≥23 | 35 | S |
| Gentamycin | 10 | ≤ 12 | 13-14 | ≥15 | 9 | R |
| Kanamycin | 30 | ≤ 13 | 14-17 | ≥18 | 14 | I |
| Naldixic acid | 30 | ≤ 3 | 14-18 | ≥19 | 0 | R |

S= Susceptible I= Intermediate R= Resistant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.6 (ต่อ)** ความสามารถในการต้านทาต่อยาปฏิชีวนะของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

| Antibiotic agents | Disk content(μg) | Zone diameter | | | *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R | I | S | Zone diameter (mm) | Acceptable inhibitory |
| Neomycin | 30 | ≤ 12 | 13-16 | ≥17 | 11 | R |
| Nitrofurantion | 300 | ≤ 14 | 15-16 | ≥17 | 27 | S |
| Norfloxacin | 10 | ≤ 17 | 18-21 | ≥22 | 13 | R |
| Novabicin | 30 | ≤ 12 | 13-16 | ≥17 | 18 | S |
| Oxolinic acid | 2 | ≤ 10 | - | ≥11 | 0 | R |
| Tetracyclin | 30 | ≤ 14 | 15-18 | ≥19 | 41 | S |
| Sulfamethoxazole/Trimethoprim | 25 | ≤ 10 | 11-15 | ≥16 | 0 | R |
| Oxytetracyclin | 30 | ≤ 14 | 15-18 | ≥19 | 40 | S |

S= Susceptible I= Intermediate R= Resistant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาทะเล ได้แก่ ปลากดทะเล ปลาทรายแดง ปลาทู และ ปลากระบอก จำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง และนำมาคัดเลือกคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นพบว่า มี 5 ไอโซเลท และมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกคือ เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และมีรูปร่างกลม 10 ไอโซเลทและรูปร่างแบบท่อนสั้น 90 ไอโซเลท Gonzalez *et al.* (2000) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากปลาน้ำจืด ซึ่งสามารถคัดแยกได้จาก เหงือก ผิวหนัง และลำไส้ของปลา จากการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ทั้งหมด 249 ไอโซเลท โดยมากพบว่าเป็นรูปร่างท่อน 237 ไอโซเลท และมีรูปร่างกลม 12 ไอโซเลท โดย Ringo and Gatesoupe (1998) รายงานว่า จะสามารถพบกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในลำไส้ของปลาที่มีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในระบบทางเดินอาหารของปลานั้นมาจากน้ำ ตะกอนดิน รวมไปถึงอาหารที่ปลาได้รับอีกด้วย (Sugita *et al.* 1997) และจะพบว่ามีแบคทีเรียกรดแลกติกอยู่เพียง 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียในระบบย่อยอาหารนี้ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร (Ringo. 1993)

## 5.2 องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ ไอโซเลท Ba1, Ba9, Tb11, Ma9 และ Mu7 ผลการทดลองพบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด oleic เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบได้ปริมาณสูงสุดในการทดลองนี้ โดยกรดไขมันกลุ่ม oleic นี้เป็นเป็นกรดไขมันในกลุ่ม n 9 ซึ่งในการสังเคราะห์จะเริ่มต้นจาก 18:1 n 9 จากนั้น จะถูกสังเคราะห์เป็น 20:1 n 9 และ 22:1 n 9 และแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ระหว่าง 0.0113 – 0.055 mg/g และผลิตกรดไขมันชนิด DHA ได้ระหว่าง 0.0331 – 0.0217 mg/g ซึ่งการผลิตกรดไขมันเหล่านี้มักจะอยู่ในรูปของน้ำมันหรือเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ชนิดนั้นๆ (Gill and Vallivety. 1997) ซึ่งจากการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตกรดไขมันจำเป็นชนิด EPA และ DHA ในปริมาณน้อย Nichols *et al.* (1997) รายงานว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้มากนั้น จะเป็นแบคทีเรียจำพวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Flexibacter, Vibrio* และ *Shewanella* ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียจำพวกนี้สามารถมีชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ (extreme environment) ได้ เช่น อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมาก หรือในสภาวะที่มีเกลือที่ความเข้มข้นสูงมาก ซึ่งโดยมากแล้วจะพบในแบคทีเรียจำพวก psychrophile เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะมี cell membrane ที่ประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอัตราที่สูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ทั้งนี้เพื่อให้ membrane ยังคงสภาพได้ ไม่แข็งตัว ซึ่งเป็นการปรับตัวที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus, Listeria, Vibrios* บางสายพันธุ์, *Pseudomonas* และ *Brevibacterium* (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547) โดยการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงได้ วิกรมนัส เอื้อวิทูทิช และ คณะ (2544) ทำการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Sh.putrefaciens* ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 และ 42 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *Sh.putrefaciens* ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียมีการสร้างกรดไขมันชนิด EPA และ DHA สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ แต่ทั้งนี้การเจริญของเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถเจริญได้น้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nichols *et al.* (1997) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย psychrophilic bacterium สายพันธุ์ 651 จากก้อนน้ำแข็งบริเวณขั้วโลก และศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต่อการผลิตกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า เซลล์แบคทีเรียสามารถผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้ 12.2-2.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสัดส่วนการผลิตกรดไขมันชนิด EPA จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง โดยพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ที่ 2 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการผลิตกรดไขมันชนิด EPA ได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนี้โดยมากจะพบได้จากลำไส้ของปลาทะเลลึก และอยู่ในเขตที่มีความเย็นแต่จะพบได้น้อยในปลาที่อาศัยในเขตร้อน (Yano *et al.* 1997)

### 5.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้ ทั้งหมด 5 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ผลการทดสอบพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีความสามารถคงตัวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบมากที่สุด โดยการบันทึกผลจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ (organic acid) ของแบคทีเรียกรดแลกติก สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยมากจะเป็นกรดแลกติก และ กรดอะซิติก โดยกรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลกติก ซึ่งเกิดจากผลผลิตของกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตมีการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นกรดแลกติก ซึ่งเมื่อมีการสะสมของกรดเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของบริเวณนั้นลดลง ทำให้มีการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของแบคทีเรีย โดยกรดแลกติกจะสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ และเมื่อสภาพภายในเซลล์มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าสภาพภายนอกเซลล์แล้วนั้น กรดแลกติกจะแตกตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน ทำให้มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลายหรือหน่วงเหนี่ยวจุลินทรีย์นั้นๆ (De Vuyst and Vandamme. 1994) จากผลการทดลองจะพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมลบสามารถทนต่อกรดได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าไอโซเลท Tb11 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า อาจเป็นผลที่เกิดร่วมกันของกรดอินทรีย์และสารชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าสารยับยั้งที่สร้างขึ้นมานั้นเกิดจากสารใด การทดลองโดย Ziauddin *et al.* (1993) พบว่า กรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียก่อโรค ที่ระดับความเข้มข้นของกรดแลกติก 1.5-2.5 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Bacillus, E. coli, Salmonella, Staphylococcus* และ *Streptococcus* ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากกรดแลกติกแล้วนั้นยังมีสารชนิดอื่นๆที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลกติก และ กรดอะซิติก แต่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นกัน ได้แก่ แอมโมเนียม เอทานอล, กรดฟอร์มิก, ไดอะซิติล, ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์, อะซิทัลดีไฮด์, เบนโซเอต, เอนไซม์แบคเทอริโอไรติก และแบคเทอริโอซิน และยังมีสารชนิดอื่นๆที่ยังไม่มีการจำแนกอีกด้วย

### 5.4 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

การศึกษากราฟการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อระยะเวลานานขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เพิ่มขึ้นซึ่งบ่งบอกถึงความหนาแน่นของทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว โดยแสงที่ส่องผ่านสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียจะดูดซับแสงส่วนหนึ่งเอาไว้ ซึ่งปริมาณแสงที่ถูกดูดเอาไว้นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย โดยการเจริญของเชื้อจะมีความแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมนั้นๆ เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ เป็นต้น (อัจฉรา เพิ่ม. 2549) ดังนั้นในการทดลองนี้ หากต้องการทราบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ จำเป็นต้องทำการใช้วิธี dilution plate count ควบคู่กันไปด้วย จากนั้นจึงนำไปสร้างกราฟการเจริญ ซึ่งจากกราฟการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงแรกของการสุ่มตัวอย่าง (ชั่วโมงที่ 0-2) เชื้อแบคทีเรียจะอยู่ในระยะที่เรียกว่า lag phase โดยในระยะนี้เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม เซลล์แบคทีเรียยังไม่เพิ่มจำนวนมากนัก แต่จะมีการสังเคราะห์โพรโทพลาซึม รวมทั้งเอนไซม์ โคเอนไซม์ DNA และ RNA โดยความยาวของระยะ lag phase นี้จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในระยะนี้ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส มีจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เท่ากับ 7.033-7.164 Log CFU/ml และ 7.064-7.204 Log CFU/ml ตามลำดับ จากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า log phase (ชั่วโมงที่ 2-6) ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ ในระยะนี้อัตราการเจริญจะมีมากที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมาก ซึ่งจำนวนของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ทำให้ลักษณะของ curve เป็นแบบ exponential จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary phase (ชั่วโมงที่ 8 ที่อุณหภูมิ30, 37 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก โดยแม้ว่ามีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นก็จะมีเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องมาจากสารอาหารได้ถูกนำไปใช้จนหมดนั่นเอง โดยไอโซเลท Tb11 เจริญได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 22 ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.281 Log CFU/ml และ 9.202 Log CFU/ml ตามลำดับ และหลังจากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ death phase (ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป) ซึ่งในระยะนี้แบคทีเรียมีการตายลงอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นสม่ำเสมอ ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์เริ่มหมดไปนั่นเอง และจากผลการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท Tb11 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ซึ่งถือเป็นข้อดีหากมีการนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งโดยปกติแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเลี้ยงปลาอยู่ที่ประมาณ 26-30 องศาเซลเซียส

**5.5 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก**

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 พบว่า ไอโซเลท Tb11 ถือเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด ทนต่อสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ และทนต่อสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ มีการสร้างกรดเพื่อยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ สามารถมีชีวิตรอดได้ในกระเพาะจำลองและลำไส้จำลอง ทนต่ออุณหภูมิสูง เจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 นี้ มาทำการจำแนกสายพันธุ์ และจากการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CH เพื่ออ่านผลที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 ถูกจำแนกเป็น *Lactococcus lactis* spp. lactis1 ที่ระดับความถูกต้อง (% of identification) 99.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลจากการจำแนกอยู่ในเกณฑ์ที่ค่อนข้างน่าเชื่อถือโดยในการทดลองนี้ใช้ชุดทดสอบ API 50 CH ในการทดสอบเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลจากการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่มีระดับความถูกต้องสูงแต่ก็ควรมีการยืนยันด้วยการจัดจำแนกโดยการใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA มาใช้ในการประกอบการพิจารณาด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือรูปไข่ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน การเรียงตัวของเซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรืออาจเป็นสายโซ่ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactic, Lactococcus garvieae, Lactococcus plantarum, Lactococcus raffinolactis* และ *Lactococcus piscium* นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* จากแหล่งตัวอย่างปลาชนิดอื่นๆ เช่น จากระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย ปลากระพง (ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์. 2551; Rumjuankiat *et al.* 2553) ปลาคาร์พ ปลาเทร้า และจากธัญพืช สัตว์ และในลำไส้ของมนุษย์ (Salminen *et al.* 2012) โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococci* เป็นแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อหมักในผลิตภัณฑ์นมหมัก สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ในทางการค้านิยมใช้ *L.lactis* subsp. *lactis* และ *cremoris* ซึ่งความแตกต่างของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้จะแตกต่างกันที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. lactis* มีความสามารถในการทนเกลือ และสามารถไฮโดรไลซิสอาร์จีนีน ในขณะที่สายพันธุ์ *cremoris* ไม่สามารถทำได้ (Salminen *et al.* 2012) โดย อัญชลินทร์ สิงห์คำ และ จีรชัย กาญจนพฤฒิพงศ์ (2551) ทำการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกจากน้ำนมดิบของแพะในเขตภาคกลาง สามารถคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* ได้ 5.13 เปอร์เซ็นต์ และจำแนกเป็นสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ได้ 4 ไอโซเลต ซึ่งทุกไอโซเลทสามารถหมักน้ำตาลแลกโทสได้

## 5.6 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

### 5.6.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง

การนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 และไอโซเลทอื่นๆมาเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่างๆ ผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 2-10 โดยการเจริญเติบโตจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มสูงขึ้น และสามารถเจริญได้สูงสุดที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และมีแนวโน้มลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นที่ระดับ 8-10 โดยในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์บางชนิดมีการหลั่งกรดเกลือทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหารมีค่าลดลง จนมีค่าเท่ากับ 0.5-2 ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญและทนได้ (Jin *et al.* 1998) ดังนั้นความสามารถในการทนต่อกรด-ด่างจึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก (Havenaar *et al.* 1992) แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4.5-7.0 โดยมีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งในการทำงานของเอนไซม์จะต้องอยู่ในช่วงที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอีกด้วย เช่น การทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L.lactis* ssp. *lactis* โดยเอนไซม์ Pyruvate kinase ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 6.9-7.5 เอนไซม์ Intracellular proteinase ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 7.5 และการทำงานของเอนไซม์ X-Prolyl dipeptidyl peptidase ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 8.5 เป็นต้น (Hutkins and Nannen. 1993) สอดคล้องกับผลการทดลองคือ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และโดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 1.0-11.0 ในกลุ่ม Streptococci, Lactococci (Hutkins and Nannen. 1993) แบคทีเรียกรดแลกติกเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดพบว่าปริมาณของแบคทีเรียจะลดลง เนื่องจากเซลล์ลดการเจริญ ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี คมแข พิลาสมบัติ และคณะ (2553) ทำการศึกษาความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จากปลากะพง ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3-10 พบว่า จำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นตามระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่สูงขึ้น (3.0-6.0) และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้นในระดับที่มากกว่า 6 เป็นต้นไป พบว่าความสามารถในการเจริญลดลง

**5.6.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์**

การนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 และไอโซเลทอื่นๆมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในโซเดียมคลอไรด์ที่มีระดับความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีค่าการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 4 ไอโซเลท โดย *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1-5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความขุ่นของเชื้อลดลงจาก 1.019 เหลือ 0.277 ตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งหากมีการนำแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์นับว่าเป็นข้อได้เปรียบในการนำไปใช้ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ เช่นในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นอาหารประเภทหมักจะมีเกลือเป็นส่วนผสม 2.4-3 เปอร์เซ็นต์ โดยเกลือที่ใส่ลงไปในอาหารนี้จะทำหน้าที่ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) และการนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคของสัตว์น้ำ เช่นในกลุ่มพวกปลาสวยงาม ก็มักจะมีการใช้โซเดียมคลอไรด์ร่วมกับการเลี้ยงด้วยเช่นกัน โดยมีความเข้มข้นระหว่าง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ (ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2544) ในขณะเดียวกันพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีค่าการเจริญในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์มากกว่าสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ลงไปโซเดียมคลอไรด์อาจจะเข้าไปรบกวนการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากว่า กระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียมีความ sensitive ต่อไอออนของโซเดียมคลอไรด์และน้ำ (Vinderola and Reinheimer. 2003) Verluyten *et al.* (2004) รายงานว่า ในการเลี้ยงเชื้อ *L. carvatus* LTH 1174 ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในระดับต่ำ 1-2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ แต่มีการเพิ่มปริมาณการยับยั้งเชื้อ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า จะมีการผลิตสารยับยั้งเพิ่มมากขึ้นในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำๆ แม้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะไม่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อก็ตาม

**5.6.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์**

การนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 และไอโซเลทอื่นๆมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าความเข้มข้นของน้ำดีสังเคราะห์ที่ระดับต่างๆ ผลการทดลอง พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้นได้สูงถึง 0.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.029 log CFU/ml โดยมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำดีสังเคราะห์ที่เพิ่มสูงขึ้น คมแข พิลาสมบัติ และคณะ (2553) ได้ทดสอบการเจริญของไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลากระพง พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในน้ำดีสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในความเข้มข้นที่ 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการเจริญ Begley *et al.*(2005) ได้รายงานว่า โดยทั่วไปแล้วในกระเพาะและลำไส้ของสัตว์จะมี bile salts ซึ่ง bile salts มีความเข้มข้นสูง ทำให้สามารถละลายไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้ส่วนประกอบต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกมาทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ bile salt และจะส่งผลทำให้เซลล์ตายในที่สุด ทั้งนี้สายพันธุ์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งต่อความสามารถในการทน bile salts อีกด้วย ซึ่งในการทนต่อ bile salt ของแบคทีเรียนั้นเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ bile salts hydrolase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมา (Madureira *et al.* 2005) ดังนั้นคุณสมบัติที่ดีสำหรับการเป็นโปรโอติกนั้นจะต้องมีความสามารถในการทนต่อน้ำดี ทั้งนี้เนื่องจากน้ำดีจะถูกปล่อยเข้าสู่ลำไส้เล็ก หลังจากที่มีการย่อยอาหารประเภทไขมันแล้ว ซึ่งจากผลการทดลองสามารถแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีแนวโน้มที่จะสามารถมีชีวิตรอดและเจริญอยู่ในได้ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน

**5.6.4 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง**

การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยน้ำย่อยจำลองที่ใช้ในการทดสอบมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับ 2, 3, 4 และ 7 จากผลการทดลองพบว่า ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 เชื้อแบคทีเรียไม่มีสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 อัตราการมีชีวิตรอดได้นานขึ้นแต่พบว่าลดลงเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยนานขึ้น และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 และ 7 พบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะและผ่านเข้าไปในลำไส้ได้ โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดสุดท้าย เท่ากับ 8.698 Log

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CFU/ml และ 8.0 Log CFU/ml ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ คมแข พิลาสมบัติ และ คณะ (2552) ได้ทดสอบความสามารถของ *Lb. salivarius* K4 ในการมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยน้ำย่อยจำลองที่ใช้ทดสอบ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยของกระเพาะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 พบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้น และเริ่มลดลงเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น โดยสามารถผ่านเข้าไปถึงลำไส้ได้ แต่มีชีวิตรอดเหลืออยู่เพียง 1.29 Log CFU/ml และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 และ 7 พบว่า *Lb. salivarius* K4 มีชีวิตรอดค่อนข้างสูง การศึกษาการมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารนี้ มีส่วนสำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก โดยคุณสมบัติสำคัญในการเป็นโปรไบโอติกนั้นจะต้องมีความสามารถในการทนต่อกรดที่มีความเข้มข้นสูงๆทั้งเนื่องเนื่องจาก เมื่อเจ้าบ้านรับแบคทีเรียโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายแล้ว แบคทีเรียจะต้องผ่านเข้าสู่กระเพาะและลำไส้ โดยในกระเพาะจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำซึ่งเป็นการทำลายแบคทีเรียของเอนไซม์เปปซินที่พบในกระเพาะอาหาร และน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงในลำไส้เล็ก จะส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไปจนถึงลำไส้ (Huang and Adams. 2004) โดยในระบบการย่อยอาหารของปลาประกอบด้วยอวัยวะหลัก 3 ส่วน คือ กระเพาะอาหาร ลำไส้ และ ไส้ติ่งซึ่งในกระเพาะอาหารของมีสภาพเป็นกรด โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2-4 เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปปซิน และในส่วนของลำไส้จะมีสภาวะที่เป็นกลาง-ด่าง โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7-11 (Jobling. 1995)

คณินทรา สุวรรณมานนท์ และ คณะ (2550) ศึกษาความทนต่อสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลองของ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ M13 โดยศึกษาที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 และ 7 เปรียบเทียบกับ สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 ที่มีส่วนผสมของ skimmed milk จากผลการทดลอง พบว่า ที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และ 2 ที่ผสม skimmed milk อัตราการรอดชีวิตมากกว่า เชื้อที่สัมผัสกับน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 โดยตรง ทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อมีการบริโภคอาหารแต่ละชนิดเข้าไป จะส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอาหารมีความแตกต่างกัน โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 เป็นสภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งแม้ว่าจะไม่มีอาหารอยู่แต่จะไม่เกิดการทำลายเชื้อในกระเพาะอาหาร จึงทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดหลงเหลือไปถึงในลำไส้จำลอง และเมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 และ 2 ที่ผสม skimmed milk พบว่า เชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 มีอัตราการรอดชีวิตเหลืออยู่น้อยมาก ในขณะที่การทดลองที่ใช้ skimmed milk พบว่าเชื้อมีอัตราการรอดชีวิตมากพอๆกับที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ทั้งนี้เนื่องจาก skimmed milk มีส่วนในการช่วยห่อหุ้มเชื้อ ทำให้เชื้อไม่สัมผัสกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายกระเพาะจำลองที่มีความเป็นกรดสูงโดยตรง เชื้อจึงถูกทำลายน้อย ดังนั้น หากมีการนำโปรไบโอติกไปใช้จึงควรมีการบริโภคในสภาวะที่กระเพาะเป็นกลาง (ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7) หรือควรบริโภคอาหาร เช่น นม เพื่อให้ทำให้เชื้อได้หลงเหลือถึงลำไส้นั่นเอง

**5.6.5 การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง**

การศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงโดยนำเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มาทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที จากผลการทดลอง พบว่า อัตราการรอดชีวิตจะลดน้อยลงตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าอุณหภูมิอื่นๆ และที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 วินาที พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ แบคทีเรียกรดแลกติกมีบทบาทในอาหารมากมาย ซึ่งโปรไบโอติกนั้นได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด โดยโปรไบโอติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันอาจมีการใช้ผสมในรูปผง เม็ด หรือรูปแป้งเปียก ส่วนการประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์สามารถทำได้โดยการให้สัตว์กินโดยตรง ผสมกับอาหาร หรือมีการเติมในน้ำ การนำโปรไบโอติกไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหารนั้น มีการใช้ความร้อนในขั้นตอนของการผสมอาหาร ทำให้แบคทีเรียมีการตาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเป็นโปรไบโอติก (Gardiner *et al.* 2000) โดย Campbell *et al.* (2006) พบว่าการอัดอาหารเม็ดของไก่ มีอุณหภูมิที่เหมาะสม ประมาณ 85 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการอัดเม็ด 15 วินาที และจากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที ของเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 20-80 วินาที อัตราการมีชีวิตรอดไม่เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเวลาทดสอบที่มากกว่าเวลาที่ใช้ในการอัดเม็ดอาหารไก่ ดังนั้นหากมีการนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไปผ่านกระบวนการผสมกับอาหารโดยการอัดเม็ด เชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 จะมีโอกาสในการรอดชีวิตสูง

**5.6.6 การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน**

การศึกษาความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มภายใต้สภาวะ 2 สภาวะ คือ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ใน Anaerobic jar และ บ่มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบในการนำ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไปใช้เพื่อเป็นโปรไบโอติก ตัวอย่างเช่น ในส่วนของการนำไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกร่วมกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจาก *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 นี้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการเจริญได้ทั้งสองสภาวะและสามารถเจริญได้ในลำไส้ของปลาซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Jobling, 1995) ซึ่งในการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ปรีชา ภูมิพื้นผล. (2550) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 โดยการเลี้ยงสายพันธุ์ดังกล่าวลงในอาหารเหลว MRS และนำเข้าบ่มภายใต้สภาวะที่กำหนด 3 สภาวะ ด้วยกันคือ สภาวะปราศจากออกซิเจน ในตู้บ่มแบบปราศจากออกซิเจน (anaerobe incubator), สภาวะการเติมออกซิเจนโดยการเขย่าที่ 100 rpm และ ในสภาวะบรรยากาศปกติ ผลการทดลองพบว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถเจริญได้ดีในทั้ง 3 สภาวะที่ทำการทดลอง โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมีความต้องการอากาศที่แตกต่างกัน แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Facultative anaerobes ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะสร้างพลังงานได้จากการหายใจและจากกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งเป็นพลังงานที่ไม่ได้เกิดจากการใช้ออกซิเจน และอีกกลุ่มคือ แบคทีเรียในกลุ่ม microaerophilic ซึ่งเป็นกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550)

**5.6.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน/ไขมัน/แป้ง**

การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และ แป้ง ของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 โดยจากผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ไม่สามารถย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งได้ ในการทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก การย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งนี้ถือเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่ใช้ในการคัดเลือก เนื่องจากความสามารถของแบคทีเรียกรดแลกติกในการย่อยสลายสารอาหาร ส่งผลต่อการส่งเสริมการเจริญของสัตว์ Austin *et al.*(1995) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งได้ จะมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญของสัตว์น้ำ โดยการที่แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถย่อยโปรตีนได้ดีนั้นจะส่งผลต่อกระบวนการย่อยอาหารของสัตว์ เนื่องจากทำให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วขึ้น

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์ (2551) ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 20 ไอโซเลท จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลท ไม่สามารถย่อยไขมันและแป้งได้ ในขณะที่มี 12 ไอโซเลท สามารถย่อยโปรตีนได้ การใช้ประโยชน์จากสารอาหารของแบคทีเรียกรดแลกติกนี้จะขึ้นอยู่กับการสร้าง exoenzyme ของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ โดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถย่อยแป้งได้ จะมีการใช้เอนไซม์ amylase ในการย่อยแป้ง ส่วนการใช้ไขมันของแบคทีเรียกรดแลกติกจะใช้เอนไซม์ phoaphatidase หรือบางชนิดอาจมีการใช้เอนไซม์ lipase และการใช้โปรตีนของแบคทีเรียกรดแลกติกจะใช้เอนไซม์ protease ในการย่อยโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.6.8 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ**

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลกติก *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 ต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 15 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Naldixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim การทนต่อยาปฏิชีวนะ ถือเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งของการเป็นโปรไบโอติก ทั้งนี้เนื่องจาก ในการเลี้ยงสัตว์แม้จะมีการหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะและเริ่มมีการนำโปรไบโอติกมาใช้ แต่ก็มีความจำเป็นในการนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาโรค โดยสาเหตุหนึ่งก็ คือ การติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งหากต้องการนำแบคทีเรียกรดแลกติกไปใช้ประโยชน์นั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ในระดับหนึ่ง Mathur and Singh. (2005) รายงานว่า การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีพื้นฐาน จากปัจจัย 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ การมียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และ การปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ โดยยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้แก่ ampicillins, chloramphenicol, cephalothin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, nitrofurantoin, norfloxacin, novabicin, oxolinic acid, tetracycline, oxytetracyclin

การมียีนที่ต้านทานที่มีอยู่เองต่อยาปฏิชีวนะจะทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญอยู่ได้ภายใต้สภาวะที่มียาปฏิชีวนะ โดยความต้านทานที่แบคทีเรียได้รับมานั้นอาจมีการถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ ในอดีตนั้นการนำแบคทีเรียกรดแลกติกไปใช้นั้น ถือว่ามีความปลอดภัยทั้งต่อคนและสัตว์ แต่ในเวลาต่อมา Salminen *et al.* (1998) รายงานว่า แบคทีเรียชนิด *Streptococcus, Enterrococcus* บางสายพันธุ์มีโอกาสถ่ายทอดยีนที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ ไปสู่แบคทีเรียก่อโรคได้ อย่างไรก็ตาม Zhou *et al.* (2005) รายงานว่า ไม่เป็นที่แน่นอนเสมอไปว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทนต่อยาปฏิชีวนะจะสามารถถ่ายทอดยีนต้านยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ตัวอย่างเช่น ในแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะที่มีอยู่เอง โดยสามารถต้านทานต่อ bacitracin, gentamicin, metronidazole, notrofurantion, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin และ vanomycin (Danielsen and Wind. 2003) โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถถ่ายทอดยีนเหล่านี้ได้ เนื่องจากไม่มี plasmid ที่ใช้ในการถ่ายทอดนั่นเอง ซึ่งสายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ที่กล่าวมา ตัวอย่างเช่น *L.plantarum, L.rhamnosus, L.casei,* pediococcus โดยในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นเท่านั้น เพื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อหากเจ้าบ้านได้รับการรักษาโดยมีการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นหากมีการนำแบคทีเรียนี้ไปประยุกต์ใช้จริงควรมีการศึกษาการถ่ายทอดยีนต้านทานยาปฏิชีวนะร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 6
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาทะเล 4 ชนิด โดยตัวอย่างปลาทะเลที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ปลากดทะเล ปลาทรายแดง ปลาทู และ ปลากระบอก สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ 100 ไอโซเลท โดยแยกได้จากปลากดทะเล 35 ไอโซเลท ปลาทรายแดง 30 ไอโซเลท ปลาทู 11 ไอโซเลท และ ปลากระบอก 24 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์และน้ำดีสังเคราะห์ ได้ดีที่สุด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Ba1 และ Ba9 จากปลากดทะเล ไอโซเลท Tb11 จากปลาทรายแดง ไอโซเลท Ma9 จากปลาทู และไอโซเลท Mu7 จากปลากระบอก การตรวจการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท พบเซลล์ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยไอโซเลท Tb11 และ Ma9 มีรูปร่างกลม ส่วนไอโซเลท Ba1, Ba9 และ Mu7 มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น เมื่อศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรีย พบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด oleic เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบได้ปริมาณสูงสุดในการทดลองนี้ ไอโซเลท Ba1, Ba9, Tb11, Ma9 และ Mu7 เมื่อทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ พบไอโซเลท Tb11, Ba9 และ Mu7 แสดงผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแต่เมื่อทดสอบไปได้ระยะหนึ่ง ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลกติกลดลงค่อนข้างมาก เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบค่อนข้างคงตัว โดยไอโซเลท Tb11 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124$^{T}$, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942, *Leuconostoc cremoris, Lactobacillus plantarum* TISTR 8104, *Brochotrix campeatris* NBRC 11547$^{T}$, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693$^{T}$ และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกต่อไป

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและระยะเวลา 22 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Tb11 ดีที่สุด ไอโซเลท Tb11 ถูกจัดจำแนกเป็น *Lactococcus lactis* ssp lactis1 มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในระดับความเป็นกรด-ด่างที่ 2 และ 3 เท่ากับ 2.086 และ 2.113 Log CFU/ml ตามลำดับ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถทนต่อสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดเท่ากับ 6.732 Log CFU/ml และมีความสามารถในการมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอดในน้ำดีสังเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง คือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอด เท่ากับ 3.029 Log CFU/ml มีความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลองพบว่า น้ำย่อยจำลองที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ส่วนในน้ำย่อยจำลองที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3, 4 และ 7 เชื้อแบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลองและผ่านไปยังลำไส้จำลองได้ และมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงโดย *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถมีชีวิตรอดได้ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานที่สุด 80 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส และ120 วินาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11 สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิด Gentamycin, Naldixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ข้อเสนอแนะ**

1. จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าสารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบนั้นคือสารชนิดใด

2. จากการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง พบว่า ที่น้ำย่อยจำลองที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2 เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการเพิ่มปริมาณการมีชีวิตรอด ในน้ำย่อยจำลองที่มีความเป็นกรด โดยอาจมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สัมผัสกับน้ำย่อยโดยตรงและการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเมื่อมีการห่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

3. การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกควรมีการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ร่วมด้วยในการใช้ยืนยันผลการทดสอบ เนื่องจากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตเป็นวิธีที่มาตรฐานในการศึกษาความสัมพันธ์ของอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการระหว่างสายจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม


กิจการ ศุภมาตย์. 2541. **เอกสารการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คณินทรา สุวรรณมานนท์, ชมพูนุท ขาวนวล, พิมลพรรณ ทองอุ่น, ศศิวิมล ชื่นอิ่ม และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2550. "การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อของไทย." **รายงานวิจัยโครงการคณะอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.**

คมแข พิลาสมบัติ, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. "สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 28: 1-8.

คมแข พิลาสมบัติ, นวลพรรณ งามยี่สุ่น และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2552. "การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 28:19-28.

ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์. 2551. "การคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติสร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารปลาสวาย." ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพ. 36 หน้า.

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2544. **สายพันธ์และการเลี้ยงปลาทอง เชิงธุรกิจ ฉบับสมบูณ์.** หจก. เพชรกะรัตสติวโอ, กรุงเทพ.

นวลจันทร์ พารักษา. 2533. "สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก." **ว. สุกรสาส์น.** 16(53): 6-13.

นฤมล อัศวเกศมณี. 2549. **อาหารและการให้อาหารปลา.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

ปรีชา ภูมิพื้นผล. 2550. "การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อรม เพชรสม. 2539. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** ชวนพิมพ์. กรุงเทพ.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิกรมนัส เอื้อวิทูทิช, พงษ์เทพ วิไลพันธ์, วันชัย วรวัฒนเมธีกุล และ ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์. 2544. "การศึกษาการสร้างกรดไขมัน EPA และ DHA ของ *Shewanella putrefaciens* เมื่อเลี้ยงในน้ำที่ได้จากขั้นตอนการแยกน้ำมันออกจากน้ำของโรงงานผลิตน้ำมันปลาทูน่า." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39.** สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. **อาหารพื้นเมือง ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. **อาหารปลา.** ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. **แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์.**สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยมหิดล.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. "การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. **แบคทีเรียกรดแลคติก.** คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

อัญชลินทร์ สิงห์คำ และ จีรชัย กาญจนพฤฒิพงศ์. 2551. "การคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกจากน้ำนมดิบของแพะในเขตภาคกลางของประเทศไทย." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46.** สาขาสัตว์และสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. "แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก." **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 23(2): 145-160.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A., Efendi, I. and Griffith, D.R.W. 1995. "A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*." **J. Fish Dis.** 18: 93-96.

Axelsson, L.T. 1998. **Lactic acid bacteria: classification and physiology.** *In* Lactic Acid Bacteria. (ed. Salminen, S. and Wright, A.V.)New York: Marcel Dekker. 1-64pp.

Balcazar, J.L., Blas, I., Zazuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquia, L. 2006. "The role of probiotic in aquaculture." **Veter. Microbiol.** 114: 173-186.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Campbell, J.M., Russell, L.E., Crenshaw, J.D., Behnke, K.C. and Clark, P.M. 2006. "Growth response of broilers to spray-dried plasma in pelleted or expanded feed processed at high temperature." **J. Anim. Sci.** 84: 2501-2508.

Collins, J.K., Thornton, G. and Sullivan, G.O. 1998. "Selection of probiotic strains for human applications." **International Dairy Journal.** 8: 487-490.

Danielsen, M. and Wind, A. 2003. "Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents." **Int. J. Food Microbiol.** 82: 1-11.

Delong, E.F., Franks, D.G. and Yayanos, A.A. 1997. "Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep – sea bacteria." **Appl. Environ. Microbiol..** 63: 2105-2108.

Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G. and Stanton, C. 2002. "Improve stress toleranceof GroESL – overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338." **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 5929-5936.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. **Bacteriocins from Lactic acid bacteria.** Blackie Academic & Professional, New York.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Class IIa bacteriocins from food preservation." **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 6: 705-716.

Folch, J., Lees, M. and Stanley, S.G.H. 1957. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues." **Journal of Biological Chemistry.** 226: 497-509.

Fuller, R. 1993. **Probiotic food current use and future developmented.** IFI NR. 3: 23-26. Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotic in aquaculture. **Aquaculture.** 180: 147-165.

Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P. and Stanton, C. 2000. "Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. sarivarius* strains during heat treatment and spray drying." **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2605-2612.

Gatesoupe, F.J.1999. "The use of probiotics in aquaculture." **Aquaculture.** 180: 147-165.

Gill, I. and Valivety, R. 1997. "Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and application." **Tibtech.** 15: 9-401.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gomez-Gil, B., Rouge, A. and Turnbull, J.F. 2000. "The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organism." **Aquaculture.** 191: 259-270.

Gonzalez, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez, M.L. and Otero, A. 2000. "Characterization and identification of lactic acid bacteria from fresh water fishes." **Food Microbiol.** 17:383-391.

Havenaar, R., Ten Brink, B. and Huis in't Veld, J.H.J. 1992. "Selection of strains for probiotic use." **The Sciencetific Basis.** 209-221.

Huang, Y. and Adams, M.C. 2004. "In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic diary propionbacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 91:253-260.

Hutkins, R.W. and Nannen, N.L. 1993. "pH Homeostasis in lactic acid bacteria." **Faculty publications in food sciences and technology.** University of Nebraska-Lincoin.

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.

Jin, L.Z., Ho N. Abduliah, M.Y., Ali, A.M. and Jalaludin, S. 1998. "Acid and bile tolerance of lactobacillus isolated from chicken intestine." **Appl. Microbiol.** 27: 183-185.

Jobling, M. 1995. **Environmental Biology of Fishes.** Chapman & Hall, London.

Jotensen, J.P. and Landfald, B. 1997. "High prevalence of polyunsaturated – fatty – acid producing bacteria in Arctic invertebrates." **FEMS Microbiology Letters.** 151: 95-101.

Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet, I.D., Wright, A.V., Poutanan, K. and Sandholm, T.M. 1998. "The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed onfermented oat bran product effect on gastrointestinal microbiota." **J. Appl Microbiol Biotechnol.** 50:246-252.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Truszkowska, A.M.P., Pintado, M.E., Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. 2005. "Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract." **International Dairy Journal.**15:921-927.

Mathur, S. and Singh, R. 2005. "Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review." **Int. J. Food Microbiol.** 105: 281-295.

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. **Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid.** In Laboratory Exercises in Microbiology. Graw-Hill, New York Press: 126-188.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moriaty, D.J.W. 1998. "Control of luminous *Vibrios* species in penaeid aquaculture ponds." **Aquaculture.**164: 351-358.

Nestle. 2002. **A Yoghurt with many Quality.** In Nestle Clinical Nutrition course, Lausanne.

Nichols, D.S., Hart, P., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. 1996. "Enrichment of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed an Antarctic bacterium containing polyunsaturated fatty acids." **Aquaculture.** 147: 115-125.

Nichols, D.S., Brown, J.L., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. 1997. "Production of eicosapentaenoic acid and arachidonic acid by Antarctic bacterium: response to growth temperature." **FEMS Microbiology Letters.** 152: 349-354.

Nichols, D.S. and McMeekin, T.A. 2002. "Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acid." **Journal Microbiological Methods.** 48: 161-170.

Nichols, D.S. 2003. "Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web." **FEMS Microbiology Letters.** 219: 1-7.

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter, G.R. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology.** London WC1W9LB, England.

Raes, K., De Smet, S, and Demeyer, D. 2001. "Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids." **Animal science.** 73: 253-260.

Ringo, E. 1993. "Dose chromic oxide ($Cr_2O_3$) affect faecal lipid and intestinal bacteria flora in Arctic charr.(*Salvelinus alpines*)." **Aqua. Fish Manage.** 24: 767-776.

Ringo, E. and Gatesoupe, F.J. 1998. "Lactic acid bacteria in fish: review." **Aquaculture.** 160: 177-203.

Rumjuankiat, K., Pilasombut, K., Wangwibutkit, S. and Swetwiwathana, A. 2553. "Screening and partial characterization from lactic acid bacteria in fish gastrointestinal tract." **KKU Res J.** 15: 870-877.

Russell, N.J. and Nichols, D.S. 1999. "Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten." **Microbiology.** 145: 767-779.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. **Lactic acid bacteria.** New York: Marcel Dekker Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salminen, S., Bouley, C., Boutron – Ruault, M.C., Cumming, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. and Rowand, I. 1998. "Functional food science and gastrointestinal physiology and function." **Brit. J. Int.** 13: 293-313.

Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 2004. **Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects.** New York: Marcel Dekker Inc.

Salminen, S., Lahtinen, S., Ouwehand, A.C. and Wright, A.V. 2012. **Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects.** London: Crc press.

Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M. and Deguchi, Y. 1997. "*Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida.*" **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4986-4989.

Toit, M. 1998. "Characterization and selection of probiotic Lactobacilli for a preliminary minipig Feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content." **Journal of food microbiol.** 40: 93-104.

Verluyten, J., Messens, W. and De Vuyst, L.2004. "Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174, originating from fermented sausage." **Appl. Environ. Microbiol.** 70:2271-2278.

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.

Yanes-Roca, C., Rhody, N., Nystrom, M. and Main, K.L. 2009. "Effects of fatty acid composition and spawing season on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*)." **Aquaculture.** 4487-4489.

Yano, Y., Nakayama, A. and Yoshida, K. 1997. "Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestine of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals." **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2572-2577.

Yazawa, K., Araki, K., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inoue, A., Kondo, K., Watabe, S. and Zarate, G., Hashimoto,K. 1988. "Eicosapentaenoic acid productivity of the bacteria isolated from fish intestines." **Nippon Suisan Gakkaishi.** 54: 1835-1838.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zarate, G., Chaia. A.P., Gonzalez, S. and Oliver, G. 2000. "Viability and β-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial and intestinal fluids." **J. Food Sci.** 63: 1214-1221.

Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. 2005. "Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains." **Int. Food Microb.** 98:211-217.

Ziauddin, K.S., Roa, H.S. and Amla, B.L. 1993. "In vitro study on the effect of lactic acid and sodium chloride on spoilage and pathogenic bacteria of meat." **J. Food Sci. Technol.** 33: 255-258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก.

# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

**MRS (Deman Rogosa and Sharpe)**

ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10 | กรัม |
| Meat extract | 8 | กรัม |
| Yeast extract | 4 | กรัม |
| Glucose | 20 | กรัม |
| Tween 80 | 1 | กรัม |
| di-Ammonium hydrogen citrate | 2 | กรัม |
| di-Potassium hydrogen phosphate | 2 | กรัม |
| Sodium citrate | 5 | กรัม |
| Magnesium sulfate | 0.2 | กรัม |
| Manganese sulfate | 0.04 | กรัม |

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมผงวุ้น 15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Tryptic soy broth + Yeast extract (TSBYE)**

ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Peptone from casein | 17 | กรัม |
| Peptone from soymeal | 3 | กรัม |
| Dextrose | 2.5 | กรัม |
| Sodium chloride | 5 | กรัม |
| di-Potassium hydrogen phoaphate | 2.5 | กรัม |
| Yeast extract | 5 | กรัม |
| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | 7.3 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมผงวุ้น 15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Nutrient broth**

ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 5 | กรัม |
| Beef extract | 1.5 | กรัม |
| Yeast extract | 1.5 | กรัม |
| Sodium chloride | 5 | กรัม |
| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | 7.4 | |

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Milk agar**

ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 5 | กรัม |
| Yeast extract | 2.5 | กรัม |
| Dextose | 1 | กรัม |
| Skim milk powder | 1 | กรัม |
| Agar | 12.5 | กรัม |

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Starch agar**

ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Beef extract | 3 | กรัม |
| Soluble starch | 10 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| Agar | 12 | กรัม |

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**1.1 Tributyrin agar**

ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10 | กรัม |
| Meat extract | 8 | กรัม |
| Yeast extract | 4 | กรัม |
| Glucose | 20 | กรัม |
| Tween 80 | 1 | กรัม |
| di-Ammonium hydrogen citrate | 2 | กรัม |
| di-Potassium hydrogen phosphate | 2 | กรัม |
| Sodium citrate | 5 | กรัม |
| Magnesium sulfate | 0.2 | กรัม |
| Manganese sulfate | 0.04 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 จากนั้นเติม tributyrin ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค.

# ข้อมูลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1** การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเลชนิดต่างๆ

| รหัสสายพันธุ์ | แหล่งตัวอย่าง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา |
|---|---|---|
| Ba1 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba1-2 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba1-3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba1-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba2-1 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba2-2 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba2-3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba2-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba2-5 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba4-1 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba4-2 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba4-3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba4-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Ba4-5 | ปลากดทะเล | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Ba5-1 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba5-2 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba5-3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba5-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba6-1 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba6-2 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba6-3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba6-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba7 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba8-1 | ปลากดทะเล | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Ba9 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba9-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba10 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba10-3 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba11 | ปลากดทะเล | รูปร่างกลม แกรมบวก |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1(ต่อ)**

| รหัสสายพันธุ์ | แหล่งตัวอย่าง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา |
|---|---|---|
| Ba11-2 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba11-4 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba11-5 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba11-5-1 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ba11-6 | ปลากดทะเล | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb1-1 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb1-2 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb2 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb2-3 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb3-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb3-6 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb5-3 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb5-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb5-5 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb6-3 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb6-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb6-6 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb7-1 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb7-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb8 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb8-3 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb9-2 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| TB9-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb9-5 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb10-1 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb10-3 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb10-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb11 | ปลาทรายแดง | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Tb11-2 | ปลาทรายแดง | รูปร่างกลม แกรมบวก |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1(ต่อ)**

| รหัสสายพันธุ์ | แหล่งตัวอย่าง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา |
|---|---|---|
| Tb11-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb11-4-1 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb12 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb12-3 | ปลาทรายแดง | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Tb12-4 | ปลาทรายแดง | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Ma1-1 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma1-3 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma2 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma2-3 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma3-2 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma4-4 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma6-2 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma7 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma8-5 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Ma9 | ปลาทู | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Ma9-3 | ปลาทู | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu1-1 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu1-2 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu2-3 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu2-3 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu3 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu3-1 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu4-1 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu4-3 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu5-3 | ปลากระบอก | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Mu5-4 | ปลากระบอก | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Mu6-1 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu6-2 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu7 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu7-1 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1(ต่อ)**

| รหัสสายพันธุ์ | แหล่งตัวอย่าง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา |
|---|---|---|
| Mu8 | ปลากระบอก | รูปร่างกลม แกรมบวก |
| Mu8-2 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu9-2 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu9-4 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu10 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu10-1 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu11-2 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu11-3 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu12 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |
| Mu12-3 | ปลากระบอก | รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก |

**ตารางภาคผนวกที่ 2** การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 และแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลทอื่นๆที่คัดเลือกได้ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง

| pH | การเจริญ (OD 600nm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Tb11 | Ma9 | Mu7 | Ba1 | Ba9 |
| 2 | 0.028 | 0 | 0.020 | 0.014 | 0 |
| 3 | 0.028 | 0.021 | 0.022 | 0.019 | 0.016 |
| 4 | 0.054 | 0.047 | 0.051 | 0.050 | 0.045 |
| 4.5 | 0.095 | 0.084 | 0.088 | 0.081 | 0.081 |
| 5 | 0.564 | 0.478 | 0.512 | 0.511 | 0.492 |
| 6 | 1.096 | 1.053 | 1.067 | 1.070 | 1.059 |
| 7 | 1.317 | 1.214 | 1.310 | 1.314 | 1.211 |
| 8 | 1.413 | 1.311 | 1.398 | 1.411 | 1.309 |
| 9 | 0.770 | 0.652 | 0.690 | 0.712 | 0.642 |
| 10 | 0.706 | 0.600 | 0.641 | 0.690 | 0.599 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 3** การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 และแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลทอื่นๆที่คัดเลือกได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์

| NaCl (%) | การเจริญ (OD 600 nm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Tb11 | Ma9 | Mu7 | Ba1 | Ba9 |
| 0 | 1.085 | 1.065 | 1.089 | 1.076 | 1.078 |
| 1 | 1.019 | 1.004 | 1.020 | 1.015 | 1.021 |
| 2 | 0.696 | 0.678 | 0.702 | 0.687 | 0.690 |
| 3 | 0.603 | 0.594 | 0.621 | 0.611 | 0.607 |
| 4 | 0.483 | 0.449 | 0.483 | 0.462 | 0.479 |
| 5 | 0.277 | 0.253 | 0.269 | 0.259 | 0.268 |

**ตารางภาคผนวกที่ 4** การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11 และแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลทอื่นๆที่คัดเลือกได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์

| Bile salt (%) | การเจริญ (OD 600 nm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Tb11 | Ma9 | Mu7 | Ba1 | Ba9 |
| 0 | 1.019 | 1.020 | 1.019 | 1.011 | 1.018 |
| 0.3 | 0.135 | 0.031 | 0.096 | 0.087 | 0.036 |
| 0.6 | 0.132 | 0.012 | 0.074 | 0.068 | 0.018 |
| 0.9 | 0.128 | 0 | 0.051 | 0.048 | 0 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 5** การมีชีวิตรอดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับต่างๆของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

| pH | การเจริญของไอโซเลท Tb11 | |
|---|---|---|
| | OD 600 nm | Log CFU/ml |
| 2 | 0.028 | 2.086 |
| 3 | 0.028 | 2.113 |
| 4 | 0.054 | 5.880 |
| 4.5 | 0.095 | 5.995 |
| 5 | 0.564 | 7.653 |
| 6 | 1.096 | 8.075 |
| 7 | 1.317 | 8.152 |
| 8 | 1.413 | 8.139 |
| 9 | 0.770 | 8.103 |
| 10 | 0.706 | 8.037 |

**ตารางผนวกที่ 6** การมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

| NaCl(%) | การเจริญของไอโซเลท Tb11 | |
|---|---|---|
| | OD 600 nm | Log CFU/ml |
| 0 | 1.085 | 8.082 |
| 1 | 1.019 | 8.071 |
| 2 | 0.696 | 7.167 |
| 3 | 0.603 | 7.079 |
| 4 | 0.483 | 6.857 |
| 5 | 0.277 | 6.732 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 7** การมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

| Bile salt(%) | การเจริญของไอโซเลท Tb11 | |
|---|---|---|
| | OD 600 nm | Log CFU/ml |
| 0 | 1.019 | 8.071 |
| 0.3 | 0.135 | 3.342 |
| 0.6 | 0.132 | 3.113 |
| 0.9 | 0.128 | 3.029 |

**ตารางภาคผนวกที่ 8** การมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลองของ *L. lactis* ssp. *lactis* Tb11

| pH | จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในกระเพาะจำลอง (Log CFU/ml) | | | | จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (Log CFU/ml) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | เวลา (นาที) | | | เวลา (นาที) | | |
| | เชื้อเริ่มต้น | 0 | 90 | 180 | 0 | 90 | 180 |
| 2 | 9.226 | 8.748 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 9.170 | 8.698 | 7.612 | 6.591 | 5.477 | 0 | 0 |
| 4 | 9.154 | 8.845 | 8.826 | 8.296 | 8.255 | 8.096 | 7.698 |
| 7 | 9.173 | 9.170 | 8.350 | 8.320 | 8.301 | 8.113 | 8.000 |

**ภาพภาคผนวกที่ 1** ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Tb11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 9 เมษายน 2530 ที่จังหวัดสมุทรสาคร |
| ที่อยู่ | 3/245 หมู่บ้านสวนปาล์ม ซอยB6 ต.โคกขาม อ.เมือง จ.สมุทรสาคร 74000 |
| ประวัติการศึกษา | 2551 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง) ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้