วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 28.2(19-28)

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่

Study on probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* K4 isolated from chicken intestine

คมแข พิลาสมบัติ[1] นวลพรรณ งามยิ่งสุน[2] และอดิศร เสวตวิวัฒน์[3]

บทคัดย่อ

Lactobacillus salivarius K4 เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ และสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ โดยศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส pH 4) การเจริญที่ pH 2, 2.5, 3 และ 3.5 การเจริญเมื่อสัมผัสกับน้ำดีสังเคราะห์ (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1 % น้ำดี ox-bile ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 % ความเข้มข้นของน้ำดีไก่สด 3 % รวมถึงการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองที่น้ำย่อยของกระเพาะ pH 2, 3, 4 และ 7 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถเจริญได้ที่ pH 3-3.5 เชื้อสามารถเจริญในน้ำดี ox-bile ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 12 % น้ำดีไก่สด 3 % มีผลทำให้เชื้อมีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำดีสังเคราะห์ได้ และเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยจำลองที่ pH 3, 4 และ 7 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะ จำลองไปถึงลำไส้จำลองได้ นอกจากนี้ *Lb. salivarius* K4 ยังสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเป็นเชื้อโปรไบโอติกของ *Lb. salivarius* K4 ที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต

คำสำคัญ: ระบบทางเดินอาหารจำลอง, *Lactobacillus salivarius*, โปรไบโอติก

Abstract

Lactobacillus salivarius K4 was isolated from chicken intestine. This strain produced bacteriocins against several bacteria. According to the effective inhibiting activities of this strain, its probiotic properties were therefore, further studied. The inhibition activity of cell free supernatant (CFS, pH 4) against indicator strains both gram positive and negative and strain survival *in vitro* study were determined at pH 2, 2.5, 3 and 3.5, concentration of bile salts 0, 0.3, 0.6 and 1%, concentration of ox-bile at 0, 3, 6, 9 and 12%, and also fresh chicken bile in MRS at 3%. The percentage of cell survival in gastrointestinal tract model was performed at pH 2, 3, 4 and 7. Besides, antibiotic susceptibility for this strain was also study. Its antimicro bial activity showed that this strain inhibited both gram positive and negative in CFS and survived pH 3-3.5. This strain could survival in ox-bile concentration up to 12%. However, in the presence of 3% chicken

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[3]สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bile revealed slightly decreased in cell number, but no survival was found in bile salts. This strain survived in gastrointestinal tract model at pH 3, 4 and 7. On the contrary, *Lb. salivarius* K4 was completely destroyed in the presence of gastric juice at pH 2. *Lb. salivarius* K4 was resistant to Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin and Streptomycin. This study indicated that *Lb. salivarius* K4 could be used as probiotic for food-industry in the future.

Keywords: Gastrointestinal tract model, *Lactobacillus salivarius*, probiotic

คำนำ

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (อัจฉรา, 2550) โปรไบโอติกที่มีการศึกษามากที่สุดคือกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก (Fernández *et al.*, 2003) แบคทีเรียกรดแลกติกพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ (อัจฉรา, 2550) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ เช่น *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius* เป็นต้น (Slover, 2008) *Lb. salivarius* K4 แยกได้จากลำไส้ไก่ สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ Salivaricin B และ Salvicin K ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อดังกล่าว สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124 ^{T}, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Bacillus coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T (Pilasombut *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง

Lb. salivarius K4 เจริญได้ดีในอาหารเหลว MRS (De Man-Rogosa and Sharpe, Merck, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Pilasombut, 2006) เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้าย 15 % (v/v) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งแสดงใน Table 1

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lown (ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.*, 1999) โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1.5 % ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว ถ่ายเชื้อทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 % ซึ่งหลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อเป้าหมายที่เตรียมไว้ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นหยดสารละลายใสปราศจากเซลล์ที่ไม่ปรับ pH (pH 4) และผ่านการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวอาหาร รอจนสารละลายซึมผ่านวุ้น นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิด (Table 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด น้ำดีสังเคราะห์ และน้ำดี Ox-bile

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

การทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีไก่สด

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

การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง

ถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 % ลงในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย NaCl 0.9 % (w/v) ละลายเซลล์แบคทีเรียในน้ำย่อยสังเคราะห์ (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, $NaHCO_3$ 45 mM และ pepsin 3 % ปรับ pH เป็น 2, 3, 4 และ 7 โดยใช้ HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอด หลังจากผ่านไป 180 นาที ในกระเพาะอาหารจำลอง นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที (4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) เทน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง นำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ไปแขวนลอยในของเหลวในลำไส้จำลอง (pancreatin 0.1 % และ bile salts 0.15 % ปรับ pH เป็น 8 โดยใช้ NaOH) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (37 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น รายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml (Zárate *et al.*, 2000)

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทำตามวิธีการของ Quinn *et al.*, (1994) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน ทำการ swab เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS จนทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ ลงบนอาหารที่มีเชื้ออยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนาน 16 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใส (clearzone) ที่เกิดขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ Ampicillins (10 µg),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chloramphenicol (30 µg), Cephalothin (30 µg), Erythomycin (15 µg), Gentamycin (10 µg), Kanamycin (30 µg), Naldixic acid (30 µg), Neomycin (30 µg), Nitrofurantoin (300 µg), Norfloxacin (10 µg), Novabincin (5 µg), Oxolini cacid (2 µg), Tetracyclin (30 µg), Sulfamethoxazole/Trimethoprim (25 µg/1.5 µg) และ Oxytetracyclin (30 µg)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการศึกษาพบว่าสารยับยั้ง (น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส pH 4) ที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด (Table 1) โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกจะได้กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กโดยเกิดควบคู่กับการลดลงของค่า pH ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเนื่องจากกรดอินทรีย์ทั้งกรดอะซิติกและกรดแลกติก เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดได้ ส่งผลให้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มี pH สูงกว่าภายนอก และเกิดการแตกตัวของกรดให้ไอออนลบและโปรตอน ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นเช่น substrate translocation และ oxidative phosphorylation (อรวรรณ, 2546) โดย Murry *et al.*, (2004) รายงานว่า *Lb. salivarius* สามารถสร้างกรดแลกติกและกรดอะซิติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, S. Typhimurium และ *C. perfringens* จากผลการทดลองในครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Pilasombut *et al.*, (2005) ซึ่งรายงานว่าแบคเทอริโอซิน (น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส pH 6) ที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Lec. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *E. faecalis* JCM 5803^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T จะเห็นได้ว่าเมื่อแบคเทอริโอซินทำงานร่วมกับกรดที่เชื้อสร้างขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้น

ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรดของ *Lb. salivarius* K4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 3.0 และ 3.5 โดยมีการเจริญของเชื้อถึง 7.23 และ 7.63 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2.0 และ 2.5 (below the limit of detection) (Table 2) ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Vinderola and Reinheimer, 2003) ซึ่งค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะอาจจะแตกต่างกันตั้งแต่ 2.0-3.5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการกินอาหาร ระยะการเจริญหรือชนิดของสัตว์ โดยพบว่าค่า pH ในกระเพาะแท้และกึ๋นของไก่ มีค่าตั้งแต่ 2.5-4.74 และการย่อยอาหารจะใช้เวลา 1-3 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร (Musikasang *et al.*, 2009) จากการศึกษาครั้งนี้หากพิจารณาค่า pH ภายในระบบทางเดินอาหารไก่ พบว่า *Lb.salivarius* K4 มี%การมีชีวิตรอดสูงที่ pH 3.0-3.5 แต่ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH ต่ำกว่า 3.0 ในขณะที่ภายในกระเพาะอาหารของคนมีค่า pH อยู่ระหว่าง 1.0-2.5 (McDowell *et al.*, 2007) Erkkilä and Petäjä (2000) รายงานว่าเมื่อมีอาหารค่า pH ในกระเพาะอาหารจะเพิ่มขึ้นถึงระดับ pH 3 และอาหารจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารของมนุษย์นาน 2-4 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดในสภาวะดังกล่าว

การทดสอบความสามารถในการเจริญในน้ำดีสังเคราะห์, ox-bile, และน้ำดีไก่สด

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญในน้ำดีสังเคราะห์ พบว่า *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดีสังเคราะห์ (below the limit of detection) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า *Lb. salivarius* K4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ คือ 3, 6, 9 และ 12 % แต่มีการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่มควบคุม (Table 2) นอกจากนี้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถอยู่รอดได้เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่ระดับความเข้มข้น 3 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักยกเว้นเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดนาน 24 ชั่วโมง พบการลดลงของเชื้อ 2.91 log cfu/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 1) ซึ่งความสามารถในการอยู่รอดภายใต้การทำงานของน้ำดีเป็นหลักการทั่วไป ที่ใช้เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติก เนื่องจากน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ (Taranto *et al.*, 2006) น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.5-2.0 % ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณ 0.3 % (Noriega *et al.*, 2004) ส่วนในลำไส้เล็กของไก่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 10-11 มิลลิโมลต่อกิโลกรัมของอาหารที่กิน (Knarreborg *et al.*, 2003) สัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบของน้ำดีแตกต่างกัน เช่น ในไก่มีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ 100 % ส่วนในโคมีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 50 % และในคนมีเกลือน้ำดี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบหลักโดยมี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 16-27 % ซึ่งเกลือน้ำดีที่มี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ จะมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มากกว่าเกลือน้ำดีที่มี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเกลือน้ำดีที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น taurine conjugate จึงผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง (Oomen *et al.*, 2004) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบน้ำดีต่างชนิดกันคือ น้ำดี bile salts, ox-bile และน้ำดีไก่สด ซึ่งพบว่า bile salts สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ได้ ในขณะที่ ox-bile และน้ำดีไก่สด มีผลต่อการลดลงของเชื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลอง

จากการทดสอบความสามารถของ *Lb. salivarius* K4 ในการมีชีวิตรอดผ่านน้ำย่อยกระเพาะ และน้ำย่อยลำไส้จำลอง โดยน้ำย่อยจำลองที่ใช้ทดสอบ มีค่า pH ต่าง ๆ ได้แก่ 2, 3, 4 และ 7 พบว่า *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยของกระเพาะที่มีค่า pH 2 ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 พบว่า เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้น แต่พบว่า จำนวนเชื้อลดลงเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะเป็นเวลาที่นานขึ้น เชื้อสามารถมีชีวิตรอดเพียง 4.40 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะนาน 180 นาที และมีชีวิตรอดเพียง 1.29 log cfu/ml เมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้นาน 180 นาที ในน้ำย่อยที่มีค่า pH 4 ที่ระยะเวลาสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะนาน 90 และ 180 นาที เชื้อ *Lb. salivarius* K4 มีชีวิตรอดมากถึง 7.25 และ 5.07 log cfu/ml ตามลำดับ (Figure 2) ค่า pH ที่ต่ำและการทำลายแบคทีเรียของเอนไซม์เปปซินซึ่งพบในกระเพาะอาหาร มีผลต่อการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ (Huang and Adams, 2004) กลไกในการรักษาระดับ pH ของแบคทีเรียคือการปล่อยโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ H^+- ATPase และใช้พลังงานจาก ATP ค่า pH ที่ต่ำสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียต้องใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นเพื่อรักษาระดับ pH ภายในเซลล์ให้อยู่ในภาวะสมดุล (McDonald *et al.*, 1990) เชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้จำลอง แต่มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยเป็นเวลาที่นานขึ้น (Figure 2) ในลำไส้เล็กประกอบด้วยเกลือน้ำดีและ pancreatin ในลำไส้เล็กมีค่า pH ประมาณ 8.0 (Huang and Adams, 2004) เกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็วเป็นเหตุให้โปรตีนแทรกที่เยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) แยกออกมา ซึ่งส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาและเซลล์ตายไปในที่สุด (Begley *et al.*, 2005) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่อยู่ภายในลำไส้ไก่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase) (Knarreborg *et al.*, 2003) ทำให้น้ำดีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง แบคทีเรียจึงสามารถทนต่อน้ำดีได้ (Erkkilä and Petäjä, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 List of indicator strains, growth condition and antimicrobial activity of *Lb. salivarius* K4 against the strains

Indicator strains	Media	Temperature (°C)	Antimicrobial activity of *Lb. salivarius* K4
Lactic acid bacteria			
Lactobacillus plantarum ATCC 14917^T	MRS	30	-
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	MRS	30	+
Lactobacillus sakei TISTR 890	MRS	37	-
Lactococcus cremoris TISTR 1344	MRS	30	-
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T	MRS	30	-
Leuconostoc mesenteroides TISTR 942	MRS	30	-
Enterococcus feacalis JCM 5803^T	MRS	37	-
Enterococcus feacalis TISTR 888	MRS	37	-
Streptococcus sp. TISTR 1030	MRS	30	-
Other gram positive bacteria			
Bacillus coagulans JCM 2257^T	TSB-YE	37	+
Bacillus coagulans TISTR 1447	TSB-YE	37	+
Listeria innocua ATCC 33090^T	TSB-YE	37	+
Brochotrix campestris NBRC 11547^T	TSB-YE	26	+
Staphylococcus aureus TISTR 118	TSB-YE	37	-
Other gram negative bacteria			
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^T	TSB-YE	26	+
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	TSB-YE	26	+
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	NB	30	+
Salmonella Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37	+
Escherichia coli TISTR 780	TSB-YE	37	-

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville. Md
JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan
NRBC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center
TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research
TSB – YE = Tryptic soy broth (Merck, Germany) + 0.6% Yeast extract (Merck, Germany)
NB = Nutrient broth (Merck, Germany); MRS = De Man Rogosa and Sharpe (Merck, Germany)
+ = Inhibition zone; - = No inhibition zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 Survival of *Lb. salivarius* K4 grown in MRS broth at 37 °C for 16 hr under various pH, concentration of bile salts and ox-bile

Treatments	Viable cells count (log cfu/ml)
pH value	
control	10.45±0.04
2.0	Below the limit of detection
2.5	Below the limit of detection
3.0	7.23±0.17
3.5	7.63±0.12
Bile salts concentration (%)	
0	11.55±1.80
0.3	Below the limit of detection
0.6	Below the limit of detection
1	Below the limit of detection
Ox-bile concentration (%)	
0	10.77±0.03
3	6.48±0.18
6	6.91±0.30
9	7.47±0.25
12	6.43±0.26

ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความสามารถของ *Lb. salivarius* K4 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 18 ชนิด ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่นำมาใช้ในการรักษาคน และสัตว์ พบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin มีรายงานว่าการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีพื้นฐานมาจาก 2 ปัจจัยด้วยกันคือ การมียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และการปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ ยีนต้านทานที่มีอยู่เองของแบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะโดยไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นๆ ได้ ส่วนความต้านทานที่แบคทีเรียได้รับมาอาจมีการถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นได้ ความต้านทานที่ได้รับมาช่วยให้แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้เนื่องจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจีโนม หรือการได้รับยีนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะช่วยให้เกิดการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียได้เนื่องจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการเข้าจับของยาปฏิชีวนะ ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไปสู่สัตว์และมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักซึ่งไม่ผ่านความร้อนก่อนการบริโภคจึงเป็นพาหะที่สำคัญต่อการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียไปสู่เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในสัตว์และในระบบทางเดินอาหารมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียกรดแลกติกไปสู่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (Mathur and Singh, 2005) Lactobacilli บางสายพันธุ์มียีนต้านทานที่มีอยู่เองซึ่งสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ bacitracin, gentamicin, metronidazole, notrofurantoin, norfloxacin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

norfloxacine, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim/sulphamethoxazole และ vancomycin (Danielsen and Wind, 2003) นอกจากนี้หลาย ๆ สายพันธุ์ของ *Lb. salivarius* มียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นยีนที่มีอยู่เอง และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin (Elisha and Courvalin, 1995) และ D'Aimmo *et al.*, (2007) รายงานว่า ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติก เป็นความสามารถของเชื้อในการที่จะอยู่รอดได้เมื่อเจ้าบ้านได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ

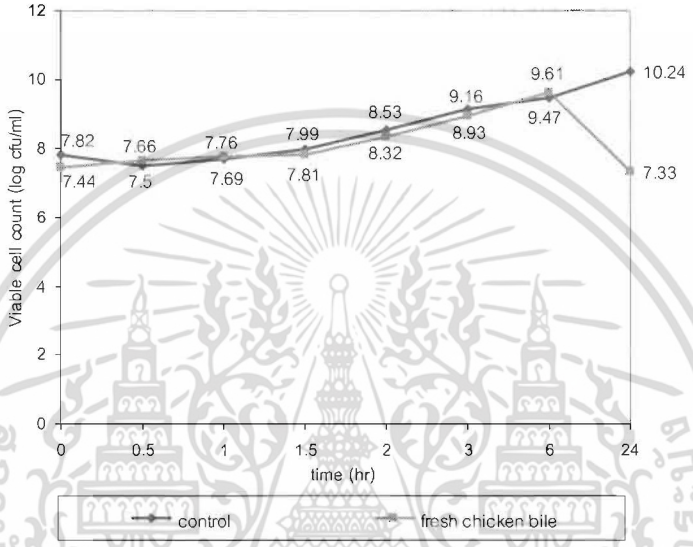

Figure 1 Viability of *Lb. salivarius* K4 in the presence of 3% fresh chicken bile
Control = viable cell count (log cfu/ml) of *Lb. salivarius* K4 in control group
fresh chicken bile = viable cell count (log cfu/ml) of *Lb. salivarius* K4 in 3% fresh chicken bile

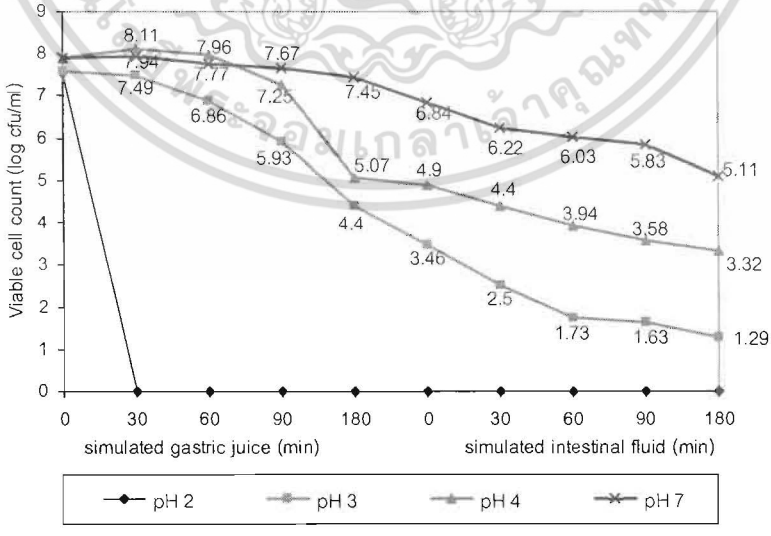

Figure 2 Viability of *Lb. salivarius* K4 in the presence of simulated gastric juice pH 2, 3, 4 and 7 (0-180 min) and simulated intestinal fluid (0-180 min)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lb. salivarius* K4 ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากลำไส้ไก่ สามารถเจริญและทนต่อกรดได้ที่ pH 3-3.5 ทนต่อน้ำดี ox-bile และ น้ำดีไก่สดที่ความเข้มข้นสูงได้ รวมถึงมีแนวโน้มในการเป็นเชื้อในกลุ่มโปรไบโอติก คือทนและมีชีวิตรอดอยู่ในกระเพาะและลำไส้จำลองได้ นอกจากนี้ *Lb. salivarius* K4 ยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิดทั้งแกรมบวก และแกรมลบ รวมทั้งยังสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทั่วไปในคนและสัตว์อีกด้วย ซึ่งจากผลลัพธ์ที่ได้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่มีความเป็นไปได้ในการนำ *Lb. salivarius* K4 ไปใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ โดยความร่วมมือระหว่าง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

อรวรรณ ละอองคำ. 2546. การจำแนกเชื้อและการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลกติก. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

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

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

D'Aimmo, M.R., Modesto, M. and Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. Int. J. Food Microbiol. 115 : 35-42.

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

Elisha, B.G. and P. Courvalin. 1995. Analysis of genes encoding d-alanine: d-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. Gene. 152 : 79–83.

Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 1999. Investigation of bacteriocin production and purification from Nukadoko isolates displaying antimicrobial activity. Japanese J. Lactic Acid Bacteria. 10 : 29-36.

Erkkilä, S. and E. Petäjä. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Sci. 55 : 297-300.

Fernández, M.F., S. Boris and C. Barbés. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gasirointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 94 : 449-445.

Gilliland, S.E., Stanley, T.E. and Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67 : 3045-3051.

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

Hyronimus, B., C.L. Marrec, A.H. Sassi and A. Deschamps. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 61 : 193-197.

Knarreborg, A., S.K. Jensen and R.M. Engberg. 2003. Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured in vitro and in vivo. J. Nutr. Biochem. 14 : 259-265.

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

McDonald, L.C., H.P. Fleming and H.M. Hassan. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2120-2124.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McDowell, A. and B.J. McLeod. 2007. Physiology and pharmacology of the brush tail possum gastrointestinal tract: Relationship to the human gastrointestinal tract. Adv. Drug Deliv. Rev. 59 : 1121-1132.

Murry, A.C., A. Hinton and H. Morrison. 2004. Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillua plantarum*. Int. J. Poult. Sci. 3(9) : 603-607.

Musikasang, H., A. Tani, A. H-kittikun and S. Maneerat. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. World J. Microbiol. Biotechnol. 25 : 1337-1345.

Noriega, L., M. Gueimonde, B. Sanchez, A. Margolles and C.G. Reyes-Gavilan. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. Int. J. Food Microbiol. 92 : 79-86.

Oomen, A.G., C.J.M. Rompelberg, E. Van de Kamp, D.P.K.H. Pereboom, L.L. De Zwart and A.J.A.M. Sips. 2004. Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46 : 183-188.

Pilasombut, K., W. Wajjwalku, S. Nitisinprasert, A. Swetwiwathana, T. Zendo, J. Nakayama, K. Sonomoto and T. Sakpuaram. 2005. Screening and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestine. Kasetsart J. (Nat. Sci.). (39) : 612-621.

Pilasombut, K. 2006. Purification and characterization of bacteriocins by *Lactobacilus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.

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

Slover, C.M. 2008. *Lactobacillus* : a review. Clin. Microbiol. Newsletter. 30: 23-27.

Taranto, M.P., G. Perez-Martinez and G.F. de Valdez. 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Res. Microbiol. 157 : 720-725.

Vinderola, C.G. and J.A. Reinheimer. 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.

Zárate, G., A.P. Chaia, S. González and G. Oliver. 2000. Viability and β-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. J. Food Prot. 63: 1214-1221.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้