รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

Preliminary probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from fermented meat products

ผศ. ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์
นายจิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงานวิจัย
จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ : คุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

แหล่งเงินทุน : งบประมาณเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559

หัวหน้าโครงการวิจัย : ผศ. ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์

ผู้ร่วมวิจัย : นายจิรโรจน์ นิธิสันถะคุปต์

หน่วยงาน : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจำนวน 42 ตัวอย่าง ได้แก่ แหนมหมู แหนมไก่ แหนมเนื้อ และไส้กรอกอีสาน ที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานคร จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจำนวนทั้งหมด 325 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ดีเยี่ยมจำนวน 246 ไอโซเลท (73.65%) และเจริญได้ดีจำนวน 17 ไอโซเลท (5.09%) จากนั้นทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* ด้วยวิธีการ agar spot พบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท (18.30%) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทุกสายพันธุ์ โดยมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 3 และ 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตในสภาวะกรดที่ค่า pH 2 และ 3 โดยมีปริมาณ 10^{1} - 10^{2} และ 10^{1} - 10^{3} cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทสามารถทนและเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1% โดยมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท ที่สามารถทนในสภาวะที่ค่า pH 2 - 3 และเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1% ได้มากกว่า 60 % ซึ่งมีสมบัติของโปรไบโอติกเบื้องต้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The aims of this study were to screen and select for preliminary property of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented meat products. The LABs were isolated from fermented meat products such as pork Nham, chicken Nham, beef Nham and fermented sausages for 42 samples that were distributed in Bangkok 's local markets. The 325 isolates were screened as LAB. The excellent and well growth rate of LABs were 246 isolates (73.65%) and 17 isolates (5.09 %), respectively. The antibacterial activity of LABs against bacterial pathogen was detected by agar spot test that four indicator bacteria were *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*. All pathogens were inhibited growth by 26 LAB isolates (18.30%). In acid condition at pH 3 and 4, the 3 and 26 LAB isolates survived range in 10^1 - 10^2 and 10^1 - 10^3 cfu/ml, respectively. However, all LAB isolates tolerant and grow in 0.3, 0.6 and 1% bile salt conditions. The 8 LAB isolates tolerant at pH 2-3 condition and grow more than 60% in 1% bile salt condition. These LABs are preliminary probiotic property and suitable probiotic culture that will be applied to in fermented meat products.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ ที่กรุณาให้ความรู้ในเรื่องงานวิจัย และให้คำปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์จากคุณอังคณา ทุมดี

โครงการวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2559 ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผุสดี ตังวัชรินทร์

จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ข

ABSTRACT ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 อาหารหมัก 4

2.2 แบคทีเรียแลคติก 5

2.3 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 8

2.4 โปรไบโอติก 9

2.5 โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 10

2.6 การคัดเลือกโปรไบโอติกจากอาหารหมัก 12

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง 25

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 30

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 40

บรรณานุกรม 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของ *L. fermentum* จำนวน 35 สายพันธุ์……..14
ภายหลังการบ่มที่ pH 3.0 เป็น เวลา 72 ชั่วโมง
ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ……..16
ในน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5
ตารางที่ 3 ความทนต่อเกลือน้ำดี *L. fermentum* วัดเป็นเวลาล่าช้า…….....…18
จากความเข้มข้น 0.3% ของเชื้อจำนวน 11 สายพันธุ์
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การจัดเรียงตัวของ *L. Fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์…….....19
ตารางที่ 5 กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 5 สายพันธุ์…….....20
ตารางที่ 6 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%) ……21
ตารางที่ 7 ความอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกที่ทนต่อเกลือน้ำดี 24
ในสภาพการย่อยอาหารจำลอง
ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียแลคติกแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ 30
วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ
ตารางที่ 9 จำนวนไอโซเลทแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 31
ที่วางจำหน่ายใน ตลาดสดกรุงเทพ ฯ
ตารางที่ 10 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกคัดแยกจาก 32
ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วาง จำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ
ตารางที่ 11 เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกคัดแยกจาก 33
ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วาง จำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ
ตารางที่ 12 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้ง 34
การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค
ตารางที่ 13 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ 35
ตารางที่ 14 เปอร์เซนต์การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆ …….....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่ pH 2.5 ในระบบทางเดิน…….15
-อาหารเทียม และในลำไส้เทียม (pH 8)
ภาพที่ 2 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* F6 ในกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2.0 (T1) ……17
และลำไส้เทียม pH 8.0 (T2) ความทนทานต่อการน้ำในลำไส้จำลอง (pH 8.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

โปรไบโอติก ในระบบทางเดินอาหารมีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน ให้ผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยมีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติก และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ อีกทั้งสร้างสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์ให้ดีขึ้น (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) โปรไบโอติกที่มีการศึกษามากที่สุด คือ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) (Fernández *et al*. 2003) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) ให้เกิดกรดแลกติก (lactic acid fermentation) กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และสารอื่น เช่น hydrogen peroxide และ diacetyl ซึ่งทำให้เกิดกลิ่น และรสของอาหารหมัก อีกทั้งแบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) (Food Network Solution. 2010)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักมีหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก (Ammor *et al.* 2006) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในอาหารหมักประเภทต่างๆ ดังนั้นในปัจจุบันการแยก และคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เช่น Lee *et al.* (2006) แยกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิ ซึ่งเป็นอาหารหมักของประเทศเกาหลี และศึกษาความเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอก ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งหมด 31 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกได้ดีที่สุด คือ *Lactobacillus plantarum*

อัจฉรา หนูเพชร และคณะ (2547) คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย 22 ชนิด จำนวน 179 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 327 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าว 67 สายพันธุ์ เมื่อนำทั้ง 67 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 13 สายพันธุ์ (*Stapphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus cereus Shigella sonnie S. flexneri Proteus vulgaricus P. rettgeri Enterobacter cloacae E. aerogenes Escherichia coli* ATCC 25922 *E. coli* O157:H7 *Salmonella* Typhimurium *S.* Typhi และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร คือสายพันธุ์ LA6 LA13 LA71 LA102 และ LA198 ซึ่ง LA71 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหนมเมื่อนำไปเทียบเคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์พบว่าเป็น *L. plantarum* นอกจากนี้ สมใจ ศิริโภค และคณะ (2550) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อของไทย 3 ชนิด จำนวน 13 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบว่ามีเพียง 14 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Stapphylococcus aureus* TISTR118 โดยมี 4 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี agar well diffusion assay

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานครที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และสามารถรอดชีวิตในสภาวะกรด และเกลือน้ำดีได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้

2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่สามารถเจริญได้ดี และมีการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ

3. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่สามารถรอดชีวิตในช่วงพีเอชต่าง ๆ และเกลือน้ำดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และทดสอบสมบัติแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในตลาดสด จำนวน 42 ตัวอย่าง

การทดลองที่ 2 การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ ศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ทดสอบสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes* *S. aureus* *Salmonella* Rissen และ *E. coli* โดยวิธี agar spot และศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH ต่างๆ และศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในความเข้มข้นต่าง ๆ ของเกลือน้ำดี (ความเข้มข้น 0 0.3 0.6 และ 1.0%)

1.4 ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย

1 ปี (ต.ค. 2558 – ก.ย. 2559)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. คัดเลือกได้แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

2. สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยระดับชาติ (National Conference)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา เช่น อะไมเลส โปรติเอส ไลเปส เป็นต้น จะไปเปลี่ยนสารประกอบพวก polysaccharide โปรตีน และไขมัน ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยพร้อม ๆ กับเพิ่มกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสให้กับผลิตภัณฑ์ด้วย (Steinkraus. 1997)

กระบวนการหมักอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณลักษณะของวัตถุดิบ เช่น เพิ่มกลิ่น รส เนื้อสัมผัส วิตามิน โปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และสามารถเก็บอาหารได้นานขึ้น (Holzapfel. 2002; Motarjemi. 2002)

Leroy and de Vuyst (2004) แบ่งอาหารหมักออกเป็น 6 ชนิด คือ

1. ผลิตภัณฑ์จากนม (dairy products) ได้แก่ hard cheeses without eyes, cheeses with small eyes, Swiss-and ltailan-type cheeses, butter and buttermilk, kefir, fermented milk และ yoghurt

2. เนื้อหมัก (fermented meats) ได้แก่ fermented sausage (Europe) และ fermented sausage (USA)

3. ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (fermented fish products)

4. ผักดอง (fermented vegetables) ได้แก่ sauerkraut, pickles, fermented olives และ fermented vegetables

5. ซอสถั่วเหลือง (soy sauce) และธัญพืชหมัก (fermented cereals) ได้แก่ sourdough

6. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverages) ได้แก่ wine และ rice wine

Steinkraus (1997) จำแนกอาหารหมักออกเป็น 7 ประเภท ได้แก่

1. การหมักกรดแลคติก เช่น sauerkraut กิมจิของเกาหลี แตงกวา และผักดอง นมหมัก โยเกิร์ต kefir และชีส ของรัสเซีย โยเกิร์ตผสมข้าวสาลี kishk ของอียิปต์ trahanas ซึ่งผสมข้าว สุก กุ้ง และปลาหมึกรวมกันของกรีก balao balao burong dalag และขนมปัง sour-dough ของฟิลิปปินส์ idli ของอินเดีย enjera ของเอธิโอเปีย kisra ของซูดาน และ pout ของฟิลิปปินส์ วิเชียร (2534) แบ่งผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็น 2 ประเภท คือ

1.1 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช ได้แก่ ขนมจีน ก๊วยจั๊บ ซีเซ็กจั๊บ ตั้งฉาย เกี๊ยมจ่าย ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2) ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ นมหมัก แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว กะปิ กุ้งจ่อม หรือกุ้งส้ม กุ้งเจ่า ปลาเจ่า ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ปลาร้า และปลาหมัก (ส้มฟัก) เป็นต้น

2. อาหารหมักเพื่อผลิตเนื้อสัมผัสใหม่ให้มีลักษณะคล้ายเนื้อแต่ใช้วัตถุดิบจากพืช เช่น tempe และ ontjom ของอินโดนีเซีย

3. อาหารที่ใช้เกลือในปริมาณสูงโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีโปรตีนในปริมาณสูง เช่น ซอสของประเทศจีน shoyu และ miso ของญี่ปุ่น น้ำปลา (nuocmam) ของเวียดนาม patis และ bagoong ของฟิลิปปินส์ และ mam ของเวียดนาม

4. การหมักแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์องุ่น pulque ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่ทำจากต้น agave ของแมกซิโก ไวน์น้ำผึ้ง (honey wines) chichi และเบียร์ของอินเดีย ไวน์จากอินทผาลัม และขนุน ของอินเดีย ไวน์จากอ้อย เหล้าสาเกของญี่ปุ่น tape ของอินโดนีเซีย loc-chao ของจีน และไวน์จากข้าวของไทย

5. การหมักกรดอะซิติก เช่น เหล้าแอปเปิ้ล และน้ำส้มสายชูของประเทศแถบตะวันตก น้ำส้มสายชูจากไวน์อินทผาลัมในแอฟริกา และตะวันออกไกล น้ำส้มสายชูจากมะพร้าวของฟิลิปปินส์ tea fungus หรือ kombucha ของยุโรป แมนจูเรีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น และอเมริกา และวุ้นสวรรค์ของฟิลิปปินส์

6. การหมักที่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีพีเอชสูง เช่น dawa dawa ของไนจีเรีย iru ของแอฟริกา kenima ของอินเดีย natto ของญี่ปุ่น และถั่วเน่าของไทย

7. การหมักขนมปังโดยใช้เชื้อยีสต์ของประเทศแถบตะวันตก และขนมปัง sour dough

2.2 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อสร้างพลัง และกรดอินทรีย์จากกระบวนการหมัก แบ่งกระบวนการหมักออกเป็น 3 ลักษณะ (Holzapfel and Wood. 1995; Litchfield. 1996) ดังนี้

2.2.1 Obligative homofermenter หมายถึง แบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดแลกติกอย่างเดียว กลไกการเกิดกรดแลคติกเป็นไปตาม Embden-Meyerhof-Parnas pathway]จะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นแลกเตส (lactate) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตกรดแลคติกชนิด D และกรดแลกติกชนิด L ได้ประมาณ 95% ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ มีรูปร่างเป็นแบบแท่งได้แก่ *Lactobacillus* และรูปร่างกลมได้แก่ *Leuconostoc* และ *Enterococcus* เป็นต้น

2.2.2 Facultative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดแลคติก 50% กรดอะซิติก หรือเอทานอล 25% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 25% ผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phoshoketolase pathway สามารถผลิตน้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลูโคสได้ เช่น เฮกโซส เพนโตส อาราบิโนส ไรโบส ไซโรส ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus plantalum*

2.2.3 Obligative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคส 1 mol แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก 1 mol กรดอะซิติก หรือเอทานอล 1 mol และคาร์บอนไดออกไซด์ 1 mol ผ่าน Phoshoketolase pathway สามารถผลิตน้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลูโคสได้ เช่น เฮกโซส เพนโตส ได้ดี ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc* spp. *Lactobacillus brevis* และ *L. buchneri*

แบคทีเรียแลคติกพบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์นม ธัญพืช เนื้อสัตว์ ปลา ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ และผักดอง อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536; Salminen and Wright. 1993) แบคทีเรียแลคติกมีประวัติการใช้เป็นกล้าเชื้อมาเป็นเวลายาวนานในกระบวนการหมัก เพื่อรักษาคุณค่าทางอาหารในอาหารแต่ละประเภท ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลไม้ดอง ผักดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และปลาหมักเปรี้ยวชนิดต่าง ๆ (วรรณดี บัญญัติ และคณะ. 2542; Ammor *et al*. 2006) เพราะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยผลิตกรดแลคติกออกมาทำให้ค่าพีเอชลดลง (Daeschel. 1989) และผลิตสารประกอบชนิดต่าง ๆ แบ่งออกเป็น สารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิทิล สารประกอบที่ไม่สามารถระบุคุณลักษณะได้ (unchaeacterized compounds) และสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น แบคเทอริโอซิน (Jay. 1982; Klaenhammer. 1988; Piard and Desmazeaud. 1991; 1992) สารประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ทำให้เก็บอาหารได้นานขึ้น (Ammor *et al*. 2006)

ระดับ และชนิดของกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ขึ้นอยู่กับชนิด หรือสายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะในการเจริญ ซึ่งกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์กลุ่มหลักของกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียแลกติก (Lindgren and Dobrogosz. 1990) และผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์เกิดขึ้นเนื่องจากกรดอินทรีย์แพร่เข้าไปในไซโตพลาสซึม ทำให้พีเอชในไซโตพลาสซึมลดลง และมีสภาพเป็นกรด ส่งผลทำให้การทำงานของเซลล์หยุดลงเนื่องจากพีเอชไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Podolak *et al.* 1996)

แบคทีเรียแลคติกผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยเอนไซม์ flavoprotein oxidase หรือ nicotinamide adenine dinuclcotide (NADH) peroxidase ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยา oxidation ของ sulfhydryl groups ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์หลายชนิดถูกทำลาย และจากการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้รูที่เยื่อหุ้มเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นทำให้สูญเสียความสามารถในการย่อยให้สารผ่านเข้าออก (Kong and Davison. 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม heterofermentative bacteria (Ammor *et al.* 2006) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคาร์บอนได ออกไซด์ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามคาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบพวกที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Farber. 1991) และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 20-50% (v/v) สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ (Lindgren and Dobrogosz. 1990)

ไดอะซิทิลเป็นสารประกอบที่มีกลิ่นหอมที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นจากกระบวนการใช้ citrate (Ammor *et al.* 2006) ไดอะซิทิลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบโดยจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine utilization ซึ่ง Jay (1982) พบว่า แบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อไดอะซิทิลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยไดอะซิทิลที่ความเข้มข้น 200 μg/ml สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ และไดอะซิทิลที่ความเข้มข้น 344 μg/ml สามารถยับยั้ง *Listeria Salmonella Yersinia E. coli* และ *Aeromonas* ได้

แบคเทอริโอซินสารจำพวกโปรตีน ซึ่งสังเคราะห์จากไรโบโซมของแบคทีเรียมีผลยับยั้ง และฆ่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Spellhaug and Harlander. 1989) กลไกการยับยั้งเกิดจากแบคเทอริโอซินทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรูจึงเกิดการรั่วไหลของโปรตอนภายในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดความไม่สมดุลภายในเซลล์ (Montville *et al.* 1995)

สมาชิกที่สำคัญในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ สกุล *Streptococcus Vagococcus Lactococcus Enterococcus Pediococcus Tetragenococcus Aerococcus Leuconostoc Carnobacterium* และ *Lactobacillus* เป็นต้น การจัดจำแนกสกุลของแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้อาศัยทั้งลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี ปัจจุบันได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการจัดหมวดหมู่ ทำให้มีความชัดเจนถูกต้องมากขึ้น (วรรณดี บัญญัติ และคณะ. 2542)

2.3 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก (Ammor *et al.* 2006) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่าง ๆ ดังนั้นในปัจจุบันการแยก และคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เช่น Belgacem *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียแลกติกจาก Gueddid ซึ่งเป็นเนื้อหมักของประเทศตูนีเซีย พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ MMZ 04 09 13 และ 17 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าทั้งหมดเป็น *Enterococcus faecium* และแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีสมบัติทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำงานได้ดีในช่วง pH 3-9 ไวต่อ α-chymotrypsin trypsin และ proteinase K แต่ไม่ไวต่อ lysozyme และ lipase

Liu *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียแลคติกจาก Xuan-Wei Ham ซึ่งเป็นเนื้อหมักของประเทศจีน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้สายพันธุ์ 31-1 เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus pentosus* 31-1 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีชื่อว่า pentocin 31-1 แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีขนาด 14.2 kDa และสามารถยับยั้ง *Listeria* spp. *Staphylococcus* spp. *Bacillus* spp. *Lactobacillus* spp. *Streptococcus* spp. *Pediococcus* spp. และ *Escherichia* spp. มีสมบัติทนความร้อน มีความคงตัวในช่วง pH กว้าง และไวต่อ protease

Lee *et al.* (2006) แยกแบคทีเรียแลคติกจากกิมจิ ซึ่งเป็นอาหารหมักของประเทศเกาหลี และศึกษาความเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอก ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งหมด 31 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกได้ดีที่สุด คือ *Lactobacillus plantarum*

Sawatari *et al.* (2005) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปเส้นหมักของจีน พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่แยกมาจากอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ผักดอง เนย ผลิตภัณฑ์นม น้ำมะพร้าว ไส้กรอก ก๋วยเตี๋ยวเส้นหมัก หน่อไม้ดอง น้ำแอปเปิ้ล และกะหล่ำปลีดอง เป็นต้น จากทั้งหมด 46 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus plantarum* 6 สายพันธุ์ คัดเลือกได้ 9 สายพันธุ์ คือ *L. pentorus* จำนวน 3 สายพันธุ์ และ *L. plantarum* 6 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดดีที่สุด และผลิตภัณฑ์ (เส้นบะหมี่) ที่ได้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคคือ *L. plantarum* NRIC 0380 ที่แยกมาจากผักดองของไทย ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 11 g/kg เส้นบะหมี่หลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง และระดับพีเอชลดลงจาก 7.9 เป็น 3.9 โดยระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมที่สุด คือ 1.5 ชั่วโมง ที่ระดับพีเอช 7.5 เส้นบะหมี่ที่ได้จะมีความเหนียวนุ่ม ยืดหยุ่นดี และมีรสเปรี้ยวเล็กน้อย

อัจฉรา หนูเพชร และคณะ (2547) คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย 22 ชนิด จำนวน 179 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 327 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าว 67 สายพันธุ์ เมื่อนำทั้ง 67 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 13 สายพันธุ์ (*Stapphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus cereus Shigella sonnie S. flexneri Proteus vulgaricus P. rettgeri Enterobacter cloacae E. aerogenes Escherichia coli* ATCC 25922 *E. coli* O157:H7 *Salmonella* Typhimurium *S.* Typhi และ *Vibrio parahaemolyticus*) โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร คือสายพันธุ์ LA6 LA13 LA71 LA102 และ LA198 ซึ่ง LA71 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหนมเมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 โปรไบโอติก

โปรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเข้าไปอยู่ในระบบของร่างกายมนุษย์ และสัตว์แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยจุลินทรีย์นั้นทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้ ซึ่งหากจุลินทรีย์โปรไบโอติกสามารถเกาะติดผนังลำไส้ และแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ส่งผลช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดก่อโรคเข้าเกาะติดผนังลำไส้ และหลั่งสารพิษที่มีผลทำให้เยื่อบุลำไส้อักเสบได้ จากสมบัติดังกล่าวจึงได้มีการนำเอาโปรไบโอติกมาใช้ในการรักษา และป้องกันโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่ส่งผลดีต่อสุขภาพในลำไส้ลดลงเช่นกัน

ประโยชน์ต่อสุขภาพของโปรไบโอติก (สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549)

2.4.1 การลดภาวะไม่ทนต่อแลกโตส (lactose intolerance) เป็นผลต่อสุขภาพที่สำคัญของโปรไบโอติก พบว่าประชากรโลกส่วนใหญ่มีปริมาณของเอนไซม์แลกเตส (lactase) ต่ำจึงทำให้แลกโตส (lactose) ไม่สามารถถูกย่อยในทางเดินอาหาร ดังนั้นหลายคนที่ดื่มนมแล้ว เกิดอาการท้องอืด เฟ้อ ท้องเดิน ปวดท้อง โปรไบโอติกในอาหารประเภทนมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ตสามารถช่วยบรรเทาอาการนี้ได้ เนื่องจากโปรไบโอติกได้ช่วยย่อยแลกโตสไปแล้วในระหว่างการหมัก (fermentation) จึงทำให้มีแลกโตสเหลือน้อยกว่าหรือไม่มีเลย

2.4.2 การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด หลักฐานการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ยังไม่สรุปแน่ชัด แต่มีผู้เสนอกลไกที่อาจเป็นไปได้ คือ อาจเนื่องจากคอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด เกลือน้ำดี ดังนั้นถ้าเราเพิ่มการขับออกของเกลือน้ำดีก็จะทำให้มีการกระตุ้นให้มีการนำเอาคอเลสเตอรอลออกมาใช้ในการสังเคราะห์เกลือน้ำดีเพิ่มขึ้น โดยในจุลินทรีย์จะมีเอนไซม์ที่สามารถจับกับกรด เกลือน้ำดี และทำให้กรด เกลือน้ำดีถูกขับออกทางอุจจาระเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้]นอกจากนี้อาจเนื่องจากการที่จุลินทรีย์สามารถนำเอาคอเลสเตอรอลไปใช้ได้โดยตรง ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง

2.4.3 การบรรเทาอาการท้องเดิน เป็นบทบาทหลักของโปรไบโอติก คือ ช่วยลดความรุนแรงของอาการท้องเดิน โดยลดระยะเวลาของโรค และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน กลไกที่เป็นไปได้ คือ การทำให้ลำไส้ใหญ่มีความเป็นกรด จากการผลิตกรดแลคติก (lactic acid) และกรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ อีกกลไกหนึ่ง คือ ทำให้การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น

2.4.4 การป้องกันมะเร็ง ข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่มีความสัมพันธ์กับการกินอาหารไขมันสูง ซึ่งไขมันในอาหารจะกระตุ้นให้มีการหลั่งกรดเกลือน้ำดีในลำไส้ใหญ่มากขึ้น ร่วมกับกรด เกลือน้ำดีอีกส่วนหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียเอง ซึ่งทำให้มีส่วนส่งเสริมให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ นอกจากนี้เอนไซม์ของแบคทีเรียบางชนิดก็จะเปลี่ยนสารบางอย่างในลำไส้ใหญ่ไปเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นกลไกในการต้านมะเร็งของโปรไบโอติก ได้แก่ กดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำงานของสารก่อมะเร็ง ควบคุม หรือเหนี่ยวรั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ในการทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง มีผลต่อการเคลื่อนไหว หรือการบีบตัวของลำไส้ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

2.5 โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ในทศวรรษที่ 1960 การตลาดของอาหารเพื่อสุขภาพเริ่มมีแนวโน้มที่ลดการใช้ส่วนประกอบที่อันตรายต่อสุขภาพ เช่น น้ำตาล และไขมัน ในปี 1970 นี้ต่อเนื่องจนถึงปี 1980 เพื่อลด และขจัดวัตถุเจือปนอาหารเริ่มต้นที่นำไปสู่การเหนี่ยวนำ และนำส่วนประกอบที่มีประโยชน์มาใช้แทน เช่น วิตามิน แร่ธาตุ และโปรไบโอติกในปี 1990 (Työppönen *et al.* 2003) เมื่อเร็วๆ นี้ Tamang and Palni (2010) ได้ศึกษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่าง ๆ จากผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เผ่าพันธุ์ของเทือกเขาหิมาลัยตะวันออก และสามารถต้านจุลชีพที่ใช้งานโดยไม่มีการผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน

การใช้โปรไบโอติกที่ได้พบแนวทางเข้าไปในฟาร์มนมผ่านการใช้ LAB (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโยเกิร์ต) แต่โอกาสที่จะมีเนื้อถูกใช้เป็นอาหารทำงานซึ่งยังคงที่มีการสำรวจ (Zhang *et al.* 2010) โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพนอกเหนือ ไปจากคุณค่าทางโภชนาการมีการดักจับมากเป็นร้อยละการทำงานของตลาดอาหาร เนื้อทำหน้าที่เป็นสื่อที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของโปรไบโอติก และยังได้รับการรายงานเกี่ยวกับการปกป้องจุลินทรีย์กับน้ำดี (Gänzle *et al.* 1999) ในเนื้อการใช้จุลินทรีย์เริ่มต้น เนื้อได้รับการทำการปรับปรุงความปลอดภัยของเนื้อมากกว่าการแนะนำการทำงาน หรือทางสรีรวิทยาคุณภาพ (Leroy *et al.* 2006) ไม่มีความร้อนการรักษามักจะหมักแห้งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ซึ่งให้เงื่อนไขที่เหมาะสมที่จำเป็นสำหรับความอยู่รอดของโปรไบโอติก (Ammor and Mayo. 2007; Arihara. 2006) ยังมีการเสนอว่าสภาพแวดล้อมไส้กรอกอาจปกป้อง lactobacilli โปรไบโอติกในช่วงผ่าน GIT (Klingberg and Budde. 2006) ในอีกแง่หนึ่ง เป็นสารยับยั้ง เช่น ปริมาณสูงของเกลือ pH เป็นกรด และปริมาณน้ำที่ลดลงเกิดจากการอบแห้งสร้างเงื่อนไขที่ไม่พึงประสงค์ เพื่อความอยู่รอดของโปรไบโอติก การคัดเลือกสายพันธุ์โปรไบโอติกส่วนใหญ่กำหนดศักยภาพในเมทริกซ์เนื้อหมัก

สำหรับการแยกเป็นจุลินทรีย์ธรรมชาติที่พบในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ไอโซเลทของไส้กรอกสามารถที่จะได้รับการคัดเลือกแบคทีเรีย หรือเนื้อเริ่มต้นที่วางตลาดแล้วที่ดีกับการอยู่รอด ลักษณะเช่น *Pediococcus acidilactici* PA-2 และ *Lactobacillus paracasei* Lb3 สามารถใช้เพื่อจุดประสงค์นี้ (De Vuyst *et al.*. 2008) เช่นเดียวกับ *L. casei* และ *L. paracasei* ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก (Rebucci *et al.* 2007) โดยคุณสมบัติที่ใช้ในการพิจารณาถึงโปรไบโอติกที่มีศักยภาพนั้น ต้องคำนึงถึงการมีชีวิตอยู่รอดในการจำลองสมบัติน้ำย่อยจำลองในกระเพาะอาหารเทียม CaCo-2 การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตของกรดอินทรีย์ และเป็นการป้องกันต่อเชื้อโรค ทั้งนี้ *L. plantarum* ที่แยกได้จากไส้กรอกแสดงคุณสมบัติที่เด่นกว่า *L. paracasei* และ *L. brevis* ใน CaCo-2 (Pennacchia *et al.* 2006) เป็นเรื่องธรรมดาที่จะต้องแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากระบบลำไส้ของมนุษย์ ไอโซเลทเหล่านี้ต้องเป็นหลักเพื่อความอยู่รอดในการหมัก และการอบแห้งตามมา ประสบการณ์ปกติในช่วงการแปรรูปเนื้อสัตว์ที่จะต้องพิจารณา ที่มีศักยภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ พิจารณานี้จำนวนของ lactobacilli จากมนุษย์ที่นำมาทำการศึกษา และ lactobacilli จากลำไส้มนุษย์มีชีวิตรอดในขั้นตอนการผลิตไส้กรอก (De Vuyst *et al.* 2008)

ไส้กรอกเป็นอาหารที่มีคุณค่าซึ่งมีการบริโภคทั่วโลกเนื่องจากรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ และมีคุณค่าทางโภชนาการ ไส้กรอกได้รับการพัฒนาที่เรียกร้องให้มีสายพันธุ์โปรไบโอติก ยังคงมีหลายอุปสรรคสำหรับการเรียกร้องเหล่านี้จะถือว่ามีประสิทธิภาพ และมีประโยชน์สำหรับมุมมองสุขภาพของมนุษย์ (Hammes and Hertel. 1998) การพิสูจน์แรกในเรื่องนี้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์จะนำเสนอในจำนวนที่เพียงพอเพื่อให้มีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคพืชลำไส้ ประการที่สองพวกความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ของมนุษย์ (De Vuyst *et al.* 2008)

ความสามารถของไส้กรอกหมักมีศักยภาพสำหรับโปรไบโอติก เนื่องจากการให้ความร้อนอ่อน และอาจเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียในระบบย่อยอาหาร (Arihara. 2006; De Vuyst *et al.* 2008) สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการรอดชีวิต และสภาพการจำลองในระบบทางเดินอาหารในลำไส้ของมนุษย์ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่อาจเกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ การประยุกต์ใช้สายพันธุ์ที่เลือกเหล่านั้นในไส้กรอกหมักประสบความสำเร็จโดยไม่ต้องมีผลต่อรสชาติของผลิตภัณฑ์ (Klingberg *et al.* 2005)

สายพันธุ์โปรไบโอติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกประกอบด้วยไอโซเลทในลำไส้ Lactobacilli และ Bifidobacteria สำหรับสายพันธุ์โปรไบโอติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อต้องมีความจำเฉพาะต่อทางประสาทสัมผัสและสมบัติการทำงานในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Hammes and Hertel. 1998) นอกจากนี้ไส้กรอกจะต้องมีการออกแบบในลักษณะที่ทำให้จำนวน และการทำงานของสายพันธุ์โปรไบโอติกในช่วงที่สูงสุด ดังนั้นลดลงมากในช่วง pH (e.g. <5.0) ทำให้สุกที่ช่วง (e.g. >1 เดือน) ความแห้ง หรือความร้อนที่มาเกินไป จะต้องมีการหลีกเลี่ยงเพื่อผลประโยชน์ของโปรไบโอติก (De Vuyst *et al.* 2008)

เชื้อ *Lactobacillus gasseri* JCM1131 แสดงให้เห็นว่ามีประโยชน์ต่อสายพันธุ์โปรไบโอติกสำหรับการประยุกต์ใช้ในการหมักเนื้อ และมีความปลอดภัย (Arihara *et al.* 1998) ในขณะที่ *Lactobacillus rhamnosus* FERM P-15120 และ *L. paracasei* subsp. paracasei FERM P-15121 มีรายงานว่า จัดเป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Sameshima *et al.* 1998) การเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นแบบดั่งเดิม (Bactoferm T-SPX) และโปรไบโอติกที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. casei* LC-01 หรือ *Bifidobacterium lactis* Bb-12 ได้รับความสำเร็จในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Hammes and Hertel. 1998) สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกประสบความสำเร็จมากที่สุดในส่วนของโปรไบโอติก และ *L. plantarum* และ *L. casei* ในปัจจุบันมีการใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อให้มีขอบเขตที่สำคัญสำหรับโปรไบโอติกในการผลิตไส้กรอก (De Vuyst et al. 2008) นอกจากนี้ การใช้กล้าเชื้อทำงานได้เหนือกว่า และให้ความปลอดภัยมากขึ้น รสชาติ และประโยชน์ต่อสุขภาพเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม (Ammor and Mayo. 2007)

จากการศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในการหมักเนื้อ (Fernández-Giné *et al.* 2005) อย่างไรก็ตามปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้เทคนิค micro-encapsulation technique เชื้อจุลินทรีย์ *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus reuteri* ห่อหุ้มโดยแอลจิเนตตัวเลือกที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้ (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro. 2010) เมื่อเร็ว ๆ นี้ Poulin *et al.* (2010) ก็สามารถประสบความสำเร็จในการสร้างเม็ด β-lactoglobulin succinylated ซึ่งมีการป้องกันเชื้อสายพันธุ์ *B. longum* ในร่างกาย และในหลอดทดลอง นอกจากนี้ *Lactobacillus* F19 ได้มีการรายงานการรอดชีวิตโดยการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในจำนวนมากเมื่อเทียบกับ *Bifidobacterium* Bb12 เมื่อห่อหุ้มกับเคซีน (Heidebach *et al.* 2009) นอกจากนี้ไมโครเอนแคปซูเลชั่นทั้งสองสายพันธุ์ ยังมีการทดลองกับกระเพาะลูกวัวที่เหนี่ยวนำให้เกิดเจลของนมซึ่งส่งผลให้ผลตอบแทนสูง และอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้น (Heidebach *et al.* 2010)

2.6 การคัดเลือกโปรไบโอติกจากอาหารหมัก

โปรไบโอติกที่กำหนดไว้จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อใช้ในปริมาณที่เพียงพอมีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (Joint FAO/WHO. 2002) ในการวิจัยที่ผ่านมา 10 ปี โปรไบโอติกได้กลายเป็นหัวข้อหลักของแบคทีเรียแลคติก (LAB) ซึ่งรวมถึงเชื้อจำพวก *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มีการเติบโตที่น่าสนใจในการใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าของสายพันธุ์ที่แยกได้จากธรรมชาติดั้งเดิมที่ได้จากผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งมีผลต่อการส่งเสริมสุขภาพ อย่างไรก็ตามเพื่อให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ สายพันธุ์ *Lactobacillus* ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ต้องทนต่อสภาพทางกายภาพ และเคมี ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรด และเกลือน้ำดี (Del Piano *et al.* 2006) โปรไบโอติกยังต้องมีความสามารถในการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์จำนวนมากในระหว่างการผลิต และการเก็บรักษา (Ljungh and Wadström. 2006) งานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากธรรมชาติดั้งเดิมของผลิตภัณฑ์นมหมัก พบว่ามีความปลอดภัยต่อการนำไปใช้ (Holzapfel *et al.*. 2001) *Lactobacillus casei* str. Zhang เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพที่แยกได้จาก Koumiss ที่มีความทนกรดสูง ทนเกลือน้ำดี ทนต่อการเคลื่อนย้ายในระบบทางเดินอาหาร ลดคอเลสเตอรอล และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Zhang Wu *et al.* 2010)

Yoon *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียแลกติกจาก Chungkukjang ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองที่ทำจากถั่วเหลืองของประเทศเกาหลี พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 7 สายพันธุ์ เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Enterococcus faecium* ซึ่งมีสมบัติเป็นโปรไบโอติก คือสามารถเจริญได้ที่ระดับพีเอชต่ำ และทนเกลือน้ำดี และมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ S2C10 และ S2C11 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้ จากการศึกษานี้ทำให้สามารถคัดเลือกกล้าเชื้อที่มีความเหมาะสมเพื่อพัฒนากระบวนการผลิต Chungkukjang ต่อไป

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2550) คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทยสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสะวิรัติ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 225 สายพันธุ์ จากอาหารหมักจำนวน 152 ตัวอย่าง โดย 40 สายพันธุ์ มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และเมื่อนำทั้ง 40 สายพันธุ์มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบ 16 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *Samonella* Typhimurium *S.* Typhi *S.* Enteritidis *S.* Paratyphi และ *Escherichia coli* O157: H7 ได้โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 mm และมีเพียง 5 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ดี

Omar *et al.* (2006) แยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากข้าวหมัก (ben saalga) โดยสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 8 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus B. licheniformis Enterococcus faecalis Listeria innocua L. monocytogenes Staphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Salmonella* Enteric ได้ และเมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* ที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม plantaricin

Yoon *et al.* (2006) ทดลองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* C3 *L. casei* A4 และ *L. delbrueckii* D7 ในการผลิตน้ำกะหล่ำปลีหมัก พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญได้ดีในน้ำกะหล่ำปลีหมักโดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10×10^{8} CFU/ml หลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *L. casei* ผลิตกรดแลกติกได้น้อยกว่า *L. plantarum* หรือ *L. delbrueckii* และเมื่อเก็บน้ำหมักที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็น (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเชื้อของแบคทีเรียแลกติกจะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บ โดย *L. plantarum* และ *L. delbrueckii* มีปริมาณเชื้อคงเหลือ 4.1×10^{7} และ 4.5×10^{5} CFU/ml ตามลำดับ แต่สำหรับ *L. casei* ไม่สามารถมีชีวิตรอดเลยหลังการเก็บน้ำหมักไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ดังนั้นกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตน้ำกะหล่ำปลีหมักจึงได้แก่ *L. plantarum* และ *L. delbrueckii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของ *L. fermentum* จำนวน 35 สายพันธุ์ ภายหลังการบ่มที่ pH 3.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

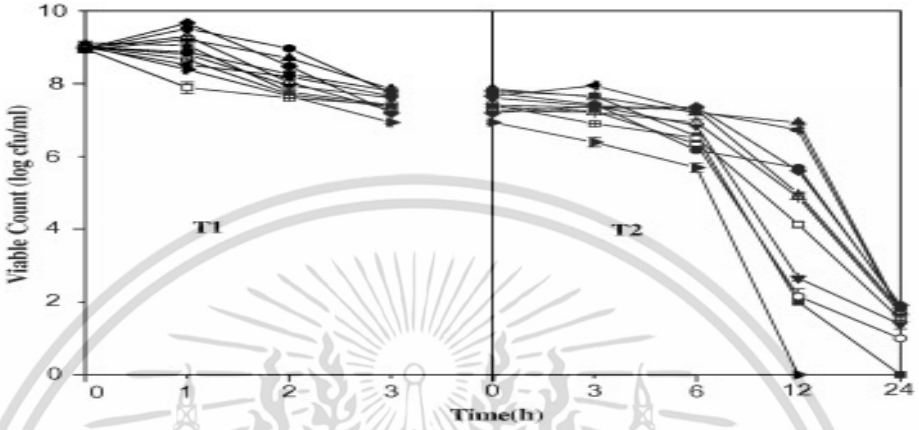
สายพันธุ์	$\Delta A_{600\ nm}$	สายพันธุ์	$\Delta A_{600\ nm}$	สายพันธุ์	$\Delta A_{600\ nm}$
F6	1.849 ± 0.003	IMAU60167	0.766 ± 0.030	IMAU60121	0.611 ± 0.029
IMAU60070	1.173 ± 0.044	IMAU60120	0.759 ± 0.035	IMAU20090	0.593 ± 0.033
IMAU60145	1.165 ± 0.017	IMAU60092	0.747 ± 0.019	IMAU20087	0.586 ± 0.035
IMAU60102	1.001 ± 0.011	IMAU60125	0.744 ± 0.020	IMAU20084	0.581 ± 0.023
IMAU60080	0.925 ± 0.037	IMAU20080	0.738 ± 0.037	IMAU20055	0.580 ± 0.018
IMAU60086	0.925 ± 0.034	IMAU60149	0.732 ± 0.036	IMAU20044	0.579 ± 0.004
IMAU60154	0.860 ± 0.031	IMAU60083	0.730 ± 0.033	IMAU20059	0.575 ± 0.012
IMAU60168	0.825 ± 0.025	IMAU20081	0.717 ± 0.018	IMAU60075	0.559 ± 0.024
IMAU60071	0.825 ± 0.013	IMAU60142	0.702 ± 0.017	IMAU60093	0.548 ± 0.007
IMAU60150	0.800 ± 0.024	IMAU60144	0.700 ± 0.029	IMAU60151	0.543 ± 0.028
IMAU60146	0.785 ± 0.041	IMAU60113	0.670 ± 0.027	IMAU60152	0.521 ± 0.031
IMAU20083	0.779 ± 0.023	IMAU60115	0.629 ± 0.009		

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2543) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย 329 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 212 ไอโซเลท ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* 198 ไอโซเลท และ *Pediococcus* 14 ไอโซเลท เมื่อนำทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella* Typhimurium 3230 โดยวิธี agar spot พบว่าการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติก 193 ไอโซเลท เกิดจากกรดอินทรีย์ และเมื่อกำจัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลท เท่านั้นที่แสดงผลการยับยั้ง ซึ่ง 4 ไอโซเลท จาก 10 ไอโซเลท ดังกล่าวพบว่าแยกได้จากผักดอง เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* ได้แก่ สายพันธุ์ PS2 PS5 และ ST7 ส่วนสายพันธ์ ST16 เป็น *L. brevis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bao *et al.* (2010) ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 90 สายพันธุ์ ในกระเพาะจำลองและลำไส้เทียม ในตารางที่ 1 พบว่า 35 สายพันธุ์ของ *L. fermentum* เจริญได้ดีที่ ($\Delta A_{600\ nm} \geq 0.500$) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดที่ pH 3.0 ปริมาณรวม 38.9% ซึ่งได้รับการคัดเลือกสำหรับความทนต่อการเคลื่อนย้าย ผลที่ได้อยู่ที่ความทนของสายพันธุ์ *L. fermentum* ที่ pH ต่ำ



ภาพที่ 1 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่ pH 2.5 ในระบบทางเดินอาหารเทียม และในลำไส้เทียม (pH 8) โดย T1 คือน้ำย่อยจำลอง (pH 2.5) T2 คือลำไส้เทียม (pH 8.0) ของเชื้อ (■) IMAU60083 F6(▲) IMAU60092 (▼) IMAU60151 (○) IMA-U60071 (◀) IMAU60120 (▶) IMAU60145 (□) IMAU20044 (★) IMAU20081 (◆) IMAU20084 และ (△) IMAU20080

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

ก่อนที่จะถึงส่วนปลายของระบบลำไส้ และผลของโปรไบโอติก แบคทีเรียเหล่านี้ต้องรอดชีวิตในช่วงที่ผ่านกระเพาะอาหาร และส่วนบนของระบบลำไส้ ค่าพีเอชในกระเพาะอาหารของมนุษย์จาก 1.5 ถึง 4.5 หลังอาหาร และการบริโภคอาหารใช้เวลา 3 ชั่วโมง (Jacobsen *et al.* 1999) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่เจริญต่ำสุดที่ pH 3.0 จากการประเมินตรวจสอบจำนวนของ *L. fermentum* ซึ่ง Foligne *et al.* (2007) แสดงให้เห็นว่า *L. fermentum* ACA-DC 179 สามารถรอดชีวิตที่ pH ต่ำ 2.5 ใน 3 ชั่วโมง ความอยู่รอดของสายพันธุ์ *L. fermentum* AD1 ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) เป็น 99.9% ในเวลา 1 ชั่วโมง 94.7% ในเวลา 2 ชั่วโมง และ 86.8% ในเวลา 3 ชั่วโมง (Strompfová *et al.* 2006) เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่สมบูรณ์สำหรับเซลล์แบคทีเรีย $\Delta A_{600\ nm} \geq 0.500$ ถูกเลือกให้เป็นมาตรฐาน และวิธีนับได้อัตราการรอดชีวิตถูกนำมาใช้สำหรับการประเมินผลต่อไป

ผลของน้ำย่อยจำลอง และการเคลื่อนย้าย *L. fermentum* มีการรอดชีวิตในลำไส้ ในตารางที่ 2 และภาพที่ 1 ใน 35 สายพันธุ์ และอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80% เป็นมาตรฐาน 11 สายพันธุ์ (6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์จากทิเบต 4 จากมองโกเลีย และ 1 จากภายในมองโกเลีย) ถูกตัดออกมีความทนต่อน้ำย่อยจำลองสูง (pH 2.5 บ่ม 3 ชั่งโมง) สัดส่วนจำนวนของสายพันธุ์ทั้งหมด 12.2% แม้ว่าสายพันธุ์ทดสอบส่วนใหญ่จะเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด รูปแบบที่ดีของการเจริญของสายพันธุ์ในน้ำย่อยเทียมที่ pH 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) บ่ม 90 สายพันธุ์ในน้ำย่อยจำลอง (pH 2.0) พบว่าเพียง F6 ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมแบบดั้งเดิมในเขตมองโกเลีย แสดงความทนกรดค่อนข้างดี และสามารถรอดชีวิตได้ (อัตราการรอดชีวิต 53.7%) (ภาพที่ 2) และบ่มในลำไส้จำลอง 12 ชั่วโมง ไม่ได้ส่งผลต่อศักยภาพอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2) F6 แสดงความต้านทานที่สูงขึ้นเมื่อน้ำย่อยเป็นกรด ต่อจากนั้นอัตราการรอดชีวิตที่มีความสำเร็จทนน้ำย่อยจำลอง 33.5% ที่ pH 8.0 ในเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) แสดงว่าความทนสูงกระตุ้นน้ำย่อยได้ดี

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ในน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5

สายพันธุ์	ความทนต่อน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5 (log CFU / ml)		อัตราการรอดชีวิต (%)
	0 h	3 h	
IMAU60120	9.115 ± 0.021	8.364 ± 0.060	91.8[a]
IMAU60092	8.730 ± 0.063	7.680 ± 0.011	88.0[b]
IMAU60083	9.206 ± 0.000	8.002 ± 0.002	87.0[c]
F6	8.488 ± 0.020	7.358 ± 0.021	86.7[c]
IMAU60151	9.135 ± 0.024	7.720 ± 0.029	84.5[d]
IMAU20044	9.122 ± 0.012	7.583 ± 0.018	83.1[e]
IMAU20080	9.039 ± 0.062	7.371 ± 0.018	81.6[f]
IMAU20081	9.143 ± 0.018	7.430 ± 0.005	81.3[f]
IMAU60071	9.136 ± 0.075	7.361 ± 0.032	80.6[g]
IMAU60145	9.043 ± 0.031	7.286 ± 0.007	80.6[g]
IMAU20084	9.029 ± 0.034	7.263 ± 0.032	80.4[h]

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

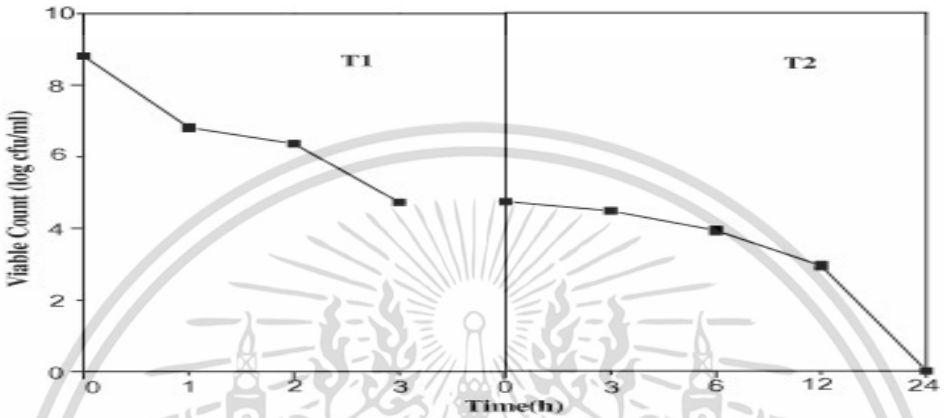
[a b c d e f g h] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

โปรไบโอติกเป็นที่รู้จักกันดีในเชิงการค้าว่า เป็นตัวควบคุมที่ทนต่อการเคลื่อนย้ายได้ดี Jaya และคณะ (1998) รายงานว่า การรอดชีวิตของโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ในเชิงการค้า *L. acidophilus* LA-1 และ *L. rhamnosus* GG ทั้งสองลดลง 7.6 CFU/ml หลังจากการบ่มที่ pH 3 นาน 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง Conway *et al.* (1987) ตรวจสอบการตายของ *L. acidophilus* NCFM ใน pH ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่ำ ในระบบการทำงานนับจากนั้น 3 ชั่วโมงที่ pH 3 ในน้ำเกลือ buffered สำหรับ NCFM (จาก 7.5 log CFU/ml ถึง log 3.3 CFU/ml) ดังนั้น *L. fermentum* F6 ให้ผลดีกว่าโปรไบโอติกในเชิงการค้าในด้านการทนกรด สายพันธุ์ของ *L. fermentum* เจริญได้ดีใน oxgall ที่ 0.3% ความทนต่อน้ำดีของสายพันธุ์นี้ช้าตามเวลาที่ระบุในตารางที่ 3



ภาพที่ 2 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* F6 ในกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2.0 (T1) และลำไส้เทียม pH 8.0 (T2) ความทนทานต่อการน้ำในลำไส้จำลอง (pH 8.0)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

การทนต่อความเข้มข้นที่แตกต่างกันของเกลือน้ำดีของสายพันธุ์นี้แสดงในตารางที่ 5 ผลที่ได้วิเคราะห์โดยข้อเสนอที่ทำโดย Chateau *et al.* (1994) ที่โดดเด่นในสี่กลุ่มนี้ตามความล่าช้าของการเจริญที่กระตุ้นโดย oxgall สายพันธุ์ที่ทนทาน (ความล่าช้าของการเจริญ $d \leq 15$ นาที) สายพันธุ์ที่ทน ($15 < d \leq 40$ นาที) สายพันธุ์ที่ช้า ($40 < d \leq 60$ นาที) และสายพันธุ์ที่เร็ว ($d > 60$ นาที) เวลาที่จำเป็นสำหรับ 0.3 หน่วย เพิ่มขึ้นในการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร สำหรับ F6 เพาะเลี้ยงใน MRS-THIO broth 2.33 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามเวลาที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มขึ้น 0.3 หน่วย ในการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดย F6 เพาะเลี้ยงใน MRS-THIO broth ที่มีเกลือน้ำดี 2.99 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ความทนต่อเกลือน้ำดี *L. fermentum* วัดเป็นเวลาล่าช้าจากความเข้มข้น 0.3% ของเชื้อจำนวน 11 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ต่อชั่วโมง		
	ไม่เสริม oxgall	เสริมด้วย oxgall 0.3% (w/v)	เวลาล่าช้า (LT)
F6	2.33 ± 0.02	2.99 ± 0.11	0.66 ± 0.13[a]
IMAU60145	2.35 ± 0.44	3.21 ± 0.36	0.86 ± 0.09[ab]
IMAU60071	2.64 ± 0.02	3.59 ± 0.16	0.95 ± 0.18[ab]
IMAU20084	2.94 ± 0.36	3.90 ± 0.05	0.96 ± 0.31[ab]
IMAU20080	2.98 ± 0.20	4.02 ± 0.22	1.03 ± 0.02[ab]
IMAU20081	3.46 ± 0.33	4.49 ± 0.10	1.03 ± 0.43[ab]
IMAU20044	2.79 ± 0.24	4.10 ± 0.01	1.32 ± 0.23[bc]
IMAU60092	2.65 ± 0.13	4.20 ± 0.31	1.55 ± 0.18[bc]
IMAU60120	2.66 ± 0.28	4.64 ± 0.42	1.97 ± 0.13[cd]
IMAU60083	3.15 ± 0.68	5.23 ± 0.30	2.08 ± 0.62[cd]
IMAU60151	3.82 ± 0.39	6.57 ± 0.31	2.74 ± 1.91[d]

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[A B C D] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

สำหรับสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเจริญได้ไวคือ F6 (0.66 ช.ม.) ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อเกลือน้ำดี (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ระดับสูงสุดของ F6 เมื่อเกลือน้ำดีเป็น 1.8% (ตารางที่ 4) ความล่าช้าของการเจริญ สำหรับ IMAU60145 IMAU60071 และ IMAU20084 เป็น 0.86, 0.95 และ 0.96 ชั่วโมงตามลำดับ และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ค่อยทน (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ระดับความทนสูงสุดของ IMAU60092, IMAU60071, IMAU60145 และ IMAU20084 ในเกลือน้ำดีเป็น 1.8% (ตารางที่ 4) การศึกษาก่อนหน้าเมื่อระดับความทนต่อน้ำดีของ *L. fermentum* ที่ระดับต่างๆ ความทนสูงสุดของ *L. fermentum* ACA-DC 179 เกลือน้ำดีเป็น 2% (Zoumpopoulou *et al.* 2007) สายพันธุ์ *L. fermentum* AD1 ก็สามารถที่จะเจริญในน้ำดี 1% และยังคงทำงานได้ 75.4% หลังจากบ่มที่ 24 ชั่วโมง (Strompfová *et al.* 2006) หาก *L. fermentum* SGM3 ซึ่งแยกจากไก่มีความทนสูง 0.3% ของเกลือน้ำดีเป็น 100% แต่ไม่มีความทนในเกลือน้ำดีที่ PG3 และ PGM3 ซึ่งถูกแยกจากสัตว์ปีก (Lin *et al.* 2007) ดังนั้น *L. fermentum* F6 จึงแสดงถึงการเป็นโปรไบโอติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การจัดเรียงตัวของ *L. Fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์

	เวลา					
สายพันธุ์	2 ชม.	4 ชม.	6 ชม.	8 ชม.	10 ชม.	20 ชม.
F6	3.2 ± 0.5	3.5 ± 1.8	5.3 ± 1.1	7.9 ± 0.2	9.1 ± 2.0	27.0 ± 0.8[b]
IMAU60092	2.7 ± 1.0	4.8 ± 0.9	7.9 ± 0.2	9.4 ± 0.4	10.0 ± 1.3	26.6 ± 1.2[b]
IMAU60120	5.1 ± 0.2	5.7 ± 0.5	7.3 ± 0.7	9.0 ± 1.2	10.7 ± 0.9	20.6 ± 1.0[c]
IMAU20084	4.1 ± 0.2	6.1 ± 0.3	7.2 ± 0.4	8.3 ± 0.4	9.1 ± 0.4	17.2 ± 0.4[d]
IMAU60083	4.7 ± 0.3	6.1 ± 0.3	7.1 ± 0.3	8.3 ± 0.2	8.4 ± 0.0	13.5 ± 0.3[e]
IMAU60071	3.7 ± 0.8	4.0 ± 0.8	5.5 ± 1.0	5.6 ± 0.4	4.8 ± 1.0	11.8 ± 0.6[ef]
IMAU60151	7.8 ± 1.1	14.2 ± 0.6	20.2 ± 0.8	25.4 ± 0.7	29.2 ± 0.7	51.5 ± 0.8[a]
IMAU20044	6.9 ± 0.8	11.0 ± 1.2	11.6 ± 0.6	12.6 ± 0.3	14.3 ± 0.8	13.4 ± 0.5[e]
IMAU20080	4.5 ± 0.8	6.3 ± 1.2	6.5 ± 1.0	6.8 ± 1.1	6.5 ± 1.9	10.6 ± 1.8[f]
IMAU20081	6.9 ± 0.8	11.0 ± 1.2	11.6 ± 0.6	12.6 ± 0.3	14.3 ± 0.8	13.4 ± 0.5[e]
IMAU60145	3.1 ± 3.4	9.3 ± 2.0	12.1 ± 0.6	14.6 ± 0.9	15.6 ± 1.6	28.1 ± 1.4[b]

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[A B C D] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

เกลือน้ำดีทำให้ไม่เป็นระเบียบต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ที่มีชีวิต (Margolles *et al.* 2003) ดังนั้นความทนต่อน้ำดีถือเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้รอดชีวิตเติบโต และมีแรงในการเคลื่อนย้ายในระบบทางเดินอาหาร สายพันธุ์ที่สามารถเจริญ และเผาผลาญอาหารในน้ำดีปกติได้ ทางกายภาพสามารถรอดชีวิตได้ในระหว่างการเคลื่อนย้ายในระบบทางเดินอาหาร (Sanders *et al.* 1996) นอกจากนี้ Noriegal *et al.* (2004) รายงานถึงผลของเกลือน้ำดีเมื่ออยู่รอดของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน *Lactobacillus* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์ โดยเป็นที่ทราบกันดีว่ามีความเข้มข้นของน้ำดีเกลือในลำไส้มีความแปรปรวนไม่คงที่ตั้งแต่ 1.5% ถึง 2% (w/v) ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณ 0.3% (w/v) ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการต่อต้านเกลือน้ำดีจากสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของไฮโดรเลสเกลือน้ำดี ซึ่งสามารถย่อยสลายเกลือน้ำดีทั้งหมด และทำให้ลดผลที่เป็นพิษ และผลข้างเคียงของเกลือน้ำดี

การยับยั้งการเน่าเสียของอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคจาก 11 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงในตารางที่ 5 การเพาะเลี้ยงเชื้ออิสระของ F6 ในอาหาร MRS ยับยั้งแกรมบวก (*L. monocytogenes* C53-3, *S. aureus* AC1.2465) และแกรมลบ (*E. coli* O157 882364 *S. flexneri* CMCC (B) 51592 *S.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Typhimurium S50333) ในเวลาเดียวกันก็ชี้ให้เห็นว่า เชื้อที่แตกต่างกันของ *L. fermentum* มีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ แม้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรดสูง เนื่องจากการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการต้านจุลชีพ

ตารางที่ 5 กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella* Typhimurium	*Escherichia coli*	*Shigella flexneri*	*Staphylococcus aureus*
F6	+++	++	++	++	+++
IMAU60092	+	±	±	+	±
IMAU60120	+	±	–	±	+
IMAU20084	±	±	–	±	±
IMAU60083	–	±	±	±	±
IMAU60071	+	–	+	+	+
IMAU60151	+	–	–	±	+
IMAU20044	+	–	±	–	±
IMAU20080	–	–	±	–	±
IMAU20081	–	–	–	±	±
IMAU60145	–	–	–	–	+

-: ≤0mm; ±: 0-4 mm; +: 4-8 mm; + + 8-12 mm; + + +:> 2 mm.

[a] บริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย = การกระจายเส้นผ่าศูนย์กลาง - เส้นผ่าศูนย์กลางพีเอชควบคุม

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

ตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า IMAU60092 แสดงความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียกับทุกสายพันธุ์ทั้งห้านี้ แต่ในระดับที่น้อยกว่า F6 ในทางตรงกันข้าม IMAU60145 แสดงเฉพาะการยับยั้งการทำงานกับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์อื่น ๆ ได้รับการที่ทดสอบ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ เฉพาะสายพันธุ์ที่มีศักยภาพต้านเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อที่ทดสอบ ตามธรรมชาติผลิตภัณฑ์นมหมักมักจะคิดว่าปลอดภัยเพราะค่า pH ต่ำ และการผลิตสารต้านจุลชีพจากสิ่งมีชีวิตในอาหารหมัก (Svanberg *et al.* 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของ *Lactobacillus* ในการควบคุมการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในธรรมชาติที่ผลิตภัณฑ์นมหมักแบบดั้งเดิมที่ได้รับรายงานจาก (Batdorj *et al.* 2007; Heping *et al.* 2008; Mathara *et al.* 2008) *Lactobacilli* ผลิตที่หลากหลายของสารต้านแบคทีเรีย รวมทั้งน้ำตาล catabolites เช่น กรดอินทรีย์ (เช่น กรดแลกติก และกรดอะซิติก) ออกซิเจน catabolites เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารโปรตีน เช่น bacteriocins เปปไทด์โมเลกุลต่ำมวลอื่น ๆ และเปปไทด์ต้านรา/โปรตีน ไขมัน และกรดอะมิโน กรด metabolites เช่น กรดไขมัน กรด phenyllactic และกรด OH-phenyllactic และสารประกอบอื่น ๆ เช่น reuterin และ reutericyclin (Lefteris *et al.* 2006) เป็นหนึ่งกลไกที่สำคัญของสมบัติโปรไบโอติก จากการวิจัยมุ่งเน้นไปที่การผลิตสารต้านจุลชีพ (servin. 2004) วิจัยส่วนใหญ่แบคทีเรียที่ผลิตโดย *L. plantarum* หรือ *L. reuteri* (Delgado *et al.* 2007; Gänzle *et al.* 2000) ดังนั้นขั้นตอนต่อไปมีการตรวจสอบสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย F6 ซึ่งจะมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Vrancken *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2007)

ตารางที่ 6 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%)

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
CP01	*Lactobacillus casei*	87.5
CP02	*Lactobacillus casei*	25.9
CP03	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	29.1
CP04	*Lactobacillus casei*	24.3
CP05	*Lactobacillus* sp.	88.4
CP06	*Lactobacillus casei*	38.7
CP07	*Lactobacillus casei*	0
CP08	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP09	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP10	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP11	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP12	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP13	*Lactobacillus casei*	0
CP14	*Lactobacillus casei*	0
CP15	*Lactobacillus casei*	0
CP16	*Lactobacillus casei*	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
CP17	*Lactobacillus casei*	0
CP18	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP19	*Lactobacillus* sp.	0
CP20	*Lactobacillus casei*	0
CP21	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	48.6
CP22	*Lactobacillus casei*	51.8
CP23	*Lactobacillus casei*	0
CP24	*Lactobacillus* sp.	27.6
CP25	*Lactobacillus casei*	0
CP26	*Lactobacillus casei*	52.7
CP27	*Lactobacillus casei*	33.9
CP28	*Lactobacillus casei*	0
CP29	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	17.4
CP30	*Lactobacillus* sp.	31.5
CP31	*Lactobacillus casei*	27.7
CP32	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	30.2
CP33	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	42.9
CP34	*Lactobacillus casei*	41.8
CP35	*Lactobacillus casei*	18.3
CP36	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP37	*Lactobacillus casei*	59.9
CP38	*Lactobacillus casei*	51.9
CP39	*Lactobacillus* sp.	43.1
CP40	*Lactobacillus casei*	67.16
CP41	*Lactobacillus casei*	26.21
CP42	*Lactobacillus casei*	0
CP43	*Lactobacillus casei*	46
CP44	*L. rhamnosus*	59.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
CP45	*L. rhamnosus*	39.3
CP46	*Lactobacillus casei*	72.3
CP47	*Lactobacillus casei*	51.6
CP48	*L. paracasei* sbsp *paracasei*	18.2
CP49	*Lactobacillus* sp.	25.5
CP50	*Lactobacillus* sp.	90.1
CP51	*Lactobacillus* sp.	37.1
CP52	*Lactobacillus* sp.	0
CP53	*Lactobacillus* sp.	18.5
CP54	*Uncultured bifidobacteria*	92.2
CP55	*Uncultured bifidobacteria*	95.6
CP56	*Enterococcusfaecalis*	50.6
CP57	*Enterococcusfaecalis*	48.8
CP58	*Enterococcusfaecalis*	92.6
CP59	*Enterococcusfaecalis*	47.2
CP60	*Enterococcus vaginalis*	41.4
CP61	*Enterococcusfaecalis*	39
CP62	*Enterococcusfaecalis*	54.7
CP64	*Enterococcusfaecalis*	49.9
CP65	*Streptococcus anginosus*	57.7
CP66	*Streptococcus anginosus*	0
CP67	*Streptococcus anginosus*	0
CP68	*Streptococcus anginosus*	78.9
CP69	*Streptococcus anginosus*	86.8
CP71	*Enterococcusfaecalis*	57
CP72	*Enterococcusfaecalis*	40.8

ที่มา: Nueno-Palop *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Nueno-Palop *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 70 สายพันธุ์ มากกว่า 50 % ของเกลือน้ำดี 0.3% พบว่า มีเพียง 22 สายพันธุ์สามารถรอดชีวิตในเกลือน้ำดีได้ และมีเพียง 7 สายพันธุ์ที่รอดชีวิตได้มากกว่า 80% (ตารางที่ 6) ซึ่งสายพันธุ์มากที่สุดทนต่อเกลือน้ำดีคือ *L. casei* *Lactobacillus* sp. จากนั้นเมื่อนำแบคทีเรียแลกติก เหล่านี้มาทดสอบการรอดชีวิตในน้ำย่อยลำไส้เล็กจำลอง พบว่า 5 สายพันธุ์ สามารถรอดชีวิตในลำไส้เล็กจำลองได้ คือ *L. casei* *Lactobacillus* sp. และ *E. faecalis*c และแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์นี้สามารถยึดเกาะ Caco-2 ได้โดยเชื้อ *E. faecalisc* สายพันธุ์ CP58 เป็นสายพันธุ์มากที่สุดกับค่าการยึดเกาะ 2.6×10^5 CFU / ml

ตารางที่ 7 ความอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีในสภาพการย่อยอาหารจำลอง

รหัส	สายพันธุ์	การอยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)	ความอยู่รอดของการย่อยอาหาร (%)
CP01	*Lactobacillus casei*	87.5	27.0
CP05	*Lactobacillus* sp.	88.4	23.8
CP37	*Lactobacillus casei*	59.9	30.0
CP40	*Lactobacillus casei*	67.2	24.4
CP44	*Lactobacillus rhamnosus*	59.6	0
CP46	*Lactobacillus casei*	72.3	0
CP50	*Lactobacillus* sp.	90.1	0
CP54	Uncultured bifidobacteria	92.2	0
CP55	Uncultured bifidobacteria	95.6	0
CP58	*Enterococcus faecalis*	92.6	42
CP69	*Streptococcus anginosus*	86.8	0

ที่มา: Nueno-Palop *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ขอบเขตของงานวิจัย

การทดลอง	กิจกรรม
การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	1.1) การสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร จากแหล่งจำหน่ายในกรุงเทพมหานคร 1.2) การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก 1.3) ทดสอบสมบัติแบคทีเรียแลคติก - ย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย (Gram stain) - ตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียแลคติกโดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส
การทดลองที่ 2 การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกบางประการของแบคทีเรียแลคติก	แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ 2.1) การศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก 2.2) การทดสอบสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes* *S. aureus Salmonella* Rissen และ *E. coli* โดยวิธี agar spot 2.3) การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วงพีเอชต่างๆ โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวน 7 ทรีเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่ทำการปรับค่า pH 2 3 4 5 6 7 และ 8 2.4) การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในความเข้มข้นต่าง ๆ ของเกลือน้ำดี โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ทรีทเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) ความเข้มข้น 0 0.3 0.6 และ 1.0% 2.5) การเก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ - working stock - mother stock

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
2. เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Germany)
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow (Dwyer model merk II, USA)
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, Germany)
5. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Germany)
6. หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama model HVE 50, Japan)
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
8. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
9. เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France)
10. ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu model UV – 1601, Japan)
12. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Agar-agar (Merck, Germany)
2. Baird-Parker agar (Merck, Germany)
3. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Merck, Germany)
4. Hektoen enteric agar (Merck, Germany)
5. Modified Oxford Listeria supplement (Oxiod, UK)
6. Mueller-Hinton broth (Merck, Germany)
7. Novobiocin Sodium salt (Sigma-Aldrich, USA)
8. Oxford Listeria agar base (Oxoid, UK)
9. Plate Count agar (Merck, Germany)
10. Tryptic Soy Broth (Merck, Germany)
11. Bromocresol purple (Alpha Chemika, India)
12. Ethanol (Merck, Germany)
13. Sodium Chloride (NaCl) (Merck, Denmark)
14. Sodiumhydroxide (NaOH) (Merck, Germany)
15. Glycerol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ระเบียบวิจัย

การศึกษาสมบัติความเป็นโปรไบโอติกบางประการของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แบ่งเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

1. การสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลคติกมีทั้งผลิตภัณฑ์เนื้อหมักท้องถิ่นที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร เช่น แหนมหมู แหนมเนื้อ ไส้กรอกอีสานหมู และไส้กรอกอีสานเนื้อ จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายในกรุงเทพมหานคร ได้แก่ ตลาดสด จำนวน 41 แห่ง และซูเปอร์มาร์เก็ต จำนวน 14 แห่ง

2. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เตรียมตัวอย่างโดยการชั่งตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง 25 กรัม ลงใน normal saline dilution 0.85% (0.85% NaCl) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่า ทำการเจือจางส่วนผสมจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นมาทำการ pour plate หรือ streak บนอาหาร de man Rogosa and Sharp (MRS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศส่วนอาหารที่เป็นของเหลว นำมา streak บนอาหาร MRS agar เลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบ ๆ โคโลนี คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Gram stain) เพื่อตรวจดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกติดสีแกรมบวก แล้วจึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียแลคติก โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลคติก catalase test จะให้ผลลบ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้โดยแทงลงไปในอาหาร MRS agar และเก็บในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุกสัปดาห์ และเก็บเชื้อไว้ในสารละลายกลีเซลรอลที่มีความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองครั้งต่อไป (อนุสรา รัตนบุรี. 2553)

การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติดที่มีสมบัติโปรไบโอติกบางประการ จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

1. คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีการเจริญได้ดี

ถ่ายแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 1 loopful จากหลอดอาหาร MRS agar ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เชื้อละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญโดยการวัดปริมาณแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างที่เป็นของเหลวที่มีความยาวคลื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

660nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีการเจริญได้ดีมากโดยมีค่า OD 660nm > 1.5 และแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ดีมีค่า OD 660_{nm} ตั้งแต่ 1 ถึง 1.5 และแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ต่ำมีค่า OD 660_{nm} < 1 เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

โดยนำแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 1 loop ถ่ายลงใน MRS broth แล้วนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ลงในจานเพาะเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แบ่งเป็นช่อง ๆ ไว้ 4 ช่องห่างเท่า ๆ กัน ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้มาแตะบนผิวหน้า MRS ช่องละ 1 ตัวอย่าง จานละ 1 เชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่เขี่ยเพาะเชื้อแล้วทั้งหมดไปบ่มในสภาพ microaerobe โดยใช้ candle jar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการผสมเชื้อ *L. monocytogenes S. aureus Salmonella* Rissen และ *E. coli* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE soft agar เป็นปริมาตร 2% (v/v) โดยแบคทีเรีย 1 ชนิดต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีความเข้มข้นแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 105 CFU/ml แล้วทำการเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน เท soft agar ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วจานอย่างเร็ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียแลคติก ถ้าเชื้อที่เป็นอินดิเคเตอร์ใดถูกยับยั้งการเจริญจนเห็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดสอบ แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกนั้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ และทำการบันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในกรด และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี agar spot (Schillinger and Lucke. 1989) จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง เพื่อนำไปคำนวณหา ค่าประสิทธิภาพของการยับยั้ง ตามวิธีการของ Makras and De Vuyst (2006)

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

โดยประสิทธิภาพของการยับยั้ง แบ่งออกเป็น 3 ช่วง โดย 1 หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง 1.1-1.9 หมายถึง มีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ 2.0-2.9 หมายถึง มีประสิทธิภาพการยับยั้งปานกลาง และ >3.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายถึง มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูง โดยทำการคัดเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด โดยมีค่าประสิทธิภาพยับยั้งที่มากกว่า 1 ขึ้นไป

3. การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วงค่า pH ต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Erkkilä and Petäjä. 2000) นำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมาศึกษาการทนกรดและการเจริญที่ระดับค่า pH ต่างๆ ในอาหารเหลว MRS broth ที่ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วย กรดไฮโดรคลอริก (8M HCI) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5N NaOH) ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวน 7 ทรีเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่ทำการปรับค่า pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยให้มีเชื้อที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลองปริมาณ 10^6 CFU/ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำหลอดทั้งหมดไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดลองทุกระดับพีเอชหลังการบ่มที่ 18 ชั่วโมง โดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar และบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณโคโลนีของเชื้อ และสุ่มตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการบันทึกจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในที่ช่วงค่า pH ต่าง ๆ จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้โดยทุกระดับค่า pH ต้องมีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^6 CFU/ml ขึ้นไป

4. การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Gilliland and Speck. 1984; Erkkilä and Petäjä. 2000) การวางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 4 ทรีเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% โดยการเตรียม MRS broth ให้มีค่า pH ใกล้เคียงกับลำไส้เล็กส่วนต้น คือ มีค่า pH 8 แบ่งอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ดังกล่าวให้มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% เติมแบคทีเรียแลคติกที่ทำการศึกษาโดยให้มีเชื้อที่ใช้ในการศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลองปริมาณ 10^6 CFU/ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำหลอดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนำปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดลองทุกระดับ pH หลังการบ่มที่ 18 ชั่วโมง โดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar และบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณโคโลนี และสุ่มตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการบันทึกจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ โดยทุกความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ต้องมีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^6 CFU/ml ขึ้นไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูล ทำการบันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทำได้โดยแทงลงไปในอาหาร MRS agar และเก็บในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุกสัปดาห์ และเก็บเชื้อไว้ในสารละลายกลีเซลรอลที่มีความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานครจำนวน 42 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ได้ทั้งหมด 375 ไอโซเลท เพื่อทำการทดสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกด้วยการย้อมสีแกรม การสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 354 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 325 ไอโซเลท โดยมีเซลล์ที่มีรูปท่อน 259 ไอโซเลท และทรงกลมจำนวน 66 ไอโซเลท (ตาราง 8) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมใจ ศิริโภค และคณะ (2550) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จำนวน 131 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน 110 ไอโซเลท รูปไข่ 7 ไอโซเลท และทรงกลมจำนวน 14 ไอโซเลท

ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียแลคติกแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	โคโลนีที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก			จำนวนแบคทีเรียแลคติก	
	MRS agar	คะตะเลส (-)	แกรมบวก	Bacilli	Cocci
แหนม (หมู)	220	216	206	160	46
แหนม (ซี่โครงหมู)	24	22	20	19	1
แหนม (เนื้อ)	20	15	13	11	2
แหนม (เอ็นไก่)	10	6	6	6	-
ไส้กรอกอีสาน	101	95	80	63	17
รวม	375	354	325	259	66

เช่นเดียวกับ ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ (2557) ทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผัก และอาหารหมักรวมจำนวน 32 ตัวอย่าง โดยคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ 10 ไอโซเลท และจากผลิตภัณฑ์อื่นๆ 99 ไอโซเลท ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บวก รูปร่างแท่ง หรือกลม และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยจากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมูได้มากที่สุด รองลงมาคือ แหนมหมู ไส้กรอกอีสานหมู แหนมเนื้อวัว และแหนมเอ็นไก่ ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ 10.00, 8.00, 7.63, 6.50 และ 6.00 ไอโซเลทต่อตัวอย่าง ตามลำดับ (ตาราง 9)

ตารางที่ 9 จำนวนไอโซเลทแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	ค่า pH ของผลิตภัณฑ์	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	จำนวนแบคทีเรียแลคติกต่อตัวอย่าง
ไส้กรอกอีสาน (หมู)	4.3 – 4.7	10	80	8.00
แหนม (หมู)	4.1 – 4.7	27	206	7.63
แหนม (ซี่โครงหมู)	4.2 – 4.6	2	20	10.00
แหนม (เนื้อโค)	4.7 – 4.9	2	13	6.50
แหนม (เอ็นไก่)	4.5 – 4.6	1	6	6.00
รวม		42	325	

เนื่องจากผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรหมัก ได้แก่ ไส้กรอกหมัก แหนมหมู และแหนมซี่โครงหมูมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.1 – 4.7 อาจแสดงได้ว่า ผลิตภัณฑ์มีกิจกรรมกระบวนการหมัก และจำนวนแบคทีเรียแลคติกมาก ส่งผลให้ผลิตกรดมาก ทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วงค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อวัว และแหนมเอ็นไก่ มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5 – 4.9 แสดงได้ว่าผลิตภัณฑ์มีกิจกรรมกระบวนการหมักและจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่น้อยกว่า จึงส่งผลให้พบแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่าแหนมหมูและไส้กรอกหมัก นอกจากนี้ Ruiz-Moyano *et al.* (2008) ยังได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งไอบีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวนทั้งหมด 363 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus* spp., *Lactococci* spp. และ *Enterococci* spp. จำนวน 263, 44 และ 56 ไอโซเลท ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การทดสอบสมบัติความเป็นโพรไบโอติกบางประการของแบคทีเรียแลคติก

การทดลองย่อย 2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (ตารางที่ 10) แสดงค่าความขุ่น (turbidity) ของแบคทีเรียแลคติกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 237 (72.92 %), 17 (5.23 %) และ 71 (21.85 %) สามารถเจริญได้ดีเยี่ยม เจริญได้ดี และเจริญได้ไม่ดี ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 254 ไอโซเลท ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ตั้งแต่ 1 ถึง 1.5 เพื่อทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคต่อไป

ตารางที่ 10 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกคัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ

ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600nm})	ระดับการเจริญ	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ไอโซเลท
> 1.5	เจริญได้ดีมาก	237	72.92
1.0 – 1.5	เจริญได้ดี	17	5.23
< 1.0	เจริญได้ไม่ดี	71	21.85
รวม		325	100.00

การทดลองย่อย 2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยเทคนิค agar spot assay พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมดจำนวน 254 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *E. coli* จำนวน 53, 57, 45 และ 57 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tharmaraj and Shah (2009) พบว่า โปรไบโอติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแกรมลบ โดยมีบริเวณการยับยั้งการเจริญ 19 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้งสอดคล้องกับ Shanthya *et al.* (2010) ที่ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมลบของแบคทีเรียแลคติก พบว่า เชื้อ Lactobacilli สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ได้โดยมีค่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญอยู่ที่ 26 และ 28 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้ง Hwanhlem *et al.* (2010) ยังได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากปลาส้มจำนวน 14 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ *S. salivarius* LD219, *Enterococcus faecalis* LPS04, LPS17 และ LPS18 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 11 เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกคัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพ ฯ

การยับยั้งเชื้อก่อโรค	เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง (มม.)	(+++)	(++)	(+)	(-)
L. monocytogenes	จำนวนไอโซเลท	1	9	43	201
	เปอร์เซ็นต์	0.39	3.54	16.93	79.13
S. aureus	จำนวนไอโซเลท	5	10	42	197
	เปอร์เซ็นต์		3.94	16.54	77.56
S. Typhimurium	จำนวนไอโซเลท	2	9	34	209
	เปอร์เซ็นต์		3.54	13.39	82.28
E. coli	จำนวนไอโซเลท	2	4	51	197
	เปอร์เซ็นต์		1.57	20.08	77.56

(-) : $\leq$ 0 มม.; (+) : 1 - 8 มม.; (++) : 8 - 12 มม.; (++) : > 12 มม.

ดังตารางที่ 12 แสดงความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท มีความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษแกรมบวกและแกรมลบได้เป็นจำนวน 42 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lima *et al.* (2007) ที่ทำการคัดแยกเชื้อ Lactobacilli จากกระเพาะพักและไส้ติ่งของลูกไก่ พบว่าเชื้อ Lactobacilli จำนวน 265 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *L. reuteri* และ *L. salivarius* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ (26 ไอโซเลท) เพื่อนำไปศึกษาการรอดชีวิตในช่วง pH ต่างๆ และการทนต่อเกลือน้ำดีต่อไป

ตารางที่ 12 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค [1, 2]	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติก
1 สายพันธุ์ (ทั้งแกรมบวกและลบ)	44
2 สายพันธุ์ (ทั้งแกรมบวกและลบ)	54
2 สายพันธุ์ (แกรมบวก)	42
2 สายพันธุ์ (แกรมลบ)	36
3 สายพันธุ์	23
4 สายพันธุ์	26

[1] จุลิทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (*S. aureus, L. monocytogenes, S.* Typhimurium and *E. coli*).

[2] แบคทีเรียแลคติกจำนวน 29 ไอโซเลทไม่พบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองย่อยที่ 2.3 การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH ต่าง ๆ

จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกใน MRS broth ที่มีการปรับค่า pH ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 26 ไอโซเลท มีแบคทีเรียแลคติกเพียง 3 ไอโซเลท ที่สามารถในการรอดชีวิตได้ในสภาวะค่า pH 2 โดยมีจำนวนอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^2 cfu/ml ในขณะที่สภาวะค่า pH 3 มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^4 cfu/ml (ตารางที่ 13) ที่สภาวะค่า pH 4 มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 18 และ 8 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^4 ถึง 10^5 และมากกว่า 10^6 cfu/ml ตามลำดับ และที่สภาวะค่า pH 5 - 8 แบคทีเรียแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตและเจริญได้มากกว่า 10^6 cfu/ml ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกมีค่า pH เหมาะสมต่อการเจริญโดยอยู่ในช่วง 5.58 ถึง 6.20 แต่จะมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อมีค่า pH ลดลง เป็นกลางหรือเป็นด่างมากขึ้น (Salminen and Wright. 1993) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Ruiz - Moyano *et al.* (2008) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกหมักแห้งไอบีเรียโดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH 5 และ 5.5 โดยมีความสามารถในการรอดชีวิตได้ถึง 34.6 % โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ 6 - 8 log cfu/g ภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง ในขณะที่สภาวะค่า pH 4 แบคทีเรียแลคติกสามารถรอดชีวิตได้ลดลงเหลือเพียง 10 %

ตารางที่ 13 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ

pH	จำนวนไอโซเลทต่อระดับการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (CFU/ml)					
	$< 10^1$	10^1-10^2	10^2-10^3	10^3-10^4	10^4-10^5	$> 10^6$
2	23	3	-	-	-	-
3	-	9	11	6	-	-
4	-	-	-		18	8
5	-	-	-	-	-	26
6	-	-	-	-	-	26
7	-	-	-	-	-	26
8	-	-	-	-	-	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองย่อยที่ 2.4 การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในความเข้มข้นต่าง ๆ ของเกลือน้ำดี

ดังตารางที่ 14 แสดงความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติก โดยดัดแปลงวิธีการจาก Erkkilä and Petäjä (2000) และ Garcia-Ruiz *et al*. (2014) พบว่า ที่ทุกระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่สามารถทนและเจริญได้มากกว่า 10^6 cfu/ml โดยแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1.0 % ได้การเจริญร้อยละ 100 มีจำนวน 10, 7 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Bao *et al.* (2010) โดยพบว่าการคัดเลือกโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus fermentum* จากผลิตภัณฑ์นมจำนวน 11 สายพันธุ์ โดย *L. fermentum* F6 สามารถทนต่อเกลือน้ำดี ในขณะที่ *L. fermentum* IMAU60151, IMAU60083, IMAU20080 และ IMAU60120 มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ต่ำกว่า เช่นเดียวกับ Zoumpopoulou *et al*. (2007) พบว่า *L. fermentum* ACA-DC 179 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ถึงความเข้มข้น 2 % ในขณะที่ Bao *et al.* (2010) ทำการคัดแยก *L. fermentum* SGM จากไก่ พบว่าสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.3 % ได้ 100 % และ *L. fermentum* F6 สามารถทนต่อความเข้มข้นเกลือน้ำดีได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 เปอร์เซนต์การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี [1]	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์การเจริญ	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์การเจริญ	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์การเจริญ
0.3 %	1011B1	99.55	13-12B1	100.00	601-22B1	12.00
	1011B2	98.42	13-12B2	45.43	601-21B1	100.00
	1011C2	100.00	14-21A2	98.83	612-32C1	100.00
	1011-1C2	100.00	14-22B1	97.37	73-21A2	100.00
	1012C2	100.00	2021B1	98.88	73-11C2	100.00
	1031B1	90.19	4011A1	12.20	73-11A1	88.72
	1031C2	11.77	43-11A2	97.86	8031C1	93.43
	1032A1	94.19	5031A2	97.13	9011B1	98.31
	12-11A3	100.00	601-12A2	100.00		
0.6 %	1011B1	100.00	13-12B1	93.46	601-22B1	13.20
	1011B2	86.54	13-12B2	25.61	601-21B1	96.04
	1011C2	100.00	14-21A2	84.84	612-32C1	66.33
	1011-1C2	98.77	14-22B1	65.70	73-11A1	75.04
	1012C2	100.00	2021B1	98.01	73-11C2	100.00
	1031B1	83.02	4011A1	13.20	73-21A2	100.00
	1031C2	15.44	43-11A2	92.44	8031C1	95.42
	1032A1	67.99	5031A2	100.00	9011B1	93.75
	12-11A3	100.00	601-12A2	60.59		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์การเจริญ	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์การเจริญ	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์การเจริญ
1.0 %	1011B1	100.00	13-12B1	64.14	601-22B1	12.80
	1011B2	54.66	13-12B2	12.80	601-21B1	85.97
	1011C2	91.42	14-21A2	30.38	612-32C1	56.98
	1011-1C2	68.41	14-22B1	22.43	73-21A2	61.76
	1012C2	100.00	2021B1	82.95	73-11C2	100.00
	1031B1	72.39	4011A1	12.60	73-11A1	38.80
	1031C2	18.76	43-11A2	21.42	8031C1	66.26
	1032A1	29.94	5031A2	79.67	9011B1	30.41
	12-11A3	8.22	601-12A2	14.50		

อีกทั้งการศึกษานี้ยังพบว่า แบคทีเรียแลคติกบางไอโซเลทสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจาก เกลือน้ำดีส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้มีการจัดเรียงเซลล์ที่ไม่เป็นระเบียบ ส่งผลให้เป็นพิษต่อเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงถือเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้รอดชีวิตได้ในการย่อยและการดูดซึมของระบบทางเดินอาหาร (Sanders *et al.* 1996) นอกจากนี้เกลือน้ำดีมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacillus* แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ซึ่งความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้มีแปรปรวนตั้งแต่ 1.5 % ถึง 2.0 % (w/v) ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณ 0.3 % (w/v) โดยการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกขึ้นอยู่กับความสามารถในการไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อลดความเป็นพิษเกลือน้ำดีต่อเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก (Noriega *et al.* 2004) และเมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะpH 2 - 3 ร่วมกับเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ได้มากกว่า 60% มีแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ 1011C2, 1011-1C2, 1012C2, 2021B1, 5031A2, 601-21B1, 73-21A2 และ 8031C1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และทดสอบสมบัติแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานคร จำนวน 42 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีจำนวน 325 ไอโซเลท จากแบคทีเรียทั้งหมด 375 ไอโซเลท
2. การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก
   2.1 แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีความสามารถในการเจริญได้ดี จำนวน 254 ไอโซเลท
   2.2 แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* Rissen และ *E. coli* ได้จำนวน 26 ไอโซเลท
   2.3 แบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะ pH 3 และมีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1% จึงมีสมบัติของโปรไบโอติกเบื้องต้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

วรรณดี บัญญัติ, พรรษา ขอย้ายกลาง และอาฐิติ ต้นเกษร. 2542. แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักดอง." **ว. วิทยาศาสตร์. มข.** 27 : 255-264.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. **อาหารจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียในประเทศไทย**. โปรซีดดิงส์แลกติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. **ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย." **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 : 177-189.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, ดวงพร คันธโชติ และวราภรณ์ วุฑฒะกุล. 2550. "โพรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสะวิรัติ." **ว. สงขลานครินทร์ วทท**. 29 : 981-991.

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. **ว. มศว. วทท.** 23 : 92-114.

สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549. **พรีไบโอติก และโพรไบโอติก: อาหารสุขภาพ**. ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 6 หน้า.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. **การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม**. วิทยานิพนธ์ มหาบัณฑิตเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ, วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ. 2557. **การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง.** รายงานประชุมวิชาการเสนอผลงานระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 667-676.

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

อัจฉรา หนูเพชร, ดวงพร คันธโชติ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. "การคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย." **ว. สงขลานครินทร์ วทท**. 26: 659-670.

อนุสรา รัตนบุรี. 2553. **การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง(Gracilaria fisheri) โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-Aminobutyric Acid(GABA)**. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ammor, S., Tauveron, G., Dofour, E. and Chevallier, l. 2006. “Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds.” **Food Control**. 17: 454-461.

Axelsson. L.T. 1993. “Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology.” In: **Lactic Acid Bacteria**, Ed. Salminen, S., Ed. Von Wright, A., New York: Marcel Dekker. pp. 1-64.

Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgalarrondo, M., Prévost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle, T. and Chobert, J.M.. 2007. “Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis T31, isolated from Mongolian yoghurt: Inhibitory activity on food-borne pathogens.” **J. Appl. Microbiol**, 103(3), 584–593.

Bacteriological Analytical Manual (BAM). 2001c. *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration. (Online). Available: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429. [30 March 2014]

Bacteriological Analytical Manual (BAM) 2002. *Escherichia coli*. U.S. Food and Drug Administration. (Online). Available: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacterio -logicalAnalyticalManualBAM/UCM064948. [30 March 2014]

Bacteriological Analytical Manual (BAM) 2003. *Listeria monocytogenes*. U.S. Food and Drug Administration. (Online). Available: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/aboratory -Methods/BacteriologicalAnalyticalManual-BAM/ucm071400.htm. [9 May 2014]

Bacteriological Analytical Manual (BAM) 2007. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration. (Online). Available: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070149. [30 Jul. 2010]

Belgacem, B. Z., Ferchichi, M., Prevost, H., Dousset, X. V. and Manai, M. 2008. “Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria form “Gueddid” a traditionally Tunisian fermented meat.” **Meat Sci**. 78 : 513-521.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. 1987. “Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells.” **J. Dairy Sci.**, 70 : 1–12.

Delgado, A., Arroyo López, F. N., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., and Garrido-Fernández, A. 2007. “Optimum bacteriocin production by Lactobacillus plantarum 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics.” **J. Biotechnol.**, 130 : 193–201.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Farber, J.M. 1991. “Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review.” **J. Food Pro.** 54: 58-70.

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

Food network solution. 2010. Lactic acid bacteria. (Online). Available: http://www.foodnetworksolution.com/ vocab/word/782/lactic-acid-bacteria%E0%B9%81%E0%B8%9A%E0%B8%84%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B8%B5%E0%B8%A2%E0%B8%9C%E0B8%A5%E0%B8%B4%E0%B8%95%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%81%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%81. [8 October 2014]

Gänzle, M. G., Höltzel, A., Walter, J., Jung, G., and Hammes, W. P. 2000. “Characterization of Reutericyclin produced by Lactobacillus reuteri LTH2587.” **Appl. Environ. Microbiol.** 66 : 4325–4333.

Gilliland, S.E. and Speck, M. 1984. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.** 33 : 15-18.

Heping, Z., Jie, X., Junguo, W., Menghebilige Tiansong, S., Haiping, L., Mingruo G.. 2008. “A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China.” **Food Control** 19 : 578–586.

Holzapfel, W.H. 2002. “Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries.” **Int. J. Food Microbiol.** 75: 197-212.

Hwanhlem, N. , Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S. 2011. “Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains.” **Food Control** 22 : 401-407.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 40 : 525-532.

Jay, J.M. 1986. **Modern food Microbiology**. New York: Vvan Nostrand Reinhold.

Jaya, P., Gill, H., Smart, J., and Gopal, P. K.. 1998. “Selection and characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics.” **Int. Dairy J.**, 8 : 993–1002.

Klaenhammer, T.R. 1988. “Bacteriocins of lactic acid bacteria.” **Biochimie.** 70: 337-349.

Kong, S. and Davison, A.J. 1980. “The role of interactions between O_2, H_2, OH^-, e^- and O^{2-} in free radical damage to biological systems.” **Arch. Biochem. Biophys.**. 204: 18-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee. J.Y., Kim, C.J. and KunZ, B. 2006. "Identificalion of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages." **Meat Sci.** 72: 437-445.

Lefteris, M., Vagelis, T., Domitille, F., Tom, A., Georgia, Z., Effie, T., Servinc, A., and De Vuyst, L. 2006. "Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds." **Res. Microbiol.** 157(3), 241–247.

Leroy, F. and de Vuyst, L. 2004. "Lactic acid bacteria as functional starter culture for the food fermentation industry." **Trends Food Sci. Tech.** 15: 67-78.

Leroy F., Verluyten, J. and de Vuyst, L. 2006. "Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation." **Int. J. Food Microbiol.** 106: 270-285.

Lima, E.T., Andreatti F. R. L., Okamoto, A. S., Noujaim, J.C., Barros, M. R. and Crocci, A. J. 2007. "Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by Lactobacillus spp. isolated from chickens." **Can. J. Vet. Res.** 71 : 103-107.

Lindgren, S.E. and Dobrogsz, W.J. 1990. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations." **FEMS Microbiol. Rev.** 7 : 149-163.

Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K. and Zhang, J. 2008. "Pentocin 31-1, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product." **Food Control.** 19: 353-359.

Makras, L. and Vuyst, L. D. 2006. "The *in vitro* inhibition of gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids." **Int. Dairy J**. 16 : 1049-1057.

Margolles, A., Garcí a, L., Sá nchez, B., Gueimonde, M., and de los Reyes-Gavilá n, C. G. 2003. "Characterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate-A preliminary study." **Int. J. Food Microbiol.**, 82 : 191–198.

Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., and Mbugua, S. K. 2008. "Functional characteristics of Lactobacillus spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya." **Int. J. Food Microbiol.** 126 : 57–64.

Montville, T. J., Winkowski, K. and Ludescher, R. D. 1995. "Models and mechanisms for bacteriocin action and application." **Int. Dairy J.** 5 : 797-814.

Motarjemi, Y. 2002. "Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries." **Int. J. Food Microbiol.** 75 : 213-229.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murray, J.M., M. Tavassoli, R. Al-Harithy, K.S. Sheldrick, A.R. Lehmann, A.M. Carr and F.Z. Watts. 1994. "Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pomberad2*gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage." **Molecular and Cellular Biol.** 14 : 4878-4888.

Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A., and de los Reyes-Gavilán, C. G. 2004. "Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in Bifidobacterium." **Int. J. Food Microbiol.** 94 : 79–86.

Nueno-Palop, C. and Narbad, A., 2011. "Probiotic assessment of Enterococcus faecalis CP58 isolated from human gut." **Int. J. Food Microbiol.** 145 : 390–394.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2000. "*In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria." **British J. Nutri.** 83: 247-255.

Omar, N.B., Abriouel, H., Lucas, R., Canamero, M.M., Guyot, J.P. and Galvez, A. 2006. "Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso." **Int. J. Food Microbiol.** 112 : 44-50.

Piard, J.C. and DesmaZeaud, M. 1991. "Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end products." **Lait.** 71 : 113-142.

Piard, J.C. and DesmaZeaud, M. 1992. "factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances." **Lait.** 72: 113-142.

Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P. and Córdoba, M.D.G. 2008. "Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages." **Meat sci.** 80: 715-721.

Salminen, S., Deighton, M., and Gorbach, S. 1993. *In* S. Salminen and Wright, A.V. ,eds. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker. New York. pp. 199–225.

Sanders, M. E., Walker, D. C., and Walker, K. M. 1996. "Performance of commercial cultures in fluid milk application." **J. Dairy Sci.** 79(6), 943–955.

Sawatari, Y., Sugiyama, H., Suzuki, Y., Hanaoka, A., Saito, K., Yamauchi, H., Okada, S. and Yokota, A. 2005. "Development of fermented instant Chinese noodle using *Lactobacillus plantarum*." **Food Microbiol.** 22: 539-546.

SAS software. 1998. Statistical Analysis Systems Institute Inc., USA.

Sasidharan, S., Prema, B. and Latha, L.Y. 2011. "Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products." **Asian Pacific J. Tropical Biomedicine**. 1: 130-132.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schillinger, U. and Lucke, F. K. 1989. “Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat.” **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1906.

Servin, A. L. 2004. “Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens.” **FEMS Microbiology Reviews** 28(4), 405–440.

Shanthya, R., Saranya, S. and Shenpagam, N.H. 2011. “Antagonistic Effects of Lactobacilli on Gram-Negative Bacteria.” **J. Adv. Lab. Res. Biol.** 2: 70-72.

Sharavathy, M.K., Urooj, A. and Puttaraj, S. 2001. “Nutritionally important starch fractions in cereal based Indian food preparations.” **Food Chem.** 75: 241-247.

Spelhaug, S. R. and Harlander, S. K. 1989. "Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*", **J. Food Prot.** Vol.52, pp. 856-862

Steinkraus, K.H. 1997. “Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques.” **Food control.** 8: 311-317.

Strompfová , V., Marcinčáková , M., Simonová , M., Bogovic-Matijasić , B., and Lauková , A. 2006. “Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs.” **Anaerobe** 12(2), 75–79.

Svanberg, U., Sjogren, E., Lorri, W., Svennerholm, A. M., and Kaijser, B. 1992. “Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic-fermented cereal gruels.” **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8(6), 601–606.

Tharmaraj, N. and Shah, N. P. 2009. “Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-base dips.” **Int. Food Res. J.** 16: 261-276.

Vrancken, G., Rimaux, T., De Vuyst, L., and Leroy, F. 2008. “Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem.” **Int. J. Food Microbiol.** 128(1), 58–66.

Wen-Hsin L., Bi Yub, Jangc, S.J. and Tsen, H. Y. 2007. “Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry.” **Anaerobe** 13: 107–113.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2006. “Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria.” **Biore. Technol.** 97: 1427-1430.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2008. “Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from ChungKukjang, a fermented soy product.” **Ledensm-Wiss.u.-Technol.** 41: 925-933.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Wu, R., Chen, X., Chen, W., Meng, H., Hu, S., and Zhang, H. 2010. "Complete genome sequence *of Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional home-made koumiss in Inner Mongolia of China." **J. Bacteriol.** 192: 5268-5269.

Zhang, X., Kong, B., and Xiong, Y. L. 2007. Production of cured meat color in nitrite free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation." **Meat Sci.** 77(4), 593–598.

Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., and Tsakalidou, E. 2007. "*Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models." **Int. J. Food Microbiol.** 121(1), 18–26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้