



## ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. ในการผลิตโปรไบโอติกแบบผง  
(Factors effecting the survival of *Pediococcus* sp. in the production of probiotic powder form)

จัดทำโดย

นางสาวเกศสุดา พอดดี

รหัสนักศึกษา 44040751

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร

รหัสนักศึกษา 44040772

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก



5 / 11 / 47

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหา

พิเศษ

( )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. ในการผลิตโปรไบโอติกแบบผง  
(Factors effecting the survival of *Pediococcus* sp. in the production of probiotic powder form)



T096529

จัดทำโดย

นางสาวเกศสุดา พอดิ รหัสประจำตัวนักศึกษา 44040751

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์จิตร รหัสประจำตัวนักศึกษา 44040772

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ.2547

พ.ศ.

ก ๗๗๓๗

๒๕๔๗

เลขหมู่.....

๒๒๕๒๙

เลขทะเบียน.....

วันเดือนปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวเกศสุดา พอดี และ นายศาสตรา เถลิงวงศ์วิจิตร 2547 : ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. ในการผลิต โพรไบโอติกแบบผง (Factors effecting the survival of *Pediococcus* sp. in the production of probiotic powder form) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะ อุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. อติสร เสวตวิวัฒน์

ความต้องการใช้จุลินทรีย์ในฟาร์มเกษตรกรรมต่าง ๆ ซึ่งมีการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากมักจะเกิดปัญหา ภาวะโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ อันมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง การใช้โพรไบโอติกเพื่อให้มี กลไกควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรครายในลักษณะการควบคุมโดยชีววิธีแบบ เดียวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ โพรไบโอติกหรือสารเสริมชีวนะ คือ อาหารเสริมซึ่งประกอบด้วย จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่และก่อให้เกิดประโยชน์ โดยช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายใน ระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต การใช้โพรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการ เจริญเติบโตขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น โดยไป เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายอาหารหรือช่วยสลายอาหารที่ย่อยยาก ทำให้ผลผลิตต่าง ๆ จากสัตว์ ในฟาร์มสูงขึ้น จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกมีด้วยกันหลายชนิด ได้มีการทดลองนำเชื้อ *Pediococcus acidilactici* , *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็น จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกมาผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นส่วนผสมใน อาหารสัตว์ ทำการทดลองเชื้อแต่ละตัวโดยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 32 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 3 ผสม โซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 4 ผสมโซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำทั้ง 4 ส่วนบ่มไว้ประมาณ 30 วัน พบว่า เชื้อที่ผสม skimmed milk และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด โดยเชื้อ *Pediococcus* มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า *Lactobacillus* และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องคือประมาณ 32 องศาเซลเซียส การผสม skimmed milk ลงไปในอาหาร สัตว์จะพบปริมาณการอยู่รอดของเซลล์มากกว่าโซเดียมคลอไรด์ เพราะ skimmed milk จะช่วย ป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ ดังนั้นในการเลือกใช้เชื้อ *Pediococcus* ผสม skimmed milk ในอาหาร สัตว์จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและสามารถมีชีวิตอยู่ รอดได้นานเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้ที่สัตว์บริโภคอาหารมีสุขภาพแข็งแรง และ ช่วยให้มีผลผลิตสูงขึ้นด้วย

เกศสุดา พอดี

ศาสตรา เถลิงวงศ์วิจิตร

อติสร

5/11/47

ลายมือชื่อ น.ศ.

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้ประสบความสำเร็จได้โดยการให้ความช่วยเหลือของหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์ที่ปรึกษาคือ ผศ. อติสร เสวตวิวัฒน์ที่สละเวลาอันมีค่ามาให้คำแนะนำและช่วยเหลือดูแลและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อข้าพเจ้า ขอขอบคุณเพื่อน ๆ สาขาเทคโนโลยีการหมักทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบคุณอาจารย์วิรัช อารีกุล ที่สละเวลามาเป็นกรรมการสอบครั้งนี้

ขอขอบคุณนายนครินทร์ แดงทิพย์ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเทคโนโลยีและการทำ

Power point และ สูดถ่ายขอขอบคุณพ่อและแม่ที่เป็นหน่วยสนับสนุนทางการเงิน และกำลังใจดี ๆ ที่ทำให้ลูกทั้ง 2 คนนี้มีพลังในการทำงาน

นางสาวเกศสุตา พอดี

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์วิจิตร

ตุลาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
2 การตรวจเอกสาร	2
ข้อมูลเบื้องต้นของ โพรไบโอติก	3
จุดประสงค์ในการใช้โพรไบโอติกในอาหารสัตว์	4
หลักการทำงานของโพรไบโอติกที่ดี	5
ลักษณะการทำงานของโพรไบโอติกที่ดี	7
จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	7
ความต้องการ โพรไบโอติก	11
กลไกการทำงานของโพรไบโอติก	11
กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย	16
รูปแบบของการใช้สารเสริมชีวนะ ในอาหารสัตว์	17
หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ	18
วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็น โพรไบโอติก	18
ประโยชน์ของการใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์	20
คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกทางสัตววิทยาและสัตววิทยา	20
การจำแนกแบคทีเรียในสกุล <i>Pediococcus</i>	24
อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในสกุล <i>Pediococcus</i>	26
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Pediococcus</i>	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง บทที่		หน้า
3	อุปกรณ์และวิธีการ	30
	สารเคมี	30
	อุปกรณ์ในการวิเคราะห์	30
	เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	30
	สถานที่ในการทดลอง	31
	วิธีการทดลอง	31
4	ผลการทดลองและวิจารณ์	35
5	สรุปผลการทดลอง	41
	ข้อเสนอแนะ	42
	เอกสารอ้างอิง	43
	ภาคผนวก ก	
	ภาคผนวก ข	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	เปรียบเทียบคุณสมบัติและการทำงานของโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ	6
2	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติก	8
3	สารเสริมชีวิตที่จำหน่ายทางการค้า	10
4	ผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในการหมักของแบคทีเรียกลุ่ม ต่าง ๆ แสดงในรูปของโมลาร์	21
5	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR 536	35
6	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)ของเชื้อ <i>Pediococcus acidilactici</i> (LAB 4)	36
7	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)ของเชื้อ <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LAB 1)	36
8	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้ ของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR 536	38
9	แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้ ของเชื้อ <i>Pediococcus acidilactici</i> (LAB 4)	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก	19
2	กระบวนการเมแทบอลิซึมโดยอาศัยกลูโคสและฟรุกโตสของ homofermentative lactic acid bacteria โดย glycolysis pathway	22
3	กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสและฟรุกโตสของ heterofermentative lactic acid bacteria โดย phosphoketolase pathway	23
4	แสดงขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม	32
5	แสดงขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้	34
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาทีก) กับ log CFU/ml ในสภาวะ จำลองกระเพาะอาหาร	40
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาทีก) กับ log CFU/ml ในสภาวะ จำลองลำไส้สัตว์	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทนำ

ปัจจุบันมีจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้นทุกปี ดังนั้นแหล่งอาหารที่นำมาใช้ในการบริโภค เช่น เนื้อสัตว์ จึงต้องมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย อาหารโปรตีนจากเนื้อสัตว์นับว่ามีความสำคัญต่อประชากรโลก การเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบันมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อการบริโภคของประชากร และตอบสนองต่อความต้องการของตลาดที่มีเพิ่มขึ้นทุกปี จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตทั้งด้านการปรับปรุงสายพันธุ์สัตว์ การจัดการเลี้ยงดู และคุณภาพอาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้ในระดัปลำ (20-50 ส่วนในล้านส่วน) เพื่อเร่งการเจริญ ทำให้สัตว์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้สารอาหาร และปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวกับการผลิตสัตว์ และเพื่อป้องกันการติดเชื้อในช่วงที่สัตว์อยู่ในสภาวะไวต่อการติดเชื้อ แต่สัตว์ที่ได้รับสารปฏิชีวนะในระดัปลำเป็นเวลานาน ทำให้มีการพัฒนาของเชื้อดื้อยาขึ้นในลำไส้ ยาปฏิชีวนะอาจสะสมอยู่ในเนื้อสัตว์ เมื่อมนุษย์บริโภคเข้าไปอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยในทางเดินเกิดการดื้อยาไปด้วย การดื้อต่อยาของเชื้อก่อโรค นำไปสู่ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรคในมนุษย์ไม่ได้ผล รวมถึงสัตว์อื่น ๆ ด้วย การส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ต้องได้รับผลกระทบอย่างมาก เมื่อตรวจพบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ เนื่องจากในต่างประเทศใช้มาตรฐานสุขอนามัยเป็นข้อบังคับในการกำหนดคุณภาพสินค้า การนำจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติก มาใช้เสริมในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงและเพิ่มภูมิคุ้มกันแก่สัตว์ จึงเป็นแนวทางที่ผู้ศึกษาสนใจกันมาก จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็น โปรไบโอติกจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อสัตว์และต้องแสดงให้เห็นผลดีกว่าการไม่เติม โปรไบโอติกได้ชัดเจน ในปัจจุบันมีโรงงานผลิตอาหารสัตว์มากมาย และได้มีการคิดค้นสูตรอาหารใหม่ ๆ มีการเติมจุลินทรีย์โปรไบโอติก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่อาหารสัตว์ ประเทศไทยได้มีการประกาศการใช้โปรไบโอติกไว้ในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยใช้ชื่อเรียกว่า สารเสริมชีวนะ การที่ประเทศไทยประกาศการใช้สารเสริมชีวนะหรือ โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ ทำให้ต่างประเทศสนใจในคุณภาพเนื้อสัตว์ส่งออก โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้เป็นพวกแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารเสริมชีวนะ หรือ โปรไบโอติกสำหรับสัตว์ในฟาร์มสามารถแยกได้จากอาหารหมักคองของไทย การศึกษานี้เป็นการศึกษาสมบัติการเป็น โปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก หาสูตรอาหาร สภาวะที่เหมาะสม และศึกษาวิธีการเก็บรักษาที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานที่สุด เพื่อลดต้นทุนการผลิต , ลดการนำเข้าของเชื้อที่ต้องสั่งจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงและไม่เหมาะกับสภาพแวดล้อมของไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก
2. เพื่อเปรียบเทียบเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากหมนมและจากบริษัทที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในอาหารสัตว์
3. เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตในรูปแบบผงในกระเพาะและลำไส้จำลอง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### 1. ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotic) หรือสารเสริมชีวิต จัดเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะสมดุล ช่วยในระบบย่อยอาหารดีขึ้น การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น ไม่มีปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การดื้อยา หรือสารตกค้าง ใช้ได้กับสัตว์หลายประเภท

คำว่าโปรไบโอติก (Probiotic) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” Lilly และ Stillwell (1965) เป็นบุคคลแรกที่นำมาอธิบายสารที่ปล่อยออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงมีความหมายตรงกันข้ามกับคำว่า “Antibiotic” หรือสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายเพิ่มเติม คือ

Parker ( 1974) เป็นคนแรกที่ใช้คำว่า Probiotic เพื่ออธิบายถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการป้อนสัตว์ โดยให้คำจำกัดความว่า “จุลินทรีย์ หรือ สารที่ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล”

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (1989) ประเทศสหรัฐอเมริกา หรือ FDA (The United States Food and Drug Administration) ได้เปลี่ยนมาใช้คำว่า DFM (Direct – Fed Microbial) แทนคำว่า Probiotic และได้ให้ความหมายว่าเป็นแหล่งของจุลินทรีย์มีชีวิต ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ นอกจาก FDA และ AAFCO (The Association of American Feed Control Official) ได้จัดให้จุลินทรีย์ DFM เป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) ingredients เป็น Food and Food additive ที่ปลอดภัยสามารถเป็นอาหารของมนุษย์ได้โดยผ่านการพิจารณาจากนักเภสัชกรและนักพิษวิทยาแล้ว

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Teark และ Wilkinson (1989) จากสหราชอาณาจักรอังกฤษให้คำจำกัดความว่า “เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถให้สัตว์กินเพื่อปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น”

โปรไบโอติกในความหมายของ สิริรัตน์(1988) ผู้นำเสนอผลงาน “Probiotic BS-11” ซึ่งเป็น โปรไบโอติกที่ใช้ในบ่อเลี้ยง ใต้กล่าวให้ความหมายไว้ว่า “โปร” คือ การเตรียม “ไบโอติก” คือ ชีวิต ดังนั้นความหมายของ โปรไบโอติกคือ การเตรียมพร้อมให้สิ่งมีชีวิตมีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งก็คือ จุลินทรีย์จากคำจำกัดความ นั่นคือจุลินทรีย์ที่เมื่อผู้บริโภคนำเข้าไปแล้ว สามารถเข้าไปและผิวหน้าของทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ตาย แล้วผลิตสารบางอย่างเพื่อเป็นการแก่งแย่งกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

นอกจากนี้ยังมีการให้ความหมายของ โปรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดจำเพาะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (โดยเฉพาะ *Lactobacillus* sp. ) แล้วเสริมในอาหารสัตว์ มีผลทำให้การเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ

## 2. จุดประสงค์ในการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์

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

1. เพื่อเป็นการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตขึ้น
2. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น โดยไปเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายอาหารหรือช่วยสลายอาหารที่ย่อยยาก
3. ทำให้ผลผลิตต่าง ๆ จากสัตว์ในฟาร์มสูงขึ้น

### 3. หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

#### 3.1 ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคโดย

- สร้างสาร Antibacterial substance
- ขัดขวางเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
- สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ไม่สามารถเกาะ และ ก่อตัวในทางเดินอาหารได้

#### 3.2 ช่วยระบบย่อยอาหาร โดย

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

#### 3.3 กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคโดย

- มีการสร้างสาร Antibody มากขึ้น
- เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ ในการกินจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค หรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

### ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนการใช้สารปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ที่อาจเกิดปัญหาการคือ ยาของเชื้อก่อโรค และสารตกค้าง
2. ช่วยให้ระบบย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้น
3. ป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ซึ่งโปรไบโอติกจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากสารปฏิชีวนะดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติและการทำงานของโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	สารปฏิชีวนะ
<b>คุณสมบัติ</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต</li> <li>2. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร</li> <li>3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร</li> <li>4. ไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์</li> <li>5. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์</li> </ol>	<b>คุณสมบัติ</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เป็นสารประกอบเคมีบริสุทธิ์</li> <li>2. ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร</li> <li>3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร</li> <li>4. อาจทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์</li> <li>5. อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์</li> </ol>
<b>การออกฤทธิ์</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. สร้างกรดและลด pH ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค</li> <li>2. ทำงานเจาะจงเฉพาะที่</li> <li>3. แบ่งตัวเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารและแย่งจับพื้นที่บริเวณทางเดินอาหารกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค</li> </ol>	<b>การออกฤทธิ์</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ยับยั้งการสร้างโปรตีน DNA , RNA ของเซลล์สิ่งมีชีวิต</li> <li>2. พื้นที่การทำงานกว้าง</li> <li>3. ไม่มีการเพิ่มจำนวน</li> </ol>

ที่มา : อภิศุกร (2542)

#### 4. ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น และมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่มีพิษ (non- pathogenic , non- toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ได้ และสามารถย่อยสลายในลำไส้ได้
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานได้ในสภาพที่เก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม
6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานหลังจากทำการผสมกับอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อน , แร่อัดเพื่อการอัดเม็ด และสภาพที่เป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation
7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์
8. ราคาไม่แพง
9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้
12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้

#### 5. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็ก ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกซึ่งมีผลทางอ้อมต่อผลผลิตสัตว์ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. จุลินทรีย์บางชนิดสร้างจุลินทรีย์และสารที่ไม่ทราบชนิด ซึ่งไม่เพียงแต่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารสัตว์ แต่ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยและยังให้กรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีน เมไทโอนีน เพื่อเป็นต้นกำเนิดในการสร้างโปรตีนและไขมัน

2. จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เฉพาะเจาะจงที่จะย่อยสลายประกอบเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ซึ่งสัตว์และจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่สามารถนำไปใช้ต่อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส ไซลันเนส ไลเพส โพนทีเอส บีต้า-กลูคาเนส แอนิเลส ซึ่งช่วยในการย่อยอาหารได้

3. จุลินทรีย์สามารถสร้างสารปรุงแต่งพิเศษและสารหอมระเหยซึ่งสามารถส่งเสริมการกินอาหารทำให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้น

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกโดยสร้างโคโลนีทุกพื้นที่ของทางเดินอาหารและเคลื่อนที่จากปากไปสู่ปลายทางคือทวารจะไม่เคลื่อนที่ขึ้นทางบทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่เหล่านี้ ช่วยย่อยอาหารและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกันและระหว่างจุลินทรีย์กับ host จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้าง acetate lactate propionate volatile acid วิตามิน เอนไซม์ สารต้านแบคทีเรียและสารประกอบเคมีที่ไม่ทราบชนิด

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนี้อาจเป็นแบคทีเรีย รา หรือ ยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งคุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์จะแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติก

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

ที่มา : Kung (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเสริมชีวนะหรือโพรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์หลายด้าน แต่การใช้โพรไบโอติกจะต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยมีระดับการใช้ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไม่น้อยกว่า  $1 \times 10^5$  CFU (colony forming unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กรัม จุลินทรีย์ที่กำหนดให้ใช้เป็นโพรไบโอติกตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 มีดังนี้

### 1. แบคทีเรีย

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

### 2. เชื้อรา

*Aspergillus niger* และ *A. oryzae*

### 3. ยีสต์

*Candida pintolepessi* , *Saccharomyces cerevisiae*

ตารางที่ 3 สารเสริมชีวนะที่จำหน่ายทางการค้า

ชื่อทางการค้า	ชนิดของสารเสริมชีวนะ	สายพันธุ์อ้างอิง
Bactocell ®	<i>Pediococcus acidilactici</i>	CNCM MA18/5M
Biacton ®	<i>Lactobacillus farciminis</i>	CNCM MA 67/4R
Bioplus 2B ®	[In a 1/1 ratio] <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Strain CH200 DSM 5749 Strain CH201 DSM 5750
Biosprint ®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BCCM/MUCL 39885
Bonvital ®	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSM 7134 DSM 7133
Biosaf Sc 47 (Sacc. Cer.) ®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc 47 NCYC Sc47
Cylactin LBC ®	<i>Enterococcus faecium</i>	NCIB 1045
Levucell SB20 ®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CNCM 1-1079
Levucell Sc20 ®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CNCM 1-1077
Paciflor C 10®	<i>Bacillus cereus</i>	CIP 5832/ATCC 14893
Probios PDFM	<i>Enterococcus faecium</i>	20.2 DSM 4788 / ATCC 53519
Granular®	<i>Enterococcus faecium</i>	30.1 DSM 4789 / ATCC 65593
Toyocerin®	<i>Bacillus cereus var. toyoi</i>	CNCMI 10121 / NCCIB 401121
YEA-SACC ®	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 49394
Microferm ®	<i>Enterococcus faecium</i>	M74 CDSM 5464 for piglet
Oralin ®	<i>Enterococcus faecium</i>	NCIB 10415 for Pig

ที่มา : Anonymous (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. ความต้องการโปรไบโอติก

สภาพปัจจุบันสิ่งมีชีวิตมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เป็นธรรมชาติ ซึ่งต้องมีการปฏิบัติคนอย่างระมัดระวังหรือการดูแลอนามัยที่ดี มีข้อจำกัดมากมายเกี่ยวกับการบริโภคหรือการกินอาหารที่ไม่เป็นธรรมชาติ มีภาวะกดดัน มีโอกาสสัมผัสหรือมีการเลี้ยงดูของแม่และลูกน้อยลง ภาวะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายจุลินทรีย์ ภาวะกดดันรวมทั้งความเครียด ล้วนมีผลต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ทั้งสิ้น โดยมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมคือ อาจทำให้จุลินทรีย์มีองค์ประกอบที่ผิดปกติไปจากเดิม มีบางอย่างบกพร่อง อันมีผลต่อการแสดงออกถึงความต้านทานโรคลดลง มีความไวต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค มีผลต่อการเจริญเติบโตในวัยอ่อนลดลง

การใช้โปรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้มีการเสริมสร้างหรือซ่อมแซมฟื้นฟูในส่วนที่บกพร่องต่าง ๆ เหล่านี้ให้กลับคืนสู่สภาพเดิมปกติ เพื่อทำหน้าที่ปกป้องและควบคุมจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่บุกรุกได้คืออย่างมีประสิทธิภาพเท่าเดิม ซึ่งมีความแตกต่างจากการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งมุ่งไปที่การให้การรักษาและมีการส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยไม่ได้คำนึงถึงผลข้างเคียงที่ตามมา

## 7. กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

### 7.1 การผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์

#### 7.1.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกเป็นตัวยับยั้งที่แรงที่สุดและมีช่วงของการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ ราและแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity

เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวจุลินทรีย์นั้นๆ แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรายงานว่า สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus* ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus sake* ที่แยกจากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ นอกจากนี้ *Enterococcus* ก็ สามารถกรดแลคติกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 7.1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

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

ในสถานะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลกติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงต่อแบคทีเรีย โดยหมู่ sulfhydryl ภายในโมเลกุล โปรตีนของเซลล์และในชั้นไขมันเมมเบรนสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและ โปรตีนในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะรวมตัวกับไรโอโซมาเนค โดยเอนไซม์แลคโคเปอร์ออกซิเดส เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ โครงสร้างเมมเบรนของแบคทีเรียจะถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงได้เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโปไรโอโซมาเนค

### 7.1.3 คาร์บอนไดออกไซด์

ส่วนมากคาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลกติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้วิธีเมตาบอลิซึมอื่นๆก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการ Decarboxylation และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมันก็เป็นเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารละลาย ที่ความเข้มข้นสูงสามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

### 7.1.4 ไคอะซิดิล

มีรายงานว่าไคอะซิดิลมีฤทธิ์ต่อต้าน *Bacillus* sp. แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างไคอะซิดิลได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* นอกจากนี้ยังพบว่าไคอะซิดิลยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกกลไกยับยั้งของไคอะซิดิลคาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ยึดกับตรงตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหรือเอนไซม์

### 7.1.5 สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

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

### 7.1.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน จะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรม การตัดแปลงหลังผ่านกระบวนการการแปรหัสทางพันธุกรรม และกลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซินแบ่งได้เป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

#### 1. Class I : Lantibiotic

##### 1.1 Nisin

Nisin A ควบคุมการสร้างยีน โดย Nis A ขนาด 174 bp โมเลกุลของ pre- nisin เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 57 ตัว เกิดขึ้นมาหลังผ่านกระบวนการแปรหัสทางพันธุกรรม และเปลี่ยนมาอยู่ในรูป pro- nisin เมื่อตัดกรดอะมิโนตรง leader peptide ของ pre- nisin ออกไป 3 ตัว โมเลกุลสมบูรณ์ที่พร้อมจะทำงานได้ต้องผ่านกระบวนการ dehydration ก่อน จะได้ลักษณะโมเลกุลมีประจุบวกและไม่ชอบน้ำ โมเลกุลที่ได้มีขนาดเล็ก และมักพบอยู่ 2 โมเลกุล ที่มีความเสถียร nisin-A มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ที่ไวต่อสารชนิดนี้ให้ตายได้ใน 1 นาที โดย nisin จะเป็นทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างโมเลกุลของ nisin และเยื่อหุ้มเซลล์ บางครั้งเกิดจากประจุบวกของ nisin ทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ เมื่อ nisin จะแทรกเข้าไปภายใน จะทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ เป็นผลให้สารประกอบน้ำหนักโมเลกุลต่ำภายในเซลล์ไหลออกอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ nisin ยังไปลดประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วย nisin สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารในห่วงโซ่อิเล็กตรอนได้ เป็นผลให้การรับออกซิเจนถูกยับยั้งเซลล์ที่ไวต่อ nisin จึงไม่สามารถรับพลังงานไปใช้ในการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังพบว่า การเติม chelating agent จะช่วยให้เซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อ nisin โดยสารนี้จะไปรบกวนสภาพความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ ขอมให้แบคเทอริโอซินเข้าไปในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม

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

## 1.2 Lactocin S

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

## 1.3 Lactocin 481

ผลิตโดย *Lactobacillus lactis* โครงสร้างปฐมภูมิของ Lactocin 481 ไม่มีความสัมพันธ์กับ nisin เมื่อพัฒนาเป็น โมเลกุลที่สมบูรณ์พร้อมทำงาน จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน 27 ตัว และแสดงลักษณะของ lanthionine ด้วย

## 2. Class II : Small heat-stable bacteriocin

ขนาดโมเลกุลจะเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 และ 57 ตัวตามลำดับจะออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม แบคทีเรียโอซินในคลาสนี้ได้แก่

### 2.1 Lactococcin A

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

## 2.2 Lactococcin B

เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 47 ตัวกลไกการทำงานของ Lactococcin B จะคล้ายกับ Lactococcin A ขึ้นที่เกี่ยวเนื่องกับการสร้าง Lactococcin B อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับ Lactococcin A

## 2.3 Lactococcin M

ขึ้นที่เกี่ยวกับการสร้างสารจะอยู่บน conjugative plasmid p9B4 เช่นเดียวกับ Lactococcin A และ B

## 2.4 Small heat-stable กลุ่มอื่นๆ

ได้แก่ pediocinPA-1 และ pediocin Ach,leucocinA-UAL,mesentercin Y105,sakacin A, sakacin P และ curvacinA แบคทีเรียโอซินเหล่านี้จะเป็นเปปไทด์สายตรงที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36-44 ตัว มีรายงานว่า pediocin PA-1 ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มไซโตพลาซึมของแบคทีเรียที่ไวต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนี้

## 2.5 Lactacin F

Lactacin F เป็นแบคทีเรียโอซิน ที่สร้างโดย *Lactobacillus acidophilus* 11088 (NCK88) มีคุณสมบัติเป็น โปรตีนที่เสถียรและทนทานต่อความร้อนสามารถทนต่อการนึ่งฆ่าเชื้อโรคอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีขนาดโมเลกุล 180 kDa.มีโครงสร้างเป็น โปรตีนก้อนกลมมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้ง *Lactobacillus acidophilu* , *L. fermentum* ,*Enterococcus faecalis* , *L.delbrueckii subsp.lactis* และ *L. delbrueckii subsp.bulgaricus* อย่างไรก็ตาม Lactacin F สามารถถูกทำลายโดย proteinaseK,subtilisin,trypsin และ ficin แต่ไม่ได้รับผลกระทบจาก lysozyme , lipase

## 2.6 Lactococcin G

เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมการทำงานโดยอาศัยเปปไทด์ ที่มีความยาวของกรดอะมิโน ประมาณ 39 และ 35 ตัว เปปไทด์ทั้งสองมีประจุสูง จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์

### 3. Class III :Large heat-labile bacteriocin

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

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

7.2 การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E.coli* และ *Salmonella* กลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญติดกับผนังลำไส้แล้วสามารถเพิ่มจำนวนแล้วเพาะตัวในส่วน lumen ของลำไส้ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาตัวอย่างกระเพาะอาหารหนู และในกระเพาะพักและกระหุ้งกันของไก่ ต่อมาแบคทีเรียกรดแลคติกจะยึดครองบริเวณ receptor ที่ผิวเซลล์ ทำให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคถูกกำจัดออกไปจากทางเดินอาหาร

แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค *E.coli* ยึดเกาะที่เซลล์เป้าหมายด้วย Proteinaceous projection (pili) ส่วน *Lactobacilli* จะยึดเกาะที่ผนังลำไส้ด้วย extracellular substance ซึ่งประกอบด้วย polysaccharide, protein, lipid และ lipoteichoic acid สำหรับ lipoteichoic acid จะเป็นโพลีเมอร์ของ glycerolphosphate ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ *Lactobacilli*

### 7.3 กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน

## 8. กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย

กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย ( Mode of action of live bacterial culture ) ที่เป็นสารเสริมชีวิต สามารถจะอธิบายได้ว่า เมื่อสัตว์กินจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมชีวิตเข้าไป แบคทีเรานั้นจะแพร่พันธุ์และก่อตัวที่ผิวทางเดินอาหาร เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งสัตว์กินเข้าไปภายหลังเจริญเติบโตและเกาะที่ผนังลำไส้ยากมากขึ้น เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย จะสร้างกรดอินทรีย์ ( organic acid ) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลให้ pH ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบทางเดินอาหารเปลี่ยน ซึ่งผลดังกล่าวไม่เหมาะสมกับการคงตัวหรือการเพิ่มจำนวนของ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหรือแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ เช่น เชื้อ *Lactobacilli* สามารถสร้าง เอนไซม์แลกเทส ( lactase ) และอะไมเลส ( amylase ) ทำให้ร่างกายได้รับเอนไซม์มากขึ้น เป็นผล ทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น โดยมีการทำงานเป็นแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ( symbiosis ) ของ เอนไซม์ในทางเดินอาหารและกระบวนการย่อยอาหาร แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างวิตามิน บี 12 ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น เนื่องจากวิตามินดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการ สังเคราะห์กรดอะมิโน การสร้างโปรตีน การเปลี่ยนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยการให้จุลินทรีย์ ที่เป็นประโยชน์ต่อลูกสัตว์แรกเกิดจำนวนมากก่อสร้างสารจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ อาจช่วย สัตว์สร้างจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และช่วยควบคุมหรือขจัดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค การแข่งขัน เพื่อยับยั้งการออกฤทธิ์ โดย Fox ( 1988 ) และ Stark และ Wilkinson ( 1989 ) ได้วิจัยการแข่งขัน การ เกาะ การจับหรือการกอดตัวในทางเดินอาหารของ *Lactobacilli* และแบคทีเรียก่อโรคเพื่อครอบครอง ทางเดินอาหาร การป้องกันพิษของเอมีน ( amine ) และก๊าซแอมโมเนีย ( ammonia ) เนื่องจาก โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเอมีนและก๊าซแอมโมเนียโดยการเพิ่ม metabolic activity ของเชื้อ *E.coli* เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจง ( Non-specific immunomodulators ) ในมดลูกสุกรที่กิน *Lactobacilli* พบว่า *Lactobacilli* จะทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ( immunomodulators ) โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดในทางเดินอาหาร

### 9. รูปแบบของการใช้สารเสริมชีวิตในอาหารสัตว์

การใช้สารเสริมชีวิตหรือ โปรไบโอติก จะมีผลดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ แต่สารเสริม ชีวิตยังมีราคาสูง เพราะว่าสารเสริมชีวิตที่ผสมในอาหารสัตว์ผลิตอยู่ในรูปสารผสมในปัจจุบันที่ นำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อจะใช้จึงนำไปผสมกับอาหารสัตว์สำเร็จรูป ก่อนที่จะนำไปให้สัตว์กิน ทำให้เกษตรกรอาจไม่นิยมใช้ แต่โรงงานผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปที่มีสารเสริมชีวิตผสมแทนการใช้ สารปฏิชีวนะได้ การใช้สารเสริมชีวิตในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป โดยกำหนดให้มีเชื้อจุลินทรีย์ ไม่น้อยกว่า  $1 \times 10^5$  CFU ต่อน้ำหนักอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป 1 กรัม จุลินทรีย์สารเสริมชีวิตที่ใช้ ผสมในอาหารสัตว์มี 2 รูปแบบ คือ การใช้เซลล์ที่มีชีวิต ( vegetative form ) และ การใช้ในลักษณะ ของสปอร์ ( endospore form ) ซึ่งพบว่าทำให้เซลล์ที่มีชีวิต นิยมใช้ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือ สัตว์สี่เท้ากระเพาะ เช่น วัว หรือ ควาย มากกว่าสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น ไก่ สุกร หรือ เป็ด ทั้งนี้เพราะ สภาพที่เป็นกรดทางเดินอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว จะทำให้เชื้อที่มีชีวิตเปลี่ยนแปลงได้ก่อนที่จะ ผ่านไปถึงลำไส้ ทำให้สารเสริมชีวิตนั้นไม่สามารถให้ประโยชน์กับสัตว์เต็มที่ ดังนั้นลักษณะที่ เหมาะสมกับสัตว์กระเพาะเดี่ยวควรจะเป็นการให้ในรูปสปอร์ เพราะสามารถทนต่อน้ำย่อยใน

กระเพาะได้ดี และทนต่อความร้อน นอกจากนี้ความร้อนและความชื้นในขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์ในกระบวนการอัดเม็ด (pellet) จะมีผลต่อลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเช่นกัน

#### 10. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวิต

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นสารเสริมชีวิตนั้น สามารถพิจารณาได้ ต้องเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรค โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เจ้าบ้าน สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง เช่น กระเพาะอาหารและสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งน้ำดีหลังมาจากตับอ่อน สามารถเพิ่มจำนวนและมีเมตาบอลิซึมในระบบทางเดินอาหารได้ ผลิตรครอินทรีย์และสารต้านจุลชีพ ซึ่งมีผลลดจุลินทรีย์เกิดโรค เพาะเลี้ยงง่ายและเพิ่มจำนวนได้เร็ว ตลอดจนมีอัตราการรอดชีวิตสูง เมื่อเก็บรักษาระยะเวลาไม่นาน ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเป็นจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมได้ ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านทานสลายพิษของเชื้อโรคหรือสารต้านโภชนาตัวอื่นๆที่อยู่ในอาหาร เช่น *Lactobacillus*

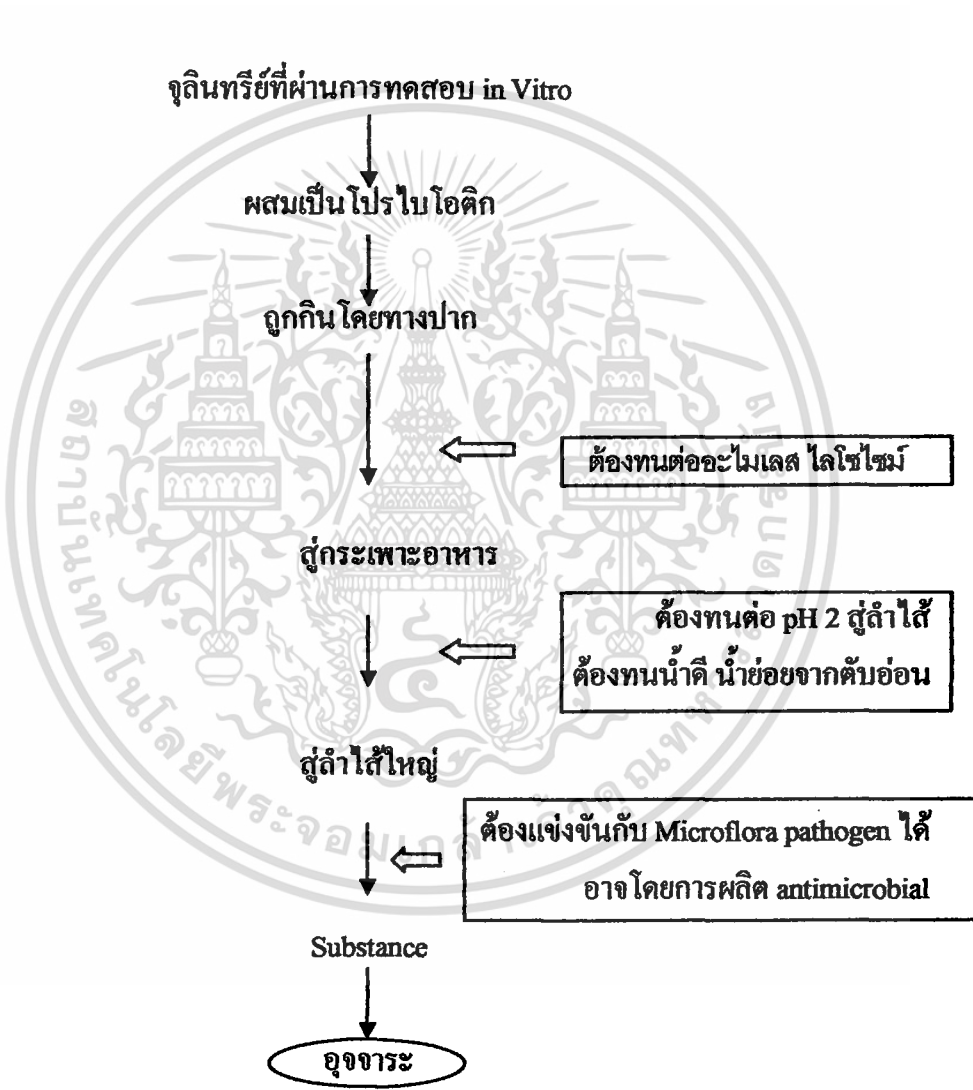
#### 11. วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก

การพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็น โปรไบโอติกนั้น สิ่งสำคัญประกอบด้วย 2 ประการคือ)

1. เป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วไปและมีความปลอดภัยตลอดระยะเวลาในการใช้ทั้งระยะสั้นและระยะยาว ตามมาตรฐาน GRAS ( Generally Recognized As Safe Microorganism )

2. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความเฉพาะเจาะจง คือจุลินทรีย์ที่จะพิจารณาต้องระบุกลุ่มเป้าหมายที่จะนำไปใช้ให้ชัดเจนว่าในคนหรือสัตว์ประเภทใด ชนิดใด จุลินทรีย์นั้นจึงจะออกฤทธิ์หรือมีเมตาบอลิซึมให้ประโยชน์ตามที่ต้องการได้และการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณเนื้อเยื่อใด ในสัตว์ชนิดใดก็มักแสดงผลบวกกับผู้ให้อาศัยชนิดเดียวกันด้วย ซึ่งอาจจะใช้ไม่ได้ผลกับสัตว์ชนิดอื่นซึ่งมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ด้านสรีระของเยื่อผิว ระบบการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารในกระเพาะและลำไส้ รวมทั้งการยึดเกาะกับเยื่อผนังภายในร่างกาย การขยายพันธุ์ การได้ผลบวกในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ อาจจะไม่ได้ผลบวกในการทดลองกับสัตว์ทดลองหรือผลบวกทางคลินิกก็เป็นได้ เนื่องจากสภาวะแตกต่างกัน

ในการใช้โปรไบโอติกเพื่อให้ผลตามที่มุ่งหวังนั้น จุลินทรีย์ที่ผ่านจากปากเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของร่างกายจะต้องรอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณต่าง ๆ หรือจุดจำเพาะเจาะจงที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ หรือมี การแข่งขันเจริญเติบโตกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ มีการขยายเผ่าพันธุ์และผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นในห้องปฏิบัติการ จะต้องได้รับการทดสอบจนมั่นใจในสัตว์ทดลองและในผู้บริโภค



ภาพที่ 1 ขั้นตอนในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็น โปรไบโอติก  
ที่มา : วลัยพร (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 12. ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนสารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ ซึ่งอาจพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง
2. ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารสัตว์ดีขึ้น ทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในนมดีขึ้น
3. ใช้ป้องกันโรคต่างๆเนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ลดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์ เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้สูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
4. ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอก โดยโปรไบโอติกจะช่วยยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอก และลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน
5. ยับยั้งการสร้างคลอโรสเตอรอล
6. ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ
7. FDA ขอมรับว่าเป็น GRAS

## 13. คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกทางสัตววิทยาและสรีระวิทยา

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก มีรูปร่างแบบท่อน และแบบกลม อาจอยู่เดี่ยว ๆ หรือเกาะกันเป็นคู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเจริญได้ดีในสภาวะกดดันสูง ที่อุณหภูมิ 5-50 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดต่ำที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5-5.8 แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาพที่มีวัตถุแห้งได้สูงสุดถึง 700 กรัมต่อกิโลกรัม (70 เปอร์เซ็นต์) หรือเมื่อมีความชื้นอยู่ที่เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ Woolford (1990)

การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นไปตาม Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> ed.1994 ดังนี้ Holt และคณะ (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 13.1 กลุ่มรูปร่างแบบท่อนกลม

ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก สกุล *Enterococcus* *Lactobacillus* *Streptococcus* *Vagococcus* *Aerococcus* *Pediococcus* *Tetragenococcus* และ *Leuconoctoc*

### 13.2 กลุ่มรูปร่างแบบท่อนยาว

ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* และ *Carpobacterium* นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกจากความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกได้เป็น 2 จำพวก คือ

#### 13.2.1.Homofermentative lactic acid bacteria

ผลิตภัณฑ์หลัก (main product) ที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแลคติก 80-90 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4

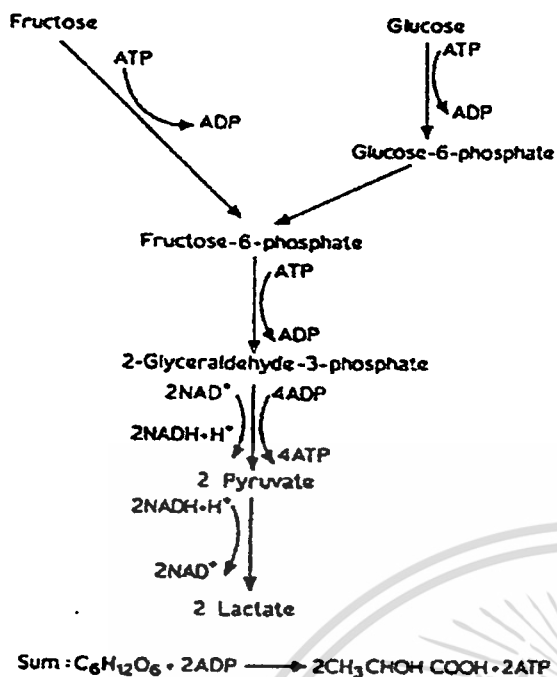
กระบวนการเมแทบอลิซึมดำเนินไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือที่เรียกว่าวิถีเอ็มเดนเมอร์โฮฟพามาส (Embden Meyerhof Parnas pathway) ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 4 ผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในการหมักของแบคทีเรียกลุ่ม ต่าง ๆ แสดงในรูปของโมลาร์

Substrate	Products	Comments
1 glucose	2 lactic acid	Homofermentation
1 fructose	2 lactic acid	Homofermentation
1 glucose	1 lactic acid, 1 acetic acid, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
1 glucose	1 lactic acid, 1 ethanol, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
3 fructose	1 lactic acid, 1 acetic acid, 2 mannitol, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
1 xylose	1 lactic acid, 1 acetic acid	Homo and Hetero
2 citrate	3 acetic acid, 1 lactic acid, 3 carbon dioxide	Homo and Hetero
2 citrate	2 acetic acid, 4 carbon dioxide, 1 2,3-butanediol	Homo and Hetero
1 malate	1 lactate and 1 carbon dioxide	Homo and Hetero

ที่มา : Muck (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



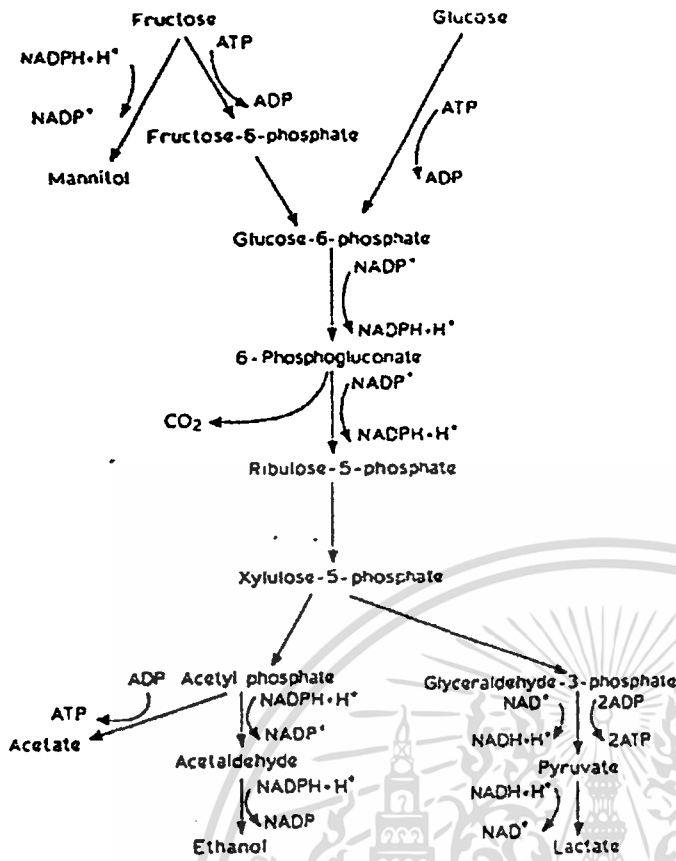
**ภาพที่ 2** กระบวนการเมแทบอลิซึม โดยอาศัยกลูโคสและฟรุกโตสของ homofermentative lactic acid bacteria โดย glycolysis pathway  
ที่มา : Woolford (1985)

### 13.2.2.Heterofermentative lactic acid bacteria

ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้คือกรดแลคติกในปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการเมแทบอลิซึมดำเนินไปตามวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase pathway) ดังแสดงในภาพที่ 3

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่เรียกรดแลคติก ในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียที่เรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermentative lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่ากลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria เมื่อใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นสารตั้งต้นประมาณ 2 เท่าตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสและฟรุกโตสของ heterofermentative lactic acid bacteria โดย phosphoketolase pathway  
ที่มา : Woolford (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 14. การจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus*

Breed และคณะ (1948) จัด *Pediococcus* ไว้เพียงสปีชีส์เดียว คือ *Pediococcus cerevisiae* ต่อมา Breed และคณะ (1957) จัดแบ่ง *Pediococcus* ออกเป็นสองชนิด โดยอาศัยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและความสามารถเจริญในเบียร์ คือ *Pediococcus cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส มีความสามารถเจริญได้ใน wort, hopped wort และในเบียร์กับ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีความสามารถเจริญใน unopped wort แต่ไม่มีความสามารถเจริญในเบียร์

Yamazato (1958) และ Sakaguchi (1958) ได้ให้ชื่อ *Pediococcus soyae* สำหรับแบคทีเรีย *Pediococcus* ที่แยกได้จากน้ำหมักซึอิ้ว (miso) และเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเกลือได้สูงถึง 25–26 เปอร์เซ็นต์

Nakagawa และ Kitahara (1959) ได้อาศัยความแตกต่างของ pH อุณหภูมิในการเจริญ การสร้างเอนไซม์คาตาเลส ความต้องการออกซิเจน ความต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ ความทนเกลือ ความทนต่อ hop ตลอดจนความสามารถในการใช้น้ำตาลแบ่ง *Pediococcus* ออกเป็น 5 ชนิด คือ *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus urinae* – *equi* และพวกที่ทนเกลือ คือ *Pediococcus halophilus* ซึ่งรวมเอา *Pediococcus halophilus* Mess, 1934 ซึ่งแยกจาก anchovy pickles และ *Pediococcus soyae* (Sakaguchi) (1958) เข้าได้ด้วย

Deibel และ Niven (1960) ได้จัด *Gaffkya homari* และ *Pediococcus viridans* ที่แยกได้จาก cured meat และ meat curing brine ไว้ในพวก *Pediococcus homari* ซึ่งเป็นสปีชีส์ใหม่ โดยให้เหตุผลว่าแบคทีเรียทั้งสองมีลักษณะคล้ายกันมา และมีลักษณะไปทางสกุล *Pediococcus* คือ เป็นพวก homofermentative ไม่สามารถใช้ในเครท เจริญได้เล็กน้อยบนพื้นผิวของอาหารวัน ไม่สามารถย่อยโปรตีน ส่วนมากเรียงตัวกันเป็นสี่เหลี่ยม คาตาเลสเป็นพวก facultative หรือ microaerophile มีความสามารถทนเกลือ สร้าง dextrorotatory lactic acid

Pederson (1949) Gunther และ White (1961), Coster และ White (1964) Gibbs และ Skinner (1966) ได้อาศัยคุณสมบัติและคุณลักษณะต่างๆ ของ *Pediococcus* แบ่งแบคทีเรียนี้ออกเป็น 5 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whittenbury (1965) อาศัยหลักการของ Nakagawa และ Kitahara (1959) จัดแบ่งแบคทีเรีย *Pediococcus* ออกเป็น 4 ชนิด คือ *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus halophilus* ส่วน *Pediococcus urinae - equi* เขาจัดไว้ในพวก *Aerococcus viridans* โดยให้เหตุผลว่าแบคทีเรียนี้ชอบสภาพมีอากาศในการเจริญผลิกรวดได้น้อยใน glucose broth และเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีน้ำตาล

Sakaguchi และ Mori (1969) พบว่า *Pediococcus halophilus* *Pediococcus soyae* และ *Pediococcus homari* มีความคล้ายคลึงกันทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะความต้องการธาตุอาหาร ตลอดจนค่า  $T_m$  ของ DNA จึงควรจัดไว้เป็นชนิดเดียวกัน ส่วน *Pediococcus urinae - equi* นั้น มีความคล้ายคลึงกับสามสปีชีแรก โดยเฉพาะเรื่องความต้องการธาตุอาหาร แต่มีข้อแตกต่างในด้านการทนเกลือและจัดรวม *Aerococcus viridans* ไว้ใน *Pediococcus urinae - equi* โดยให้เหตุผลว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ตลอดจนความต้องการธาตุอาหารคล้ายกัน

ต่อมา Buchanan และคณะ (1974) ได้อาศัยหลักการจัดแบ่งของ Nakagawa และ Kitahara (1959) จัดแบ่งแบคทีเรีย *Pediococcus* ออกเป็น 5 ชนิด โดยแบ่งได้เป็นพวกใหญ่ ๆ 2 พวก คือ

1. พวกที่เจริญได้ที่ pH 5.0 แต่ไม่เจริญที่ pH 9.0 มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด
  - ก. พวกที่ไม่เจริญที่ pH 7.0 หรืออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ชอบลักษณะที่เป็น anaerobic condition จัดไว้ใน *Pediococcus cerevisiae*
  - ข. พวกที่สามารถเจริญได้ที่ pH 7.0 หรือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเป็น microaerophilic ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 พวก
    ๑. สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จัดไว้ใน *Pediococcus acidilactici*
    ๒. ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จัดไว้ใน *Pediococcus pentosaceus*

## 2. พวกที่ไม่สามารถเจริญที่ pH 5.0 แต่สามารถเจริญที่ pH 9.0

ก. ชอบเกลือ (halophilic) จัดไว้ใน *Pediococcus halophilus*

ข. ไม่ชอบเกลือ (non halophilic) ได้แก่ *Pediococcus urinae - equi*

## 15. อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของบักเตรีในสกุล *Pediococcus*

โดยทั่วไปบักเตรีที่ผลิตกรดและแลคติกนี้เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างยาก เนื่องจากมีความต้องการธาตุอาหารค่อนข้างสมบูรณ์ และสลับซับซ้อนในการเจริญ (Prescott และ Dunn, 1959 และ Tittsler และคณะ 1952) มีความต้องการอาหาร เกลือแร่ กรดอะมิโน และวิตามินหลายชนิด โดยเฉพาะวิตามิน B-complex นอกจากนี้ยังต้องการพวก organic growth factor เช่น adenine guanine และ uracil อีกด้วย (Tittsler และคณะ 1952 และ Rogosa และคณะ 1961)

### 15.1 แหล่งธาตุคาร์บอน

แหล่งธาตุคาร์บอน คือ สารประกอบที่ให้คาร์บอนไปใช้ประโยชน์ในการเสริมสร้างซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Martin และ Batt, 1957) แหล่งคาร์บอนและพลังงานในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์พวก heterotrophs ทั่ว ๆ ไปมักจะมีสารเดียวกัน (Frobisher และคณะ 1974) สำหรับแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนของบักเตรีแลคติกจะเป็นพวกคาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาลกลูโคสแลคโตส ซูโครส เป็นต้น (Tittsler และคณะ 1952) Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าบักเตรี *Pediococcus* สามารถเฟอร์เมนต์ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแมนโนส แต่ไม่สามารถใช้ซอร์บิตอลและแป้ง Dolezil และ Kirsop (1977) พบว่า บักเตรี *Pediococcus* จะใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส แมนโนส เซลโบไบโอส ทรีฮาโลส และ เอ็น-อะเซทิล กลูโคซาไมน์ เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงานได้

## 15.2 แหล่งธาตุไนโตรเจน

แหล่งธาตุไนโตรเจน คือ สารประกอบที่ให้ไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ในการเจริญและเสริมสร้างหรือซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ (Date, 1971) แหล่งธาตุไนโตรเจนของแบคทีเรียแลคติกมักจะเป็นกรดอะมิโน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น essential amino acid แต่ก็มีบางชนิดสามารถใช้ peptide ได้ (Tittler และคณะ 1952) ส่วนเกลือแอมโมเนีย นั้น พวก *Pediococcus* ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนไม่ได้ (Gunther และ White, 1961) แต่ก็มีพวก *Lactobacillus helveticus* ที่สามารถใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนเพื่อนำไปสร้าง non-essential amino acid และสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในไซโตพลาสซึม

## 15.3 แหล่งของ growth factor

จุลินทรีย์ต้องการ growth factor ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินต่าง ๆ ได้ แต่บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินบางอย่างขึ้นใช้ได้ จึงจำเป็นต้องเติมวิตามินเหล่านั้นลงในอาหาร Eddy (1941) แบคทีเรียแลคติกต้องการวิตามิน และ growth factor ค่อนข้างเฉพาะลงไป แล้วแต่ชนิดของเชื้อ Jensen และ Seeley (1953) พบว่าแบคทีเรีย *Pediococcus* มีความต้องการ citrovorum factor, niacin และ pantothenic acid ในการเจริญ ส่วน biotin และ pyridoxine นั้นเป็นเพียงตัวเร่งในการเจริญเท่านั้น นอกจากนี้เขายังได้ศึกษาถึงความต้องการธาตุอาหารของ *Pediococcus* ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 Nakagawa และ Kitahara (1959) พบว่า *Pediococcus* โดยทั่วไปมีความต้องการพวก niacin, pantothenic acid และ biotin หรือ tween 80 บางสายพันธุ์ต้องการ organic base riboflavin และ peptide like substance (P-factor) ในการเจริญ

## 15.4 เกลือแร่

แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ต้องการ  $K^+$ ,  $Mn^{++}$  และ  $PO_4^-$  ในปริมาณค่อนข้างมาก (Tittler และคณะ 1952) และบางชนิดยังต้องการ  $Mg^{++}$   $Sr^{++}$   $Ca^{++}$   $Rb^+$  ซึ่งความต้องการอนุพลโลหะต่าง ๆ นี้จะแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแต่ละชนิด

## 16. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Pediococcus*

### 16.1 อิทธิพลของอุณหภูมิการเจริญของแบคทีเรีย *Pediococcus* sp.

ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์จะเป็นลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์แต่ละชนิด Davis และคณะ 1968 และ Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Pediococcus cerevisiae* อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียนี้ไม่เจริญที่ 35 องศาเซลเซียส *Pediococcus acidilactici* จะเจริญอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส *Pediococcus pentosaceus* จะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 40–45 องศาเซลเซียส ส่วน *Pediococcus urinae-equi* จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 42 องศาเซลเซียส สำหรับ *Pediococcus halophilus* Nakagawa และ Kitahara (1959) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่ 25–30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้จะอยู่ต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส Sakaguchi (1959) รายงานว่า *Pediococcus soyae* ซึ่งเป็นพวกเดียวกับ *Pediococcus halophilus* (Nakagawa และ Kitahara, 1959) ที่แยกได้จากน้ำหมักซีอิ๊วญี่ปุ่นจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Gunther และ White (1961) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Coster และ White (1964) พบว่า *Pediococcus halophilus* มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญอยู่ระหว่าง 10–40 องศาเซลเซียส Whittenbury (1965) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ 40 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส Saisithi (1967) พบว่า *Pediococcus halophilus* ที่แยกได้จากน้ำปลาไทยจะเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* จะอยู่ระหว่าง 25–30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 40 องศาเซลเซียส

## 16.2 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Pediococcus* sp.

ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ถ้าต่ำกว่านั้นหรือสูงกว่านั้นจะไม่มี การเจริญเลย หรือเจริญก็เจริญไม่ดีเท่าในช่วง pH ที่เหมาะสม (Okinsky และ Unmreit, 1959)

Buchanan และคณะ (1974) รายงานว่าแบคทีเรีย *Pediococcus cerevisiae* จะเจริญได้ในช่วง pH 3.5 – 6.2 และจะเจริญได้ดีที่สุดในที่ pH 5.5 Nakagawa และ Kitahara (1959) พบว่า *Pediococcus acidilactici* จะเจริญได้ดีที่ pH 6.0 ส่วน pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 3.5 – 3.8 และ pH สูงสุดที่เจริญได้อยู่ที่ 8.0 ส่วน pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* อยู่ที่ pH 7.0 และ pH 8.0 เป็น pH สูงสุดที่สามารถเจริญได้ *Pediococcus urinae - equi* จะเจริญได้ที่ pH 9.0 และ pH สูงสุดที่เจริญได้ คือ 9.6 ส่วน *Pediococcus halophilus* จะเจริญได้อยู่ที่ 9.2 Sakaguchi (1959) พบว่า *Pediococcus soyae* ในน้ำหมักซีอิ๊วญี่ปุ่นจะเจริญได้ในช่วง pH 5.5 – 9.0 Coster และ White (1964) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 8.6 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 4.4 Whittenbury (1965) พบว่า *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 5.0 และ 8.0 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 9.6

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ NaCl
2. แคลเซียมคาร์บอเนต CaCO<sub>3</sub>
3. Skimmed milk

#### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Ultra centrifuge)
2. เครื่องเขย่า
3. จานเพาะเชื้อ
4. ปิเปตขนาด 1 ml.
5. หลอดทดลองขนาด (150 x 16) + ฝา
6. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
7. ที่วางหลอดทดลอง
8. flask ขนาด 250 ml.
9. แท่งแก้วรูปตัวแอล
10. เครื่องชั่ง
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. anaerobic jar
13. incubator

#### เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง

1. *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)
2. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536
3. *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) เป็นตัว control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

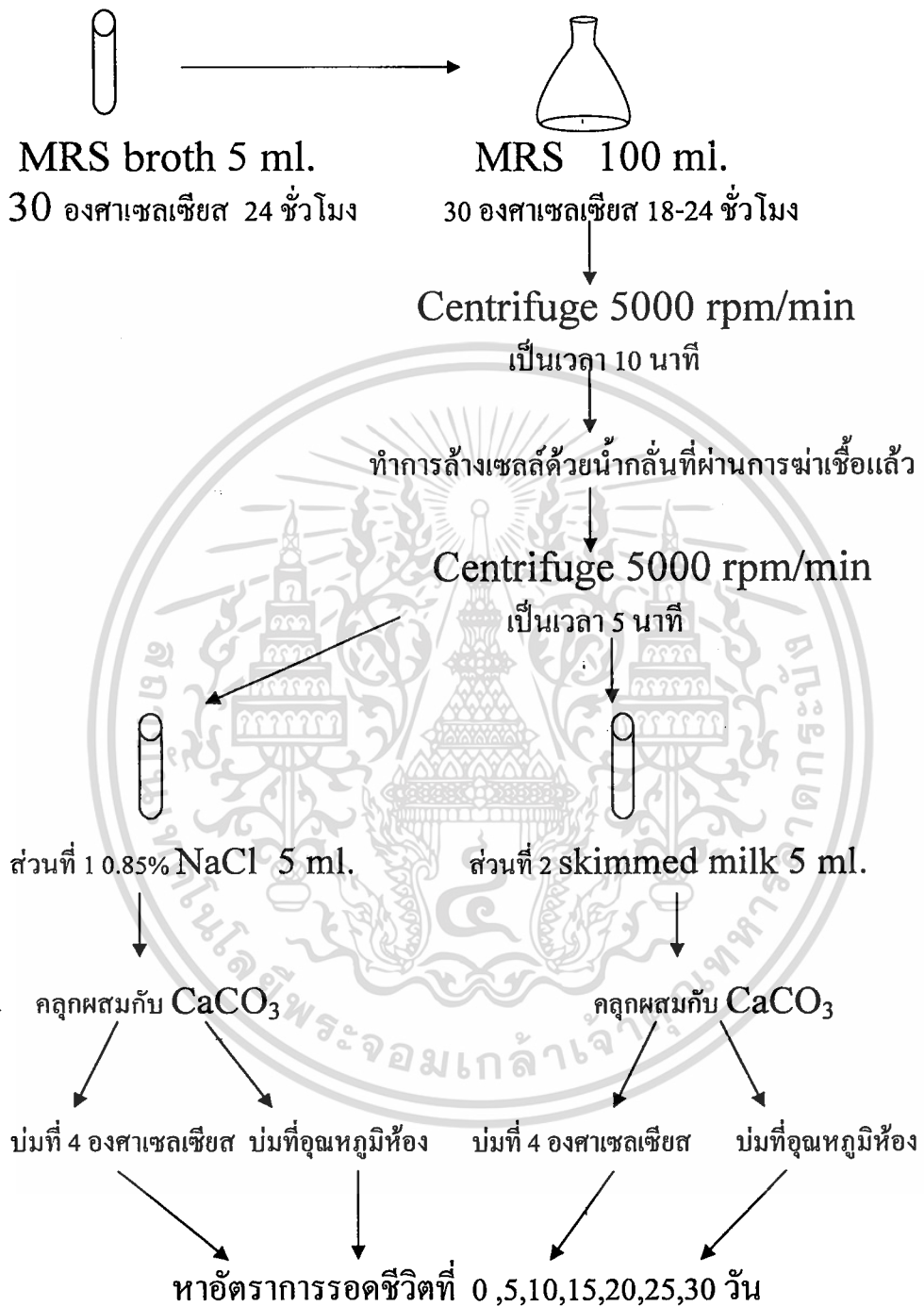
## วิธีการทดลอง

### การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม

1. นำเชื้อ *Pediococcus acidilactici* *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus acidophilus* มาเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ในอาหาร MRS agar + 1.0 % Calcium carbonate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตบริเวณ clear zone
2. ทำการเลี้ยงขยายหัวเชื้อ โดยใช้เข็มเจาะบริเวณ clear zone มาใส่ใน flask ที่บรรจุอาหาร MRS เข้าเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. นำเชื้อจาก flask แต่ละ flask มาทำการแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm/min เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปหมุนเหวี่ยงต่อเป็นเวลา 5 นาที
4. แบ่งเชื้อที่ได้คือออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ผสมกับ 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ 5 ml. และส่วนที่ 2 ผสมกับ skimmed milk 5 ml.
5. นำแต่ละส่วนมาคลุกกับ แคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัม คลุกให้เข้ากัน
6. แบ่งครึ่งแคลเซียมคาร์บอเนตที่คลุกให้เข้ากันแล้ว แยกเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ทำการตรวจวิเคราะห์การรอดชีวิตที่ 0,5,10,15,20,25,30 วัน

## การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม

เชื้อที่ใช้ *Pediococcus acidilactici* (LAB4) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1)



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อในสถานะจำลองกระเพาะสัตว์และสถานะจำลองลำไส้สัตว์

### ในสถานะกระเพาะสัตว์ (Gastric juice)

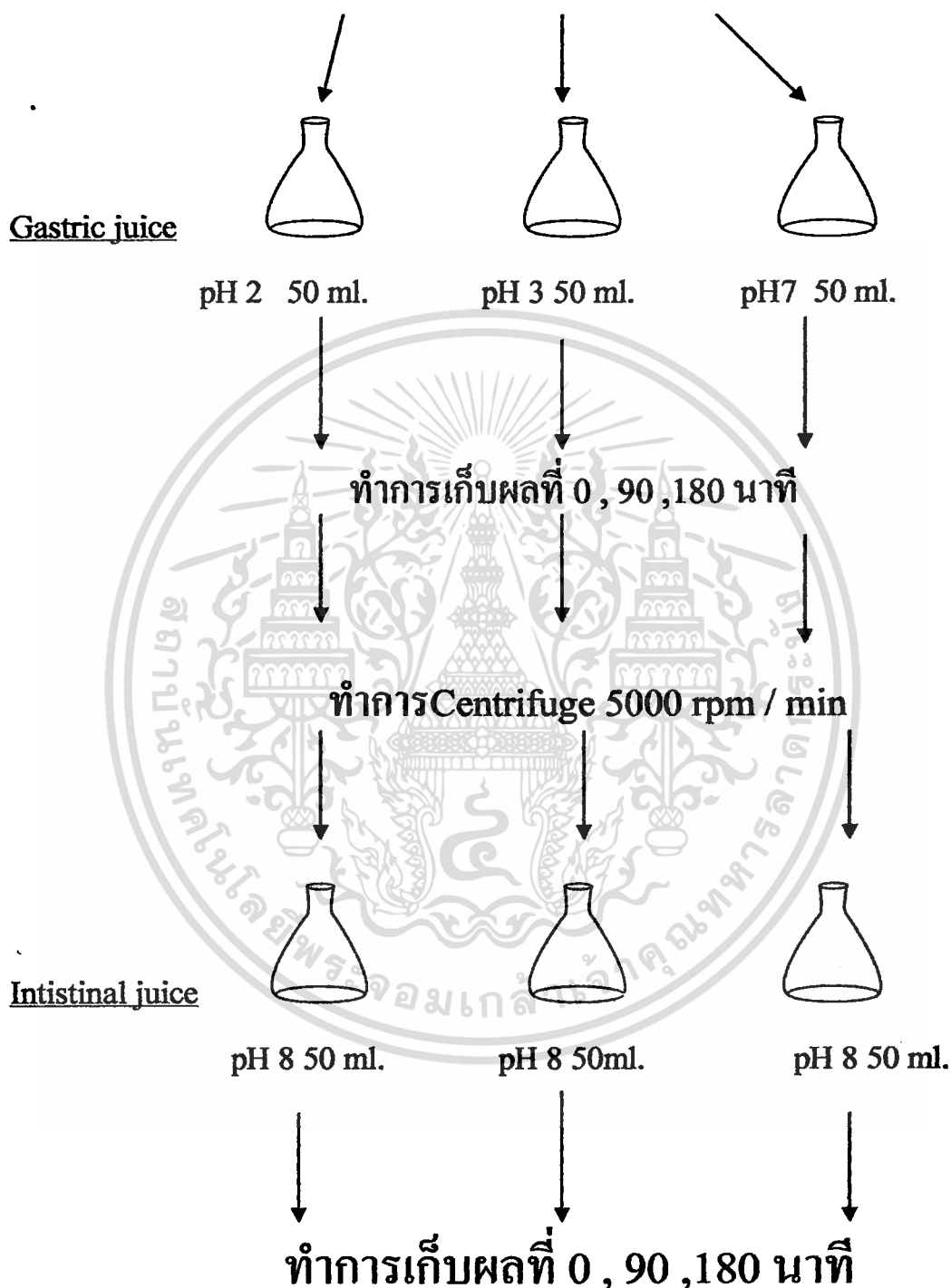
1. คัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดจากการทดลองในขั้นหาสภาวะที่เหมาะสม
2. เตรียมสถานะจำลองที่คล้ายกระเพาะสัตว์ โคนใส่ ( NaCl 7.305 g/l , KCl 0.522 g/l , NaHCO<sub>3</sub> 3.781 g/l , Pepsin 3 g/l) flask ละ 50 ml. โดยใน flask ที่ 1 ปรับ pH ให้เป็น 2 , flask ที่ 2 ปรับ pH ให้เป็น 3 และ flask ที่ 3 ปรับ pH ให้เป็น 7
3. ตักเชื้อผงที่คลุกกับ CaCO<sub>3</sub> มา 5 g ใส่ลงในแต่ละ flask
4. ทำการเก็บผลที่ 0 , 90 , 180 นาที

### ในสถานะลำไส้ (Intestinal juice)

1. เตรียมสถานะคล้ายลำไส้ โดยใส่ (0.1 % Pancreatin , 0.15 % Bile salt ) ใน 3 flask flask ละ 50 ml. ปรับ pH ให้ได้ 8 ทั้ง 3 flask
2. นำเชื้อจากขั้นตอนในสถานะกระเพาะสัตว์มาทำการหมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm / min
3. นำเชื้อที่ได้ใส่ลงใน flask จำลองสถานะลำไส้
4. ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ 0 , 90 , 180 นาที

## ขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้สัตว์

เนื้อที่คัดเลือกมาจากขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม นำมา 5 กรัม



### ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และวิจารณ์

จากการทดลองในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เชื้อ 3 ชนิด คือ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pediococcus* โดยที่เชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก โดยนำมาทำการหมუნหึ่งที่ความเร็ว 5000 รอบ / นาที และทำการละลายเชื้อโดยใช้สื่อ 2 ชนิด คือ 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ และ skimmed milk จากนั้นนำมาผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ แล้วทำการแยกเก็บเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 32 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 ผสม skimmed milk เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 3 ผสม โซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนที่ 4 ผสม โซเดียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำทั้ง 4 ส่วนบ่มไว้ประมาณ 30 วันจะให้ผลดังตารางดังในตารางที่ 5 ตารางที่ 6 และตารางที่ 7

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด (โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

วันที่	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	536+skimmed milk อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	536+skimmed milk อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	536+NaCl อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	536+NaCl อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
0	$1.72 \times 10^9$	$6.5 \times 10^9$	$1.2 \times 10^9$	$6.5 \times 10^9$
5	$1.7 \times 10^9$	$1.53 \times 10^9$	$1.35 \times 10^9$	$6.1 \times 10^8$
10	$1.18 \times 10^9$	$1.2 \times 10^9$	$1.91 \times 10^9$	$4.8 \times 10^6$
15	$1.2 \times 10^9$	$1.18 \times 10^9$	$1.15 \times 10^7$	$5.8 \times 10^5$
20	$1.17 \times 10^9$	$6.7 \times 10^8$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
30	$1.1 \times 10^9$	$4.3 \times 10^5$	$6.6 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$

จากตารางที่ 5 จะพบว่าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด เมื่อเก็บไว้ประมาณ 30 วัน คือ ประมาณ  $10^9$  CFU / ml ส่วนที่มีการผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์ และเก็บที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตที่น้อยที่สุด คือประมาณ  $10^4$  CFU / ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 6** แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4)

วันที่	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	LAB 4 + skimmed milk อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 4 + skimmed milk อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	LAB 4 + NaCl อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 4 + NaCl อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
0	$5.9 \times 10^8$	$1.36 \times 10^9$	$9.9 \times 10^8$	$1.36 \times 10^9$
5	$3.1 \times 10^8$	$8.2 \times 10^8$	$8.9 \times 10^8$	$7.8 \times 10^8$
10	$2.3 \times 10^8$	$6.2 \times 10^8$	$5.7 \times 10^8$	$4.1 \times 10^5$
15	$1.6 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$	$1.33 \times 10^7$	$4.2 \times 10^5$
20	$1.4 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$	$2.3 \times 10^6$	$3.3 \times 10^5$
30	$9.5 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$	$9 \times 10^5$	$7.2 \times 10^4$

จากตารางที่ 6 พบว่าจะให้ผลที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 โดยในส่วนที่มีการผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด เมื่อเก็บไว้ประมาณ 30 วัน คือประมาณ  $10^7$  CFU / ml และในส่วนที่มีการผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์ เก็บที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตที่น้อยที่สุด คือประมาณ  $10^4$  CFU / ml

**ตารางที่ 7** แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร) ของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1)

วันที่	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด(โคโลนี/มิลลิลิตร)			
	LAB 1 + skimmed milk อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 1 + skimmed milk อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	LAB 1 + NaCl อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	LAB 1 + NaCl อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
0	$4.3 \times 10^8$	$1.12 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$	$1.12 \times 10^8$
5	$3.8 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$1.12 \times 10^4$	$3.6 \times 10^3$
10	$2.2 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10
15	< $30 \times 10$	< 10	< 10	< 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 7 พบว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ คือประมาณ 5-10 วันเท่านั้น ส่วนเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ที่ผสม skimmed milk มีอัตราการรอดชีวิตที่นานที่สุด คือประมาณ 10-15 วัน

จากผลการทดลองในตารางของเชื้อ 3 เชื้อ พบว่า เชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB 1) ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จะมีอัตราการรอดชีวิตแค่ประมาณ 5-10 วันเท่านั้น ก็จะไม่พบการรอดชีวิต ถึงแม้จะทำการผสมกับ skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็ตาม ก็สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้แค่ประมาณ 15 วัน ต่างกับเชื้อ *Pediococcus* ทั้ง 2 ตัว ที่สามารถมีการรอดชีวิตถึงแม้ว่าจะทำการเก็บไว้แล้ว 30 วัน ทั้งนี้เนื่องมาจากความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือเชื้อ *Pediococcus* จะมีลักษณะเป็น cocci ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* จะมีลักษณะเป็น rod ดังนั้นการเลือกใช้เชื้อ *Pediococcus* ในการนำมาทำอาหารสัตว์ จึงน่าจะให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อ *Lactobacillus* เพราะสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่า ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก และจากการทดลองพบว่า เชื้อที่มีการผสม skimmed milk จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้ 0.85% NaCl หรือใช้น้ำเกลือเจือจาง ทั้งนี้เพราะ skimmed milk จะช่วยห่อหุ้มเซลล์ป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ ในสภาวะการผลิตแบบผงซึ่งเป็นแบบแห้ง ทำให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่า ส่วนในการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่า การเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 32 องศาเซลเซียส เพราะการเก็บที่อุณหภูมิเย็นจะช่วยชะลอการเมแทบอลิซึมของเซลล์ลง ทำให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้เชื้อ *Pediococcus* ผสมกับ skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด และเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์โปรไบโอติก ซึ่งจะช่วยให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรงและทำให้มีผลผลิตในฟาร์มสูงขึ้นด้วย

#### หมายเหตุ

- LAB 4 คือ เชื้อ *Pediococcus acidilactici*  
 536 คือเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536  
 LAB 1 คือเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*

จากการทดลองในขั้นตอนการจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้ โดยคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดจากขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมมาทำการทดลองผ่านสภาวะจำลองกระเพาะอาหารที่ ค่า pH 2 , pH 3 และ pH 7 คู่อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจากนั้นนำมาผ่านสภาวะจำลองลำไส้คู่อัตราการรอดชีวิตของเชื้อว่าเมื่อผ่านสภาวะทั้งกระเพาะและลำไส้แล้วเชื้อจะสามารถมีชีวิตรอดได้หรือไม่ จากการทดลองเราได้นำเชื้อ *Pediococcus acidilacticii* (LAB 4 ) ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียส และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ได้มาจากการทดลองในขั้นตอนหาสภาวะที่เหมาะสมมาทำการทดลองต่อในขั้นตอนการจำลองกระเพาะและลำไส้สัตว์ซึ่งจะให้ผลดังตารางที่ 8 และตารางที่ 9 ดังนี้

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้โดย จุลินทรีย์ที่นำมาทดลองคือเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ผสม skimmed milk บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อเริ่มต้นประมาณ  $3 \times 10^{10}$  CFU/ml

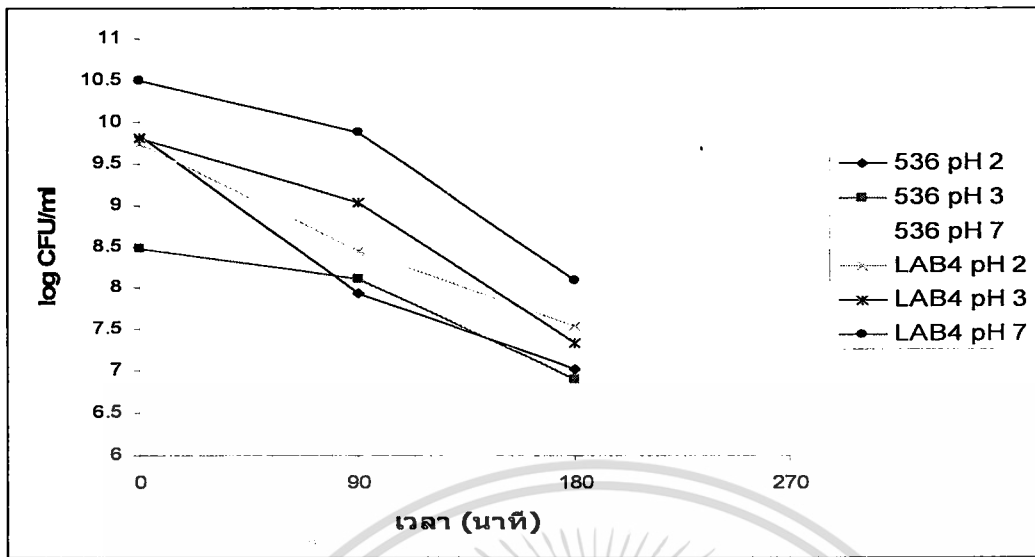
สภาวะ	เวลา (นาที)	ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้		
		pH 2	pH 3	pH 7
Gastric juice กระเพาะอาหาร	0	$6.3 \times 10^9$	$3 \times 10^8$	$7.9 \times 10^9$
	90	$8.5 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$	$5 \times 10^9$
	180	$1.05 \times 10^7$	$7.7 \times 10^6$	$3.6 \times 10^8$
สภาวะ	เวลา(นาที)	pH 8	pH 8	pH 8
Intestinal juice ลำไส้	0	$1.05 \times 10^7$	$7.7 \times 10^6$	$3.6 \times 10^8$
	90	$5.8 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$9.6 \times 10^6$
	180	$2.7 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$6.7 \times 10^6$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

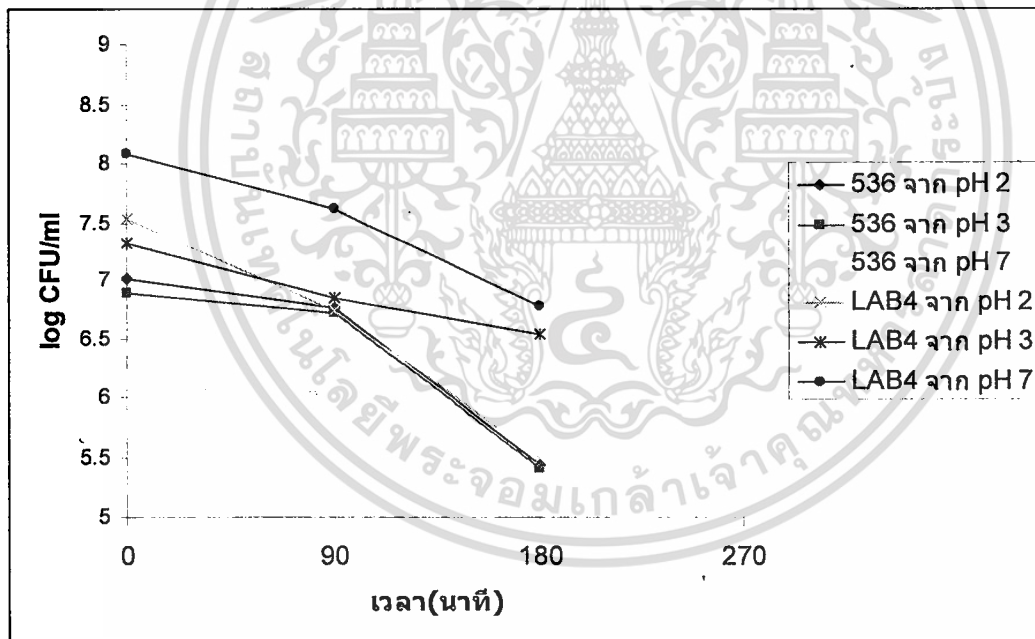
ตารางที่ 9 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะและลำไส้โดย จุลินทรีย์ที่นำมาทดลองคือเชื้อ *Pediococcus acidilacticii* (LAB 4) ผสม skimmed milk บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อเริ่มต้นประมาณ  $6.9 \times 10^{10}$  CFU/ml

สภาวะ	เวลา (นาที)	ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะและลำไส้		
		pH 2	pH 3	pH 7
Gastric juice กระเพาะอาหาร	0	$5.6 \times 10^9$	$6.5 \times 10^9$	$3.2 \times 10^{10}$
	90	$2.8 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$7.6 \times 10^9$
	180	$3.5 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$
สภาวะ	เวลา(นาที)	pH 8	pH 8	pH 8
Intestinal juice ลำไส้	0	$3.5 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$
	90	$5.4 \times 10^6$	$7.1 \times 10^6$	$4.2 \times 10^7$
	180	$3.1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^6$	$6 \times 10^6$

จากตารางที่ 8 และตารางที่ 9 พบว่า เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *Pediococcus acidilacticii* (LAB 4) ที่นำมาทำการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะกระเพาะที่มีความเป็นกรดสูง คือที่ pH 2 , pH 3 และสภาพที่เป็นกลางคือ pH 7 และสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยที่ pH 7 จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด คือประมาณ  $10^8$  และเมื่อนำมาทำการทดลองต่อในขั้นตอนผ่านสภาวะจำลองลำไส้ที่มีค่า pH 8 พบว่าเชื้อที่มาจาก 3 ปีจ้ยสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะจำลองลำไส้ที่มีความเข้มข้นของเกลือแร่สูงโดยสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ ประมาณ  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml ซึ่งถือว่าอัตราการรอดชีวิตที่สูง และจัดว่ามีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกที่ดีคือสามารถผ่านระบบทางเดินอาหารและสามารถจะมีชีวิตรอดอยู่ได้ในลำไส้ ทำให้ลดปริมาณของเชื้อก่อโรคที่จะไปเกาะและก่อตัวในลำไส้ลงได้โดยจะไปแย่งจับพื้นที่ภายในผนังลำไส้ของสัตว์ ช่วยให้สัตว์แข็งแรงเป็นโรคน้อยลง ลดปัญหาการใช้จ่ายชีวิตที่อาจตกค้างในสัตว์ ไม่ทำให้เกิดการดื้อยา และทำให้มีผลผลิตในฟาร์มที่สูงขึ้นด้วย



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา(นาทีก)กับ log CFU/ml ในสภาวะ จำลอง กระเพาะอาหาร



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา(นาทีก)กับ log CFU/ml ในสภาวะ จำลองลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

โปรไบโอติก (Probiotic) หรือสารเสริมชีวิต จัดเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ในการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากมักจะเกิดปัญหาภาวะโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ อันมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง การใช้โปรไบโอติกเพื่อให้มีกลไกควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เพราะโปรไบโอติกจะช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหารได้ ช่วยระบบย่อยอาหารดีขึ้น สร้างน้ำย่อย ลดพิษของ amine และ แอมโมเนีย กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคโดย ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะสมดุลเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร ให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

จากการทดลองในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) , *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด ส่วนที่ผสมด้วยโซเดียมคลอไรด์และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตที่สูง แต่น้อยกว่าส่วนที่ผสม skimmed milk เพราะ skimmed milk จะช่วยป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งดีกว่าการใช้น้ำเกลือเจือจางหรือโซเดียมคลอไรด์ การเก็บที่อุณหภูมิต่ำคือ 4 องศาเซลเซียสดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องคือประมาณ 32 องศาเซลเซียส เพราะช่วยลดอัตราการเมแทบอลิซึมของเชื้อลง ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดได้นานขึ้น จากการทดลองโดย นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกเหมือนกันมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับเชื้อ *Pediococcus* โดยผสมในแคลเซียมคาร์บอเนตและทำการทดลองเช่นเดียวกับเชื้อ *Pediococcus* พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำมาก ดังนั้นการใช้เชื้อ *Pediococcus* มาผสมลงในอาหารสัตว์จึงดีกว่าการใช้เชื้อ *Lactobacillus* และเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้สัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีสุขภาพแข็งแรง ทนต่อโรค และมีผลผลิตสูงขึ้นด้วย

จากการทดลองในขั้นตอนจำลองสภาวะกระเพาะและลำไส้สัตว์โดยนำเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดจากขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นคือเชื้อ *Pediococcus acidilactici* (LAB 4) , *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผสม skimmed milk และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถทนต่อสภาวะกระเพาะที่มีความเป็นกรดสูง คือ pH 2 และ pH 3 และสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะลำไส้ที่มีความเข้มข้นของเกลือแร่สูงได้ในระดับสูง ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ดีคือมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง เมื่อผ่านระบบทางเดินอาหาร

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรให้มีการทดลองทำในกระเพาะสัตว์จริง ๆ เพื่อดูอัตราการรอดชีวิตของเชื้อว่าสามารถมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารได้หรือไม่
2. ควรทำการทดลองนำเชื้อหลาย ๆ ตัวที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกมาทำการทดลองเปรียบเทียบกันว่าจะสามารถนำมาทำเป็นอาหารสัตว์โปรไบโอติกได้หรือไม่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- บุญเรียง ลำวิญญู.2544. “การคัดเลือกและผลิตสารจุลินทรีย์เพื่อเป็นสารเสริมชีวณะใช้ในการเลี้ยงไก่.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วลัยพร ทิมบุญธรรม.2544. “การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกึ่งกักขัง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วรุจา มาลัยพวง.2544. “การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่ของแบคทีเรียกรดแลคติกของไทย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศศิธร ศิลภูมิ . 2546. “โปรไบโอติกเพื่อการเลี้ยงกึ่งกักขัง.” สัมมนาปริญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์ . 2540 การ ใช้แลคติกแอซิกแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่. จุฬาลงกรณ์ 6(6) : 10-13.
- สุพรรณิการ์ สมใจเที่ยง.2544. “การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในการหมักไข่แดง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิศุภร ลอดระกุล.2542. “โปรไบโอติกในมนุษย์.” สัมมนาปริญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อำนาจ เจริรัตน์.2540. “ การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไข่แดง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anonymous. 1999 . Use of certain microorganisms as additive feeding stuffs food safety : Form the farm to the fork . Available [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out23\\_en.htm](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out23_en.htm), April 28 , 1999.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fuller, R. 1989 . Probiotics in man and animal. *J.App.Bacteriol.* 66:365-378

Holt, J.G.,N.R. Krieg,P.H.A.Sneath.,J.T.Staley and S.T.Wiliams. 1994. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology . 9 th ed., Wiliams and Wilkins.,Maryland.787 p*

Lilly,D.M. and R.H. Stillwell.1965 .Probiotic : growth promoting factors produced by Microorganisms.*Science.*147:747-748

Parker , R.B., G.G. Conchikov and G.B.Lev .1979.Inhibitory activity of lactic acid microflora in Kurunga in relation to coliform bacteria . *J. Dairy Sci* 41:5976.(Abstract)

“Probiotic” 2001.[Online].Available : <http://school.biotech.or.th/html/microbialworld.htm>

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

Weinberg,Z.G., and Muck .R.E. 2002. “The survival of silage inoculant lactic acid Bacteria in rumen fluid.” [Online]. Available:[http://www.dfre.wise.edu/DFRC WebPDFs/2003-Weinberg-GFS-94-1066.pdf](http://www.dfre.wise.edu/DFRCWebPDFs/2003-Weinberg-GFS-94-1066.pdf)

Woolford , M.K. 1985 . The silage fermentation , pp .85-112 . in B.J.B. Wood (ed) *Microbiology of Fermented Foods.* Elsevier Applied Science Publishers,Essex

Woolford , M.K. 1990. The silage fermentation , pp.137-144 . In T.W. Flegel,G.Thryn and Y.Yuthavong (eds.).*Biotechnology for Small Industries.Proceeding of The InternationalSymposium on Application of Biotechnology for Small Industries . Text and Journal Corporation , Bangkok.*

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสภาวะจำลองกระเพาะสัตว์

NaCl	7.305 g/l
KCl	0.522 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	3.781 g/l
Pepsin	3 g/l

### การเตรียมสภาวะจำลองลำไส้สัตว์

Pancreatin	0.1%
Bile salt	0.15%

### การทำตัวอย่างอาหารให้เจือจางลงตามลำดับ (serial dilution)

การทำตัวอย่างอาหารให้เจือจางลง มักทำให้เจือจางลงระดับละ 10 เท่า (ten fold serial dilution) โดยใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ในขั้นต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหรือขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าหลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (mixer) หรือใช้มือเขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง ตัวอย่างอาหารในขั้นนี้จะมีเจือจาง 1:100 ( $10^{-2}$ ) ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางในระดับต่อไปคือ 1:1000 ( $10^{-3}$ ), 1:10000 ( $10^{-4}$ ) เรื่อยไปตามลำดับให้กระทำโดยวิธีเดียวกันกับที่กล่าวข้างต้น โดยใช้ตัวอย่างอาหารที่เจือจางในระดับ 1:100, 1:1000 เรื่อยไปตามลำดับและควรทำการเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกครั้งในทุกๆระดับความเจือจางที่ต้องการเตรียม

### ขั้นตอนการ spread plate

- เหมอาหารเพาะเชื้อ MRS agar + 0.5 % CaCO<sub>3</sub> ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
- ชั่งตัวอย่าง โดยใช้ช้อนตวงตักตัวอย่างอาหาร 1 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติก
- ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ทำการเจือจาง จาก 10 fold dilution จนถึงระดับ 1: 10<sup>8</sup>
- ดูดตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 ml. ใส่บน MRS agar 0.5% + CaCO<sub>3</sub> plate ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ
- นำแท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อจากแอลกอฮอล์ เกลี่ยตัวอย่างที่ใส่ไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ทั่ว
- คลำจานแล้วทำการบ่มเพาะเชื้อใน candle jar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
- ตรวจสอบจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดยสังเกตโคโลนีที่มีขอบใส (clear zone ) รอบ ๆ โคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อต่อกรัมตัวอย่างอาหาร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวศศสุดา หอดี เกิดเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม ปี พ.ศ.2525 สถานที่เกิด โรงพยาบาลสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ วุฒิมัธยมศึกษา จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบ วิทยาลัยสมุทรปราการ พ.ศ.2543 และศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษา ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายศาสตรา เฉลิมวงศ์จิตร เกิดเมื่อวันที่ 22 สิงหาคม พุทธศักราช 2526 สถานที่เกิด โรงพยาบาลหัวเฉียว จังหวัดกรุงเทพมหานคร วุฒิมัธยมศึกษา จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา พ.ศ.2543 และศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษา ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้