19755

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

T096671

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติคที่เหมาะสมต่อการผลิตอาหารโปรไบโอติค (probiotic)

โดย

นายณรงค์ พลบูรณ์ รหัสประจำตัว 45045027

นายวิชัย บุญสุระ รหัสประจำตัว 45045047

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

อดิศร

.....

(ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

5 / ม.ค. / 47 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

ปพ.
กพ211ก
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96671
วัน,เดือน,ปี 4 JUN 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิชัย บุญสุระ และณรงค์ พลบูรณ์ 2546 : การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ทนกรดเกลือและเกลือน้ำดีสำหรับการผลิตอาหารโปรไบโอติก . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , 39 หน้า

บทคัดย่อ

สารปฏิชีวนะตกค้างในสัตว์เป็นปัญหาสำคัญ ที่สร้างความหวั่นวิตกแก่ผู้บริโภคอย่างยิ่ง และอาจนำไปสู่การดื้อยาของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและ ยากต่อการรักษามากขึ้นในมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงได้ก่อให้เกิดทางเลือกใหม่ คือ การใช้อาหารเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการผลิตสัตว์ให้มีสุขภาพที่แข็งแรงและเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารเพื่อลดปัญหาการตกค้างของสารปฏิชีวนะมาสู่คน

การทดลองนี้จึงได้ทำการทดลองเอาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้โดยคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1) , *Pediococcus pentosaceus* (LAB4)รหัส TISTR 536 จากอาหารสัตว์ และ *Lactococcus lactis* (N19)สร้าง (nisin) , *Pediococcus pentosaceus* TISTR (536) สร้าง (peiocin-PA1) จากแหนม มาทดสอบความเป็นไปได้ในการผลิตเป็นอาหารโปรไบโอติกให้กับสัตว์โดยเบื้องต้นเพื่อจะดูความสามารถในการทนกรดไฮโดรคลอลิก (HCl) ที่ pH2-pH6และpH8 , และมีความสามารถในการทนเกลือน้ำดี (Bile salt) ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6, 1.0 % ได้ดี ซึ่งสารเคมีทั้งสองตัวอยู่ภายในกระเพาะอาหารและลำไส้ของคนและสัตว์ จากผลการทดลองพบว่า *P. pentosaceus* รหัส TISTR 536 (สร้างแบคเทอริโอซิน) ที่แยกได้จากแหนมและ *P. pediococcus* รหัส (LAB4) จากอาหารสัตว์เป็นจุลินทรีย์ที่ทนกรดไฮโดรคลอลิกที่ pH2, pH3 และทนเกลือน้ำดีที่ 0.6, 1.0 % ได้ดีที่สุด กล่าวคือเชื้อทนได้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อทั้งสองเป็นกลุ่มเชื้อที่จะทำการผลิตเป็นอาหารสัตว์ไว้ในการทดลองเป็นอาหาร โปรไบโอติกในโอกาสต่อไป

.....

....

ลายเซ็นนักศึกษา ลายเซ็นอาจารย์ที่ปรึกษา ลายเซ็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งให้คำแนะนำช่วยเหลือให้คำปรึกษาตลอดมารวมทั้งดูแลเอาใจใส่ และตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ และ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมคอยแนะนำและให้คำปรึกษาต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณทุกท่านที่ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ให้ตลอดจนคำแนะนำด้านต่างๆขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจาหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมีต่างๆรวมทั้งให้ความสะดวกในการปฏิบัติงานและขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกายตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาวที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนด้านทุนทรัพย์ในการจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ผู้จัดทำ

นายวิชัย บุญสุระ

นายณรงค์ พลบูรณ์

5 มกราคม 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่	
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
2. วารสารปริทัศน์	3
2.1 โปรไบโอติก-ความหมาย	3
2.2 ความรู้เกี่ยวกับจุลชีพประจำถิ่น	3
2.3 ที่มาของโปรไบโอติก	4
2.4 คุณสมบัติของโปรไบโอติก	4
2.5 ประโยชน์ของโปรไบโอติก	5
2.6 การทำงานของโปรไบโอติก	5
2.7 การศึกษาวิจัยและพัฒนาแบคทีเรียแลคติคในประเทศไทย	7
2.8 แบคทีเรียแลคติค ณ ศูนย์เก็บจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	7
2.9 สภาพการวิจัยแบคทีเรียแลกติกของยุโรป 1990-1993	7
3. อุปกรณ์และการทดลอง	15
3.1 อุปกรณ์การทดลอง	15
3.2 ขั้นตอนและวิธีการ	16
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
4.1 ผลการศึกษาการทนกรดเกลือ(HCl) ที่ pH2-pH6 และpH8	18
4.2 ผลการศึกษาการทนเกลือน้ำดี(Bile salt) ที่ 0, 0.3, 0.6, 1.0 %	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สรุปผลการทดลอง 21
เอกสารอ้างอิง 22
ภาคผนวก ก. การเจริญของเชื้อที่ระดับ pH ต่างๆ 24
ภาคผนวก ข. การเกิดโคโลนีโดย streak plate 25
ภาคผนวก ค. การเกิดโคโลนีโดย spread plate 26
ประวัติผู้เขียน 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงค่าการทนกรดเกลือ (HCl) ที่ pH2-pH6 และpH8	18
2.	จำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอด	19
3.	แสดงค่าการทนเกลือน้ำดี (Bile salt) 0, 0.3, 0.6, 1.0 %	19
4.	จำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอด	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. การทนกรดเกลือ (HCl) 24
2. ลักษณะของเชื้อที่ทำการ Streak plate 25
3. ลักษณะของเชื้อที่ทำการ Spread plate 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ผลกระทบจากกลุ่มผู้บริโภคที่โจมตีเนื่องจาก สารเคมีตกค้างในสัตว์ที่เลี้ยงโดยใช้ยาต้านจุลชีพ เพื่อเร่งการเติบโตหรือป้องกันและรักษาโรค ที่สร้างความหวั่นวิตกแก่ผู้บริโภคอย่างยิ่งและอาจนำไปสู่การดื้อยาของสายพันธุ์แบคทีเรีย ในร่างกายมนุษย์หรือให้เกิดโรคที่ยากต่อการรักษามากขึ้นในมนุษย์ ได้ก่อให้เกิดทางเลือกใหม่ คือ โปรไบโอติก ซึ่งช่วยลดขจัดปัญหาการตกค้างของสารจุลชีพ ช่วยให้การมีผลกำไรมากขึ้นและมีผลิตภัณฑ์ที่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ให้การยอมรับมากที่สุดเทคโนโลยีสัตว์น้ำ เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วพร้อมๆกับการประดิษฐ์อุปกรณ์เทคโนโลยีสมัยใหม่จำนวนมาก ทั้งนี้การพัฒนาได้มุ่งเน้นไปที่ประเด็นการผลิตให้มีประสิทธิภาพซึ่งต้องใช้เงินลงทุนมากขึ้น ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งในระบบปิดมีการใช้ยาและสารเคมีระหว่างการเลี้ยง รวมทั้งเทคโนโลยีสมัยใหม่ มากขึ้นเพื่อป้องกันการระบาดของโรคแต่สิ่งหนึ่งที่ลืมไม่ได้คือ การกระทำดังกล่าวทำให้ต้นทุนสูงขึ้นแต่ผลกำไรอาจลดลงด้วย

นอกจากนี้ยังมีผลกระทบจากกลุ่มผู้บริโภคที่โจมตีเรื่องสารเคมีตกค้าง ในสัตว์ที่มีการเลี้ยงโดยใช้ยาต้านจุลชีพ เพื่อเร่งการเติบโตหรือป้องกันและรักษาโรค การใช้ยาต้านจุลชีพอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงกุ้งอาจนำไปสู่การดื้อยาของสารพันธุ์แบคทีเรีย ในร่างกายและทำให้เกิดโรคที่ยากต่อการรักษามากขึ้นในมนุษย์ สิ่งเหล่านี้สร้างความหวั่นวิตกแก่ผู้บริโภคอย่างยิ่งในการบริโภคสัตว์ที่ได้จากการเลี้ยงในระบบนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะลด หรือห้ามการใช้ยาต้านจุลชีพบางชนิดหรือยาบางประเภทโดยสิ้นเชิงกับสัตว์ที่เลี้ยงเป็นอาหาร มีทางออกที่ไม่ง่ายนักต่อปัญหาดังกล่าว นั่นคือ การใช้โปรไบโอติก ที่สามารถช่วยบรรเทาปัญหาเหล่านี้ได้

ด้วยเหตุนี้การทดลองดังกล่าวจึงได้นำเอาจุลินทรีย์ในกลุ่ม แบคทีเรียแลกติคที่แยกได้จากอาหารสัตว์ 2 สายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1), *Pediococcus pentosaceus* (LAB4) รหัส TISTR 536 และจากแหนม 2 สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* (N19) สร้าง (nisin Z), *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 (สร้าง pediocin-PA1) มาทำการคัดเลือกหาสายพันธุ์ ที่เหมาะสมในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติกในโอกาสต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเบื้องต้นดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ดูการคงทนของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ต่อปริมาณกรด HCl ที่ระดับต่างๆ ที่อาจตรวจพบในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของสัตว์
2. ดูการคงทนของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ของเชื้อต่อเกลือน้ำดีที่ระดับต่างๆ 0, 0.3, 0.6, 1.0 % ที่อาจพบในลำไส้เล็กส่วนต้นของสัตว์
3. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทนกรดและเกลือน้ำดีที่ระดับต่างๆได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ความหมายของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิม ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้นโดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง (Freez-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมักซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้คนและสัตว์สุขภาพดีขึ้นด้วย และโปรไบโอติกไม่ใช่กำจัดการใช้เฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้นยังอาจไปมีผลกับระบบอื่นๆ เช่นทางเดินหายใจส่วนต้นหรือระบบปัสสาวะและสืบพันธุ์

2.2 ความรู้เกี่ยวกับจุลชีพประจำถิ่น

ความสำคัญจุลชีพประจำถิ่น

ความสำคัญจุลชีพประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ (Normal Flora in Gastrointestine) ภายในลำไส้ และการมีสุขภาพที่ดีของสัตว์เป็นที่รู้กันโดยทั่วไป แม้ว่าจะไม่รู้ชัดถึงกลไกแท้จริงว่าจุลชีพที่ดำรงชีวิตอยู่ในระบบภายในลำไส้มีผลกระทบอย่างไรต่อสุขภาพของสัตว์ แต่ก็สามารถชี้ได้ว่าสมดุลระหว่างจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์และจุลชีพที่ก่อโรคเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง สันนิษฐานว่ากลุ่มแลคโตบาซิลลัสและสเตรปโตคอคคัส เช่น Streptococcus faecium เป็นตัวที่ช่วยคงความสมดุลนี้เอาไว้ เมื่อความสมดุลนี้เปลี่ยนแปลงก็อาจเกิดความไม่เป็นระเบียบของจุลชีพที่ดำรงชีวิตอยู่ของระบบภายในลำไส้ขึ้นได้ ความไม่สมดุลเหล่านี้อาจจะเกิดในรูปของโรคที่แสดงอาการหรือโรคที่ไม่แสดงอาการอันมีผลต่ออัตราการผลิตที่ลดต่ำลง

ผลของความเครียดที่มีผลต่อจุลชีพประจำถิ่น

เชื่อกันว่าความเครียดในสัตว์เป็นสาเหตุหลักในการลดลงของจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ การวิจัยค้นคว้าแสดงให้เห็นว่าเมื่อสัตว์ถูกกำหนดให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่กดดันให้เกิดความเครียด จำนวนเชื้อก่อโรคจะเพิ่มมากขึ้นและจำนวนแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ซึ่งได้แก่ แลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus) ดั้งเดิมในระบบทางเดินอาหาร การเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศอย่างรุนแรง การรักษาด้วยยา (โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาต้านจุลชีพที่เจาะจงสำหรับจุลชีพ แกรมบวก) โรคแทรกซ้อน และบางทีอาจมาจากสาเหตุอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการสูญเสียจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ เสียสมดุลที่

มีต่อจุลชีพที่ไร้ประโยชน์และมีผลกระทบให้เกิดการแสดงอาการของโรค สุดท้ายย่อมเกิดปัญหาผลผลิตลดลงในที่สุด

2.3 ที่มาของโปรไบโอติก

คำว่าโปรไบโอติก (Probiotic) เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกโดย ริชาร์ค ปาร์กเกอร์ ในปี ค.ศ. 1977 แต่ในความเป็นจริงแนวความคิดเรื่องโปรไบโอติก เป็นที่รู้จักกันดีมาเป็นเวลานานเกือบศตวรรษแล้ว Metchnikoff (1908) เขียนรายงานเกี่ยวกับการมีสุขภาพที่ดีและอายุยืนของบัลแกเรีย โดยให้เหตุผลว่าเพราะชาวบัลแกเรียนิยมบริโภคนมซึ่งผ่านการหมัก (Fermented milk products) กันมาก ซึ่งเขาได้แยกเชื้อจุลชีพจากนมชนิดนี้ขึ้นมาหนึ่งชนิดโดยครั้งแรกตั้งชื่อว่า บาซีลัส บัลแกริคัส *Bacillus bulgaricus* และภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็นแลคโตบาซิลลัส *Lactobacillus bulgaricus* นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา นักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาเกี่ยวกับทั้งมนุษย์และสัตว์ก็เริ่มศึกษาค้นคว้าโปรไบโอติกในหลายๆ จุดประสงค์

นักวิทยาศาสตร์ที่ทำการวิจัยอย่างจริงจังในเวลาต่อมาได้เสนอแนะให้นำคุณสมบัติที่เหมาะสมของโปรไบโอติกไปใช้เพื่อการเลี้ยงสัตว์ อย่างไรก็ตาม ประโยชน์ของโปรไบโอติกก็ยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากโปรไบโอติกไม่ใช่ยารักษาโรคครอบจักวาล

2.4 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

คุณสมบัติที่สำคัญที่นำมาใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ Gatesoupe (1999) ได้รวบรวมไว้ดังนี้คือ

4.1 ควรเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถ ในการแข่งขันการใช้สารอาหารหรือผลิตสารเพื่อฆ่าหรือยับยั้ง จุลินทรีย์ที่ก่อโรค

4.2 มีความสามารถในการเกาะยึดลำไส้ได้หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง

4.3 ทำให้เจ้าบ้านแข็งแรงมีความต้านทานโรคโดยมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบด้านการต้านทานโรค (challenge test)

4.4 มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามสำหรับคุณสมบัติในการผลิตหรือไม่ผลิตสารยับยั้งในสภาพหลอดทดลองนั้น ไม่ใช่คุณสมบัติที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อเป็นโปรไบโอติกได้เสมอไป เพราะว่าสารยับยั้งเหล่านี้มีด้วยกันหลายประเภท คือ antibiotic, organic acid, hydrogen peroxide และ siderophores ซึ่งการสร้างสารแต่ละชนิดเหล่านั้นจะขึ้นอยู่กับสภาวะที่แตกต่างกันออกไปทั้งในสภาพหลอดทดลองและในตัวสัตว์ทดลอง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ประโยชน์ของโปรไบโอติก

โดยทั่วไปเราจะใช้โปรไบโอติกเพื่อต่อสู้กับผลกระทบจากความเครียดที่เกี่ยวเนื่องกับระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นหรือการเลี้ยงในระบบปิด ความเครียดเหล่านี้มักเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นหากเป็นไปได้จึงควรให้โปรไบโอติกก่อนที่จะเกิดความเครียดขึ้น ตัวอย่างเช่น ในกรณีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของกุ้งกุลาดำ อันได้แก่การเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือมีการเปลี่ยนแปลงทางสภาพอากาศ เป็นต้น ควรใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารให้กุ้งกินก่อนและหลังที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงพบว่าการให้โปรไบโอติกช่วยลดความผิดปกติของระบบการย่อยของอาหารลง อัตราการเจริญเติบโตต่อวันโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นและอัตราการให้อาหารก็ลดต่ำลง ในขณะที่น้ำหนักกุ้งเท่าเดิมหรือมากขึ้น เนื่องจากประสิทธิภาพในการนำอาหารไปเปลี่ยนเป็นเนื้อดีขึ้น โปรไบโอติกยังใช้ได้ดีในเวลาที่มีความสมดุลในการลบกลับมาอยู่ในสมดุลในทางบวกในเวลาที่สุดเท่าที่เป็นไปได้เพื่อลดอัตราการสูญเสียผลผลิต สถานการณ์ที่คล้ายกันนี้อาจเกิดขึ้นได้ในกรณีของลูกกุ้งกุลาดำที่นำมาปล่อยลงสู่บ่อเลี้ยงใหม่ แหล่งอาหารใหม่

สาเหตุอีกข้อหนึ่งของโปรไบโอติกเป็นที่แพร่หลายคือ คุณสมบัติในการกระตุ้นการกินอาหาร โดยจะพบว่าความต้องการอาหารหรือความว่องไวในการหาอาหารจะมากขึ้นกว่าไม่มีการใช้โปรไบโอติก เราสามารถสังเกตความเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนถึงปริมาณกุ้งที่เข้ายอมากขึ้นกว่าปกติ รวมทั้งขี้กุ้งจะยาวและใหญ่กว่าการให้อาหารโดยไม่มีโปรไบโอติก นั่นย่อมแสดงว่ากุ้งได้รับอาหารมากขึ้น

เราสามารถใช้ประโยชน์โปรไบโอติกกับสัตว์ได้หลายชนิดเพื่อช่วยจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากสัตว์นั้นๆ ถูกเลี้ยงในสภาพที่สกปรกมากๆโปรไบโอติกอาจช่วยแก้ปัญหาแรกเริ่มของประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารเข้าไปใช้ประโยชน์ของสัตว์น้ำ และสร้างความสมบูรณ์เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ข้อบ่งชี้ทั่วไปทำให้เห็นประโยชน์ของโปรไบโอติกในการช่วยสร้างจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ขึ้นในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง หรือประโยชน์ในการสร้างสมดุลขึ้นมาใหม่อีกครั้งในสัตว์น้ำที่มีความเครียดสูง ทำให้เราเห็นคุณค่าที่ปราศจากข้อกังขาของไปรไบโอติกในเวลาที่เราพบว่าไม่มีความเครียด หรือปัจจัยที่สร้างความเครียดจำนวนมากหลงเหลืออยู่ในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามการใช้โปรไบโอติกอย่างระมัดระวังและเก็บไว้ที่เหมาะสมเพื่อคงคุณสมบัติไว้ได้นานข้อสำคัญ ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจะเสียค่าใช้จ่ายน้อยโดยเฉพาะ อย่างยิ่งเมื่อเทียบกับตัวยาราคาแพงชนิดอื่นๆ หรือเทียบกับช่วงเวลาการให้อาหารที่ยืดออกไป

2.6 การทำงานของโปรไบโอติก

แม้โปรไบโอติกจะเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีมานานหลายปีก็ตาม แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ยังสรุปการทำงานที่แท้จริงของมันไม่ได้ทั้งๆที่ มีการตั้งทฤษฎีตั้งมากมาย จึงได้มีผู้รวบรวมสมมติฐานการทำงานของกลุ่มโปรไบโอติก ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวความคิดของโปรไบติก

2.6.1 **การสร้างกรดแลคติก** โดยจุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส *Lactobacillus* และกลุ่มสเตรปโตคอคคัส *Strepcoccus* เป็นปัจจัยหนึ่งหลายๆปัจจัยที่เป็นประโยชน์ในการทำงานของจุลชีพเหล่านี้โดยปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหารของกุ้งให้คงที่

2.6.2 **การสร้างไฮโดรเจนเปอร์อ๊อกไซด์** ซึ่งเป็นตัวทำลายเชื้อก่อโรคหลายชนิด

2.6.3 **การสร้างสารปฏิชีวนะ** จุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus) และจุลินทรีย์สเตรปโตคอคคัส (Streptococcus) บางสายพันธุ์ที่โดดเด่นได้ถูกนำมาสาธิตในห้องทดลองทางวิทยาศาสตร์ได้แก่ *Lactobacillus acidophillus* และ *lactobacilluslactolin* จะสามารถสร้างสารฆ่าเชื้อก่อโรคในร่างกายกุ้งหรือสัตว์น้ำอื่นๆได้ เมื่อมันเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์นั้นๆ

2.6.4 **การสร้างเอนไซม์** ผลกระทบที่ไม่จำเพาะเจาะจงที่มักพบได้ของโปรไบโอติกอาจเกี่ยวข้องการสร้างน้ำย่อยในระบบการย่อยที่โปรไบโอติกสร้างขึ้น ตัวอย่างเช่นเป็นที่รู้จักกันในหมู่เอนไซม์แลคโตบาซิลลัสสามารถสร้างน้ำย่อยแลคเตส (Lactase) ได้ดีและทำงานในฐานะเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน กับน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหาร (Brush borderrenterocyte enzymes)ในกระบวนการย่อย

2.6.5 **การสร้างวิตามินบี** จุลชีพโปรไบโอติกเป็นผู้ผลิตวิตามินบีหลายชนิด เช่นเดียวกับสารที่ย่อยได้ภายในลำไส้

2.6.6 **การแข่งขันกับเชื้อก่อโรค** การเกาะยึด การยึดติดหรือการอยู่รวมกันของระบบทางเดินอาหารเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของจุลชีพ ในการพยายามที่จะอยู่ร่วมกันในพื้นที่พิเศษของกระเพาะโปรไบโอติกมีบทบาทในการขัดขวางเชื้อก่อโรค (pathogens) จากการเกาะติดหรือรวมตัวกันในบริเวณทางเดินอาหาร หรือมีบทบาทในการป้องกันการเกาะติดโดยตรงของเชื้อโรคกับผนังทางเดินระบบทางเดินอาหาร

2.6.7 **การป้องกันการเป็นพิษของเอมีนและแอมโมเนีย** เมื่อโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบเอมีนและแอมโมเนียโดยปฏิกิริยาการย่อยที่เพิ่มขึ้นของเชื้อโรค (*E.coli*) ความระคายเคืองและความเป็นพิษจากเอมีนจะทำให้เกิดการยืดหดตัวของลำไส้มากขึ้น ซึ่งทำให้กุ้งย่อยอาหารได้ไม่สมบูรณ์อยู่แล้วเกิดปัญหาได้ โปรไบโอติกจะช่วยให้การยืดหดของลำไส้และดันอาหารสู่บ่อเลี้ยงช้าลง ระบบการย่อยจะดีขึ้น มีเศษอาหารในบ่อน้อยลง ลดการเน่าเสียของพื้นบ่อได้ทางอ้อม นอกจากนี้ยังพบว่าแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในกระเพาะมีการลดลงอย่างเห็นได้ชัด ด้วยการให้อาหารที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์ แลคโตบาซิลลัส และ สเตรปโตคอคคัส

2.6.8 **การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง** เช่นอาจมีบทบาทบางอย่างกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดในกระเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การศึกษาวิจัยและพัฒนาแบคทีเรียแลคติกในประเทศไทย

แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่ใกล้ชิดมนุษย์มาก และส่วนใหญ่จะให้ผลประโยชน์กับมนุษย์ การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติกนั้น เป็นสิ่งที่กระทำกันโดยเสมอมาทั้งในต่างประเทศและแม้แต่ประเทศไทยก็ตามงานศึกษาวิจัยในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติกในอาหาร เพื่อต้องการทราบเชื้อที่มีบทบาทในอาหารเหล่านั้น และติดตามด้วยเชื้อที่พึงประสงค์ เพื่อจะนำกลับมาใช้ในการปรับปรุงอาหารนั้นอีกครั้ง ตลอดจนการศึกษาทางวิธีเก็บรักษาเชื้อเพื่อนำมาใช้ด้วย ซึ่งในการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่มีแนวโน้มเป็นไปได้ แต่ก็ยังมีเหตุผลบางประการที่ต้องมาวิเคราะห์วิจารณ์กันเพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการพัฒนาแบคทีเรียแลคติคในประเทศไทยกันต่อไปในอนาคต

2.8 แบคทีเรียแลคติก ณ ศูนย์เก็บจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ศูนย์เก็บจุลินทรีย์ วท. ได้รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียจำพวกที่สร้างกรดแลคติกไว้จำนวนทั้งสิ้น 79 สายพันธุ์ อันประกอบไปด้วย Lactobacillus , Leuconostoc , Pediococcus , และ Streptococcus ในจำนวนนี้มี 27 สายพันธุ์ที่สั่งมาจากต่างประเทศเพื่อเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบสำหรับงานวิจัย 47 สายพันธุ์แยกจากอาหารดองของไทยและ 5 สายพันธุ์แยกจากวัสดุอุตสาหกรรม จุลินทรีย์เหล่านี้ได้เก็บรักษาในสภาพแห้ง-แข็ง (Freeze-dried) เพื่อให้บริการแก่ผู้ที่สนใจในการนำไปใช้ในงานวิจัย หรืออุตสาหกรรม โดยมีประวัติและคุณสมบัติของแต่ละสายพันธุ์บันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์

2.9 สภาพการณ์การวิจัยแบคทีเรียแลคติกของยุโรป 1990-1993

การสรุปเกี่ยวกับความก้าวหน้าของทั่วโลก ในการศึกษาแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักชนิดต่างๆ ข้อมูลทั้งหมดนี้ได้ รวบรวมจากงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ที่เข้าร่วมการประชุม แบคทีเรียที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ 17-21 กันยายน 2533

แบคทีเรียแลคติกเข้าร่วมในกระบวนการหมัก อาหารประเภทนม เนื้อ ผัก และ เครื่องดื่ม สิ่งที่เกิดขึ้นก็คือ การนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสเนื้อสัมผัส และที่สำคัญ ก็คือความสามารถในการเก็บรักษาอาหารให้อยู่ได้นาน นอกจากนั้น แบคทีเรียแลคติกยังมีผลในการช่วยรักษาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้อยู่ในสภาพที่ดีด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Fermented Dairy Products

1.1 Lactose Utilisation

Lactose ถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และกาแลคโตสโดยเอ็นไซม์ galactosidase น้ำตาลที่ได้จากการย่อยนี้ จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก ซึ่งมีผลทำให้ pH ในอาหารลดลง ดังสมการข้างล่างนี้

ได้มีการศึกษายีน ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ซึ่งเข้าร่วมในกระบวนการ metabolism ของน้ำตาล แลคโตส ดร. Poolman ได้ศึกษาการใช้น้ำตาลแลคโตสของเชื้อ Streptococcus thermophilus พบว่า lac operon ประกอบด้วยยีนหลายยีนที่น่าสนใจได้แก่ lacZ แสดง β – galactosidase activity lacS แสดง lactose transport protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านน้ำตาลแลคโตสเข้าสู่เซลล์ โดยดำเนินในลักษณะที่เรียกว่า Stoichiometric exchange จาก lactose เป็น galactose ฉะนั้น จะมีการปล่อยน้ำตาล กาแลคโตสออกสู่ภายนอกเซลล์ ลักษณะเช่นนี้แสดง gal$^-$ phenotype

Dr. London 1990-1993 จาก national Intitute of Dental Research ได้ศึกษา metabolism pathway ของ *L. casei* และ *Streptococcus avium* พบว่า pathway ในการใช้ glucose ต่างจาก จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งใช้ glycolysis pathway ในกรณีของ *Lactobacillus* มี pathway คล้ายกับ pentose pathway

1.2 Flavor development

1.2.1 คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสและเปบติเอส

protinase

protein ⟶ oligopeptide , amino acide ⟶ กลิ่นรสต่าง

peptidase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการสารอาหารเฉพาะที่เหมาะสม ในการเจริญเติบโต (Fastidious) อันได้แก่ nucleotide vitamin และรวมทั้งกรดอมิโนด้วย proteinase และ peptidase จึงมีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนได้ กรดอมิโนและสารประกอบเปบไทด์ ที่เหลือ จะเป็นตัวทำให้เกิดกลิ่นรส เฉพาะขึ้นในอาหารชนิดนั้น ฉะนั้นได้มีการศึกษา proteolytic system ของแบคทีเรียแลคติก แต่ละชนิด โดยได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางใน *Lactococcus* ซึ่งพอจะสรุปทั่วไปได้ดังนี้

1. ขนาดของเอนไซม์อยู่ในช่วง 80-145 kda.
2. pH optimum 5.5-6.5 ,IE 4.4-4.55
3. ต้องการ Ca^{2+} ในการ stabilize เอนไซม์
4. เอนไซม์มีลักษณะ serine type
5. Cell associated enzyme
6. ชนิดของเอนไซม์แบ่งเป็น

6.1 P_I , acid activity , optimum temperature 30 ^{0}C specific , β - casin

6.2 P_{II} , mutral activity , optimum temperature 30 ^{0}C

6.3 P_{III} , acid activity , optimum temperature 40 ^{0}C specific to α , β - casein

7. เอนไซม์ peptidase มีความจำเพาะต่อ substrate ชนิดต่างๆได้แก่ di-and tripeptidase , aminopeptidase , aryl - peptyl amidase , x - propyl - dipeptidyl , aminopeptidase endopeptidase และ carboxypeptidase เป็นต้น

คุณสมบัติของเอนไซม์ peptidase ขึ้นกับแหล่งเอนไซม์นั้นๆ เช่น เอนไซม์ amino peptidase ที่แยกจาก strain WG2 ไม่สามารถย่อย dipeptide ที่มี alanine หรือ phynilanine ที่ N - terminal ขณะที่ *L. Lactis* สามารถย่อยได้

1.2.2 การศึกษาในระดับ molecular ของ Protinase

โดยวิธี curing , conjugation , protoplast fusion และ transfornation พบว่ายีนที่แสดง (expresor) protinase ปรากฏอยู่บนพลาสมิดขนาด 13.5-10 kb จากการศึกษา protinsae gene ของ *L. Lactis spp.* Cremoris 2 สเตรนพบว่า

- Active site อยู่บริเวณ highly conserve และในส่วนนี้ยัง homology กับเอนไซม์ subtilisin ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ในการขับเอนไซม์สู่ภายนอกเซลล์ (Protinase secretion) สามารถกระทำได้โดย truncated c - terminal จะทำหน้าที่รับผิดชอบเกี่ยวกับการที่เอนไซม์ยึดกับผนังเซลล์ (enzyme associated cell wall)

1.3 <u>การใช้วิธีวิศวกรรมพันธุศาสตร์ เพื่อปรับปรุงผลิตภัณฑ์นมหมัก</u>

เป็นกรรมวิธีที่ ใช้ในการเปลี่ยนแปลงของระบบยีน เพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีขึ้น งานวิจัยที่กำลังดำเนินอยู่ในปัจจุบันพอจะสรุปได้ดังนี้

- การทำโปรตีนผสมระหว่าง PI และ PIII ทำให้ความสามารถในการย่อย casein (โปรตีนในนม) เปลี่ยนไป
- การยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมเกี่ยวกับการใช้น้ำตาลแลคโตส และการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Protrase) *Lactobacillus* สายพันธุ์ใหม่นี้ (lac^- , $Prot^-$) นำไปใช้เป็น starter สำหรับการผลิต cheddar cheese พบว่าทำให้กลิ่นรสดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากทำให้มีปริมาณ peptide โมเลกุลเล็ก และกรดอมิโน ในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากนั้นยังเป็นการควบคุมความสมดุลย์ระหว่าง endoprotidase และ endopeptidase ทำให้สามารถกำจัดรสขมในการทำ cheese ได้
- การยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Lac^+ , $prot^-$) ทำให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ (yield) สูงขึ้น เนื่องจากการย่อยเคซีนลดน้อยลง
- ในอุตสาหกรรมการทำเนยเหลว (butter) สารประกอบ diacetyl ซึ่งได้จากกระบวนการ citrate metabolism เป็นตัวทำให้เกิดกลิ่นรสพิเศษขึ้นในเนยเหลว ปัญหาที่เกิดขึ้นคือ กลิ่นรสที่ได้ไม่สม่ำเสมอ จึงได้มีการตั้งสมมติฐานว่า ยีนที่ควบคุมเกี่ยวกับกระบวนการนี้ปรากฏอยู่บนพลาสมิค และปัญหาที่พบบ่อยครั้งคือ ความไม่คงตัวของพลาสมิค (plasmid instability) ซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ ฉะนั้นจึงได้มีการใส่พลาสมิคซึ่งมียีนที่รับผิดชอบในกระบวนการครั้งนี้ ลงในโครโมโซม พบว่าสามารทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสชาติคงที่ได้
- อุตสาหกรรมการผลิตสารให้ความหวานแบบธรรมชาติ (natural sweetener) เป็นที่ทราบกันแล้วว่าน้ำตาลแลคโตส สามารถนำไปใช้ในกระบวนการ metalism ของเซลล์ในรูปกลูโคสและกาแลคโตส โดยน้ำตาลแลคโตสสามารถเปลี่ยนไปเป็น น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส เอนไซม์ β - galactosidase นอกจากนั้นทั้งกลูโคสและกาแลคโตสจะเข้าสู่ glucose kinase และ glucose transferase ทำให้ไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ได้ เซลล์จุลินทรีย์จะใช้เฉพาะน้ำตาลกาแลคโตสเท่านั้น ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้น้ำตาลกลูโคสยังคงปรากฏในอาหาร เป็นการเพิ่มความหวานในอาหารทางหนึ่งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19755

2. Meat Fermentation

เนื้อเป็นอาหารที่เสียได้ง่าย เนื่องจากคุณสมบัติของอาหารเหมาะสม กับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น water activity สูงถึง 0.97-0.98 , pH 5.6 และส่วนประกอบธาตุอาหารต่างๆ ฉะนั้นจึงได้มีการถนอมอาหารโดยวิธีต่างๆ เช่น การตากแห้ง , การดองเค็ม และที่น่าสนใจคือการหมัก

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเนื้อ

- วัตถุดิบที่ใช้ พบว่าต้องมีเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในปริมาณที่ต่ำ
- ปริมาณของ starter ควรอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมพบว่าอยู่ในช่วง $10^6 - 10^7$ cfu/g
- ชนิดของ starter จากการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *L. curvatus* และ *L. sake* เข้าร่วมในกระบวนการหมัก จะทำให้ได้ไส้กรอกที่มีคุณภาพดี
- การใช้สาร additive อื่นๆ , อุณหภูมิและความชื้นเป็นต้น

2. การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก

- ในการหมัก โดยใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติก มีผลทำให้เกิดกรดแลคติก ทำให้ pH ลดลง เป็นผลทำให้เน่า
- การตกตะกอนของโปรตีน ทำให้เนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป
- การเกิด acid taste
- แบคทีเรียแลคติกบางตัว สามารถผลิตสาร Antagonistic ทำให้ปลอดภัยต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ เช่นการผลิต sakacin A ของ *L. sake*
- การเกิดสีแดงของเนื้อของสารประกอบ nytrosomyoglobin
- Lipolysis มีบทบาทในด้านการทำให้เกิดกลิ่น (aroma) เกิดขึ้น ขบวนการนี้ยังไม่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง
- ระดับกลิ่นรสในเนื้อหมัก สามารถเกิดจาก metabolite ของแบคทีเรียแลคติก เช่น น้ำตาลกลูโคส acitic acid และเอทธิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น

3. Vegetable Fermentation

ไม่ค่อยมีการศึกษากันมากนัก ในกลุ่มประเทศทางยุโรป เท่าที่พบมีเพียง 2 paper ซึ่งสามารถสรุปได้ดังไปนี้

- ในการหมักต้องใช้ heavy inoculum เพื่อให้ปลอดภัย จากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- คุณค่าทางอาหาร ในอาหารผักดอง พบว่า ธาตุเหล็กของพืชผักถูกพบในรูปของ heme iron ซึ่งร่างกายสามารถ absorb ไปใช้โดยตรงเปลี่ยนแปลงจาก Free iron เป็น heme iron เกิดขึ้นได้เนื่องจากเอนไซม์ phytase ซึ่งจุลินทรีย์ผลิตได้เอง

4. Soy sauce

เกี่ยวกับคุณค่าทางอาหารจากถั่วที่ผ่านการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก และที่ไม่ผ่านการหมัก จากการทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด

5. Beverage

เช่นการทำไวน์องุ่น พบว่าการใส่ Malolactic startes จะช่วยทำให้กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น

6. Silage

คืออาหารสัตว์หมัก โดยวัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ หญ้า หรือวัสดุเหลือใช้ในทางการเกษตร

เป้าหมายการทำ Silage คือ เราต้องการให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้ออื่นๆ ซึ่งสามารถกระทำได้โดย

1. การใส่ formic acid
2. การหมัก Lactic acid bacteria ทำให้เกิดกรดแลคติค เป็นผลให้ pH ลดลง

ในปัจจุบันมุ่งมาใช้วิธีที่ 2 โดยการใช้ pure culture แทน จากธรรมชาติเพื่อให้ได้การหมักที่เร็วขึ้น pH ลดลงเป็น 4.2 ภายในเพียง 2 วันเท่านั้น

นอกจากนั้นยังได้มีการโคลนยีนที่แสดง amylase activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยแป้ง และ Endoglucanase ซึ่งเข้าร่วมกระบวนการย่อยเซลลูโลส เข้าไปใน *L. platarum* ทำให้ recombinant strains สามารถย่อยแป้งและ carboxymethyl cellulose ได้ในการโคลนยีน ทำในลักษณะ 2 ระบบ คือ autonomouse replicating plasmid และ intergration ไปสู่ chomosomal DNA พบว่าในระบบหลัง เชื้อจะมีคุณสมบัติ segregation stability สูงกว่าเป็นผลให้ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ อยู่ในระดับคงที่แน่นอนกว่า

สรุปจะเห็นว่างานวิจัยในต่างประเทศรุดหน้าไปถึงขั้น การศึกษาในระดับโมเลกุลแล้ว ฉะนั้นประเทศไทยเราควรจะพิจารณา และเร่งการศึกษาในด้านนี้ให้มากขึ้น นั่นหมายถึง ความสามารถที่จะควบคุม ขบวนการผลิตให้ได้ตามเป้าหมาย ซึ่งจะนำไปสู่ผลกำไรมหาศาลในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลพลอยได้จากแบคทีเรียแลคติค

สรุปย่อ

แบคทีเรียแลคติค นอกจากจะมีประโยชน์ในการถนอมอาหารต่างๆ มากมายแล้ว แบคทีเรียแลคติคแต่ละชนิดยังมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์อีกด้วยตัวอย่างเช่น กรดแลคติค แบคทีเรียแลคติคบางชนิดได้ถูกนำมาใช้ผลิตกรดแลคติคในระดับอุตสาหกรรมนอกจากกรดแลคติคแล้วยังมีผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะเปปไทด์ เช่น ไนซิน แบคทีริโอซิน เป็นต้น โปรไบโอติค เป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่เป็นผลพลอยได้ โดยใช้เป็นอาหารเสริมทั้งในมนุษย์และสัตว์ ผลพลอยได้อีกสองประเภทได้แก่ การใช้แบคทีเรียแลคติค ปรับปรุงคุณภาพไวน์ และการใช้ผลิตหญ้าหมัก

1. กรดแลคติค

กรดแลคติคเป็นกรดอินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ที่มีประวัติการใช้ในอุตสาหกรรมยา เคมี และอาหารมาช้านาน เริ่มแรกใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรดและเป็นสารถนอมอาหาร ปริมาณการผลิตปีละ 50,000 ตัน โดยในปริมาณพอๆกัน ทั้งวิธีทางการหมักและการสังเคราะห์ทางเคมี แบคทีเรียแลคติคที่ใช้ คือ *Lactobacillus spp.* และ *Streptococcus thermophilus* (Mehaia M.A & Cheryan M. , 1987 ; Boyaval & Goulet , 1998 ; Leh & Cherles , 1989 ; a-c ; Andrews & Fonta , 1989 ; and Yao & Todda , 1990)

2. ยาปฏิชีวนะ

นักวิทยาศาสตร์พบสารปฏิชีวนะเปปไทด์ในแบคทีทเรียแลคติค โดยเฉพาะในหัวเชื้อที่ใช้ผลิตเนยแข็งซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้ : *Lactococcus lactis* ผลิตไนซิน (nisin) , *L. cremoris* ผลิต ไดโปลคอคซิน (diplococcin) และ *L. diacetylactis* ผลิตแบคทีริโอซิน (bacteriocin) สารปฏิชีวนะดังกล่าว ถูกควบคุมการผลิตโดยดีเอนเอในส่วนของพลาสมิค (Schereit et al. 1983 ; Muriana & Klaenharnmer , 1987 ; Lauffenburger , 1987 ; Gonzales & Kunka , 1987). Silva et al. 1987 ; Schillinger & Luche , 1989 ; and Ahn & Stiles , 1990). เมื่อเร็วๆนี้ ได้มีการศึกษาถึงขั้นพันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียแลคติคดังกล่าวโดยการ clone ยีนของสารปฏิชีวนะ (Vanbelkum et al. , 1989 and Kaletta & Entian , 1989)

3. ปรับปรุงไวน์

ในไวน์แดงและไวน์ขาวมักมีกรดมาลิคผสมอยู่ซึ่งทำให้รสชาติของไวน์ไม่ดี ดังนั้นแบคทีเรียแลคติคสามารถกำจัดกรดมาลิคให้ลดลงได้ และลดการใช้ปริมาณ sulphurous anhydride ได้โดยเฉพาะในไวน์แดง (Lafon-Lafourcade et al. 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. <u>การใช้ผลิตหญ้าหมัก</u>

การผลิตหญ้าหมักโดยใช้ แบคทีเรียแลคติค จะทำให้หญ้าหมักมี pH ต่ำ ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน แต่ปริมาณน้ำตาลที่แบคทีเรียแลคติคจะใช้ได้มีอยู่ต่ำมากในหญ้าที่นำมาหมัก ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการเติมยีสต์อัลฟา-อะไมเลส และเอนโดกลูคาเนส เข้าไปในแบคทีเรียแลคติค เพื่อให้ผลิตน้ำตาลที่จะใช้เปลี่ยนเป็นกรดแลคติคได้อย่างเพียงพอ (Bates et al. , 1989 & Scheirlinck et al. 1989 , Scheirlinck et al. 1990)

5. <u>การใช้ร่วมกับยีสต์</u>

แบคทีเรียแลคติคสามารถใช้ร่วมกับยีสต์ได้ โดยในน้ำผลไม้ปกติจะมีน้ำตาลกลูโคสซึ่งยีสต์จะเปลี่ยนเป็นเอทธานอล นอกจากกลูโคสแล้วในน้ำผลไม้จะมีกรดซิตริก ซึ่งแบคทีเรียแลคติค จะเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก ตัวอย่างเช่น *Saccharomycys cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* (Kennes et al. , 1991)

6. <u>โปรไบโอติค</u>

ในอดีตประมาณ 40 ปีเศษ มนุษย์เริ่มใช้ยาปฏิชีวนะต่อสัตว์เลี้ยงในฟาร์มเพื่อรักษาโรคและกระตุ้นการเจริญเติบโต ต่อมาก็ประจักษ์ว่ามีผลทำให้เกิดการดื้อยาและผลข้างเคียง ด้วยเหตุนี้เองเจ้าของฟาร์มสัตว์เลี้ยงบางแห่ง ได้เปลี่ยนจากการใช้ยาปฏิชีวนะมาเป็น โปรไบโอติค

โปรไบโอติก คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็นอาหารเสริมซึ่งมีประโยชน์ต่อผู้ที่ได้รับโดยปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ปิเปต
2. กระดาษกาว
3. แอลกอฮอล์
4. บีกเกอร์
5. หลอดทดลอง
6. หลอดทดลองแบบฝาเกลียว
7. หม้อขนาดใหญ่
8. จุกยาง
9. เข็มเขี่ยเชื้อ
10. ช้อนตักสาร
11. แท่งแก้ว
12. ขวด Volume
13. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
14. ตะกร้าใหญ่
15. dropper
16. ขวดเอ็มสปอร์ต
17. กระบอกตวง
18. กระดาษทิชชู
19. plate
20. Vortex
21. Hot air oven
22. autoclave
23. pH meter
24. ไมโครปิเปต และทิป
25. เตาอบไมโครเวฟ
26. ไฟแช็ค
27. สำลี
28. น้ำกลั่น
29. ตะเกียงแอลกอฮอล์
30. ตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 **สารเคมี**

1. MSR Broth
2. น้ำกรอง
3. เกลือ
4. $CaCO_3$
5. HCl 0.5 N
6. NaOH 1 N

3.1.3 **เชื้อจุลินทรีย์จากอาหารสัตว์**

Lactobacillus acidophilus (LAB1),

Pediococcus pentosaceus (LAB4) รหัส TISTR 536

และ เชื้อจุลินทรีย์แหนม

Lactococcus lactis (N19) สร้าง (nisin Z),

Pediococcus pentosaceus รหัส TISTR (536) (สร้าง pediocin-PA1)

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทำ

ศึกษาการเจริญของเชื้อ LAB1, LAB4, N19, TISTR536 โดยทำการทดลอง พบว่าเชื้อทนกรด HCl และเกลือน้ำดีที่ระดับต่างๆกัน มีวิธีการศึกษาดังนี้

1. การเตรียมเชื้อ LAB1, LAB4, N19, 536 ที่ใช้ในการทดลอง

1. ทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดลงในอาหาร MRS Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใน plate

2.1 นำ MRS Broth 26.1 g. ,Agar 5.1 g. (1.2 %) ,$CaCO_3$ (c-s) 2.5 g.(0.5 %) และน้ำกรอง 500 g. มาผสมเข้าด้วยกันในบีกเกอร์

2.2 คนด้วยแท่งแก้วให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเข้าไมโครเวฟประมาณ 3-5 นาที หลังจากนั้นนำออกมาคนด้วยแท่งแก้วให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำเข้าไมโครเวฟอีกครั้งประมาณ 3-5 นาที ก็จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใสและเป็นเนื้อเดียวกัน

2.3 นำไปใส่ในขวดเอ็มสปอร์ต ปิดฝาหลวมๆ นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 20 นาที

2.4 นำออกมาทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงแต่อย่าให้แข็ง เพื่อเตรียมไว้ใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์นี้เป็นของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การเตรียมอาหาร MRS Broth เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่ระดับต่างๆกัน

3.1 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ pH2
3.2 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ pH3
3.3 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ pH4
3.4 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ pH5
3.5 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ pH6
} ปรับด้วย HCl

3.6 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ pH8 } ปรับด้วย NaOH

4. การเตรียมน้ำเกลือสำหรับ Dilution 0.85%

4.1 น้ำกรอง 1 ลิตร ต่อเกลือ 8.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 9 ml

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ Bile salt ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

5.1 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ Bile salt 0 %

5.2 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ Bile salt 0.3 %

5.3 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ Bile salt 0.6 %

5.4 อาหาร MRS Broth ที่ระดับ Bile salt 1.0 %

6. ทำการถ่ายเชื้อ LAB1, LAB4, N19, TISTR536 ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงในอาหารตัวอย่าง MRS Broth ที่มีความเข้มข้นกรดต่างกันทุกๆ ตัวอย่าง แล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{0}C นาน 18-24 ชั่วโมง

6.1 ทำการตรวจผล ดูการ positive ของเชื้อทุกๆหลอด

6.2 นำเชื้อในหลอดที่ไม่ positive มา Dilution ที่ 10^{2} และ 10^{3} มา Spread plate บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนี

6.3 นำเชื้อในหลอดที่ positive มา streak plate บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนี

7. ทำการถ่ายเชื้อ LAB1, LAB4, N19, 536 ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงในอาหารตัวอย่าง MRS Broth ที่มีความเข้มข้น bile salt ทุกๆ หลอด

7.1 ทำการตรวจผล ดูการ positive ของเชื้อทุกๆหลอด

7.2 นำเชื้อในหลอดที่ไม่ positive มา Dilution ที่ 10^{2} และ 10^{3} มา Spread plate บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนี

7.3 นำเชื้อในหลอดที่ positive มา streak plate MRS Agar +0.5% $CaCO_3$ บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96671

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการนำเชื้อมาเลี้ยงที่ pH2-pH6 และ pH8

จากการทดลองการทนกรดของเชื้อ แลคติกแบคทีเรีย ทั้งสี่สายพันธุ์ คือ เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1) , *Pediococcus pentosaceus* (LAB4) จากอาหารสัตว์ และ *Lactococcus lactis* (N19)สร้าง nisin , *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR(536) สร้าง (pediocin-PA1) จากแหนม โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ cfu/ml

มาในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่ระดับต่างๆคือ pH2-pH6 และ pH8 พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ใน MRS Broth ที่ระดับ pH4-pH6+pH8 ยกเว้น N19 ที่เจริญได้ในระดับ pH5-pH8 (ตารางที่ 1) แต่ในหลอด MRS Broth ที่ระดับ pH2-pH3 ซึ่งเป็นระดับเดียวกันที่อยู่ในกระเพาะของสัตว์ถึงแม้ว่าเชื้อไม่เจริญแต่เชื้อก็ยังไม่ตาย ยังสามารถทนอยู่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง ยกเว้น N19 ที่เจริญได้ในระดับ pH5-pH8 (ตารางที่ 1) สายพันธุ์ N19 ที่ตรวจไม่พบในหลอดที่ pH2

ตารางที่ 1 : แสดงผลการตรวจสอบการทนกรดเกลือที่ระดับ pH ต่างๆ ของกลุ่มแบคทีเรียแลกติก เชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ cfu/ml

	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH8
LAB1	-	-	++	++	++	++
LAB4	-	-	++	++	++	++
N19	-	-	-	++	++	++
536	-	-	++	++	++	++

(LAB1) =*Lactobacillus acidophilus* (N19) = *Lactococcus lactis* สร้าง (nisin Z)

(LAB4) =*Pediococcus pentosaceus* (536) =*Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 (สร้าง pediocin-PA1)

++ : มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อ

- : ไม่มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 : ปริมาณเชื้อที่ทนกรดเกลือที่เหลือรอด

นำเชื้อมาจากข้อ 1 ที่ผล Negative (-) มา Dilution NaCl 0.85 %ที่ 10^2 และ 10^3 และนำมา Spread plate (เติมเชื้อ Plate ละ 0.1 ml.)

	pH2	pH3	pH4
LAB1	3	20	NT
LAB4	100	$1x10^4$	NT
N19	0	2	30
536	370	$2x10^4$	NT

NT= ไม่ได้ทำการทดสอบ

4.2 ผลการทดลองการทนของ เกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6, 1.0 %

จากการทดลองการทนเกลือน้ำดีของเชื้อ แลคติกแบคทีเรีย ทั้งสี่สายพันธุ์คือ เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LAB1) , *Pediococcus pentosaceus* (LAB4) จากอาหารสัตว์ และ *Lactococcus lactis* (N19)สร้าง nisin , *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR(536) สร้าง (pediocin-PA1) จากแหนม โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ cfu/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับ 0, 0.3, 0.6, 1.0 % พบว่า LAB4 และTISTR536 สามารถทนเกลือน้ำดี ที่ระดับ 0.6, 1.0 % (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นระดับเดียวกันที่อยู่ในผนังลำไส้ของสัตว์ ไม่มีการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 1.0 และ 0.6 % ตามลำดับ

ตารางที่ 3 : แสดงผลการตรวจสอบการทนเกลือน้ำดี ของเชื้อ 4 สายพันธุ์

Bile salt	0%	0.3%	0.6%	1.0%
LAB1	++	+	+	-
LAB4	++	++	++	++
N19	++	+	-	-
536	++	++	++	++

(LAB1) =*Lactobacillus acidophilus* (N19) = *Lactococcus lactis* สร้าง (nisin Z)

(LAB4) =*P. pentosaceus* (536) =*P. pentosaceus* รหัส TISTR 536 (สร้าง pediocin-PA1)

++ : มีการเจริญของเชื้อ

- : ไม่มีการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 : ปริมาณเชื้อที่ทนเกลือน้ำดีที่เหลือรอด

นำเชื้อมาจากข้อ 1 ที่ผล Negative (-) มา Dilution NaCl 0.85 % ที่10^2 และ 10^3 นำมา Spread plate (เติมเชื้อ Plate ละ 1 ml.)

Bile salt	0.6%	1.0%
LAB1	NT	1X10
LAB4	NT	0
N19	0	0
536	NT	NT

NT= ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากการทดลองสรุปได้ว่า LAB4 และTISTR536 จากการนำหลอดเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเจริญของเชื้อในสายพันธุ์ LAB1 ที่ระดับความเข้มข้นเกลือน้ำดี 1.0 % และN19 ที่ระดับความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.6 และ 1.0 % ไปทำการเกลี่ยเพาะเลี้ยงเชื้อบน MRS Agar+0.5%$CaCO_3$ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 1.0 % เชื้อ LAB ยังพบอยู่ในปริมาณ 10 cfu/ml ขณะที่ N19 ถูกทำลายจนไม่พบเชื้อในหลอด MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.6+1.0 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า แบคทีเรียแลคติก (LAB) ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่แยกได้โดยคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* , *Pediococcus pentosaceus* จากอาหารสัตว์ และ *Lactococcus lactis* , *Pediococcus pentosaceus* จากแหนม มาทดสอบความเป็นไปได้ในการผลิตเป็นอาหารโปรไบโอติก ให้กับสัตว์โดยเบื้องต้นเพื่อจะดูความสามารถในการทนกรดไฮโดรคลอลิก (HCl) ที่ pH2-pH6และpH8 , และมีความสามารถในการทนเกลือน้ำดี (Bile salt) ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6, 1.0 % ได้ดี ซึ่งสารเคมีทั้งสองตัวอยู่ภายในกระเพาะอาหารและลำไส้ของคนและสัตว์ จากผลการทดลองพบว่า *P. pentosaceus* รหัส TISTR (536) (สร้างแบคเทอริโอซิน) ที่แยกได้จากแหนมและอาหารสัตว์ ทั้งสองแหล่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทนกรดไฮโดรคลอลิกที่ pH2, pH3 และทนเกลือน้ำดีที่ 0.6, 1.0 % ได้ดีที่สุด กล่าวคือทนได้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซึ่งจะเก็บเชื้อไว้ในการทดลองเป็นอาหาร โปรไบโอติกต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วิริยะจารี และคระ. 2537. โครงการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์แหนม. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภูริวัฒน์ ศรีปัญญาวิญญู. 2539. กรดแลคติกในอุตสาหกรรม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รุจา มาลัยพวง. 2544. "การผลิอาหารโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลคติกของไทย" ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. 152 หน้า.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ 2541-2542 โปรไบโอติกอาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์. วารสาร จา พาร์ ฉบับที่41- 48

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. ผลของการใช้กล้าเชื้อแลคติกต่อซาลโมเนลลาในการหมักแหนม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adisorn Swetwiwathana, และคณะ. 2001. Potential for Use of Isolete Bacteriosin-Producing Pediococcus pentosaceus TISTR 536 from Nham (Thai Fermented Meat) to Control the Growth of Salmonella anatum. Proceeding of the 47th International Congress of meat science and Technology. VolumeII. August 26th -31th , 2001 Krakow, Poland. P. 18-19.

Bates et al. , 1989 & Scheirlinck et al. 1989 , Scheirlinck et al. 1990

Dr. London 1990-1993 จาก national Intitute of Dental Research ได้ศึกษา metabolism pathway ของ *L. casei* และ *Streptococcus avium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gatesoupe (1999)

George, J. 1983. Basic Food Microbiology. USA : Saybrook Press, Inc. 781pp.

Gonzales & Kunka , 1987). Silva et al. 1987 ; Schillinger & Luche , 1989 ; and Ahn & Stiles , 1990

Herbert Weber. 1994. "Dry sausage manufacture, The important of protective cultures and their metabolic product" Fleischwirtsch. 74(3), 278-282.

(Lafon-Lafourcade et al. 1983)

(Mehaia M.A & Cheryan M. , 1987 ; Boyaval & Goulet , 1998 ; Leh & Cherles , 1989 ; a-c ; Andrews & Fonta , 1989 ; and Yao & Todda , 1990

Metchnikoff (1908)

Saccharomycys cerevisiae และ *Lactobacillus plantarum* (Kennes et al. , 1991)

(Schereit et al. 1983 ; Muriana & Klaenhammer , 1987 ; Lauffenburger , 1987 ; (Vanbelkum et al. , 1989 and Kaletta & Entian , 1989)

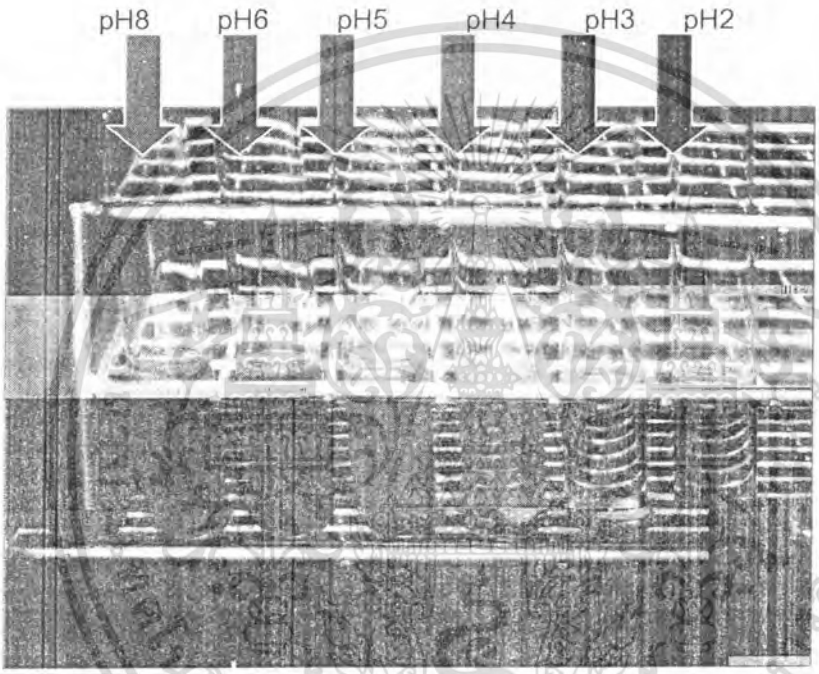
วารสารโปรไบโอติก http://www.thaiscience.com/acrobat4/probiotic.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แสดงค่าการทนกรดเกลือ (HCl) ที่ pH2-pH6 และpH8

รูปที่ 1 : การเจริญของเชื้อที่ระดับ pH ต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

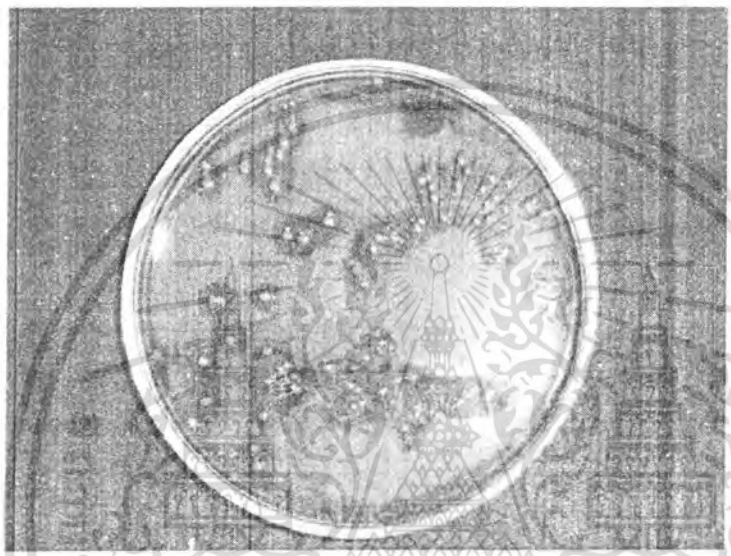
รูปที่ 2 การเกิดโคโลนี โดย streak plate

เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปที่ 3 การเกิดโคโลนี โดย spread plate



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายวิชัย บุญสุระ เกิดวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2522 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เมื่อปี พ.ศ. 2543 จากโรงเรียนบ้านแฮดศึกษา จังหวัดขอนแก่น และปี พ.ศ. 2547 จบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

นายณรงค์ พลบูรณ์ เกิดวันที่ 19 กรกฎาคม 2524 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เมื่อปี พ.ศ. 2543 จากโรงเรียนหนองบัวลำพูศึกษา จังหวัดหนองบัวลำพู และปี พ.ศ. 2547 จบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้