ผลของพีเอช เกลือน้ำดี และ สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติก

Effect of pH bile salts and gastrointestinal tract model on isolated lactic acid bacteria for a source of probiotic

วรีรัน แย้มแสง
เอกชัย แม้นพยัคฆ์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของพีเอช เกลือน้ำดี และ สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติก

Effect of pH bile salts and gastrointestinal tract model on isolated lactic acid bacteria for a source of probiotic

T148845

วรีริน แย้มแสง
เอกชัย แม้นพยัคฆ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ลงหมู่.....
เลขทะเบียน 148845
วัน.เดือน.ปี 30 พ.ย. 2560

b 12876667
i.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของพีเอช เกลือน้ำดี และ สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง ที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติก

Effect of pH bile salts and gastrointestinal tract model on isolated lactic acid bacteria for a source of probiotic

จัดทำโดย

วรีริน แย้มแสง รหัสนักศึกษา 55080119

เอกชัย แม้นพยัคฆ์ รหัสนักศึกษา 55080140

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..../...../.....

(รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของพีเอช เกลือน้ำดี และสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติก
ชื่อนักศึกษา	วรีริน แย้มแสง รหัสนักศึกษา 55080119
	เอกชัย แม้นพยัคฆ์ รหัสนักศึกษา 55080140
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่แยกได้จากแหนม *Weissella paramesenteroides* SM081 และ *Lactobacillus plantarum* SM154 ซึ่งคัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติกในมนุษย์ เมื่อทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2 และ พีเอช 3 ตามลำดับ นำมาตรวจนับปริมาณของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด ด้วยวิธี Pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ซึ่งเก็บตัวอย่างทุกๆชั่วโมงที่ 0, 3, 6 และ 18 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °c ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูความอยู่รอดและความคงทนของเชื้อ จากนั้นจึงนำมาทดสอบโดยศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดี โดยทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าว ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีแตกต่างกัน คือ 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% ตามลำดับ จากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดด้วยวิธี Pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar+ Brom Cresol Purple บ่มที่อุณหภูมิ 37 °c ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูความอยู่รอดและความคงทนของเชื้อที่มีต่อเกลือน้ำดีในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำมาทดสอบขั้นต่อไปเพื่อยืนยันผลการทดลองจากสองการทดสอบข้างต้น คือ การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร โดยใช้กระเพาะอาหารจำลองที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน คือ ที่พีเอช 2 พีเอช 2 เติมนมพร่องมันเนย ซึ่งปรับพีเอชด้วย 0.1M ของกรดไฮโดรคลอริก และที่ พีเอช 7 ซึ่งปรับพีเอชด้วย 0.1M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยในแต่ละพีเอชจะเติมเอนไซม์เปปซิน 3 กรัมต่อลิตร และในสภาวะลำไส้จำลอง ซึ่งมีพีเอช8 โดยมีเอนไซม์เพนครีเอติน 1 กรัมต่อลิตร พร้อมทั้งเติม เกลือน้ำดี ความเข้มข้น 4.5% ปรับพีเอชด้วย 0.1M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในแต่ละสภาวะจะทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 3ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าโดยจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 90 และ 180 นาที มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธีPour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar+ Brom Cresol Purple บ่มที่อุณหภูมิ 37 °c ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พี่เอช 2 และ พีเอช 3 ตามลำดับ พบว่า *Lactobacillus plantarum* SM154, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 เป็น 2 สายพันธุ์ที่เจริญและสามารถทนต่อความเป็นกรดที่พีเอช 2 และ 3ได้ดี รวมถึงสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงๆ คือ 1.0% ได้ดีกว่า *Weissella paramesenteroides* SM081 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด จากการทดสอบทั้งสองสภาวะข้างต้น จากนั้นเมื่อทำการยืนยันผลการทดลองโดยการทดสอบ ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารพบว่า *Lactobacillus plantarum* SM154 มีความสามารถในการรอดชีวิตได้ดีที่สุดทั้งในสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลองโดยในสภาวะกระเพาะจำลองที่พีเอช7 จะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากที่สุด รองลงมาคือ ที่พีเอช 2 เติมนมพร่องมันเนย และที่พีเอช 2 ที่ไม่ได้เติมนมพร่องมันเนย จำนวนเซลล์จะทนต่อสภาวะข้างต้นได้น้อยที่สุด

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลกติก โปรไบโอติก พีเอช เกลือน้ำดีระบบทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect of pH bile salts and gastrointestinaltract model on isolated lactic acid bacteria for a source of probiotic in chicken feed
Student name	Wareerin yamsaeng Student ID 55080119
	Ekachai manphayhac Student ID 55080140
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่คอยให้คำปรึกษาและคอยให้คำแนะนำในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้จนงานสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน อีกทั้งต้องขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ที่คอยให้คำปรึกษาในเรื่องของการปฏิบัติงานของปัญหาพิเศษ รวมไปถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลืออนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมีต่างๆ รวมทั้งให้ความสะดวกสบายในการปฏิบัติงานตลอดมาจนสำเร็จ

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับกำลังใจและสนับสนุนด้านกำลังทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ซึ่งผู้จัดทำหวังว่าปัญหาพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ศึกษาต่อไปในอนาคตไม่มากก็น้อย

วรีริน แย้มแสง

เอกชัย แม้นพยัคฆ์

4 พฤษภาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1การศึกษาความเป็นโปรไบโอติกในไก่	3
2.2ระบบทางเดินอาหารของไก่	3
2.3 จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารไก่	7
2.4 การศึกษาความเป็นโปรไบโอติกในมนุษย์	9
2.5 แบคทีเรียกรดแลกติก	9
2.6 โปรไบโอติก	16
2.7 การใช้โปรไบโอติกในสัตว์	18
2.8 งานวิจัยที่กี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	28
3.2 อุปกรณ์	28
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1ผลของพีเอชที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก	32
4.2 ผลของเกลือน้ำดีที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก	36
4.3ผลของกระเพาะและลำไส้จำลองที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	49
ภาคผนวก ก ภาพความขุ่นจากการทดลองและลักษณะสัญฐานของเชื้อแบคทีเรียแลกติก	50
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	61
ประวัติผู้เขียน	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่	6
2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก	8
2.3 การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในสกุล *Lactobacillus*	11
2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียกรดแลกติก	15
4.1 แสดงผลการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแลกที่พีเอช 2 และ3 ที่บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °c	34
4.2 แสดงผลการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่เกลือน้ำดี ความเข้มข้น 0%, 0.3%, 0.6% และ 1.0% ตามลำดับที่บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °c	36
4.3 แสดงผลการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก.ในสารละลาย ระบบทางเดินอาหารจำลองที่ พีเอช 2, พีเอช2 ใส่นม และ พีเอช7 ที่บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °c	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ระบบทางเดินอาหารของไก่	6
4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแลกติก ในอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°c เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	32
4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแลกติก ในอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°c เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	32
4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อแลกติก ในอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°c เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	33
4.4 แสดงความสัมพันธ์ของการทนกรดของเชื้อแบคทีเรียแลกติก กับเวลา (ชั่วโมง) ที่พีเอช 2 (ก) และพีเอช 3 (ข)	35
4.5 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก กับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ที่ 0% (ก.),0.3% (ข),0.6 (ค),1.0% (ง)	37
4.6 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติก กับเวลา ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1.ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ โดยเฉพาะไก่นั้น มีการใช้สารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมี ในการป้องกันเชื้อก่อโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหารก็มีการใช้สารปฏิชีวนะในการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่สารเหล่านี้มีผลทำให้เชื้อโรคต่างๆดื้อต่อยา และยังสามารถตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคเมื่อได้รับปริมาณมาก และติดต่อกันเป็นเวลานาน ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีความพยายามที่จะหาทางแก้ไขปัญหาเชื้อก่อโรค และหาสารกันเสียธรรมชาติมาทดแทน ซึ่งมีความปลอดภัย มากกว่าสารกันเสียที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมีการใช้สารต้านทานจุลินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ก็ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาวิจัยโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเป็นแบคที่เรียที่สามารถพบได้ในอาหารประเภทหมักดอง ผลิตภัณฑ์นม ในระบบทางเดินหายใจระบบทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ต่างๆ ได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากผลิตสารทีสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ และมีความปลอดภัยเป็นที่ยอมรับและแบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะมีคุณสมบัติดังกล่าวแล้ว ในบางสายพันธุ์สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (probiotic) ผสมในอาหารสัตว์โดยมีความสำคัญทางโภชนาการ(ธารารัตน์,2542)คือ

1. กรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตออกมาจะมีผลทำให้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค
2. ทำให้การทำงานของระบบขับถ่ายดีลดการสะสมของเสียเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้โดยเฉพาะมะเร็งในลำไส้ใหญ่
3. ลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด
4. กระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเตสสำหรับย่อยน้ำตาลแลคโตสลดการเกิดท้องอืด และช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมดีขึ้น
5. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจากคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลกติก

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้เกิดความสนใจศึกษาความสามารถในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ที่เรียกว่าแบคเทอริโอซิน โดยได้ทำการศึกษาผลของ pH และ Bile salts รวมถึงผลจากสภาวะในกระเพาะอาหารจำลอง และลำไส้จำลอง เพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพ ในการผลิตสารเสริมชีวภาพจากธรรมชาติ หรือ โปรไบโอติก ทดแทนสารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *Weissella paramesenteroides* SM081 และ *Lactobacillus plantarum* SM154

1.2.2 เพื่อทำการศึกษาวิธีการตรวจสอบ ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ดีที่สุดสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติกได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ทราบถึงวิธีการศึกษาในขั้นตอนการทดสอบต่างๆในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่จะใช้สำหรับเป็นโปรไบโอติก

1.3.2 ได้เชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด ในการใช้เป็นอาหารเสริมโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร

1.3.3 สามารถฝึกกระบวนการคิดวิเคราะห์ การวางแผนการทำงาน และการลงมือปฏิบัติการทำงานเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ต้องการรวมถึงการทำงานร่วมกับผู้อื่นได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในไก่

ชื่อวิทยาศาสตร์ของไกคือ *Gallus domesticus* มีชื่อสามัญวา Fowl เปนสัตวปกที่มีขนาดลำตัวปานกลางคอนไปทางขนาดเล็ก ปกติมีนิ้วเทา 4 นิ้ว มีปาก (beak) ที่ยื่นยาวออกมา ไมมีฟน ปอดติดอยูกับซี่โครงและมีถุงลมชวยในการหายใจ ไมมีกระเพาะปสสาวะอุณหภูมิรางกายสูงกวาสัตวเลี้ยงประเภทอื่น ซึ่งในไก (fowl) มีอุณหภูมิรางกายประมาณ 40.6 °c ทั้งนี้ขึ้นอยูกับเวลาที่ทำการวัดอุณหภูมิเฉลี่ยตอนเที่ยงวันประมาณ 41.6 °c (ปฐม เลาหะ-เกษตร, 2540) ซึ่งสัตวปกจำพวกไกจะมีอยูดวยกันหลายชนิดและชนิดที่นำมาเลี้ยงกันเปนไกเพื่อการบริโภคในปจจุบันนั้นสามารถจำแนกตามอนุกรมวิธานไดดังนี้

Kingdom: Animalia
Phylum: Chordata
Class: Aves
Order: Galliformes
Family: Phasianidae
Genus: Gallus
Species: domesticus

2.2 ระบบทางเดินอาหารของไก่

ระบบการย่อยอาหารของไก่ประกอบด้วย

2.2.1 ปาก (mouth) ไก่จะมีลักษณะของปากที่แตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่นๆ คือ ไก่จะไม่มีริมฝีปาก ไม่มีฟันและแก้ม แต่จะมีปากยื่นยาวออกมาเป็นจะงอยซึ่งใช้ทำหน้าที่จิกและฉีกอาหารเข้าปาก ลิ้นของไก่มีลักษณะแข็งรูปร่างคล้ายหัวลูกศร ทำหน้าที่ในการบังคับ หรือดันให้อาหารไหลลงสู่หลอดอาหาร ภายในปากของไก่ จะมีต่อมน้ำลายอยู่บริเวณด้านข้างทั้งสองข้างทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนๆ ทำให้อาหารเปียกชื้นและอ่อนนุ่ม ประกอบไปด้วยเอนไซม์ Ptyalin (Amylase) ซึ่งใช้ในการย่อยแป้งและเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล แต่อย่างไรก็ตามการย่อยในปากเกิดขึ้น เพียงเล็กน้อยเนื่องจากอาหารจะอยู่ในปากเพียงระยะสั้น อาหารส่วนใหญ่จะถูกย่อยในอวัยวะส่วน อื่นๆ (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.2 หลอดอาหาร (esophagus or gullet) เป็นท่อกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการลำเลียงอาหารจากปากไปยังกระเพาะ ตอนปลายของหลอดอาหารจะขยายออกเป็นกระเพาะพัก (Crop) ซึ่งมีในสัตว์ปีกทุกชนิด หลอดอาหารมีลักษณะพิเศษ คือ สามารถขยายตัวได้มาก (อาวุธตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.3 กระเพาะพัก (crop) หลังจากที่ผ่านจากปาก อาหารจะเคลื่อนลงสู่หลอดอาหาร และจะเข้าสู่กระเพาะพักซึ่งเป็นหลอดอาหารส่วนที่ขยายใหญ่ขึ้นทำหน้าที่เป็นที่พักอาหารไว้ชั่วคราวเพื่อให้อาหารนิ่มลง โดยอาหารจะถูกพักไว้เป็นเวลานานเท่าไรนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร ปริมาณอาหารที่ไก่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกระเพาะบด ในกระเพาะพักนั้นจะไม่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์ใด ๆ ออกมาแต่มีเอนไซม์ ptyalin จากปากทำหน้าที่ในการย่อยแป้งต่อไป (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.4 กระเพาะแท้ (true stomach or proventiculus) เป็นอวัยวะที่มีลักษณะเป็นกระเปาะอยู่ทางด้านหลังของกระเพาะพัก และอยู่ในตำแหน่งก่อนกระเพาะบด เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glandularstomach เพราะเป็นส่วนที่เต็มไปด้วยต่อมน้ำย่อย กระเพาะส่วนนี้จะมีการสร้างน้ำย่อย (gastric juice) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เพปซิน (pepsin) และกรดเกลือ (hydrochloric acid) โดยเอนไซม์เพปซินทำหน้าที่ย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง และกรดเกลือทำหน้าที่ปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร โดยเปลี่ยนอาหารในสภาพที่เป็นด่างให้เป็นกรดและช่วยในการย่อยโปรตีน เนื่องจากกระเพาะส่วนนี้มีขนาดเล็กและสั้นทำให้อาหารผ่านไปสู่กระเพาะบดอย่างรวดเร็ว การย่อยจึงเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยแต่การย่อยจะมีต่อเนื่องมากขึ้นไปขณะที่อาหารผ่านเข้าไปอยู่ในกระเพาะบด (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.5 กระเพาะบด (กึ๋น) (gizzard or venticulus) เป็นอวัยวะที่มีผนังหนาและมีกล้ามเนื้อที่แข็งแรง จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า muscular stomach มีรูปร่างคล้ายก้อนกล้ามเนื้อสีแดงค่อนข้างกลมแบน เชื่อมต่อระหว่างกระเพาะบดกับลำไส้อ่อน (duodenum) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อที่มีพลังมาก 2 คู่ ผิวภายในประกอบด้วยเยื่อบุหนา ซึ่งจะมีการสึกหรอหรือเปลี่ยนใหม่อยู่เสมอ กระเพาะบดนี้ ทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารแทนฟัน ทำให้อาหารมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับอาหาร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย ภายในกระเพาะบดจะพบว่ามีก้อนกรวดและหินก้อนเล็ก ๆ อยู่เกิดจากการจิกกินของไก่เองหรือจากการเสริมลงไปในอาหารของไก่ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยบดย่อยอาหารเนื่องจากกระเพาะส่วนนี้ไม่มีการผลิตเอนไซม์ออกมา ในขณะที่กระเพาะบดมีอาหารอยู่ กล้ามเนื้อจะทำงานอยู่ตลอดเวลาจนกว่ากระเพาะจะว่าง เมื่อมีอาหารเข้ามาใหม่จะมีการเริ่มทำงานใหม่ อาหารที่ถูกบดละเอียดแล้วจะถูกผสมคลุกเคล้ากับน้ำย่อยที่ได้จากกระเพาะแท้ อาหารที่ละเอียดแล้วจะผ่านกระเพาะบดไปสู่ลำไส้อ่อนภายใน 2-3 นาที แต่ถ้าอาหารที่ไก่กินเป็นอาหารที่มีขนาดใหญ่ หยาบ อาจอยู่ในกระเพาะบดนานถึง 4-5 ชั่วโมงก็ได้ (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.6 ลำไส้เล็ก (small intestine) เป็นท่อทางเดินอาหารที่ต่อจากกระเพาะบดไปสู่ลำไส้ใหญ่ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ส่วนกลาง (jejubum) และส่วนท้าย(ilium) ลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะโค้งเป็นลูป (loop) เรียกว่า duodenum loop เป็นที่ยึดของตับอ่อน (pancreas) ซึ่งตับอ่อนจะทำหน้าที่ในการผลิตน้ำย่อย (pancreatic juice) เข้าสู่ลำไส้เล็ก ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase), ทริปซิน (trypsin) และไลเปส (lipase) น้ำย่อยจากตับอ่อนมีลักษณะค่อนข้างเป็นด่างจึงช่วยให้สภาพในลำไส้เป็นกลาง ช่วยให้การย่อยอาหารเกิดได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีน้ำดีที่ผลิตจากตับ และเก็บไว้ในถุงน้ำดีซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวเหลืองมีความเป็นด่างจะผ่านเข้าไปสู่ส่วนล่างของลำไส้ทางท่อน้ำดี น้ำดีมีหน้าที่ช่วยปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหารให้เป็นกลางและทำให้ไขมันกระจายตัวได้ดีโดยน้ำดีจะมีส่วนประกอบ 3 ส่วนคือ

2.2.6.1เกลือน้ำดี (Bile Salt) มีหน้าที่ตีให้ไขมัน (Fat) แตกตัวเป็นหยดเล็กๆ ไขมันที่ถูกตี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้แตกตัวเป็นหยดเล็กๆ เรียกว่า อีมัลชั่น (Emulsion) จากนั้นจึงถูก Lipase ย่อยต่อให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล

2.2.6.2 รงควัตถุน้ำดี (Bile Pigment) เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบิน โดยตับ เป็นแหล่งทำลายและกำจัด Hemoglobin ออกจากเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่หมดอายุ โดยเก็บรวมเข้าไว้เป็นรงควัตถุในน้ำดี (Bile Pigment) คือ บิริรูบิน (Bilirubin) จึงทำให้น้ำดีมีสีเหลือหรือเขียวอ่อน และจะถูกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาล โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่เกิดเป็นใสในอุจจาระ

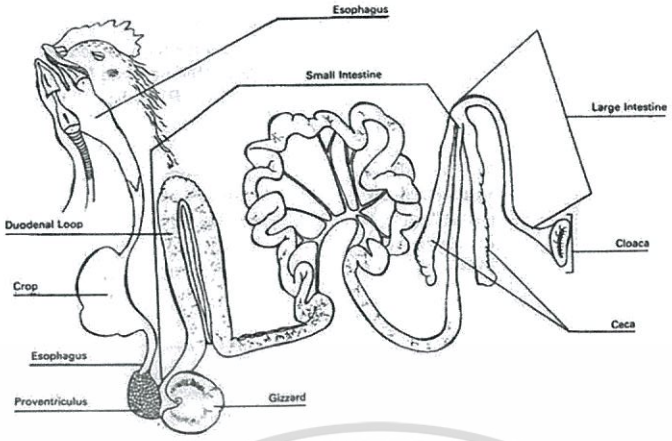
2.2.6.3 โคเรสเตอรอล (Cholesterol) ถ้ามีมากๆ จะทำให้เกิดนิ่วในถุงน้ำดี เกิดการอุดตันที่ท่อน้ำดี เกิดโรคดีซ่าน (Janudice) มีผลทำให้การย่อยอาหารประเภทไขมันบกพร่อง กระบวนการย่อยจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์ในส่วนของลำไส้เล็ก ซึ่งในไก่ที่โตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 150 เซนติเมตร (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.7 ไส้ติ่ง (ceca) เป็นลำไส้ตัน 2 อัน มีลักษณะคล้ายถุงเล็ก ๆ ตอนปลายขยายใหญ่กว่าตอนโคน มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร เชื่อมต่อกับท่อทางเดินอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กกับลำไส้ใหญ่ ภายในไส้ติ่งเต็มด้วยอาหารจากลำไส้เล็กและมีอาหารเข้าออกอยู่ตลอดเวลา ไส้ติ่งไม่มีหน้าที่สำคัญในการย่อยอาหารโดยเฉพาะในไก่ที่กินอาหารผสมที่ย่อยง่าย แต่ในไก่ที่กินอาหารที่มีเยื่อใยสูงการย่อยอาหารอาจเกิดขึ้นได้บ้างโดยอาศัยจุลินทรีย์ในไส้ติ่งเป็นตัวช่วย นอกจากนั้นไส้ติ่งอาจช่วยดูดซึมน้ำจากอาหารในไส้ติ่งได้บ้างเล็กน้อย (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.8 ลำไส้ใหญ่ (large intestine or rectum or colon) อยู่ต่อจากลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วม ในไก่ลำไส้ใหญ่มีขนาดใหญ่กว่าลำไส้เล็กถึง 2 เท่า แต่มีความยาวสั้นมาก คือ มีความยาวเพียง 10 เซนติเมตรเท่านั้น กระบวนการย่อยอาหารในลำไส้เล็กอาจต่อเนื่องถึงลำไส้ใหญ่กากอาหารหรืออาหารที่ผ่านการย่อยแล้วและอาหารบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยหรือย่อยไม่ได้จะเคลื่อนตัวมาอยู่ในลำไส้ส่วนนี้เพื่อการขับถ่ายออก นอกจากนี้จะมีการดูดซึมน้ำออกจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกายทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้ง (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

2.2.9 ทวารร่วม (cloaca) เป็นอวัยวะส่วนที่อยู่ปลายสุดของระบบการย่อยอาหารของไก่เป็นแหล่งรวมของสิ่งต่างๆ ก่อนจะออกนอกตัวไก่ผ่านทางทวารหนัก (vent) ของไก่รวมทั้ง อุจจาระ ปัสสาวะและไข่ในแม่ไก่ ถ้าเปิดทวารร่วมจะเห็นช่องอุจจาระของลำไส้ใหญ่อยู่ทางขวาและช่องไข่ออกอยู่ทางซ้ายของตัวไก่ (อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่2.1 ระบบทางเดินอาหารของไก่

ที่มา : Moreng และ Avens (1985)

เนื่องจากทางเดินอาหารของไก่มีหลายส่วนทำให้มีค่าพีเอชแตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 2.1 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่

Position	pH
Crop	4.00-6.30
Proventiculus	3.17-4.80
Gizzard	2.5-4.74
Duodenum	5.70-6.00
Jejunum	5.80-5.90
Ileum	6.30-6.40
Rectum or colon	6.30-6.40
Ceca	5.70-8.40
Cloaca	5.40-8.40

ที่มา: Sturkie (1976 อ้างโดย รุจา มาลัยพวง, 2544)

จากตารางที่ 2.1 พบว่าพีเอชในทางเดินอาหารของไก่แต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน โดยอยู่ในช่วง 2.5-8.4 อย่างไรก็ตามพีเอชของน้ำย่อยในทางเดินอาหารไก่ (กระเพาะและกึ๋น) สามารถลดต่ำลงถึง 0.5-2.0 ได้ (รุจา มาลัยพวง, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารไก่

ทางเดินอาหารของไก่ ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด และมีการดำรงชีพอย่างเป็นระบบ ลูกไก่ที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ นั้นทางเดินอาหารยังปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ในช่วงอายุ 1 สัปดาห์แรกเมื่อลูกไก่ได้กินอาหารหรือวัสดุรองพื้น ก็จะได้รับจุลินทรีย์เข้าไปทำให้เกิดการเจริญ และพัฒนาของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ดำรงชีพโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic flora) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม coliforms และ *Enterococcus* หลังจากนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* จะมีการเจริญมาแทนที่และกลายเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่อาศัยในทางเดินอาหาร นอกจากนี้พบว่าทางเดินอาหารแต่ละส่วนของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ในส่วนกระเพาะพักพบจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* เป็นส่วนใหญ่ซึ่งเกาะอยู่บนเยื่อบุของกระเพาะพัก ส่วนกระเพาะแท้ และกระเพาะบดตรวจพบจุลินทรีย์ได้น้อยชนิด อาจเป็นผลมาจากภาวะความเป็นกรดค่อนข้างสูง (pH 1-2) ในลำไส้เล็กสามารถตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* แบคทีเรียแลกติกและจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterococcus* โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* จะมีปริมาณมากที่สุดในลำไส้เล็กส่วนปลายโดยเฉลี่ย 1012-1015 CFU/g ไส้ตันเป็นส่วนของทางเดินอาหารที่มีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากซึ่งตรวจพบได้มากกว่า 200 ชนิด ในจำนวนนี้ตรวจพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม และไม่สร้าง-สปอร์ 30% และพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งไม่สร้างสปอร์ 20% ในไส้ตันไก่แรกเกิดถึงอายุ 3 วันจุลินทรีย์ปกติที่พบได้มากคือกลุ่ม Enterobacteriaceae, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* หลังจากนั้น Enterobacteriaceae และ *Enterococcus* จะลดจำนวนลงและมีจำนวนคงที่หลังจากไก่อายุได้ 15 วัน ส่วนจุลินทรีย์ *Bacteroides* spp. และ *Eubacterium* spp. จะตรวจพบในไก่ตั้งแต่อายุ 2สัปดาห์ขึ้นไป (ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ, 2547) จากการศึกษาถึงจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีกพบความแตกต่างของชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

Organ	Microorganism	Population level (CFU/g)
Crop	Lactobacilli	10^9
	Streptococcus sp.	10^4
	E. coli	10^2
Small bowel	Lactobacilli	10^8
	Streptococcus sp.	10^4
	E. coli	10^2
Large bowel	Lactobacilli	10^9
	Streptococcus sp.	10^7
	E. coli	10^5
	Yeasts	10^2
	Obligate anaeroes*	10^{10}

ที่มา: Tannock (1992 อ้างโดย รุจา มาลัยพวง, 2544)

Jin และคณะ (1996) ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ในทางเดินอาหารของไก่ซึ่งสามารถแยก *Latobacillus* ได้ 46 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. acidophilus, L. brevis, L. fermentum, L. crispatus, L. delbrueckii* และ *Leu. lactis* ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ส่วน jejunum, ileum และ caecum โดยพบว่า *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์, *L. brevis* 7 สายพันธุ์, *L. fermentum* 2 สายพันธุ์ และ *L. crispatus* 1 สายพันธุ์ มีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผนังทางเดินอาหารได้ในระดับปานกลางถึงดีมาก ซึ่ง *L. acidophilus* I26 เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ที่มีความสามารถในการเกาะติดสูงที่สุด และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารส่วนที่ต่างกันจะมีความสามารถในการเกาะติดเซลล์เยื่อบุผนังทางเดินอาหารที่ต่างกันด้วย โดย *Lactobacillus* ที่แยกจากลำไส้เล็กส่วน ileum จะมีความสามารถในการเกาะติดดีที่สุด รองลงมาคือไอโซเลทที่แยกได้จาก caecum และจากการศึกษาของ Anadón และคณะ (2006) ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Enterococcus* เป็นกลุ่มที่มีปริมาณมากที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของสัตว์ คือมีประมาณ 10^7-10^8และ 10^5-10^6 CFU/g ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในมนุษย์

ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่อาศัยในร่างกาย มนุษย์ขยายวงกว้างมากขึ้น จนทำให้ทราบว่าสิ่งใดเป็นคุณและ เป็นโทษต่อร่างกาย สิ่งมีชีวิตที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายเรา มีมากมายหลายชนิด รวมไปถึงสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่เราเรียกว่า โปรไบโอติก โดยจะต้องเป็นจุลชีพที่มีในร่างกาย มนุษย์อยู่แล้ว และต้องยังคงสภาพที่มีชีวิต ซึ่งทนต่อสภาพกรด และอยู่ในน้ำดีได้ โดยสามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ และให้ประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ โดยไม่ก่อให้เกิดโทษต่อ ร่างกาย ซึ่งบทบาทของ โปรไบโอติก ในมนุษย์จะผลิตสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์เนื่องจาก

1. กรดแลกติก (lactic acid) ที่จุลินทรีย์สร้างจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (pathogen) เช่น *Clostridium perfringens, Salmonella* เป็นต้น

2. ช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสฟอลิพิด (phospolipid) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในเลือด โดย *L. acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ กลุ่มบิฟิโดแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล (choloesterol) และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล ผ่านผนังลำไส้

3. ช่วยในการทำงานของลำไส้ ลดอาการท้องผูกได้ เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ บิฟิโดแบคทีเรีย (bifidobacteria) ผลิตขึ้น จะกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ และช่วยเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้สามารถขับถ่ายได้สะดวกมากขึ้น

4 .ช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในระบบย่อยอาหาร

5. สามารถผลิตวิตามินต่างๆ เช่น Vitamin B1, Vitamin B2, vitamin B6, Vitamin B12, biotin (vitamin H) nicotinic acid และ folic acid ได้ (อุทัย, 2548)

2.5 แบคทีเรียกรดแลกติก

2.5.1ความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลกติก

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียแลกติก (*Lactic Acid Bacteria* : LAB) จัดเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Lactobacillaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างมีทั้ง กลม ท่อนสั้นและยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) โดยทั่วไปพบสามารถสร้างผลิตภัณฑ์จากการหมักคาร์โบไฮเดรตได้เป็น กรดแลคติก กรดอะซิติก ไดอะซิติล (diacetyl) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นที่เฉพาะตัว กรดแลกติกยังมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคและถนอมอาหารโดยการไปทำให้สภาวะความเป็นกรด – ด่างไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านั้น และเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกบางชนิดยังสามารถผลิตสารต้านแบคทีเรีย(antibacterial agent) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อน เป็นสาเหตุของการเกิดโรคและสาเหตุของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าวคือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ประเภทของแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลคติกถูกจัดจำแนกเป็น 12 สกุล ดังนี้

2.5.2.1 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรีและมีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C โดยทั่วไปจะต่ำกว่า50 mol % พบได้ทั่วไปในแหล่งที่มีคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่เชื้อต้องการเช่น น้ำนม รวมถึงในแหล่งธรรมชาติต่างๆเช่น ในเยื่อเมือกของมนุษย์ สัตว์ พืช แหล่งน้ำทิ้ง และในผลิตภัณฑ์อาหารหลักที่กำลังจะเน่าเสีย

เนื่องจาก *Lactobacillus* เป็นสกุลที่ใหญ่มีสมาชิกมากมายจึงได้มีการจัดกลุ่มของ *Lactobacillus* ออกเป็น 3 กลุ่มโดยอาศัยหลักเกณฑ์ทางชีวเคมีสรีระวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์มาใช้ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังต่อไปนี้

กลุ่ม A Obligately homofermentative lactobacilli

เชื้อในกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลกติกโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof- parnas (EMP) ได้มากกว่า 85 % เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้มีเอนไซม์fructose 1,6 bisphosphate-aldolase แต่มีเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคเนสและน้ำตาลเพนโทสได้

กลุ่ม B facultatively homofermentative lactobacilli

เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี EMP ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแล็กติก และสามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง fructose 1,6 bisphosphatealdolase และ phospho-ketolase แต่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสเอนไซม์ในวิถี phosphogluconate จะถูกกดไว้

กลุ่ม C Obligately heterofermentative lactobacilli

เชื้อในกลุ่มนี้จะใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถีPhosphogluconate ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแลคเตท เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ในปริมาณเท่าๆกันนอกจากนี้เชื้อก็ยังสามารถใช้น้ำตาลเพนโทสผ่านวิถีนี้ได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.3 การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในสกุล *Lactobacillus*

สมบัติของ *Lactobacillus*	กลุ่ม *A*	กลุ่ม *B*	กลุ่ม *C*
หมักเพนโทส	-	+	+
สร้าง CO2 จากกลูโคส	-	-	+
สร้าง CO2 จากกลูโคเนท	-	+	+
สร้าง FDP adolase	+	+	-
สร้าง phosphoketolase	-	+	+
ตัวอย่างของกลุ่ม	*Lb. cidophilus*	*Lb. casei*	*Lb.brevis*
	Lb. delbruckii	*Lb.curvartus*	*Lb.buchneri*
	Lb. heviticus	*Lb. plantarum*	*Lb.fermentum*
	Lb. salivarius	*Lb. sake*	*Lb. reuteri*

หมายเหตุ + ให้ผลการทดลองเป็นบวก

\- ให้ผลการทดลองเป็นลบ

ที่มา : Axelsson (1998)

2.5.2.2. *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปร่างไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 1 ไมครอน จัดเรียงตัว เป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคสมักใช้ เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 °c แต่ไม่เจริญที่ 45 °c ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus lactis ssp. Lactis, Lc.lactis ssp. Cremoris, Lc. Lactis ssp.hordniae, Lc. Plantarum, Lc. Raffinolactis* และ *Lc. Piscium* มี *mol%G+C* อยู่ระหว่าง 34-43%

2.5.2.3. *Streptococcus*

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เท่านั้น เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส (homofermentative) ต้องการอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนในการเจริญ พบว่ามีอยู่หลายสปีชีส์ที่เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางสปีชีส์เป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20-42 °c ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มี mol%G+C อยู่ระหว่าง 34-46%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.4 *Enterococcus*

เซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ต้องการอาหารในการเจริญเติบโตที่ซับซ้อน ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส มี mol% G+C อยู่ระหว่าง 37-40% พบว่ามีบางชนิดที่ก่อโรคได้ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Enterococcus faecalis, Ent. avium,Ent.gallinarum, Ent. faecium*และ *Ent. cecorum*

2.5.2.5 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ยกเว้นบางสกุล ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Vogococcus fluvialis* เดิมจัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* กลุ่ม *N* แยกได้จากอุจจาระของไก่ และ *V.salmoninalum* แยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

2.5.2.6. *Pediococcus*

เซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน มีการแบ่งตัวในลักษณะสองทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยการแบ่งครั้งที่สองจะตั้งฉากกับการแบ่งครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะที่ไม่มีอากาศผลิต กรดแลคติกชนิด *DL* และ *L*(+) จากการหมักกลูโคสบางชนิดทำให้เบียร์และไวน์เสื่อมสภาพ ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici, P.dextrinicus, P. inopinatus, P.parvurus, P. pentosaceus* และ *P. domonocus mol% G+C* อยู่ระหว่าง *34 - 44%*

2.5.2.7 *Tetradgenococcus*

เชื้อในสกุลนี้แยกมาจากสกุล *Pediococcus* (ก่อนหน้านี้คือ *P. halophilus*) โดยมีลักษณะพิเศษสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% และมีลำดับเบส 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่า สกุลเดิม

2.5.2.8 *Carnobacterium*

เซลล์รูปร่างเป็นแท่งตรงยาว มักพบอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 ไมครอนและยาว 1.1 – 3.0 ไมครอน mol% G+C อยู่ระหว่าง 31.6 – 37.2% สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกชนิด L(+) เอธานอล กรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารอะซิโตอิน(acetoin) หรือกรดฟอร์มิก ได้ในปริมาณต่าง ๆ กัน ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะผลิตกรดฟอร์มิกได้เพียงเล็กน้อย ประกอบด้วย 6 สปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.9. *Leuconostoc*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ อยู่เป็นคู่ หรือสายโซ่สั้นจนถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) เอธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมัก ดอง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentativeการเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อนประกอบด้วย 8 สปีชีส์ mol% G+C อยู่ระหว่าง 37-40%

2.5.2.10 *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวคล้ายกับ *Pediococcus* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงพีเอช ประมาณ 9 สองสปีชีส์คือ *A. viridans*และ *A. urinae* มีรายงานพบว่า *A. viridans* เป็นสาเหตุให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์

2.5.2.11 *Weissella*

มีรูปร่างทั้งแบบกลมและเป็นท่อนปนกัน และยังมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันกับ *Leuconostoc* ประกอบด้วย 7 สปีชีส์

2.5.2.12 *Oenococcus*

เชื้อในสกุลนี้มีอยู่เพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งแยกออกมาจาก *Leu.oenos* มีลักษณะเด่นคือคุณสมบัติการทนกรด และสามารถผลิตเอธานอลได้ในปริมาณสูง และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ที่แตกต่างจาก สปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน

2.5.3 สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตและมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น

ในกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกนั้น จะเป็นการลดปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยเกิดควบคู่ไปกับการลดลงของค่าพีเอชเนื่องจากการสะสมกรดอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยระดับและสัดส่วนของผลผลิตเหล่านี้จะสะสมในสภาพแวดล้อม และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของกระบวนการหมัก ตัวอย่างกรดอินทรีย์ที่เป็นผลิตผลของการหมักได้แก่ กรดแลกติก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก และนอกจากกรดอินทรีย์แล้วยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งชนิดอื่น ๆ อีกเช่นเอธานอล แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารแบคเทอริโอซิน เป็นต้น และพบว่าสารยับยั้งบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารได้

สารยับยั้งดังกล่าวข้างต้นเมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 2 กลุ่ม ดังนี้คือ (Axelsson, 1993)

2.5.3.1 สารยับยั้งกลุ่ม Non – peptide inhibitor สารยับยั้งในกลุ่มนี้ไม่มีสารประเภทโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.1.1 กรดอินทรีย์

กระบวนการหมักในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกนั้นจะได้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์นั้นเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ไปมีผลทำให้สภาวะความเป็นกรด – ด่าง ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยทำให้ค่าพีเอช ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และ เข้มข้นของกรด ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการยับยั้งของกรดแลกติก และกรดอะซิติก และจะมีผลต่อการยับยั้งในวงกว้าง รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ และรา ในภาวะที่พีเอชต่ำ กรดที่มีค่า pKa สูงจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่า pKa ต่ำ เช่น กรดอะซิติก (pKa = 4.74) ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม herterofermentative มีกรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติก (pKa = 3.85) 2-4 เท่าที่พีเอชในช่วง 4-4.6 (Lindgren และ Dobogrosz, 1990) ทำให้มีผลมากกว่ากรดแลคติก

การสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากกรดอ่อนส่วนที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มีผลทำให้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีพีเอชสูงกว่าภายนอก และเกิดการแตกตัวของกรดให้ไอออนลบและโปรตอน ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อเซลล์ เช่น oxidative phosphorylation และ substrate translocation

2.5.3.1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยการทำงานของฟลาโวโปรตีน(flavoprotein) ของเอนไซด์ ออกซิเดส (oxidase) NADH oxidase และ superperoxidedismutase ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่ สร้างเอนไซด์คะตะเลส (catalase) ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและ ออกซิเจน และมีระบบอื่นที่จะใช้กำจัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตามกลไกการสะสมไฮโดร-เจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตาม Frontaine และคณะ ได้กล่าวแย้ง ว่า ไม่มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์เพราะว่าถูกสลายไปโดยเอนไซด์ peroxidase, flavoprote และ pseudocatalase ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีฤทธิ์รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยออกซิไดซ์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหมู่ซัลฟิดริล(sulfhydryl) คือ โปรตีนในเซลล์และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์

นอกจากนี้ในปฏิกิริยาการ สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจนส่งผลให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนทำให้ แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.4เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียกรดแลกติก

เอนไซม์	ปฏิกิริยา
NADH:H_2O_2 oxidase	$NADH + H^+ + O_2 \longrightarrow NAD + H_2O_2$
Pyruvate oxidase	Pyruvate + phosphate + $O_2 \longrightarrow$ acetylphosphate + CO_2 + H_2O_2
α – Glycerophosphate oxidase	α – Glycerophosphate + $O_2 \longrightarrow$ dihydroxyacetonephosphate + H_2O_2
superoxide dismutase	$2O^-_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

ที่มา : Vuyst และ Vandamme (1994)

2.5.3.1.3 ไดอะซิติล (Diacetyl)

ไดอะซิติล (2,3-butanedione) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ ไพรูเวท ทั้ ง ในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ของสกุล *Lactobacillus, Leuconostoc,Pediococcus* และ *Streptococcus* (Jay, 1982) โดยจะสร้างเมื่อ เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิเตรทในวัฏจักรเครบ (Kreb's cycle) ซึ่งกระบวนการหมักจะได้ ไพรูเวทจำนวนมาก และไพรูเวทเหล่านี้จะถูกเมตาบอไลซ์เป็นไดอะซิติล

ไดอะซิติลจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดที่พีเอชต่ำกว่า 7.0 (Jay, 1982) แต่จะมีคุณสมบัติการยับยั้งก็ต่อเมื่อมีน้ำตาลกลูโคส อะซิติลและทวีน 80 ในอาหาร โดยไดอะซิติลมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย และพบว่าไดอะซิติลสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่จับกับอาร์จินีน (Arginine bindingprotein) ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถใช้อาร์จินีนได้

2.5.3.1.4 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative และยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative บางชนิดสามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากมาเลท และ ซิเตรทได้ (Fleming และคณะ, 1986; London,1990) โดยมาเลทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตทและคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์มาโลแลกติก ในขณะที่ซิเตรทเปลี่ยนเป็นอะซิเตทและออกซาโลอะซิเตทโดยเอนไซด์ซิเตทไลเอส จากนั้นออกซาโลอะซิเตทจะเกิดปฏิกิริยา decarboxilation เปลี่ยนเป็นไพรูเวทและคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ โดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนทำให้ค่าพีเอชทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ลดลง และยังพบว่ามีผลในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

2.5.3.1.5 รูเทอริน (Reuterin)

รูเทอริน 3-hydroxypopanol เป็นสารยับยั้งที่มีโมเลกุลต่ำ ผลิตโดย *Lactobacillus reuterin* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ เมื่ออยู่ในสภาวะ ที่ไม่มีออกซิเจน สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในวงกว้างโดยมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก รา ไวรัส และโปรโตซัว กลไกการยับยั้งเกิดจากรูเทอรินจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มซัลฟไฮดริล (sulfhydryl) โดยจับกับเอนไซม์บริเวณ substrate binding sub unitของ ribonucleotide reductase ทำให้มีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

2.5.3.2. สารยับยั้งกลุ่ม Peptide inhibitor เป็นกลุ่มที่มีสารประเภทโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่

2.5.3.2.1 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่มีองค์ประกอบเป็นสารประเภทโปรตีนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในสปีชีส์เดียวกันหรือใกล้เคียงกันโดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่ผลิต และนอกจากนี้ยังพบว่าแบคเทอริดอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น *Listeriamonocytogenes, Bacillus cereus, Clostidium botulinum* และ*Staphylococcus aureus* เป็นต้นในปัจจุบันแบคเทอริโอซินได้รับ ความสนใจและมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยนำมาใช้ในกระบวนถนอมและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ ทั้งอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ นอกจากนี้มีการใช้ป้องกันโรคเต้านมอักเสบในวัว และใช้จัดอนุกรมวิธาน

2.6 โปรไบโอติก

Parker (1974) ได้ให้คำนิยามของโปรไบโอติกไว้ว่า คือ สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ส่วน Fuller (1989) กล่าวว่า โปรไบโอติก คือจุลินทรีย์ที่เสริมในอาหารสัตว์แล้วมีผลทำให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร (intestinal balance) ของสัตว์ชนิดนั้นและช่วยทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นโทษให้ลดลง ทำให้สัตว์สุขภาพดีและทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) ซึ่งโปรไบโอติกอาจใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหลายชนิด (ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ, 2547) ดังนั้นจากความหมายหรือคำนิยามของโปรไบโอติกข้างต้นโปรไบโอติกที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

- ควรเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) และไม่สร้างสารพิษ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

- ควรเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) เนื่องจากสามารถทนทานต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

- สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เพื่อให้สามารถเดินทางผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะเป็นกรดสูงได้ (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

- ควรสามารถสร้างกรดได้ดี เพื่อช่วยปรับสภาวะในทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์กลุ่ม coliform เจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) นอกจากนี้ยังทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากยาอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์,2544)

- สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วและสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาน 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

- สามารถทนต่อน้ำดีได้ดี (Kontula *et al*., 1998)

- มีการรอดชีวิตสูงแม้เก็บไว้เป็นเวลานาน (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

- สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

- ควรจะสามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease,lactase, และ cellulase มีผลทำให้การย่อยและการใช้ประโยชน์ของยาอาหารต่าง ๆ ดีขึ้น (อุทัย คันโธ,2535)

- มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งจะช่วยในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993)

- เป็นตัวแย่งอาหารของแบคทีเรียก่อโรค (Fuller, 1993)

- สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

- ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

ในทางเดินอาหารของสัตว์โดยปกติจะมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ทั้งชนิดที่เป็นโทษและที่เป็นประโยชน์ (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) เรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ซึ่งหากในระบบทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะสมดุล จะทำให้สัตว์มีความสามารถในการต้านทานโรคโดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหารดีขึ้น (มณฑกานต์ ทองสม, 2547) แต่เมื่อสัตว์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น เกิดความเครียด หรือการได้รับยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน ๆ แล้วนั้นสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์เหล่านี้จะเสียไป มีผลให้จุลินทรีย์ที่เป็นโทษเพิ่มปริมาณขึ้นในขณะที่จุลินทรีย์เป็นประโยชน์มีปริมาณลดลง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) สัตว์จึงเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารทำให้เติบโตช้าและอ่อนแอ ดังนั้นในการป้องกันและรักษาโรคทำได้โดยการปรับระดับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในภาวะสมดุล และการใช้โปรไบโอติก ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถปรับสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยการสร้างกรดแลกติกทำให้เกิดสภาวะความเป็นกรดมากขึ้นในระบบทางเดินอาหารเป็นผลให้แบคทีเรียบางจำพวกที่เป็นโทษลดจำนวนลง จึงสามารถลดการสูญเสียเนื่องจากสามารถควบคุมปริมาณของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2535) นอกจากนี้โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Lactobacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ amylase ได้ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148845

โปรไบโอติกประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิดซึ่งช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารและป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญ โดยเมื่อสัตว์ได้รับโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายแล้วโปรไบโอติกจะผ่านกระเพาะอาหารไปเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหารและมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อบุผนังลำไส้โดยเฉพาะผนังลำไส้เล็กทุกส่วนโดยแทรกตัวอยู่ที่ร่องผนัง (villi) จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากทางเดินอาหาร (Karpinska *et al.*, 2001) และการที่มันแปลกปลอมนี่เองจึงสามารถดึงดูดให้แมคโครฟาร์จเดินทางมามาก จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้ดีขึ้น นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น แบคเทอริโอซิน (Mead, 2000) ซึ่งสามารถทำลายหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2535) สร้างสาร metabolite ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษหรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษแบคทีเรียจำพวก Bifidobacteria ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกสามารถป้องกันการสร้าง amine จากจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกสกุล (genus) *Bacillus* เช่น *B. cereus*หรือสกุล *Clostridium* สามารถสังเคราะห์วิตามินบีซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นได้ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539)

2.7 การใช้โปรไบโอติกในสัตว์

เป็นเวลากว่า 20 ปี แล้วที่ได้มีการนำโปรไบโอติกมาใช้ในอาหารสัตว์เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิต โดยปรับปรุงลักษณะที่ต้องการทางเศรษฐกิจ เช่น การเจริญเติบโต(growth) อัตราการใช้อาหาร (conversion rate) เนื่องจากโปรไบโอติกสามารถปรับปรุงสุขภาพของสัตว์โดยเฉพาะในสัตว์ที่ยังไม่โตเต็มวัยหรือยังเป็นสัตว์รุ่นๆ อยู่ ในปี 1993 สหภาพยุโรปได้มีการใช้โปรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้นซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ Council Directive 70/524/EEC on additive in animal nutrition (Becquet, 2003) และมักจะมีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่เสริมในการเลี้ยงสัตว์เนื่องจากมีคุณสมบัติค่อนข้างครบตามหลักเกณฑ์ของโปรไบโอติก (Nousiainen and Setala, 1998)

รูปแบบของโปรไบโอติกที่ใช้ในอาหารสัตว์แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ (Coeuret *et al*,2004) คือ

- เสริมอาหารในรูป feed additive โดยเสริมที่ปริมาณ 10^{10} CFU/g
- เสริมอาหารในรูป premixturesโดยเสริมที่ปริมาณ 10^{8} CFU/g
- ผสมในอาหารสัตว์ในรูปอาหารอัดเม็ดและอาหารผง โดยเสริมที่ปริมาณ 10^{6} CFU/g

โดยทั่วไปจะพบการเสริมโปรไบโอติกในรูปผงซึ่งโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สายพันธุ์หลัก ๆ กลุ่มของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เสริมในอาหารสัตว์ในปัจจุบันประกอบด้วย

- *Bacillus* เช่น *B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (Anadón *et al*, 2006)
- *Enterococcus* เช่น *E. faecium* (Anadón *et al*., 2006) *E. faecalis* (Simpson *et al*., 2004)
- *Lactobacillus* เช่น *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* (Anadón *et al*., 2006) *L. bulgaricus*, *L. lactis* (Simpson *et al*., 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- *Pediococcus* เช่น *P. acidilactici* (Anadón *et al.*, 2006) *P. pentosaceus* (Simpson *et al.*, 2004)

- *Streptococcus* เช่น *S. infantarius* (Anadón *et al.*, 2006) *S. cremoris* (Simpson*et al.*, 2004)

- *Bifidobacterium* เช่น *B. bifidum, B. longum, B. thermophilum* (Simpson *et al.*, 2004)

- *Propionibacterium* เช่น *P. freudenreichii* subsp., *P. frendenreichii PFF-6* (Simpson *et al.*, 2004)

- *Lactococcus* เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Simpson *et al.*, 2004)

- ยีสต์และรา เช่น *Aspergillus, Saccharomyces cerevisiae* และ *Kluyveromyces* (Anadón *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2004)

การนำโปรไบโอติกมาใช้ในไก่ จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดิน อาหารของไก่ เช่น *Salmonella, E. coli, S. aureus* เป็นต้น จากการศึกษาการติด เชื้อ Salmonella พบว่า เชื้อดังกล่าว มักจะอาศัยอยู่ในลำไส้ไก่ โดยไม่แสดงอาการ ลูกไก่ จะมีความไวที่สุดที่จะได้รับเชื้อ ซึ่งเชื้อจะเจริญได้ดีใน ทางเดินอาหารของลูกไก่ แล้วเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว พบมากในส่วนของไส้ติ่ง (Brownell; Sadler; & Fanelli. 1969: 804-816)

จากการศึกษาโดยการ นำของเหลวจากทางเดิน อาหารของไก่ที่โตเต็มวัยและมีสุขภาพสมบูรณ์เจือจางกับน้ำเกลือแล้วนำมากรอกให้ลูกไก่แรกเกิดทาง ปาก จากนั้น 24 ชั่วโมงจึงกรอกตามด้วยเชื้อ *Salmonella Infantis*พบว่าการให้ของเหลวจากทางเดิน อาหารของไก่ที่โตเต็มที่และมีสุขภาพดีนี้จะช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อ *S. Infantis*ในทางเดินอาหาร ของไก่ได้ (Nurmi and Rantala. 1973) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ การศึกษาของฟลูเลอร์และ บรูคเกอร์พบว่า เมื่อใช้ของเหลวที่แยกจากส่วนต่างๆ ของ ลำไส้ไก่หรือไก่งวงที่เติบโตเต็มที่และมีสุขภาพสมบูรณ์ มาเจือจางในน้ำเกลือ แล้วนำไปกรอกให้ลูกไก่ 26 และลูกไก่งวง หลังจากนั้น 3 วัน จึงกรอกเชื้อ *S. Typhimurium* พบว่า ของเหลวที่แยกจากส่วนต่างๆ ของลำไส้มีผลป้องกันการเจริญของเชื้อ *S. Tryhimurium* (Lioyd., Cumming and Kent. 1997) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของ *L. acidophilus* ในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคจะเกิดได้ดีที่กระเพาะพัก แต่ให้ผลไม่ดีนักในลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (Watkins and Miller. 1983)

ออดิซิโอและคณะ ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจาก การติดเชื้อ *Salmonella pullorum* หรือที่เรียกว่า โรคขี้ขาว โดยใช้ *Ent. faeciumJ96* ที่แยกได้จากไก่ สุขภาพดี และผ่านการทดสอบมาแล้วว่าสามารถผลิตแบคทีริโอซิน และกรดแลกติก มายับยั้ง *S. pullorum* จากผลการทดลองสำหรับการให้เพื่อป้องกัน จะให้ *Ent. faeciumJ96* โดยตรงทางปาก ลูกไก่อายุ 30 ชั่วโมง เมื่ออายุครบ 4 วัน จะให้เชื้อ *S. pullorum* M97 โดยตรงในกระเพาะพักของลูกไก่ ส่วนการทดสอบเพื่อรักษาโรค จะให้ *Salmonella* แก่ลูกไก่ตั้งแต่อายุ 30 ชั่วโมงก่อน แล้วตามด้วยการ ให้*Ent. faeciumJ96* ผลการวิจัยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การให้*Ent. faeciumJ96* เพื่อป้องกันโรคพบว่า ไก่มีอัตราการ รอดชีวิตร้อยละ 75 และสภาพของม้ามและตับก็ปกติด้วย ขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งให้เฉพาะ*Salmonella*ปรากฏอัตราการตายคิดเป็นร้อยละ 50 สำหรับการใช้เพื่อการรักษา จะพบว่าไก่ตายทั้งหมด

จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่า ลูกไก่แรกเกิดมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ *Salmonella* และการให้โปรไบโอติกจะมีส่วนช่วยให้อาการดีขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีการทดลองจำนวนมากที่ให้ผลในทำนอง เดียวกันนี้ ที่พบว่าการเสริมโปรไบโอติกจะส่งผล ควบคุมและยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ในลำไส้ ไก่ได้ (Corrier; et al. 1995: 916); (Nisbet; Corrier; & DeLoach. 1995); (Watkins; & Miller. 1983: 1772-1779); (ฐิติพงษ์ธนะรัชติกานนท์. 2539); (ปัญชลีประคองศิลป์. 2541); (Yeo; & Kim. 1997: 381-385); (Pascual; et al. 1999: 4981-4986); (ศิริรัตน์เร่งพิพัฒน์และ ฐิติพงศ์ธนะรัชติกานนท์. 2540:10-13)

การศึกษาผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยใช้เชื้อ *L. acidophilus*เพื่อป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดจาก *E. coli* ในลูกไก่ สำหรับการทดลองเพื่อป้องกันโรคทำการ ศึกษาโดยทำการ กรอกเชื้อ *L. acidophilus*ให้กับลูกไก่อายุประมาณ 2 วันก่อน หลังจากนั้นอีก 2 วัน จะให้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในไก่ ผล การทดลองพบว่า *L. acidophilus* ที่ให้ไก่ในช่วงแรกช่วยลดอัตราการตาย ของลูกไก่ได้ ส่วนในการทดลองเพื่อรักษาโรคที่เกิดจาก *E. coli* ทำโดยการกรอกเชื้อ *E. coli*ก่อน ประมาณ 10^8 -10^9เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้กับลูกไก่อายุประมาณ 2 วัน หลังจากนั้นอีก 2 วัน จึงกรอก *เชื้อ Lb. acidophilus*ประมาณ 10^8 -10^9เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า การให้เชื้อ *L.acidophilus* มีผลช่วยลดอัตราการตายของลูกไก่ได้ โดยการให้*L. acidophilus* ไม่ว่าจะให้ก่อน หรือหลังจากได้รับ *E. coli* มีผลทำให้ pH ในกระเพาะพัก ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรงลดลง (Watkins; 27 Miller; & Nell. 1982: 1298-1308)

นอกจากนี้ จากการศึกษาของจินและคณะ (Jin; et al. 1998: 197-209) ยังพบว่า เมื่อทดลองให้อาหารที่ผสมด้วย *Lactobacillus* แก่ไก่กระทง จะสามารถลด ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม โคลิฟอร์มในกระพุ้งลำไส้ส่วนต้นได้ และพบ *lactobacill* สูงกว่ากลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับเอ็นโดและคนอื่นๆ (Endo; et al. 1999: 1569-1575) ซึ่งมีการใช้เชื้อผสมของโปรไบโอติก กับเชื้อก่อโรค (*Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Clostridium, Saccharomyces* และ *Candida*) ให้แก่ไก่ตัวผู้พบว่า สามารถช่วยลดจำนวนของ Enterobacteriaceae ในกระพุ้งลำไส้ใหญ่ ได้อย่างมาก โดย *Bacillus, Streptococcus, Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* จะมีจำนวน เพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีสต์จะมีจำนวนลดลง

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าโปรไบโอติกช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ ในทางเดินอาหารของไก่ นอกจากประโยชน์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคแล้ว การเสริมโปร ไบโอติก จะทำให้ไก่มีสุขภาพแข็งแรงและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยพบว่าเมื่อ เสริม *L. acidophilus*จะช่วยให้ไก่มี น้ำหนักเพิ่มขึ้น (Murry; Hinton; & Morrison. 2004: 603-607); (Jin; et al. 1998: 197-209); (Tahia; Porubean; & Gukstrom. 1983: 32) เช่นเดียวกับการเสริมโปรไบโอติกจากเชื้อชนิดอื่น อาทิ โปรไบโอติกที่ใช้ทางการค้า (Primalac) (Angel; et al. 1999: 58, 98) *Lb. reuteri* (เพิ่มศักดิ์ศิริวรรณ; บัวเรียม มณีวรรณ; และ เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. 2551: 64-70) *Lb. acidophilus*และ *Enterococcus* (Atherton; & Robins. 1987: 167-196) *Lactobacillus spp.* (ฐิติพงษ์ธนะรัชติกานนท์. 2539) *Saccharomyces cerevisiae* ร่วมกับ *Ent. faecium* C-28 ซึ่งใน การใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า โปรไบโอติกผสมของเชื้อ *S. cerevisiae*ร่วมกับ *Ent. faecium* C-28จะช่วยให้เชื้อสร้าง กรดแลกติกมากขึ้น และเพิ่ม กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซิเมธิลเซลลูเลส (carboxylmethyl cellulase) ในการย่อยเซลลูโลสใน อาหารที่ค้างในไส้ติ่งได้อย่างมาก (Kumprecht; & Zobac. 1998: 63-70) นอกจากนี้ยัง พบว่าไก่จะมีประสิทธิภาพ ในการใช้อาหารดีขึ้น (Atherton; & Robins. 1987: 167-196)

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเสริมโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ พบว่าเมื่อ เสริมโปรไบโอติกและสารปฏิชีวนะต่างชนิดกัน ในไก่งวง จะให้ค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่แตกต่างกัน แต่ ส่วนใหญ่ไก่กลุ่มได้รับโปรไบโอติกและสารปฏิชีวนะเ สริมร่วมกันจะมีประสิทธิภาพการกินอาหารดีกว่า กลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว และจำนวน *Salmonella*ในกระเพาะพักและลำไส้ใหญ่จะ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (Javed; Siddique; & Hameed. 1994: 254-257) สำหรับในไก่กระทงที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงกว่ากลุ่มควบคุม 28 ในช่วง 3 สัปดาห์แรก โดยลดแอคติวิตีของเอนไซม์ยูรีเอสในลำไส้เล็ก ของไก่ได้ทำให้ลดการสะสมของ ปริมาณแอมโมเนีย ที่เป็นพิษต่อลำไส้ลง ส่งผลให้ไก่มีสุขภาพแข็งแรง และเจริญเติบโตดีกว่าไก่กลุ่ม ที่ ได้รับสารปฏิชีวนะ chloroxytetracyline (Yeo; & Kim. 1997: 381-385)

ฟรานซิส. (1978) ได้ศึกษาการใช้ *Lactobacillus* ร่วมกับ zinc bacitracin พบว่า การเสริมเชื้อ *Lactobacillus*มีผลทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหาร ของ ลูกไก่งวงเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ดีกว่ากลุ่มซึ่งไม่มีการให้เชื้อและ กลุ่มที่ให้ zinc bacitracin การเสริม เฉพาะ *Lactobacillus* หรือ zinc bacitracin เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง มีผลทำให้ลูกไก่งวงที่ทดลองมี น้ำหนักตัวสูงกว่า และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารดีกว่าไก่งวงที่ได้รับอาหารซึ่งเสริมทั้งเชื้อ *L. acidophilus*และ zinc bacitracin ร่วมกัน และยังตรวจพบว่าลูกไก่งวงที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อ *L. acidophilus*มีจำนวน แบคทีเรียโคลิฟอร์ม ในระบบทางเดินอาหารน้อยกว่า กลุ่มที่เสริม zinc bacitracin และการ*เสริม L. acidophilus* มีผลทำให้จำนวนของ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบใน ทางเดินอาหารของลูกไก่งวงสูงขึ้น แต่การเสริม zinc bacitracin ร่วมกับ *L. acidophilus* มีผลทำให้จำนวน *Lactobacillus*ที่ตรวจนับจากทางเดินอาหารของลูกไก่งวงลดลง สำหรับการศึกษาผลของ โปรไบโอติกต่อน้ำหนักตัวของไก่กระทงและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเสริมโปรไบโอติกลงในน้ำ ให้ไก่กิน พบว่าการเสริมโปรไบโอติกช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้อย่างมีนัยสำคัญ (Kabir;et al. 2004: 361-364)

โปรไบโอติกยังมีผลของต่อการลดปริมาณของคลอเรสเตอรอลในไข่ไก่ โดยเมื่อ*ใช้ L. acidophilus* เสริมในอาหารไก่ไข่จะลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในไข่แดงลงถึง ร้อยละ 18.8 และ ยังพบว่า โปรไบโอติกมีส่วนช่วยให้เมแทบอลิซึมของไขมันดีขึ้นด้วย (Endo; et al. 1999: 1569-1575); (Haddain; et al. 1996: 494-497) รวมทั้งเพิ่มระดับเอนไซม์อะไมเลส ในลำไส้เล็กได้แต่ไม่มีผลต่อ กิจกรรมของเอน ไซม์โปรทิโอไลติกและไลโปไลติก นอกจากนี้ยัง สามารถ ลดกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้ากลูโคโรนิเดสในทางเดินอาหารของไก่และใน มูลไก่ ซึ่งเอนไซม์เบต้ากลูโคโรนิเดส จะทำหน้าที่ เร่งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษและสารก่อมะเร็งต่างๆ (Jin; et al. 2000: 886-891) และยังพบว่าอาหาร ที่เสริมโปรไบโอติกจะทำให้ไก่มีการ ผลิตไข่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Haddadin; et al. 1996: 494-497); (Charles; & Duke. 1978: 1125); (Cerniglia; Goodling; & Herbert. 1983: 1399); (Ryu; Song; & Kim. 1999: 99); (Xu; et al.2006: 364-368)

2.8 งานวิจัยที่กี่ยวข้อง

2.8.1 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่

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

2.8.2. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อคัดเลือกและประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผักสดและอาหารหมัก โดยทดสอบความสามารถในการหมักและทดสอบสมบัติโปรไบโอติกในหลอดทดลอง ได้แก่ ทดสอบการเจริญ การทนน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค การทนเกลือน้ำดี ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมันและแป้ง การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ อีกทั้งทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัย ได้แก่ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 6 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการหมักที่ดี มีความปลอดภัยและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จึงเป็นตัวแทนที่ดีที่จะนำไปทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในกระบวนการหมักผักดอง

2.8.3 ผลของการเสริมโปรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลกติกต่อคุณภาพซากของไก่เนื้อ

ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกแบบผงแห้งเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะต่อคุณภาพซากของเนื้อไก่กระทง ที่อายุ 42 วันโดยใช้ไก่เนื้อคละเพศ อายุ 1 วัน จำนวน 200 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง และให้อาหารตามสูตรดังต่อไปนี้ T1) กลุ่มควบคุม, T2) อาหารพื้นฐานเสริม Oxytetracycline ในระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.05%,T3) อาหารพื้นฐานเสริม *Lactobacillus plantarum* ST1 แบบผงแห้งในระดับ 0.2% (เชื้อเดี่ยว), และ T4) อาหารพื้นฐานเสริมน้ำพืชหมักแบบผงแห้งในระดับ 1.0% (เชื้อผสม) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ ตามระดับของโปรตีน (Starter; โปรตีน 22% และ Grower; โปรตีน 21%) จากผลการทดลองพบว่า การเสริมโปรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่เป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมแบบผงแห้งและการเสริมสารปฏิชีวนะในอาหารไก่ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและคุณภาพซาก (P>0.05) ของไก่เนื้อ การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกแบบผงแห้งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ โดยมีผลต่อคุณภาพซากไม่แตกต่างกัน

2.8.4 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก่

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากลำไส้ไก่ นำมาทดสอบเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยการทดสอบทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และความทนต่อความเป็นกรด-ด่าง ความทนต่อ Ox-bile และ bile-salt ความทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จากการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด 41 ไอโซเลทพบว่า 37 ไอโซเลทมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium 292, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากนั้นนำทั้ง 37 ไอโซเลทมาศึกษาการทนต่อกรด-ด่าง, ox-bile, bile salt และ NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เพียง 6 ไอโซเลทจากทั้งหมด 37 ไอโซเลทคือ C120, C129, C132, C133, C136 และ C140 พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 2-10 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ได้ถึง 5% และสามารถทนต่อ ox-bile ที่ความเข้มข้น 3%, 6%, 9% และ bile-salt ที่ความเข้มข้น 0.3%, 0.6%, 0.9%

2.8.5 การคัดแยกและการจำแนกสารยับยั้งจุลินทรีย์ ในแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่โดยใช้ PCR Technique

ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์โดยเฉพาะไก่นั้น มีการใช้สารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมีในการป้องกันเชื้อก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหารก็มีการใช้สารปฏิชีวนะในการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่สารเหล่านี้มีผลทำให้เชื้อโรคต่าง ๆ ดื้อต่อยา และยังสามารถตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคเมื่อได้รับปริมาณมากและติดต่อกันเป็นเวลานาน ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหารจึงได้มีความพยายามที่จะหาทางแก้ไขปัญหาเชื้อก่อโรคและหาสารกันเสียธรรมชาติมาทดแทนซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าสารกันเสียที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมี การใช้สารต้านทานจุลินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ก็ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัย โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในอาหาร ประเภทหมักดอง ผลิตภัณฑ์นม ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ต่าง ๆ ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากผลิตสารที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ และมีความปลอดภัยเป็นที่ยอมรับ และแบคทีเรียกรดแลคติกนอกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีคุณสมบัติดังกล่าวแล้ว ในบางสายพันธุ์สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (probiotic) ผสมในอาหารสัตว์

2.8.6 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากมูลสัตว์เพื่อนามาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อนาเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เหมาะสม จะส่งผลให้โฮสต์มีสุขภาพดี โดยโปรไบโอติกที่ใช้อาจเป็นแบคทีเรียแบบสายพันธุ์เดียว หรืออาจเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ผสม ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นหนึ่งในกลุ่มโปรไบโอติกที่สำคัญ ในงาน วิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจาก ตัวอย่างอุจจาระจากสัตว์ ได้แก่ วัว หมู ไก่และเป็ด ในฟาร์ม ต่างๆ จำนวน 150 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท แบคทีเรียเหล่านี้ไปคัดเลือกโดยใช้คุณลักษณะของโปรไบโอติกที่ดี โดยทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่ามีเชื้อ 61 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีเชื้อ 43 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *Salmonella* sp. มีเชื้อ 59 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีเชื้อ 78 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *Shigella* sp. และมีเชื้อ 79 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella* sp. จากการทดสอบการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ที่แยกได้สามารถทนต่อน้าดี 1.0% และสามารถทนต่อ pH 3.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากการทดสอบความ ความมีขั้ว –ไม่มีขั้ว เพื่อบ่งชี้การเกา ะติดลาไส้พบว่า 12 ไอโซเลต สามารถเกาะติดลาไส้ได้ดีมาก จากนั้น คัดเลือก 6 ไอโซเลท คือ K16, P6, P8, P25, P30 และ P31 จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ดี มาทาการ จัดจำแนก โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต K16, P8 และ P30 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* ไอโซเลท P25 มีความคล้ายคลึงกับ *L. paraplantarum* และ ไอโซเลท P6 และ P31 มีความคล้ายคลึงกับ *L. plantarum* จากนั้นนาแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ซึ่งต่างสปีชีส์กันและมีความโดดเด่นในคุณสมบัติต่างๆ คือ *L. plantarum*P6, *L. paraplantarum* P25 และ *L. reuteri* P30 มาศึกษาการอยู่ร่วมกัน พบว่าสามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่ยับยั้งกันเอง และศึกษาความสามารถในการเกาะติด ลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าสามารถเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดีมาก จึงนามาศึกษาการมีชีวิตในอาหารไก่เนื้อโดยผสมในรูปเชื้อสดพบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีชีวิต ทุกสายพันธุ์ลดลงถึง 107 CFU/g หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน จึงเลือกในระยะเวลา ไม่เกิน 3 วันมาทดลองในภาคสนาม โดยใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Ross308 ที่มีการให้อาหารผสมโปรไบโอติก พบว่าการให้อาหารผสมโปรไบโอติกจะไม่มีผลแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อน้าหนักของไก่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในทางกลับกัน อาหารผสมโปรไบโอติกสามารถเพิ่มจานวนแบคทีเรียกรดแลกติก และลดจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *Salmonella* sp. ในอุจจาระไก่ได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

2.8.7 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม

การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองของประเทศไทย สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 322 และ 226ไอโซเลต ได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทง 10 ตัวและไก่พื้นเมือง 8 ตัว ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 548 ไอโซเลตภายใต้สภาวะจำลองของกรดในกระเพาะอาหารที่พีเอช 2.5 และมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียแลกติกจำนวน 103 ไอโซเลตสามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะดังกล่าว และเมื่อนำสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะกรดไปทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีพบว่า มี 20ไอโซเลตที่ทนต่อสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กที่พีเอช 8.0 มีเอนไซม์แพนครีเอติน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและมีน้ำดีสดของไก่ 7% ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ KT2S15 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 92.94% อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกลดลงเมื่อมีการทดสอบการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดีต่อเนื่องกัน โดยมี 6 สายพันธุ์ คือ KT3L20, KT2CR5, KT10L22, KT5S19, KT4S13 และ PM1L12 สามารถรอดชีวิตได้ 43.68%, 37.56%, 33.84%, 32.89%, 31.37% และ 27.19% ตามลำดับ มี 12 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนแต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้งและไขมันได้ แบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลตมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคคือ *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*และ*Escherichia coli* แต่มี 1 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ ทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกต้านทานต่อ erythromycin, chloramphenicol และ tetracycline โดยมีค่า MIC 64 ถึงมากกว่า 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไวต่อ penicillin G แต่อย่างไรก็ตามมี 7 สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อ penicillin G โดยมีค่า MIC มากกว่า 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการทดสอบดังกล่าวสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ (KT2L24, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 และ KT8S16) ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ดีและเมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Enterococcus* sp., *Ent. lactis*, , *P. pentosaceus*, และ *E. faecium* ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *Ent. Lactis* KT3L20 หลังจากการทำ microencapsulation ด้วยอัลจิเนต ภายใต้สภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องกัน พบว่า การทำ microencapsulation แบบ extrusion มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการทำ microencapsulation แบบ emulsion และเซลล์อิสระตามลำดับ

2.8.8 ผลของกรดน้ำดีในการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกสำหรับการบริหารช่องปาก

แบคทีเรียกรดแลกติกและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่อาศัยอยู่ในลำไส้จะต้องทนต่อเกลือน้ำดี การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจสอบผลกระทบของเกลือน้ำดี taurodeoxycholate (TDCA) และ Deoxycholate (DCA) บน *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีค่ามีแนวโน้มที่จะเป็นโปรไบโอติก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น *L. reuteri* แสดงให้เห็นว่าอัตราการรอดตายสูงที่สุด แต่ยังคงมีความไวต่อความเข้มข้น DCA สูง DCA ทำให้เกิด permeabilization ของเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ และ ยกเลิกการดูดซึมกลูโคสแสดงโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รายละเอียดการศึกษาวิเคราะห์เผยให้เห็น การเปลี่ยนแปลงในอัตราส่วนระหว่าง phospholipid และ Glycolipid รวมทั้งสัดส่วนของไขมัน C18:1 W9C ที่เพิ่มขึ้นซึ่งต่อไปนี้อาจจะมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วและมีการปรับตัวในระหว่างการใช้ DCA การศึกษาครั้งนี้มีหลักฐานที่แสดงกลไกของความเป็นพิษของ DCA ในแบคทีเรียกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.9 การคัดกรองกล้าเชื้อเนื้อทางการค้าที่ pH ต่ำและเมื่อเติมเกลือน้ำดี เพื่อการใช้เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ

การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติก จากจำนวน 8 กล้าเชื้อเนื้อ ภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง โดยในกระเพาะอาหารถูกจำลองโดยใช้ค่าพีเอช 1 ± 5 phosphate-buered saline และสภาวะในลำไส้เล็กจำลองใช้ MRS broth ช่วงพีเอช 4 ± 7 และความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 2 ความเข้มข้น(0.15% และ 0.30%) ความสามารถในการอยู่รอดที่ pH 3ถูกจำกัด และที่ 0.30% เกลือน้ำดี *L. sake* (RM10) และ *P. acidilactici* (P2) สามารถทนได้ที่ pH 6 และยังมีความสามารถที่ดีที่สุดสำหรับการอยู่รอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและในความเข้มข้นที่สูงขึ้นของเกลือน้ำดี

2.8.10 สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของไก่พื้นเมืองไทย

แบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้น ถูกแยกและคัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารของไก่พื้นเมืองไทย ทำให้ทราบถึงความสามารถในการเป็นโปรไบโอติกของแบคเทอริโอซิน ซึ่งผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลกติก 14 สายพันธุ์ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดูจาก เมื่อนำส่วนใสไปไตรเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ สายพันธุ์ดังกล่าวคือ *L. sakei* subsp. *Sakei* JCM1157, *Ent. faecalis* VanB, *Bacillus* sp., and *Listeria monocytogenes*. ผลการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือก จะลดลงเมื่อเติมเอนไซม์ proteolytic ซึ่งก็คือ α-chymotrypsin และ trypsin และสายพันธุ์ที่แสดงผลการยับยั้งมากที่สุดคือ ในช่วง stationary phase ของ *L. sakei*subsp. *Sakei* JCM1157 ใน MRS broth ที่ 37°c โดย 9 ไอโซเลท ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกมาศึกษา มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก การอยู่รอดพบใน3 log CFU/ml เมื่ออยู่ในสภาวะของระบบทางเดินอาหารจำลอง โดยทุกสายพันธุ์ที่คัดแยก สามารถย่อยโปรตีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่สามารถย่อยแป้งและไขมัน และ 13 ไอโซเลต สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน โดยตัวที่ยับยั้งที่ดีที่สุด คือ *L. salivarius* และมีเพียง 1 สายพันธุ์ ที่ระบุลำดับการวิเคราะห์ 16s rDNA คือ *L. agilis.*

2.8.11 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อนำไปสู่การเป็นแหล่งโปรไบโอติกของไก่

ในการศึกษานี้ 332 ไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ถูกนำมาตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ผลคือ หกสิบสองไอโซลตของแบคทีเรียกรดแลกติกแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการรวมตัวกันสูงสุด และยังแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium และ*E. coli* O78: K80 โดยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แต่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 4 ใน 62 สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียได้รับการคัดเลือกจากการทดสอบผลของการรวมตัวและการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 4 ใน 62 สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ถูกนำมาทดสอบต่อมา คือ การทดสอบประสิทธิภาพในการกันน้ำของเซลล์พื้นผิว ความต้านทานต่อเกลือน้ำดี และและทดสอบการทนต่อกรด ซึ่ง *L. crispatus*ได้รับเลือกให้เป็นสายพันธุ์โที่มีความสามารถในการเป็นโปรไบโอติก เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น จะเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของไก่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.12 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติก เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติกในโคเนื้อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อคัดแยก คัดเลือก และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติก เพื่อทดสอบความเป็นโปรไบโอติกในโคเนื้อ ซึ่งส่วนของลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และตัวอย่างอุจจาระจาก โคพันธุ์บราห์มัน 6 ตัว ที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างถูกบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa and Sharp (MRS) agarที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3% โคโลนีของแบคทีเรียที่แสดงให้เห็นถึงโซนใสรอบโคโลนี ถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่การทดสอบการทนกรด และการทนต่อเกลือน้ำดี ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้วิธี Disk diffusion ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึง จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติก จากลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และอุจจาระ คือ 5.15×10^7, 5.85×10^7 and 1.25×10^{12} CFU/g, ตามลำดับ โดยที่ 27 ไอโซเลต จาก 86 ไอโซเลท ทนต่อ pH3 และ 15 ไอโซเลท ทนต่อเกลือน้ำดี ซึ่ง 15 ไอโซเลท ที่ทนต่อกรดและเกลือน้ำดี แสดงให้เห็นถึง ความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25923 and *Salmonella* Typhimurium ซึ่งทุกไอโซเลต ที่ทนต่อกรดและเกลือน้ำดี แสดงให้เห็นถึงความไวต่อยาปฏิชีวนะ คือ penicillin, erythromycin, tetracycline และ vancomycin แต่ในทางตรงกันข้าม ไอโซเลตที่ 11 และ 4 ต่อต้าน streptomycin และ gentamicin ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม มีเพียงไอโซเลตเดียว (F30) แสดงผลการยับยั้งที่ pH ต่ำ เกลือน้ำดี การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยไอโซเลทนี้ถูกระบุสายพันธุ์ โดย 16S rRNAซึ่งสามารถระบุได้ว่าเป็น *Streptococcus infantarius* (99.93%) และแสดงถึงความสามารถในการเป็นโปรไบโอติกในโคเนื้อ

2.8.13 บทบาทของโปรไบโอติกในการป้องกันและรักษา อาการท้องเสียที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ

อาการท้องเสียที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ เป็นผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะที่พบได้บ่อย สาเหตุเกิดจากยาปฏิชีวนะทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น ทำให้เชื้อโรคเจริญเติบโตได้มากกว่าปกติ โปรไบโอติกจึงเข้ามามีบทบาทในการป้องกันและรักษาอาการนี้ โปรไบโอติกมีหลายชนิด ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Lactobacilli, Bifidobacterium, Enterococcus, Streptococcus* และ *Escherichia* เป็นต้น และ ยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ซึ่งโปรไบโอติกมี กลไกการออกฤทธิ์หลายอย่าง ทั้งนี้มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรไบโอติกในร่างกาย ข้อมูลจากการศึกษาส่วนใหญ่ แสดงให้เห็นว่า การใช้โปรไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดอาการท้องเสียที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ ได้จริง ซึ่งโปรไบโอติกเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการป้องกัน และรักษาอาการท้องเสียที่เกิดจากยาปฏิชีวนะได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบแยกได้จากอาหารหมักและในระบบทางเดินอาหารของไก่ คือ

Pediococcus pentosaceus TISTR 536 แยกได้จากแหนม

*Weissella paramesenteroides*SM081 แยกได้จากลำไส้ไก่

Lactobacillus plantarum SM154 แยกได้จากลำไส้ไก่

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS), Difco,USA

3.1.3 สารเคมี

pepsin,sigma,USA

pancreatin,sigma,USA

bile salt,Merck,Germany

brom cresol purple

Sodium hydroxide,Carlo erbal,Itaiyty

Sodium chloride,Carlo erbal,Itaiy

hydrochloric acid,Carlo erbal,Itaiy

95% Alcohol,Commericial Grade,องค์การสุราไทย,ประเทศไทย

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

หลอดทดลองขนาด (Test tube) 16x150 มิลลิเมตร

หลอดทดลองขนาด (Test tube) 13x100 มิลลิเมตร

บีกเกอร์ขนาด (Beaker) 50,250,600 และ 1000 มิลลิลิตร

กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100,250 และ1000มิลลิลิตร

จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

ขวดรูปชมพู่(Erlenmeyer flask)ขนาด1000มิลลิลิตร

หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 เครื่องมือ

เครื่องชั่ง (Balance)	(Mettler Toledo, Germany)
เครื่องชั่ง (Balance)	(Sartorinus, Canada)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	(Heraeus, Germany)
ตู้บ่มเชื้อ (Incobater) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	(Heraeus, Germany)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)	(BossTech, Thailand)
ไมโครเวฟ (Microwave)	(Electrolux, China)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	(Memmert, Germany)
หม้อนึ่งฆ่าเช้อความดันไอ (Autoclave)	(Tommy, Japan)
ไมโครปิเปต (Micropipette)	(Brand, Germany)
ขนาด 100-1000และ 20-200 ไมโครลิตร	
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)	(Scientific Industrirs, USA)
ห้องเย็น (Chill Room) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)	(inolab, Germany)
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	(Nikon ECLIPSE E200,China)
เครื่องตีปั่น (Stomacher)	(IUL instruments, Spain

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การทดสอบการทนกรดของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

1) ทำการเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria จำนวน3สายพันธุ์คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 *Weissella paramesenteroides* SM081 *Lactobacillus plantarum* SM154 ใน MRS Broth (ภาคผนวก ข.1) ที่มีปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 ·c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในข้อ 3.1.1 ใส่ลงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 10 ml ที่ปรับกรดด้วย HCl ที่พีเอช 2,3,4,5,6 และ 7 โดยใส่ลงในปริมาตร 0.1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35-37·c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) ให้เชื้อที่เลี้ยงมีปริมาณเริ่มต้นในแต่ละหลอดของอาหารในแต่ละพีเอช ประมาณ 1×10^{6} cfu/ml

4) นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่พีเอชที่2และ3 มาตรวจนับปริมาณของเชื้อที่มีอยู่ ด้วยวิธี dilution pours plat ทุกๆชั่วโมงที่ 0, 3, 6, และ 18

5) ในแต่ละชั่วโมงให้ทำการ dilution จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth เป็น $10^{-1},10^{-2},10^{-3},10^{-4},10^{-5}$ แล้วใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิเปตลงบนเพลทปริมาตร 1 ml ทำการ pour plate ด้วย MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37·c เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยบ่มในสภาวะไร้อากาศ

6) ดูความอยู่รอดและความคงทนของเชื้อด้วยการนับโคโลนีและส่องกล้องดูลักษณะของเชื้อที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

1) ทำการเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria ที่ต้องการศึกษา (ในที่นี้ศึกษา จำนวน3สายพันธุ์คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 , *Weissella paramesenteroides* SM081, *Lactobacillus plantarum* SM154 ใน MRS Broth ที่มีปริมาตร 5ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 Cเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) ปิเปตเชื้อ ปริมาตร 0.1 ml ลงใน MRS broth+Bile salts ที่ 0%,0.3%,0.6%,1.0% ที่มีปริมาตร 10ml ปรับพีเอชด้วย NaOH ให้ pH=8

3) ให้เชื้อที่เลี้ยงมีปริมาณเริ่มต้นในแต่ละหลอดของอาหารในแต่ละพีเอช ประมาณ 1×10^{6}cfu/ml

4) นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีเปอร์เซนต์ของ Bile salts 0%,0.3%,0.6%,1.0% มาตรวจนับปริมาณของเชื้อที่มีอยู่ ด้วยวิธี pour plate ทุกๆชั่วโมงที่ 0, 6, 12,18 และ24

5) ในแต่ละชั่วโมงให้ทำการ dilutionจากอาหารเลี้ยงเชื้อMRS Broth เป็น 10^{-1}, 10^{-2},10^{-3},10^{-4},10^{-5}, 10^{-6} โดย ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิเปตลงบนเพลทปริมาตร 1 ml ทำการ pour plate ด้วย MRS agar+Brom Cresol Purple (ภาคผนวก ข.2) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 Cเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยบ่มในสภาวะไร้อากาศ

6) ดูความอยู่รอดและความคงทนของเชื้อต่อBile salts ที่แต่ละความเข้มข้นด้วยการนับโคโลนีและส่องกล้องดูลักษณะของเชื้อที่เกิดขึ้น

3.3.3 การทดสอบการทนต่อสภาวะกระเพาะจำลองและลำไส้จำลอง

1) ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก ในMRS broth ปริมาตร 10 ml จำนวน3หลอด ที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) ถ่ายเชื้อที่ได้ลงหลอด Centrifuge และนำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

3) เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl (ภาคผนวก ข.6) ปริมาตร 10 ml และนำไป Centrifuge อีกรอบที่ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

4) เทส่วนใสทิ้งและนำเซลล์ที่เหลือหลอดที่1ปั่นผสมรวมกับนมปริมาตร50mlใส่ลงในสารละลายกระเพาะจำลอง (ภาคผนวก ข.3) ที่พีเอช2 อีก2หลอดที่เหลือปั่นรวมกับ 0.85% NaCl ปริมาตร50mlเช่นกัน แล้วเทลงในสารละลายกระเพาะจำลองที่พีเอช2 และพีเอช7ตามลำดับ

5) นำสารละลายกระเพาะจำลองทั้ง 3 ฟลาสก์ที่มีเชื้อแล้วไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm

6) เก็บตัวอย่างทุกๆนาทีที่ 0,90,180 โดยทำการเจือจางกับสารละลายละลายที่เหมาะสม และใช้วิธีการpour plate ด้วย MRS agar+ Brom Cresol purple

7) เมื่อเก็บตัวอย่างครบแล้ว นำสารละลายที่เหลือในสารละลายกระเพาะจำลองทั้ง3ฟลาสก์ไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาทีและล้างเซลล์0.85% NaCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8) จากนั้นนำไปใส่ในสารละลายลำไส้จำลอง (ภาคผนวก ข.4) ทั้ง3 ฟลาสก์ และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm

9) เก็บตัวอย่างทุกๆนาทีที่ 0,90,180 โดยทำการเจือจางกับสารละลายละลายที่เหมาะสม และใช้วิธีการpour plate ด้วย MRS agar+ Brom Cresol purple

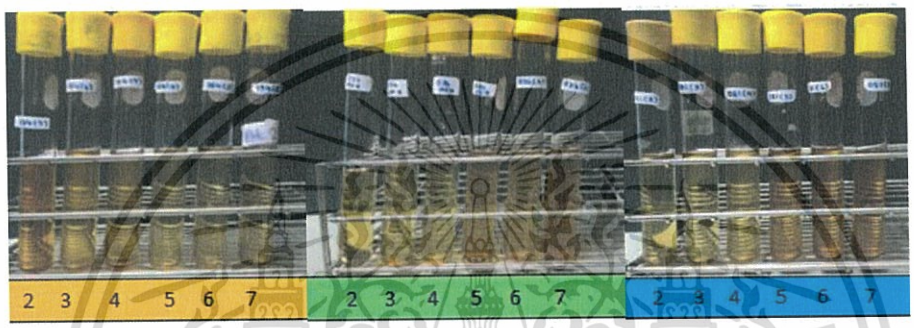
10) ทำการวิเคราะห์โดยดูความอยู่รอดของเชื้อในสารละลายกระเพาะจำลองและลำไส้จำลองโดยการนับจำนวนโคโลนีและส่องกล้องดูลักษณะของเชื้อที่เกิดขึ้น นำปริมาณเชื้อที่ได้ไปสร้างกราฟเพื่อ ประเมินการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเชื้อจากกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

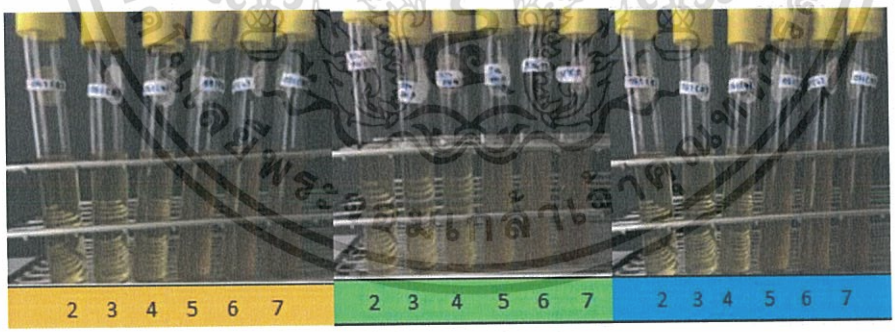
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของพีเอชที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก

ผลของพีเอช เป็นส่วนหนึ่งในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเพื่อที่จะนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติกจากการศึกษาการทนต่อพีเอชของเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้มีการปรับอาหาร MRS broth ให้พีเอชมีความแตกต่างกันคือ ที่พีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 จากนั้นนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับ pH ในระดับต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่อุณหภูมิ 35-37°c ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

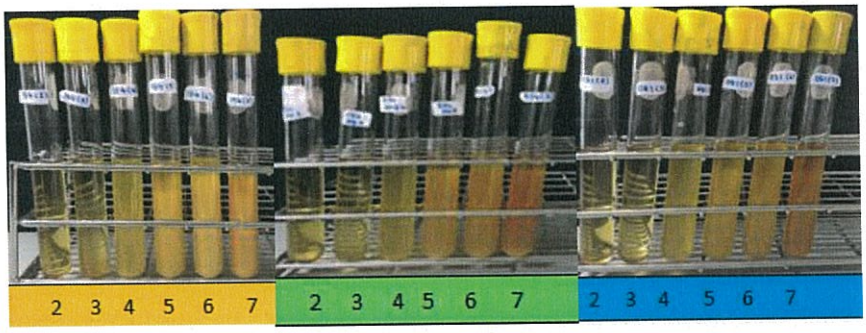


ภาพที่ 4.1การเพาะเลี้ยงเชื้อแลกติก*Lactobacillus plantarum*SM154,*Pediococcuspentosaceus*TISTR 536,*Weissella paramesenteroides*SM081 ในอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°c เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.2การเพาะเลี้ยงเชื้อแลกติกSM154,TISTR 536,SM081 ในอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°c เป็นเวลา 6ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3การเพาะเลี้ยงเชื้อแลกติก SM154, TISTR 536, SM081 ในอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอช 2, 3, 4, 5, 6, 7 ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°c เป็นเวลา 18ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.1-4.3 จะเห็นได้ว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกใน MRS broth ที่ปรับพีเอชในระดับต่างๆ แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 0, 3, 6, 18 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเชื้อในหลอดเริ่มมีความขุ่นในชั่วโมงที่ 6 (ภาพที่ 4.2) โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อที่ขุ่นนั้นจะอยู่ในช่วงระดับที่พีเอช 4 - 7 เช่นเดียวกับเมื่อบ่มเพาะเชื้อครบ 18 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.3) เชื้อที่พีเอช 4 – 7 มีความขุ่นมากเช่นกัน จึงจะสรุปได้ว่าจากการทดลองนี้เชื้อแบคทีเรียแลกติกมีความทนต่อพีเอช ที่ 4 – 7 เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการทดลองของกาญจนา.(2556) ที่ทำการทดลองโดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทำการทดลองในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นจะเจริญได้ดีในสภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 4 ขึ้นไป จะไม่ค่อยทนต่อสภาวะความเป็นกรดที่ 3 และ 2

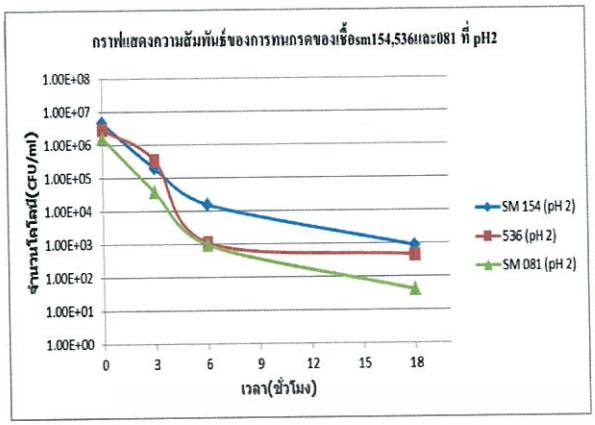
แต่เนื่องจากผู้ทดลองได้ศึกษาการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียแลกติก ซึ่งผลของพีเอช เป็นส่วนหนึ่งในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเพื่อที่จะนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติก เนื่องจากกระเพาะอาหารเมื่อตอนท้องว่างมักมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งส่วนมากจะอยู่ที่ประมาณ พีเอช 2 - 3 ผู้ทดลองจึงได้หาปริมาณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีการรอดชีวิต โดยนำ MRS broth ที่ทำการเพาะเชื้อที่พีเอช 2 และ 3 มาทำการเก็บตัวอย่าง ด้วยวิธี Pour plate โดย MRS agar ที่เวลา 0, 3, 6, 18 ชม. พบว่าสามารถนับจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีความเข้มข้นที่พีเอช2 และ พีเอช3 ได้ดังนี้ (ตารางที่4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

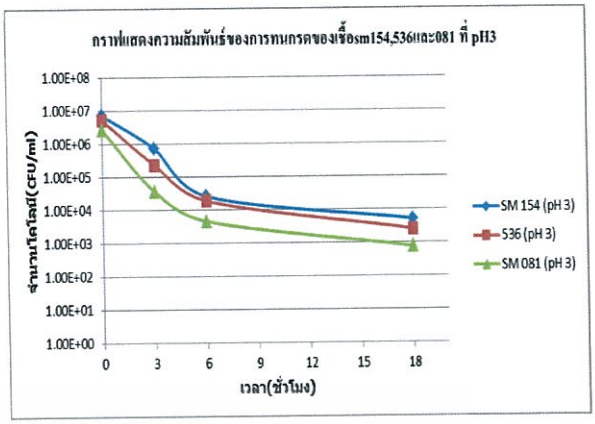
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการนับจำนวนเซลล์ (CFU/ml) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum*SM154, *Pediococcus pentosaceus*TISTR 536, *Weissella paramesenteroides*SM081 ที่พีเอช 2 และ 3 ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° c

พีเอช	เวลาที่นับ (ชั่วโมง)	เชื้อแบคทีเรียแลกติก		
		SM154 (CFU/ml)	TISTR 536 (CFU/ml)	SM081 (CFU/ml)
2	0	4.5×10^{6}	2.9×10^{6}	1.6×10^{6}
	3	1.9×10^{5}	3.4×10^{5}	3.7×10^{4}
	6	1.5×10^{4}	1.1×10^{3}	9.5×10^{2}
	18	8.5×10^{2}	4.5×10^{2}	4.0×10^{1}
3	0	7.0×10^{6}	5.5×10^{6}	2.6×10^{6}
	3	7.1×10^{5}	2.2×10^{5}	3.5×10^{4}
	6	2.5×10^{4}	1.8×10^{4}	4.5×10^{3}
	18	5.0×10^{3}	2.5×10^{3}	7.5×10^{2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.4แสดงความสัมพันธ์ของการทนกรดของเชื้อแบคทีเรียแลกติก SM154, TISTR536, และSM108 กับเวลา (ชั่วโมง) ที่พีเอช 2 (ก) และพีเอช 3 (ข)

จากการศึกษาพบว่า การเพาะเชื้อใน MRS broth ในช่วงพีเอช 2 (ภาพที่ 4.4 ก) และ พีเอช 3 (ภาพที่ 4.4 ข) เชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญและถูกทำลายโดยที่ *L.plantarum* SM154 และ *P.pentosaceus* TISTR 536 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเป็นกรดที่ระดับพีเอช 2 และ พีเอช 3ได้ดีที่สุด กล่าวคือ เชื้อทั้ง 2 สามารถตรวจพบได้ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อ *Weissella paramesenteroides* SM081 หลังจากการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยที่พีเอช 3 (ภาพ 4.1 ข) เชื้อจะเหลือในปริมาณที่มากกว่าที่ พีเอช2 (ภาพที่ 4.1 ก) โดยสอดคล้องกับผลการทดลองของ lin และคณะ.(2007) ที่กล่าวไว้ว่า เชื้อแลกติกสายพันธ์ *Lactobacillus* เป็นเชื้อที่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดต่ำๆได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

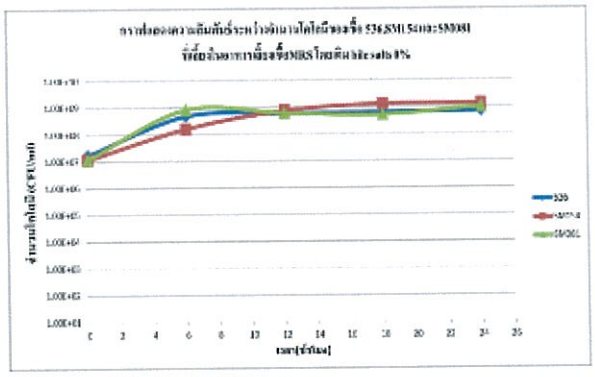
4.2ผลของเกลือน้ำดีที่มีต่อแบคทีเรียกรดแลกติก

ในการศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดีนั้นได้นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกมาเพาะเลี้ยงใน MRS broth ที่ทำการปรับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0%,0.3%,0.6% และ 1.0% บ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 35-37°c ทำการเก็บตัวอย่างโดยการ Pour plate ด้วย MRS agar+ brom cresol purpleที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24 ชั่วโมงพบว่าสามารถนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียแลกติกได้ดังนี้ (ตารางที่4.2)

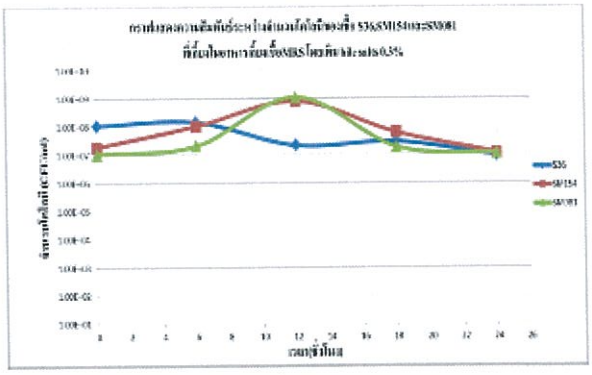
ตารางที่4.2 แสดงผลการนับจำนวนเซลล์(CFU/ml) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกSM154, TISTR536, และ SM108 ที่เกลือน้ำดีความเข้มข้น 0%, 0.3%, 0.6% และ 1.0%ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° c

%bile salt	เวลาที่นับ (ชั่วโมง)	เชื้อแบคทีเรียแลกติก		
		SM154 (CFU/ml)	TISTR536 (CFU/ml)	SM081 (CFU/ml)
0.0%	0	$1.1x10^7$	$1.7x10^7$	$1.1x10^7$
	6	$1.0x10^8$	$4.7x10^8$	$8.0x10^8$
	12	$7.3x10^8$	$5.9x10^8$	$5.9x10^8$
	18	$1.3x10^9$	$6.3x10^8$	$5.2x10^8$
	24	$1.3x10^9$	$6.8x10^8$	$9.9x10^8$
0.3%	0	$1.9x10^7$	$1.1x10^8$	$1.0x10^7$
	6	$1.0x10^8$	$1.5x10^8$	$2.0x10^7$
	12	$7.9x10^8$	$2.1x10^7$	$1.1x10^9$
	18	$6.9x10^7$	$2.9x10^7$	$1.9x10^7$
	24	$1.2x10^7$	$9.4x10^6$	$1.1x10^7$
0.6%	0	$1.0x10^7$	$7.0x10^6$	$1.3x10^7$
	6	$1.3x10^8$	$5.0x10^7$	$9.9x10^6$
	12	$4.3x10^8$	$1.6x10^7$	$1.9x10^7$
	18	$9.9x10^6$	$3.8x10^6$	$6.9x10^6$
	24	$7.2x10^6$	$6.2x10^5$	$8.7x10^5$
1.0%	0	$5.1x10^7$	$1.2x10^7$	$1.5x10^7$
	6	$2.8x10^8$	$1.4x10^7$	$2.0x10^7$
	12	$1.5x10^8$	$9.2x10^6$	$1.0x10^7$
	18	$6.7x10^6$	$9.8x10^5$	$1.3x10^6$
	24	$1.0x10^6$	$5.2x10^5$	$1.6x10^5$

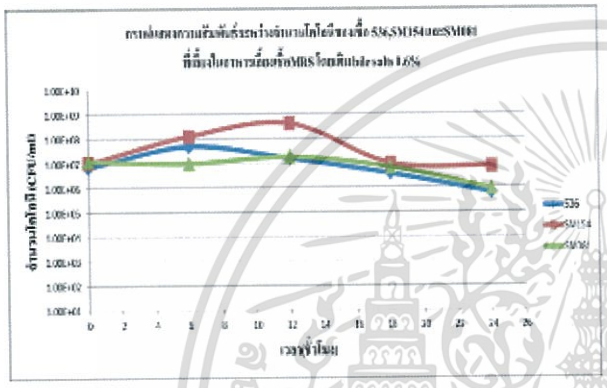
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



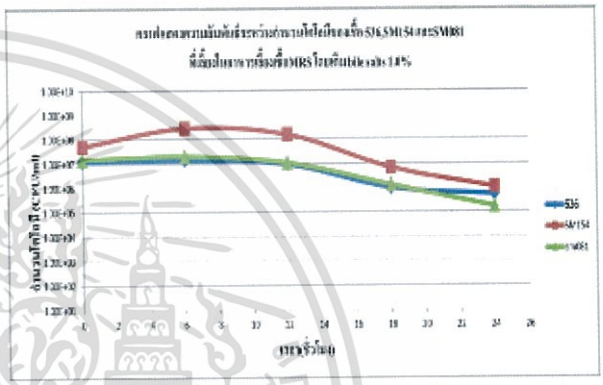
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก SM154, TISTR536, และ SM081กับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0% (ก.),0.3% (ข),0.6 (ค),1.0% (ง)

จากการศึกษาการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ กับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่แตกต่างกันจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SM154 สามารถทนเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นสูงถึง 1.0% (ภาพที่4.5 ง) กล่าวคือ เชื้อสามารถตรวจพบได้มากกว่าเชื้ออื่นๆส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.6% (ภาพ4.5 ค) เชื้อ *L.plantarum* SM154 และ *P.pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนเกลือน้ำดีได้ในระดับลองลงมา ซึ่งเชื้อ*L.Plantarum* SM154 สามารถทนได้ดีกว่า *P.pentosaceus* TISTR 536 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *W. paramesenteroides* SM081 สามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ที่ 0.3% (ภาพ4.5 ข) แต่จะสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.6% และ 1.0% ได้เพียงเล็กน้อยแต่ก็ยังพอมีเชื้อเจริญเติบโตอยู่บ้าง จึงสรุปได้ว่าเชื้อ *L. plantarum* SM154 เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 1% ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของศิริรัตน์ และคณะ (2548) ได้รายงานไว้ว่าเชื้อในสกุลบาซิลลัสจะเจริญเติบโตได้ใน เกลือน้ำดีไม่เกิน 3 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของกระเพาะและลำไส้เล็กที่มีต่อแบคทีเรียแลกติก

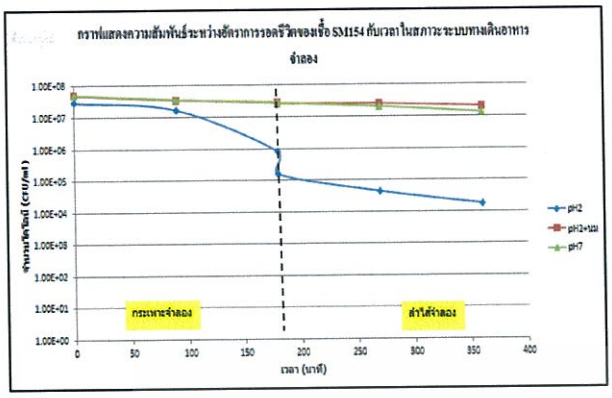
จากการศึกษาความทนต่อสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์คือ SM154, TISTR536, SM081 ที่สภาวะกระเพาะจำลองในระดับที่พีเอช2 และ พีเอช7 ที่มีแต่เชื้อ และใช้เปรียบเทียบกับพีเอช 2 ที่มีส่วนผสมของ skimmed milk ที่เป็นอาหารในช่วงกระเพาะจำลองที่เวลา 0, 90 180 นาที และผ่านเข้าสู่ช่วงลำไส้จำลอง(pH 8) ที่เวลา 0 (180 นาทีของกระเพาะจำลอง) 90 180 นาที ทำการเก็บตัวอย่างโดยการ pour plateด้วย MRS agar+ brom cresol purple ซึ่งพบว่าสามารถนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ (SM154 TISTR536 SM081) ในระบบสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้ดังนี้(ตารางที่4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการนับจำนวนเซลล์ (CFU/ml) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก.SM154, TISTR536, และ SM108 ในสารละลายกระเพาะจำลองและลำไส้จำลอง ที่พีเอช 2,พีเอช 2 ใส่นม และพีเอช 7 ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °c

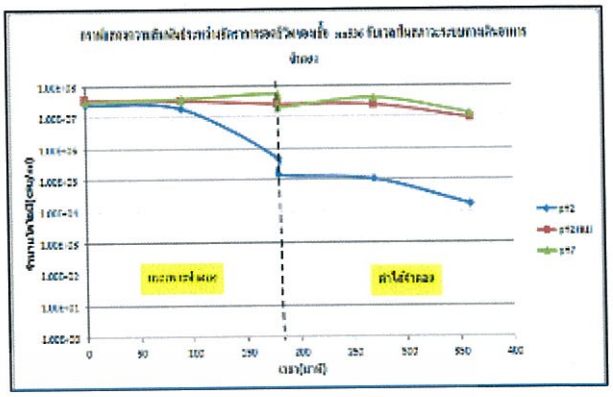
สารละลาย	พีเอช	เวลาที่นับ (นาที)	เชื้อแบคทีเรียแลกติก		
			SM154 (CFU/ml)	TISTR 536 (CFU/ml)	SM081 (CFU/ml)
กระเพาะจำลอง	2	0	2.9×10^{7}	2.7×10^{7}	7.1×10^{6}
		90	1.6×10^{7}	1.9×10^{7}	1.4×10^{6}
		180	7.9×10^{5}	5.0×10^{6}	2.2×10^{2}
Centrifuge					
ลำไส้จำลอง	2	0	1.5×10^{5}	1.5×10^{5}	2.3×10^{2}
		90	4.4×10^{6}	1.0×10^{5}	2.5×10^{4}
		180	1.8×10^{6}	1.7×10^{6}	ND
กระเพาะจำลอง	2 + skim milk	0	4.9×10^{7}	3.7×10^{7}	9.5×10^{6}
		90	3.5×10^{7}	3.5×10^{7}	5.7×10^{6}
		180	2.8×10^{7}	2.6×10^{7}	3.0×10^{5}
Centrifuge					
ลำไส้จำลอง	2 +skim milk	0	2.6×10^{7}	2.6×10^{7}	4.0×10^{5}
		90	2.5×10^{7}	2.5×10^{7}	3.0×10^{5}
		180	2.1×10^{7}	9.5×10^{6}	1.5×10^{5}
กระเพาะจำลอง	7	0	5.1×10^{7}	3.2×10^{7}	9.4×10^{6}
		90	3.5×10^{7}	4.0×10^{7}	4.8×10^{6}
		180	2.8×10^{7}	5.6×10^{7}	1.6×10^{6}
Centrifuge					
ลำไส้จำลอง	7	0	2.7×10^{7}	2.1×10^{7}	1.1×10^{6}
		90	2.0×10^{7}	4.3×10^{7}	9.0×10^{5}
		180	1.3×10^{7}	1.4×10^{7}	8.5×10^{5}

หมายเหตุ ND = non detect หมายถึงไม่มีจำนวนเซลล์เกิดขึ้น

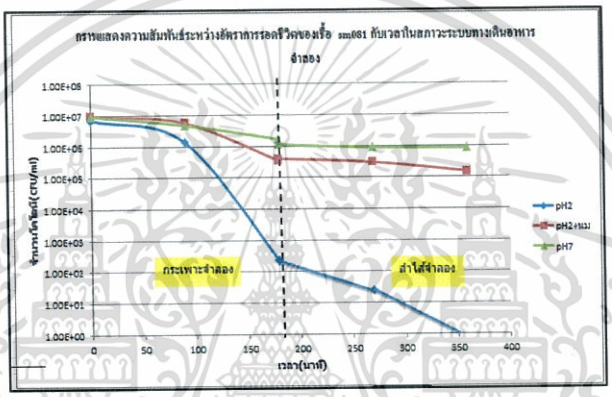
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่4.6แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติก SM154(ก),TISTR 536 (ข),SM081(ค) กับเวลาในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

จากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระบบสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลอง พบว่าระดับพีเอช7 และ พีเอช2 (skimmed milk) พบการเหลือรอดของเชื้อมากกว่าการนำเชื้อเข้าสู่ พีเอช 2 โดยตรง ซึ่งจากการศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวนี้พบว่าเชื้อ SM154 (ภาพที่4.6 ก) มีความทนต่อสภาวะความเป็นกรดของกระเพาะจำลองและเหลือรอดไปในสภาวะลำไส้จำลองได้ดี พอๆกับเชื้อ TISTR 536 (ภาพที่4.6 ข) ที่ก็สามารถทนต่อสภาวะของกระเพาะและลำไส้จำลองได้เช่นกันส่วนเชื้อ SM081 (ภาพที่ 4.6 ค) ในส่วนของช่วงกระเพาะจำลองที่ระดับพีเอช 2 ที่ใส่เชื้อโดยตรง มีจำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัดและมีจำนวนค่อนข้างน้อย จึงทำให้มีเชื้อเหลือรอดไปในลำไส้น้อยและตายในที่สุดทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อบริโภคอาหารแต่ละชนิด จะทำให้ pH ในกระเพาะอาหารมีความแตกต่างกัน โดยที่พีเอช7 ซึ่งมีสภาวะเป็นกลางถึงแม้ว่าจะไม่มีอาหารอยู่ แต่ไม่เกิดการทำลายของเชื้อในช่วงที่อยู่ในกระเพาะจำลอง ทำให้เชื้อหลงเหลืออยู่มากเพียงพอผ่านเข้าสู่ลำไส้จำลอง สำหรับการทดลองที่ใช้ skimmed milk ละลายเชื้อก่อนใส่ในกระเพาะจำลองที่มีพีเอช2 พบว่ามีเชื้อหลงเหลืออยู่มากพอๆกับพีเอช7 และพบเชื้อเหลือรอดมากกว่าการทดลองที่ละลายเชื้อเข้าไปที่ พีเอช2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยตรง การเหลือของจำนวนเซลล์ที่มากนี้อาจเนื่องจาก skimmed milk ที่ใช้ในการละลายเชื้อไปช่วยห่อหุ้มเชื้อ ทำให้เชื้อไม่สัมผัสกับสารละลายกระเพาะจำลองที่มีความเป็นกรดสูงโดยตรงเชื้อจึงถูกทำลายจากสภาวะความเป็นกรดได้น้อย (คณินทรา และ คณะ,2547) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ คมแขและคณะ (2553) ที่ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดในน้ำยอยของกระเพาะที่มีคา พี่เอช2 ได้น้อย และพบวาจำนวนเชื้อจะลดลงเมื่อสัมผัสกับน้ำยอยในกระเพาะเปนเวลานานซึ่งคา pH ที่ต่ำและการทำลายแบคทีเรียของเอนไซมเปบซินซึ่งพบได้ในกระเพาะอาหาร มีผลตอการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียที่ผานกระเพาะไปถึงลำไส้ (Huang and Adams, 2004) ในการทดลองเราพบว่าเชื้อ *L. Plantarum* SM154 มีความทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองได้มากที่สุด ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติกได้ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ยงยุทธ (2558) ที่ได้กล่าวไว่ว่า เชื้อแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* เป็นสายพันธ์ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง3สายพันธุ์ คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *Weissella paramesenteroides* SM081 และ *Lactobacillus plantarum* SM154 ซึ่งคัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ เพื่อนำไปสู่การเป็นโปรไบโอติกในอาหารไก่ และ เพื่อทำการศึกษาวิธีการตรวจสอบ ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ดีที่สุดสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติกได้ในระบบทางเดินอาหาร โดยนำมาทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น คือ การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2 และ พีเอช 3 ตามลำดับ การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี และนำมายืนยันผลอีกครั้งโดยการทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารซึ่งแบ่งเป็น กระเพาะอาหารจำลอง และ ลำไส้เล็กจำลอง โดยจากผลการทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2 และ พีเอช 3 ตามลำดับ พบว่า*Lactobacillus plantarum* SM154, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536เป็น 2 สายพันธุ์ที่เจริญและสามารถทนต่อความเป็นกรดที่พีเอช2 และ 3ได้ดี รวมถึงสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงๆ คือ 1.0%ได้ดีกว่า *Weissella paramesenteroides* SM081 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุดจากการทดสอบทั้งสองสภาวะข้างต้น จากนั้นเมื่อทำการยืนยันผลการทดลองโดยการทดสอบ ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร พบว่า *Lactobacillus plantarum* SM154 มีความสามารถในการรอดชีวิตได้ดีที่สุดทั้งในสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยในสภาวะกระเพาะจำลองที่พีเอช7 จะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากที่สุด รองลงมาคือ ที่พีเอช2 เติมนมพร่องมันเนย และที่พีเอช2 ที่ไม่ได้เติมนมพร่องมันเนย จำนวนเซลล์จะทนต่อสภาวะข้างต้นได้น้อยที่สุด ซึ่งมีแนวโน้มในการเป็นเชื้อในกลุ่มโปรไบโอติกในอาหารไก่ เพื่อส่งผลต่อการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาทำการศึกษาคุณสมบัติของความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง3สายพันธุ์ คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ,*Weissella paramesenteroides* SM081 และ *Lactobacillus plantarum* SM154 เมื่อทำการยืนยันผลจากการทดลองพบว่า *Lactobacillus plantarum* SM154 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเป็นโปรไบโอติกที่ดี ดังนั้น จึงควรนำมาศึกษาเพิ่มเติม เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารไก่ เพื่อทำให้ไก่มีการสร้างผลผลิตที่ดีนำไปสู่การผลิตผลิตผลที่มีคุณภาพในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

52.2 ศึกษาเพิ่มเติมว่า เหมาะสมในการเป็นโปรไบโอติกในมนุษย์หรือไม่ และหากนำไปใช้กับสัตว์ปีก ควรปรับสภาวะการทดลองให้เหมาะสมคือ ปรับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ เป็น 42 °c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนามาใช้เป็นโปรไบโอ-ติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชเทคโนโลยีชีวภาพ.มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

กิจการ ศุภมาตย์. 2544. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2535. ตัวเสริมชีวนะ. ว.สัตว์เศรษฐกิจ. 10 : 79-82.

คณะกรรมการบริหารสินค้าไก่เนื้อและผลิตภัณฑ์. 2549. ข้อมูลการผลิตและการส่งออก.[ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.dld.go.th/Board_chicken/dataproduct_export.html. 8 ตุลาคม 2549

คณินทรา สุวรรณมานนท์ ชมพูนุท ขาวนวล พิมลพรรณ ทองอุ่น ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2547. การศึกษาคุณสมบัตความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อของไทย. สาขาเทคโนโลยีการหมัก. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คมแข พิลาสมบัติ นวลพรรณ งามยี่สุน และ อดิศร เสวตวิวัฒน. 2553. การศึกษาคุณสมบัติการเปนโปร-ไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไสไก. ว.เกษตรพระจอมเกลา 28: 19-28

ชรินทร์ เขียวจรัส. 2539. การใช้โปรไบโอติก เอนไซม์ และกรดอินทรีย์ในอาหารสัตว์. ว.สัตวบาล. 6 : 23-37.

ฐิติพงษ์ ธนะรัชติกานนท์. 2539. การใช้แลค ติกแอสิคแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเสริม อาหารไก่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และ กัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. ว.สัตวแพทย์ศาสตร์. 14 : 52-61.

ธารารัตน ศุภศิริ. 2542. แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. ว.วิทยาศาสตร์. 6: 357-360.

นวลจันทร์ พารักษา. 2533. สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก. ว.สุกรสาส์น. 16 : 5-13.

นิรนาม. 2547. การคัดแยกและการจำแนกสารยับยั้งจุลินทรีย์ในแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่โดยใช้ PCR Technique.ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์และการบริการวินิจฉัย. คณะสัตวแพทยศาสตร์.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เบญจรัตน์ ยิ้มมิ่ง และ ปณิชา ปั่นสุ่น. 2553. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก่. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปฐม เลาหะเกษตร. 2540. การเลี้ยงสัตว์ปีก. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่2) พ.ศ. 2542. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.feedusers.com/thai/cms/html/Others/194.html. 3 มิถุนายน 2551

เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ บัวเรียม มณีวรรณ์ และ เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. (2551). ผลของการเสริม *Lactobacillus reuteri* ในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตและการย่อยได้ของโภชนะในไก่เนื้อ.ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาสัตว์ และสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ยงยุทธ เขมาวะนิช. 2558. การเสริมจุลินทรีย์ *Bacillus* ในอาหารไก่กระทง. สาขาสัตวศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย,วิทยาเขตนครศรีธรรมราช.

รุจา มาลัยพวง. 2544. การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลกติกของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัญจกร จันทร์อุดม. 2549. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11.สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วันดี ศิริโชคชัชวาล ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และ ณุวีร์ ประภัสระกูล. บทบาทของโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร. ภาควิชาจุลชีววิทยา.คณะสัตวแพทยศาสตร์.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริรัตน์ สีหนาท ลือชัย บุตคุป สมคิด แข็งกลาง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2548. การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสงขลานครินทร์. 27: 266-274.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิต ของเชื้อโดยการห่อหุ้ม.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต.สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Anadón, A., Martínes-Larrañaga, M. R. and Martínes, M. A. 2006. Probiotic for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. Regul. Toxicol. Pharm. 45: 91-95.

Angel, R., Dalloul, R.A., Tamim, N.M., Shellem, T.A. and Doerr, J. 1999. Performance and nutrient use in broilers fed a lactobacillus-based probiotic. Poult. Sci. 78 (1): 58,98.

Atherton, D. and Robins S. 1987. Probiotics a European perspective. In biotechnology in The feed industry. Edited by Lyons, T.P. Kentucky: Nicholasville.: 167-196.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Audisio, M.C., Oliver, G. and Apella, M.C. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain on chicks infected with *Salmonella pullorum*. J. Food Prot. 63(10): 1333-1337.

Axelsson, L. T. 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria. 1st ed. (Salminen, S. and Wrigth, A.V., eds.). p. 1-64. New York: Marcel Dekker.

Becquet, P. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. Int. J. Food Microbiol. 88 :247-254.

Brownell, J.R., Sadler, W.W. and Fanelli, M.J. 1969. Factors influencing the intestinal infection of chickens with *Salmonella* Typhimurium. Br. Vet. J. 13: 804-816.
probiotic products. Int. J. Food Microbiol. 97: 147-156.

Coeuret, V., Gueguen, M. and Vernoux, J. P. 2004. Numbers and strains of *Lactobacillus* in some probiotic products. Int. J. Food Microbiol. 97: 147-156.

Corrier, D. E., Hollister, A. G., Nisbet, D. J., Scanlan, C. M., Beier, R. C. and DeLoach, J. R. 1994. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in Leghorn chicks : comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. Avian Dis. 38 : 297-303.

Corsetti , A. , M. Gobbetti and E. Smacchi. 1996. Antibacterial Activity of Sourdough Lactic Acid Bacteria : Isolation of a Bacteriocin – Like Inhibitory Substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C 57. Journal of Food Microbiology. 13 : 447-456.

Endo, T., Nakano, M., Shimizu, S., Fukushima, M. and Miyoshi, S. 1999. Effect of probiotic on the lipid metabolism of cocks fed on a cholesterol-enriched diet. Biosci. Biotechnol. Biochem 63(9): 1569-1575.

Erkkilae, S. and Petae, J.E. 1999. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in thepresence of bile salts for potential probiotic use.Department of Food Technology.University of Helsinki.

Francis, C., Janky, D.M., Arafa, A.S. and Harms, R.H. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poults. Poultry Sci. 57: 1687-1689.

Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1988. Food Microbiology. 4 th ed. Tata McGraw-Hill Co. Ltd. New York , Sydney.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66 : 365-378.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developmenteds. Ifi Nr. 3 : 23-26.

Haddain, M.S.Y., Abulrahim, S.M., Hashlaoun, E.A.R. and Robinson, P.K. 1996. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. Poultry Sci. 75: 494-497.

Javed, T., Siddique, M. and Hameed, A. 1994. Occurrence of *Salmonella* in avifauna. Pak. Vet. J. 14(4): 254-257.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44: 525-532.

Jin, L. Z., Ho, Y. W., Ali, M. A., Abdullah, N., Ong, K. B. and Jalaludin, S. 1996. Adhesion of *Lactobacillus* isolates to intestinal epithelial cells of chicken. Lett. Appl. Microbiol. 22 : 229-232.

Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A. and Jalaludin, S. 1998. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatilefatty acids in broilers. J. Anim. Feed Sci. 70 : 197-209.

Kabir, S.M.L., Rahman, M.M., Rahman, M.B., Rahman, M.M. and Ahmed, S.U. 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. Int. J. Poult. Sci. 3(5): 361-364.

Karpinska, E., Blaszczak, B., Kosowska, G., Degorski, A. and Borzemsk, B. W. 2001. Growth of the intestinal anaerobic in the newly hatched chicks according to the feeding and proving with normal gut flora. B. Vet. I. Pulawy. 45: 105-109.

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

Kumprecht, I. and Zobac, P. 1998. The effect of probiotic preparations containing *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterococcus faecium* in diets with different levels of B-vitamins on chicken broiler performance. *Zivocina-Vyrobc*. 43: 63-70.

Lin, W-H., Yu, Bi., Jang, S-H. and Tsen, H-Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillusfermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe. 13: 107-113

Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microb. 87: 149-164.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lioyd, A.B., Cumming, R.B. and Kent, R.D. 1997. Prevention of *Salmonella* Typhimurium infection in poultry by pretreatment of chickens and poultry with intestinal extracts. Aust. Vet. J. 53: 82.

Mead, G. C. 2000. Prospects for "competitive exclusion" treatment to control *salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. Vet. J. 159 : 111-123.

Moreng, R. E. and Avens, J. 1985. Poultry Science and Produdtion. Repartment of Animal Science. 1st Ed. p 61. Colorado State University. Colorado.

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robinow, C. F. 1994. Determinative and Cytogical Light Microscopy. *In* Method for General and Molecular Bacteriology. (Murray, R. E. G., Wood, W. A.. And Krieg, N.R. ed.). American Society for Microbiology. USA.

Musikasang, H., Sohsomboon, N., Tani A. and Maneerat S. 2012. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probioticpotential from Thai indigenous chickens. Department of Industrial Biotechnology.Faculty of Agro-Industry.Prince of Songkla Universityand Institute of Plant Science and Resources.Okayama University.

Musikasang, H., Sohsomboon, N., Tani A. and Maneerat S. 2012. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probioticpotential from Thai indigenous chickens. Department of Industrial Biotechnology.Faculty of Agro-Industry.Prince of Songkla Universityand Institute of Plant Science and Resources.Okayama University.

North, O. M. 1984. Animal Science Textbook Series. Commercial Chicken Production 3rdEd. AVI Puplishing. USA.

Nousiainen, J. and Setala, J. 1998. Lactic Acid Bacteria as Animal Probiotics, *In* Lactic Acid Bacteria. 2nd ed. (Salminen, S. and Wright, A. V., eds.). p. 431-473. Mercel Dekker Inc. New York.

Nurmi, E. and Rantala, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature. **1973**. 241: 210-211.

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

Pilasombut, K., Worawidh, W., Sunee N., Adisorn S., Takeshi Z., Jiro N., Kenji S. and Thavajchai S. 2005. Screening and characterization of bacteriocin producing lacticacid bacteria isolated from chicken Intestine. Kasetsart Journal. 39 : 612 - 621.

Puphan, K., Pairat S., Suthipong U. and Chainarong N. 2015. Screening of lactic Acid bacteria as potential probiotics in beef cattle .Pakistan Journal of Nutrition. 14 (8): 474-479.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari M. and Shivazad M. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selectionas a source of chicken probiotic. Department of Animal Science.University College of Agriculture and Natural Resources and University of Tehran.

Taranto, M.P.,Gaspar Perez-Martinez b and Graciela Font de Valdez.2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteriafor oral administration.Department of Biotechnology, Institute of Agricultural Chemistry and Food Technology (CSIC).

Watkins, B.A., Miller, B.F. and Nell, D.H. 1982. *In vitro* inhibitory effects of *Lactobacillus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci. 61: 1298-1308.

Watkins, B.A. and Miller, B.F. 1983. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in ghotobiotic sicks. Poultry Sci. 62: 1772-1779.

Simpson, W.J. and Taguchi, H. 1995. The genus *Pediococus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In The genera of lactic acid bacteria. Edited by Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. 2nd Edition. Glasgow: Blackie Academic & Professional.: 125-164.

Yeo, J. and Kim, K.I. 1997. Effect of feeding diets containing and antibiotic, probiotic of yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poultry Sci. 76: 381-385.

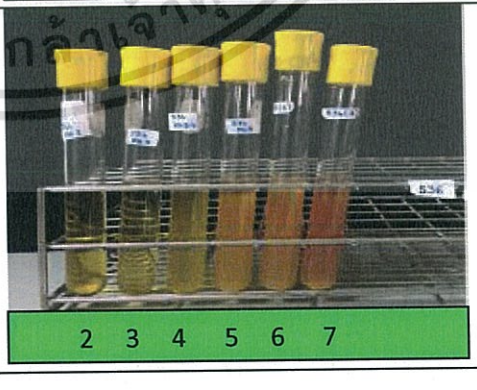
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

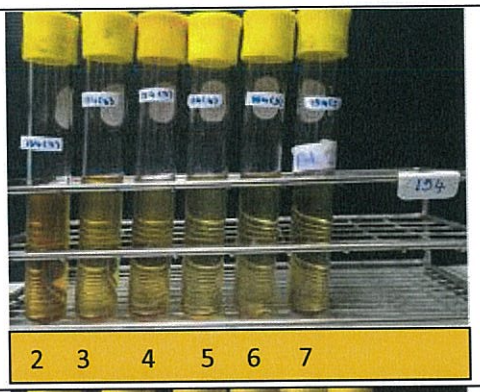
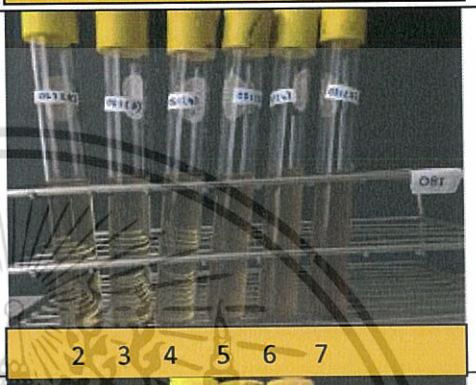
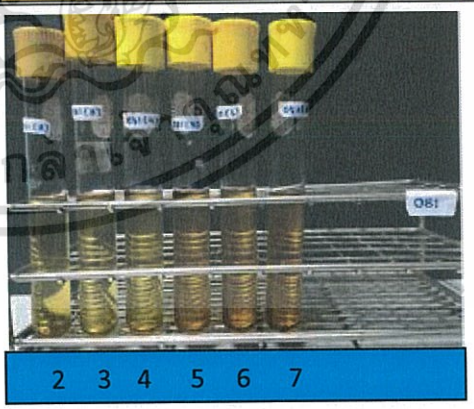
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
ภาพความขุ่นจากการทดลองและลักษณะสัญฐานของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

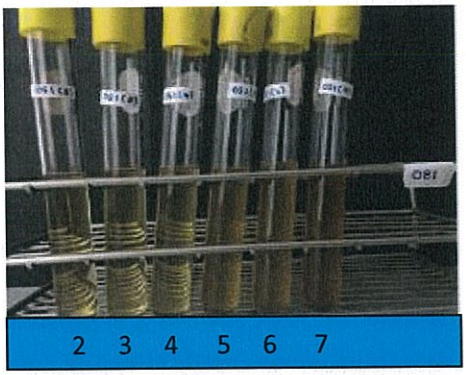
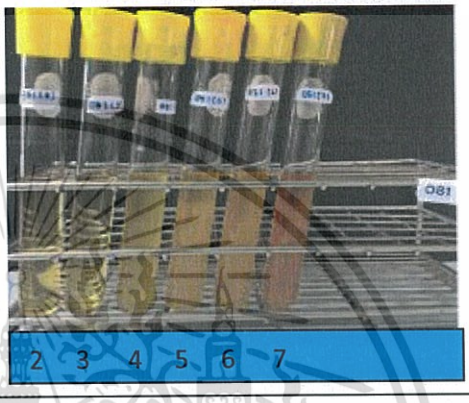
ก.1 ภาพความขุ่นของMRS broth ที่ให้ความเข้มข้นของ พีเอช 2,3,4,5,6,7 ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

เชื้อแบคทีเรียแลกติก	เวลา (ชั่วโมง)	ภาพความขุ่นของMRS broth ที่พีเอชต่างๆ
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	3	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	6	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	18	

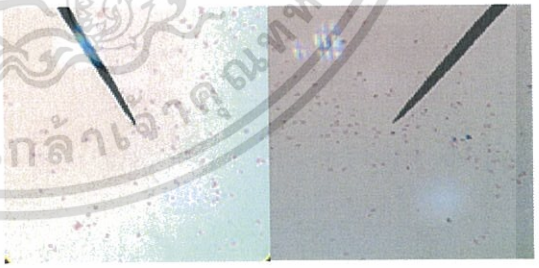
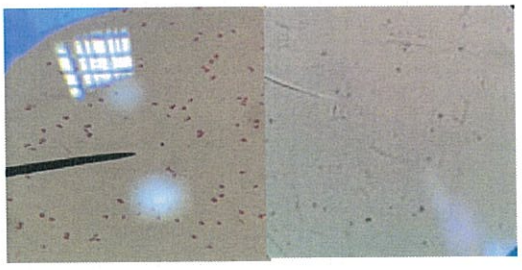
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus plantarum SM154	3	
Lactobacillus plantarum SM154	6	
Lactobacillus plantarum SM154	18	
Weissella paramesenteroides SM081	3	

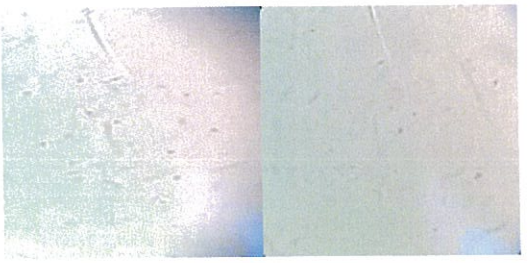
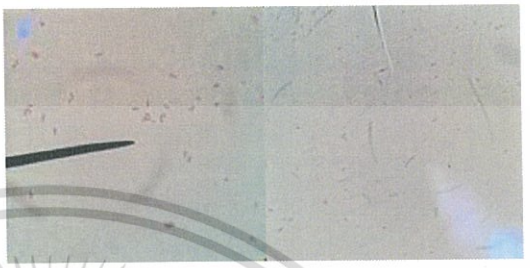
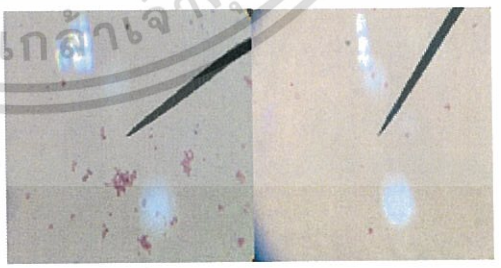
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weissella paramesenteroides SM081	6	
Weissella paramesenteroides SM081	18	

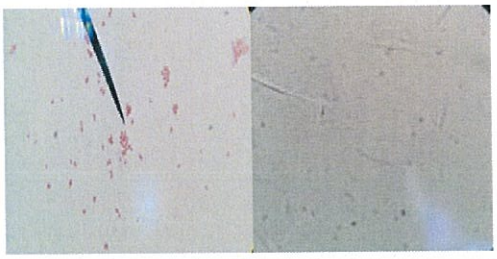
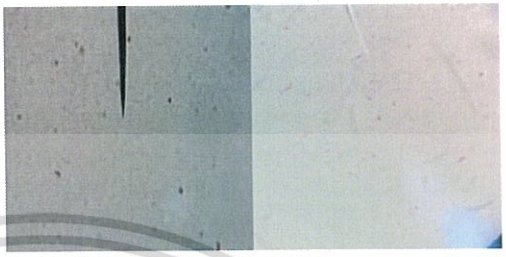
ก.2 ภาพแสดงลักษณะสัญฐานของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก จากการทดลองการทนต่อกรด

เชื้อแบคทีเรียแลกติก	เวลา (ชั่วโมง)	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากการส่องกล้องจุลทรรศน์
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	3	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	6	

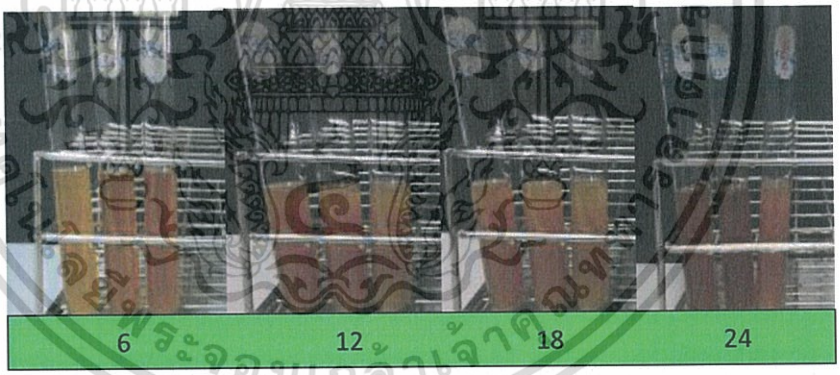
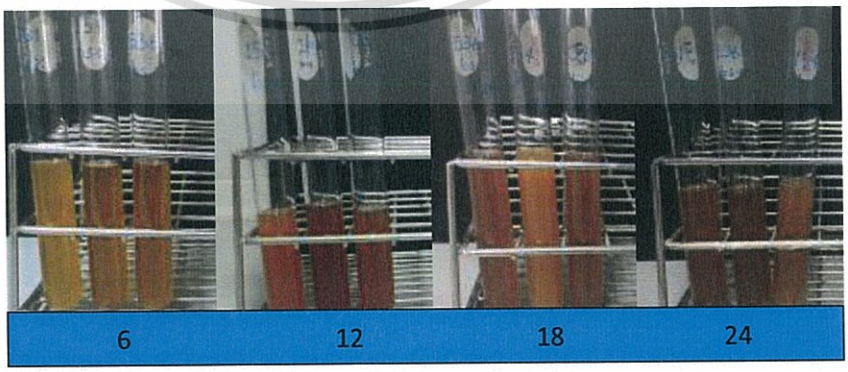
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus pentosaceus TISTR 536	18	
Lactobacillus plantarum SM154	3	
Lactobacillus plantarum SM154	6	
Lactobacillus plantarum SM154	18	
Weissella paramesenteroides SM081	3	

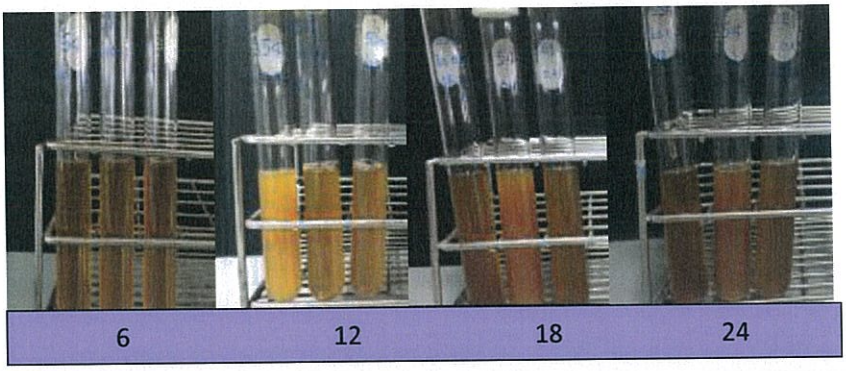
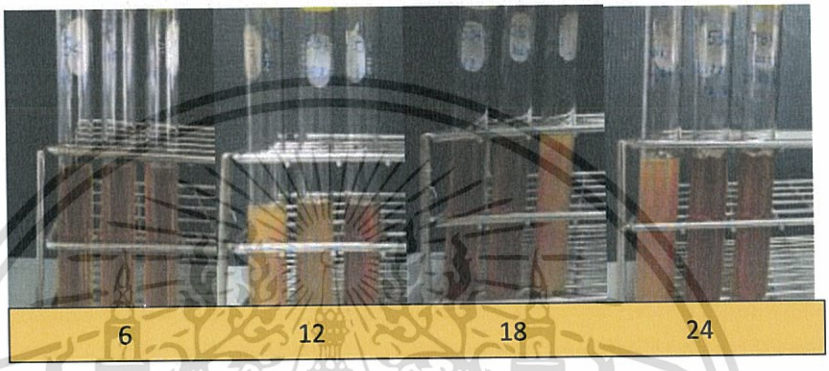
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weissella paramesenteroides SM081	6	
*Weissella paramesenteroides*SM 081	18	

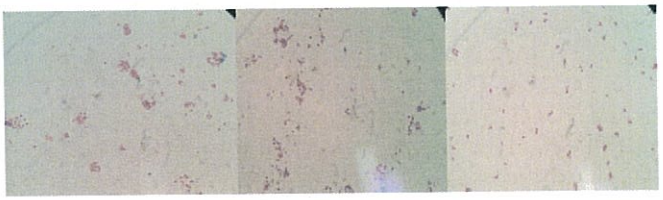
ก.3 ภาพความขุ่นของMRS broth ที่ให้ความเข้มข้นของ bile salt 0%,0.3%,0.6% และ 1.0% ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

% bile salt	ลักษณะความขุ่นของแบคทีเรียแลกติกทั้ง3สายพันธุ์และเวลาที่เพาะเลี้ยง(ชั่วโมง)
0%	
0.3%	

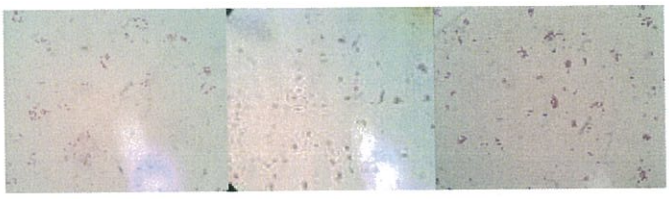
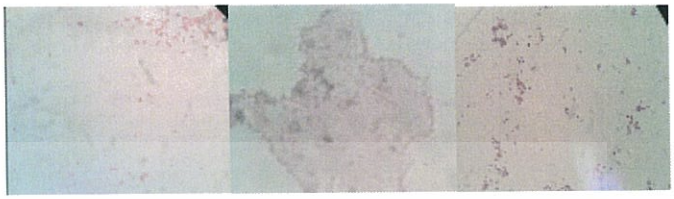
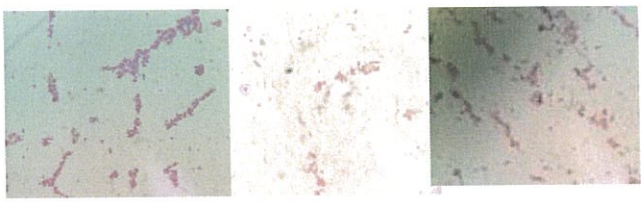
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.6%	
1.0%	

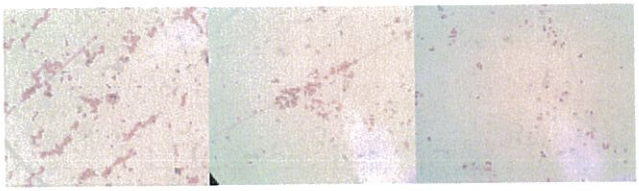
ก.4 ภาพแสดงลักษณะสัญฐานของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากการทดลองการทนต่อเกลือน้ำดี

เชื้อแบคทีเรียแลกติก	%bilesalts	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	0%	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	0.3%	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus pentosaceus TISTR 536	**0.6%**	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	**1.0%**	
Lactobacillus plantarum SM154	**0%**	
Lactobacillus plantarum SM154	**0.3%**	
Lactobacillus plantarum SM154	**0.6%**	
Lactobacillus plantarum SM154	**1.0%**	
Weissella paramesenteroides SM081	**0%**	

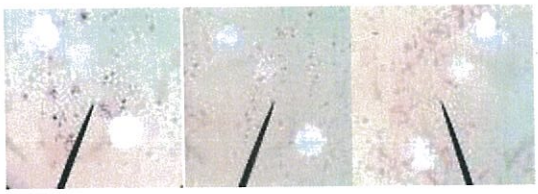
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weissella paramesenteroides SM081	**0.3%**	
Weissella paramesenteroides SM081	**0.6%**	
*Weissella paramesenteroides*SM 081	**1.0%**	

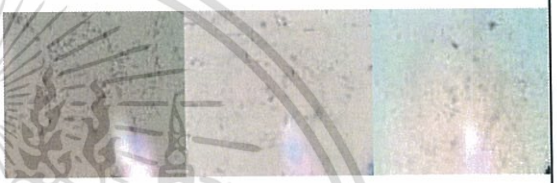
ก.4 ภาพแสดงลักษณะสัญฐานของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากการทดลองการทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

เชื้อแบคทีเรียแลกติก	สภาวะจำลอง	ระดับพีเอช	ลักษณะสัญฐานของเชื้อแบคทีเรียแลกติก
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	กระเพาะจำลอง	2	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	กระเพาะจำลอง	2+นม	

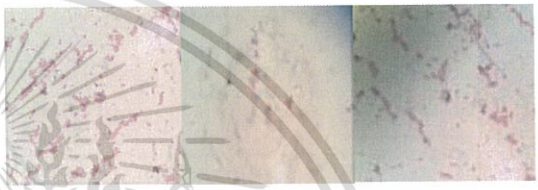
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus pentosaceus TISTR 536	กระเพาะจำลอง	7	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	ลำไส้จำลอง	2	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	ลำไส้จำลอง	2+นม	
Pediococcus pentosaceus TISTR 536	ลำไส้จำลอง	7	
Lactobacillus plantarum SM154	กระเพาะจำลอง	2	
Lactobacillus plantarum SM154	กระเพาะจำลอง	2+นม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus plantarum SM154	กระเพาะจำลอง	7	
Lactobacillus plantarum SM154	ลำไส้จำลอง	2	
Lactobacillus plantarum SM154	ลำไส้จำลอง	2+นม	
Lactobacillus plantarum SM154	ลำไส้จำลอง	7	
Weissella paramesenteroides SM081	กระเพาะจำลอง	2	
*Weissella paramesenteroides*SM 081	กระเพาะจำลอง	2+นม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weissella paramesenteroides SM081	กระเพาะจำลอง	7	
Weissella paramesenteroides SM081	ลำไส้จำลอง	2	ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก
Weissella paramesenteroides SM081	ลำไส้จำลอง	2+นม	
*Weissella paramesenteroides*SM 081	ลำไส้จำลอง	7	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ข.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)	55 g
น้ำกลั่น	1 L

ชั่งสารอาหารตามสูตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อน และคน จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่นาทีอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15

ข.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar+ Brom Cresol purple

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)	55 g
Brom Cresol purple	0.02 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1 L

ชั่งสารอาหารตามสูตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนและคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.3สารละลายกระเพาะจำลอง

Pepsin	3 g
น้ำเกลือปราศจากเชื้อ	1 L

ชั่งสารละลายตามสูตร ละลายผสมในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 1 ลิตร ให้ความร้อนแก่สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าพี่เอชเป็น 7.0±0.1 ด้วย 1 N NaOH และ 2.0±0.1 ด้วย HCl จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.4สารละลายลำไส้จำลอง

Pancreatin	1 g
Bile salts	45 g
น้ำเกลือปราศจากเชื้อ	1 L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งสารละลายตามสูตร ละลายผสมในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 1 ลิตร ให้ความร้อนแก่สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าพี่เอชเป็น 8.0±0.1 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข.5 สารละลาย NaOH (1 N)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 g ละลายในน้ำกลั่นจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml เก็บไว้ในขวดแก้วสีชา

ข.6 0.85% NaCl (Sodium chloride)

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 ml แล้วฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาววรีริน แย้มแสง
วัน เดือน ปี เกิด	10 เมษายน 2537
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ กรุงเทพมหานคร ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่	54 ซ.พัฒนาการ 28 ถ.พัฒนาการ แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร 10250

ชื่อ – นามสกุล	นายเอกชัย แม้นพยัคฆ์
วัน เดือน ปี เกิด	1 กันยายน 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนตลุกดู่วิทยาคม จ.อุทัยธานี ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่	55/1 ม.2 ต.ตลุกดู่ อ.ทัพทัน จ.อุทัยธานี61120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้