



รายงานฉบับสมบูรณ์

“การนำเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

โดย

รศ. ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 1)

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

โดย

รศ.ดร.อดิสร	เสวตวิวัฒน์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผศ.ดร.คมแห	พิลาสมบัติ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงการ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สัญญาเลขที่ RDG5120013

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกulture สำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

**Potential of Using Probiotic Bacteria as Starter Culture in
Innovative Fermented Meat Products for Functional Food**

โดย

รศ.ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์

ผศ.ดร. कमแข พิลาสมบัติ

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 1)

สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญ	3
วัตถุประสงค์	4
ขอบเขตงานวิจัย	4
เป้าหมาย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
แผนการดำเนินงาน	6
ผลที่คาดว่าจะได้รับภายใน 6 เดือน	8
สรุปขั้นตอนการดำเนินงาน	13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
วิธีการดำเนินงาน	36
ผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง	
การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็น โพรไบโอติกของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7	43
การทดลองที่ 2 ผลของการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7	61
บรรณานุกรม	88

โครงการย่อยที่ 2 “การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นก๊อแล้เชื้อ สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและ สุขภาพ”

Potential of Using Probiotic Bacteria as Starter Culture in Innovative Fermented Meat Products for Functional Food

ความสำคัญ

แนวคิดเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) กำลังแพร่หลายและเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เพราะหมายถึงอาหารที่มีผลดีต่อสุขภาพ นอกเหนือจากมีคุณค่าทางอาหาร อาหารเพื่อสุขภาพที่เป็นที่รู้จักทั่วไป ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมโยเกิร์ตและนมเปรี้ยวที่เติมเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก (probiotic) ในขณะที่ผลิตภัณฑ์พวกผักดองและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ แต่ขณะนี้ยังมีความชัดเจนในการนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อสุขภาพ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยการเติมก๊อแล้เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันผู้วิจัยได้ค้นพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 7 ชนิด คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *P. pentosaceus* M13, *Lactococcus lactis* N100 และ N190, และ *Lactobacillus plantarum* RS54 และพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ส่วนเชื้ออีก 2 ชนิดคือ *Lactobacillus salivarius* K4 และ K7 เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เป็นชนิดที่ยังไม่เคยพบมาก่อน นอกจากนี้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 อยู่ในระหว่างการทดลองใช้ในการผลิตแฮมเนื้อหมูในทางการค้า ดังนั้นคณะผู้วิจัยมีความต้องการจะนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวข้างต้นมาใช้เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์จากเนื้อโคให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพและมีความปลอดภัยทางด้านอาหารและความสม่ำเสมอด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งยังไม่แพร่หลายในประเทศไทย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีแนวคิดในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินและแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกมากขึ้นกว่าที่มีอยู่เดิม 7 สายพันธุ์ เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติในการนำมาใช้เป็นก๊อแล้เชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ เพื่อจะได้ยืนยันการเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ และนอกจากนั้นยังจะมีผลพลอยได้ตามมาอีก คือสามารถลดการนำเข้าก๊อแล้เชื้อแบคทีเรียจากต่างประเทศและสามารถลดการใช้สารเคมีในการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อนำเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *P. pentosaceus* M13, *Lactococcus lactis* N100 และ N190, และ *Lactobacillus plantarum* RS54 มาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อเพิ่มมูลค่า เพิ่มความสม่ำเสมอด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เพิ่มคุณค่าทางอาหารและมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคมากขึ้น รวมทั้งยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์
2. เพื่อนำเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 มาทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกและคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย ในการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อเพิ่มมูลค่า เพิ่มความสม่ำเสมอด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เพิ่มคุณค่าทางอาหารและมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคมากขึ้น รวมทั้งยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์
3. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ และศึกษาลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอรีโอซินที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์
4. เพื่อคัดเลือกและศึกษาลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก
5. เพื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ใหม่มาศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ

ขอบเขตงานวิจัย

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกไว้แล้ว 5 ชนิด มาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
นวัตกรรมใหม่
2. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และศึกษาคุณสมบัติการนำมาเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อของ *Lb. salivarius* K4 และ K7
3. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอรีโอซินและแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกจากลำไส้สัตว์ และจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ เชื้อแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกจะนำมาศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อ โปรไบโอติกในอาหารหมักนวัตกรรมใหม่

4. นำสารแบคทีเรียโอซิน และกรดอินทรีย์มาใช้ในการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนวัตถุดิบเนื้อสัตว์เพื่อความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

เป้าหมาย

1. สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติสร้างสารแบคทีเรียโอซินและมีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกได้
2. สามารถนำเชื้อที่คัดแยกได้มาใช้เป็นกล้ำเชื้อโปรไบโอติกเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารในอาหารหมักประเภทเนื้อ และเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภค
3. สามารถนำเชื้อที่มีอยู่แล้ว 7 ชนิด มาใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ
4. สามารถนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ และเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคมากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหารจากผลิตภัณฑ์เนื้อ
2. เพิ่มความสม่ำเสมอด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์
3. เพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์
4. เพิ่มคุณค่าทางอาหารในผลิตภัณฑ์และเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค
5. ได้องค์ความรู้ของการควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านสาธารณสุขอาหาร
6. สามารถลดการนำเข้ากล้ำเชื้อแบคทีเรียจากต่างประเทศ
7. สามารถลดการใช้สารเคมีเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์

แผนการดำเนินงานภายใน 3 ปี (2551 – 2554)

กิจกรรม	ปีที่			ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	1	2	3	
1. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อ แบคทีเรียจากเชื้อที่ได้คัดเลือกมาแล้ว 1.1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ 1.2 ศึกษาคุณสมบัติการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อของเชื้อที่มีอยู่แล้ว 5 ชนิด ได้แก่ <i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR 536, <i>P. pentosaceus</i> M13, <i>Lactococcus lactis</i> N100 และ N190, <i>Lactobacillus plantarum</i> RS54 1.3 ศึกษาคุณสมบัติการนำเชื้อมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย	●	●		1. ทราบคุณสมบัติของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 2. ยืนยันว่าเชื้อที่มีอยู่แล้ว 5 ชนิดพร้อมกับที่ศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมอีก 2 ชนิดสามารถนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้ 3. ได้สูตรกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง
2. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จากแหล่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน 2.1 คัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จากแหล่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 2.2 ใช้แบคเทอริโอซินลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคที่พบมากในเนื้อสดก่อนการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อ	●	●	●	1. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ 2. ได้ทราบข้อมูลว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ใหม่มีคุณสมบัติเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้ 3. สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์โดยใช้สารแบคเทอริโอซินหรือใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับกรดอินทรีย์ ซึ่งมีเนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยในการบริโภคมากขึ้น 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง
3. คัดเลือกและศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก		●	●	1. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อนำไปศึกษากำหนดนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารหมักประเภทเนื้อต่อไป 2. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง

กิจกรรม	ปีที่				ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	1	2	3		
4. นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 และ 3 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ 4.1 การศึกษาการนำกล้าเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นสูตรสำเร็จ จากข้อ 1.3 มาทดสอบการใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อ (<i>In vitro</i>) 4.2 การศึกษาการนำกล้าเชื้อแบคทีเรีย จากเชื้อที่คัดแยกใหม่ (จากข้อ 2 และ 3) มาทดสอบการใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อ (<i>In vitro</i>)		●	●		1. สามารถผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อที่มีความปลอดภัยจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ
5. การศึกษาคุณภาพและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก นวัตกรรมใหม่ 5.1 นำกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ผ่านการทดสอบในผลิตภัณฑ์เนื้อ (<i>In vitro</i>) มาใช้ในการผลิต ผลิตภัณฑ์เนื้อนวัตกรรมใหม่คือ แหนมกึ่งแห้ง 5.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและจุลชีววิทยา รวมถึงทดสอบด้านประสาทสัมผัสการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งโปรไบโอติก			●	●	1. ได้ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมใหม่ แหนมกึ่งแห้งและทราบถึงคุณภาพที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อ โปรไบโอติกเปรียบเทียบกับ ที่ผลิตโดยใช้เชื้อตามธรรมชาติ และที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อจากต่างประเทศ 2. ได้ทราบผลการยอมรับนวัตกรรมใหม่จากผู้บริโภค 3. ทราบวิธีการในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อ นวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในโอกาสต่อไป วิธีการที่สามารถจดเป็นลิขสิทธิ์หรือสิทธิบัตรในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในเชิงการค้า 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 2 เรื่อง

ผลที่คาดว่าจะได้รับราย 6 เดือน

ระยะเวลา	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
6 เดือนที่ 1	1. ทราบคุณสมบัติของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 2. ยืนยันว่าเชื้อที่มีอยู่แล้ว 5 ชนิดพร้อมกับที่ศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมอีก 2 ชนิดสามารถนำมาใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้
6 เดือนที่ 2	1. ทราบคุณสมบัติของเชื้อ <i>Lb. salivarius</i> K4 และ K7 ในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 2. ยืนยันว่าเชื้อที่มีอยู่แล้ว 5 ชนิดพร้อมกับที่ศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมอีก 2 ชนิดสามารถนำมาใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้ 3. ได้สูตรกล้ำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง 5. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ 6. ได้ทราบข้อมูลว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ใหม่มีคุณสมบัติเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้
6 เดือนที่ 3	1. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ 2. ได้ทราบข้อมูลว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ใหม่มีคุณสมบัติเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้ 3. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อนำไปศึกษาการนำไปใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารหมักประเภทเนื้อต่อไป 4. สามารถผลิตกล้ำเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อที่มีความปลอดภัยจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้กล้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ 5. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง
6 เดือนที่ 4	1. สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์โดยใช้สารแบคทีเรียโอซินหรือใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดอินทรีย์ ซึ่งมีเนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยในการบริโภคมากขึ้น 2. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อนำไปศึกษาการนำไปใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารหมักประเภทเนื้อต่อไป 3. สามารถผลิตกล้ำเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อที่มีความปลอดภัยจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้กล้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง
6 เดือนที่ 5	1. ได้ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมใหม่ แหนมกึ่งแห้งและทราบถึงคุณภาพที่ผลิตโดยการเติมกล้ำเชื้อ โปรไบโอติก เปรียบเทียบกับ ที่ผลิตโดยใช้เชื้อตามธรรมชาติ และที่ผลิตโดยใช้กล้ำเชื้อจากต่างประเทศ 2. ได้ทราบผลการยอมรับนวัตกรรมใหม่จากผู้บริโภค 3. ทราบวิธีการในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในโอกาสต่อไปวิธีการที่สามารถจดเป็นลิขสิทธิ์หรือสิทธิบัตรในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในเชิงการค้า 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 2 เรื่อง
6 เดือนที่ 6	1. ได้ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมใหม่ แหนมกึ่งแห้งและทราบถึงคุณภาพที่ผลิตโดยการเติมกล้ำเชื้อ โปรไบโอติก เปรียบเทียบกับ ที่ผลิตโดยใช้เชื้อตามธรรมชาติ และที่ผลิตโดยใช้กล้ำเชื้อจากต่างประเทศ 2. ได้ทราบผลการยอมรับนวัตกรรมใหม่จากผู้บริโภค

ระยะเวลา	ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	3. ทราบวิธีการในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์กรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในโอกาสต่อไปวิธีการที่สามารถจดเป็นลิขสิทธิ์หรือสิทธิบัตรในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์กรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในเชิงการค้า 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 2 เรื่อง

หน่วยงานและบุคลากรที่มีความร่วมมือ

Prof. Dr. Kenji Sonomoto.

Department of Bioscience and Biotechnology,

Faculty of Agriculture, graduate School, Kyushu University, Japan

ส่วนที่ 1 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีอยู่เดิม

แผนการดำเนินการ ข้อที่ 1.1, 1.2, 1.3 และ 2.2

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 1)

**ส่วนที่ 1 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก
ที่สร้างสารแบคเทอรีโอซินที่มีอยู่เดิม**

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 1)

ส่วนที่ 1 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีอยู่เดิม

การศึกษาเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

1.1 ศึกษาการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

1.2 ศึกษาการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด น้ำดีสังเคราะห์ และน้ำดี Ox-bile

1.3 ศึกษาการทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีไก่สด

1.4 ศึกษาการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

1.5 ศึกษาการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง

การทดลองที่ 2 ศึกษาการทดสอบคุณสมบัติการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรีย

2.1 ศึกษาการมีชีวิตรอดของกล้ำเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่มีไนโตรเจน

2.2 ศึกษาผลการการใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกร่วมกับกระเทียมในการทำลายเชื้อ *Salmonella* ในแบบจำลองการหมักแนม

2.3 ศึกษาผลของการสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ร่วมกับกรดแลกติกที่มีต่อเชื้อ *S. Typhimurium*

2.4 ศึกษาผลของการใช้เชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตแนมเนื้อโค

การศึกษาคูณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกโดยศึกษาเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR

536, *P. pentosaceus* M13, *Lactococcus lactis* N100 และ N190 และ *Lactobacillus*

plantarum RS54

1. ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อที่สภาวะที่มีความเป็นกรดและน้ำดี

2. ศึกษาผลของการสารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* บนเนื้อโค

แผนการดำเนินงานข้อที่ 1.1, 1.2, 1.3 และ 2.2

บทคัดย่อ

Lactobacillus salivarius K4 และ K7 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ และสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 และศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรีย ในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส pH 4 การมีชีวิตรอดที่ pH 2, 2.5, 3 และ 3.5 การมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับน้ำดีสังเคราะห์ (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี ox-bile ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ และการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองที่น้ำย่อยของกระเพาะ pH 2, 3, 4 และ 7 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ผลทดลองพบว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH 3-3.5 ส่วน *Lb. salivarius* K7 สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH 2.5-3.5 น้ำดี ox-bile และน้ำดีไก่สดมีผลทำให้เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำดีสังเคราะห์ได้ ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถเจริญได้เล็กน้อย และเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยจำลองที่ pH 3, 4 และ 7 เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว สามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะ ไปถึงลำไส้จำลองได้ นอกจากนี้ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ยังสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin

ส่วนการศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียทำการศึกษาความสามารถในการทนต่อไนโตรฟของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ศึกษาผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ศึกษาผลของการใช้กล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตหมั่นเ็นโค และยืนยันการตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถเจริญในสภาวะที่มีไนโตรฟได้ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถเจริญในสภาวะที่มีไนโตรฟได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

จากแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมและไม่เติมกระเทียม มีการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมกระเทียม หรือกล้ำเชื้อเพียงอย่างเดียว การใช้กล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตเหวมเนื้อโคพบว่าในผลิตภัณฑ์เหวมที่มีการเติมกล้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูง และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ให้ต่ำลงรวดเร็วกว่าเหวมที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ แต่ค่า pH ในช่วง 4 วันของการหมักยังคงมีค่าสูงกว่า 4.5 และเมื่อดูประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 พบว่าเมื่อทำการหมักเหวมเป็นเวลา 0-5 วันยังคงตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. วิวัฒนาการของแนวคิดเกี่ยวกับโปรไบโอติก

Vasiljevic and Shah (2008) ได้อ้างคำกล่าวของ Ilya Metchnikoff ว่า ชาวชนบทของประเทศบัลแกเรีย มีอายุขัยเฉลี่ย 87 ปี และทุกๆ หนึ่งพันคนจะมีอยู่ 4 คนที่มีอายุเกิน 100 ปี ทั้งนี้ความแตกต่างของวิถีชีวิตของพวกเขาที่สำคัญอย่างหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับคนในสมัยเดียวกันคือ คนส่วนใหญ่จะบริโภคนมหมัก โดย Metchnikoff ให้ข้อเสนอว่า ร่างกายมนุษย์จะมีสารพิษเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยที่สารพิษที่มีอยู่ในร่างกายถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อก่อโรคในลำไส้ และความต้านทานของร่างกายจะอ่อนแอลงเนื่องจากการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วของเชื้อเหล่านั้น ซึ่งสามารถป้องกันได้โดยการบริโภคนมเปรี้ยวและแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ซึ่ง เสาวนีย์ ธรรมสถิติ (2547) รายงานว่า ความนิยมและยอมรับการรักษาสุขภาพเช่นนี้เกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากแต่เดิมนักวิชาการยังขาดข้อมูลหลักฐานประกอบสรรพคุณที่ชัดเจน อีกทั้งยังเชื่อว่าหากใช้เกินขนาดอาจทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคอีกด้วย ต่อมาเมื่อมีข้อมูลหลักฐานที่เชื่อถือได้มากขึ้น จึงเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป

2. คำจำกัดความของโปรไบโอติก

คำว่า “probitics” ตรงข้ามกับคำว่า “antibiotic” เป็นคำที่มาจากภาษากรีกคือ $\pi\rho\omicron$ และ $\beta\iota\omicron\tau\omicron\varsigma$ แปลว่า เพื่อชีวิต (for life) โปรไบโอติกมีหลายนิยามด้วยกัน (ตารางที่ 1) (Vasiljevic and Shah, 2008) โดยสรุปคือ โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติก และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

ตารางที่ 1 คำจำกัดความของโปรไบโอติก

ปี ค.ศ.	คำจำกัดความ
1953	โปรไบโอติกอยู่ในอาหารประเภทผักในรูปของวิตามิน สารอะโรมาติก เอนไซม์ และสารอื่นๆ ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญของร่างกาย
1954	โปรไบโอติกตรงกันข้ามกับสารปฏิชีวนะ
1955	ผลกระทบที่เป็นอันตรายของสารปฏิชีวนะสามารถป้องกันได้โดยการรักษาด้วยโปรไบโอติก
1965	สารชนิดหนึ่งที่ถูกล้างออกมาโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งแล้วไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ
1971	สารที่สกัดออกมาจากเนื้อเยื่อซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์
1973	สารประกอบที่ก่อให้เกิดความต้านทานต่อการติดเชื้อของเจ้าบ้าน แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง
1974	จุลินทรีย์และสารที่ช่วยให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
1992	จุลินทรีย์มีชีวิตที่ใช้เสริมลงในอาหารแล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยช่วยให้สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ดีขึ้น
1992	จุลินทรีย์ที่มีชีวิตชนิดเดียวหรือหลายชนิด ที่นำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์หรือมนุษย์ มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยช่วยปรับปรุงคุณสมบัติที่มีอยู่เดิมของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น
1996	จุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์นม ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและให้โภชนาการแก่เจ้าบ้าน
1996	จุลินทรีย์มีชีวิต ที่เมื่อได้รับในปริมาณที่แน่นอนจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ
1999	เซลล์จุลินทรีย์หรือส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและความปลอดภัยของเจ้าบ้าน
2001	ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในจำนวนที่เพียงพอ ซึ่งจะไปเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์เดิมของเจ้าบ้านและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านที่ได้รับเข้าไป
2002	จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vasiljevic and Shah (2008)

3. คุณสมบัติของโปรไบโอติก

3.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกคือได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยต่อเจ้าบ้าน (generally recognized as safe : GRAS) (Taranto *et al.* 2006)

3.2 ทนต่อสารหลังในระบบทางเดินอาหาร

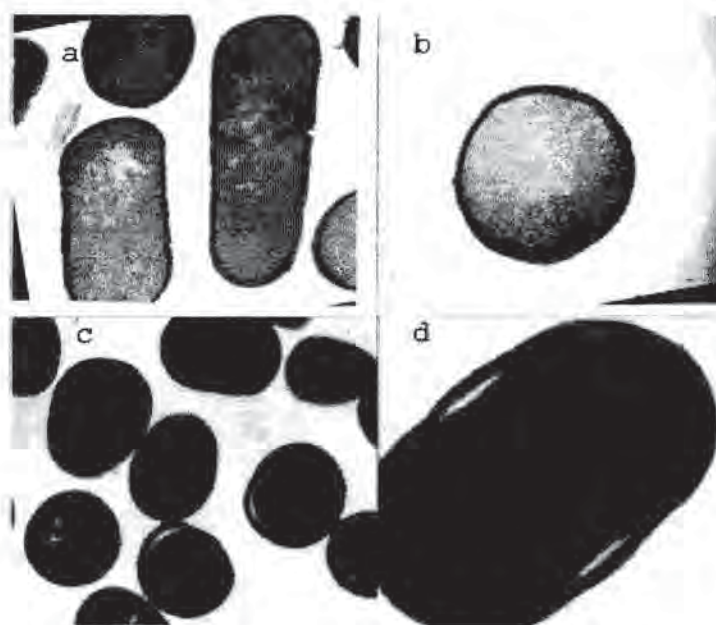
การที่จะให้ผลที่เป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้านได้นั้น โปรไบโอติกต้องสามารถที่จะอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้ และมีปริมาณเพียงพอที่จะไปถึงลำไส้ใหญ่ นั่นหมายความว่าเชื้อโปรไบโอติกต้องทนกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ของกระเพาะอาหาร อยู่รอดและเจริญในสภาวะที่มีกรดน้ำดี (Piano *et al.* 2006)

3.2.1 การอยู่รอดในระหว่างผ่านกระเพาะอาหาร

ผลที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์เดิมหรือสุขภาพที่แข็งแรงของสัตว์เจ้าบ้าน คือแบคทีเรียต้องยังคงอยู่รอดในระหว่างการลำเลียงผ่านกระเพาะและลำไส้ (Zárate *et al.* 2000) แต่ก่อนที่จะไปถึงลำไส้แบคทีเรียต้องผ่านกระเพาะซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการผ่านเข้าไปถึงลำไส้ (Morelli. 2007) น้ำย่อยที่ถูกหลั่งออกมาจากกระเพาะอาหารทุกวันเป็นสาเหตุในการทำลายจุลินทรีย์ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นความทนต่อน้ำย่อยจึงเป็นหลักการคัดเลือกโปรไบโอติกที่สำคัญ (Vinderola and Reinheimer. 2003; Succì *et al.* 2005) การอยู่รอดของของแบคทีเรียในน้ำย่อยของกระเพาะขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ถูกหลั่งออกมาจากกระเพาะอาหารมีพีเอช 0.9 เมื่อมีอาหารค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นถึงระดับพีเอช 3 เมื่ออาหารเข้าสู่ร่างกายจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะ 2-4 ชั่วโมง Lactobacilli ที่เจริญในไส้กรอกหมักอยู่รอดได้ดีกว่า Lactobacilli ที่สัมผัสกับพีเอชต่ำโดยตรง เนื่องจากไส้กรอกหมักประกอบด้วยเนื้อและไขมันห่อหุ้ม Lactobacilli ไว้ (Erkkilä and Petäjä. 2000) นอกจากนี้ Zárate *et al.* (2000) กล่าวว่า skim milk และ cheese juice ในหลอดทดลองให้ผลในการป้องกัน การเพิ่มพีเอชของน้ำย่อย เพิ่มการอยู่รอด และการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ของ propionibacteria Klingberg and Budde (2006) กล่าวว่า ความทนในกระเพาะอาหารของแบคทีเรียมีความจำเพาะกับเจ้าบ้านและมีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นเมื่อให้เชื้อแบบหมักในไส้กรอกหมัก

3.2.2 ความทนต่อน้ำดี

เชื้อจุลินทรีย์เดิมที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารต้องเผชิญกับน้ำดีซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมโคเลสเตอรอลในตับ และมีบทบาทสำคัญในการย่อยไขมัน เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแอมฟิพาติก (Taranto *et al.* 2006) น้ำดีจัดเป็นดีเทอร์เจนต์ต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยไขมันและกรดไขมัน อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยเกลือน้ำดีได้ด้วยเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) การละลายของเกลือน้ำดีจึงลดลงทำให้ความเป็นดีเทอร์เจนต์ของเกลือน้ำดีลดลง การทำงานของ BSH พบในหลายสปีชีส์รวมทั้ง *Lactobacillus* การทนต่อน้ำดีมีความผันแปรมากระหว่างสายพันธุ์และชนิดของ *Lactobacillus* (Erkkilä and Petäjä. 2000) นอกจากนี้กรดน้ำดีสารผสม (conjugated bile acids) จะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจนที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารได้น้อยกว่ากรดน้ำดีอิสระ (free bile acids) การอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำดีสูงต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ เพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เช่น ระบบตอบสนองต่อความเครียด และการควบคุมกระบวนการทรานสคริปชันซึ่งมีผลต่อเชื้อหุ้มเซลล์ การเผาผลาญพลังงาน การขนส่งกรดอะมิโน และกรดไขมันหรือไอโซพรีน (Taranto *et al.* 2006) การทดสอบความทนต่อน้ำดีโดยทั่วไปจะทำการทดสอบด้วย porcine bile หรือ bovine bile (oxgall) 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Piano *et al.* 2006) ความสามารถในการอยู่รอดต่อการทำงานของน้ำดีเป็นหลักการทั่วไปที่ใช้เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ (Morelli. 2007) Taranto *et al.* (2006) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ deoxycholic acid (DCA) ซึ่งเป็นน้ำดีอิสระ และ taurine-conjugated (TDCA) ซึ่งเป็นน้ำดีสารผสมต่อ *Lb. reuteri* CRL 1098 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก พบว่า เซลล์ที่ทดสอบด้วย TDCA มีลักษณะเหมือนกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกทดสอบด้วยน้ำดี คือ เห็นขอบเขตของผนังเซลล์ และเชื้อหุ้มเซลล์ชัดเจน (ภาพที่ 1) ในขณะที่เซลล์ที่ทดสอบด้วย DCA เกิดความผิดปกติขึ้นที่โครงสร้างของผิวเซลล์ ที่เห็นได้ชัดคือ เชื้อหุ้มเซลล์แยกออกจากผนังเซลล์ (ภาพที่ 1c-1d)



ภาพที่ 1 เซลล์ของ *Lb. reuteri* CRL 1098 ที่ถูกทดสอบด้วยกรดน้ำดี

(a) กลุ่มควบคุม

(b) ถูกทดสอบด้วย Taurodeoxycholate (conjugated bile acid)

(c) และ (d) ถูกทดสอบด้วย deoxycholate (free bile acid)

ที่มา : Taranto *et al.* (2006)

3.3 สารที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ในอุตสาหกรรมอาหารหมักดองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย (starter culture) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการผลิต โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างกรด (rapid acidification) จากสารตั้งต้น (substrate) ผลผลิตที่ได้โดยส่วนใหญ่จะเป็นกรดแลกติก นอกจากนี้ยังสามารถสร้างกรดอะซิติก เอทานอล (ethanol) สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการผลิตสารดังกล่าวขึ้นอยู่กับสถานะแวดล้อมด้วย นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารทดแทนการใช้สารเคมี เช่น โพแทสเซียมไนเตรต เป็นต้น จากการสร้างเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กหรือที่เรียกว่า แบคทีริโอซิน ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการสร้างวิตามินซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหาร การเลือกใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม

จะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคได้อีกด้วย ดังนั้นการคัดเลือกและพัฒนาเชื้อเริ่มต้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (Leroy and De Vuyst, 2004) สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่

3.3.1 การผลิตแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซิน คือสารประกอบประเภทโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย ซึ่งสร้างได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ มีโครงสร้างเป็นเพปไทด์สายเล็กๆ เป็นสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นบางชนิดได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแกรมบวกบางชนิดที่มีความจำเพาะน้อย จึงทำให้มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ ได้หลายชนิดมากขึ้น รวมทั้งชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และชนิดที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ด้วย จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารได้

3.3.2 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการเกิดกรดอินทรีย์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลกติก จะสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกและกรดอะซิติก เป็นต้น เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของซบสเตรดต่ำลง ความเป็นกรดสูงและพีเอชต่ำ จึงมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2545) Swetwathana *et al.* (1999) กล่าวว่า กรดแลกติกที่สร้างจากคาร์โบไฮเดรตโดยตระกูลของ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. จะทำให้ pH ต่ำลง และไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว

3.3.3 การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

Otero and Nader-Macías (2006) ได้ทำการศึกษาการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ภายหลังการคลอด ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจาก *Lb. gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องคลอดของโคกระบือ พบว่า *Lb. gasseri* สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ปริมาณมาก เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ร่วมกับ *S. aureus* พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง การเจริญของ *S. aureus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดแลกติกที่หลั่งออกมาโดย *Lactobacilli* จะสามารถทำลายเซลล์ของ *S. aureus* ได้

3.3.4 การเกิดเอทานอล

สุมนชา วัฒนสินธุ์ (2545) รายงานว่า การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศทำให้เกิดเอทานอลขึ้น เอทานอลเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกได้เปรียบในการแข่งขันเหนือแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต แม้ว่าเอทานอลที่เกิดขึ้นไม่มากนักก็ตาม นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีก แต่มีความสำคัญน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิต จนมีผลทำให้พีเอชของซัสเพนเดชันลดลงมาอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 แลกติกเป็นกรดที่มีราคาแพงและนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผลิตอาหารและยา

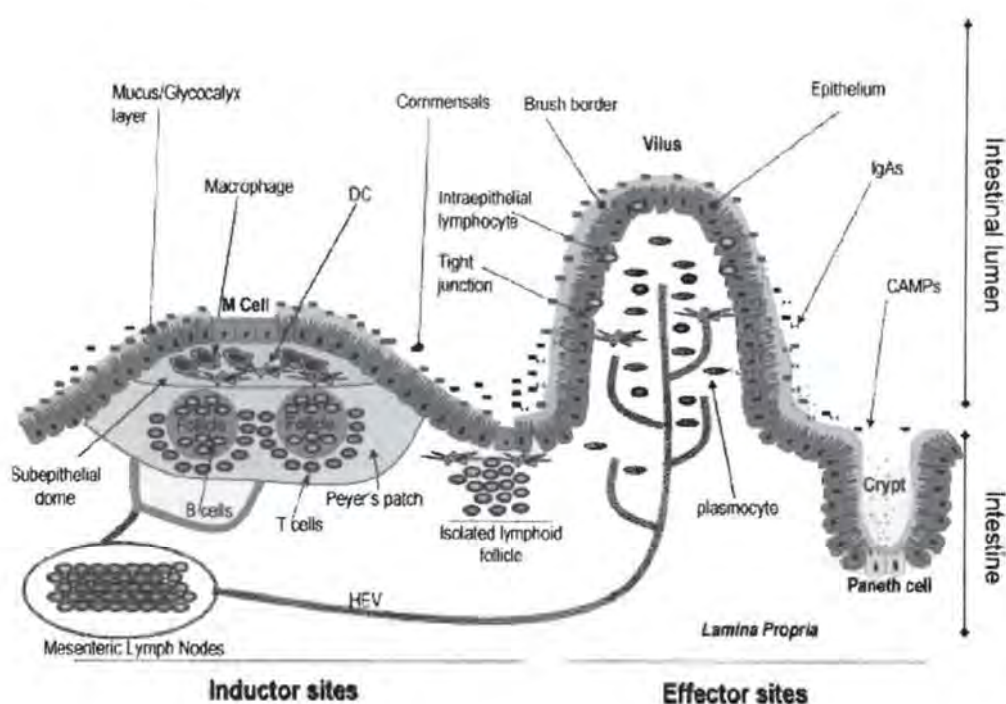
3.4 การยึดเกาะกับลำไส้

ความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้เป็นหลักการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกที่สำคัญ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของสัตว์เจ้าบ้าน เช่นการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคหรือการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (Rinkinen *et al.* 2003) การยึดเกาะกับลำไส้ของโปรไบโอติกเป็นสิ่งจำเป็นต่อการสร้างโคโลนี เมื่อไปถึงลำไส้โปรไบโอติกต้องเกาะติดกับ brush border ของ microvilli หรือยึดเกาะกับชั้นเยื่อผิว (mucus layer) โดยไม่ถูกปัดออกจากลำไส้ใหญ่จากการเคลื่อนไหวแบบ peristalsis องค์ประกอบของผิวเซลล์แบคทีเรียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์เยื่อผิวในลำไส้ การยึดเกาะกับลำไส้มีมนุษย์ของ *Lactobacilli* เกี่ยวข้องกับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่แตกต่างกัน บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบนี้มีผลต่อการยึดเกาะของ *Lactobacilli* กับเซลล์ช่องคลอดด้วย ซึ่งต่างกับกรด lipoteichoic ที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของ *Lactobacilli* กับเซลล์เยื่อในระบบขับถ่ายปัสสาวะ (Fernández *et al.* 2003) จากการศึกษาของ Fernández *et al.* (2003) พบว่าการยึดเกาะของ *Lb. gasseri* เกี่ยวข้องกับโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (อาจเป็นไกลโคโปรตีน) ในขณะที่ *Lb. acidophilus* จะขึ้นอยู่กับคาร์โบไฮเดรต และมีความสามารถในการยึดเกาะกับ caco-2 cells ได้แตกต่างกันมากในระหว่างสปีชีส์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rinkinen *et al.* (2003) ที่พบว่าคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเยื่อผิวขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลกติกมากกว่าชนิดของสัตว์เจ้าบ้าน

3.5 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์

สามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) แกมมาอินเตอร์เฟอรอน (gamma interferon) และส่งเสริมกิจกรรมของแมคโครฟาจ

(macrophage) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) โปรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ เนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว และถัดมาจนถึงเซลล์กล้ามเนื้อ (Madara. 1997) โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้โดยตัวโปรไบโอติก หรือชิ้นส่วนของโปรไบโอติก หรือสารเมตาบอไลต์ที่โปรไบโอติกสร้างขึ้น เรียกสิ่งเหล่านี้ว่า แอนติเจน เมื่อแอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิว เป็น M cells (Laissue *et al.* 1993) M cells สามารถจับแอนติเจน เซลล์เยื่อบุผิวที่ตายแล้ว (apoptosis) หรือแบคทีเรียจากช่องว่างในลำไส้ แล้วส่งเข้าไปยัง sub-epithelial dome ของ Peyer's patches เพื่อให้ถูกทำลายไปโดยแมคโครฟาจ ดังภาพที่ 2 (Magalhaes *et al.* 2007)



ภาพที่ 2 ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้

ที่มา : Magalhaes *et al.* (2007)

3.6 ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

อัจฉรา เพิ่ม (2550) รายงานว่า บทบาทของโคเลสเตอรอลในเลือด หากมีระดับสูงเกินไป มักจะทำให้เกิดเส้นเลือดหัวใจอุดตันมากขึ้น แต่คนที่มีโคเลสเตอรอลสูง มักจะได้รับคำแนะนำให้พยายามลดระดับลง โดยมีงานวิจัยส่วนหนึ่งยืนยันว่าการใช้ *Lactobacillus* จะช่วยได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำ

กับคนและใช้สัตว์ทดลองอีกชนิดหนึ่ง คือ หมู ในปี พ.ศ. 2517 มีการวิจัยเกี่ยวกับ ชนเผ่ามาซาชาในอาฟริกา เพื่อศึกษาผลของอิมัลซิฟาย ที่เติมลงในน้ำมันต่อระดับโคเลสเตอรอล ผลการวิจัยแสดงว่า สารอิมัลซิฟายไม่ช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอล แต่น้ำมันที่ผ่านการหมักโดยเชื้อ *Lactobacillus* สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ ไม่ว่าจะเติมสารอิมัลซิฟายหรือไม่เติม ต่อมามีการวิจัยใน พ.ศ. 2522 โดยใช้กลุ่มอาสาสมัคร พบว่า เมื่อกลุ่มนี้บริโภคนมสดหรือไม่ได้บริโภคผลิตภัณฑ์นมหมัก โคเลสเตอรอลจะไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อบริโภคโยเกิร์ตติดต่อกัน 1 อาทิตย์ ระดับโคเลสเตอรอลจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด

จากการศึกษาของ Liong and Shah (2004) พบว่า ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจะมีระดับคอเลสเตอรอลต่ำ เนื่องจากการผลิตน้ำดีในตับของคนและสัตว์ใช้โคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โปรไบโอติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase; BSH) ทำให้เกิด free bile salt และ cholic acid ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมีการดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ต่ำ ส่งผลให้มีการใช้โคเลสเตอรอลเพื่อสร้าง free bile salt และ cholic acid เพิ่มขึ้นในตับ ทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง

3.7 ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร

Biogenic amine เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างแบบ aliphatic, aromatic หรือ heterocyclic พบได้ในอาหารชนิดต่างๆ มากมายโดยส่วนใหญ่จะถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่มีการดัดแปลงคาร์บอกซิล (decarboxylation) ออกจากกรดอะมิโน histamine, tryptamine, tyramine, cadaverine, putrescine และ phenylethylamine ซึ่งพบว่าสารเหล่านี้ไม่เป็นที่ต้องการ เนื่องจากให้ผลลัพธ์ที่เป็นพิษ (Ammor and Mayo. 2007) การบริโภคเอมีนเหล่านี้มากเกินไป สามารถทำให้เกิดโรคประสาท โรคกระเพาะ โรคลำไส้และโรคความดันโลหิต (Suzzi and Gardini. 2003) แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวนมากที่แยกได้จากเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อ สามารถดัดแปลงคาร์บอกซิลออกจากกรดอะมิโน สายพันธุ์ของ *Lb. curvatus* เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้เป็นกลไกเชื่อในการผลิตไส้กรอก และมีการสร้างเอมีนปริมาณมาก (Bover-Cid and Holzapfel. 1999) การคัดเลือกกลไกเชื่อแบคทีเรียกรดแลกติกสำหรับการผลิตไส้กรอกหมักคือ แบคทีเรียกรดแลกติกต้องไม่ทำหน้าที่ในการดัดแปลงคาร์บอกซิลออกจากกรดอะมิโน การเจริญเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วและการสร้างกรดจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีการสร้างเอมีนได้ (Ammor and Mayo. 2007) กลไกเชื่อที่ทำหน้าที่ในการออกซิเดสเอมีนอาจจะช่วยในการลด biogenic amine ที่ถูกสร้างขึ้นในระดับเนื้อเยื่อ (*In situ*) แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีรายงานแล้วว่ามีกิจกรรมนี้ได้แก่ *Lb. plantarum* และ *Lb. casei* (Fadda et al. 2001)

3.8 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

Hirayama and Rafter (2000) รายงานว่า ยังไม่มีการทดลองโดยตรงที่แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการเกิดมะเร็งในมนุษย์อันเนื่องมาจากการบริโภคเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมหมักหรือไม่หมัก กลไกการยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามกลไกที่เป็นไปได้คือ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน การจับและย่อยทำลายสารก่อมะเร็ง การสร้างสารประกอบที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในลำไส้ใหญ่ Commane *et al.* (2005) กล่าวว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเป็นลำดับต่อเนื่อง ที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ การกระตุ้น และการขาดหายไปของ oncogenes และ tumour suppressor genes มีการรายงานในงานวิจัยจำนวนมาก ว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ โปรไบโอติกอาจจะช่วยลดความเสี่ยงในการมะเร็งได้ในระยะของการเกิดมะเร็งที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโปรไบโอติก

4. แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และผลิตกรดแลคติก ซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากกระบวนการหมักได้เมื่อมีคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมเป็นสารตั้งต้น (เสาวนีย์ ธรรมสถิตี. 2547) ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่สามารถมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีอากาศ แบคทีเรียกรดแลคติกขาดไซโตโครม (cytochrome) และพอร์ไฟริน (porphyrins) จึงไม่สร้างเอนไซม์อะคเตเลสและออกซิเดส แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดได้รับออกซิเจนโดยผ่านเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (flavoprotein oxidases) และใช้ออกซิเจนนี้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือใช้เพื่อรีออกซิไดซ์ NADH ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการดีไฮโดรจิเนชันของน้ำตาล (สมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545) โปรไบโอติกบางชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการค้าแสดงในตารางที่ 2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรายงานว่าโปรไบโอติกมีดังนี้คือ

4.1 *Streptococcus*

Burton *et al.* (2006) รายงานว่า *Streptococcus salivarius* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในช่องปาก และมีศักยภาพสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก โดย Burton *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาความปลอดภัยของ *S. salivarius* K12 พบว่า การได้รับ *S. salivarius* K12 เข้าสู่ร่างกายไม่ก่อให้เกิดอันตราย และจากการ

วิเคราะห์ทางชีวเคมี และโครงสร้างของยีนที่มีความเป็นพิษรุนแรง พบว่า *S. salivarius* K12 มีความเป็นเชื้อก่อโรคมามาก และไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ที่มีสุขภาพดี

4.2 *Enterococcus*

Kolodjieva *et al.* (2006) รายงานว่า Enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยอยู่ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งได้มีการนำเชื้อชนิดนี้ไปใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียสำหรับเสริมในอาหารในลักษณะของโปรไบโอติก Kolodjieva *et al.* (2006) ได้ทำการทดสอบลักษณะความเป็นพิษรุนแรง (ยีน: *gelE*, *sprE*, *esp*, *fsrB*, *asaI*) ของ Enterococci พบว่า ลักษณะความเป็นพิษของ *E. faecium* ต่ำกว่า *E. faecalis*

4.3 *Lactococcus*

Kimoto-Nira *et al.* (2007) รายงานว่า lactococci มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และเป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพ *Lactococcus* สายพันธุ์ 527 ยึดเกาะกับ Caco-2 cells ได้ดี *Lactococcus* สายพันธุ์ N7 สามารถกำจัดโคเลสเตอรอลได้มาก *Lactococcus* สายพันธุ์ G50 ช่วยในการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การยับยั้งการสร้าง IgE *Lactococcus* สายพันธุ์ N7 และ 527 ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตนมในญี่ปุ่นมาเป็นเวลา 50 ปี สายพันธุ์ G50 ที่แยกได้จากหญ้าสดต้องมีการทดสอบความปลอดภัยอย่างเข้มงวดเพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก

4.4 *Weissella*

Yeonhee (2005) รายงานว่า *Weissella kimchii* PL9023 สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ปริมาณมาก และให้ลักษณะที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกในผู้หญิง *W. kimchii* PL9023 ยับยั้งการเจริญ และการยึดเกาะของ *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากช่องคลอด ส่วนประกอบของผิวเซลล์ที่มีผลต่อการยึดเกาะของ *W. kimchii* PL9023 กับเยื่อผิวช่องคลอดคือไกลโคโปรตีน *W. kimchii* PL9023 ไม่สร้างสารเมตาบอไลต์ หรือเอนไซม์ที่เป็นอันตราย จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า *W. kimchii* PL9023 เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพสำหรับสุขภาพของช่องคลอด

4.5 *Lactobacillus*

จุลินทรีย์ *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ไม่ต้องการอากาศ และรูปร่างไม่แน่นอนแบบท่อนที่โดยปกติแล้วจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประเภทคาร์โบไฮเดรตและมีความสัมพันธ์กับระบบเมตาบอลิซึมของเจ้าบ้านโดยตรง (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ ประกอบด้วย *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ของ *Lactobacilli* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารคือ *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* และ *Lb. salivarius* (Slover, 2008) *Lb. salivarius* เป็นแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพชนิดหนึ่งได้แก่ สายพันธุ์ UCC118 เป็น *Lb. salivarius* สายพันธุ์ที่มีการศึกษามากที่สุด ไม่เพียงแต่มีการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น แต่ยังมีการศึกษาในสัตว์ด้วย ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทำให้ลดการเกิดอาการอักเสบ (Dunne *et al.* 2001)

ตารางที่ 2 โปรไบโอติกบางชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการค้า

สายพันธุ์	แหล่งที่มา
<i>Lb. acidophilus</i> LA1/LA5	Chr. Hansen
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> Lb12	
<i>Lb. paracasei</i> CRL431	
<i>B. animalis</i> ssp. <i>Lactis</i> Bb12	
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM [®]	Danisco
<i>Lb. acidophilus</i> La	
<i>Lb. paracasei</i> Lpc	
<i>B. lactis</i> HOWARU [™] /BI	
<i>Lb. acidophilus</i> LAFTI [®] L10	DSM Food Specialties
<i>B. lactis</i> LAFTI [®] B94	
<i>Lb. paracasei</i> LAFTI [®] L26	
<i>Lb. johnsonii</i> La1	Nestle
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-20621	Snow Brand Milk Products Co. Ltd.
<i>B. longum</i> SBT-29281	
<i>Lb. rhamnosus</i> R0011	Institute Rosell
<i>Lb. acidophilus</i> R0052	
<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult
<i>B. breve</i> strain Yakult	
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Fonetera
<i>Lb. rhamnosus</i> HN001 (DR20)	
<i>Lb. plantarum</i> 299V	Probi AB
<i>Lb. rhamnosus</i> 271	
<i>Lb. casei</i> Immunitas	Danone
<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)	
<i>Lb. rhamnosus</i> LB21	Essum AB
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vasiljevic and Shah (2008)

ตารางที่ 2 (ต่อ) โพรไบโอติกบางชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการค้า

สายพันธุ์	แหล่งที่มา
<i>Lb. reuteri</i> SD2112	Biogaia
<i>Lb. rhamnosus</i> GG1	Valio Dairy
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College Cork
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co. Ltd.
<i>Lb. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory
<i>Lb. paracasei</i> F19	Medipharma

ที่มา : คัดแปลงจาก Vasiljevic and Shah (2008)

5. คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus salivarius*

Lb. salivarius เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถพบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จัดเป็น microflora ที่ช่วยในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ และยังพบว่า *Lb. salivarius* สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่จำเป็นต่อระบบทางเดินอาหารเพราะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ นอกจากนี้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* ยังจัดเป็นสารชีวภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารแทนการใช้สารเคมีได้อีกด้วย (Robredo and Torres, 2000) ผลจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า *Lb. salivarius* มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับสุกร (Nemcova *et al.* 1997) และไก่ (Garriga *et al.* 1998) มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ *Lb. salivarius* เป็นโพรไบโอติกเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella enteritidis* และ *E. coli* มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับเยื่อผิวลำไส้สูง ทนต่อเกลือ น้ำดี และสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (Nemcova *et al.* 1997; Garriga *et al.* 1998) *Lb. salivarius* ที่มีรายงานว่ามียีนคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก มีดังนี้คือ

5.1 การทนต่อสารหลังในระบบทางเดินอาหาร

Dunne *et al.* (2001) ได้แยกโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ โดยคัดเลือกประชากรจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่กับชิ้นส่วนของระบบทางเดินอาหารที่เจือนออกมา ทำการทดสอบแบคทีเรียทั้งหมด 1,500 ไอโซเลต ที่ได้จาก ilium ตอนปลายของมนุษย์ ระหว่างจุลินทรีย์เหล่านี้ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* สายพันธุ์ UCC118 ถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาต่อไป โดยทดลองผสมในนมให้หนูกิน

Lb. salivarius สายพันธุ์ UCC118 สามารถสร้างโคโลนีในระบบทางเดินอาหารของหนูได้ และศึกษาในคนโดยใช้อาสาสมัครสุขภาพดี 80 คน พบว่าโยเกิร์ตสามารถใช้เป็นพาหะในการส่ง สายพันธุ์ UCC118 เข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร การคัดเลือกโปรไบโอติกในหลอดทดลองอาจจะสะท้อนให้เห็นถึงผลลัพธ์ในร่างกายของเจ้าบ้าน เช่น การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์เดิมในระบบทางเดินอาหาร Martin *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษา *Lb. salivarius* CETC 5713 ที่แยกจากอุจจาระของทารกที่กินนมแม่อายุ 1 เดือน ในสภาวะของระบบทางเดินอาหารจำลอง สารหลังที่ใช้ไม่มีไลโซไซม์หรืออะไมเลสเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสารหลังจากน้ำลายไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของ Lactobacilli ที่ระดับสรีรวิทยา จากการศึกษาพบว่า *Lb. salivarius* CETC 5713 มีอัตราการอยู่รอดประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์

5.2 การสร้างแบคทีเรียโอซิน

Ocana *et al.* (1999) ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 ที่แยกได้จากช่องคลอดของมนุษย์ พบว่ามีผลต่อการยับยั้ง *E. faecalis*, *E. faecium* และ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค จากผลการทดลองยังพบอีกว่า โปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติในการทนความร้อน สามารถยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียอื่นๆ ได้ ซึ่ง *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกได้

Flynn *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาของกลุ่มของแบคทีเรียโอซินขึ้นในกลุ่มของ *Lb. salivarius* UCC118 ซึ่งแยกได้จากลำไส้เล็กส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารของมนุษย์ พบว่า *Lb. salivarius* UCC118 สร้างแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน คือ abp118 β และ α Presalivarin B ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118 จะมีลำดับอะมิโนคล้ายกับแบคทีเรียโอซิน Salivarin B ที่รายงานโดย Cataloluk (2001) ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อ *Lb. salivarius* M7 จากหีนปุ่นของสัตว์ฟันแทะ แต่อย่างไรก็ตาม Presalivarin B ที่พบใน *Lb. salivarius* UCC118 ไม่มีผลต่อการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ Salivarin B ที่ได้จาก *Lb. salivarius* M7 มีผลในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งต่อมา Dunne *et al.* (2001) ได้นำสายพันธุ์ UCC118 มาศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

Pilasombut (2006) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ และพบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน โดยพบแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 2 ชนิด คือ Salivarin B และ Salvicin K นอกจากนี้ยังพบยีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ abp118 β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118 ซึ่งพบว่า แบคทีเรีย

ริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lec. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^T, *E. faecalis* JCM5803^T, *B. coagulans* JCM2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC11547^T

Pilasombut *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและคัดเลือก *Lb. salivarius* K7 จากลำไส้ไก่ พบว่า *Lb. salivarius* K7 มีคุณสมบัติในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lec. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^T และ *B. coagulans* JCM2257^T และได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน โดยการแยกสารแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ และศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดยวิธี Edman degradation พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K7 มีลำดับอะมิโนคล้ายกับลำดับอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน abp118β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118

Stern *et al.* (2006) ได้ทำการแยก Bacteriocin OR-7 จาก *Lb. salivarius* strain NRRL B-30514 และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ ion-exchange และ hydrophobic-interaction chromatography จากการหาลำดับอะมิโนของ OR-7 (KTYYGTVNGVH CTKNSLWGKV RLKNMKYDQNTTYMGRLQDI LLGWATGA FGKTFH) ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้ว่า OR-7 อยู่ในกลุ่ม class IIa bacteriocin ซึ่งคล้ายกับ Acidocin A ที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* แต่ OR-7 มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ และจัดว่าเป็น antibacterial อีกชนิดหนึ่ง จากนั้นได้ทำการศึกษาต่อโดยการนำโปรตีนที่ได้ไปผสมกับอาหารไก่ และจัดกลุ่มการทดลอง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *Campylobacter jejuni* ในระบบย่อยอาหาร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* NRRT B-30514 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. jejuni* ในระบบย่อยอาหารได้

5.3 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการเกิดกรดอินทรีย์

Aiba *et al.* (1998) ได้ทำการทดสอบเชื้อ Lactobacilli ในการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ในหลอดทดลองและในหนูที่ติดเชื้อ *H. pylori* พบว่า *Lactobacillus salivarius* สามารถสร้างกรดแลกติกได้ปริมาณสูงจึงยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้อย่างสมบูรณ์ การนำ *Lb. salivarius* ไปใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อการยับยั้ง *H. pylori* และลดการอักเสบ ได้รับการยืนยันอีกครั้งจากการทดลองในร่างกายโดยใช้หนูที่ติดเชื้อ *H. pylori*

Murry *et al.* (2004) ทำการศึกษา *Lb. salivarius* และ *Lb. plantarum* ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกทางการค้า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli*, *S. typhimurium* และ *Clostridia perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองจากอาหารไก่ได้ โดยพบว่าคุณสมบัติความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อ

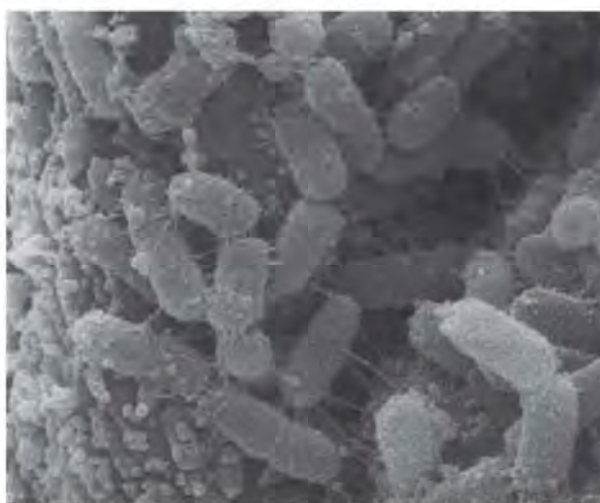
โรคดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* และ *Lb. plantarum* มีการหมักสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตแล้วผลิตกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรดเบสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองจากอาหารไก่ลดลง ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่เจริญ

5.4 การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

Martín *et al.* (2006) ศึกษาการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Lb. salivarius* CECT 5713 ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกที่กินนมแม่อายุ 1 เดือน พบว่า *Lb. salivarius* CECT 5713 สามารถสร้าง L-lactate, acetate และ hydrogen peroxide ไปยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

5.5 การยึดเกาะกับลำไส้

Garriga *et al.* (1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ *Lb. salivarius* ที่แตกต่างกัน 8 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในลำไส้ มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเซลล์เยื่อผิวของไก่ได้ดี (ภาพที่ 3) ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เช่น โมแนซิน ทนต่อเกลือน้ำดีและที่พีเอช 3.0



ภาพที่ 3 การยึดเกาะกับเยื่อผิวกระเพาะพักของไก่ของ *Lb. salivarius* CTC 2197

ที่มา : Garriga *et al.* (1998)

5.6 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์

Peran *et al.* (2005) ทำการสังเกตผลลัพธ์ในการยับยั้งสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบและกลไกของ *Lb. salivarius* ssp. *salivarius* CECT 5713 ใน trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model ของหนูที่มีอาการลำไส้ใหญ่อักเสบ การได้รับ *Lb. salivarius* ssp. *salivarius* CECT 5713 ซึ่งเป็นโปรไบโอติก จะช่วยให้เนื้อเยื่อที่ถูกทำให้อักเสบใน TNBS model ของหนูที่มีอาการลำไส้ใหญ่อักเสบหายเป็นปกติได้ง่ายขึ้น ซึ่งผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงขบวนการสร้างสารตัวกลางที่มีผลต่อการตอบสนองที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น สารที่หลั่งออกมาจากเซลล์ อันประกอบด้วย tumor necrosis factor α (TNF- α) และ nitric oxide (NO) Peran *et al.* (2005) ได้สันนิษฐานว่าผลลัพธ์ที่เป็นประโยชน์นี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ทำให้เกิดการอักเสบ

5.7 การลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด

Bae *et al.* (2002) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* เพื่อใช้เสริมในผลิตภัณฑ์นมหมักเพื่อสุขภาพ โดยคัดเลือก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* จากอุจจาระของผู้ที่มีสุขภาพดี 80 คน ที่ทนกรดและน้ำดีใน lactobacilli MRS broth ไปทำการทดลองในหลอดทดลองเพื่อประเมินความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอล พบว่า โคเลสเตอรอลใน lactobacilli MRS broth ลดลง 23-38 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.8 การลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร

Martín *et al.* (2006) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lb. salivarius* CECT 5713 ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกที่กินนมแม่อายุ 1 เดือน พบว่าไม่สร้าง biogenic amines

5.9 การลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

O'Mahony *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองใช้ *Lb. salivarius* ssp. *salivarius* UCC118 ซึ่งเป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารให้หนูกิน เพื่อประเมินผลของการบริโภคโปรไบโอติกที่มีต่อจุลินทรีย์เดิมในระบบทางเดินอาหาร การพัฒนาของเนื้องอก และอาการลำไส้ใหญ่อักเสบของหนูที่ถูกทำให้สับสนด้วย IL-10 วิธีการทดลองคือ ศึกษาในหนู 20 ตัว แบ่งเป็นหนู 10 ตัวได้กินนมที่มีโปรไบโอติก และอีก 10 ตัว ได้กินนมธรรมดาที่ไม่มีโปรไบโอติก เป็นเวลา 16 สัปดาห์ วิเคราะห์จุลินทรีย์ในอุจจาระทุกสัปดาห์เพื่อนับจำนวน UCC118 ที่เป็นโปรไบโอติก Lactobacilli ทั้งหมด *Clostridium*

perfringen, *bacteroides*, *coliforms*, *bifidobacteria* และ *enterococci* และฆ่าหนูเพื่อนำลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่มาวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbiologically) และจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (histologically) จากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ *Lb. salivarius* UCC118 จากอุจจาระของหนูทั้งหมดในกลุ่มที่ได้กินอาหารโปรไบโอติก แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับอาหารโปรไบโอติกมี *coliform* และ *enterococci* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หนูทดสอบมีจำนวนของ *C. perfringens* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มทดสอบที่ใช้โปรไบโอติกไม่พบการตายที่เกิดจากลำไส้ใหญ่อักเสบอย่างรุนแรงในขณะที่พบในกลุ่มควบคุม 2 ตัว หนูในกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติกมีการพัฒนาของมะเร็ง 1 ตัวเท่านั้น แต่ในกลุ่มควบคุมมีถึง 5 ตัว หนูทดสอบมีการอักเสบของเยื่อหุ้มตัวต่ำกว่าหนูในกลุ่มควบคุม O'Mahony *et al.* (2001) สรุปว่า การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้โดย *Lactobacilli* ที่เป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และการอักเสบของเยื่อหุ้ม

6. การนำโปรไบโอติกไปใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ

กล้าเชื้อแบคทีเรีย (starter culture) คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมาก ซึ่งอาจจะประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพียง 1 ชนิด หรือมากกว่า 1 ชนิดก็ได้ โดยการเติมกล้าเชื้อใส่ลงในวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารหมัก (ประมวล ทราษทอง, 2551) กล้าเชื้อแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มรสชาติ ความปลอดภัย และการเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างสารประกอบอะโรมา (aroma compound) สารแบคทีเรียโอซิน หรือสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ช่วยพัฒนาสีของเนื้อหมัก ไม่สร้างเอมีนหรือสารประกอบที่เป็นพิษอื่นๆ (Leroy *et al.* 2006) Swetwathana *et al.* (1998) รายงานว่า ได้มีการนำกล้าเชื้อมาใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ เพื่อช่วยให้ช่วงเวลาก่อทำให้สุกสั้นลง ให้ความคุ้มครองการพัฒนาของสี เพิ่มรสชาติ และได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัย กรดแลกติกที่ถูกสร้างขึ้นโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่า pH ต่ำลง จึงส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์เกิดรสชาติเปรี้ยว Erkkilä and Petäjä (2000) รายงานว่า กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก มีผลต่อลักษณะสัมผัส รสชาติ อายุการเก็บรักษา และความปลอดภัยของไส้กรอกแห้ง แบคทีเรียเหล่านี้จะปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยส่วนใหญ่แล้วในปัจจุบันโปรไบโอติกจะถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อซึ่งเป็นเนื้อเดียวกัน ในอนาคตโปรไบโอติกอาจถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อโปรไบโอติกมากขึ้น ซึ่งกล้าเชื้อโปรไบโอติกจะแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ และเจริญเพิ่มจำนวนซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคด้วย

Erkkilä *et al.* (2001a) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการหมักของโปรไบโอติก ได้แก่ *Lb. rhamnosus* GG, LC-705 และ E-97800, *P. pentosaceus* E-90390 และ *Lb. plantarum* E-98098 ในกระบวนการผลิตไส้กรอกแห้ง โดยทำการศึกษาความสามารถในการสร้างกรดแลกติก biogenic amines ได้แก่ histamine หรือ tyramine เบื้องต้นในอาหารเหลว MRS และทำการวิเคราะห์โดยใช้ high-performance liquid chromatography ซึ่งจากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าวสามารถสร้างกรดแลกติกได้สูงกว่าหรือเท่ากับกลุ่มควบคุม ไม่สร้างสารเอมีน ในระหว่างการหมักไส้กรอกแห้งจำนวนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 6.5-7.0 log cfu/g ถึง 8.0-9.0 log cfu/g โดย *P. pentosaceus* เจริญได้ดีที่สุด ค่า pH ของไส้กรอกหมักลดลงจาก 5.6 ถึง 4.9-5.0

Erkkilä *et al.* (2001b) ทำการศึกษาการผลิตไส้กรอกแห้งโดยใช้โปรไบโอติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. rhamnosus* GG, E-97800 และ LC-705 และกล้ำเชื้อทางการค้า 1 ชนิด คือ *P. pentosaceus* ใช้เป็นกลุ่มควบคุม จากการศึกษพบว่า ในระหว่างกระบวนการหมักจำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เติมลงไปมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นจาก 7 log cfu/g ถึง 8-9 log cfu/g และค่า pH ลดลงจาก 5.6 ถึง 4.9-5.0 จากการทดสอบทางด้านรสชาติ พบว่า ไส้กรอกหมักที่เติมเชื้อ *Lb. rhamnosus* LC-705 มีรสชาติดีกว่าไส้กรอกในกลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า *Lb. rhamnosus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ GG และ E-97800 มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นกล้ำเชื้อโปรไบโอติกในการผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้ง

Muthukumarasamy and Holley (2007) ได้ทำการศึกษาผลของการเติมโปรไบโอติก 2 ชนิดคือ *Lb. reuteri* และ *Bifidobacterium longum* ร่วมกับกล้ำเชื้อในเนื้อคือ *P. pentosaceus* และ *S. carnosus* ที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* 0157 : H7 ในไส้กรอกหมักแบบแห้ง โดยหมักไส้กรอกไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 26 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 88 เปอร์เซ็นต์ และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 วัน ในระหว่างการหมักทำการวิเคราะห์ค่า pH ค่า water activity (A_w) โปรตีน ความชื้น และจำนวนจุลินทรีย์ จากการศึกษพบว่า ค่า pH และค่า A_w ลดลงจาก 5.7 และ 0.98 ถึง 4.9 และ 0.88 ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้จำนวน *E. coli* 0157 : H7 ลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Lb. salivarius* K4 และ K7 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่และได้รับการยืนยันว่าผลิตแบคทีเรียโอซิน (Pilasombut, 2006) เลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth (Merck, Germany) เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่เชื้อ 500 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB-YE [Tryptic soy broth (Merck, Germany) ที่มีส่วนผสมของ yeast extract 0.6 เปอร์เซ็นต์ (BIO BASIC INC, Canada)] เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่เชื้อ 500 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.3 แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งแบคทีเรีย ได้จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)	สภาวะการเจริญ
Lactic acid bacteria			
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	30	anaerobic
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30	anaerobic
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37	anaerobic
<i>Lactococcus cremoris</i> TISTR 1344	MRS	30	anaerobic
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30	anaerobic
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30	anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37	anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37	anaerobic
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	30	aerobic

ตารางที่ 3 (ต่อ) อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (°C)	สภาวะการเจริญ
Other gram positive bacteria			
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	TSB-YE	37	aerobic
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB-YE	37	aerobic
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB-YE	37	aerobic
<i>Brochotrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TSB-YE	26	aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB-YE	37	aerobic
Other gram negative bacteria			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TSB-YE	26	aerobic
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB-YE	26	aerobic
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR 1321	NB	30	aerobic
<i>Salmonella</i> Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37	aerobic
<i>Escherichia coli</i> TISTR 780	TSB-YE	37	aerobic

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville. Md

JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

NRBC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

TSB-YE = Tryptic soy broth ที่มีส่วนผสมของ Yeast extract 0.6 เปอร์เซ็นต์

MRS = de Man Rogosa and Sharpe

NB = Nutrient broth

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

2.1 MRS broth (Merck, Germany)

2.2 Agar (Criterion, U.S.A.)

2.5 Beef extract (Scharlau Chemie S.A., Spain)

2.6 Tryptone (BIO BASIC INC, Canada)

2.7 Peptone (Merck, Germany)

- 2.8 XLD agar (Merck, Germany)
- 2.9 Salmosyst broth base, SB (Merck, Germany)
- 2.10 Salmosyst selective supplement tablet, SBST (Merck, Germany)
- 2.11 Agglutinating antiserum (polyvalent)
- 2.12 KOVAC (Merck, USA)
- 2.13 Tryptic soy broth (Merck, Germany)
- 2.14 yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)

3. สารเคมี

- 3.1 Glucose (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2 CaCO_3 (Scharlau Chemie S.A., Spain)
- 3.3 โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)
- 3.4 โซเดียมไนไตรท์ (Merck, USA)
- 3.5 โซเดียมไตรโพลิฟอสเฟต (Carlo Erba Reagent, Italy)
- 3.6 โซเดียมแอสคอเบท (Metha Group Trading Ltd., Part., Thailand)
- 3.7 กลีเซอรอล (APS Finechem, Australia)
- 3.8 น้ำมันพาราฟิน (Metha Group Trading Ltd., Part., Thailand)
- 3.9 กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)
- 3.10 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.11 Ampicillins ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.12 Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.13 Cephalothin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.14 Erythromycin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.15 Gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.16 Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.17 Nalidixic acid ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.18 Neomycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.19 Nitrofurantoin ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.20 Norfloxacin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)

- 3.21 Novobiocin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.22 Oxolinic acid ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.23 Tetracyclin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.24 Sulfamethoxazole/Trimethoprim ความเข้มข้น 25/1.5 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.25 Oxytetracyclin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.26 Penicillin G ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.27 Amoxycillin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)
- 3.28 Streptomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, England)

4. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหมยม

- 4.1 เนื้อโค
- 4.2 เอ็นโค
- 4.3 ข้าวสุก
- 4.4 กระเทียม
- 4.5 พงชูรส
- 4.6 พริกสด
- 4.7 น้ำตาลทราย
- 4.8 เกลือฟอสเฟต
- 4.9 เกลือไนไตรท์

5. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 5.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (DWYER instruments INC, USA)
- 5.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (BD, Scientific promotion CO., LTD.)
- 5.3 เครื่องเขย่า (Shaking Incubator: VS-8408 SFN, Korea)
- 5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge CR 3i, France)
- 5.5 เครื่องวัดค่า pH (EUTECH PC 510)
- 5.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Fx-2000i, Japan)
- 5.7 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (KMC-1300V, Korea)
- 5.8 ไมโครเวฟ (TRX-249M, Korea)

- 5.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (High-Pressure Steam Sterilizer ES-315, Japan)
- 5.10 ไมโครปิเปต (Biopipette autoclavable, Labnet)
- 5.11 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Angle Technology CO., Ltd., Thailand)
- 5.12 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven: Memmert, Belgium)
- 5.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)
- 5.14 เครื่องตีบดตัวอย่าง (Stomacher Bag Mixer 400 interscience, France)

6. วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

1.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

1.1.1 การเตรียมสารละลายไลสพลาสมจากเซลล์ (Cell-free supernatant, CFS)

ถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออก แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองผ่าน filter ปลอดเชื้อที่มีขนาด Pore size 0.2 μ m

1.1.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn (Ennahar *et al.* 1999)

ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn (Ennahar *et al.* 1999) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปั่นอย่างทั่วถึงประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นหยดสารละลายไลสพลาสมจากเซลล์ (pH 4) ที่ผ่านการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวอาหาร รอจนสารละลายซึมผ่านวุ้นนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ดังตารางที่ 3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone)

1.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด น้ำดีสังเคราะห์ และ น้ำดี Ox-bile

วิธีการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด คัดแปลงมาจากวิธีของ Hyronimus *et al.* (2000) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ค่าต่างๆ คือ 2, 2.5, 3 และ 3.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (กลุ่มควบคุมคืออาหารที่ไม่ปรับ pH; pH 6 ± 0.2) รวมถึงอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีสังเคราะห์ (Sigma, New Zealand) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ ox-bile (Fluka, France) ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ (ปรับ pH 8) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง โดยวิธีการ spread plate

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 16 ชั่วโมง (log cfu/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อในชุดทดลองควบคุม (log cfu/ml)}}$$

1.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีไก่สด

วิธีการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีไก่ คัดแปลงมาจากวิธีของ Gilliland *et al.* (1984) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีน้ำดีไก่สด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) บ่มทั้ง 2 ชุดทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง และหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี spread plate

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 16 ชั่วโมง (log cfu/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อในชุดทดลองควบคุม (log cfu/ml)}}$$

1.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ทำตามวิธีการของ Quinn *et al.* (1994) โดยถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน ทำการ swab เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS จนทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ ลงบนอาหารที่มีเชื้ออยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนนาน 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ Ampicillins (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Cephalothin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Gentamycin (10 µg), Kanamycin (30 µg), Nalidixic acid (30 µg), Neomycin (30 µg), Nitrofurantoin (300 µg), Norfloxacin (10 µg), Novabincin (5 µg), Oxolinic acid (2 µg), Tetracyclin (30 µg), Sulfamethoxazole/Trimethoprim (25 µg/1.5 µg) และ Oxytetracyclin (30 µg) แสดงผลเป็น Susceptible (S), Intermediate (I) หรือ Resistant (R)

1.5 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง

ถ่ายเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายเซลล์แบคทีเรียในน้ำย่อยสังเคราะห์ (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO₃ 45 mM และ pepsin 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 2, 3, 4 และ 7 โดยใช้ HCl) ปริมาตร 100 มิลลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอด หลังจากผ่านไป 180 นาที ในกระเพาะอาหารจำลอง จากนั้นนำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ปริมาตร 50 มิลลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที (4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) เทน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง นำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ไปแขวนลอยในของเหลวในลำไส้จำลอง (pancreatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ bile salts 0.15 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 8 โดยใช้ NaOH) ปริมาตร 50 มิลลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (37 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น รายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml (Zárate *et al.* 2000)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 180 นาที (log cfu/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log cfu/ml)}}$$

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

1.1 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 พบว่า สารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด คือ ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T และ *Br. campestris* NBRC 11547^T และในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ เชื้อ *P. fluorescens* JCM 5963^T, *P. fluorescens* TISTR 358, *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ส่วนสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกได้ แต่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้เช่นเดียวกับสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 คือสามารถยับยั้งเชื้อ *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T, *Br. campestris* NBRC 11547^T นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ เชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 (ตารางที่ 4)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกจะได้กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยเกิดควบคู่กับการลดลงของค่า pH ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากกรดอินทรีย์ทั้งกรดอะซิติกและกรดแลกติกเมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดได้ ส่งผลให้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มี pH สูงกว่าภายนอก และเกิดการแตกตัวของกรดให้อิออนลบและโปรตอน ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นเช่น substrate translocation และ oxidative phosphorylation (อรรณณ ละอองคำ. 2546) Murry *et al.* (2004) รายงานว่า การยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *C. perfringens* เกิดจากค่า pH ที่ลดลงกรดแลกติก และกรดอะซิติกที่สร้างโดย *Lb. salivarius* และ *Lb. plantarum* นอกจากนี้ Pilasombut *et al.* (2005b) พบว่า สารยับยั้งที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ไอโซเลท J9-2, J6-1, D2-6, D3-9, D1-8, D7-3, D2-8, I4-9, I4-8, C4-4 และ C3-3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. Enteritidis* DMST

17368 ได้ และ Lan *et al.* (2003) รายงานว่า สารยับยั้งที่สร้างโดย *Lb. salivarius* subsp. *salicinius* JCM 1230 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ได้มากกว่า *E. coli*

โดยทั่วไปความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลกติกมักเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ ที่ส่งผลให้เกิดการลดลงของ pH (Gonzalez *et al.* 2007) โดยระดับและชนิดของกรดอินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติก องค์ประกอบในการเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไคอะซีทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอรีโอซิน (Lindgren and Dobrogosz. 1990)

โดยส่วนใหญ่กรดอินทรีย์จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Makras and Vuyst. 2006) ส่วนแบคเทอรีโอซินเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอรีโอซิน (Leroy and De Vuyst. 1999) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลกติกภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ flavoprotein oxidases หรือ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) peroxidase การยับยั้งแบคทีเรียโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจเกิดจากการเพอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เยื่อหุ้มซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่องว่างเพิ่มขึ้น (Condon. 1987)

Pilasombut *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาโดยทำการปรับค่าความเป็นกรดและด่างของสารละลายไฮโปรอสจากเซลล์ให้มีค่าประมาณ 6 ก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่ได้เกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ จากการศึกษาพบว่า แบคเทอรีโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *E. faecalis* JCM 5803^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T นอกจากนี้ Pilasombut *et al.* (2006) พบว่าแบคเทอรีโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *B. coagulans* JCM 2257^T เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งการทดลองไม่ได้ทำการปรับค่าความเป็นกรดและด่างของสารละลายไฮโปรอสจากเซลล์ให้มีค่าประมาณ 6 ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ จึงเกิดจากการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์และแบคเทอรีโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลจากการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์และ

แบคทีเรียโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้มากกว่าผลของแบคทีเรียโอซินเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารยับยั้งที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

จุลินทรีย์ทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ	กิจกรรมการยับยั้ง	
		(°C)	K4	K7
Lactic acid bacteria				
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	30	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30	+	-
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37	-	-
<i>Lactococcus cremoris</i> TISTR 1344	MRS	30	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37	-	-
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	30	-	-
Other gram positive bacteria				
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	TSB-YE	37	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB-YE	37	+	+
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB-YE	37	+	+
<i>Brochothrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TSB-YE	26	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB-YE	37	-	-
Other gram negative bacteria				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TSB-YE	26	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB-YE	26	+	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR 1321	NB	30	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37	+	+
<i>Escherichia coli</i> TISTR 780	TSB-YE	37	-	-

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

NRBC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR= Thailand Institute of Scientific and Technological Research

+ = Inhibition zone

- = No inhibition

1.2 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นกรดของ *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^{10} cfu/ml) และ *Lb. salivarius* K7 (เชื้อเริ่มต้น 10^9 cfu/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า *Lb. salivarius* K4 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 3.0 และ 3.5 โดยมีการเจริญของเชื้อถึง 7.23 และ 7.63 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2.0 และ 2.5 ส่วนความสามารถในการทนกรดของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 พบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2.5, 3 และ 3.5 โดยมีการเจริญของเชื้อเท่ากับ 2.65, 7.11 และ 7.23 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH 2 ดังแสดงในตารางที่ 5

ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Vinderola and Reinheimer, 2003) ซึ่งค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจะแตกต่างกันตั้งแต่ 2.0-3.5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการกินอาหาร ระยะการเจริญหรือชนิดของสัตว์ โดยพบว่าค่า pH ในกระเพาะแท้และก้นของไก่ มีค่าตั้งแต่ 2.5-4.74 และการย่อยอาหารจะใช้เวลา 1-3 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร (Musikasang *et al.* 2009) จากการศึกษาศักยภาพความสามารถในการทนกรดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 โดยพิจารณาจากค่า pH ภายในระบบทางเดินอาหารของไก่ พบว่า *Lb. salivarius* K4 มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงที่ pH 3.0-3.5 แต่ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ pH ต่ำกว่า 3.0 ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จะสามารถอยู่รอดได้เมื่อผ่านกระเพาะแท้และก้นของไก่ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วงดังกล่าว ในขณะที่ภายในกระเพาะอาหารของคนมีค่า pH อยู่ระหว่าง 1.0-2.5 (McDowell and McLeod, 2007) แต่อย่างไรก็ตาม Erkkilä and Petäjä (2000) รายงานว่าเมื่อมีอาหารค่า pH ในกระเพาะอาหารจะเพิ่มขึ้นถึงระดับ pH 3 และอาหารจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารของมนุษย์นาน 2-4 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่า *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถมีชีวิตรอดในสภาวะดังกล่าว

1.3 ความสามารถในการเจริญในน้ำดีสังเคราะห์ ox-bile และน้ำดีไก่สด

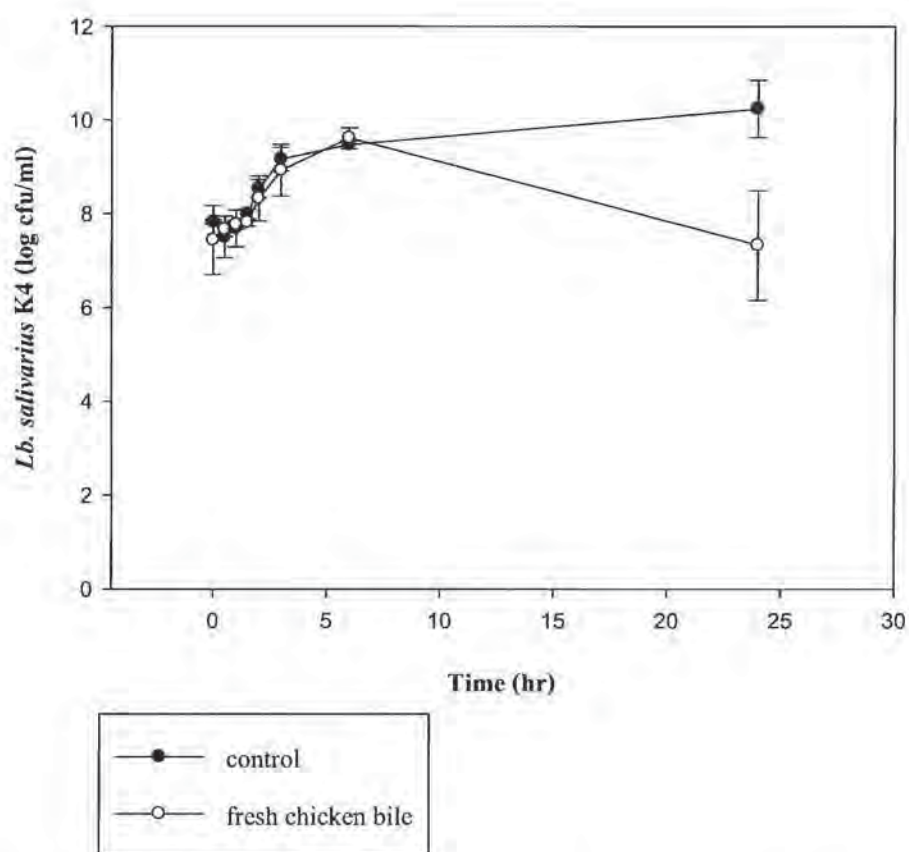
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีชนิดต่างๆ พบว่า *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^{12} cfu/ml) ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดีสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^{10} cfu/ml) สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ คือ 3, 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5) นอกจากนี้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 (เชื้อเริ่มต้น 10^7 cfu/ml) สามารถอยู่รอดได้เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดเป็นเวลา 0, 1.5, 2, 3 และ 24 ชั่วโมง จะมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตลดลงจากปริมาณเชื้อในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับน้ำดีเท่ากับ 0.38, 0.18, 0.21, 0.23 และ 2.91 log cfu/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 (เชื้อเริ่มต้น 10^9 cfu/ml) จะมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตลดลงจากปริมาณเชื้อในกลุ่มควบคุม เมื่อสัมผัสกับ bile salts ที่มีความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 6.75, 8.14 และ 8.86 log cfu/ml ตามลำดับ และสามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับ ox-bile ความเข้มข้น 6, 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 6 log cfu/ml ส่วนที่ความเข้มข้นของ ox-bile 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 5 log cfu/ml (ตารางที่ 5) นอกจากนี้เชื้อ *Lb. salivarius* K7 (เชื้อเริ่มต้น 10^7 cfu/ml) สามารถอยู่รอดได้เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำดีเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแรก พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K7 จะมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างต่อเนื่องจนถึง 1.5 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นจนถึง 24 ชั่วโมงของการสัมผัสกับน้ำดี พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง เชื้อลดลงจากกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1.26 log cfu/ml (ภาพที่ 5)

ซึ่งความสามารถในการอยู่รอดภายใต้การทำงานของน้ำดีเป็นหลักการทั่วไป ที่ใช้เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติก เนื่องจากน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยสลายอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ (Taranto *et al.* 2006) น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Noriega *et al.* 2004) ส่วนในลำไส้เล็กของไก่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 10-11 มิลลิโมลต่อกิโกรัมของอาหารที่กิน (Knarreborg *et al.* 2003) สัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบของน้ำดีแตกต่างกัน เช่น ในไก่มีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในโคมีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ และในคนมีเกลือน้ำดี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 16-27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกลือน้ำดีที่มี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ จะมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มากกว่าเกลือน้ำดีที่มี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเกลือน้ำดีที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น taurine

conjugate จึงผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง (Oomen *et al.* 2004) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบน้ำดีต่างชนิดกันคือ น้ำดี bile salts, ox-bile และน้ำดีไก่สด ทั้งนี้เพื่อเป็นการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 เพื่อนำไปใช้ในคน และสัตว์ ซึ่งจากการศึกษา พบว่า bile salts ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำดีคนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ได้ ในขณะที่ ox-bile และน้ำดีไก่สด มีผลต่อการลดลงของเชื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวไปใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์ ซึ่งจากการศึกษาของ Ehrmann *et al.* (2002) ซึ่งได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* TMW 1.970 และ TMW 1.992 ในการทนต่อ taurocholic acid ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และ ox gall ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า taurocholic acid ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวลดลงเพียงเล็กน้อย ส่วน ox-bile ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ที่มีชีวิตรอด เมื่อสัมผัสกับอาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH 2, 2.5, 3, 3.5 อาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของน้ำดี bile salts และอาหารเหลว MRS ที่มี ox-bile ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

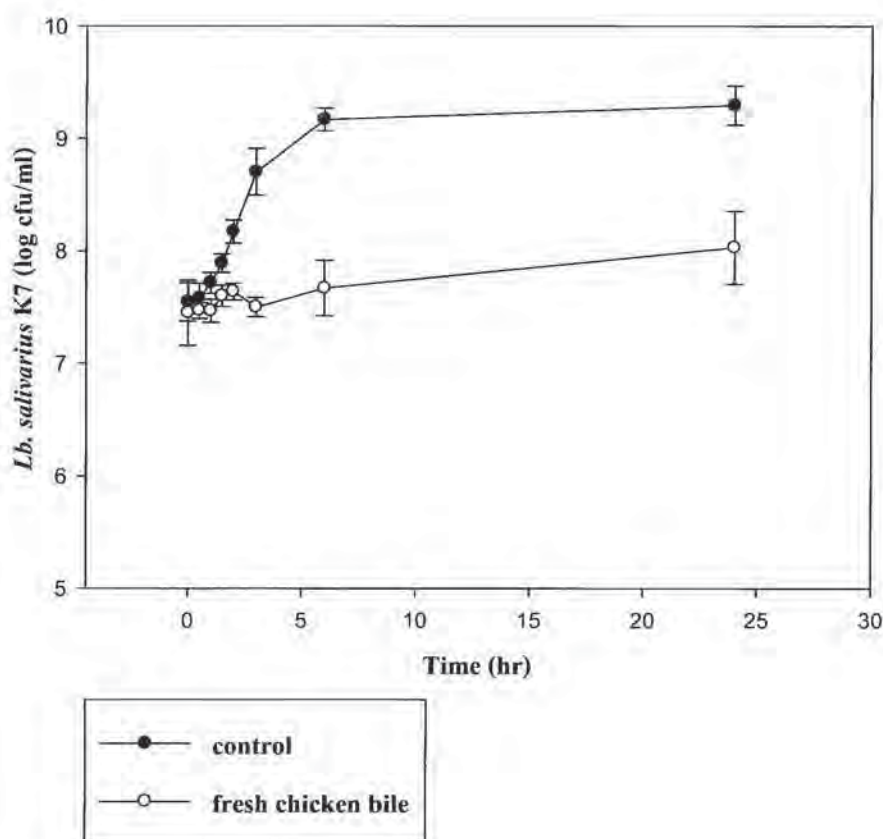
กลุ่มทดลอง	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (log cfu/ml)	
	<i>Lb. salivarius</i> K4	<i>Lb. salivarius</i> K7
pH value		
Control (6.5)	10.45±0.04	9.28±0.04
2.0	< 10	< 1
2.5	< 10	2.65±0.14
3.0	7.23±0.17	7.11±0.03
3.5	7.63±0.12	7.23±0.04
Bile salts concentration (%)		
0	11.55±1.80	9.32±0.13
0.3	< 10	3.86±0.68
0.6	< 10	1.77±0.01
1	< 10	1.39±0.01
Ox-bile concentration (%)		
0	10.77±0.03	9.17±0.04
3	6.48±0.18	5.30±0.10
6	6.91±0.30	6.30±0.20
9	7.47±0.25	6.82±0.19
12	6.43±0.26	6.62±0.20



ภาพที่ 4 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ : control หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K4 ในกลุ่มควบคุม

Fresh chicken bile หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K4 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สดที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ : control หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K7 ในกลุ่มควบคุม

Fresh chicken bile หมายถึง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K7 เมื่อสัมผัสกับน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์

1.4 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 18 ชนิด ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่นำมาใช้ในการรักษาคนและสัตว์ จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin ได้อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถถูกยับยั้งการเจริญได้โดยยาปฏิชีวนะ Ampicillins, Cephalothin, Erythromycin, Nitrofurantoin, Penicillin G, Amoxycillin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (ตารางที่ 6)

ยาปฏิชีวนะบางชนิดเช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์เติบโตเร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมาจึงปรากฏว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริม เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงอย่างกว้างขวาง ซึ่งบ่อยครั้งเกิดปัญหาขึ้น เนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินไปที่กำหนด การใช้นานเกินไป โดยไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า เป็นต้น ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อมดที่ใช้อย่างบางชนิดขึ้นโดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคนจึงทำให้เกิดปัญหาการรักษาในภายหลัง นอกจากนี้ การที่สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะบ่อยเกินไปทำให้เสียสมดุลของเชื้อประจำถิ่น ในลำไส้ความผิดปกติสามารถก่อผลร้ายต่อสัตว์ได้ ดังนั้นจึงต้องหาสิ่งมาทดแทนในลักษณะเดียวกัน คือ โปรไบโอติกปรากฏว่าใช้เป็นสิ่งเสริมในอาหารสัตว์ที่ให้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะแต่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาตามมา (อจธรา เพิ่ม. 2550)

มีรายงานว่า การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีพื้นฐานมาจาก 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ การมียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และการปรับตัวในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ ยีนต้านทานที่มีอยู่เองของแบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ โดยไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นๆ ได้ ส่วนความต้านทานที่แบคทีเรียได้รับมาอาจมีการถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นได้ ความต้านทานที่ได้รับมาช่วยให้แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้เนื่องจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจีโนม หรือการได้รับยีนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะช่วยให้เกิดการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียได้เนื่องจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการเข้าจับของยาปฏิชีวนะ ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไปสู่สัตว์และมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักซึ่งไม่ผ่านความร้อนก่อนการบริโภคจึงเป็นพาหะที่สำคัญต่อการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียไปสู่เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในสัตว์และในระบบทางเดินอาหารมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียกรดแลกติกไปสู่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (Mathur and Singh. 2005) Lactobacilli บางสายพันธุ์มียีนต้านทานที่มีอยู่เองซึ่งสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ bacitracin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, gentamicin, metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycin, sulphadiazine, teicoplanin, trimethoprim/sulphamethoxazole และ vancomycin (Danielsen and Wind. 2003) นอกจากนี้หลายๆ สายพันธุ์ของ *Lb. salivarius* มียีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นยีนที่มีอยู่เอง และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin (Elisha and Courvalin.

1995) และ D'Aimmo *et al.* (2007) รายงานว่า ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติก เป็นความสามารถของเชื้อในการที่จะอยู่รอดได้เมื่อเจ้าบ้านได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ

ตารางที่ 6 ความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (µg)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)			<i>Lb. salivarius</i> K4		<i>Lb. salivarius</i> K7	
		R	I	S	ขนาดวงใส (mm)	ความสามารถในการต้านทาน	ขนาดวงใส (mm)	ความสามารถในการต้านทาน
Ampicillins	10	≤11	12-13	≥14	25	S	25	S
Chloramphenicol	30	≤12	13-17	≥18	16	I	16	I
Cephalothin	30	≤14	15-17	≥18	28	S	28	S
Erythromycin	15	≤13	14-22	≥23	26	S	26	S
Gentamycin	10	≤12	13-14	≥15	8	R	8	R
Kanamycin	30	≤13	14-17	≥18	0	R	0	R
Nalidixic acid	30	≤13	14-18	≥19	0	R	0	R
Neomycin	30	≤12	13-16	≥17	9	R	9	R
Nitrofurantoin	300	≤14	15-16	≥17	26	S	26	S
Norfloxacin	10	≤17	18-21	≥22	0	R	0	R
Novobiocin	5	≤12	13-16	≥17	15	I	15	I
Oxolinic acid	2	≤10	-	≥11	0	R	0	R
Tetracyclin	30	≤14	15-18	≥19	8	R	8	R
Sulfamethoxazole	25/1.5	≤10	11-15	≥16	16	S	16	S
/								
Trimethoprim	30	≤14	15-18	≥19	8	R	8	R
Oxytetracyclin	10	≤19	-	≥28	28	S	28	S
Penicillin G	10	≤13	-	≥18	26	S	26	S
Amoxycillin	10	≤11	12-14	≥15	0	R	0	R
Streptomycin								

หมายเหตุ : R = Resistant

I = Intermediate

S = Susceptible

1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลอง

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการมีชีวิตรอดผ่านน้ำย่อยกระเพาะ และน้ำย่อยลำไส้จำลอง โดยน้ำย่อยจำลองที่ใช้ทดสอบ มีค่า pH ต่างๆ ได้แก่ 2, 3, 4 และ 7 จากการทดลองพบว่า *Lb. salivarius* K4 และ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยของกระเพาะที่มีค่า pH 2 ได้ ดังนั้นจึงไม่มีชีวิตเหลือรอดไปยังลำไส้ ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้น แต่พบว่า จำนวนเชื้อลดลงเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะเป็นเวลานานขึ้น โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดเพียง 4.40 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะนาน 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดเพียง 3.92 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้ 180 นาที ในขณะที่เชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยของกระเพาะได้นาน 180 นาที โดยมีชีวิตรอดถึง 5.39 log cfu/ml และสามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้จำลองได้นานถึง 180 นาที แต่มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยเป็นเวลานานขึ้น โดยมีชีวิตรอดเพียง 3.21 และ 2.61 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้ 90 และ 180 นาที ตามลำดับ เมื่อมีเชื้อเริ่มต้น 7 log cfu/ml ในน้ำย่อยที่มีค่า pH 4 ที่ระยะเวลาสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะนาน 90 และ 180 นาที เชื้อ *Lb. salivarius* K4 มีชีวิตรอดมากถึง 7.25 และ 5.07 log cfu/ml ตามลำดับ และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้จนถึงน้ำย่อยในลำไส้ แต่มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยเป็นเวลานานขึ้น โดยมีชีวิตรอด 3.32 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้เป็นเวลา 180 นาที เช่นเดียวกับ *Lb. salivarius* K7 ที่มีอัตราการรอดชีวิตในน้ำย่อยของกระเพาะที่มีค่า pH 4 สูงถึง 6.45 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะนาน 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยของลำไส้ได้นาน 180 นาที โดยมีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือเพียง 4.39 log cfu/ml ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่า pH 7 พบว่า มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อทั้งสองชนิดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือ เชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะไปจนกระทั่งถึงลำไส้ โดยมีการรอดชีวิตในกระเพาะที่เวลา 180 นาทีสูงถึง 7.45 log cfu/ml (ภาพที่ 6) ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีการรอดชีวิตลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ตั้งแต่สัมผัสกับน้ำย่อยของกระเพาะไปจนกระทั่งถึงน้ำย่อยในลำไส้เป็นเวลาทั้งหมด 6 ชั่วโมง โดยมีชีวิตรอด 6.45 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยของกระเพาะที่ 180 นาที และมีชีวิตรอด 4.53 log cfu/ml เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยของลำไส้เป็นเวลา 180 นาที (ภาพที่ 7)

การศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร มีความสำคัญต่อการคัดเลือกและพัฒนาโปรไบโอติก การศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียในสภาวะของกระเพาะ และลำไส้จำลอง จะทำการทดสอบภายใต้สภาวะของระบบสรีรวิทยา เช่นการเคลื่อนไหวแบบ peristalsis การเปลี่ยนแปลงของ pH และน้ำดีที่หลั่งออกมาจากลำไส้เล็ก (Marteau *et al.* 1997) ค่า pH ที่ต่ำและการ

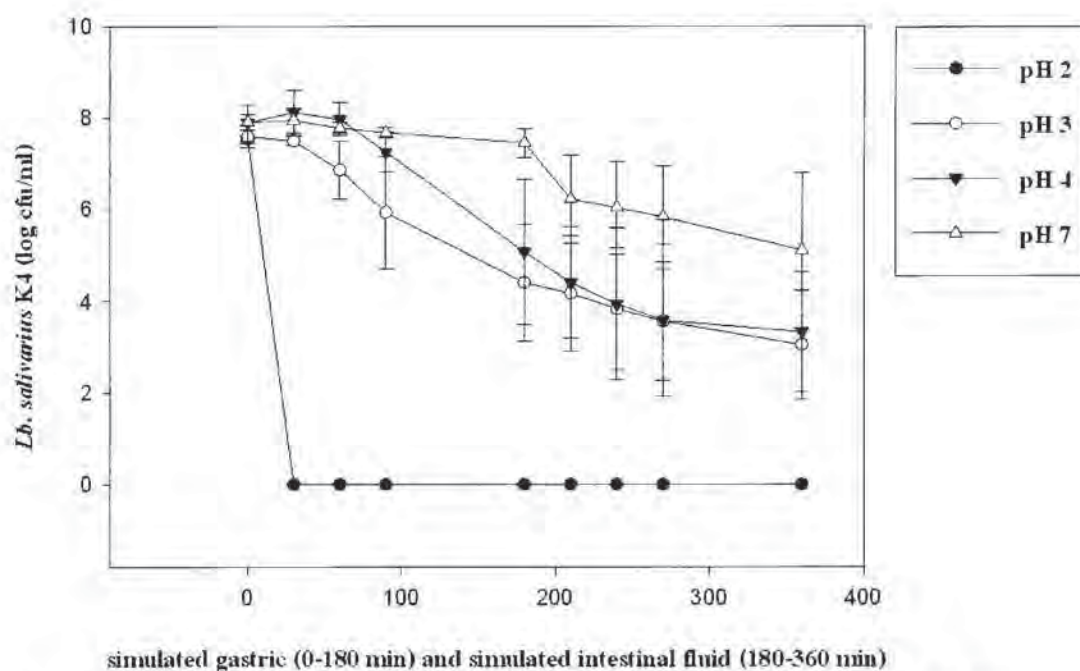
ทำลายแบคทีเรียของเอนไซม์เปปซินซึ่งพบในกระเพาะอาหาร มีผลต่อการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ (Huang and Adams, 2004) กลไกในการรักษาระดับ pH ของแบคทีเรียคือการปล่อยโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ H^+ -ATPase และใช้พลังงานจาก ATP ค่า pH ที่ต่ำสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียต้องใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นเพื่อรักษาระดับ pH ภายในเซลล์ให้อยู่ในภาวะสมดุล (McDonald *et al.* 1990) ค่าความเป็นกรดที่ pH 2 และ 3 เป็นค่า pH ที่เพียงพอต่อการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Conway *et al.* 1987) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถมีชีวิตรอดได้ในกระเพาะที่ pH 3 แต่ไม่สามารถอยู่รอดได้ที่น้ำย่อย pH 2 แต่อย่างไรก็ตาม Zárate *et al.* (2000) รายงานว่า โดยส่วนใหญ่โปรไบโอติกจะถูกบริโภคในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งในสถานะที่มีอาหารจะช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ดีขึ้นเนื่องจากอาหารและส่วนผสมในอาหารจะช่วยให้ค่า pH ภายในกระเพาะอาหารเพิ่มสูงขึ้นถึงระดับ pH 7 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อในน้ำย่อยกระเพาะจำลองที่มีค่า pH ต่างๆ คือ pH 2, 3, 4 และ 7

เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในลำไส้จำลอง แต่มีจำนวนเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยเป็นเวลานานขึ้น (ภาพที่ 6 และ 7 ตามลำดับ) ในลำไส้เล็กประกอบด้วยเกลือน้ำดีและ pancreatin ในลำไส้เล็กมีค่า pH ประมาณ 8.0 (Huang and Adams, 2004) เกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็วเป็นเหตุให้โปรตีนแทรกที่เยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) แยกออกมา ซึ่งส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาและเซลล์ตายไปในที่สุด (Begley *et al.* 2005) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่อยู่ภายในลำไส้ก็สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase) (Knarreborg *et al.* 2003) ทำให้น้ำดีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง แบคทีเรียจึงสามารถทนต่อน้ำดีได้ (Erkkilä and Petäjä, 2000)

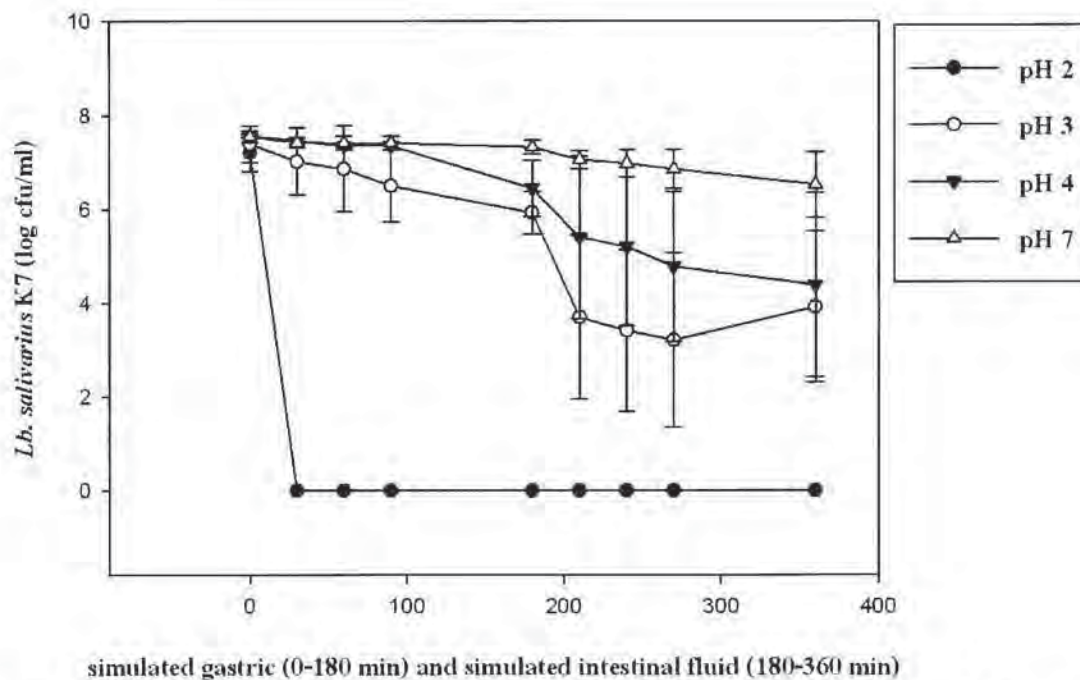
จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า สอดคล้องกับการทดลองของ Zárate *et al.* (2000) ที่พบว่าการย่อยที่ pH 4 ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของ propionibacteria ที่ทำการทดสอบ และ *P. acidipropionici* Q4 เท่านั้นที่ไวต่อการย่อยที่ pH 3 และที่ pH 2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างรวดเร็ว ในระหว่างการทดลองในกระเพาะ และ Huang and Adams (2004) ได้ทำการศึกษาผลของค่า pH ที่แตกต่างกันของน้ำย่อยในกระเพาะจำลองต่อการมีชีวิตรอดของ propionibacteria 13 ชนิด ซึ่งแยกได้จากนมโค โดยทำการทดสอบเป็นเวลา 180 นาที พบว่า propionibacteria ทั้ง 13 ชนิด สามารถมีชีวิตรอดได้ที่น้ำย่อยในกระเพาะ pH 4 ในขณะที่ในน้ำย่อย pH 3 มี propionibacteria ที่สามารถมีชีวิตรอดได้อยู่ 10 ชนิด ในขณะที่ในน้ำย่อย pH 2 ทุกสายพันธุ์มีชีวิตรอดลดลง เช่นเดียวกับ Zárate *et al.* (2000) ที่พบว่า

propionibacteria 4 สายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากนมโค สามารถมีชีวิตรอดได้ที่น้ำย่อย pH 4 และมี 1 สายพันธุ์มีชีวิตรอดลดลงเพียงเล็กน้อยที่น้ำย่อย pH 3 และทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าว มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องที่น้ำย่อย pH 2

โดยปกติแบคทีเรียกรดแลกติกจะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยในกระเพาะอาหาร จะมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกน้อยกว่า 3 log cfu/ml ในลำไส้เล็กส่วนไอเลียม (ileum) 2-5 log cfu/ml และในลำไส้ใหญ่ 4-9 log cfu/ml (Erkkilä and Petäjä. 2000) ซึ่งการที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านได้นั้น โปรไบโอติกต้องสามารถอยู่รอดได้ในระหว่างผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหาร และลำไส้ในปริมาณตั้งแต่ 6-9 log cfu/ml (Zárate *et al.* 2000) และจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า เมื่อมีเชื้อเริ่มต้น 7 log cfu/ml เมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะที่ pH 3, 4 และ 7 พบว่าเมื่อไปถึงลำไส้ *Lb. salivarius* K4 มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 2, 4 และ 4 log cfu/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 1, 3 และ 4 log cfu/ml ดังนั้นถ้าจะให้มีความปลอดภัยพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้านควรเติมเชื้อทั้ง 2 ชนิดในปริมาณเริ่มต้น 10 log cfu/ml จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งสองชนิด สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 ขึ้นไป จึงมีแนวโน้มว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้



ภาพที่ 6 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ



ภาพที่ 7 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ

สรุป

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถทนต่อกรดได้โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญในสถานะที่มีน้ำดีชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ทนต่อน้ำดี bile salts โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ไม่สามารถเจริญได้เลย ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เจริญได้บ้างเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในน้ำดี ox-bile และน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซนต์ สารยับยั้งที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T, *Br. campestris* NBRC 11547^T, *P. fluorescens* JCM 5963^T, *P. fluorescens* TISTR 358, *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 ส่วนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. coagulans* JCM 2257^T, *B. coagulans* TISTR 1447, *L. innocua* ATCC 33090^T, *Br. campestris* NBRC 11547^T, *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *S. Typhimurium* TISTR 292 เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Oxolinic acid, Tetracyclin, Oxytetracyclin และ Streptomycin เชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ไม่สามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ได้เมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะที่ pH 2 และเมื่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดสัมผัสกับน้ำย่อยที่ pH 3, 4 และ 7 เชื้อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ได้แต่จะมีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อค่า pH ของย่อยในกระเพาะลดลง และเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะและลำไส้จำลองเป็นเวลานานขึ้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 มีแนวโน้มที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 มีคุณสมบัติเบื้องต้นส่วนใหญ่เป็นโปรไบโอติก แต่มีข้อด้อยคือ ไม่สามารถทนต่อน้ำดี bile salt ได้ แต่สามารถทนและมีชีวิตรอดในน้ำดีจากสัตว์ เช่น ox-bile และน้ำดีไก่สด ดังนั้นจึงน่าจะเหมาะในการนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้เชือดังกล่าวแยกได้จากไส้ไก่ ซึ่งนับว่า *Lb. salivarius* K4 และ K7 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ในสัตว์ปีก การศึกษาต่อไปน่าจะนำเชือดังกล่าวไปใช้เป็นอาหารเสริมโปรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะสัตว์ปีกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์ให้ดีขึ้น

**การทดลองที่ 2 ผลของการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อ
แบคทีเรียของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7**

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 2 ผลของการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7

2.1 การทดสอบผลของการใช้ในไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักແໜມ (Nham model broth, NMB) (Swetwathana *et al.* 1999)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักແໜມ (วิธีการเตรียมแสดงในผนวก ก) ขวดละ 100 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แบ่งแบบจำลองการหมักແໜມออกเป็น ไม่เค็มและเค็มโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ppm โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักແໜມ มีองค์ประกอบดังนี้

ขวดที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

ขวดที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับการเค็มโซเดียมไนไตรท์ 100 ppm

2.2 การทดสอบผลของการใช้กระเทียมและ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ที่มีต่อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักແໜມ (Swetwathana *et al.* 1999)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักແໜມ ขวดละ 100 มิลลิลิตรจำนวน 6 ขวด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และคัดสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ppm โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักແໜມ มีองค์ประกอบดังนี้

ขวดที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

ขวดที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ขวดที่ 3 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

ขวดที่ 4 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

ขวดที่ 5 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

(วิธีการเตรียมกระเทียมสดปลอดเชื้อแสดงในภาคผนวก ก)

ขวดที่ 6 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำมันพาราฟินทุกขวด นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า pH ปริมาณกรดแลกติก และตรวจหาปริมาณของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE Agar และ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ด้วย MRS agar และทำการยืนยันเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยการสุมโคโลนีไปวางบนอาหาร XLD agar ถ้าเป็นเชื้อ *Salmonella* จะให้โคโลนีเป็นสีชมพูใส มีจุดดำตรงกลาง

2.3 ผลของการใช้สารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus* K4 และ K7 ร่วมกับกรดแลกติก ต่อจำนวนเชื้อ *Salmonella* Typhimurium

2.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus salivarius* K4 และ *Lactobacillus salivarius* K7 จาก stock culture ที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 5 มิลลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิตร บ่ม 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิตร ไป centrifuge 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่เป็นแบคทีเรียโอซินจากเชื้อที่ได้มาใช้ แบ่งเป็น 2 หลอด หลอดละ 4 มิลลิตร กรองด้วยกระดาษกรองจุลินทรีย์ (0.2 μ) จะได้ส่วนที่เป็นแบคทีเรียโอซินออกมา

การเตรียมเชื้อ *Salmonella* Typhimurium โดยนำเชื้อจาก stock culture ที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว TSB-YE broth ปริมาตร 5 มิลลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในอาหารเหลว TSB-YE broth ปริมาตร 50 มิลลิตร บ่ม 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว TSB-YE broth ปริมาตร 5 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหาร TSB-YE ใส่ขวดให้มีปริมาตรขวดละ 50 มิลลิตร จำนวน 8 ขวดโดยใช้กรดแลกติกในการปรับค่า pH ให้ได้ค่า pH เป็น 4.5, 5, 5.5 และ 6 อย่างละ 2 ขวดตามลำดับ

2.3.2 วิธีการทดลอง

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Veerawanayotin *et al.* (2010) โดยนำเชื้อ *S. Typhimurium* 1% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เตรียมเอาไว้ใส่ในอาหาร TSB-YE ขวดละ 50 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้โดยปรับค่า pH ด้วยกรดแลกติกให้มีค่า pH 4.5, 5, 5.5 และ 6 ใส่เชื้อปริมาณ 10^8 log cfu/ml ทุกขวดจำนวน 8 ขวด เดิม แบคทีเรียโอซินปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด ส่วนอีก 4 ขวดคือกลุ่มควบคุม คือไม่เติมสารแบคทีเรียโอซิน วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดที่เวลาการบ่มที่ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ standard plate count โดยการคูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดอาหารเจือจาง 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าหลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (vortex) ให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} (1:10) ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางระดับต่อไปนี้คือ 10^{-2} (1:100) และ 10^{-3} (1:1,000) ตามลำดับ ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนอาหารปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร โดยวิธี spread plate ลงบนอาหาร TSB-YE + agar เมื่ออาหารแข็งตัวนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml

2.4 การทดสอบผลของการใช้ *Lb. salivarius* K7 ที่มีต่อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในผลิตภัณฑ์หมักเนื้อโค (ดัดแปลงจาก Swetwathana *et al.* 2007)

เตรียมหมักซึ่งมีส่วนผสมดังนี้คือ เนื้อโคสด 3.8 กิโลกรัม เอ็นโคสุก 1.2 กิโลกรัม ข้าวสุก 400 กรัม กระเทียมสด 400 กรัม เกลือไนไตรท์ 110 กรัม ฟอสเฟต 20 กรัม น้ำตาลทราย 20 กรัม โมโนโซเดียมกลูตาเมต 10 กรัม ผสมส่วนผสมทั้งหมดแล้ววนจนส่วนผสมเหนียวอัดแน่นปริมาณ 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกขนาด 10 x 14 เซนติเมตร คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติดีที่สุดมา 1 สายพันธุ์ คือ *Lb. salivarius* K7 แบ่งตัวอย่างหมักทั้งหมดออกเป็น 4 ตัวอย่างดังนี้คือ

ตัวอย่างที่ 1 ไม่เติมเชื้อ ใช้เป็นกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K7 (10^6 cfu/g)

ตัวอย่างที่ 3 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 (10^2 cfu/g)

ตัวอย่างที่ 4 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ผสมให้เชื้อเข้ากันกับหมักจากด้านบนออกจากรีดเอาอากาศออก มัดให้แน่น และปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน หลังจากการหมักวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 นำหมักแต่ละตัวอย่างออกมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของตัวอย่างหมัก

2.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของตัวอย่างเหวมเนื้อโค

1. วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติก (ดัดแปลงจาก AOAC. 1984 โดย นภา

โล่ห์ทอง. 2529)

ชั่งตัวอย่างเหวม 3 กรัม บดให้ละเอียด (แบบจำลองการหมักเหวม 3 มิลลิเมตร) เติมน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดเพื่อไล่คาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาตร 50 มิลลิตร นำน้ำใส่ที่ได้ไปเคี่ยวละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ 2-3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ จะเกิดสีชมพู คำนวณปริมาณกรดแลกติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลกติก} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1,000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

1,000 x ปริมาตรของตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้

2. การวัดค่า pH (ดัดแปลงจาก AOAC. 1984 โดย นภา โล่ห์ทอง 2529)

นำตัวอย่างเหวม 10 กรัม มาบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิตร วัดด้วย

เครื่อง pH meter

3. การวัดค่า water activity (ตามคู่มือการใช้งานของเครื่องวัดค่า a_w รุ่น

LabMASTER a_w)

4. วิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างเหวม

4.1 ตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก (AOAC. 2006)

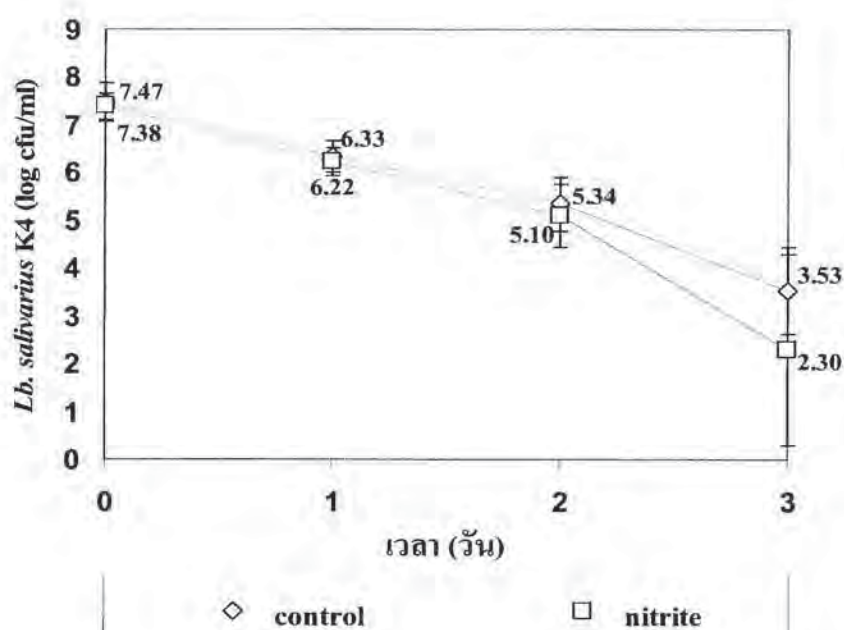
สุ่มตัวอย่างเหวมตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยสารละลายเปปโตเน ปริมาตร 225 มิลลิตร จะได้สารละลายเปปโตเน ที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นคูดสารละลายเปปโตเน ที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 0.1 มิลลิตร ถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS Agar ที่เติม CaCO_3 (0.5 เปอร์เซ็นต์) spread ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ นับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี

2.1 ผลของการใช้ในไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม

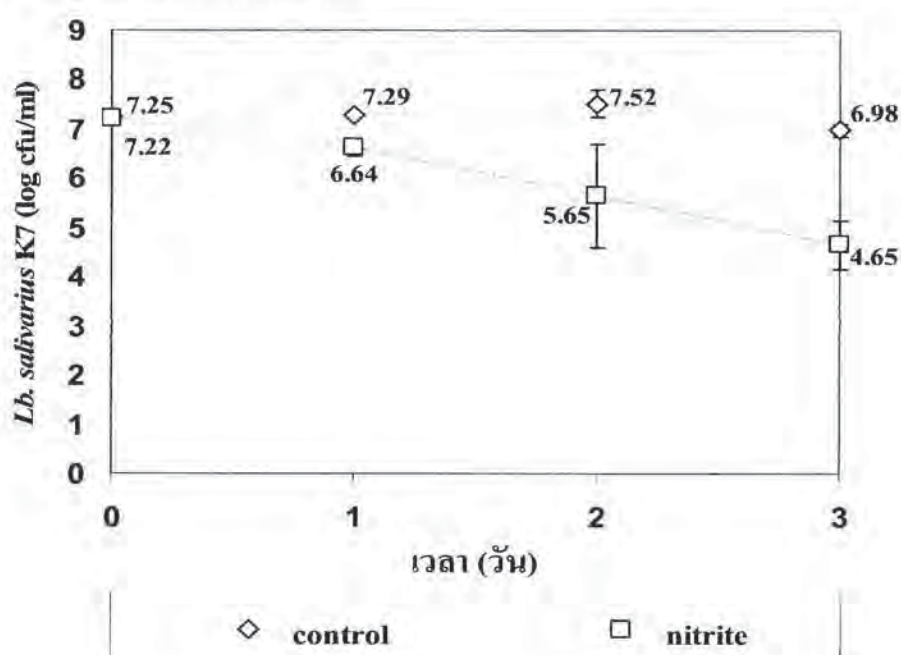
ไนไตรท์ถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเพื่อช่วยพัฒนาสีของผลิตภัณฑ์ ช่วยป้องกันการหืนของไขมัน และช่วยในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonellae* และ *Clostridia* ความเข้มข้นของไนไตรท์ที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 20-200 ppm ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Leroy and De Vuyst, 1999) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในการทนต่อไนไตรท์ เพื่อคัดเลือกเชื้อดังกล่าวสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตเหนมจากการทดสอบความสามารถในการทนต่อไนไตรท์ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น แบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 และแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm พบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมและไม่เติมไนไตรท์มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในกลุ่มที่ไม่ได้เติมไนไตรท์มีชีวิตรอดสูงกว่าเชื้อในกลุ่มที่เติมไนไตรท์ลงไป คือ ในกลุ่มที่ไม่ได้เติมไนไตรท์เชื้อมีชีวิตรอด $3.53 \log \text{ cfu/ml}$ ในขณะที่เชื้อในกลุ่มที่เติมไนไตรท์ลงไปมีชีวิตรอดเพียง $2.30 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก (ภาพที่ 8) ในทำนองเดียวกัน เชื้อ *Lb. salivarius* K7 ทั้งกลุ่มที่เติมและไม่เติมไนไตรท์มีชีวิตรอดลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 ของกระบวนการหมักเช่นเดียวกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมไนไตรท์ลงไป พบว่าเชื้อในกลุ่มที่ทำการเติมไนไตรท์ลงไปจะมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตต่ำกว่า คือในกลุ่มที่ไม่เติมไนไตรท์มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด $6.98 \log \text{ cfu/ml}$ ส่วนเชื้อในกลุ่มที่เติมไนไตรท์ลงไปมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดเพียง $4.65 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก (ภาพที่ 9)

ไนไตรท์ช่วยส่งเสริมความเป็นพิษของกรดแลกติกถ้าความสามารถในการป้องกัน ตัวเองของแบคทีเรียลดลง ก็จะทำให้การสะสมของไนไตรท์อยู่ในเซลล์ ซึ่งไนไตรท์สะสมอยู่จะไปรบกวนกระบวนการ *active transport* ของเซลล์ (Leroy and De Vuyst, 1999)

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะสังเกตเห็นได้ว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ทนต่อไนไตรท์ที่เติมลงในแบบจำลองการหมักเหนมความเข้มข้น 100 ppm ได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 กล่าวคือ เชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีชีวิตรอดถึง $4.65 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก ในขณะที่เชื้อ *Lb. salivarius* K4 มีชีวิตรอดเพียง $2.30 \log \text{ cfu/ml}$ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตเหนมต่อไป



ภาพที่ 8 ผลของไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเหนม



ภาพที่ 9 ผลของไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเหนม

2.2 ศึกษาผลการใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกร่วมกับกระเทียมในการทำลายเชื้อ *Salmonella* ในแบบจำลองการหมักเห็ด

2.2.1 ผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอด และการสร้างกรดแลกติก ของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักเห็ด

จากการศึกษาผลของกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการนำไปใช้ในเห็ดจริงโดยสูตรทั่วไปของเห็ดหมักใช้กระเทียมประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาผลของกระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักเห็ด พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถเจริญได้ในแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมและไม่เติมกระเทียม แต่มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการหมักเป็นเวลา 3 วัน โดยในวันที่ 1, 2 และ 3 ของการหมัก ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อต่ำกว่าปริมาณเชื้อในแบบจำลองการหมักเห็ดที่ไม่ได้เติมกระเทียมในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก (ภาพที่ 10) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ตลอดระยะเวลาในการหมักเห็ดเป็นเวลา 3 วันแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมกระเทียมมีค่า pH ลดลง (ตารางที่ 7) และมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าแบบจำลองการหมักเห็ดที่ไม่เติมกระเทียม (ภาพที่ 11) ซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณเชื้อดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในวันที่ 0 และ 1 ของการหมัก ปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมกระเทียมมีปริมาณสูงกว่าปริมาณเชื้อในแบบจำลองการหมักเห็ดที่ไม่เติมกระเทียม ดังนั้นจึงส่งผลให้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมกระเทียมสร้างกรดแลกติกได้สูงในช่วงแรกของการหมัก และกรดแลกติกยังคงอยู่ในแบบจำลองการหมักเห็ดตลอดระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 3 วัน ส่วนผลของกระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* K7 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ในแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมและไม่เติมกระเทียมแต่มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2 วันของการหมัก และในวันที่ 3 ของการหมักเชื้อสามารถเจริญได้เพิ่มขึ้นจากการหมักวันที่ 2 ในวันที่ 1 และ 2 ของการหมักปริมาณเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมกระเทียมมีปริมาณสูงกว่าปริมาณเชื้อในแบบจำลองการหมักเห็ดที่ไม่เติมกระเทียม และตลอดระยะเวลาในการหมักเห็ดเป็นเวลา 3 วันแบบจำลองการหมักเห็ดที่เติมกระเทียมมีค่า pH ลดลงต่ำกว่า (ตารางที่ 7) และมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าแบบจำลองการหมักเห็ดที่ไม่เติมกระเทียม (ภาพที่ 11) ซึ่งจากการศึกษาของ Verluyten *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาผลของกระเทียมที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก โดยทำการศึกษาในสภาวะการหมักเนื้อ

จำลอง พบว่า กระเทียม 0.35 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เชื้อ *Lb. curvatus* LTH 1174 มีการเจริญลดลง 1.5 log cfu/ml ใน 28 ชั่วโมงแรกแต่หลังจากนั้นเชื้อสามารถกลับมาเจริญได้อีก

ตารางที่ 7 ค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมและไม่เติมกระเทียม

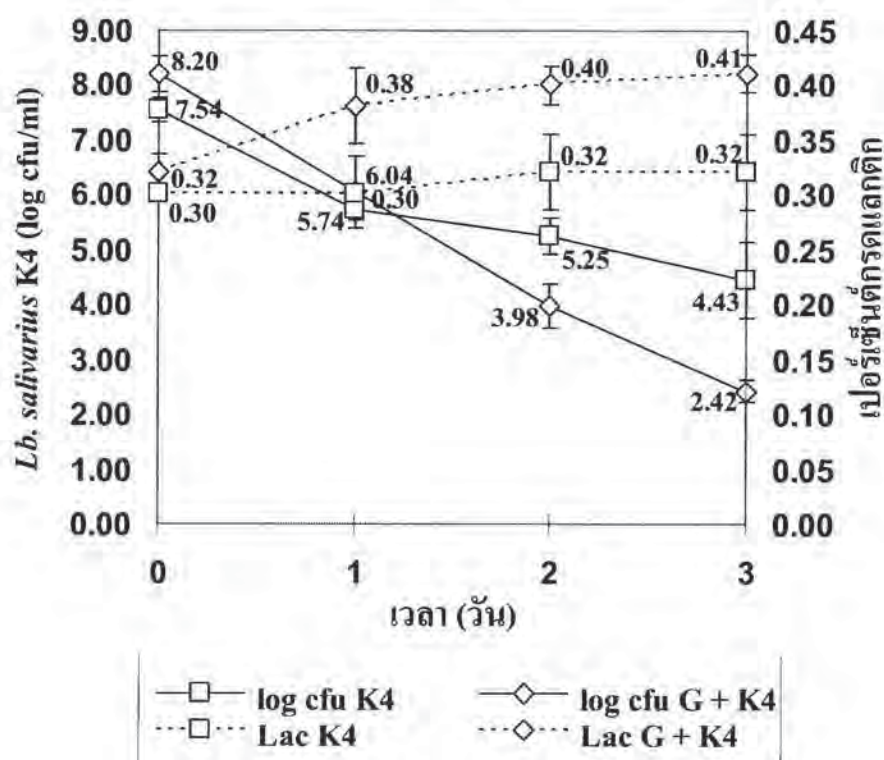
แบบจำลองการหมักเหวม	ค่า pH			
	จำนวนวันในการหมัก (วัน)			
	0	1	2	3
K4	5.64±0.11	5.34±0.21	5.20±0.17	5.11±0.16
G + K4	5.31±0.37	4.68±0.22	4.62±0.16	4.50±0.06
K7	5.80±0.10	5.05±0.09	4.96±0.06	4.88±0.04
G + K7	5.78±0.10	4.85±0.24	4.68±0.26	4.61±0.24

หมายเหตุ : K4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4

G + K4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมกระเทียม

K7 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7

G + K7 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักเหวมที่เติมกระเทียม



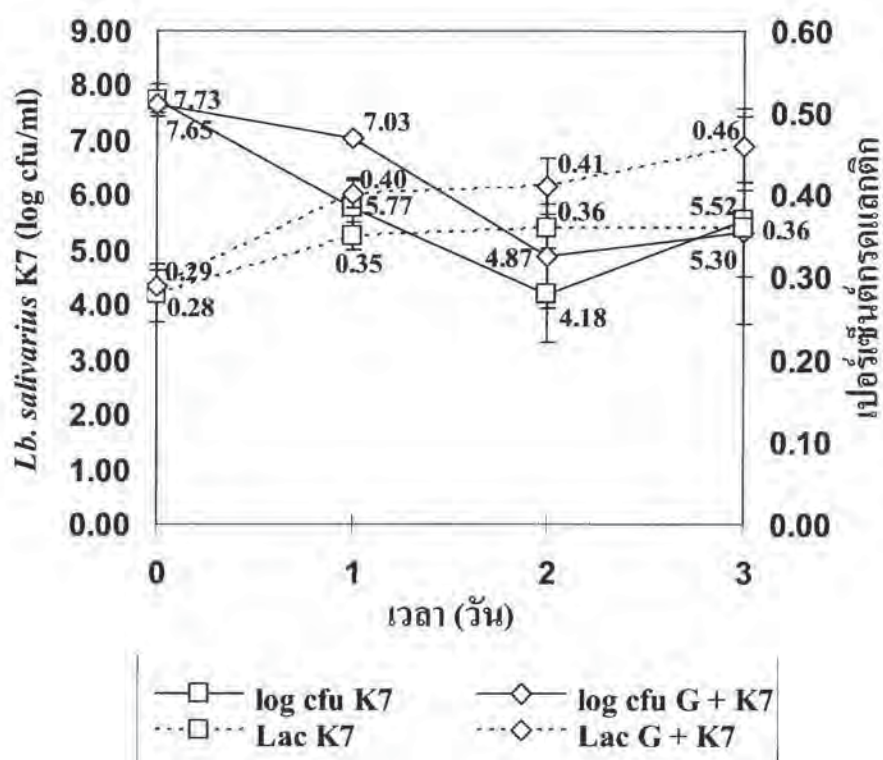
ภาพที่ 10 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และปริมาณการสร้างกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติม และไม่เติมกระเทียม

หมายเหตุ : log cfu K4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4

log cfu G + K4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมกระเทียม

Lac K4 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4

Lac G + K4 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ร่วมกับกระเทียม



ภาพที่ 11 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ ปริมาณการสร้างกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักหมักที่เต็ม และไม่เต็มกระเทียม

หมายเหตุ : log cfu K7 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7

log cfu G + K7 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในแบบจำลองการหมักหมักที่เต็มกระเทียม

Lac K7 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักหมักที่เต็มเชื้อ *Lb. salivarius* K7

Lac G + K7 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักหมักที่เต็มเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับกระเทียม

2.2.2 ผลของการใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักหมัก

ผลของการใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักหมัก เทียบกับแบบจำลองการหมักหมักที่เต็มกระเทียม หรือ เชื้อ *Lb. salivarius* K4 เพียงอย่างเดียว จากการศึกษ

พบว่า การใช้กลูต้าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือกระเทียมเพียงอย่างเดียวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 เจริญได้ลดลงในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ส่วนการใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการหมักแบบจำลองการหมักแหมน (ภาพที่ 12) เช่นเดียวกับผลของการใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่พบว่า การใช้กลูต้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 หรือกระเทียมเพียงอย่างเดียวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก ส่วนการใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการหมัก (ภาพที่ 13) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Swetwiwathana *et al.* (1999) ที่พบว่า การใช้กลูต้าเชื้อ *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* และ *P. acidilactici* ร่วมกับกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ในวันแรกของการหมัก

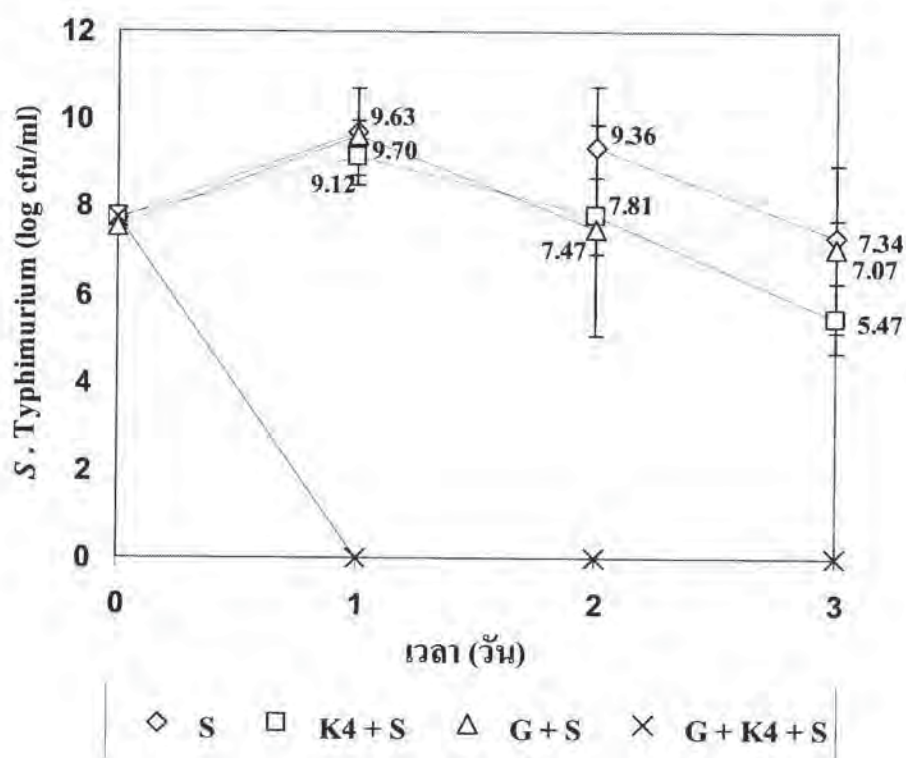
เป็นที่น่าสังเกตว่า การใช้ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับกระเทียมมีผลในการทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก ในขณะที่ค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สูงกว่าค่า pH ของกลุ่มทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 8) ส่วนค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius* K7 มีค่าสูงกว่าค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 และแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลการทำงานร่วมกันของกระเทียม แบคทีเรียโอซิน และกรดอินทรีย์ที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกมักเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ ที่ส่งผลให้เกิดการลดลงของ pH (Gonzalez *et al.* 2007) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไดอะซีทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน (Lindgren and Dobrogosz. 1990) ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด คือ Salivaricin B และ Salivacin K (Pilasombut. 2006) และเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน abp118α ได้ (Pilasombut. 2006) และในกระเทียมยังประกอบด้วยสาร allicin ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Swetwiwathana *et al.* 1999) กระเทียมที่โตเต็มที่ที่มีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น cysteine sulfoxides และเมื่อถูกสับให้ละเอียดเอนไซม์ allinase จะถูกปล่อยออกมา ซึ่งเอนไซม์ allinase จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน cysteine sulfoxides เป็น thiosulfates ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา เป็นสารระเหย

สร้างกลิ่น และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Benkeblia, 2004) กระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคในอาหารจำนวนมากทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจาก allicin ที่พบในกระเทียมจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับโปรตีนที่มีส่วนประกอบของ thiol และสามารถผ่านเข้าสู่ Phospholipids bilayers ได้อย่างอิสระ และสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีองค์ประกอบของ thiol ที่อยู่ในเซลล์ได้ (Verluyten *et al.* 2004) ซึ่งผลการทำงานร่วมกันของสารต่างๆนี้อาจมีผลทำให้จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ลดลงอย่างรวดเร็ว และหมดไปได้ภายใน 24 ชั่วโมง มีรายงานเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียโอซินและกระเทียมในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรค (Kim *et al.* 2008) นอกจากนี้ Swetwathana *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาผลการทำงานร่วมกันของ pH ที่ต่ำโดยใช้กรดแลกติก ร่วมกับแบคทีเรียโอซิน pediocin PA-1 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Anatum* จากการศึกษาพบว่า เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่ถูกทำลาย และทำการศึกษาในแบบจำลองการหมักแหมนโดยใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกลีเซอรอลที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน pediocin จากการศึกษาพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ดีกว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่ไม่เติมกลีเซอรอล และแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมกลีเซอรอลที่ไม่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

เมื่อพิจารณาถึงแบบจำลองการหมักแหมนที่มีการเติมกระเทียมอย่างเดียว หรือแบบจำลองการหมักแหมนที่มีการเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 เพียงอย่างเดียว พบว่า แบบจำลองการหมักแหมนที่มีการเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ผลดีรองจากการเติมทั้งกระเทียมและเชื้อ เนื่องด้วยการทำงานร่วมกันของกระเทียม แบคทีเรียโอซิน และกระเทียม จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ดีกว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่ไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7

ตารางที่ 8 ค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหมนที่ใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4

แบบจำลองการหมักแหมน	ค่า pH			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
S	5.86±0.08	4.31±0.10	4.12±0.05	4.07±0.10
K4 + S	5.65±0.06	4.34±0.07	4.17±0.03	4.08±0.10
G + S	5.70±0.07	5.04±0.67	4.84±0.74	4.32±0.06
G+ K4 + S	5.38±0.33	4.71±0.27	4.65±0.24	4.47±0.14



ภาพที่ 12 จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

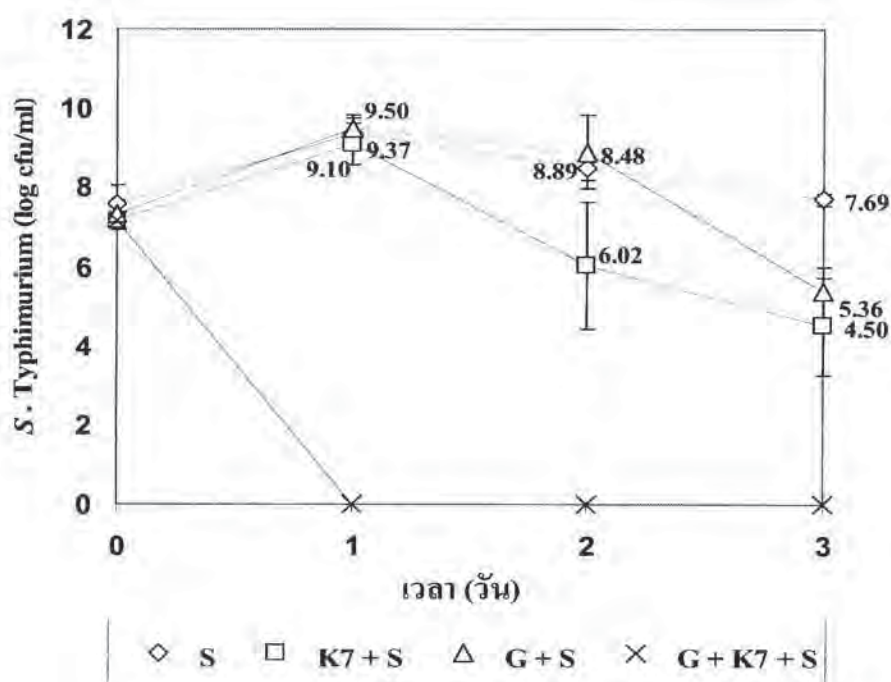
K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + K4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

ตารางที่ 9 ค่า pH ของแบบจำลองการหมักແໝັກທີ່ใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* K7

แบบจำลองการหมัก ແໝັກ	ค่า pH			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
S	5.89±0.03	4.48±0.08	4.16±0.04	4.11±0.03
K7 + S	5.81±0.10	4.26±0.09	3.99±0.04	3.83±0.06
G + S	5.87±0.09	5.08±0.56	4.86±0.71	4.81±0.70
G + K7 + S	5.74±0.16	4.72±0.46	4.59±0.32	4.58±0.33



ภาพที่ 13 จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมักແໝັກ

หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
 K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และ *S. Typhimurium* TISTR 292
 G + K7 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

2.3 ศึกษาผลของการสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lb. salivarius* K 4 และ K 7 ร่วมกับกรดแลกติกที่มีต่อเชื้อ *S. Typhimurium*

2.3.1 ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K 4 ร่วมกับกรดแลกติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Typhimurium*

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus salivarius* K4 ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Typhimurium* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ที่ปรับค่า pH ด้วยกรดแลกติกให้มีค่า pH 4.5, 5, 5.5 และ 6 ตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอดที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน จากนั้นนำมาตรวจหาเชื้อ *Salmonella Typhimurium* ในอาหาร TSA โดยวิธีการ pour plate จากการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 เชื้อ *Salmonella Typhimurium* ในสภาวะเป็นกรดที่มีค่า pH 4.5 มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน $6.71 \log \text{cfu/ml}$ เมื่อเวลากรบ่มเพิ่มขึ้นเชื้อมีชีวิตรอดลดลงโดยเวลาการบ่มชั่วโมงที่ 6, 12 และ 18 พบว่าจำนวนเชื้อลดลงเหลือ 6.04 , 5.47 และ $3.99 \log \text{cfu/ml}$ ตามลำดับและเมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมงพบว่าเชื้อไม่มีชีวิตรอดอยู่สภาวะนี้เลย แต่เมื่อสภาวะการเป็นกรดที่ค่า pH 5, 5.5 และ 6 ตามลำดับ มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน 6.75 , 7.73 และ $7.61 \log \text{cfu/ml}$ เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 30 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวน 8.06 , 8.44 และ $8.60 \log \text{cfu/ml}$ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhimurium*

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.71 ± 0.25	6.75 ± 0.42	7.73 ± 0.84	7.61 ± 0.61
6	6.04 ± 0.05	7.46 ± 1.05	8.01 ± 0.27	8.27 ± 0.31
12	5.47 ± 0.45	8.05 ± 0.20	8.35 ± 0.28	8.78 ± 0.21
18	3.99 ± 0.13	8.08 ± 0.15	8.65 ± 0.11	8.69 ± 0.23
24	00	8.07 ± 0.08	8.51 ± 0.07	8.68 ± 0.02
30	00	8.06 ± 0.07	8.44 ± 0.40	8.60 ± 0.33

แต่ในขณะเดียวกันในกลุ่มที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เพียงกรดแลกติกพบว่าเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในสถานะเป็นกรดที่มีค่า pH 4.5 มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน $6.60 \log \text{cfu/ml}$ เมื่อผ่านไป 30 ชั่วโมงพบว่า เชื้อมีจำนวน $5.65 \log \text{cfu/ml}$ มีปริมาณลดลงจากชั่วโมงที่ 0 เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อสถานะการเป็นกรดที่ค่า pH 5, 5.5 และ 6 ตามลำดับ มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน 6.83, 7.86 และ $7.91 \log \text{cfu/ml}$ ตามลำดับเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 30 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวน 8.28, 8.49 และ $8.90 \log \text{cfu/ml}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium เมื่อไม่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.60 ± 0.33	6.83 ± 0.30	7.86 ± 0.54	7.91 ± 0.60
6	6.12 ± 0.22	7.90 ± 0.03	8.19 ± 0.16	8.33 ± 0.21
12	6.09 ± 0.11	8.32 ± 0.19	8.31 ± 0.71	8.82 ± 0.11
18	5.95 ± 0.09	8.37 ± 0.08	8.68 ± 0.06	8.99 ± 0.45
24	5.86 ± 0.21	8.35 ± 0.09	8.60 ± 0.04	8.79 ± 0.16
30	5.65 ± 0.41	8.28 ± 0.13	8.49 ± 0.48	8.90 ± 0.13

2.3.2 ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K7 ร่วมกับกรดแลกติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus salivarius* K7 ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ที่ปรับค่า pH ด้วยกรดแลกติกให้มีค่า pH 4.5, 5, 5.5 และ 6 ตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอดที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน จากนั้นนำมาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในอาหาร TSA โดยวิธีการ spread plate จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K7 เชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในสถานะเป็นกรดที่มีค่า pH 4.5 มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน $6.82 \log \text{cfu/ml}$ เมื่อเวลากรบ่มเพิ่มขึ้นเชื้อมีชีวิตรอดลดลงโดย

เวลาการบ่มชั่วโมงที่ 6, 12, 18, 24 และ 30 พบว่าจำนวนเชื้อลดลงเหลือ 7.43, 6.79, 5.89, 4.82 และ 4.21 log cfu/ml ตามลำดับ แต่เมื่อสภาวะการเป็นกรดที่ค่า pH 5, 5.5 และ 6 ตามลำดับ มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน 6.88, 7.31 และ 7.33 log cfu/ml เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 30 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวน 8.18, 8.36 และ 8.56 log cfu/ml ตามลำดับ ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K7 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.82 ± 1.47	6.88 ± 0.59	7.31 ± 0.49	7.33 ± 0.61
6	7.43 ± 1.57	7.68 ± 0.42	8.26 ± 0.22	8.56 ± 0.28
12	6.79 ± 1.45	8.00 ± 0.29	8.68 ± 0.23	8.7 ± 0.30
18	5.89 ± 1.33	8.11 ± 0.14	8.38 ± 0.21	9.00 ± 0.32
24	4.82 ± 1.14	8.16 ± 0.12	8.16 ± 0.20	8.88 ± 0.28
30	4.21 ± 1.28	8.18 ± 0.14	8.36 ± 0.30	8.56 ± 0.36

แต่ในขณะเดียวกันในกลุ่มที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เพียงกรดแลคติกพบว่าเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในสภาวะเป็นกรดที่มีค่า pH 4.5 มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน 6.78 log cfu/ml เมื่อผ่านไป 30 ชั่วโมงพบว่าเชื้อมีจำนวน 4.42 log cfu/ml มีปริมาณลดลงจากชั่วโมงที่ 0 เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อสภาวะการเป็นกรดที่ค่า pH 5, 5.5 และ 6 ตามลำดับ มีปริมาณเชื้อชั่วโมงที่ 0 จำนวน 6.91, 7.29 และ 7.34 log cfu/ml เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 30 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวน 8.25, 7.91 และ 8.68 log cfu/ml ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium เมื่อไม่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K7

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.78 ± 1.07	6.91 ± 0.67	7.29 ± 0.67	7.34 ± 0.69
6	7.60 ± 1.13	7.02 ± 0.59	7.92 ± 0.54	8.36 ± 0.37
12	6.39 ± 0.78	7.94 ± 0.35	8.78 ± 0.54	9.14 ± 0.28
18	5.84 ± 0.69	8.26 ± 0.15	8.78 ± 0.60	9.17 ± 0.26
24	5.51 ± 0.66	8.27 ± 0.14	8.77 ± 0.71	8.98 ± 0.22
30	4.42 ± 0.17	8.25 ± 0.190	7.91 ± 0.88	8.68 ± 0.13

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ร่วมกับกรดแลกติก ในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* พบว่าในสภาวะที่ค่า pH เป็น 4.5 เชื้อ *S. Typhimurium* ไม่สามารถมีชีวิตรอดเมื่ออยู่ในสภาวะนี้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป แต่เมื่อสภาวะที่ค่า pH เป็น 5, 5.5 และ 6 ตามลำดับ เวลาเพิ่มมากขึ้นเชื้อสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนขึ้นได้ โดย ธัญรดา (2553) รายงานถึงผลของแบคทีเรียโอซินว่า แบคทีเรียโอซิน มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ ได้หลายชนิดมากขึ้น รวมทั้งชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และชนิดที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ ปิยนันต์ 2552 กล่าวว่า แบคทีเรียโอซิน จะทำให้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ถูกทำลาย มีการนำแบคทีเรียโอซินมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร พบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายกลุ่ม Ocana *et al.* (1999) ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *Salivarius* CRL 1328 ที่แยกได้จากช่องคลอดมนุษย์ พบว่ามีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis*, *E. faecium* และ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค Pilsombut (2006) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกจากไส้ไก่ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน โดยพบแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ 2 ชนิด คือ Salivaricin B และ Savicin K นอกจากนี้ยังพบยีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ abp118B ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC118 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *Sakei* JCM1157^T, *Lec. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* JCM6124^T, *E. faecalis* JCM5803^T, *B. coagulans* JCM2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC11547^T การใช้กรดแลกติกใน

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค Bojana and Irena (1998) รายงานว่า กรดแลกติกจัดเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับ โพรพิโอนิก กรดซอบิก และกรดอะซิติก เป็นต้น มีความสามารถในการยับยั้งในขอบเขตที่จำกัดความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรดอินทรีย์ขึ้นอยู่กับค่า pH โดยพบว่ากลไกการยับยั้งเชื้อเกิดจากกรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูป undissociated แพร่ผ่านชั้น cell membrane และ lipid bilayer ที่มีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ เมื่อกรดแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้เซลล์มีค่า pH ต่ำลง แบคทีเรียจึงกำจัดกรดออกสู่ภายนอก โดยมีโปรตอนถูกขับออกมาภายนอกจนให้พลังงานหมดไปตลอดจนเกิดการรบกวนการเข้าออกของสารจนทำให้เซลล์ตายในที่สุด Pipek *et al.* (2004) รายงานว่าการใช้กรดแลกติกในการลดจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้ในระดับความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจใช้ในขั้นตอนที่แตกต่างกันได้ในแต่ละโรงฆ่าและได้นำมาใช้บนซากสัตว์ภายหลังฆ่าให้เร็วที่สุด เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนผิวซากไม่ให้เจริญและแพร่ตัวลงไปในเนื้อเยื่อสัตว์ การใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Salmonella* spp. จะถูกทำลายและลดจำนวนลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่ต่ำกว่า pH 5 เมื่อทดสอบโดยใช้กรดแลกติกทั้งในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินและไม่เติมแบคทีเรียโอซิน แต่กลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินจะยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ดีกว่า กลุ่มที่ไม่เติมแบคทีเรียโอซิน อาจกล่าวได้ว่าเมื่อนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. อย่างเดียวอาจไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. เท่ากับการใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับสารอื่นที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเช่นกัน ธีธรรดา (2553) ได้ศึกษาการใช้กระเทียมร่วมกับ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 พบว่าการใช้เกลือ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 หรือกระเทียมเพียงอย่างเดียวไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันแรกของการหมัก แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 เจริญได้ลดลงในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ส่วนการใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการหมักแบบจำลองการหมักแฮม

2.4 ผลของการใช้เชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตแฮมเนื้อโค

2.4.1 ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของผลิตภัณฑ์แฮมเนื้อโค

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และคุณสมบัติการเป็นเกลือของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 พบว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีน้ำดี และสามารถอยู่รอดได้ภายในระบบทางเดินอาหารจำลอง

ทนต่อไนไตรท์ และมีการเจริญในสภาวะของแบบจำลองการหมักแหมนได้ดีกว่า *Lb. salivarius* K4 ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เพื่อนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการเป็นกล้ำเชื้อในการหมักแหมน จากการทดลองผลิตแหมนโดยแบ่งตัวอย่างแหมนออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำการหมักโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลงไป และกลุ่มที่ทำการหมักโดยเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลงไป 10^6 cfu/g แล้วทำการหมักเปรียบเทียบกับกรหมักแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกล้ำเชื้อ พบว่า ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของแหมนที่เติมกล้ำเชื้อลงไปในส่วนผสม กับแหมนที่ทำการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 14) กล่าวคือ หลังจากที่ทำหมักแหมนได้ 0-3 วัน พบว่า การหมักแหมนที่มีการเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 จะทำให้เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกเพิ่มขึ้น และค่า pH ลดลงต่ำกว่าแหมนที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ ในวันที่ 4-5 ของการหมักแหมนจะสังเกตได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก และค่า pH ไม่มากนัก และเมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกระหว่างการหมักแหมน พบว่า แหมนที่หมักโดยเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ลงไปนั้น ในวันที่ 0 จะมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกสูงกว่าแหมนที่ทำการหมักโดยไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ ทั้งนี้เนื่องมาจากการเติมกล้ำเชื้อในตอนเริ่มต้นการหมัก ทำให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ แบคทีเรียกรดแลกติกเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลกติกจากกระบวนการหมัก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญในปริมาณมากกว่านี้ ทำให้มีการสร้างกรดแลกติกในปริมาณมาก จึงส่งผลให้ค่า pH ลดต่ำลงมากกว่าการหมักที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ แต่หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกของแหมนทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 14) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงค่า pH และปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรกของการหมักแหมน อาจเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีปริมาณมากได้ใช้คาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้ปริมาณมากในช่วง 3 วันแรกของการหมักแหมน หลังจากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่มที่เติมกล้ำเชื้อ มีปริมาณไม่เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อจึงทำให้สามารถสร้างกรดแลกติกและทำให้ค่า pH ลดลงใกล้เคียงกัน

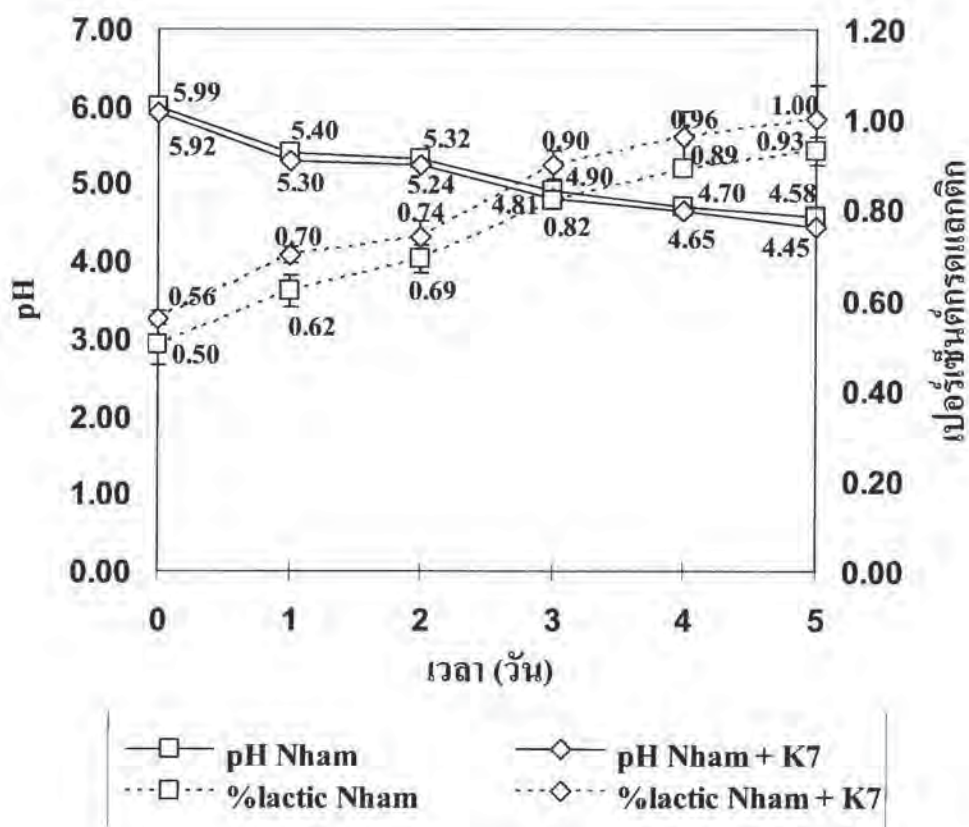
แต่อย่างไรก็ตาม บุญกร อุตรักษาติ (2547) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักแหมนคือ แบคทีเรียกรดแลกติก โดยในระยะแรกของการหมัก (ประมาณ 1-2 ชั่วโมง) พบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อซึ่งได้แก่ แบคทีเรียรูปท่อนและรูปกลม ติดสีแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งมีทั้งพวกที่สร้างกรดได้ และพวกที่ทำให้อาหารเน่าเสียแบบต่างๆ หลังการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่พบในระยะแรกบางชนิดจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดีและเติบโตในที่มีอากาศน้อย ได้แก่เชื้อ homofermentative cocci ได้แก่เชื้อ *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* เป็นจำนวนมากเติบโตไปพร้อมๆ กับเชื้อ heterofermentative lactobacilli (ได้แก่

Lb. brevis) ซึ่งเชื้อ homofermentative cocci จะใช้น้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลกติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้ pH ลดลงจากเดิมในระยะ 3 วันแรกของการหมัก ต่อมาในวันที่ 4 ของการหมักจะพบเชื้อ heterofermentative lactobacilli คือเชื้อ *Lb. plantarum* เติบโตมากขึ้นและสร้างกรดออกมา ในขณะที่ยังเหลือเชื้อ *Pediococcus* และ heterofermentative lactobacilli อยู่บ้าง ระดับ pH ของแฮมในวันที่ 4 มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 และมีกรดแลกติกสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า pH ที่ต่ำและเปอร์เซ็นต์กรดที่สูง จะทำให้จุลินทรีย์บางชนิด รวมทั้งแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ *Salmonella* ดายเกือบหมด แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ค่า pH ของแฮมที่ทำการหมักตามธรรมชาติเป็นเวลา 0-5 วัน พบการลดลงของค่า pH จาก 5.99 เป็น 4.58 ในวันที่ 5 ของการหมักแฮม ส่วนค่า pH ของแฮมที่ทำการหมักโดยเติมกลูตาเมต *Lb. salivarius* K7 พบการลดลงของค่า pH จาก 5.92 เป็น 4.45 ในวันที่ 5 ของการหมักแฮม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากลูตาเมตที่เติมลงไปนั้น ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนมากพอที่จะสร้างกรด และทำให้ค่า pH ลดลงต่ำกว่า 4.5 ได้ภายในวันที่ 3 และ 4 ของการหมัก จึงอาจส่งผลให้ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรคที่พบในแฮมอย่าง *Salmonella* ให้หมดไปได้ภายในระยะเวลาการหมักแฮมเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 14 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกระหว่างการหมักแฮมเนื้อโค

เวลา (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก (log cfu/g)		
	Nham	Nham + K7	Nham + K7 + S
0	5.72±0.11	6.76±0.15	6.75±0.19
1	8.77±0.09	8.93±0.05	8.83±0.04
2	8.94±0.09	9.11±0.08	9.11±0.04
3	9.14±0.06	9.25±0.03	8.94±0.03
4	8.53±0.06	8.69±0.15	8.54±0.03
5	8.63±0.12	8.77±0.06	8.78±0.06

หมายเหตุ : Nham หมายถึง แฮมที่หมักโดยไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 หมายถึง แฮมที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 + S หมายถึง แฮมที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S.*



ภาพที่ 14 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์แหนม

หมายเหตุ : %lactic Nham หมายถึง เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของผลิตภัณฑ์แหนม

%lactic Nham + K7 หมายถึง เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของผลิตภัณฑ์

แหนมที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

pH Nham หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนม

pH Nham + K7 หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนม
ที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

2.4.2 ค่า water activity (A_w) ของผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค

ผลของการวิเคราะห์ค่า water activity พบว่า แหนมที่มีการเติมกล้ำเชื้อ และไม่มี การเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 นั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ การหมักในวันที่ 1-3 พบว่า ค่า water activity ของแหนมทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ส่วนการหมักในวันที่ 4-5 จะพบว่า ค่า water activity เพิ่มขึ้นสูงกว่าการหมักในวันที่ 0-3 ดังแสดงในตารางที่ 15 เนื่องจากเมื่อทำการบรรจุ แหนมในถุงพลาสติกแล้วมัดให้แน่นเพื่อให้เกิดการหมักแบบไม่มีอากาศ เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้น

เนื้อโคและส่วนผสมต่างๆ เกาะตัวกัน ทำให้มีน้ำที่เกิดจากระบวนการหมักบางส่วนออกมาอยู่ในถุงพลาสติกและไม่สามารถซึมผ่านออกไปด้านนอกได้ ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ค่า water activity จึงทำให้เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แหนมทั้งที่เดิมและไม่เดิมกล้ำเชื้อลงไป มีค่า water activity เพิ่มขึ้น

ค่า water activity (A_w) เป็นดัชนีที่บอกว่ำนั่นเป็นน้ำที่นำไปใช้ได้โดยจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ของจุลินทรีย์ต้องการ A_w มากกว่า 0.9 (ดวงพร คันธโชติ, 2545) ค่า A_w ของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 1.00 และจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญในน้ำบริสุทธิ์นั้นได้ตามปกติ จุลินทรีย์มีค่า A_w ที่สูงสุด (maximum) ที่เหมาะสม (optimum) และที่ต่ำสุด (minimum) สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น อย่างไรก็ตาม สิ่งที่เป็นอย่างยิ่งต่อกระบวนการแปรรูปอาหารก็คือ การป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้วิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ก็คือ การปรับค่า A_w ของอาหารให้มีค่าที่ต่ำกว่าค่า A_w ที่ต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์ในแต่ละชนิดจะเจริญได้ เมื่อพิจารณาถึงผลของการเจริญเติบโตพบว่า ถ้าในอาหารชนิดนั้นมีค่า A_w ที่ต่ำกว่าค่า A_w ที่ต่ำที่สุดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์นั้นจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่ถ้าอาหารนั้นมีค่า A_w ที่ต่ำกว่า A_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จะทำให้จุลินทรีย์นั้นเจริญอยู่ในช่วง lag phase ที่ยาวนานกว่าปกติ และอัตราในการเจริญเติบโตก็ช้าลงกว่าเดิม ดังนั้นในการยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารจึงจำเป็นต้องลดค่า A_w ของอาหารนั้นให้ต่ำกว่าค่า A_w ที่ต่ำที่สุดของจุลินทรีย์ เพื่อลดการเสื่อมเสียของจุลินทรีย์ อาหารสดทั้งผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ รวมทั้งสัตว์ปีกและปลา มีค่า A_w อยู่ระหว่าง 0.97-1.00 ซึ่งเป็นสภาพที่เกื้อหนุนให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้เป็นส่วนใหญ่ (วราวุฒิ ครุสง. 2538) ซึ่งแหนมทั่วไปจะมีค่า A_w เท่ากับ 0.97 และจากการทดลอง พบว่าแหนมที่เดิมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-5 วัน จะมีค่า A_w ระหว่าง 0.967-0.983 ดังนั้นจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แต่อย่างไรก็ตามค่า A_w ในช่วงดังกล่าวนี้ยังส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคร้าย *Salmonella* และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียสามารถเจริญได้ด้วย ซึ่งจะต้องทำการศึกษาผลของการเดิมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการหมักแหนมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Salmonella* เพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและทำให้ได้แหนมที่มีความปลอดภัย

ตารางที่ 15 ค่า water activity (A_w) ของผลิตภัณฑ์แฮมเนื้อโค

เวลา (วัน)	ค่า water activity (A_w)	
	Nham	Nham + K7
0	0.965±0.005	0.967±0.008
1	0.963±0.007	0.959±0.003
2	0.977±0.007	0.970±0.022
3	0.980±0.002	0.975±0.003
4	0.965±0.001	0.965±0.004
5	0.982±0.008	0.983±0.005

หมายเหตุ : Nham หมายถึง แฮมที่หมักโดยไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7
 Nham + K7 หมายถึง แฮมที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7

2.4.3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แฮมเนื้อโค

การศึกษานี้ได้ทำการหาวิธีการที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ โดยนำกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *Lb. salivarius* K7 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ (Pilasombut *et al.* 2006) และมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติก (Narakaew *et al.* 2009) มาใช้ในการผลิตแฮมโดยให้หมักเชื้อเริ่มต้นการหมักในปริมาณ 10^6 cfu/g การทดลองแบ่งตัวอย่างแฮมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หมักโดยไม่เติมกล้ำเชื้อ กลุ่มที่ทำการหมักโดยเติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยให้หมักเชื้อเริ่มต้นในปริมาณ 10^2 cfu/g และกลุ่มที่ทำการหมักโดยเติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/g ร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ปริมาณ 10^2 cfu/g จากการทดลอง พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้ทุกวันของการหมัก (ตารางที่ 16)

Setwiwathana *et al.* (2007) ได้ทำการทดลองโดยใส่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 และ *P. pentosaceus* JCM 5890 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน ในการหมักแฮม พบว่าการใส่กล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/g สามารถลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 8-10 cfu/g ได้หมดในวันที่ 4, 5 และ 6 ของการหมัก โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.56, 4.44 และ 4.25 ตามลำดับ และลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 80-100 cfu/g หมดในวันที่ 5 และ 6 ส่วนการใส่กล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5890 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/g สามารถลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 8-10 cfu/g ได้หมดในวันที่ 5

และ 6 ของการหมัก โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.42 และ 4.24 ตามลำดับ และลดเชื้อ *S. Anatum* ปริมาณเริ่มต้น 80-100 cfu/g หดในวันที่ 6 ของการหมักแหมน ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้จากการศึกษาในที่ พบว่า แหมนที่เติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ปริมาณเริ่มต้น 100 cfu/g ให้หมดไปได้ภายในวันที่ 5 ของการหมักแหมน โดยแหมนที่เติมกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 แล้วทำการหมักเป็นเวลา 0-5 วัน มีค่า pH เท่ากับ 5.92, 5.30, 5.24, 4.81, 4.65 และ 4.45 ตามลำดับ ทั้งนี้ถึงแม้ค่า pH ในวันที่ 5 ของการหมักแหมนจะมีค่าต่ำกว่า 4.5 แต่ยังคงตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* อยู่ ทั้งนี้เนื่องมาจากค่า pH ในช่วงแรกของการหมักแหมนลดต่ำลงช้าทำให้เชื้อ *S. Typhimurium* สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นถึงแม้ค่า pH ในวันที่ 5 จะลดลงถึง 4.45 ก็อาจมีปริมาณกรดไม่มากพอที่จะทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ ซึ่งการที่ค่า pH ลดต่ำลงช้านี้อาจเนื่องมาจากกล้ำเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่เติมลงไปมีปริมาณน้อย หรือเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะของการหมักแหมน เนื่องจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 เป็นเชื้อที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสภาวะของแหมนอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อชนิดนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในแบบจำลองการหมักแหมน พบว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับไนไตรท์ 100 ppm และกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในวันแรกของการกระบวนการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของค่า pH ระหว่างแหมนและแบบจำลองการหมักแหมน พบว่าแบบจำลองการหมักแหมนมีการลดลงของ pH ต่ำลงรวดเร็วกว่าการลดลงของ pH ในแหมน กล่าวคือ แบบจำลองการหมักแหมนที่ทำการหมักเป็นเวลา 0-3 วัน มีค่า pH เท่ากับ 5.74, 4.72, 4.59 และ 4.58 ตามลำดับ ซึ่ง Swetwathana *et al.* (1999) รายงานว่า ในผลิตภัณฑ์แหมนจะใช้เวลาการหมักเพื่อลดเชื้อ *S. Anatum* ให้หมดไปนานกว่าผลที่ได้จากการศึกษาในแบบจำลองการหมักแหมน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกิจกรรมการยับยั้งของไนไตรท์ที่ถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์ อาจจะลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่าในแบบจำลองการหมักแหมน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาเคมีกับส่วนผสมบางชนิดในแหมน กิจกรรมการยับยั้งของไนไตรท์ที่ลดลงนี้จะไปทำให้การยับยั้งเชื้อก่อโรคลดลง ทำให้ *S. Anatum* สามารถเจริญได้ในระยะแรกของการหมักแหมน จากการที่การยับยั้งเชื้อก่อโรคจะเกิดจากการสร้างกรดแลกติกของกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ดังนั้นความแตกต่างของค่า pH ที่ลดลงในแหมน และแบบจำลองการหมักแหมนมีผลต่อการลดลงของ *S. Anatum* เนื่องจากค่า pH ของแหมนจะลดลงช้ากว่าในแบบจำลองการหมักแหมน จึงส่งผลให้การลดเชื้อ *Salmonella* ให้หมดไปจากแหมนเกิดขึ้นช้าตามไปด้วย และ พรพิมล เทียนทอง (2548) รายงานว่า เชื้อ *Salmonella* จะถูกยับยั้งโดยสารต่างๆ ที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นได้มากหรือน้อยเพียงใดนั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณที่เชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่ด้วย

ตารางที่ 16 ผลของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่มีต่อการยับยั้ง *S. Typhimurium* TISTR 292 ในແໜມ เนื้อโค

เวลา (วัน)	การตรวจพบเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292		
	Nham	Nham + S	Nham + K7 + S
0	-	+	+
1	-	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	-	+	+

หมายเหตุ : Nham หมายถึง แหนมที่หมักโดยไม่เติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

Nham + S หมายถึง แหนมที่หมักโดยเติมเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

Nham + K7 + S หมายถึง แหนมที่หมักโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อ

จากการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อของ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ในแบบจำลองการหมักແໜມ พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญในสภาวะที่มีไนโตรเจนความเข้มข้น 100 ppm และในสภาวะที่มีกระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ได้ลดลงตลอดการหมักเป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในสภาวะที่มีกระเทียม และไนโตรเจนได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และเมื่อใช้เชื้อ *Lb. salivarius* K4 หรือ K7 ร่วมกับกระเทียมพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด และจากคุณสมบัติของเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ที่สามารถทนต่อกรด น้ำดี อยู่รอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง ทนต่อกระเทียม และไนโตรเจนได้ดีกว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K4 จึงคัดเลือกเชื้อ *Lb. salivarius* K7 มาเป็นกล้าเชื้อในการทำແໜມเนื้อโค และจากการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ในการผลิตແໜມเนื้อโค พบว่าในผลิตภัณฑ์ແໜມที่มีการเติมกล้าเชื้อค่า pH ของແໜມยังคงลดต่ำลงช้าจึงไม่สามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ให้หมดไปได้ภายในระยะเวลาการหมักແໜມ 5 วัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ไม่สามารถเจริญเพิ่มในจำนวนในແໜມได้ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้แยกได้จากลำไส้ไก่ ดังนั้นสภาวะของແໜມจึงไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในน้ำดี ox-bile และน้ำดีไก่สด จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

- ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- นภา โล่ห์ทอง. 2529. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- บุษกร อุตริชาติ. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. 425 หน้า.
- ประมวล ทราชทอง. 2551. Starter Culture_สู่อุตสาหกรรมการหมักในอนาคต. ปีที่ 38 ฉบับที่ 3. [Online]. Available : http://www.ifrpd.Ku.Ac.Th/pr/pramuan_radio52.pdf, 25-02-10
- ปริยดา ตันจักร. 2550. “การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พรพิมล เทียนทอง. 2548. “ผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแฮมแบบดั้งเดิมและการผลิตแฮมกึ่งแห้ง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วรารุณี คุรุสง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- สุเมธชา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ : เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อัจฉรา เพิ่ม. 2550. แบคทีเรียแลคติก. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- อรรพรรณ ละอองคำ. 2546. “การจำแนกเชื้อและการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติก.” วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A, and Koga, Y. 1998. “Lactic Acid-Mediated Suppression of *Helicobacter pylori* by the Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* as a Probiotic in a Gnotobiotic Murine Model.” **The American J. Gastroenterol.** 93(11) : 2097-2101.
- Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. “Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update.” **Meat Sci.** 76 : 138-146.

- Bae, H.C., Nam, M.S. and Lee, J.Y. 2002. "Probiotic characterization of acid- and bile-tolerant *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* from Korean faeces." **Asian-australasian J. Anim. Sci.** (Abstract).
- Begley, M., Cormac, G.M.G. and Hill, C. 2005. "The interaction between bacteria and bile." **FEMS Microbiol. Rev.** 29 : 625-651.
- Benkeblia, N. 2004. "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)." **Lebensm. Wiss. u. Technol.** 37 : 263-268.
- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 53 : 33-41.
- Burton, J.P., Wescombe, P.A., Moore, C.J., Chilcott, C.N. and Tagg, J.R. 2006. "Safety Assessment of the Oral Cavity Probiotic *Streptococcus salivarius* K12." **Appl. Envir. Microbiol.** 72(4) : 3050-3053.
- Cataloluk, O. 2001. "Molecular characterization of the gene encoding for the Salivaricin B activity and its Flanking Sequences." **Turk J. Biol.** 25 : 379-386.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C. and Rowland, I. 2005. "The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics." **Mutat. Res.** 591 : 276-289.
- Condon, S. 1987. "Responses of lactic acid bacteria to oxygen." **FEMS Microbiol. Lett.** 46 : 269-280.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. 1987. "Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells." **J. Dairy Sci.** 70(1) : 1-12.
- D'Aimmo, M.R., Modesto, M.R.M. and Biavati, B. 2007. "Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products." **Int. J. Food Microbiol.** 115 : 35-42.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins J.K. 2001. "In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with in vivo findings." **Am. J. Clin. Nutr.** 73 : 386S-392S.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. And Vogel, R.F. 2002. "Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry." **J. Appl. Microbiol.** 92 : 966-975.

- Elisha, B.G. and Courvalin, P. 1995. "Analysis of genes encoding d-alanine: d-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp." **Gene**. 152 : 79–83.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Investigation of bacteriocin production and purification from Nukadoko isolates displaying antimicrobial activity." **Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria**. 10 : 29-36.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." **Meat Sci**. 55 : 297-300.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T. and Suihko, M-L. 2001a. "Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures." **Meat Sci**. 58 : 111-116.
- Erkkilä, S., Suihko, M-L., Eerola, S., Petäjä, E. and Mattila-Sandholm, T. 2001b. "Dry sausage fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* strains." **Meat Sci**. 64 : 205-210.
- Fadda, S., Vignolo, G. and Oliver, G. 2001. "Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains." **Biotechnol. Lett.** (Abstract).
- Fernández, M.F., Boris, S. and Barbés, C. 2003. "Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract." **J. Appl. Microbiol**. 94 : 449-445.
- Flynn, S., Sinderen, D.V., Thornton, G.M., Holo, H., Nes I.F. and Collins, J.K. 2002. "Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118." **Microbiol**. 148 : 973-984.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. 1998. "Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts." **J. Appl. Microbiol**. 84 : 125-132.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. 2007. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity." **Food Contr**. 18 : 716-722.
- Hirayama, K. and Rafter, J. 2000. "The role of probiotic bacteria in cancer prevention." **Microbes Infect**. 2 : 681-686.
- Huang, Y. and Adams, M.C. 2004. "In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria." **Int. J. Food Microbiol**. 91 : 253-260.

- Hyronimus, B., Marrec, C.L., Sassi, A.H. and Deschamps, A. 2000. "Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 61 : 193-197.
- Kim, E.L., Choi, N.H., Bajpai, V.K. and Kang, S.C. 2008. "Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk." **Food Chemistry.** 110 : 375-382.
- Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., Suzuki, I., Tsuji, N.M., Kurisaik, J. and Ohmomo, S. 2007. "REVIEW *Lactococcus* sp. As Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria." **JARQ.** 41(3) : 181-189.
- Klingberg, T.D. and Budde, B.B. 2006. "The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 109 : 157-159.
- Knarreborg, A., Ricarda, M., Jensen, S.K. and Jensen, B.B. 2002. "Quantitative determination of bile hydrolase activity in bacteria isolated from the intestine of chickens." **Appl. Environ. Microbiol.** 68(12) : 6425-6428.
- Knarreborg, A., Jensen, S.K. and Engberg, R.M. 2003. "Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured in vitro and in vivo." **J. Nutr. Biochem.** 14 : 259-265.
- Kolodjieva, V., Yafaev, R., Yermolenko, E. and Suvorov, A. 2006. "Incidence of virulence determinants in enterococcal strains of probiotic and clinical origin." **Int. Congress Series.** 1298 : 367-369.
- Laissue, J.A., Chappuis, B.B., Müller, C., Reubi, J.C. and Gebbers, J.O. 1993. "The intestinal immune system and its relation to disease." **Dig. Dis.** (Abstract).
- Lan, P.T.N., Binh, L.T. and Benno, Y. 2003. "Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 49 : 29-36.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 1999. "The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation." **Appl. Environ. Microbiol.** 65(12) : 5350-5356.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." **Trends in Food Sci. Technol.** 15 : 67-78.

- Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L. 2006. "Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation." **Int. J. Food Microbiol.** 106 : 270-285.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations." **FEMS Microbiol. Rev.** 87 : 149-163.
- Liong, M.T. and Shah, N.P. 2005. "Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains." **Int. Dairy J.** 15 : 391-398.
- Madara, J.L. 1997. "Imunology: The chameleon within: Improving antigen." **J. Sci.** 277(5328) : 910-911.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I. and Girardin, S.E. 2007. "The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens." **Semin. Immunol.** 19 : 106-115.
- Makras, L. and Vuyst, L.D. 2006. "The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids." **Int. Dairy J.** 16 : 1049-1057.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and Huis In't Veld, J.H.J. 1997. "Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile." **J. Dairy Sci.** 80(6) : 1031-1037.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. and Rodríguez, J.M. 2006. "*Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair." **Int. J. Food Microbiol.** 112 : 35-43.
- Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Pla, M. And Aymerich, T. 2006. "Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by Real-time PCR." **Appl. Environ. Microbiol.** 72(9) : 6040-6048.
- Mathur, S. and Singh, R. 2005. "Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review." **Int. J. Food Microbiol.** 105 : 281-295.
- McDowell, A. and McLeod, B.J. 2007. "Physiology and pharmacology of the brushtail possum gastrointestinal tract: Relationship to the human gastrointestinal tract." **Adv. Drug Deliv. Rev.** 59 : 1121-1132.
- Morelli, L. 2007. "In vitro assessment of probiotic bacteria : From survival to functionality." **Int. Dairy J.** 17 : 1278-1283.

- Murry, A.C., Hinton, A. and Morrison, H. 2004. "Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*." **Int. J. Poul. Sci.** 3(9) : 603-607.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2009. "Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 25 : 1337-1345.
- Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. 2007. "Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria." **Food Microbiol.** 24 : 82-88.
- Narakaew, T., Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N. and Swetwiwathana, A. 2009. Preliminary characterization of *Lactobacillus salivarius* K7 for probiotic properties. Pp. 1-10. in: Proceedings of the 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.
- Nemcova, R., Laukova, A., Gancarcikova, S. and Kastel, R. 1997. "In vitro studies of porcine lactobacilli for possible probiotic use." **Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.** (Abstract).
- Ocana, V.S., Holgado, A.A.P.D.R. and Nader-Macías, M.E. 1999. "Characterization of a Bacteriocin-like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain." **Appl. Environ. Microbiol.** 65(12) : 5631-5635.
- O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee G. O'Sullivan, G., Shanahan, F. and Collins, J. 2001. "Probiotic impact on microbial flora, inflammation and development in IL-10 knockout mice." **Alimentary Pharmacology & Therapeutics.** (Abstract).
- Oomen, A.G., Rempelberg, C.J.M., Van de Kamp, E., Pereboom, D.P.K.H., De Zwart, L.L. and Sips, A.J.A.M. 2004. "Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model." **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 46 : 183-188.
- Otero, M.C., and M.E. Nader-Macías. 2006. "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle." **Anim. Reprod. sci.** 96 : 35-46.

- Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Diaz-Ropero, M.P., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A. and Galvez, J. 2005. "Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *Salivarius*, in the TNBS model of rat colitis." **World J. Gastroenterol.** 11(33) : 5185-5192.
- Piano, M.D., Morelli, L., Strozzi, GP., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballaré, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garelo, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M. and Capurso, L. 2006. "Probiotics : from research to consumer." **Dig. Liver dis.** 2 : S248-S255.
- Pilasombut, K., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwathana, A., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Sakpuaram, T. 2005. "Screening and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestine." **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** (39) : 612-621.
- Pilasombut, K., Tanjak, P. and Nitisinprasert, S. 2005. "Screening lactic acid bacteria isolated from chicken intestine for use as probiotic." Eight Symposium on Lactic Acid Bacteria. Abstracts.
- Pilasombut, K. 2006. "Purification and characterization of bacteriocins by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine." Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Pilasombut, K., Sakpuaram, T., Wajjwalku, Nitisinprasert, S., Swetwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine." **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 28(Suppl.) : 121-132.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. London WC1W9LB, England.
- Rinkinen, M., Weatermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. 2003. "Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus." **Vet. Microbiol.** 97 : 55-61.
- Robredo, B. and Torres, C. 2000. "Bacteriocin Production by *Lactobacillus salivarius* of Animal Origin." **J. Clin. microbiol.** 38 : 3908-3909.
- Slover, C.M. 2008. "Lactobacillus : a review." **Clin. Microbiol. Newsletter.** 30(4) : 23-27.

- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. and Seal, B.S. 2006. "Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system." **Antimicrob. Agents Chemother.** 50(9) : 3111-3116.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. and Coppola, R. 2005. "Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese." **FEMS Microbiol. Lett.** 244 : 129-137.
- Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. "Biogenic amines in dry fermented sausages: a review." **Int. J. Food Microbiol.** 88 : 41-54.
- Swetwiwathana, A., Leutz, U. and Fischer, A. 1998. "Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures." **Fleischwirtschaft.** 78 : 294-298.
- Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N. and Fischer, A. 1999. "Controlling the growth of *Salmonella anatum* in nham; Effect of meat starter cultures, nitrate, nitrite and garlic." **Fleischwirtschaft.** 79(9) : 124-128.
- Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2007. "Effect of Pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation." **Fleischwirtschaft.** 22 : 46-49.
- Taranto, M.P., Perez-Martinez, G. and de Valdez, G.F. 2006. "Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration." **Res. Microbiol.** 157 : 720-725.
- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2008. "Review Probiotics-From Metchnikoff to bioactives." **Int. Dairy J.** 18 : 714-728.
- Verluyten, J., Leroy, F. And De Vuyst, L. 2004. "Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and curvacin A production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174." **Appl. Environ. Microbiol.** 70(8) : 4807-4813.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. "Lactic acid starter and probiotic bacteria : a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance." **Food Res. Int.** 36 : 895-904.

- Yeonhee, L. 2005. "Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women." **FEMS Microbiol. Lett.** (Abstract).
- Zárate, G., Chaia, A.P., González, S. and Oliver, G. 2000. "Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids." **J. Food Prot.** 63(9) : 1214-1221.