รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารไก่กระทงและไก่พื้นเมือง

Selection and primary characterization of probiotic lactic acid bacteria from intestinal tract of broiler and Thai indigenous chicken

จัดทำโดย

ผศ.ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภททั่วไป ประจำปี 2551

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองของประเทศไทย สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 322 และ 226 ไอโซเลต ได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทง 10 ตัวและไก่พื้นเมือง 8 ตัว ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 548 ไอโซเลตภายใต้สภาวะจำลองของกรดในกระเพาะอาหารที่พีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียแลกติกจำนวน 103 ไอโซเลตสามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะดังกล่าว และเมื่อนำสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะกรดไปทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีพบว่า มี 20 ไอโซเลตที่ทนต่อสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กที่พีเอช 8.0 มีเอนไซม์แพนครีเอติน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีน้ำดีสดของไก่ 7% ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ KT2S15 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 92.94% อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกลดลงเมื่อมีการทดสอบการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดีต่อเนื่องกัน โดยมี 6 สายพันธุ์ คือ KT3L20, KT2CR5, KT10L22, KT5S19, KT4S13 และ PM1L12 สามารถรอดชีวิตได้ 43.68%, 37.56%, 33.84%, 32.89%, 31.37% และ 27.19% ตามลำดับ มี 12 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนแต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้งและไขมันได้ แบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลตมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคคือ *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* แต่มี 1 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ จากผลการทดสอบดังกล่าวสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ (KT2L24, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 และ KT8S16) ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ดีและเมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Enterococcus* sp., *E. lactis* , *E. faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, และ *E. faecium* ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *E. lactis* KT3L20 หลังจากการทำ microencapsulation ด้วยอัลจิเนต ภายใต้สภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องกัน พบว่า การทำ microencapsulation แบบ extrusion (6.05 logCFU/ml) มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการทำ microencapsulation แบบ emulsion (5.76 log CFU/ml) และเซลล์อิสระ (5.52 log CFU/ml) ตามลำดับ

Abstract

This study was conducted in order to evaluate the probiotic properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from intestinal tract of broilers and Thai indigenous chickens. Three-hundred and twenty two and 226 LAB strains were isolated from 10 broilers and 8 Thai indigenous chickens, respectively. The gastrointestinal transit tolerance of these 548 isolates was determined by exposing washed cell suspensions to simulated gastric juice (pH 2.5) containing pepsin (3 mg/ml) at 41°C for 2 h, mimicking the stomach conditions. One hundred and three isolates were able to resist simulated gastric juice. The cells of the isolates which survived from simulated gastric juice were further treated for bile salt tolerance, The survival of 20 isolates was survival after passing through the simulated small intestine (pH 8.0) in the presence of pancreatin (1 mg/ml) and 7% fresh chicken bile at 41°C for 6 h. The LAB strain KT2S15 exhibited the highest survival rate at 92.94%. However, the survival rate of LAB was decreased when the acid and bile tolerance was studied in sequential step. Six strains (KT3L20, KT2CR5, KT10L22, KT5S19, KT4S13 and PM1L12) could survive in the sequential study by showing the survival rate of 43.68, 37.56, 33.84, 32.89, 31.37 and 27.19 percent, respectively. Twelve isolates exhibited protein digestion on agar plate but no isolates showed ability to digest starch and lipid. All 20 LAB showed the antimicrobial activity against *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* except one strain which did not show the inhibitory activity toward *E. coli.* Accordingly, 5 isolates of selected LAB (KT2L24, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 and KT8S16) can be classified as the best probiotics and were identified as *Enterococcus* sp., *E. lactis, E. faecium, Pediococcus pentosaceus,* and *E. faecium,* respectively. The survival rate of microencapsulation of *E. lactis* KT3L20 under simulated small intestine juice after sequential of simulated gastric juice was investigated. Extrusion technique exhibited higher survival rate (6.05 logCFU/ml) than emulsion technique (5.76 logCFU/ml) and free cell (5.52 logCFU/ml), respectively.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบาญ	IV
รายการตาราง	V
รายการภาพ	VI
บทนำ	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	26
ขอบเขตงานวิจัย	27
วิธีดำเนินการวิจัย	28
ผลการทดลองและวิจารณ์	35
สรุปผลการทดลอง	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	75
Output	107

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่	6
2	จำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก	7
3	ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค extrusion และ emulsion	22
4	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (TVC) และแบคทีเรียแลกติก (LAB) ที่มีในทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่พื้นเมือง	36
5	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (TVC) และแบคทีเรียแลกติก (LAB) ที่มีในทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่กระทง	37
6	จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่กระทงและไก่พื้นเมือง	39
7	จำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ตามรูปร่างของเซลล์	39
8	แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทงที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	42
9	แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	43
10	การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะที่มีน้ำดีสดของไก่เข้มข้น 7 % และเอนไซม์แพนครีเอติน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 8.0	46
11	ความสามารถในการย่อยไขมัน แป้ง และโปรตีนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	52
12	ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	55
13	การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ KT3L20 ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ภายหลังจากการบ่มในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่อง	61
14	ลักษณะบางประการของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่พื้นเมือง	80
15	ลักษณะบางประการของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทง	89

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระบบทางเดินอาหารของไก่	5
2	การทำ microencapsulation โดยวิธี extrusion และ emulsion	18
3	โครงสร้างทางเคมีของ alginate	19
4	โครงสร้างทางเคมีของ (a) carrageenan ; (b) κ-carageenan	20
5	โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	20
6	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ภายหลังจากบ่มในสภาวะทางเดินอาหาร (กรดกระเพาะอาหารและลำไส้)	50
7	ความสามารถในการย่อยโปรตีนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	53
8	ความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ต่อแบคทีเรียก่อโรค (a) control, (b) *E. coli*, (c) *Salmonella* sp., (d) *Staphylococcus aureus*	56
9	แผนภูมิต้นไม้ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	59
10	ลักษณะของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ด้วย (a) วิธี extrusion, (b) วิธี emulsion	62
11	เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT2L24 กับ *Enterococcus* sp.	102
12	เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT3L20 กับ *Enterococcus lactis*	103
13	เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT4S13 กับ *Enterococcus faecium*	104
14	เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT4S13 กับ *Pediococcus pentosaceus*	105
15	เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT8S16 กับ *Enterococcus faecium*	106

บทนำ

การผลิตสัตว์ในปัจจุบันโดยเฉพาะไก่ได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็วเนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคสูงขึ้นโดยในปี 2548 ที่ผ่านมาประเทศไทยมีการส่งออกไก่เนื้อแปรรูปและผลิตภัณฑ์ประมาณ 518 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าการส่งออกถึง 31,000 ล้านบาท (คณะกรรมการบริหารสินค้าไก่เนื้อและผลิตภัณฑ์, 2549) จึงได้มีการนำเอาวิชาการและเทคโนโลยีใหม่ ๆ มาใช้ในการพัฒนาการผลิตสัตว์ทั้งทางด้านพันธุ์สัตว์ การจัดการและอาหารเพื่อมุ่งเน้นให้เกิดประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด วัตถุเสริมอาหาร (feed additives) จึงได้ถูกคิดค้นและนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย เช่น สารกันเชื้อรา สารกันหืน สารเคมีและยาปฏิชีวนะต่าง ๆ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539) และเนื่องจากการผลิตสัตว์ปีก เช่น ไก่ ผู้ผลิตมักประสบกับปัญหาเรื่องโรคติดเชื้ออยู่เสมอทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เพราะนอกจากจะทำให้ไก่ตายแล้วยังทำให้ไก่ที่รอดตายมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงส่งผลให้ผลผลิตโดยรวมตกต่ำทำให้เกิดความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่ โดยมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญ คือ การใช้เพื่อรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับต่ำกว่าระดับที่ให้ในการรักษาโรคเพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตและป้องกันโรค (ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ, 2547) แต่ในระยะเวลาสิบกว่าปีที่ผ่านมาพบว่าการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาทางการแพทย์ที่เพิ่มมากขึ้น (Kastner *et al.*, 2006) และยังพบปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จากการใช้ยาในระดับที่สูงเกินขนาดที่กำหนดให้ใช้ นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะยังทำให้กลไกการต้านทานโรคของเจ้าบ้าน (host) ล้มเหลวและยังทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นอีกด้วย (Otero and Nader-Macías, 2005) จากปัญหาทั้งสองที่กล่าวมานี้ทำให้มีการลดหรือห้ามการใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดหรือบางประเภทกับสัตว์ที่เลี้ยงเป็นอาหารทำให้เกิดความพยายามที่จะหาสิ่งทดแทนยาปฏิชีวนะซึ่งทางเลือกหนึ่งคือการใช้โปรไบโอติก จากการศึกษาถึงประสิทธิภาพการใช้ในไก่พบว่า โปรไบโอติกสามารถช่วยลดเชื้อก่อโรคและไม่ทำให้เกิดการตกค้างของสารอันตรายในไก่ที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ (Wray and Davies, 2000) จึงได้มีการนำโปรไบโอติกมาเสริมในอาหารแทนยาปฏิชีวนะ โดยโปรไบโอติกที่ใช้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* และให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้แบคทีเรียโปรไบโอติกยังส่งเสริมการเจริญของไก่ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามยังมีสาเหตุบางประการที่ทำให้การนำโปรไบโอติกมาใช้นั้นไม่แพร่หลายเท่าที่ควรเนื่องจากผลที่ได้รับในการศึกษายังมีความผันแปรอยู่ และปัจจัยที่ทำให้เกิดความผันแปรของการใช้โปรไบโอติกส่วนหนึ่งนั้นเกิดจากสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของสัตว์เพื่อนำมาใช้ใน

สัตว์ชนิดนั้นจึงเป็นการลดปัญหาเรื่องความจำเพาะเจาะจงระหว่างสัตว์กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ได้ (ไพรัตน์ ศรแผลง และคณะ, 2550) การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นอาหารเสริมการเจริญเติบโตและลดการใช้ยาปฏิชีวนะในไก่ต่อไป

บทตรวจเอกสาร

1. ระบบทางเดินอาหารของไก่

ระบบการย่อยอาหารของไก่ประกอบด้วย

1.1 ปาก (mouth) ไก่จะมีลักษณะของปากที่แตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่นๆ คือ ไก่จะไม่มีริมฝีปาก ไม่มีฟันและแก้ม แต่จะมีปากยื่นยาวออกมาเป็นจะงอยซึ่งใช้ทำหน้าที่จิกและฉีกอาหารเข้าปาก ลิ้นของไก่มีลักษณะแข็งรูปร่างคล้ายหัวลูกศร ทำหน้าที่ในการบังคับหรือดันให้อาหารไหลลงสู่หลอดอาหาร ภายในปากของไก่จะมีต่อมน้ำลายอยู่บริเวณด้านข้างทั้งสองข้างทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนๆ ทำให้อาหารเปียกชื้นและอ่อนนุ่ม ประกอบไปด้วยเอนไซม์ ptyalin (amylase) ซึ่งใช้ในการย่อยแป้งและเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล แต่อย่างไรก็ตามการย่อยในปากเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากอาหารจะอยู่ในปากเพียงระยะสั้น อาหารส่วนใหญ่จะถูกย่อยในอวัยวะส่วนอื่นๆ (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.2 หลอดอาหาร (esophagus or gullet) เป็นท่อกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการลำเลียงอาหารจากปากไปยังกระเพาะ ตอนปลายของหลอดอาหารจะขยายออกเป็นกระเพาะพัก (crop) ซึ่งมีในสัตว์ปีกทุกชนิด (ภาพที่ 1) หลอดอาหารมีลักษณะพิเศษ คือ สามารถขยายตัวได้มาก (อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.3 กระเพาะพัก (crop) หลังจากที่ผ่านจากปาก อาหารจะเคลื่อนลงสู่หลอดอาหารและจะเข้าสู่กระเพาะพักซึ่งเป็นหลอดอาหารส่วนที่ขยายใหญ่ขึ้นทำหน้าที่เป็นที่พักอาหารไว้ชั่วคราวเพื่อให้อาหารนิ่มลง (ภาพที่ 1) โดยอาหารจะถูกพักไว้เป็นเวลานานเท่าไรนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร ปริมาณอาหารที่ไก่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกระเพาะบด ในกระเพาะพักนั้นจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ใด ๆ ออกมาแต่มีเอนไซม์ ptyalin จากปากทำหน้าที่ในการย่อยแป้งต่อไป (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.4 กระเพาะแท้ (true stomach or proventiculus) เป็นอวัยวะที่มีลักษณะเป็นกระเปาะอยู่ทางด้านหลังของกระเพาะพักและอยู่ในตำแหน่งก่อนกระเพาะบด เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glandular stomach (ภาพที่ 1) เพราะเป็นส่วนที่เต็มไปด้วยต่อมน้ำย่อย กระเพาะส่วนนี้จะมีการสร้างน้ำย่อย (gastric juice) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เพปซิน (pepsin) และกรดเกลือ (hydrochloric acid) โดยเอนไซม์เพปซินทำหน้าที่ย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง และกรดเกลือทำหน้าที่ปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร โดยเปลี่ยนอาหารในสภาพที่เป็นด่างให้เป็นกรดและช่วยในการย่อยโปรตีน เนื่องจากกระเพาะส่วนนี้มีขนาดเล็กและสั้นทำให้อาหารผ่านไปสู่กระเพาะบดอย่าง

รวดเร็ว การย่อยจึงเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยแต่การย่อยจะมีต่อเนื่องมากขึ้นไปขณะที่อาหารผ่านเข้าไปอยู่ในกระเพาะบด (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.5 กระเพาะบด (กึ๋น) (gizzard or venticulus) เป็นอวัยวะที่มีผนังหนาและมีกล้ามเนื้อที่แข็งแรงจึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า muscular stomach มีรูปร่างคล้ายก้อนกล้ามเนื้อสีแดงค่อนข้างกลมแบน เชื่อมต่อระหว่างกระเพาะบดกับลำไส้อ่อน (duodenum) (ภาพที่ 1) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อที่มีพลังมาก 2 คู่ ผิวภายในประกอบด้วยเยื่อบุหนาซึ่งจะมีการสึกหรอหรือเปลี่ยนใหม่อยู่เสมอ กระเพาะบดนี้ทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารแทนฟันทำให้อาหารมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับอาหารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย ภายในกระเพาะบดจะพบว่ามีก้อนกรวดและหินก้อนเล็ก ๆ อยู่ เกิดจากการจิกกินของไก่เองหรือจากการเสริมลงไปในอาหารของไก่ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยบดย่อยอาหารเนื่องจากกระเพาะส่วนนี้ไม่มีการผลิตเอนไซม์ออกมา ในขณะที่กระเพาะบดมีอาหารอยู่กล้ามเนื้อจะทำงานอยู่ตลอดเวลาจนกว่ากระเพาะจะว่าง เมื่อมีอาหารเข้ามาใหม่จะมีการเริ่มทำงานใหม่ อาหารที่ถูกบดละเอียดแล้วจะถูกผสมคลุกเคล้ากับน้ำย่อยที่ได้จากกระเพาะแท้ อาหารที่ละเอียดแล้วจะผ่านกระเพาะบดไปสู่ลำไส้อ่อนภายใน 2-3 นาที แต่ถ้าอาหารที่ไก่กินเป็นอาหารที่มีขนาดใหญ่ หยาบ อาจอยู่ในกระเพาะบดนานถึง 4-5 ชั่วโมงก็ได้ (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

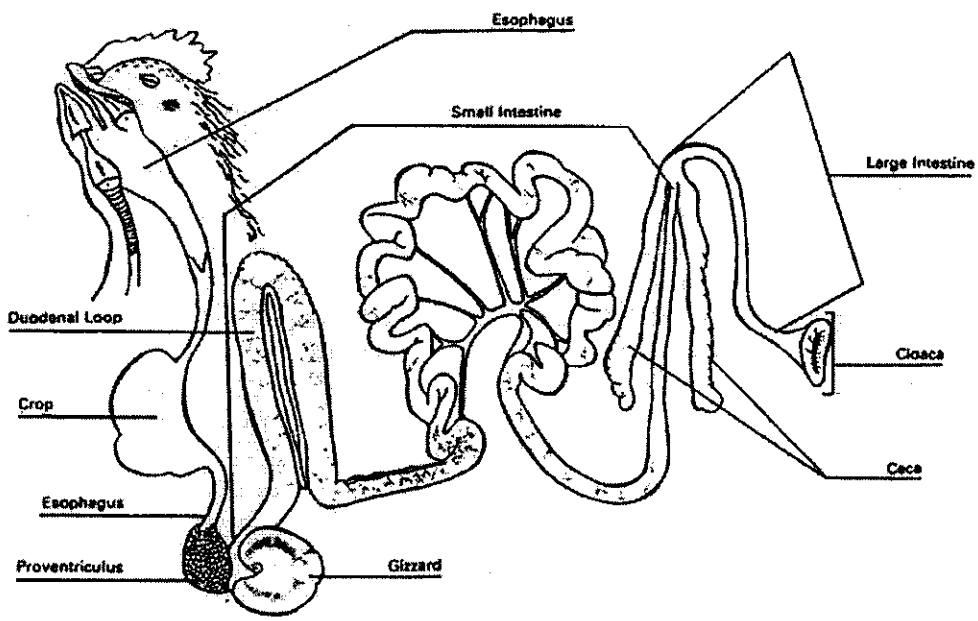
1.6 ลำไส้เล็ก (small intestine) เป็นท่อทางเดินอาหารที่ต่อจากกระเพาะบดไปสู่ลำไส้-ใหญ่ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ส่วนกลาง (jejubum) และส่วนท้าย (ilium) ลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะโค้งเป็นลูป (loop) เรียกว่า duodenum loop เป็นที่ยึดของตับอ่อน (pancreas) ซึ่งตับอ่อนจะทำหน้าที่ในการผลิตน้ำย่อย (pancreatic juice) เข้าสู่ลำไส้เล็ก (ภาพที่ 1) ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase), ทริปซิน (trypsin) และไลเปส (lipase) น้ำย่อยจากตับอ่อนมีลักษณะค่อนข้างเป็นด่างจึงช่วยให้สภาพในลำไส้เป็นกลางช่วยให้การย่อยอาหารเกิดได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีน้ำดีที่ผลิตจากตับและเก็บไว้ในถุงน้ำดีซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวเหลืองมีความเป็นด่างจะผ่านเข้าไปสู่ส่วนล่างของลำไส้ทางท่อน้ำดี น้ำดีมีหน้าที่ช่วยปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหารให้เป็นกลางและทำให้ไขมันกระจายตัวได้ดี กระบวนการย่อยจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์ในส่วนของลำไส้เล็ก ซึ่งในไก่ที่โตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 150 เซนติเมตร (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.7 ไส้ติ่ง (ceca) เป็นลำไส้ตัน 2 อัน มีลักษณะคล้ายถุงเล็ก ๆ ตอนปลายขยายใหญ่กว่าตอนโคน มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร เชื่อมต่อกับท่อทางเดินอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กกับลำไส้ใหญ่ (ภาพที่ 1) ภายในไส้ติ่งเต็มด้วยอาหารจากลำไส้เล็กและมีอาหารเข้าออกอยู่ตลอดเวลา ไส้ติ่งไม่มีหน้าที่สำคัญในการย่อยอาหารโดยเฉพาะในไก่ที่กินอาหารผสมที่ย่อยง่าย แต่

ในไก่ที่กินอาหารที่มีเยื่อใยสูงการย่อยอาหารอาจเกิดขึ้นได้บ้างโดยอาศัยจุลินทรีย์ในไส้ติ่งเป็นตัวช่วย นอกจากนั้นไส้ติ่งอาจช่วยดูดซึมน้ำจากอาหารในไส้ติ่งได้บ้างเล็กน้อย (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.8 ลำไส้ใหญ่ (large intestine or rectum or colon) อยู่ต่อจากลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วม ในไก่ลำไส้ใหญ่มีขนาดใหญ่กว่าลำไส้เล็กถึง 2 เท่า แต่มีความยาวสั้นมาก คือ มีความยาวเพียง 10 เซนติเมตรเท่านั้น (ภาพที่ 1) กระบวนการย่อยอาหารในลำไส้เล็กอาจต่อเนื่องถึงลำไส้ใหญ่ กากอาหารหรืออาหารที่ผ่านการย่อยแล้วและอาหารบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยหรือย่อยไม่ได้จะเคลื่อนตัวมาอยู่ในลำไส้ส่วนนี้เพื่อการขับถ่ายออก นอกจากนี้จะมีการดูดซึมน้ำออกจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกาย ทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้ง (North, 1984; อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)

1.9 ทวารร่วม (cloaca) เป็นอวัยวะส่วนที่อยู่ปลายสุดของระบบการย่อยอาหารของไก่ (ภาพที่ 1) เป็นแหล่งรวมของสิ่งต่างๆ ก่อนจะออกนอกตัวไก่ผ่านทางทวารหนัก (vent) ของไก่ รวมทั้งอุจจาระ ปัสสาวะและไข่ในแม่ไก่ ถ้าเปิดทวารร่วมจะเห็นช่องอุจจาระของลำไส้ใหญ่อยู่ทางขวาและช่องไข่ออกอยู่ทางซ้ายของตัวไก่ (อาวุธ ตันโช, 2538; ปฐม เลาหะเกษตร, 2540)



ภาพที่ 1 ระบบทางเดินอาหารของไก่

ที่มา : Moreng และ Avens (1985)

เนื่องจากทางเดินอาหารของไก่มีหลายส่วนทำให้มีค่าพีเอชแตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่

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

ที่มา: Sturkie (1976 อ้างโดย รุจา มาลัยพวง, 2544)

จากตารางที่ 1 พบว่าพีเอชในทางเดินอาหารของไก่แต่ละส่วนมีความแตกต่างกันโดยอยู่ในช่วง 2.5-8.4 อย่างไรก็ตามพีเอชของน้ำย่อยในทางเดินอาหารไก่ (กระเพาะและกึ๋น) สามารถลดต่ำลงถึง 0.5-2.0 ได้ (รุจา มาลัยพวง, 2544)

2. จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในทางเดินอาหารไก่

ทางเดินอาหารของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดและมีการดำรงชีพอย่างเป็นระบบ ลูกไก่ที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ นั้นทางเดินอาหารยังปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ในช่วงอายุ 1 สัปดาห์แรกเมื่อลูกไก่ได้กินอาหารหรือวัสดุรองพื้นก็จะได้รับจุลินทรีย์เข้าไปทำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ดำรงชีพโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic flora) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม coliforms และ *Enterococcus* หลังจากนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* จะมีการเจริญมาแทนที่และกลายเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่อาศัยในทางเดินอาหาร นอกจากนี้พบว่าทางเดินอาหารแต่ละส่วนของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ในส่วนกระเพาะพักพบจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* เป็นส่วนใหญ่ซึ่งเกาะอยู่บนเยื่อบุของกระเพาะพัก ส่วนกระเพาะแท้และกระเพาะบดตรวจพบจุลินทรีย์ได้น้อยชนิด อาจเป็นผลมาจากภาวะความเป็นกรดค่อนข้างสูง (pH 1-2) ในลำไส้เล็กสามารถตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* แบคทีเรียแลกติกและจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterococcus* โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* จะมีปริมาณมากที่สุดในลำไส้เล็กส่วนปลายโดยเฉลี่ย 10^{12}-10^{15} CFU/g ไส้ตันเป็นส่วนของทางเดินอาหารที่มีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากซึ่งตรวจพบได้มากกว่า 200 ชนิด ในจำนวนนี้ตรวจพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมและไม่สร้าง

สปอร์ 30 % และพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งไม่สร้างสปอร์ 20% ในไส้ตันไก่แรกเกิดถึงอายุ 3 วันจุลินทรีย์ปกติที่พบได้มากคือกลุ่ม Enterobacteriaceae, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* หลังจากนั้น Enterobacteriaceae และ *Enterococcus* จะลดจำนวนลงและมีจำนวนคงที่หลังจากไก่อายุได้ 15 วัน ส่วนจุลินทรีย์ *Bacteroides* spp. และ *Eubacterium* spp. จะตรวจพบในไก่ตั้งแต่อายุ 2 สัปดาห์ขึ้นไป (ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ, 2547) จากการศึกษาถึงจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีกพบความแตกต่างของชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

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

* Anaerobic cocci, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Gemmiger*, *Fusobacterium* and *Bacteroides* sp.

ที่มา: Tannock (1992 อ้างโดย รุจา มาลัยพวง, 2544)

Jin และคณะ (1996) ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ในทางเดินอาหารของไก่ ซึ่งสามารถแยก *Latobacillus* ได้ 46 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์

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

3. แบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลกติกมีลักษณะทั่วไปคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase)ไม่ต้องการอากาศในการเจริญหรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (Axelsson, 1993) การจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกในสกุลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ การใช้อะซิเตต การสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่ที่มีกรดเกลือความเข้มข้นสูงและการทนกรดหรือด่างต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต ให้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือบางครั้งอาจให้กรดที่ระเหยง่ายตัวอื่น เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย

แบคทีเรียแลกติกสามารถแบ่งตามการใช้สารอาหารและการสร้างสารออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (Kandler and Weiss, 1986; Axelsson, 1993) คือ

- แบคทีเรียแลกติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative lactic acid bacteria) คือ แบคทีเรียแลกติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมตัวอื่นแล้วให้กรดแลกติกประมาณ 85% หรือมากกว่า ไม่ต้องการไธอะมีน (thiamine)ในการเจริญ สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส (hexose isomerase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) และใช้ Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ทำให้ได้กรดแลกติก 2 โมเลกุล ต่อน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หรือ 15 องศาเซลเซียส แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus sake, Lactobacillus*

acidilactici, Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus, Pediococcus dextrinicus และ *Streptococcus lactis* เป็นต้น

- แบคทีเรียแลกติกกลุ่มเฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative lactic acid bacteria) คือแบคทีเรียแลกติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมตัวอื่นแล้วให้กรดแลกติกประมาณ 50% ได้กรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอลประมาน 20-50% และได้คาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย เป็นแบคทีเรียที่ต้องการไธอะมีนในการเจริญ สามารถผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสแต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลสและเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส ใช้ hexose monophosphate หรือ pentose pathway แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus brevis* และ *Leuconostoc mesenteroides* เป็นต้น

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่าง ๆ กรดอะมิโน เป็นต้น สามารถเจริญได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมในอยู่ช่วง 5.58-6.02 (Salminen and Wrigth, 1993)

แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้โดยสารที่สำคัญ คือ

- กรดแลกติก (lactic acid) การยับยั้งแบคทีเรียของกรดแลกติกเกิดจากการทำให้พีเอชในสภาวะลดต่ำลง และสภาวะที่พีเอชภายนอกเซลล์ต่ำทำให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์มีสภาพเป็นกรด กรดแลกติกเป็นกรดที่อยู่ในรูปโมเลกุลไม่แตกตัวซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lipophilic ทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และกรดในรูปไม่แตกตัวนี้จะเข้าไปทำลาย electrochemical proton gradient ของเซลล์ หรือเปลี่ยนแปลงความสามารถในการผ่านสารของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ระบบการขนส่ง substrate ผิดปกติ (Ammor *et al.*, 2006) กรดแลกติกสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อกรดมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Booth, 1985; Maragkoudakis *et al.*, 2006)

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide : H_2O_2) ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยสามารถทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ intermediary oxidation ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า lactoperoxidase antibacterial (Dasechel and Klaenhammer, 1989) กลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เช่น *Lactobacillus* สายพันธุ์ *L. frementum, L. gasseri, L. delbrueckii* subsp *delbrueckii, L. rhamnosus* เป็นต้น (Otero and Nader-Macías, 2005)

- แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Brink *et al.*, 1994) หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Kawai *et al.*, 1994) nisin เป็นแบคเทอริโอซินที่เป็นที่รู้จักกันดีซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus lactis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์หรือราได้ nisin ถูกยับยั้งได้โดยเกลือ และเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนจึงถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ pancreatin และ α-chymotrypsin (Helander *et al.*, 1997)

- ไดอะซิทิล (diacetyl or 2,3-butanodione) เป็นสารประกอบ aroma เกิดจากแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ที่สามารถหมักซิเตรทได้ ให้กลิ่น butter aroma ในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมลบได้ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงอาจทำให้มีกลิ่นรบกวนหากใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร แบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อไดอะซิทิลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Dasechel and Klaenhammer, 1989; Ammor *et al.*, 2006) โดยความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้คือประมาณ 300-1000 ppm ไดอะซิทิลที่ความเข้มข้น 344 ng/ml สามารถยับยั้ง *Listeria, Salmonella, Yersinia, E. coli* และ *Aeromonas* ได้ แต่โดยทั่วไปแล้วไดอะซิทิลที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นในอาหารหมักนั้นมีความเข้มข้นเพียงประมาณ 0.2-1.5 ppm เท่านั้นซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจึงต้องนำมาใช้ในรูปของไดอะซิทิลบริสุทธิ์ (Helander *et al.*, 1997; Ammor *et al.*, 2006)

- รูทีริน (reuterin) เป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลางผลิตขึ้นโดยแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* (Helander *et al.*, 1997) สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

- คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide : CO_2) เป็นผลิตภัณฑ์หลักของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม heterofermentative กลไกการยับยั้งของคาร์บอนไดออกไซด์ยังไม่รู้แน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามคาร์บอนไดออกไซด์มีบทบาททำให้เกิดสภาวะไร้อากาศ (anaerobic environment) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ decarboxylations และการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ใน membrane lipid bilayer ทำให้การส่งผ่านสารต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทำงานผิดปกติ คาร์บอนไดออกไซด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิต่ำ (Gram-negative psychrotrophic bacteria) ระดับการยับยั้งของคาร์บอนไดออกไซด์แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 10% (v/v) สามารถยับยั้งจำนวนของแบคทีเรียได้ 50% และ

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 20-50% (v/v) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์และราได้ดี เป็นต้น (Ammor *et al.*, 2006)

4. โปรไบโอติก

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

ดังนั้นจากความหมายหรือคำนิยามของโปรไบโอติกข้างต้นโปรไบโอติกที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

- ควรเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) และไม่สร้างสารพิษ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)
- ควรเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) เนื่องจากสามารถทนทานต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)
- สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เพื่อให้สามารถเดินทางผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะเป็นกรดสูงได้ (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)
- ควรสามารถสร้างกรดได้ดี เพื่อช่วยปรับสภาวะในทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์กลุ่ม coliform เจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) นอกจากนี้ยังทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากยาอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)
- สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วและสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาน 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)
- สามารถทนต่อน้ำดีได้ดี (Kontula *et al.*, 1998)
- มีการรอดชีวิตสูงแม้เก็บไว้เป็นเวลานาน (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)
- สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

- ควรจะสามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase, และ cellulase มีผลทำให้การย่อยและการใช้ประโยชน์ของยาอาหารต่าง ๆ ดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)
- มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งจะช่วยในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993)
- เป็นตัวแย่งอาหารของแบคทีเรียก่อโรค (Fuller, 1993)
- สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)
- ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

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

โปรไบโอติกประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิดซึ่งช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารและป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญ โดยเมื่อสัตว์ได้รับโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายแล้วโปรไบโอติกจะผ่านกระเพาะอาหารไปเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหารและมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อบุผนังลำไส้โดยเฉพาะผนังลำไส้เล็กทุกส่วนโดยแทรกตัวอยู่ที่ร่องผนัง (villi) จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากทางเดินอาหาร (Karpinska *et al.*, 2001) และการที่มันแปลกปลอมนี่เองจึงสามารถดึงดูดให้แมคโครฟาร์จเดินทางมามาก จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้

ดีขึ้น นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น แบคเทอริโอซิน (Mead, 2000) ซึ่งสามารถทำลายหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2535) สร้างสาร metabolite ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษหรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษแบคทีเรียจำพวก Bifidobacteria ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก สามารถป้องกันการสร้าง amine จากจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก สกุล (genus) *Bacillus* เช่น *B. cereus* หรือสกุล *Clostridium* สามารถสังเคราะห์วิตามินบีซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นได้ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539)

5. การใช้โปรไบโอติกในสัตว์

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

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

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

โดยทั่วไปจะพบการเสริมโปรไบโอติกในรูปผงซึ่งโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สายพันธุ์หลัก ๆ กลุ่มของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เสริมในอาหารสัตว์ในปัจจุบันประกอบด้วย

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

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

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

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

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

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

การใช้โปรไบโอติกในการเสริมการเจริญเติบโตของไก่กระทงโดยการเสริมจุลินทรีย์ *L. acidophilus* I26 ชนิดเดียวและเสริมจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* จำนวน 12 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์, *L. fermentum* 3 สายพันธุ์, *L. crispatus* 1 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 6 สายพันธุ์ ในอาหารไก่พบว่าไก่ที่ได้รับอาหารทั้ง 2 แบบ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าไก่ที่ได้รับอาหารธรรมดาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไก่ที่ได้รับอาหารเสริมจุลินทรีย์ *L. acidophilus* I26 และกลุ่มของ *Lactobacillus* มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) เป็น 2.17 และ 2.02 ตามลำดับ ในขณะที่ไก่ในชุดควบคุมมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 2.27 นอกจากนี้ไก่ที่ได้รับอาหารเสริมจุลินทรีย์กลุ่มของ *Lactobacillus* มีอัตราการตายเพียง 3.3% ในขณะที่ไก่ที่ได้รับอาหารเสริมจุลินทรีย์ *L. acidophilus* I26 มีอัตราการตาย 6.7% ในขณะที่ไก่ในชุดควบคุมมีอัตราการตายสูง 8.3% (Jin *et al.*, 1998)

มีการใช้โปรไบโอติกในไก่เพื่อการป้องกันและกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Salmonella, Campylobacter* เป็นต้น Corrier และคณะ (1994) ศึกษาการใช้โปรไบโอติกเพื่อการป้องกันและกำจัดเชื้อ *Salmonella* ในไก่ โดยการให้โปรไบโอติกที่แยกได้จากไส้ตั่งของไก่กระทงอายุ 10 สัปดาห์ จากนั้นให้ลูกไก่อายุ 1 วันกินอาหารที่ผสมโปรไบโอติกและให้เชื้อ *S. enteritidis* นาน 10 วัน และทำการฆ่าไก่นำมาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากไส้ตั่งพบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกตรวจพบ *Salmonella* น้อยกว่าไก่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับแบคทีเรียโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pascual และคณะ (1999) ที่ใช้ *Lactobacillus salivarius* CTC2197 และตรวจพบ *S. enteritidis* พบหลังจากการให้ไก่กินโปรไบโอติกเป็นเวลา 14 วัน แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* หลังจากการให้ไก่กินโปรไบโอติกผ่านไป 21 วัน นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงผลของโปรไบโอติกต่อเชื้อแบคทีเรีย *Campylobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในคนที่สามารถตรวจพบได้ในไก่พบว่าการให้โปรไบโอติกเพื่อลด

การปนเปื้อน *C. jejuni* ในไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน และนำเนื้อมาตรวจจะพบเชื้อ *C. jejuni* แต่เมื่อผ่านไป 13 วัน ปริมาณการตรวจพบเชื้อ *C. jejuni* ลดลงถึง 60% เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ในกลุ่มควบคุม (Hakkinen and Schneitz, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Morishita และคณะ (1997) ที่พบว่า *L. acidophilus* และ *S. faecium* สามารถป้องกันการติดเชื้อ *C. jejuni* ในไก่ได้ นอกจากนี้มีรายงานว่าการเสริมโปรไบโอติกในอาหารไก่กระทงอายุ 1 วันจนถึงอายุตลาดนั้นน้ำหนักตัวเฉลี่ยของไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกใกล้เคียงกับไก่กลุ่มควบคุมแต่ไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกจะมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่าไก่ในกลุ่มควบคุม (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539)

6. การห่อหุ้มโปรไบโอติกในเม็ดเจล

มีผู้ให้ความสนใจประโยชน์ของโปรไบโอติกที่มีต่อสุขภาพมากว่า 20 ปี ได้มีการพัฒนารูปแบบการนำโปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์เรื่อยมาจนกระทั่งมีการเติมแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรโปรไบโอติกลงในอาหารที่มนุษย์รับประทานกันทั่วไป เช่น ผลิตภัณฑ์นม และได้มีการศึกษาถึงจำนวนของโปรไบโอติกที่มีผลต่อการทำงานของร่างกายมนุษย์พบว่าในผลิตภัณฑ์อาหารก่อนการบริโภคควรมีจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกประมาณ 10^7 CFU/g เช่น โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารอย่างหนึ่งที่มีการเสริมแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อประโยชน์แก่ผู้บริโภค แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เสริมลงไปไม่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้เมื่อผ่านลงสู่ทางเดินอาหาร เนื่องจากมีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ต่ำ โดยมาตรฐานจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกขั้นต่ำเมื่อถึงเวลาบริโภคในแต่ประเทศแตกต่างกัน การศึกษาถึงจำนวนของโปรไบโอติกที่มีผลต่อการทำงานของร่างกายมนุษย์พบว่าในผลิตภัณฑ์อาหารเมื่อถึงเวลารับประทานควรมีจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกอย่างน้อยประมาณ 10^6 CFU/g เป็นอย่างต่ำ ในแต่ละประเทศจึงได้มีการพัฒนามาตรฐานของจำนวนโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ตัวอย่างเช่น ในประเทศญี่ปุ่น The Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association ได้กำหนดมาตรฐานขั้นต่ำของจำนวนโปรไบโอติกไว้ที่ 10^7 CFU/ml และในหลายประเทศมีการกำหนดมาตรฐานขั้นต่ำของจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ 10^6 CFU/g เช่น อาร์เจนตินา ปารากวัย บราซิล และอุรุกวัย เป็นต้น (Krasaekoopt *et al.*, 2003) นอกจากมีการเสริมโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์แล้วยังมีการเสริมโปรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ด้วยเช่นกัน ซึ่งในประเทศไทยกำหนดให้ใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดของสารเสริมชีวนะโปรไบโอติกเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 10^5 CFU ต่ออาหารสัตว์หนึ่งกิโลกรัม (พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่2) พ.ศ. 2542) Anadón และคณะ (2006) รายงานว่าปริมาณที่เหมาะสมของ *Lactobacillus* และ *Enterococcus* ที่ควร

พบในทางเดินอาหารของสัตว์คือ 10^7–10^8 และ 10^5–10^6 CFU/g ตามลำดับ จากการใช้โปรไบโอติกทางการค้าเสริมในอาหารเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของไก่ The annex of Regulation 2200/2001 ได้กำหนดปริมาณของ *E. faecium* NCIMB 10415 ที่เสริมในอาหารขั้นต่ำที่ 0.3×10^9 CFU/g และไม่เกิน 2.8×10^9 CFU/g เมื่อใช้ในรูปเซลล์อิสระ และหากใช้ในรูปเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ให้ใช้ปริมาณขั้นต่ำคือ 1×10^{10} CFU/g และไม่เกิน 1.75×10^9 CFU/g (Becquet, 2003)

เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไปปริมาณของโปรไบโอติกในอาหารอาจลดจำนวนลงจนอยู่ในระดับที่ไม่มีประโยชน์ใด ๆ ต่อร่างกาย เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกอาจไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ในปริมาณมากพอเมื่ออยู่รวมกับผลิตภัณฑ์นมหรืออาหารนั้นๆ และเมื่อแบคทีเรียแลกติกผ่านสู่ทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกจะลดลงอีก (Chandramouli *et al.*, 2004) เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกได้รับความนิยมในการนำมาเสริมในอาหารจึงมีการศึกษาถึงความสามารถในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะทางเดินอาหาร Mishra และ Prasad (2005) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* 7 สายพันธุ์ในสภาวะต่าง ๆ พบว่าที่พีเอช 1 หลังจากการบ่มเชื้อนาน 1 ชั่วโมงตรวจไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ เมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 และ 3 เชื้อมีการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะที่พีเอช 3 แม้ว่าจะบ่มเชื้อไว้ 3 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ยังคงรอดชีวิตได้ และเมื่อศึกษาผลของเกลือน้ำดีพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเพิ่มขึ้นการรอดชีวิตของเชื้อลดลงและการรอดชีวิตของเชื้อยังขึ้นกับระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับน้ำดีด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Maragkoudakis และคณะ (2006) ทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของ *Lactobacillus* 29 สายพันธุ์ พบว่าที่พีเอช 3 ทุกสายพันธุ์รอดชีวิตหลังจากการบ่มไว้ 3 ชั่วโมง ในขณะที่พีเอช 2 มี 16 สายพันธุ์ที่รอดชีวิตเมื่อบ่มนาน 3 ชั่วโมง เชื้อมีการรอดชีวิตน้อยที่สุดที่พีเอช 1 พบว่าหลังจากการบ่มเพียง 1 ชั่วโมง มีเพียง 6 สายพันธุ์เท่านั้นที่รอดชีวิต เมื่อทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3% ที่พีเอช 8.0 พบว่ามี *Lactobacillus* 13 สายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตได้ จากผลการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแลกติกจะมีการรอดชีวิตน้อย ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกเพื่อให้เชื้อมีชีวิตรอดมากที่สุดเพื่อให้สามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ได้ เทคนิคที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายคือเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียด้วยวัสดุธรรมชาติ จึงได้มีการคิดวิธีการต่าง ๆในการป้องกันโปรไบโอติกให้สามารถรอดชีวิต เช่น ใช้สารบางชนิดมาห่อหุ้มโปรไบโอติกเพื่อป้องกันผลจากสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก (Kailasapathy, 2006) Sheu และ Marshall (1993) รายงานว่าเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแลกติกใน calcium alginate ซึ่งมีลักษณะเป็นแคปซูลเล็ก ๆ เป็นวิธีการที่นิยมเป็นอย่างมาก เรียกวิธีการนี้ว่า encapsulation methods ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่ม

ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียและความสะดวกในการขนส่งกล้าเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก นอกจากนี้ calcium alginate มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Sultana *et al.*, 2000) ไม่เป็นพิษกับเซลล์แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้ม นอกจากนี้ยังได้รับการยอมรับในการใช้เป็น food additive อีกด้วย (Prevost and Divies, 1992)

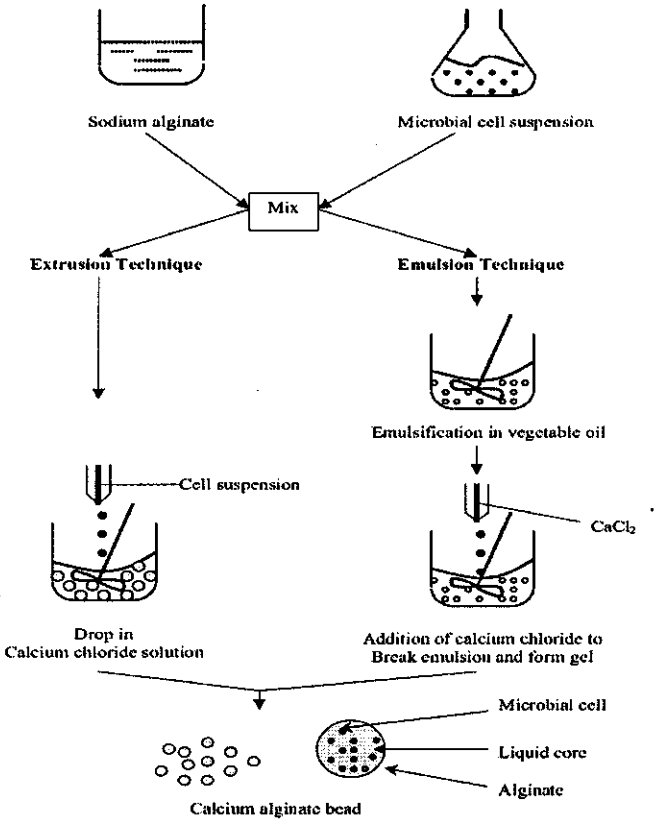
Muthukumarasamy และ Holley (2007) ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 และ *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 ที่เพิ่มลงในไส้กรอกเมื่อทำการห่อหุ้มใน sodium alginate ความเข้มข้น 3% (w/v) ทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับโปรไบโอติกอิสระ ในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกพบว่าจำนวนของ *L. reuteri* อิสระลดลงจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 7.24 log CFU/g เป็น 4.66 log CFU/g และ *B. longum* อิสระลดลงจาก 7.31 log CFU/g เป็น 5.53 log CFU/g หลังจากการหมักไส้กรอกเป็นเวลา 27 วัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *Lactobacillus reuteri* ร่วมกับ *Bifidobacterium longum* อิสระ พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงเป็น 4.42 log CFU/g หลังจากการทำให้ไส้กรอกแห้ง แต่โปรไบโอติกที่ทำการห่อหุ้มทุกชุดการทดลองมีจำนวนลดลงน้อยกว่า 0.92 log CFU/g หลังจากการหมักไส้กรอกเป็นเวลา 27 วัน การห่อหุ้มเซลล์ทำให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารหมักผ่านไปเปรียบเทียบกับเซลล์แบคทีเรียอิสระที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเท่ากัน เนื่องจากเม็ดเจลภายนอกสามารถปกป้องอันตรายให้กับเซลล์ที่อยู่ภายในจากสภาวะต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี

การทำ microencapsulation นอกจากจะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในทางเดินอาหารแล้วยังช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียจาก bacteriophages และช่วยเพิ่มการรอดชีวิตระหว่างการทำ freeze drying และการแช่แข็ง (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

การทำ microencapsulation เป็นวิธีการที่ใช้ในการป้องกันแบคทีเรียโปรไบโอติกจากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรียและเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน โดยการห่อหุ้มหรือการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการไว้ในวัสดุที่มีคุณสมบัติพิเศษ สารที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เช่น calcium alginate, sodium alginate, carageenan, cellulose acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น เทคนิคในการทำ microencapsulation ที่ประยุกต์มาใช้กับโปรไบโอติกสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ extrusion technique (droplet method) และ emulsion technique (two phase system)

6.1 Extrusion technique (droplet method) เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันโดยทั่วไปในการทำเม็ดเจลด้วย hydrocolloid ทำโดยการเตรียมสารละลาย hydrocolloid แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมกัน และใช้วิธีการปล่อย suspension ของเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยด ลงไป

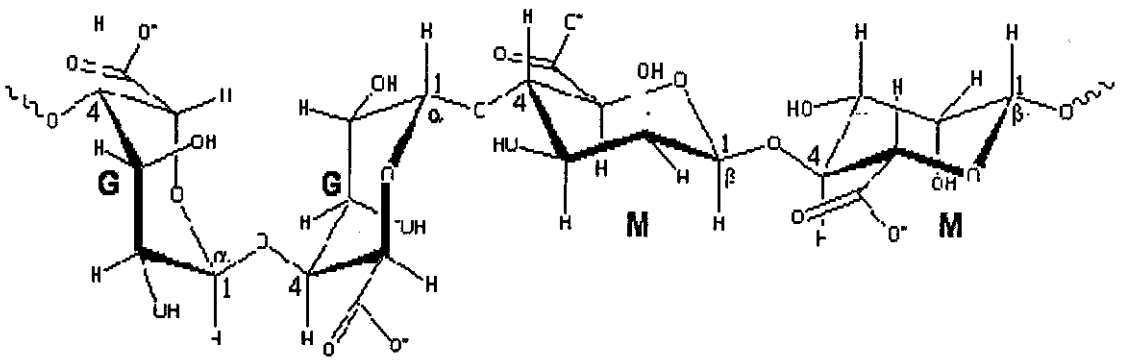
ในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) (ภาพที่ 2) ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้และความสูงของการหยด suspension ของเซลล์ลงใน hardening solution วิธีการนี้เป็นวิธีได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสภาวะที่ไม่รุนแรงเซลล์แบคทีเรียจึงมีอัตราการรอดชีวิตได้สูง (Krasaekoopt *et al.*, 2003)



ภาพที่ 2 การทำ microencapsulation โดยวิธี extrusion และ emulsion
ที่มา : Krasaekoopt และคณะ (2003)

วัสดุตัวพยุง (supporting material) ที่นิยมใช้ในวิธีนี้คือ alginate ซึ่งเป็นเฮทเทอร์โรพอลิแซคคาไรด์สายตรง (linear heteropolysaccharide) ของ D-mannuronic และ L-guluronic acid (ภาพที่ 3) คุณสมบัติและหน้าที่ของ alginate คือเป็น supporting material โดยความแข็งแรงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและลำดับของ D-mannuronic และ L-guluronic acid นั่นเอง การขึ้นรูปของเม็ดเจลทำได้โดยการผสมสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียกับสารละลาย sodium alginate และหยดลงในสารละลายที่เป็น multivalent cation ซึ่งโดยทั่วไปใช้ Ca^{2+} ในรูปแคลเซียมคลอไรด์ เซลล์ซึ่งอยู่ในพอลิเมอร์ของเหลวจะเกิดเป็นเม็ดเจลขึ้น ความเข้มข้นของ alginate และแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปเจลมีความหลากหลาย เช่น Jankowski และคณะ (1997) ใช้ alginate ความเข้มข้นต่ำมาก

คือ 0.6% และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ในขณะที่การศึกษาโดยทั่วไปใช้ alginate ที่ความเข้มข้น 1-2% และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.05-1.5 โมลาร์ (Krasaekoopt *et al.*, 2003)



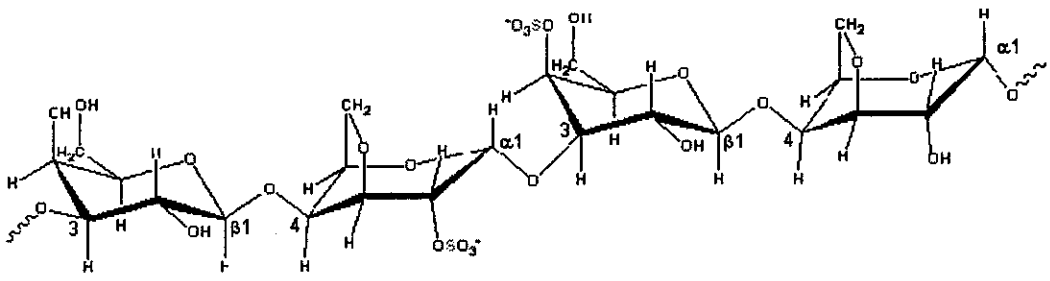
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ alginate
ที่มา : Chaplin (2008)

6.2 Emulsion technique (two phase system) เทคนิคนี้ใช้การเติมสารแขวนลอยของเชื้อในไฮโดรคอลลอยด์ปริมาตรเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่าหรือน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ส่วนผสมจะถูกตีปั่นจนอยู่ในรูป water-in-oil emulsion (ภาพที่ 2) จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) ลงไป ซึ่งส่วนใหญ่แล้วนั้นจะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น hardening solution สำหรับ alginate ขนาดของเม็ดเจลที่เกิดขึ้นขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่น ชนิด และความเข้มข้นของไฮโดรคอลลอยด์ โดยแคปซูลที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 ไมโครเมตรถึง 2 มิลลิเมตร (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

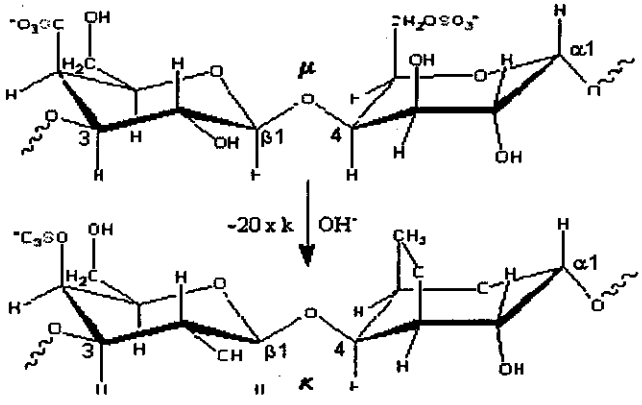
วัสดุตัวพยุงที่นิยมใช้ในวิธีนี้ มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น ส่วนผสมของ K-carageenan กับ locust bean gum, cellulose acetate phthalate, alginate, chitosan และ gelatin เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพยุงจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป เช่น

- Carrageenan โดยทั่วไปจะใช้ K-carageenan (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่โดยทั่วไปใช้เป็น food additive และใช้อุณหภูมิที่ 60-80 องศาเซลเซียสในการละลาย carageenan ที่มีช่วงความเข้มข้น 2-5% และสามารถชักนำการเกิดเจลโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้ต่ำลง ในการทำ microencapsulation โดยการเติม suspension ของเชื้อแบคทีเรียลงในสารละลาย carrageenan ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสแล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และจะใช้โปตัสเซียมไอออนซึ่งอยู่ในรูปของโปตัสเซียมคลอไรด์ทำให้เจลมีความคงตัวหลังจากการขึ้นรูป (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

a



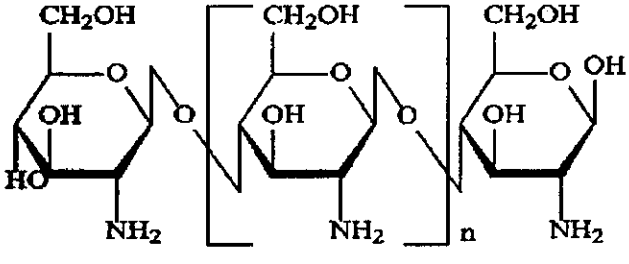
b



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ (a) carrageenan ; (b) K-carageenan

ที่มา : Chaplin (2008)

- ไคโตซาน เป็นพอลิแซคคาไรด์สายตรงซึ่งเป็นประจุบวก (ภาพที่ 5) ที่ได้มาจากกระบวนการ deacetylation ของไคตินที่สกัดจากโครงร่างแข็งภายนอกร่างกายของสัตว์ทะเลเปลือกแข็ง (subphylum crustacean) ไคโตซานสามารถละลายน้ำได้ที่พีเอชน้อยกว่า 6.5 (Krasaekoopt *et al.*, 2003)



Chitosan

ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา : Chitosan (2007)

นอกจากการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียด้วยพอลิเมอร์ธรรมชาติอย่างเดียวแล้วนั้น ยังมีการศึกษาถึงการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei* และ *Bifidobacterium bifidum* เมื่อมีการนำเอาพอลิเมอร์ธรรมชาติหรือสารอย่างอื่นที่ได้จากธรรมชาติมาทำการเคลือบผิวเม็ดเจลภายนอก เช่น การเคลือบเม็ดเจลที่ห่อหุ้มจาก sodium alginate ด้วย chitosan, sodium alginate และ poly-l-lysine (PLL) พบว่า การเคลือบเม็ดเจลด้วยวัสดุต่าง ๆ ไม่ส่งผลต่อความแตกต่างของขนาดของเม็ดเจลโดยเม็ดเจลที่ผ่านการเคลือบด้วยวัสดุต่าง ๆ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.89 มิลลิเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับเม็ดเจลที่ไม่ผ่านการเคลือบที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.62 มิลลิเมตร และเมื่อบ่มเม็ดเจลทั้งหมดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียที่มีการเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซานมีการรอดชีวิตได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับเม็ดเจลที่เคลือบด้วยวัสดุอื่น ๆ และเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการลดลง 1 log cycle ของเซลล์ (destructive value : *D*-value) การเคลือบเม็ดเจลสามารถเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้แบคทีเรียตายได้ และการเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซานมีค่า *D*-value สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเจลที่เคลือบด้วยวัสดุอื่น ๆ (Krasaekoopt *et al.*, 2004)

การเคลือบเม็ดเจลเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี เนื่องจากการเคลือบสามารถเพิ่มความแข็งแรงและความคงตัวให้กับเม็ดเจล นอกจากนี้ยังทำให้รูพรุนของเม็ดเจลมีขนาดเล็กลง ทำให้แบคทีเรียโปรไบโอติกที่อยู่ภายในสัมผัสกับสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้น้อยลง เซลล์ที่อยู่ภายในจึงมีการรอดชีวิตมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียอิสระและเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามการเคลือบเม็ดเจลต้องคำนึงถึงการนำไปใช้ประโยชน์ด้วย เนื่องจากต้นทุนในการห่อหุ้มเซลล์จะเพิ่มขึ้น

7. ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก

ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกสามารถแบ่งออกได้หลายปัจจัยด้วยกันคือ

7.1 วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียนั้นมี 2 วิธีการด้วยกันคือ extrusion technique และ emulsion technique โดยโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธีการทั้งสองสามารถรอดชีวิตเพิ่มขึ้นถึง 80-95% (Krasaekoopt *et al.*, 2003) และนอกจากขั้นตอนในการทำของทั้งสองวิธีจะต่างกันแล้วยังพบข้อดีและข้อด้อยในการห่อหุ้มเซลล์ของทั้งสองวิธีซึ่งแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค extrusion และ emulsion

	Extrusion	Emulsion
Technological feasibility	Difficult to scale up	Easy to scale up
Cost	Low	High
Simplicity	High	Low
Size of bead	2–5 mm	25 μm–2 mm

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

จากประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกและความแตกต่างของทั้งสองวิธีการ การห่อหุ้มเซลล์แต่ละครั้งจึงควรคำนึงถึงความเหมาะสมในการนำเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มไปใช้ประโยชน์ ควรเลือกวิธีการในการห่อหุ้มที่มีประสิทธิภาพและให้ประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้

7.2 วัสดุตัวพยุง

วัสดุตัวพยุงที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด ซึ่งพบว่าวัสดุตัวพยุงแต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการใช้ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแตกต่างกันด้วย Lian และคณะ (2003) ศึกษาถึงความแตกต่างของวัสดุตัวพยุงที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Bifidobacterium longum* B6 ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วย gum arabic, skim milk, gelatin และ soluble starch ที่ความเข้มข้น 10% (w/v) พบความแตกต่างของการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังการห่อหุ้มและนำเม็ดเจลไปบ่มในสภาวะทางเดินอาหารเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียอิสระมีการรอดชีวิตได้ต่ำกว่าแบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุตัวพยุงต่าง ๆ โดยการใช้ gum arabic, gelatin และ soluble starch เป็นวัสดุตัวพยุงในการห่อหุ้มเซลล์สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Bifidobacterium longum* B6 ได้ดีกว่าการห่อหุ้มเซลล์ด้วย skim milk ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ *Bifidobacterium longum* B6 สามารถเจริญหรือทนต่อวัสดุตัวพยุงสามชนิดแรกได้ดีกว่า skim milk นั่นเอง ดังนั้นในการห่อหุ้มเซลล์แต่ละครั้งจึงควรคำนึงถึงวัสดุตัวพยุงที่มีความเหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใช้ด้วย

การใช้ alginate มีความเหมาะสมในการห่อหุ้มแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactabacillus* เช่น *L. acidophilus, L. delbrueckii* spp. *balgaricus, L. plantarum* เป็นต้น แบคทีเรีย *Bifidobacterium* เช่น *B. longum* และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* เช่น *S. thermophillus, S. lactis* เป็นต้น วัสดุพยุงตัวอื่น ๆ เช่น K-carageenan เหมาะสมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. thermophillus, L. lactis* spp. *casei* เป็นต้น แต่การใช้ K-carageenan เพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย *B. longum*

วัสดุอีกชนิดคือ cellulose acetate phthalate ให้ผลดีในการห่อหุ้มโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. pseudolongum* โดยการห่อหุ้มด้วย emulsion technique ซึ่งทำให้ *B. pseudolongum* ที่บ่มในสภาวะกรดทางเดินอาหารมีการรอดชีวิตถึง 10^9 CFU/ml นอกจากนี้พบว่ามีการใช้ gelatin ความเข้มข้นสูง หรือไคโตซาน ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *L. lactis* spp. *cremoris* อีกด้วย (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

การห่อหุ้ม *B. pseudolongum* ด้วย cellulose acetate phthalate (CAP) และ calcium alginate สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่จำลองการเป็นกรดในทางเดินอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอิสระที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ และพบว่าการใช้ calcium alginate ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสามารถป้องกันเซลล์แบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้ cellulose acetate phthalate (CAP) (Rao *et al.*, 1989)

Sultana และคณะ (2000) ศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bifidobacterium* spp, *L. casei* และ *L. acidophilus* ต่อสภาวะกรดในทางเดินอาหารและเกลือน้ำดีในการทำ microencapsulation โดยใช้ alginate ร่วมกับพรีไบโอติกโดยใช้เทคนิค emulsion technique ซึ่งใช้ calcium alginate ความเข้มข้น 2% ร่วมกับแป้งข้าวโพด (Hi-maize resistant starch) 2% และเซลล์แบคทีเรีย 1% และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที จากการศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกในสภาวะกรดพบว่าแบคทีเรียภายในเม็ดเจลที่ใช้ alginate ร่วมกับแป้งข้าวโพดสามารถรอดชีวิตได้มากกว่าแบคทีเรียที่ใช้ alginate ในการห่อหุ้มเซลล์เพียงอย่างเดียว และในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีพบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 2% เซลล์แบคทีเรียในเม็ดเจลมีการตายลดลงมากกว่าที่ระดับเกลือน้ำดี 1% โดย *Bifidobacterium* spp.ในเม็ดเจลสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีกว่า *L. acidophilus* และ *L. casei* อิสระ

เนื่องจากวัสดุตัวพยุงต่าง ๆ มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันในด้านของโครงสร้าง องค์ประกอบ และความเหมาะสมในการนำไปใช้ แต่โดยทั่วไปแล้วในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียนั้นนิยมใช้ alginate เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์ของแบคทีเรีย ราคาถูก สามารถนำมาใช้ได้ง่าย ไม่ซับซ้อน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

7.3 ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ใช้

เมื่อพิจารณาถึงระดับความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุง โดยการใช้ alginate ในการห่อหุ้มแบคทีเรียพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ alginate จาก 0.75% เป็น 1%, 1.5%, 1.8% และ 2% ตามลำดับ จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ alginate เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (Chandramouli *et al.*, 2004) Lee และ Heo (2000) ที่ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *B. bifidum* ที่

ห่อหุ้มเซลล์ด้วย calcium alginate พบว่า เมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะกรดในทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลที่ใช้วัสดุตัวพยุงที่ความเข้มข้นสูงมีการรอดชีวิตได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ต่ำกว่า โดยพบว่าที่ alginate ความเข้มข้น 4% แบคทีเรียภายในเม็ดเจลมีการรอดชีวิตได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 3% และ 2% เมื่อนำเม็ดเจลมาบ่มในสภาวะกรดในทางเดินอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Chen และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยการใช้วัสดุตัวพยุงต่างๆ กันคือ sodium alginate และพรีไบโอติก เช่น fructooligosaccharides และ isomaltooligasaccharides ที่ทำการห่อหุ้มแบคทีเรียด้วยวิธี extrusion ซึ่งขึ้นรูปเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะกรดของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus, L. casei, B.longum* และ *B. bifidum* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของวัสดุตัวพยุงต่าง ๆ ที่ทำให้โปรไบโอติกมีชีวิตรอดได้มากที่สุดคือการใช้ sodium alginate ความเข้นข้น 3% หรือใช้ fructooligosaccharides ความเข้มข้น 3% และพบว่าการไม่ใช้ isomaltooligasaccharides ในการห่อหุ้มเซลล์สามารถทำให้โปรไบโอติกรอดชีวิตได้มากกว่าการใช้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

โดยทั่วไปการเพิ่มความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงสามารถเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลได้ เนื่องจากความเข้มข้นของวัสดุที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจลซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เซลล์รอดชีวิตได้มากขึ้น

7.4 ขนาดของเม็ดเจล

จากการศึกษาความแตกต่างของเม็ดเจลขนาดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Lactabacillus* 2 สายพันธุ์คือ *L. acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 ที่ทำการห่อหุ้มเซลล์ในเม็ดเจลขนาด 200, 450 และ 1000 ไมโครเมตร ซึ่งใช้ alginate พีเอช 6.9 และทำให้แข็งตัวโดยการหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จากการศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่สภาวะกรด (pH 2) พบว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้น ภายใต้สภาวะกรดพีเอช 2 ของทางเดินอาหาร การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้น โดยเม็ดเจลขนาด 1000 ไมโครเมตร ทำให้เชื้อแบคทีเรียรอดชีวิตได้มากที่สุดรองลงมาคือเม็ดเจลขนาด 450 และ 200 ไมโครเมตร ตามลำดับ (Chandramouli *et al.*, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sheu และ Marshall (1993) ที่พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่ใหญ่ขึ้นทำให้ *L. bulgalicus* มีการรอดชีวิตในขนมหวานแช่แข็งได้ดีกว่าขนาดของเม็ดเจลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า นอกจากนี้ Lee และ Heo (2000) ยังรายงานว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะกรดทางเดินอาหารลดลงเมื่อขนาดของเม็ดเจลเล็กลง

การที่แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มขนาดของเม็ดเจลให้ใหญ่ขึ้น เนื่องจากเมื่อเม็ดเจลมีขนาดใหญ่พื้นที่ผิวสัมผัสที่จะสัมผัสกับสภาวะต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายกับตัวเซลล์แบคทีเรียจะน้อยลง ในขณะที่เม็ดเจลขนาดเล็กนั้นมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากขึ้นทำให้แบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมมากขึ้นจึงทำให้แบคทีเรียมีการตายเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

7.5 เวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์

ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลยังขึ้นกับปัจจัยอีกตัวหนึ่งคือเวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวหรือการขึ้นรูปเม็ดเจลโดยทั่วไปแล้วนิยมใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากการศึกษาถึงผลของเวลาในการขึ้นรูปเม็ดเจลของ Chandramouli และคณะ (2004) โดยแช่เม็ดเจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียในเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เวลา 30 นาทีหรือมากกว่า 30 นาที มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 5 นาที ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้จากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (Lee and Heo, 2000) ระยะเวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย เนื่องจากเมื่อใช้ระยะเวลาเพิ่มจะทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวและมีความแข็งแรงมากขึ้น เมื่อนำเม็ดเจลไปบ่มในสภาวะต่าง ๆ เม็ดเจลจึงสามารถปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในได้ดีขึ้นด้วย

7.6 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

สายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการห่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาของ Grosso และ Fávaro-Trindade (2004) เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *Bifidobacterium lactis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่ผ่านการห่อหุ้มและเติมลงในโยเกิร์ตที่เก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 28 วัน *S. thermophilus* และ *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* สามารถมีชีวิตรอด 1.8×10^{6} และ 8.7×10^{5} CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการรอดชีวิตของ *B. lactis*

แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ มีการรอดชีวิตแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์นั้น ๆ ก่อนการห่อหุ้มเซลล์จึงควรศึกษาถึงลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะ

นำมาใช้ด้วย นอกจากนี้ควรเลือกวัสดุตัวพยุงให้เหมาะสมกับเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตให้กับแบคทีเรียเช่นกัน

แม้ว่าการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียด้วยพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติจะได้รับการยอมรับว่าสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดีในการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการอยู่ คือ

- การใช้วิธี extrusion technique ในการขยายขนาดการผลิตจุลินทรีย์ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์โดยเม็ดเจลไปสู่ระดับอุตสาหกรรมให้เป็นเกรดอาหาร (food-grade) ยังคงทำได้ยาก เนื่องจากยังมีความสามารถในการผลิตอยู่ในระดับต่ำ แต่เป็นวิธีการที่ใช้ต้นทุนต่ำกว่าวิธี emulsion technique
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มโดยวิธี extrusion technique มีขนาดใหญ่เกินไปที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารบางประเภท
- ถึงแม้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โดยวิธี emulsion technique ให้ขนาดเม็ดเจลที่เล็กลงกว่าวิธี extrusion technique แต่ขนาดของเม็ดเจลที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ และเป็นเทคนิคที่ยากต่อการควบคุมสภาวะให้ปลอดการปนเปื้อน

การรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ คือ วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์ วัสดุตัวพยุง ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ใช้ ขนาดของเม็ดเจล จำนวนเซลล์เริ่มต้น เวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย ระยะเวลาในการเก็บรักษา และการเคลือบเม็ดเจลด้วยวัสดุจากธรรมชาติ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้การรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกไม่ได้มีผลจากปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงอย่างเดียว แต่ทุกปัจจัยล้วนแต่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้งสิ้น ในการห่อหุ้มเซลล์จึงควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ร่วมกัน นอกจากนี้ควรคำนึงถึงการนำแบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์แล้วนั้นไปใช้อย่างเหมาะสม เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการใช้งานในแต่ละครั้ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมือง
2. เพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้หลังจากการทำ microencapsulation

ขอบเขตงานวิจัย

แยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมือง โดยศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในหลอดทดลอง (*in vitro*) คือ การทนต่อกรด การทนต่อเกลือน้ำดี การยับยั้งเชื้อก่อโรค และการย่อยสารอาหาร ได้แก่ โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรท ทำการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ ตลอดจนศึกษาการทำ microencapsulation เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ

1. กระเพาะพัก ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และไส้ติ่ง ของไก่กระทงอายุประมาณ 40-50 วัน จำนวน 10 ตัว และไก่พื้นเมืองอายุประมาณ 3-4 เดือน จำนวน 8 ตัว ที่ฆ่าแล้วจากตลาดสดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้คือ *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
   - MRS broth (de Man Rogosa and Sharp) จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
   - Nurtrition broth จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
4. สารเคมี
   - สารเคมีสำหรับย้อมแกรม ประกอบด้วย crystal violet, gram iodine, แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ safranin
   - ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัทวิทยาศรม จำกัด
   - Bromocresol purple ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajax Finechem, Australia
   - พาราฟินเหลว จากบริษัทวิทยาศรม จำกัด
   - กลีเซอรอล ยี่ห้อ AnalaR® บริษัท VWR International Ltd., England
   - L-cysteine จากบริษัท Fluka Biochemika, Japan
   - Skim milk จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
   - Tributyrin จากบริษัท Fluka, USA
   - Soluble starch ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajax Finechem, Australia
   - โซเดียมอัลจิเนต เบอร์ 71240 จากบริษัท Fluka, Switzerland
   - น้ำมันปาล์ม ยี่ห้อ มรกต บริษัท มรกต อินดัสตรี้ส์ จำกัด (มหาชน)
   - น้ำดีสดจากไก่กระทง
5. เอนไซม์
   - เอนไซม์เปปซิน (pepsin) จากบริษัท Fluka, USA

- เอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) จากบริษัท Sigma, Germany

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
2. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212
3. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-1200
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR20B
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Eppendorf Centrifuge รุ่น 5415R
9. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044
10. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon รุ่น YS2H
11. เครื่องตีปั่น (stomacher) ยี่ห้อ Seward รุ่น stomacher® 400 Circulator
12. เครื่องโฮโมจิไนซ์ ยี่ห้อ Kika Labortechnik รุ่น T25 basic
13. Peristaltic pump ยี่ห้อ Perista semipump รุ่น SJ-1211
14. เข็มและห่วงเขี่ยเชื้อ
15. ปากคีบ
16. เข็มฉีดยาขนาด 24G
17. สายยางซิลิโคน

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่

ใช้เชือกผูกปิดหัวและท้ายของอวัยวะของไก่ที่ต้องการใช้คือกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และไส้ตัน แล้วตัดออกมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 30 วินาที 2 ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ภายนอกอวัยวะ และแช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เพื่อล้างแอลกอฮอล์ออก จากนั้นนำมาตีปั่นด้วย stomacher เจือจางในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่มีเกลืออยู่ด้วย 0.85% ในอัตราส่วน 1:9 แล้วเจือจางต่อแบบ ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสม จากนั้น pour plate ในอาหาร MRS agar ที่เติม bromocresol purple 0.02% จากนั้นนำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างกรดจากอวัยวะแต่ละส่วน นำเชื้อที่มีสีเหลืองรอบๆ โคโลนีมาทำการ streak 2-3 ครั้งลงบน

อาหาร MRS agar ที่เติม bromocresol purple 0.02% เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทดสอบการเป็นแบคทีเรียแลกติกโดย

- ย้อมสีแกรมตามวิธีการของ Hucker staining method (Murray *et al.*, 1994) โดยแบคทีเรียแลกติกจะติดสีแกรมบวก และศึกษาลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson, 1993) โดยแบคทีเรียแลกติกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

เก็บเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไว้ในอาหาร MRS broth ที่มีกลีเซอรอล 25% ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากข้อ 1 มา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10 % ลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน ปิเปต culture broth มา 1 มิลลิลิตรลงใน eppendorf ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % สองครั้ง จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบติก คือ

2.1 ความสามารถในการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 2 โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปรับพีเอชเป็น 3.0 และ 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินอยู่ด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่ 41 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Conway *et al.*, 1987 ; Charteris *et al.*, 1998) เลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่ทนต่อกรดที่พีเอช 2.5 โดยสามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 5 log CFU/ml เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

2.2 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดีและเอนไซม์แพนครีเอติน

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อที่เลือกได้จากข้อ 2.1 เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 ที่ปรับพีเอชเป็น 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin อยู่ด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีน้ำดีสดของไก่ (กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมโครเมตร) ที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 1.0, 3.0, 5.0 และ 7.0% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, และ 6 ชั่วโมง ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นตรวจหาการรอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี

bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (ดัดแปลงจาก Charteris *et al.*, 1998; Maragkoudakis *et al.*, 2006) เลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีโดยสามารถรอดชีวิตได้ที่สภาวะที่มีน้ำดีเข้มข้นที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบในขั้นต่อไป

2.3 ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบต่อเนื่องกัน

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากข้อ 2.2 มา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10 % ลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน ปิเปต culture broth มา 1 มิลลิลิตรลงใน eppendrof ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % สองครั้ง จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อที่เลือกได้โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปรับพีเอชเป็น 3.0 และมีเอนไซม์เปปซินอยู่ด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1965 unit/ml) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่ 41 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยของเชื้อที่บ่มในสภาวะกรดครบ 2 ชั่วโมงมาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเกลืออยู่ด้วย 0.85% สองครั้ง แล้วจึงเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเกลืออยู่ด้วย 0.85% ที่ปรับพีเอชเป็น 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีน้ำดีสดของไก่ความเข้มข้น 7% อยู่ด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาการรอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (ดัดแปลงจาก Madureira *et al.*, 2005)

2.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งเก็บไว้ในกลีเซอรอลมา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จนมีอายุครบ 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบ

- ทดสอบการย่อยโปรตีน : หยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ใช้ skim milk ความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ (ดัดแปลงจาก Michael and Pelezar, 1995)

- ทดสอบการย่อยไขมัน : หยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 1% tributyrin นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ (ดัดแปลงจาก Michael and Pelezar, 1995)

- ทดสอบการย่อยแป้ง : หยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ใช้ soluble starch ความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้งโดยการวางเกล็ดไอโอดีนลงบนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ไอของไอโอดีนระเหยไปสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (ดัดแปลงจาก Mitidieri *et al.*, 2006)

2.5 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากข้อ 2.2 มา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตรบ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อ 10 % ลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ลงบนอาหาร MRS agar แล้วบ่มที่สภาวะเดียวกัน หลังจากการบ่ม นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์ (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml ที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางในอาหาร soft nutrient agar ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเทสารแขวนลอยของเชื้ออินดิเคเตอร์และอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งทับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียแลกติกเจริญอยู่ ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Makras and De Vuyst, 2006) วัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้น จากนั้นหาประสิทธิภาพของการยับยั้งโดยใช้สูตร

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

โดยประสิทธิภาพการยับยั้งสามารถแบ่งออกได้เป็นหากค่าเท่ากับ 1 (-) นั่นคือไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง ถ้าอยู่ในช่วง 1.1-1.9 (+) หมายถึงมีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ อยู่ในช่วง 2.0-2.9 (++) หมายถึงมีประสิทธิภาพการยับยั้งปานกลาง และหากค่าประสิทธิภาพการยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 3.0 (+++) นั่นคือมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูง

2.6 การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติก

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีมาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.7 การศึกษาการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดและเกลือน้ำดีของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้หลังจากการทำ microencapsulation

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มา 0.1 มิลลิลิตรเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10 % ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % นำมาศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโดยการทำ miroencapsulation ด้วยเทคนิค Extrusion และ Emulsion ดังนี้คือ

- Extrusion technique : แขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 6.9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 log CFU/ml แล้วหยดสารแขวนลอยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G ความสูงของปลายเข็มฉีดยาและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 5 เซนติเมตร ควบคุมความเร็วในการหยดด้วย peristaltic pump แช่เม็ดเจลที่ได้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์นาน 30 นาที แยกเม็ดเจลโดยการกรองเม็ดเจลผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

- Emulsion technique : แขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 6.9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 log CFU/ml แล้วเติมลงในน้ำมันปาล์มปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นโฮโมจิไนซ์ด้วยความเร็ว 900 rpm ให้อยู่ในรูป water-in-oil emulsion นาน 20 นาที เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงไปอย่างรวดเร็ว แช่เจลแคลเซียมคลอไรด์นาน 30 นาที เมื่อเกิดการแยกชั้นของน้ำมัน เม็ดเจล และแคลเซียมคลอไรด์ แยกชั้นน้ำมันออกจากนั้นกรองเม็ดเจลผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาล้างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85%และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ 2 ครั้ง หา encapsulation yield (EY) ซึ่งเป็นการวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้มและการรอดชีวิตของเซลล์ระหว่างกระบวนการห่อหุ้ม (Annan *et al.*, 2008) โดยใช้สูตร

$$EY\ (\%) = (N / N_0) \times 100$$

เมื่อ N = the number of viable entrapped cells released from the microspheres

N_0 = the number of free cells added to the biopolymer mixture during the production of the microspheres

จากนั้นนำเม็ดเจลมาทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตโดย

- ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดกระเพาะอาหารและสภาวะในลำไส้เล็กโดยการทดสอบต่อเนื่องกันโดย

ชั่งเม็ดเจลมา 1 กรัม เติมลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปรับพีเอชเป็น 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินอยู่ด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกเม็ดเจลที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % สองครั้ง จากนั้นเติมโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเกลืออยู่ด้วย 0.85% ที่ปรับพีเอชเป็น 8.0 มีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีน้ำดีสดของไก่ความเข้มข้น 7% อยู่ด้วยปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจหาการรอดชีวิตของเชื้อภายในเม็ดเจลก่อนการบ่ม และหลังจากการบ่มในสภาวะต่าง ๆ โดยชั่งเม็ดเจล 1 กรัม มาโฮโมจิไนซ์ในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเกลืออยู่ด้วย 0.85% ที่ปรับพีเอชเป็น 7.5 โดย stomacher เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยของเซลล์ที่ได้ต่อแบบ serial ten-fold dilution และตรวจหาการรอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองที่ถึงอายุขายคือไก่กระทงอายุประมาณ 40-50 วัน และไก่พื้นเมืองอายุประมาณ 3-4 เดือน ซึ่งเป็นไก่ที่ขายโดยทั่วไปในท้องตลาด คัดเลือกโดยการใช้อาหารแข็ง MRS ที่เติม bromocresol purple 0.02% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดได้ในทุกส่วนของทางเดินอาหารทั้งในกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และไส้ติ่ง โดยสามารถแยกเชื้อจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่อาหารเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีเหลืองรอบ ๆ โคโลนีซึ่งเกิดจากการสร้างกรดของแบคทีเรีย จากการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างกรดจากทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่ทั้งสองชนิดได้ผลดังตารางที่ 4 และ 5 จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดได้จำนวน 564 ไอโซเลต (isolate) โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง 8 ตัว จำนวน 237 ไอโซเลต และที่แยกได้จากไก่กระทง 10 ตัวจำนวน 326 ไอโซเลต ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศน้อย (microaerophile) และพบว่าโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างกรดมีความแตกต่างกันคือเป็นโคโลนีแบบขอบกลมและขอบรูปร่างไม่สม่ำเสมอ สีขาว สีเหลืองอ่อนและสีเหลืองเข้ม ทั้งนี้สีของโคโลนีที่สังเกตเห็นนั้นเกิดจากการดูดซับสีของ bromocresol purple ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผิวของโคโลนีที่พบจะมีลักษณะผิวหยาบจนถึงเรียบ ผิวแบนจนถึงโค้ง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตรเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (TVC) และแบคทีเรียแลกติก (LAB) ที่มีในทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่พื้นเมือง

Organ	Type of bacteria	Viable counts (CFU/g)							
		PM1	PM4	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9	PM10
CR	TVC	1.38×10^7	1.04×10^8	4.40×10^6	1.92×10^8	2.61×10^8	2.78×10^8	1.87×10^8	9.28×10^8
	LAB	1.75×10^5	9.55×10^6	ND	1.36×10^8	2.60×10^7	6.70×10^7	3.80×10^7	4.85×10^8
S	TVC	2.11×10^7	6.85×10^7	7.50×10^6	$>3.00 \times 10^8$	1.43×10^8	2.56×10^8	2.24×10^8	1.60×10^8
	LAB	6.05×10^6	7.75×10^6	2.95×10^6	6.15×10^7	1.16×10^7	8.10×10^7	7.30×10^7	1.35×10^8
L	TVC	9.5×10^6	2.28×10^7	5.40×10^7	$>3.00 \times 10^8$	9.10×10^7	$>3.00 \times 10^8$	$>3.00 \times 10^8$	3.50×10^7
	LAB	3.4×10^5	1.52×10^7	3.80×10^7	$>3.00 \times 10^8$	6.65×10^6	2.19×10^8	1.64×10^8	3.00×10^7
CE	TVC	2.62×10^7	1.69×10^8	1.11×10^8	3.00×10^8	9.0×10^7	$>3.00 \times 10^8$	$>3.00 \times 10^8$	2.18×10^8
	LAB	3.40×10^6	6.15×10^7	7.50×10^7	1.21×10^8	6.15×10^7	8.45×10^7	2.10×10^8	1.96×10^8

ND : Non detected PM : Thai indigenous chicken CR : Crop S : Small intestine L : Large intestine CE : Cecum

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (TVC) และแบคทีเรียแลกติก (LAB) ที่มีในทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่กระทง

Organ	Type of bacteria	Viable counts (CFU/g)									
		KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	KT9	KT10
CR	TVC	7.85×10^7	1.21×10^7	1.95×10^5	ND	1.54×10^6	$>3.00 \times 10^7$	7.25×10^6	2.52×10^7	1.05×10^6	5.75×10^6
	LAB	4.95×10^6	7.35×10^6	1.85×10^5	2.75×10^4	2.19×10^5	7.40×10^6	3.35×10^6	1.25×10^7	4.70×10^5	5.75×10^6
S	TVC	2.35×10^7	ND	8.95×10^6	5.24×10^6	2.79×10^6	3.00×10^6	2.52×10^6	1.72×10^6	1.90×10^6	1.87×10^7
	LAB	5.58×10^6	1.66×10^6	5.20×10^4	3.30×10^4	2.44×10^6	1.38×10^5	1.47×10^6	6.80×10^5	5.65×10^4	1.87×10^7
L	TVC	1.49×10^8	1.70×10^8	1.59×10^7	1.86×10^6	$>3.00 \times 10^6$	2.84×10^7	1.09×10^7	2.21×10^7	1.25×10^6	1.52×10^8
	LAB	1.26×10^6	6.50×10^5	1.20×10^6	7.15×10^4	1.07×10^6	1.42×10^7	5.25×10^6	9.95×10^6	9.45×10^5	1.46×10^8
CE	TVC	1.41×10^7	1.65×10^8	6.75×10^7	4.22×10^6	1.09×10^7	1.22×10^8	$>3.00 \times 10^7$	$>3.00 \times 10^8$	1.60×10^6	2.38×10^8
	LAB	2.25×10^5	3.35×10^7	2.85×10^6	1.83×10^5	7.00×10^6	3.45×10^7	2.56×10^7	2.64×10^7	1.34×10^6	2.62×10^7

ND : Non detected KT : Broilers CR : Crop S : Small intestine L : Large intestine CE : Cecum

จากตารางที่ 4 พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียทั้งหมดมีความแตกต่างกันในไก่พื้นเมืองแต่ละตัว โดยแบคทีเรียทั้งหมดที่มีในทางเดินอาหารของไก่พื้นเมืองจะมีจำนวนอยู่ในช่วง 10^6 ถึง 10^8 CFU/g ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกมีจำนวนอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^8 CFU/g ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการที่ไก่แต่ละตัวได้รับอาหารและการเลี้ยงแตกต่างกัน และจากตารางที่ 5 พบว่าในไก่กระทงมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^8 CFU/g และมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกในช่วง 10^5 ถึง 10^7 CFU/g ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าในไก่พื้นเมือง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ไก่กระทงนั้นได้รับยาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยงทำให้แบคทีเรียที่รอดชีวิตอยู่มีจำนวนน้อยกว่าในไก่พื้นเมือง แต่แบคทีเรียเหล่านี้น่าจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้ค่อนข้างดีจึงสามารถมีชีวิตรอดและเจริญอยู่ในทางเดินอาหารของไก่กระทงได้

เมื่อนำแบคทีเรียสร้างกรดที่คัดแยกได้ ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือ การติดสีแกรม และการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของเชื้อต่างกันคือในไก่พื้นเมืองพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง (rod) 162 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งสั้น (short rod) 51 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (cocci) 13 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง 8 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งสั้น 3 ไอโซเลต ในไก่กระทงพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง 189 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม 68 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งสั้น 65 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง 2 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งสั้น 2 ไอโซเลต การเรียงตัวของเซลล์พบแบบต่าง ๆ ได้แก่ แบบเดี่ยว แบบคู่ เป็นกลุ่ม อยู่ด้วยกันโดยเรียงตัวเป็นสายสั้นและสายยาว แบคทีเรียที่พบมากที่สุดในไก่พื้นเมืองและไก่กระทงคือแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง และคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่ติดสีแกรมบวกได้จำนวน 548 ไอโซเลต นำไปทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะต้องให้ผลการทดสอบเป็นลบ จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองและไก่กระทงให้ผลการทดสอบเป็นลบทั้งหมด ทำให้สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 548 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองจำนวน 226 ไอโซเลตและจากไก่กระทงจำนวน 322 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อแยกตามทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆของไก่ทั้งสองชนิดสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้ดังแสดงในตารางที่ 6 และสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกรูปร่างต่าง ๆได้ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของไก่กระทงและไก่พื้นเมือง

Organ	Thai indigenous chickens (Isolate)	Broilers (Isolate)	Total (Isolate)
Crop	60	86	146
Small intestine	54	78	132
Large intestine	57	76	133
Cecum	55	82	137
Total	226	322	548

ตารางที่ 7 จำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ตามรูปร่างของเซลล์

Shape	Thai indigenous chickens (Isolate)	Broilers (Isolate)	Total (Isolate)
Rod	162	189	351
Short rod	51	65	116
Cocci	13	68	81
Total	226	322	548

จากตารางที่ 6 และ 7 แสดงให้เห็นว่าในทางเดินอาหารของไก่มีแบคทีเรียแลกติกอาศัยอยู่หลากหลายโดยสามารถพบได้ทั้งแบคทีเรียรูปร่างแท่ง แท่งสั้น แท่งยาว และรูปร่างกลม โดยในไก่พื้นเมืองส่วนใหญ่แบคทีเรียแลกติกที่พบเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งและแท่งสั้น ในขณะที่ในไก่กระทงจะพบว่ามีแบคทีเรียรูปร่างกลมและรูปแท่งใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ความแตกต่างของแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของสัตว์ ขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์นั้นกินเข้าไป หรือแม้แต่สถานที่เลี้ยงก็มีผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับ ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ (2547) ที่รายงานว่าในกระเพาะพักส่วนใหญ่มีแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มรูปร่างแท่ง ในไส้ติ่งเป็นส่วนของทางเดินอาหารที่มีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากซึ่งตรวจพบได้มากกว่า 200 ชนิด ในจำนวนนี้ตรวจพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมและไม่สร้างสปอร์ 30 % และพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งไม่สร้างสปอร์ 20% นอกจากนี้ความหลากหลายของแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของไก่กระทงยังขึ้นกับการได้รับยาปฏิชีวนะที่ผู้ผลิตใช้ในการป้องกันและรักษาโรค

ให้กับไก่ที่เลี้ยง ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้งกลุ่มที่มีรูปกลมและรูปแท่งมีการทนยาปฏิชีวนะได้ระดับหนึ่ง โดยแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะที่สามารตรวจพบได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus* และ *Lactobacillus* (Mathur and Singh, 2005) นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus* และ *Bifidobacterium* ยังมีความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ได้เช่นกัน (Ammor *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะขึ้นกับชนิดและปริมาณของยาปฏิชีวนะที่ได้รับด้วย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถคัดเลือกได้จากไก่กระทงนี้อาจจะเป็นแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มที่น่าจะมีความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยงไก่ได้ การศึกษาของ Amit-Romach และคณะ (2004) ที่ใช้ 16S ribosomal DNA (rDNA) เป็น targeted probes ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้และไส้ติ่งของไก่โดยอาศัยความแตกต่างของ DNA จากการศึกษาทางเดินอาหารไก่ที่มีอายุต่างกันคือ 4, 14 และ 25 วัน พบว่า ในไส้ติ่งของไก่อายุ 4 วัน พบแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ประมาณ 25% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถจำแนกได้และไม่พบว่ามีแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* อาศัยอยู่ ในขณะที่ในไก่อายุ 14 วัน พบว่า แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มคือ lactobacilli และ *Bifidobacterium* มีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 40% ของแบคทีเรียทั้งหมด โดยในทางเดินอาหารส่วนลำไส้เล็กและไส้ติ่งของไก่วัยหนุ่ม (young chicks) แบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบคือ lactobacilli และเมื่อไก่มีอายุเพิ่มมากขึ้นจะพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นเพิ่มจำนวนขึ้นเช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* และ Amit-Romach และคณะ (2004) ยังพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ศึกษาได้นั้นเป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจะเป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp.

นอกจากรายงานการศึกษาจากต่างประเทศแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาในประเทศไทยอีกด้วยที่ให้ผลการศึกษาสอดคล้องกัน โดยการศึกษาของไพรัตน์ ศรแผลง และคณะ (2550) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากมูลของไก่พื้นเมืองของไทยที่มีอายุ 2 เดือน ถึง 4 ปี ซึ่งพบปริมาณเฉลี่ยของแบคทีเรียแลกติกในมูลไก่พื้นเมืองทั้งหมดมีค่าเฉลี่ย 1.77×10^{9} CFU/g จากการตรวจสอบเซลล์พบลักษณะของแบคทีเรียแลกติกที่สำคัญคือ มีรูปร่างแท่งและกลม โดยพบรูปร่างแท่งและกลมจากโคโลนีที่แยกได้จำนวน 74 โคโลนี คิดเป็น 87.84 และ 12.16% ตามลำดับ ปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากมูลไก่พื้นเมืองจากการศึกษาของไพรัตน์ ศรแผลง และคณะ (2550) มีแนวโน้มสูงกว่าที่แยกพบจากลำไส้ไก่พื้นเมืองที่ศึกษาในครั้งนี้ที่พบปริมาณอยู่ในช่วง 10^{5} ถึง 10^{8} CFU/g ทำให้สันนิษฐานได้ว่าแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของไก่นั้นมีจำนวนแบคทีเรียที่เจริญอยู่ได้ในสภาพเคลื่อนที่ไปตามการเคลื่อนที่ของอาหารหรือของเหลวในทางเดินอาหารมากกว่าพวกที่สามารถเจริญและเกาะติดผนังลำไส้ส่วนต่าง ๆ และส่วนใหญ่จะถูกขับออกมากับมูลเมื่อมีการขับถ่าย และเมื่อพิจารณาถึงรูปร่างของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ให้ผลการทดลองสอดคล้อง

กันโดยพบว่าแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ที่สามารถคัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งทั้งแบบแท่งขนาดยาว ขนาดปานกลาง และแบบแท่งสั้น มากกว่าแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม โดยพบรูปร่างแท่งและกลมจากโคโลนีที่แยกได้จำนวน 548 โคโลนีจากทั้งไก่พื้นเมืองและไก่กระทง คิดเป็น 85.22 และ 14.78 % ตามลำดับ นอกจากนี้ ไพรัตน์ ศรแผลง และคณะ (2550) ยังรายงานไว้อีกว่าการตรวจลักษณะทางโคโลนีและเซลล์นั้นพบว่าตัวอย่างมูลไก่กลุ่มอายุมากมีแนวโน้มพบชนิดของแบคทีเรียแลกติกได้มากชนิดกว่าไก่กลุ่มอายุน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lu และคณะ (2003) ที่รายงานว่าเมื่อไก่มีอายุมากขึ้นมีแนวโน้มตรวจพบชนิดของ *Lactobacillus* ในทางเดินอาหารไก่ได้มาก

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

2.1 ความสามารถในการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากทั้งไก่กระทงและไก่พื้นเมืองจากข้อ 1 จำนวน 548 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่พีเอช 3 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1965 unit/ml) ซึ่งเลียนแบบสภาวะในกระเพาะอาหารของสัตว์ พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่สามารถทนต่อสภาวะที่ทดสอบได้ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้เหล่านี้มาศึกษาในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอยู่ด้วย ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงผ่านไปมีแบคทีเรียแลกติกเพียง 103 ไอโซเลต ที่สามารถรอดชีวิตได้ดี โดยเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทงจำนวน 50 ไอโซเลต และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองจำนวน 53 ไอโซเลต โดยยังมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตอยู่มากกว่า 5 log CFU/ml จากจำนวนเริ่มต้น 7-8 log CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 สำหรับไก่กระทงและไก่พื้นเมืองตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Maragkondakis และคณะ (2006) ที่ศึกษาความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* จำนวน 29 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถรอดชีวิตได้เมื่อบ่มในสภาวะกรดพีเอช 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่เมื่อทดสอบที่สภาวะกรดพีเอช 2.0 ที่มีเอนไซม์ pepsin อยู่ด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมง มีเพียง 16 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ และมีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง การลดลงของเชื้อลดลงน้อยกว่า 1 log CFU/ml คือ *L. casei* Shirota ACA-DC 6002 และ *L. casei* Imunitass ACA-DC 6003 และเมื่อทดสอบที่พีเอช 1 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง มี *Lactobacillus* ถึง 23 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ ในขณะที่ *Lactobacillus* อีก 6 สายพันธุ์ที่รอดชีวิตได้นั้นมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำมาก

ซึ่งจะเห็นได้ว่ายิ่งสภาวะที่เป็นกรดพีเอชต่ำมากขึ้นความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกก็จะลดต่ำลงไปด้วย

ตารางที่ 8 แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทงที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Isolate	Viable counts (log CFU/ml)	Isolate	Viable counts (log CFU/ml)
KT1CR4*	6.30	KT4CE36	>5.48
KT1CR6	5.66	KT5CR1	6.48
KT1CR9	6.02	KT5CR2	>5.48
KT1L16	>5.48	KT5CR7	>5.48
KT2CR3	6.10	KT5CR8	6.24
KT2CR5	5.96	KT5S13	5.76
KT2S11	5.76	KT5S15	5.87
KT2S12	5.48	KT5S16	5.56
KT2S15	6.02	KT5S19	5.91
KT2CE27	6.09	KT5L20	6.32
KT2CR30	6.43	KT6CE30	6.18
KT2L24	>5.48	KT7CE31	>5.48
KT2CE25	>5.48	KT8CR3	5.58
KT2CE29	>5.48	KT8CR4	6.02
KT3CR2	6.07	KT8S16	6.35
KT3L20	>5.48	KT8S11	>5.48
KT3L22	6.21	KT8L24	5.83
KT3CE28	>5.48	KT9CR3	>5.48
KT4S13	6.02	KT9CR5	>5.48
KT4CE27	6.25	KT9CR7	>5.48
KT4CE28	6.27	KT9S13	6.30
KT9CE26	5.15	KT10L25	>5.48
KT9CE27	>5.48	KT10L26	>5.48
KT10CR3	>5.48	KT10CE32	5.78
KT10L19	6.48	KT10CE33	6.06

KT : Broiler, CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Cecum

KT1CR4* : 4th LAB isolate from crop of 1st broiler

ตารางที่ 9 แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Isolate	Viable counts (log CFU/ml)	Isolate	Viable counts (log CFU/ml)
PM1S6*	6.00	PM5CE30	6.66
PM1S8	>5.48	PM6CR1	6.19
PM1L12	>5.48	PM6CR6	>5.48
PM1L14	>5.48	PM6L22	>5.48
PM1CE19	6.26	PM6L23	>5.48
PM4CR4	>5.48	PM6L24	>5.48
PM4CR6	6.28	PM6CE25	>5.48
PM4CE29	>5.48	PM6CE27	>5.48
PM4CE30	>5.48	PM6CE28	>5.48
PM4 CE35	>5.48	PM6CE29	>5.48
PM4 CE36	>5.48	PM6CE30	>5.48
PM4 CE38	>5.48	PM6CE31	6.59
PM4 CE41	>5.48	PM6CE32	6.06
PM4CE42	>5.48	PM7CR4	6.55
PM4CE43	>5.48	PM7S8	>5.48
PM4L44	6.34	PM7L17	>5.48
PM4L53	>5.48	PM7CE19	>5.48
PM4L54	>5.48	PM7CE22	>5.48
PM5CR2	>5.48	PM8CR8	>5.48
PM5CR3	>5.48	PM8S9	6.78
PM5CR5	5.75	PM8CE24	5.68
PM5CR7	>5.48	PM8CE25	5.86
PM5S9	6.40	PM8CE26	6.03
PM5S13	>5.48	PM9L18	6.13
PM5CE25	>5.48	PM10CR3	>5.48
PM5CE27	5.73	PM10S10	>5.48
PM5CE29	6.49		

PM : Thai indigenous chicken, CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Cecum

PM1S6* : 6th LAB isolate from small intestine of 1st Thai indigenous chicken

ภายในกระเพาะอาหารจะมีสภาพเป็นกรดเนื่องจากการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกออกมาเพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพและง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่สัตว์หลั่งออกมาในกระเพาะ

อาหารเพื่อย่อยโปรตีนคือเอนไซม์ pepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะกรดพีเอชอยู่ในช่วง 2-3 การทำงานร่วมกันของกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์นี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกทำให้แบคทีเรียไม่สามารถรอดชีวิตได้ โดยทั่วไปแล้วผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งประกอบด้วย peptidoglycan, teichoic acid, และ churonic acid และมากกว่า 50% โดยน้ำหนักของผนังเซลล์คือ peptidoglycan ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สายตรงของ disaccharide pentapeptide ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดคือ N-acetylglucosamine (NAG) และ N-acetylmuramic acid (NAM) โดยมีกรดอะมิโน 4 กลุ่ม (tetrapeptide) เชื่อม NAG และ NAM เข้าด้วยกันโดยพันธะเปปไทด์ทำให้ peptidoglycan มีโครงสร้างแบบร่างแหและมีผลึกโปรตีน (protein crystal) หรือ S-layer แทรกอยู่ ซึ่งในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *L. helveticus* มีชั้น peptidoglycan หนาถึงประมาณ 20-80 นาโนเมตร (Firtel *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006) แม้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะหนาแต่สามารถถูกทำลายได้ โดยเมื่อผ่านสู่กระเพาะอาหารที่มีทั้งกรดและเอนไซม์เปปซินซึ่งจะเข้าไปทำลายผนังเซลล์ชั้น peptidoglycan ตรงตำแหน่งพันธะเปปไทด์ทำให้โครงสร้างแบบร่างแหของ NAG และ NAM แยกออกจากกัน เมื่อผนังเซลล์เสียหายแบคทีเรียแลกติกจึงไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้

โดยทั่วไปความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกขึ้นอยู่กับกิจกรรมของ H^+-ATPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการทนต่อกรดยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิด นอกจากนี้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเลี้ยงเชื้อยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกอีกด้วย (Hood and Zotolla, 1988; Madureira *et al.*, 2005)

เมื่อเปรียบเทียบไก่กับมนุษย์และสัตว์จำพวกสุกรและโคแล้ว ทางเดินอาหารของไก่จะสั้นกว่า ดังนั้นระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารก็สั้นด้วย คือประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที ดังนั้นความทนต่อกรดของแบคทีเรียในไก่อาจไม่สำคัญมากเท่ากับสัตว์อื่น ที่มีอัตราการผ่านของอาหารนานกว่า อย่างไรก็ตามพีเอชของน้ำย่อยในทางเดินอาหารไก่สามารถลดต่ำลงถึง 0.5-2.0 ได้ จึงมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์โปรไบโอติก (รุจา มาลัยพวง, 2544)

2.2 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดีและเอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin)

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากการทดสอบกับกรดและเอนไซม์เปปซินในข้อ 2.1 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อต่อเกลือน้ำดีโดยการใช้น้ำดีสดของไก่กระทงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำดีขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อทดสอบจนถึงระดับความเข้มข้นของน้ำดี 7% และมีเอนไซม์แพนครีเอตินอยู่ด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่สภาวะด่างพีเอช 8.0 ภายหลังจาก

การศึกษา พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 20 ไอโซเลตจาก 103 ไอโซเลต สามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 7 log CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 10 โดย แบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทง มีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง และแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารส่วนลำไส้เล็ก เนื่องจากสภาวะในลำไส้เล็กที่มีเกลือน้ำดีสามารถส่งผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกได้ โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mishar and Prasad (2005) ที่ศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ที่เกลือน้ำดีเข้มข้น 2 % (ox bile) ที่เวลา 3 ชั่วโมงของการทดสอบคือ *L. casei* NCDC 63, *L. casei* VT และ *L. casei* C1 และพบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตได้ไปจนถึงเวลา 12 ชั่วโมงของการทดสอบคือ *L. casei* NCDC 63 และ *L. casei* VT นอกจากนี้มีการศึกษาถึงผลของน้ำดีและเอนไซม์ที่มีต่อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม โดย Maragkondakis และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถรอดชีวิตได้เมื่อบ่มในสภาวะด่างพีเอช 8.0 ที่มีเอนไซม์แพนครีเอตินและน้ำดีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรอยู่ด้วย

คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีคือควรมีความสามารถรอดชีวิตและเกาะติดอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ได้ ดังนั้นความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียจึงเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นยิ่งอย่างหนึ่ง เนื่องจากน้ำดีสามารถทำความเสียหายให้แก่เซลล์ของแบคทีเรียจนทำให้แบคทีเรียไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้

ตารางที่ 10 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกภายใต้สภาวะที่มีน้ำดีสดของไก่เข้มข้น 7 % และเอนไซม์แพนครีเอติน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอช 8.0

Strains	Viable counts (log CFU/ml)			Percentage of tolerance
	0h	3h	6h	
KT2S15*	8.93	8.92	8.90	92.94
KT10L22	9.64	9.54	9.54	79.55
KT3L20	9.67	9.64	9.57	79.40
KT8S16	8.85	8.78	8.69	70.00
KT2L24	9.20	9.13	9.03	66.25
KT3CE28	8.47	8.39	8.29	65.42
KT5S13	8.49	8.37	8.29	62.90
KT5S16	8.60	8.42	8.37	58.50
KT5S19	8.64	8.54	8.38	54.09
KT8CR4	9.39	9.00	9.04	44.35
KT10L19	9.47	9.44	9.09	42.32
KT2CR5	8.34	8.15	7.97	42.08
KT2CR3	9.30	9.19	8.90	39.70
PM1L12	8.79	8.61	8.36	37.21
KT2S11	9.02	8.76	8.52	31.43
KT10CE33	8.92	8.67	8.41	30.96
KT4S13	8.61	8.36	7.97	22.93
KT3CR2	8.65	8.00	7.93	19.11
KT5S15	8.76	8.39	7.86	12.63
KT4CE27	9.41	8.76	8.09	4.75

KT : Broiler, PM : Thai indigenous chicken, CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Cecum

KT2S15* : 15th LAB isolate from crop of 2nd broiler

จากตารางที่ 10 พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 9 ไอโซเลต ที่มีสามารถรอดชีวิตได้สูงกว่า 50 % โดยไอโซเลต KT2S15 สามารถรอดชีวิตได้สูงสุด โดยมีความสามารถในการรอดชีวิตสูงถึง 92.94% เมื่อผ่านการบ่มในสภาวะที่มีน้ำดีสดของไก่ 7% และเอนไซม์แพนครีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งลดลงเพียง 0.03 log CFU/ml เท่านั้น รองลงมาคือไอโซเลต

KT10L22 และ KT3L20 โดยสามารถรอดชีวิตได้ 79.55% และ 79.40 % ตามลำดับ แบคทีเรียที่สามารถรอดชีวิตได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทงและสามารถรอดชีวิตได้ดีโดยมีปริมาณเชื้อลดลงน้อยกว่า 1 log CFU/ml และมีแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองจำนวน 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตได้ที่ระดับน้ำดีเข้มข้น 7% และมีปริมาณเชื้อลดลงน้อยกว่า 0.43 log CFU/ml เนื่องจากน้ำดีที่ใช้ในการทดสอบนั้นเป็นน้ำดีสดที่ได้จากไก่กระทงเพียงอย่างเดียวไม่มีการผสมน้ำดีสดของไก่พื้นเมืองลงไปด้วย จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันน้อยกว่าไก่กระทง ในการหลั่งน้ำดีมาช่วยในการทำให้ไขมันในลำไส้เล็กแตกตัวของไก่พื้นเมืองจึงอาจมีปริมาณและความเข้มข้นน้อยกว่าที่มีในทางเดินอาหารของไก่กระทง จึงเป็นไปได้ที่ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองจะน้อยกว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทง ซึ่งน้ำดีที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการหาน้ำหนักแห้ง พบว่า มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งประมาณ 16% จากการทดลองใช้น้ำดีสดของไก่กระทงความเข้มข้น 7% จะพบว่าเมื่อคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของน้ำดีได้เป็น 1.12 กรัมต่อมิลลิลิตร

น้ำดีสังเคราะห์จากโคเลสเตอรอลโดยเซลล์ pericentral hepatocytes ของตับมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอมเขียว โดยทั่วไปมีพีเอชอยู่ในช่วง 7.5-8.0 องค์ประกอบหลักของน้ำดีประกอบด้วย กรดน้ำดี (bile acids) โคเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) และสารสีไบลิเวอดิน (pigment biliverdin) นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง Immunoglobulin A และ mucus เข้าสู่น้ำดีเพื่อช่วยในการป้องกันการเจริญและเกาะติดของแบคทีเรียในลำไส้ น้ำดีที่สร้างเสร็จเรียบร้อยแล้วจะถูกกักเก็บไว้ในถุงน้ำดี (gallbladder) และน้ำดี 80% ของถุงน้ำดีจะถูกปล่อยเข้าสู่ลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum เมื่อได้รับการกระตุ้นจากอาหารที่เดินทางมาถึง โดยอาหารเหล่านั้นจะกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน ซีครีติน (secretin) และโคเลซีสโตไคนิน (cholecystokinin) ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้มีความสำคัญต่อการหลั่งและการไหลเวียนของน้ำดีในท่อน้ำดีและลำไส้ หน้าที่หลักของน้ำดีคือทำให้ไขมันแตกตัวและเข้ากับน้ำได้ดีขึ้น (emulsifies and solubilizes fats) น้ำดียังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในทางเดินอาหารได้ เนื่องจากเกลือน้ำดี (bile salts) ซึ่งเป็นกรดน้ำดี (bile acids) ชนิดหนึ่ง จะไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายโดยการที่ไปละลายไขมันในส่วนโครงสร้าง phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ลดน้อยลงเป็นสาเหตุสำคัญให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแยกออกจากกัน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้มีผลมากน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารเป็นสำคัญ นอกจากนี้ชนิดและโครงสร้างของน้ำดียังเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ

แบคทีเรีย พบว่าในน้ำดีของโคซึ่งประกอบด้วยเกลือน้ำดีชนิด trihydroxyconjugated มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่าน้ำดีของสุกรที่มีเกลือน้ำดีชนิด dihydroxyconjugated เป็นองค์ประกอบ นอกจากสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแล้วยังพบว่ากรดน้ำดีสามารถชักนำ secondary structure formation ใน RNA ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อ DNA และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA ทั้งในแบคทีเรียและเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้อีกด้วย (Begley *et al.*, 2005) Taranto และคณะ (2006) ศึกษาผลของกรดน้ำดีที่มีต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกโดยเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อ taurodeoxycholic (TDCA) และ deoxycholic acid (DCA) ของ *Lactobacillus* 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน *L. reuteri* CRL 1098, *L. casei* CECT 5275, *L. acidophilus* ATCC 4356T และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842^{T} ภายหลังจากการทดสอบพบว่า TDCA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียน้อยกว่า DCA โดย *L. reuteri* CRL 1098 มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า lactobacilli สายพันธุ์อื่น และพบว่า การใช้กลูโคสของ *L. reuteri* CRL 1098 ลดลง 50% เมื่อ DCA มีความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และลงลดอย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของ DCA, มากกว่า 3 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่มี DCA อัตราส่วนของ glycolipid ต่อ phospholipid เพิ่มขึ้นถึง 3.79 เท่า ของเซลล์ในชุดควบคุม ซึ่งมีสาเหตุหลักจากการที่ phospholipids ที่เป็นโครงสร้างหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงเนื่องจากถูกทำลายโดย DCA เซลล์แบคทีเรียที่ไม่สามารถทนต่อกรดน้ำดีได้จึงไม่สามารถรอดชีวิตต่อไปได้

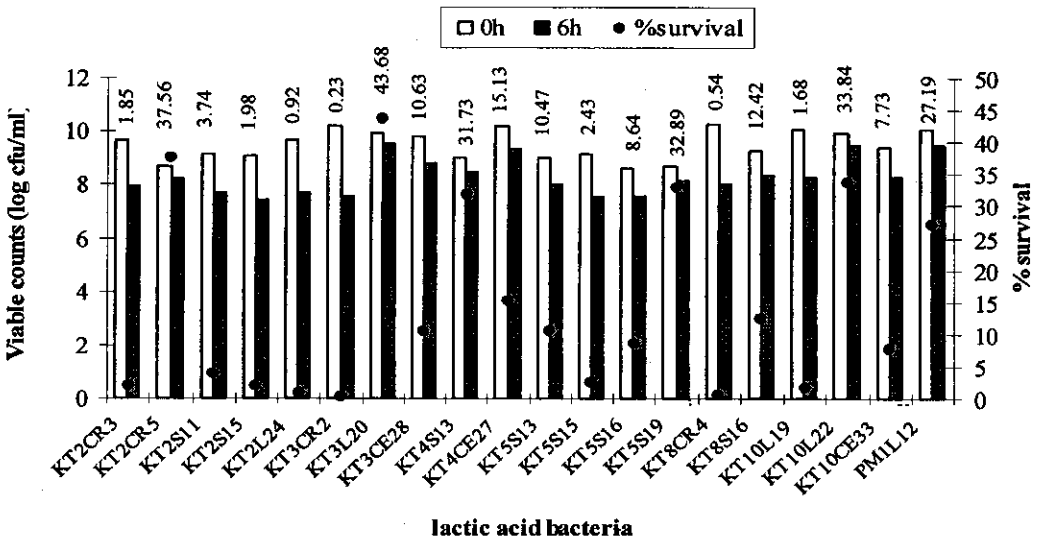
การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียมีผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ bile salts hydrolase (BSH) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถ deconjugate กรดน้ำดีได้ (Madureira *et al.*, 2005; Taranto *et al.*, 2006) ในแบคทีเรีย lactobacilli พบว่าบางสายพันธุ์ เช่น *L. gasseri* ADH ทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีเนื่องจากสร้างเอนไซม์ BSH ที่ deconjugate กรดน้ำดีได้ แต่ก็พบว่ามี lactobacilli บางสายพันธุ์เช่นกันที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ BSH สูงแต่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีต่ำ (Klaenhammer, 1995) นอกจากเกลือน้ำดีภายในทางเดินอาหารส่วนท้ายยังมีเอนไซม์ pancreatin จากตับอ่อนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มด้วยกันคือ amylase, lipase และ protease ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสารอาหารแตกต่างกันออกไป และยังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายในทางเดินอาหารอีกด้วย

2.3 ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบต่อเนื่องกัน

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกควรมีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี ซึ่งแบคทีเรียที่ทำการทดสอบนั้นส่วนใหญ่สามารถทนต่อกรดและเกลือน้ำดีได้ แต่การทดสอบข้างต้นนั้นเป็นการทดสอบที่แยกกันคือใช้เซลล์ใหม่มาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

ซึ่งในความเป็นจริงแล้วแบคทีเรียที่ผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่จะต้องผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะเป็นกรดพีเอชในช่วง 2.5-4.8 เมื่อผ่านสภาวะกรดของกระเพาะอาหารก็จะเดินทางผ่านลงสู่ลำไส้เล็กซึ่งภายในมีสภาวะเป็นกรดอ่อนจนกระทั่งเป็นด่าง ๆ อ่อนพีเอชประมาณ 5.7-8.4 (รุจา มาลัยพวง, 2544) นอกนี้ยังมีเอนไซม์และเกลือน้ำดีอยู่ด้วย ดังนั้นแบคทีเรียที่ได้รับผลกระทบจากกรดมาจะมีการได้รับการเปลี่ยนแปลงสภาวะอย่างกะทันหันและเป็นสภาวะที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้วย การทดสอบที่เลียนแบบสภาวะจริงของระบบทางเดินอาหารที่เชื้อแบคทีเรียจะได้พบนั้นจึงเป็นการทดสอบที่จะบอกถึงความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบการทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 และใช้เซลล์มาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีต่อเนื่องกันได้ผลดังแสดงในภาพที่ 6

การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์หลังจากผ่านการทดสอบต่อเนื่องด้วยสภาวะกรดพีเอช 3.0 และมีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและสภาวะน้ำดีสดของไก่ความเข้มข้น 7.0% ที่พีเอช 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า มีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 6 ไอโซเลต จากทั้ง 20 ไอโซเลต ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด คือ KT2CR5, KT3L20, KT4S13, KT5S19, KT10L22 และ PM1L12 มีอัตราการรอดชีวิต 37.56%, 43.68%, 31.37%, 32.89%, 33.84% และ 27.19% ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถทนต่อทั้งกรดและน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ภายหลังจากบ่มในสภาวะทางเดินอาหาร (กรดกระเพาะอาหารและลำไส้)

KT: Broiler, CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Cecum

KT2CR3* : 3th LAB isolate from crop of 2nd broiler

Lin และคณะ (2007) ศึกษาการทนต่อกรดและการทนต่อเกลือน้ำดีของ *Lactobacillus fermentum* ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของสุกรและไก่ จำนวน 20 สายพันธุ์ ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในสารสกัดจากทางเดินอาหารส่วนกึ๋นที่มีพีเอช 2.6 ซึ่งนอกจากพีเอชที่เป็นกรดแล้วยังมีสารประกอบอื่น เช่น เอนไซม์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทดสอบและ พบว่า *L. fermentum* สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ดี แต่เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง พบว่า *L. fermentum* 19 สายพันธุ์มีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตลดลงประมาณ 2-3 log CFU/ml ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่ *L. fermentum* ที่แยกจากสุกรและบ่มในสารคัดหลั่งจากกระเพาะอาหารพีเอช 3.2 พบว่ามี *L. fermentum* จำนวน 7 สายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตได้ต่ำโดยมีจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือลดลง 2-3 log CFU/ml ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่มีจำนวนรอดชีวิตลดลงเพียง 1 log CFU/ml เท่านั้น ทั้งนี้ที่แบคทีเรียที่ศึกษามีการรอดชีวิตที่แตกต่างกันเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการทดสอบนั้นเป็นสภาวะร่างกายจริงของสัตว์ที่แยกแบคทีเรียเหล่านั้นออกมา ซึ่งมีองค์ประกอบที่ต่างกันและที่สำคัญจะเห็นได้ว่าค่าพีเอชที่ทดสอบนั้นต่างกันมากคือ สารสกัดจากทางเดินอาหารส่วนกึ๋นของไก่มีพีเอช 2.6 ในขณะที่สารคัดหลั่งจากกระเพาะอาหารของสุกรนั้นมีพีเอชเพียง 3.2 เท่านั้น ดังนั้นค่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการ

รอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกในสภาวะกรด นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นที่แยกได้จากไก่เช่นเดียวกันแล้วยังพบว่า *L. acidophilus* และ *L. bulgaricus* สามารถทนต่อสารสกัดจากทางเดินอาหารส่วนกึ๋นที่มีพีเอช 2.6 ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้ค่อนข้างต่ำเช่นกัน ถึงแม้จะมีรายงานว่า *L. acidophilus* บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งอื่น เช่น ทางเดินอาหารของคน มีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดพีเอช 2.5 ได้ดีก็ตาม และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลการศึกษาใกล้เคียงกันคือการศึกษานี้พบแบคทีเรียแลกติกที่มีทนต่อสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่อนข้างน้อย มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่รอดชีวิตได้ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และถึงแม้จะพบว่าบางสายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้ แต่เมื่อพิจารณาถึงเปอเซ็นต์การรอดชีวิตแล้วนั้นอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมาก ในขณะที่เมื่อทดสอบแบคทีเรียแลกติกในสภาวะกรดพีเอช 3 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การรอดชีวิตสูงขึ้นคือมีจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตลดลง 1-2 log CFU/ml โดยความเป็นจริงแล้วสภาวะทางเดินอาหารของไก่นั้นมีความหลากหลายมากเนื่องจากไก่นั้นเป็นสัตว์ที่มีระบบทางเดินอาหารแตกต่างจากสัตว์อื่นคือมีส่วนของกระเพาะพัก (crop) และกึ๋น (gizzard) เพิ่มขึ้นมา ซึ่งค่าพีเอชระหว่างทางเดินอาหารจากกระเพาะพักถึงกึ๋นนั้นอาจมีค่าตั้งแต่ 2.5-6.3 (รุจา มาลัยพวง, 2544) ก่อนที่อาหารจะผ่านลงสู่ลำไส้ที่มีค่าพีเอชแตกต่างออกไป ในขณะที่ในสัตว์ชนิดอื่นค่าพีเอชของกระเพาะอาหารจะมีค่าตั้งแต่ 2.0-3.5 แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับระยะเวลาการให้อาหารและอายุหรือชนิดของสัตว์ (Yu and Tsen, 1993)

Lin และคณะ (2007) ยังได้ศึกษาถึงความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3% (ox bile) ของ ที่ *L. fermentum* ทั้ง 20 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากไก่และสุกร โดยการบ่มแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารที่เติมเกลือน้ำดี (oxgall bile) ความเข้มข้น 0.3% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *L. fermentum* จำนวน 17 สายพันธุ์ สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า 50% แสดงว่าทั้ง *L. fermentum* ที่แยกได้จากไก่และสุกรมีความสามารถในการทนต่อน้ำดีได้ ซึ่งแบคทีเรีย *L. fermentum* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ส่วนต่าง ๆ จำนวน 11 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ค่อนข้างสูง โดยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดคือ *L. fermentum* PLM1 ซึ่งรอดชีวิตได้สูงถึง 85.74% รองลงมาคือ *L. fermentum* PGM1 และ *L. fermentum* PG1 ซึ่งรอดชีวิตได้ 84.23% และ 83.93% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้นั้น มีความสามารถในการทนต่อน้ำดีได้ดีโดยสามารถรอดชีวิตได้ที่สภาวะน้ำดีเข้มข้น 7% (v/v) และนอกจากนี้สิ่งที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการทนต่อ

สภาวะในลำไส้ได้ดีเนื่องจากในสภาวะที่ทำการทดสอบนี้ยังได้เติมเอนไซม์แพนครีเอติน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในลำไส้ของสัตว์ทุกชนิดที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกผสมอยู่ด้วย

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ดีต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร เอนไซม์ในทางเดินอาหาร เกลือน้ำดี และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพิ่มการเจริญเติบและรักษาโรคในสัตว์ ซึ่งถือเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการอยู่รอดและเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก (Hyronimus *et al.*, 2000) ดังนั้นเพื่อให้ได้แบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีขึ้น จึงได้นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

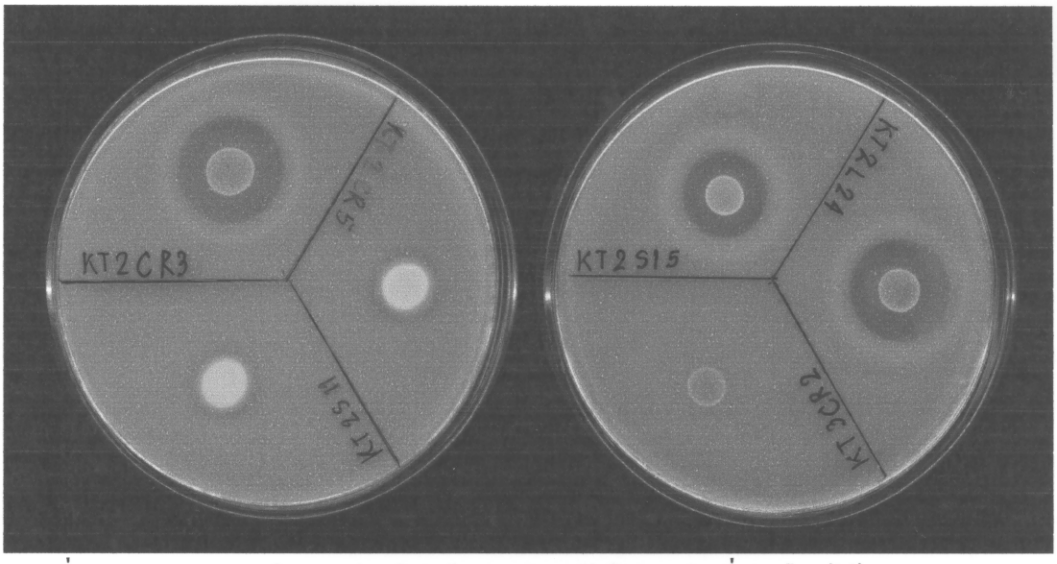
การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง ของแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 2.3 ทั้ง 20 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จำนวน 12 ไอโซเลตสามารถย่อยโปรตีนได้คือ KT2CR3, KT2CR5, KT2S11, KT2S15, KT2L24, KT4S13, KT5S13, KT5S15, KT5S16, KT5S19, KT8CR4 และ KT10CE33 (ตารางที่ 11) โดยแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต KT2CR3, KT2S15 และ KT2L24 สามารถย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดสังเกตจากขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นดังรูปที่ 7 อย่างไรก็ตามพบว่า ไม่มีแบคทีเรียแลกติกไอโซเลตใดที่สามารถย่อยไขมันและแป้งได้ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ความสามารถในการย่อยไขมัน แป้ง และโปรตีนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

strains	Lipid	Starch	Protein	strains	Lipid	Starch	Protein
KT2CR3	-	-	+	KT5S13	-	-	+
KT2CR5	-	-	+	KT5S15	-	-	+
KT2S11	-	-	+	KT5S16	-	-	+
KT2S15	-	-	+	KT5S19	-	-	+
KT2L24	-	-	+	KT8CR4	-	-	+
KT3CR2	-	-	-	KT8S16	-	-	-
KT3L20	-	-	-	KT10L19	-	-	-
KT3CE28	-	-	-	KT10L22	-	-	-
KT4S13	-	-	+	KT10CE33	-	-	+
KT4CE27	-	-	-	PM1L12	-	-	-

"+" represents a digestion capability

"-" represents a none digestion capability



ภาพที่ 7 ความสามารถในการย่อยโปรตีนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

การศึกษาในครั้งนี้ให้ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Duangchitchareon (2006) ที่ทดสอบความสามารถในการใช้ประโยชน์โปรตีน ไขมันและแป้งของแบคทีเรียแลกติก 44 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผักดองของประเทศไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ทางการค้า โดยศึกษาประสิทธิภาพการย่อยบนอาหารแข็งที่มีนม แป้งและ tributyrin เป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดสอบพบว่า แบคทีเรียแลกติกจำนวน 32 สายพันธุ์สามารถย่อยทั้งโปรตีนและแป้งได้ ในขณะที่มี 4 และ 8 สายพันธุ์ที่ย่อยได้เฉพาะโปรตีน หรือแป้ง ตามลำดับ แต่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ใดที่ย่อยไขมันได้ เมื่อสังเกตวงใสบนอาหารแข็งพบว่าวงใสของการย่อยโปรตีนสังเกตได้ชัดเจนกว่าวงใสที่เกิดจากการย่อยแป้ง แสดงว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้นั้นสามารถย่อยโปรตีนได้ดีกว่าแป้ง ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ทางการค้าสามารถย่อยโปรตีนได้เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ มณฑกานต์ ทองสม (2547) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารกุ้ง และคุณสมบัติหนึ่งที่ใช้ในการคัดเลือกคือศึกษาถึงความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 150 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 150 สายพันธุ์ สามารถย่อยโปรตีนได้ แต่สามารถย่อยแป้งได้ 7 สายพันธุ์ ย่อยไขมันได้ 21 สายพันธุ์

ความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารเป็นคุณสมบัติอีกประการหนึ่งของโปรไบโอติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ Austin และคณะ (1995) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน จะช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์น้ำได้ การที่แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้สามารถย่อยโปรตีนได้นั้นจะส่งผลดีต่อการทำงานในกระบวนการย่อยอาหารของสัตว์ ซึ่งสนับสนุนคุณสมบัติการเป็น

โปรไบโอติกในการเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ที่โปรไบโอติกอาศัยอยู่ได้ เนื่องจากทำให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น

ความสามารถในการใช้ประโยชน์สารอาหารของแบคทีเรียแลกติกขึ้นอยู่กับการสร้าง exoenzyme ของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยแป้งซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนพวกพอลิแซกคาไรด์ ได้โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง สามารถย่อยไขมันได้เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกใช้เอนไซม์ลีซิทิเนส (lecitinase) หรือ ฟอสฟาติเดส (phosphatidase) ในการตัดพันธะฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester bond) หรือแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์สามารถย่อยไขมันได้โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lipase) และสามารถย่อยโปรตีนได้โดยกิจกรรม ของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) แบคทีเรียแลกติกที่มีรายงานว่าสามารย่อยสารอาหารได้เช่น *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* สามารถย่อยโปรตีนได้ *L. fermentum* และ *L. amylovorous* สามารถย่อยแป้งได้ และ *L. plantarum* DSMZ 12028 สามารถย่อยไขมันได้ เป็นต้น (Kawai *et al.*, 1999; De Fátima Silva Lopes *et al.*, 2002; มณฑกานต์ ทองสม, 2547; Duangchitchareon, 2006)

2.5 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลตโดยในการทดสอบ ใช้วิธี agar diffusion method เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเป็นแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในคนและสัตว์ได้ เช่น *Staphylococcus aureus* จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ พบว่าทั้ง 20 ไอโซเลตของแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดี มีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้คือแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต P1L12 ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารส่วนลำไส้ใหญ่ของไก่พื้นเมือง (ตารางที่ 12) การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้สังเกตจากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นหลังจากการเลี้ยงร่วมกันบนอาหารแข็ง (ภาพที่ 8) เมื่อพิจารณาจากประสิทธิภาพในการยับยั้ง พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง คือ KT3CR2, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 และ KT8CR4 ซึ่งทั้งหมดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทงส่วนต่าง ๆ คือ กระเพาะพัก ลำไส้ใหญ่ ลำไส้เล็ก ไส้ติ่ง และ กระเพาะพัก ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

Strains	*Escherichia coli*	*Salmonella* sp.	*Staphylococcus aureus*
KT2CR3*	++	++	++
KT2CR5	++	+++	++
KT2S11	+++	++	++
KT2L15	++	+++	++
KT2L24	++	++	++
KT3CR2	++	+++	+++
KT3L20	+++	+++	++
KT3CE28	++	++	+
KT4S13	+++	+++	++
KT4CE27	++	+++	+++
KT5S13	++	+++	++
KT5S15	++	+++	++
KT5S16	++	+++	++
KT5S19	++	+++	++
KT8CR4	++	+++	+++
KT8S16	++	+++	++
KT10L19	++	+++	++
KT10L22	++	+++	++
KT10CE33	++	+++	++
PM1L12	-	+++	+

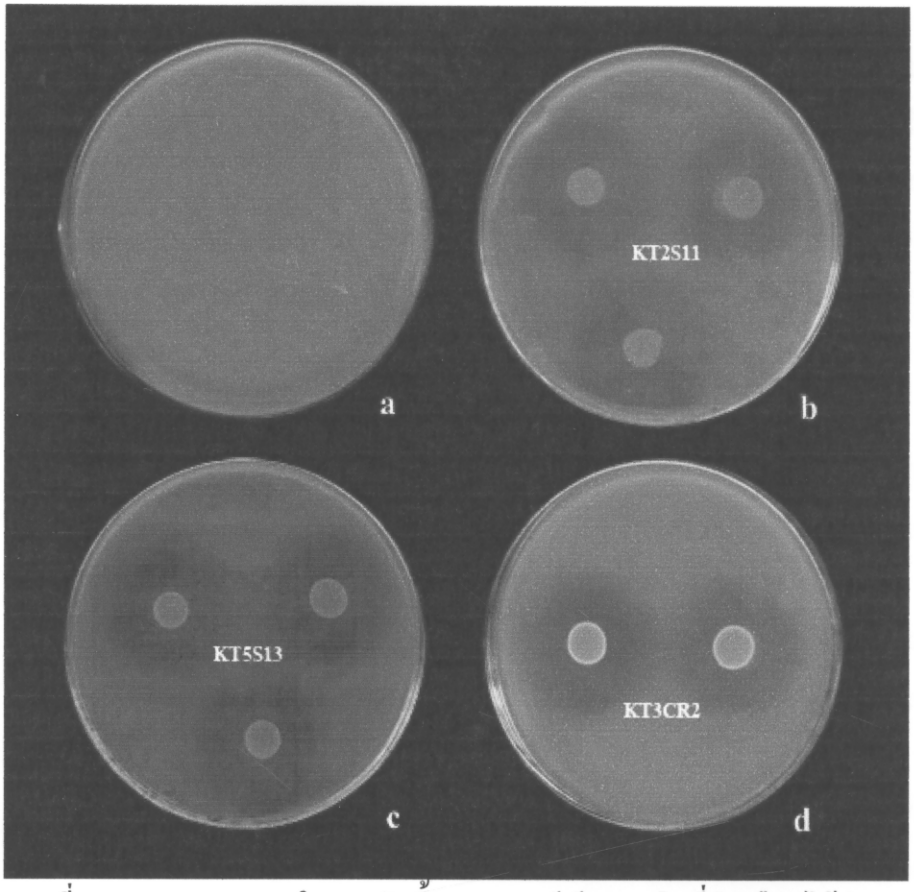
"+" represents an inhibition efficiency >1

weak (+), middle (++) and strong (+++) inhibition

"-" represents the absence of an inhibition efficiency

KT : Broiler, PM : Thai indigenous chicken, CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Cecum

KT2CR3* : 3th LAB isolate from crop of 2nd broiler



ภาพที่ 8 ความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ต่อแบคทีเรียก่อโรค (a) control, (b) *E. coli*, (c) *Salmonella* sp., (d) *Staphylococcus aureus*

กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกอาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกผลิตออกมาทำให้พีเอชในสภาวะลดลงหรืออาจเกิดจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น แบคเทอริโอซิน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นต้น (González *et al.*, 2007) ซึ่งสารประกอบต่าง ๆ ที่แบคทีเรียแลกติกผลิตออกมานี้มีผลต่อแบคทีเรียได้ 2 ลักษณะ คือมีฤทธิ์ในยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) และฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal) (González *et al.*, 2007) จากตารางที่ 12 พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ทั้งนี้อาจเป็นผลที่เกิดร่วมกันระหว่างกรดและสารอื่น ๆ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบสามารถทนต่อกรดได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งจากการทดลองแม้จะพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ก่อโรคได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจนของการถูกยับยั้งระหว่างแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า

แบคทีเรียแกรมลบ เช่น แบคเทอริโอซิน จึงพบว่าทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกสายพันธุ์ก่อโรคถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ไม่แตกต่างกัน โดยทั่วไปกรดอินทรีย์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี เนื่องจากพีเอชที่ลดต่ำลงนั้นต่ำกว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการที่กรดอินทรีย์ไม่แตกตัวนี้เข้าไปในไซโตพลาสซึมทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียหยุดลง (Booth, 1985) โดยเมื่อกรดแลกติกถูกสร้างขึ้นจะทำให้สภาวะมีความเป็นกรดสูง และสภาวะที่พีเอชภายนอกเซลล์ต่ำทำให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์มีสภาพเป็นกรด กรดแลกติกที่อยู่ในรูปโมเลกุลไม่แตกตัวซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lipophilic จึงสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และเข้าไปทำลาย electrochemical proton gradient ของเซลล์ หรือเปลี่ยนแปลงความสามารถในการผ่านสารของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ระบบการขนส่ง substrate ผิดปกติ (Ammor *et al.*, 2006) แบคทีเรียจึงไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ และเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคนที่บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวกกรดอินทรีย์จึงสามารถแทรกซึมเข้าไปทำลายภายในเซลล์ได้ดีกว่า แบคทีเรียแกรมบวกจึงมีความสามารถในการทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

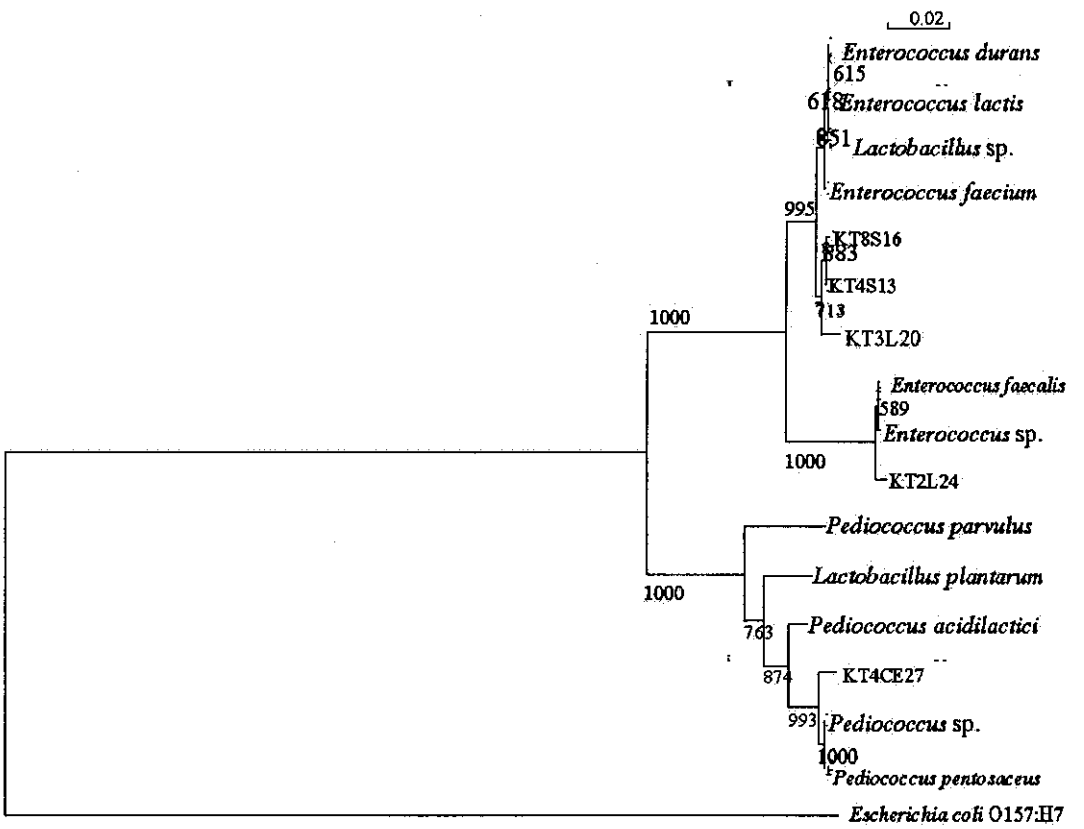
การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้ดีมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tsai และคณะ (2005) ที่ศึกษาความสามารถ ในการยับยั้ง *Salmonella* ของ *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรและไก่คือ *L. acidophilus* LAP5 และ *L. fermentum* LF33 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของตัวเซลล์ที่ไม่มีการปรับพีเอชเป็นกลาง สารสกัดส่วนใส (supernatant) ที่ไม่มีการปรับพีเอชเป็นกลาง ตัวเซลล์ที่มีการปรับพีเอชเป็นกลาง และสารสกัดส่วนใสที่มีการปรับพีเอชเป็นกลาง พบว่า ตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้ง 3 กลุ่มของแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์สามารถยับยั้ง *Salmonella* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นสารสกัดส่วนใสที่มีการปรับพีเอชเป็นกลางของ *L. fermentum* LF33 ที่แยกได้จากไก่ที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นความสามารถในการยับยั้ง *Salmonella* ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้น่าจะเกิดจากการสร้างกรดและสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งบางชนิดออกมา อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้นั้นเกิดจากสารใด

2.6 การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติก

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 20 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตมีประสิทธิภาพในด้านต่าง ๆ แตกต่างกันออกไป และพบว่ามีแบคทีเรียแลกติกบางไอโซเลตมีคุณสมบัติในการเป็น

โปรไบโอติกที่ดีหลายคุณสมบัติควบคู่กัน จึงคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีมา 5 ไอโซเลต เพื่อมาเทียบเคียงสายพันธุ์ต่อไป

แบคทีเรียแลกติก 5 ไอโซเลตที่นำมาเทียบเคียงสายพันธุ์นั้น คือ KT2L24 เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยโปรตีนได้ดีมากที่สุด KT3L20 สามารถทนต่อสภาวะภายในทางเดินอาหารได้ดี ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีมาก KT4S13 สามารถทนต่อสภาวะภายในทางเดินอาหาร ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี KT4CE27 สามารถทนต่อสภาวะภายในทางเดินอาหารได้ในระดับหนึ่ง ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี และ KT8S16 สามารถทนต่อสภาวะภายในทางเดินอาหารได้ในระดับหนึ่ง ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และโคโลนีบนอาหารแข็งมีลักษณะกลม เรียบ สีขาวขุ่น และจากการเทียบเคียงสายพันธุ์ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลต โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้กับลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ KT2L24, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 และ KT8S16 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Enterococcus* sp., *Enterococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus faecium* ตามลำดับ ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 97%, 96%, 96%, 95% และ 97% ตามลำดับ ซึ่งสามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenic tree) ได้ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แผนภูมิต้นไม้ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

Enterococcus sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมอาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม facultative anaerobes สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ (Shibata *et al.*, 2007) Enterococci พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในทางเดินอาหารส่วนลำไส้ของสัตว์ทุกชนิด เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จำพวก นม เนยแข็ง ไส้กรอกหมัก หรือพบได้ในอาหารที่ทำจากพืชผัก เป็นต้น (Huycke *et al.*, 1998; de Fa´tima Silva Lopes *et al.*, 2005; Lakshmy *et al.*, 2006; Sánchez Valenzuela *et al.*, 2008) *E. faecium* เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจในการใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ เช่น สุกร และ ไก่ เป็นต้น เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันสัตว์จากโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Schulte *et al.*, 2008) สายพันธุ์ที่ประสบความสำเร็จในการใช้เป็นโปรไบโอติกในมนุษย์ ได้แก่ *E. faecium* และ *E. faecalis* เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีผลดีต่อทางเดินอาหารที่มีการทำงานผิดปกติ แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะที่ดีของจุลินทรีย์คือมี generation time สั้นและสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ แต่มีข้อควรคำนึงถึง

เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดความต้านทานต่อยาต้านจุลชีพไปสู่แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ (Mombelli and Gismondo, 2000)

Pediococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม อยู่เป็นคู่หรือเป็น 4 เซลล์ ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นลบ เป็นแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative lactic acid bacteria) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชาสุวรรณพินิจ, 2548) บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (pediocin) สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ก่อโรคหรือทำให้อาหารเน่าเสีย (Gurira and Buys, 2005) สายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิต Pediocin ได้ เช่น *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* เป็นต้น (Anastasiadou *et al.*, 2008)

จากการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียแลกติก 4 สายพันธุ์ เป็น *Enterococcus* และมี 1 สายพันธุ์เป็น *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ที่คัดเลือกได้เป็นสายพันธุ์ *Enterococcus* จึงได้เลือก *Enterococcus* มา 1 สายพันธุ์ คือแบคทีเรียสายพันธุ์ KT3L20 ซึ่งเป็น *Enterococcus lactis* ที่สามารถทนต่อสภาวะภายในทางเดินอาหารได้ดี ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีมากและทนต่อยาปฏิชีวนะได้ดีในระดับหนึ่ง นำมาศึกษาในขั้นต่อไปคือการศึกษาการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดและเกลือน้ำดีของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้หลังจากการทำ microencapsulation

2.7 การศึกษาการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้หลังจากการทำ microencapsulation

หลังจากการทำ microencapsulation โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เลือกมาคือ KT3L20 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus lactis* จากการศึกษา พบว่า เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกมาห่อหุ้มเซลล์ด้วย extrusion technique และ emulsion technique แล้วหาค่า encapsulation yield (EY) พบว่ามีค่า 16.21% และ 15.16% ตามลำดับ เมื่อนำเม็ดเจลไปทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะทางเดินอาหาร พบว่า แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแบคทีเรียอิสระที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ภายหลังจากการบ่มในสภาวะกรดกระเพาะอาหาร (พีเอช 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และสภาวะลำไส้เล็ก (น้ำดีสดของไก่ความเข้มข้น 7.0 % ที่พีเอช 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดย *E. lactis* KT3L20 ที่ห่อหุ้มด้วย extrusion technique มีจำนวนลดลง 2.17 log CFU/ml เมื่อบ่มในสภาวะทางเดินอาหาร คือลดลงจาก 8.22 log CFU/ml ที่ชั่วโมงเริ่มต้นเป็น 6.83 log CFU/ml หลังจากการบ่มในสภาวะกระเพาะอาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อบ่มต่อในสภาวะลำไส้เล็กจำลองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง *E. lactis* KT3L20 ที่รอดชีวิตลดจำนวนลงเหลือ 6.05

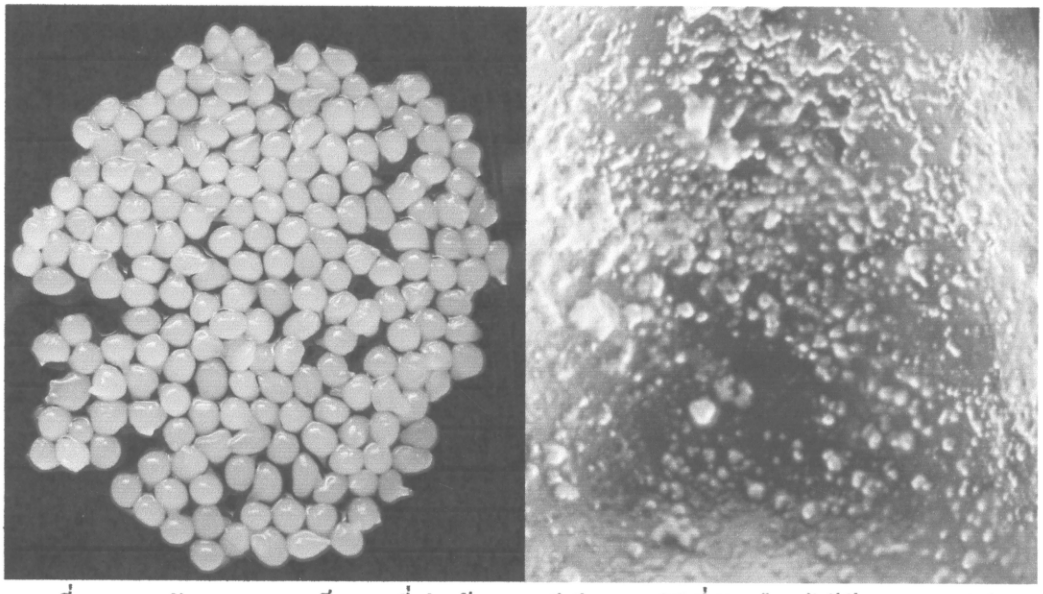
log CFU/ml เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากการบ่มทั้งสองสภาวะคิดเป็น 83.96% และ 73.60% ตามลำดับ ในขณะที่การรอดชีวิตของ *E. lactis* KT3L20 ที่ห่อหุ้มเซลล์โดย emulsion technique ลดลง 2.59 log CFU/ml เมื่อบ่มในสภาวะทางเดินอาหาร คือลดลงจาก 8.35 log CFU/ml ที่ชั่วโมงเริ่มต้นเป็น 6.91 CFU/ml หลังจากผ่านสภาวะกรดและลงลงเหลือ 5.76 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หลังจากการบ่มทั้งสองสภาวะการรอดชีวิตของ *E. lactis* KT3L20 คิดเป็น 82.75% และ 68.98% ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วย extrusion technique มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์โดย emulsion technique และการรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย extrusion technique และ emulsion technique เมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรียอิสระ 12.64% และ 7.48% ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ KT3L20 ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ภายหลังจากการบ่มในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่อง

Microencapsulation technique		Viable count (log CFU/ml) Survival (%)		
		pH 2.5		Fresh chicken bile 7%
		0 h	2 h	6 h
Extrusion	Free cell	8.99 (100)	5.93 (65.96)	5.48 (60.96)
	Cell encapsulated	8.22 (100)	6.83 (83.09)	6.05 (73.60)
Emulsion	Free cell	9.04 (100)	5.75 (63.61)	5.56 (61.50)
	Cell encapsulated	8.35 (100)	6.91(82.75)	5.76 (68.98)

จากตารางที่ 13 พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วย extrusion technique มีการรอดชีวิตสูงกว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์โดย emulsion technique ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Muthukumarasamy และคณะ (2006) ที่ศึกษาถึงการรอดชีวิตของ *Lactobacillus reuteri* ในเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มโดยวิธีที่ต่างกัน พบว่า *L. reuteri* ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตโดยวิธี extrusion technique มีจำนวนรอดชีวิต 7.78 log CFU/ml ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยวิธี emulsion technique ที่มีจำนวนรอดชีวิต 7.12 log CFU/ml จากจำนวนเริ่มต้น 8.09 log CFU/ml เมื่อผ่านการบ่มในสภาวะกรดกระเพาะอาหารพีเอช 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทั้งนี้ความสามารถในการรอดชีวิตเกิดจากความแตกต่างกันของขนาดเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มต่างวิธีกัน ในการศึกษาครั้งนี้เม็ดเจลที่ห่อหุ้มด้วย extrusion technique มีขนาดตั้งแต่ 1.80-2.50 มิลลิเมตร และมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 2.10 มิลลิเมตร ขนาดของเม็ดเจลที่ใหญ่ขึ้นจะมีพื้นที่ผิวจำเพาะน้อยกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเล็กกว่า ทำให้

เซลล์ที่ห่อหุ้มอยู่ในเม็ดเจลขนาดใหญ่สัมผัสกับสภาวะที่เป็นอันตรายน้อยกว่า เซลล์ที่อยู่ภายในจึงสามารถรอดชีวิตได้สูงกว่า ดังนั้นแบคทีเรียที่ห่อหุ้มด้วย extrusion technique ซึ่งอยู่ในเม็ดเจลขนาดใหญ่จึงมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วย emulsion technique ที่มีขนาดเม็ดเจลเล็กกว่า ซึ่งลักษณะของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มด้วยทั้งสองวิธีแสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ลักษณะของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ด้วย (a) วิธี extrusion, (b) วิธี emulsion

จากการศึกษาทำให้มั่นใจได้ว่าการนำเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์มาใช้กับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จะสามารถป้องกันสภาวะที่รุนแรงในทางเดินอาหารของไก่เมื่อนำไปใช้ได้ เมื่อผ่านกระเพาะอาหารเม็ดเจลจะป้องกันสภาวะกรดได้ในระดับหนึ่งและเมื่อเม็ดเจลตกลงสู่ลำไส้แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในเม็ดเจลจะถูกปลดปล่อยออกมาช้า ๆ เนื่องจากอัลจิเนตที่ใช้ในการห่อหุ้มนั้นจะคงตัวได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และจะละลายเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชเป็นกลางหรือเป็นด่าง (Annan *et al.*, 2008) เมื่อลงสู่ลำไส้ซึ่งมีสภาวะเป็นด่างอ่อน ๆ แบคทีเรียจะถูกปลดปล่อยออกมาช้า ๆ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าเม็ดเจลเริ่มพองตัวและแตกออกเมื่อบ่มในสภาวะด่างของลำไส้ แม้ว่าเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มโดยวิธี extrusion จะสามารถรอดชีวิตได้ดีกว่าเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยวิธี emulsion แต่ในการนำไปใช้จริงในไก่นั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความแตกต่างของการห่อหุ้มเซลล์ด้วยทั้งสองวิธี เนื่องจากในการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเซลล์เพื่อเพิ่มค่า encapsulation yield และการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติก และศึกษาความเหมาะสมในการนำไป

ผสมในอาหารไก่ทั้งในด้านความสามารถในการกินของไก่ ต้นทุนการผลิต และความยากง่ายในการจัดการในระดับอุตสาหกรรม

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองที่ถึงอายุขายคือไก่กระทงอายุประมาณ 40-50 วัน และไก่พื้นเมืองอายุประมาณ 3-4 เดือน สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 548 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองจำนวน 226 ไอโซเลตและจากไก่กระทงจำนวน 322 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารทุกส่วน คือ กระเพาะพัก ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และไส้ติ่ง เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 548 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่พีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีแบคทีเรียแลกติกเพียง 103 ไอโซเลตจากที่สามารถรอดชีวิตได้ดี โดยเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทงจำนวน 50 ไอโซเลต และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองจำนวน 53 ไอโซเลต เมื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีสดของไก่ความเข้มข้น 7% (v/v) และมีเอนไซม์แพนครีเอตินอยู่ด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่สภาวะด่างพีเอช 8.0 พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 20 ไอโซเลต สามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 7 log CFU/ml โดยแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลตแยกได้จากไก่กระทง และ 1 ไอโซเลตแยกได้จากไก่พื้นเมือง ซึ่งมีแบคทีเรียแลกติก 9 ไอโซเลต ที่สามารถรอดชีวิตได้สูงกว่า 50 % โดยไอโซเลต KT2S15 สามารถรอดชีวิตได้สูงสุด โดยมีความสามารถในการรอดชีวิตสูง 92.94% เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกันพบว่า มีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 6 ไอโซเลต ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด คือ KT2CR5, KT3L20, KT4S13, KT5S19, KT10L22 และ PM1L12 สามารถรอดชีวิตได้ 37.56%, 43.68%, 31.37%, 32.89%, 33.84% และ 27.19% ตามลำดับ

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 20 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จำนวน 12 สายพันธุ์สามารถย่อยโปรตีนได้คือ KT2CR3, KT2CR5, KT2S11, KT2S15, KT2L24, KT4S13, KT5S13, KT5S15, KT5S16, KT5S19, KT8CR4 และ KT10CE33 โดยแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต KT2CR3, KT2S15 และ KT2L24 สามารถย่อยโปรตีนได้ดีที่สุด แต่ไม่มีแบคทีเรียแลกติกไอโซเลตใดที่สามารถย่อยไขมัน และแป้งได้ การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี ยกเว้น 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้คือแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต P1L12 ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารส่วนลำไส้ใหญ่ของ

ไก่พื้นเมือง โดยแบคทีเรียแลกติกจำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง คือ KT3CR2, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 และ KT8CR4

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพดีได้จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ KT2L24, KT3L20, KT4S13, KT4CE27 และ KT8S16 และนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus* sp., *E. lactis, E. faecium, Pediococcus pentosaceus,* และ *E. faecium* ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97%, 96%, 96, 95% และ 97% ตามลำดับ

เมื่อศึกษาการรอดชีวิตภายใต้สภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก *E. lactis* KT2L20 หลังจากการทำ microencapsulation พบว่า แบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วย extrusion technique มีการรอดชีวิตสูงกว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์โดย emulsion technique และการรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย extrusion technique และ emulsion technique เมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรียอิสระที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. 2544. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 51 หน้า

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

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

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

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และกัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. ว. สัตวแพทย์ศาสตร์. 14 : 52-61.

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

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

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

ไพรัตน์ ศรแผลง, สุทธิพงศ์ อุริยะพงศ์สรรค์, เกรียงศักดิ์ พูนสุข, พลสัณห์ มหาขันธ์. 2550. แลกติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง. ว. สัตวแพทยศาสตร์. 17 : 33-42.

รุจา มาลัยพวง. 2544. การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลกติกของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาวุธ ตันโช. 2538. การผลิตสัตว์ปีก. พิมพ์ครั้งที่ 1. เอสโอพริ้นติ้งเฮาส์. กรุงเทพฯ.

อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโปรไบโอติกในอาหารสัตว์. ว.สุกรสาส์น 18 : 11-16.

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiousis, G., Ambrosiadis, I. and Koidis, P. 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. Bioresource Technol. 99 : 5384–5390.

Amit-Romach, E., Sklan, D. and Uni, Z. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Poult. Sci. 83 : 1093-1098.

Ammor, M. S., Flo´ rez, A. B. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol. 24 : 559–570.

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

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

Annan, N. T., Borza, A. D. and Hansen, L. T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Res. Int. 41 : 184–193.

Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A., Efendi, I. and Griffith, D. R. W. 1995. Aprobiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases cause by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18 : 93-96.

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

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

Begley, M., Cormac, G. M. G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol. Rev. 29 : 625–651.

Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH of bacteria. Microbiol. Rev. 49 : 359-378.

Brink, B. T., Minekus, M., Vossen, J. M., Leer, R. J. and Veld, J. H. I. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli : preliminary characterization and optimization of Acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. Appl. Bacteriol. 77 : 140-148.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. J. Microbiol. Meth. 56 : 27-35.

Chaplin, M. 2008. Water structure and science. (Online). Available http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html (30 January 2008)

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. 1998. Development of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 84 : 759–768.

Chen, K. N., Chen, M. J., Lin, C. W. 2006. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). J. Food Eng. 76 : 313–320.

Chitosan (Online). 2007. Available http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/chi_0067.shtml (10 November 2007).

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

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

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

Dasechel, M. A. and Klaenhammer, T. R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50 : 1538-1541.

De Fa'tima Silva Lopes, M., Leitao, A. L., Regalla M., Figueiredo Marques, J. J., Carrondo, M. J. T. and Crespo, M. T. B. 2002. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Food Microbiol. 76 : 107-115.

De Fa'tima Silva Lopes, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J., Tenreiro, R. and Teresa Barreto Crespoa, M. 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. Int. J. Food Microbiol. 103 : 191–198.

Duangchitchareon, Y. 2006. Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Pickles and Fermented Plant Products . Master of Science Degree Thesis. Chiang Mai University.

Firtel, M., Henderson, G. and Sokolov, I. 2004. Nanosurgery: observation of peptidoglycan strands in *Lactobacillus helveticus* cell walls. Ultramicroscopy. 101 : 105-109.

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

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

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 Control 18 : 716–722.

Grosso, C. R. F. and Fávaro-Trindade, C. S. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. Brazi. J. Microbiol. 35 :151-156.

Gurira, O. Z. Buys, E. M.. 2005. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. Food Microbiol. 22 : 159–168.

Hakkinen, M. and Schneitz, C. 1999. Efficacy of commercial competitive exclusion product against *Campylobacter jejuni*. Brit. Poultry Sci. 40 : 619-621.

Helander, I. M., Wright, A. V. and Mattila-Sandholm, T-M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends Food Sci. Tech. 8 : 146-150.

Hood, S. K. and Zotolla, E. A. 1988. Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J. Food Sci. 53 :1514–1516.

Huycke, M. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. S. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. Emerg. Infect. Dis. 4 : 239-249.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj, S. A. and Deschamps, A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 61 : 193-197.

Jankowski, T., Zielinska, M., and Wysakowska, A. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. Biotechnol. Tech. 11 : 31–34.

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

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

Johnson, K. J., Cygan. R. T. and Fein, J. B. 2006. Molecular simulations of metal adsorption to bacterial surfaces. Geochim. Cosmochim. Ac. 70 : 5075–5088.

Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT. 39 : 1221-1227.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, Non-sporing Gram-Positive Rods. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. 1st ed. (Sneath, P. H. A., Mair, N. S. Sharpe, M. E. and Holt, J. G., eds.). p. 1208-1234. Williams and Wilkins. Baltimore.

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

Kastner, S., Perreten, V., Blruler, H., Hugenchmidt, G., Lacroix, C. and Meile, L. 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. J. Syst. Appl. Microbiol. 29 : 145-155.

Kawai, Y., Saito, T., Samant, S. K. and Itoh, T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. J. Biosci. Biochem. 58 : 1218-1221.

Kawai, Y., Tacokoro, K., Konomi, R., Itoh, K., Saito, T., Kitazawa, H. and Itoh, T. 1999. A novel method for the detection of protease and the development of extracellular protease in early growth stages of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci. 82 : 481–485.

Klaenhammer, T. R.. 1995. Genetics of intestinal lactobacilli. Int. Dairy J. 5 : 1019-1058.

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

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Int. Dairy J. 13 : 3–13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int. Dairy J. 14 : 737–743.

Lakshmy, A., Srivastava, V. K., Dutta, R., Mehta, G., A. and Dutta, K. 2006. Characterization of enterococci from paediatric enterococcal infections—hospital-based study in India. Int. Congress Series 1289 : 58–61.

Lee, K. Y. and Heo, T. R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulate gastric juices and bile salt solution. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 869-873.

Lian, W. C. Hsiao, H. C. and Chou, C. C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. Int. J. Food Microbiol. 86 : 293– 301.

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

Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J. and Lee, D. M. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. Appl. Environ. Microbiol. 69 : 6816-6824.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E. and Malcata, F. X. 2005. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. Int. Dairy J. 15 : 921–927.

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.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. 16 : 189-199.

Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 105 : 281– 295.

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

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of Polysaccharide, Protein and Lipid. *In* Laboratory Exercises in Microbiology. p 126-188. Mc Graw-Hill. New York.

Mishra, V. and Prasad, D. N. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. Int. J. Food Microbiol. 103 : 109-115.

Mitidieri S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. Bioresource Technol. 97 : 1217–1224.

Mombelli, B. and Gismondo, M. R. 2000. The use of probiotics in medical practice. Int. J. Antimicrob. Ag. 16 : 531–536.

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

Morishita, Y. T., Aye, P. P., Harr, S. B., Cobb, W. C. and Clifford, R. J. 1997. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. Avian Dis. 41 : 850-855.

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robinow, C. F. 1994. Determinative and Cytogical Light Microscopy. *In* Method for General and Molecular Bacteriology. (Murray, R. E. G., Wood, W. A.. And Krieg, N.R. ed.) p. 21-41. American Society for Microbiology. USA.

Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P. and Holley, R. A., 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. J. Food Sci. 71 : M20–M24.

Muthukumarasamy, P. and Holley, R. A. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. Food Microbiol. 24 : 82–88.

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

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

Otero, M. C. and Nader-Macías, M. E. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Anim. Reprod. Sci. 96 : 35 – 46.

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

Pascual, M., Hugas, M., Badiola, I. J., Monfort, J. M. and Garriga, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidiš* colonization in chickens. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 4981-4986.

Prevost, H. and Divies, C. 1992. Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. Biotechnol. Lett. 14 : 583–588.

Rao, A. V., Shiwnavain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolohgum* in simulated gastric and imtestinal juiced. Can. Inst. F. Sci. Tec. J. 22 : 345-346.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. Lactic Acid Bacteria. 1st ed. Marcel Dekker Inc. New York.

Sánchez Valenzuela, A., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Ortega, E., Cañamero, M. M., and Gálvez A. 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits (Online). Available http://www.sciencedirect.com/science (25 April 2008)

Schulte, B., Wolza, C., Schumachera, U., Beyserb, K., Heega, P. and Borgmanna, S. 2008. Acquisition of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* strains during long-term hospitalization and fast adaptation of enterococcal flora to antibiotic treatment: A case report (Online). Available http://www.sciencedirect.com/science (7 May 2008)

Sheu, T. Y. and Marshall, R. T. 1993. Micro-encapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. J. Food Sci. 54 : 557– 561.

Shibata, K., Flores, D. M., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. 2007. Direct l-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. Enzyme Microb. Tech. 41 : 149–155.

Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R. P. 2004. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of *Bifidobacteria* from probiotic animal feed. J. Microbiol. Meth. 57 : 9-16.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiric, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginates-starch and evaluation of survival in simulate gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol. 62 : 47-55.

Taranto, M. P., Perez-Martinez, G. and Font de Valdez, G. 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Res. Microbiol. 157 : 720–725.

Tsai, C. C., Hsiha, H. Y., Chiu, H. H., Lai, Y. Y., Liu, J. H., Yu, B. and Tsen, H. Y. 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. Int. J. Food Microbiol. 102 :185–194.

Wray, C. and Davies, R. H. 2000. Gest Editorial: Competitive exclusion-an alternative to antibiotic. Vet. J. 159 : 107-108.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. MRS (de Man Rogosa and Sharp)

ประกอบด้วย

Dextrose	20	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม

pH 6.5

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม ละลายกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient broth

ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Beef extract	1.5	กรัม
Yeast extract	1.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

pH 7.4

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 13 กรัม ละลายกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Protien hydrolysis agar

ประกอบด้วย

Skim milk 20%	100	มิลลิลิตร
MRS agar	900	มิลลิลิตร

เตรียม MRS agar ที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเตรียมสารละลาย Skim milk 20% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทสารละลาย Skim milk ผสมลงใน MRA agar ที่ปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากันจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. Starch agar

ประกอบด้วย

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Soluble starch	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Tributyrin agar

ประกอบด้วย

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Tributyrin	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น tributyrin ด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 6.5 จากนั้นเติม tributyrin แล้วนำไปโฮโมจิไนซ์ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์

1. สารละลาย โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ประกอบด้วย

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.05	โมลาร์
KH_2PO_4	0.05	โมลาร์
NaCl	0.85	กรัม
pH	7.0	

ใช้ สารละลาย KH_2PO_4 ปรับ สารละลาย $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ จนได้พีเอชที่ต้องการ จากนั้นตวงบัฟเฟอร์ตามปริมาตรที่ต้องการ เติม NaCl ลงไป ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมน้ำดีสดของไก่กระทงเพื่อทดสอบการทนต่อน้ำดีและเอนไซม์แพนครีเอติน

นำถุงน้ำดีของไก่กระทงมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ตัดถุงน้ำดีและเก็บน้ำดีที่ได้ไว้ ปิเปตน้ำดีตามความเข้มข้นที่ต้องการผสมลงในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีเอนไซม์ แพนครีเอตินอยู่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เตรียมสารละลายสดทุกครั้งก่อนใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 14 ลักษณะบางประการของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่พื้นเมือง

Isolate No	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM1CR1*	+	Short rod	-
PM1CR2	+	Short rod	-
PM1CR3	+	Short rod	-
PM1CR4	+	Short rod	-
PM1S5	+	Short rod	-
PM1S6	+	Short rod	-
PM1S7	+	Short rod	-
PM1S8	+	Short rod	-
PM1S9	+	Short rod	-
PM1L10	+	Rod	-
PM1L11	+	Rod	-
PM1L12	+	Rod	-
PM1L13	+	Rod	-
PM1L14	+	Short rod	-
PM1L15	+	Rod	-
PM1L16	+	Rod	-
PM1CE18	+	Rod	-
PM1CE19	+	Rod	-
PM4CR1	+	Rod	-
PM4CR2	+	Rod	-
PM4CR3	+	Cocci	-
PM4CR4	+	Short rod	-
PM4CR5	+	Short rod	-
PM4CR6	+	Rod	-
PM4CR7	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM4CR8	+	Rod	-
PM4CR9	+	Rod	-
PM4CR10	+	Rod	-
PM4CR11	+	Rod	-
PM4CR12	+	Rod	-
PM4CR13	+	Short rod	-
PM4CR14	+	Rod	-
PM4S16	+	Rod	-
PM4S17	+	Short rod	-
PM4S18	+	Short rod	-
PM4S19	+	Short rod	-
PM4S20	+	Short rod	-
PM4S21	+	Short rod	-
PM4S23	+	Short rod	-
PM4S25	+	Short rod	-
PM4S26	+	Short rod	-
PM4S27	+	Short rod	-
PM4S28	+	Short rod	-
PM4CE29	+	Rod	-
PM4CE30	+	Rod	-
PM4CE31	+	Rod	-
PM4CE32	+	Rod	-
PM4CE34	+	Rod	-
PM4CE35	+	Rod	-
PM4CE36	+	Rod	-
PM4CE37	+	Rod	-
PM4CE39	+	Cocci	-
PM4CE40	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM4CE42	+	Rod	-
PM4CE43	+	Rod	-
PM4L44	+	Rod	-
PM4L45	+	Short rod	-
PM4L47	+	Short rod	-
PM4L48	+	Rod	-
PM4L49	+	Short rod	-
PM4L50	+	Short rod	-
PM4L51	+	Cocci	-
PM4L52	+	Cocci	-
PM4L53	+	Rod	-
PM4L54	+	Rod	-
PM5CR1	+	Short rod	-
PM5CR2	+	Short rod	-
PM5CR3	+	Short rod	-
PM5CR4	+	Short rod	-
PM5CR5	+	Rod	-
PM5CR6	+	Short rod	-
PM5CR7	+	Short rod	-
PM5CR8	+	Short rod	-
PM5S9	+	Short rod	-
PM5S10	+	Short rod	-
PM5S11	+	Short rod	-
PM5S12	+	Short rod	-
PM5S13	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM5S14	+	Short rod	-
PM5S15	+	Rod	-
PM5S16	+	Short rod	-
PM5L17	+	Rod	-
PM5L18	+	Rod	-
PM5L19	+	Rod	-
PM5L20	+	Rod	-
PM5L21	+	Rod	-
PM5L22	+	Short rod	-
PM5L23	+	Short rod	-
PM5L24	+	Cocci	-
PM5CE25	+	Rod	-
PM5CE26	+	Rod	-
PM5CE27	+	Rod	-
PM5CE28	+	Short rod	-
PM5CE29	+	Rod	-
PM5CE30	+	Rod	-
PM6CR1	+	Rod	-
PM6CR2	+	Rod	-
PM6CR3	+	Rod	-
PM6CR4	+	Rod	-
PM6CR5	+	Rod	-
PM6CR6	+	Rod	-
PM6CR7	+	Rod	-
PM6CR8	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM6S9	+	Rod	-
PM6S10	+	Rod	-
PM6S11	+	Rod	-
PM6S12	+	Rod	-
PM6S13	+	Rod	-
PM6S14	+	Rod	-
PM6S15	+	Cocci	-
PM6S16	+	Rod	-
PM6L17	+	Rod	-
PM6L18	+	Rod	-
PM6L19	+	Rod	-
PM6L20	+	Rod	-
PM6L21	+	Short rod	-
PM6L22	+	Rod	-
PM6L23	+	Rod	-
PM6L24	+	Rod	-
PM6CE25	+	Rod	-
PM6CE26	+	Rod	-
PM6CE27	+	Rod	-
PM6CE28	+	Rod	-
PM6CE29	+	Rod	-
PM6CE30	+	Rod	-
PM6CE31	+	Rod	-
PM6CE33	+	Rod	-
PM7CR1	+	Short rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM7CR2	+	Rod	-
PM7CR3	+	Rod	-
PM7CR4	+	Rod	-
PM7CR5	+	Rod	-
PM7CR6	+	Rod	-
PM7S7	+	Rod	-
PM7S8	+	Rod	-
PM7S9	+	Rod	-
PM7S10	+	Rod	-
PM7S11	+	Rod	-
PM7S12	+	Rod	-
PM7L13	+	Rod	-
PM7L14	+	Rod	-
PM7L15	+	Rod	-
PM7L16	+	Rod	-
PM7L17	+	Short rod	-
PM7L18	+	Rod	-
PM7CE19	+	Short rod	-
PM7CE20	+	Rod	-
PM7CE21	+	Rod	-
PM7CE22	+	Rod	-
PM7CE23	+	Rod	-
PM7CE24	+	Rod	-
PM8CR1	+	Rod	-
PM8CR2	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM8CR3	+	Rod	-
PM8CR4	+	Cocci	-
PM8CR5	+	Rod	-
PM8CR6	+	Rod	-
PM8CR7	+	Rod	-
PM8CR8	+	Rod	-
PM8S9	+	Rod	-
PM8S11	+	Rod	-
PM8S12	+	Cocci	-
PM8S13	+	Rod	-
PM8S14	+	Rod	-
PM8L15	+	Rod	-
PM8L16	+	Rod	-
PM8L17	+	Rod	-
PM8L18	+	Rod	-
PM8L19	+	Rod	-
PM8L20	+	Rod	-
PM8CE21	+	Rod	-
PM8CE22	+	Rod	-
PM8CE23	+	Rod	-
PM8CE24	+	Rod	-
PM8CE25	+	Rod	-
PM8CE26	+	Rod	-
PM9CR1	+	Rod	-
PM9CR2	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM9CR3	+	Rod	-
PM9CR4	+	Rod	-
PM9CR5	+	Rod	-
PM9CR6	+	Rod	-
PM9S8	+	Rod	-
PM9S9	+	Rod	-
PM9S10	+	Rod	-
PM9S11	+	Rod	-
PM9S12	+	Rod	-
PM9L13	+	Rod	-
PM9L14	+	Rod	-
PM9L15	+	Rod	-
PM9L16	+	Rod	-
PM9L17	+	Rod	-
PM9L18	+	Rod	-
PM9CE19	+	Cocci	-
PM9CE20	+	Rod	-
PM9CE21	+	Cocci	-
PM9CE22	+	Short rod	-
PM9CE23	+	Short rod	-
PM9CE24	+	Rod	-
PM9CE25	+	Cocci	-
PM10CR1	+	Rod	-
PM10CR2	+	Short rod	-
PM10CR3	+	Rod	-

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
PM10CR4	+	Rod	-
PM10CR5	+	Rod	-
PM10CR6	+	Rod	-
PM10S7	+	Rod	-
PM10S8	+	Rod	-
PM10S9	+	Rod	-
PM10S10	+	Rod	-
PM10S11	+	Rod	-
PM10S12	+	Short rod	-
PM10L13	+	Rod	-
PM10L14	+	Rod	-
PM10L15	+	Rod	-
PM10L16	+	Rod	-
PM10L17	+	Rod	-
PM10L18	+	Rod	-
PM10CE19	+	Rod	-
PM10CE20	+	Rod	-
PM10CE21	+	Rod	-
PM10CE22	+	Rod	-
PM10CE23	+	Rod	-
PM10CE24	+	Rod	-
PM10CE25	+	Cocci	-
PM10CE26	+	Cocci	-

PM : Thai indigenous chicken

CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Ceacum

PM1CR1* : 1st LAB from crop of 1st Thai indigenous chicken

ตารางที่ 15 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทง

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT1CR1*	+	Short rod	-
KT1CR2	+	Short rod	-
KT1CR3	+	Cocci	-
KT1CR4	+	Cocci	-
KT1CR5	+	Cocci	-
KT1CR6	+	Cocci	-
KT1CR7	+	Short rod	-
KT1CR8	+	Cocci	-
KT1CR9	+	Cocci	-
KT1CR10	+	Cocci	-
KT1CR11	+	Cocci	-
KT1L14	+	Short rod	-
KT1L15	+	Rod	-
KT1L16	+	Short rod	-
KT1L17	+	Short rod	-
KT1CE18	+	Cocci	-
KT1CE19	+	Cocci	-
KT1CE20	+	Short rod	-
KT1CE21	+	Short rod	-
KT1CE22	+	Short rod	-
KT1CE23	+	Rod	-
KT1S24	+	Cocci	-
KT1S25	+	Short rod	-
KT1S26	+	Short rod	-
KT2CR1	+	Short rod	-
KT2CR2	+	Short rod	-
KT2CR3	+	Cocci	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT2CR4	+	Short rod	-
KT2CR5	+	Cocci	-
KT2CR6	+	Cocci	-
KT2S7	+	Cocci	-
KT2S8	+	Short rod	-
KT2S9	+	Cocci	-
KT2S10	+	Cocci	-
KT2S11	+	Short rod	-
KT2S12	+	Short rod	-
KT2S13	+	Short rod	-
KT2S14	+	Cocci	-
KT2S15	+	Short rod	-
KT2L16	+	Short rod	-
KT2L17	+	Cocci	-
KT2L18	+	Cocci	-
KT2L19	+	Cocci	-
KT2L20	+	Cocci	-
KT2L21	+	Short rod	-
KT2L22	+	Short rod	-
KT2L23	+	Short rod	-
KT2L24	+	Cocci	-
KT2CE25	+	Rod	-
KT2CE26	+	Rod	-
KT2CE27	+	Rod	-
KT2CE28	+	Rod	-
KT2CE29	+	Rod	-
KT2CR30	+	Short rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT3CR1	+	Rod	-
KT3CR2	+	Rod	-
KT3CR3	+	Rod	-
KT3CR4	+	Rod	-
KT3CR5	+	Rod	-
KT3CR6	+	Rod	-
KT3CR7	+	Rod	-
KT3CR8	+	Rod	-
KT3S9	+	Rod	-
KT3S10	+	Rod	-
KT3S11	+	Rod	-
KT3S12	+	Rod	-
KT3S13	+	Short rod	-
KT3S14	+	Rod	-
KT3S15	+	Rod	-
KT3S16	+	Rod	-
KT3L17	+	Cocci	-
KT3L18	+	Cocci	-
KT3L19	+	Cocci	-
KT3L20	+	Cocci	-
KT3L21	+	Cocci	-
KT3L22	+	Cocci	-
KT3L23	+	Cocci	-
KT3CE24	+	Rod	-
KT3CE25	+	Rod	-
KT3CE26	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT3CE27	+	Rod	-
KT3CE28	+	Rod	-
KT3CE29	+	Rod	-
KT3CE31	+	Rod	-
KT3CE32	+	Rod	-
KT3CE33	+	Rod	-
KT4CR1	+	Short rod	-
KT4CR2	+	Cocci	-
KT4CR3	+	Short rod	-
KT4CR4	+	Short rod	-
KT4CR5	+	Short rod	-
KT4CR6	+	Short rod	-
KT4CR7	+	Short rod	-
KT4S8	+	Cocci	-
KT4S9	+	Short rod	-
KT4S10	+	Short rod	-
KT4S11	+	Short rod	-
KT4S12	+	Short rod	-
KT4S13	+	Cocci	-
KT4S14	+	Rod	-
KT4S15	+	Rod	-
KT4L16	+	Short rod	-
KT4L17	+	Cocci	-
KT4L18	+	Cocci	-
KT4L19	+	Cocci	-
KT4L20	+	Short rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT4L21	+	Short rod	-
KT4L23	+	Short rod	-
KT4CE24	+	Rod	-
KT4CE25	+	Rod	-
KT4CE26	+	Rod	-
KT4CE27	+	Cocci	-
KT4CE28	+	Short rod	-
KT4CE29	+	Rod	-
KT4CE30	+	Rod	-
KT4CE31	+	Rod	-
KT4CE32	+	Rod	-
KT4CE33	+	Rod	-
KT4CE34	+	Rod	-
KT4CE35	+	Rod	-
KT4CE36	+	Rod	-
KT5CR1	+	Rod	-
KT5CR2	+	Rod	-
KT5CR3	+	Rod	-
KT5CR4	+	Rod	-
KT5CR5	+	Rod	-
KT5CR6	+	Short rod	-
KT5CR7	+	Rod	-
KT5CR8	+	Rod	-
KT5CR9	+	Rod	-
KT5S10	+	Cocci	-
KT5S11	+	Cocci	-
KT5S12	+	Cocci	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT5S13	+	Cocci	-
KT5S14	+	Cocci	-
KT5S15	+	Cocci	-
KT5S16	+	Short rod	-
KT5S17	+	Cocci	-
KT5S18	+	Short rod	-
KT5S19	+	Short rod	-
KT5L20	+	Cocci	-
KT5L21	+	Cocci	-
KT5L22	+	Short rod	-
KT5L23	+	Short rod	-
KT5L24	+	Short rod	-
KT5L25	+	Short rod	-
KT5L26	+	Short rod	-
KT5L27	+	Short rod	-
KT5CE28	+	Short rod	-
KT5CE29	+	Short rod	-
KT5CE30	+	Cocci	-
KT5CE31	+	Short rod	-
KT5CE32	+	Short rod	-
KT5CE33	+	Short rod	-
KT5CE34	+	Short rod	-
KT5CE35	+	Short rod	-
KT5CE37	+	Rod	
KT6CR1	+	Rod	-
KT6CR2	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT6CR3	+	Rod	-
KT6CR4	+	Rod	-
KT6CR5	+	Rod	-
KT6CR6	+	Rod	-
KT6CR7	+	Rod	-
KT6CR8	+	Rod	-
KT6S9	+	Rod	-
KT6S10	+	Rod	-
KT6S12	+	Rod	-
KT6S13	+	Rod	-
KT6S14	+	Rod	-
KT6S15	+	Rod	-
KT6S16	+	Rod	-
KT6L17	+	Rod	-
KT6L18	+	Rod	-
KT6L19	+	Rod	-
KT6L20	+	Rod	-
KT6L21	+	Rod	-
KT6L22	+	Rod	-
KT6L23	+	Rod	-
KT6L24	+	Rod	-
KT6CE25	+	Rod	-
KT6CE26	+	Rod	-
KT6CE27	+	Rod	-
KT6CE28	+	Rod	-
KT6CE29	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT6CE30	+	Rod	-
KT6CE31	+	Rod	-
KT6CE32	+	Rod	-
KT7CR1	+	Rod	-
KT7CR2	+	Rod	-
KT7CR3	+	Rod	-
KT7CR4	+	Rod	-
KT7CR5	+	Rod	-
KT7CR6	+	Rod	-
KT7CR7	+	Rod	-
KT7CR8	+	Rod	-
KT7CR9	+	Rod	-
KT7CR10	+	Rod	-
KT7CR11	+	Rod	-
KT7CR12	+	Rod	-
KT7S13	+	Rod	-
KT7S14	+	Rod	-
KT7S15	+	Rod	-
KT7S16	+	Rod	-
KT7S17	+	Rod	-
KT7S18	+	Rod	-
KT7S19	+	Rod	-
KT7S20	+	Rod	-
KT7S21	+	Rod	-
KT7L22	+	Rod	-
KT7L23	+	Short rod	-
KT7L24	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT7L25	+	Rod	-
KT7L26	+	Rod	-
KT7L27	+	Rod	-
KT7L28	+	Rod	-
KT7CE29	+	Rod	-
KT7CE30	+	Rod	-
KT7CE31	+	cocci	-
KT7CE32	+	Rod	-
KT7CE33	+	Rod	-
KT7CE34	+	Rod	-
KT7CE35	+	Rod	-
KT7CE36	+	Rod	-
KT8CR1	+	Rod	-
KT8CR2	+	Rod	-
KT8CR3	+	Rod	-
KT8CR4	+	Rod	-
KT8CR5	+	Rod	-
KT8CR6	+	Rod	-
KT8CR7	+	Rod	-
KT8CR8	+	Rod	-
KT8S9	+	cocci	-
KT8S10	+	Rod	-
KT8S11	+	Rod	-
KT8S12	+	Rod	-
KT8S13	+	cocci	-
KT8S14	+	Rod	-
KT8S15	+	cocci	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT8S16	+	cocci	-
KT8L17	+	Rod	-
KT8L18	+	Rod	-
KT8L19	+	Rod	-
KT8L20	+	Rod	-
KT8L21	+	Rod	-
KT8L22	+	Rod	-
KT8L23	+	Rod	-
KT8L24	+	Rod	-
KT8CE25	+	Rod	-
KT8CE26	+	Rod	-
KT8CE27	+	Rod	-
KT8CE28	+	Rod	-
KT8CE29	+	Rod	-
KT8CE30	+	Rod	-
KT8CE31	+	Rod	-
KT8CE32	+	Rod	-
KT9CR1	+	Rod	-
KT9CR2	+	Rod	-
KT9CR3	+	Rod	-
KT9CR4	+	Rod	-
KT9CR5	+	Rod	-
KT9CR6	+	Rod	-
KT9CR7	+	Rod	-
KT9CR8	+	Rod	-
KT9S9	+	Rod	-
KT9S10	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT9S11	+	Rod	-
KT9S12	+	Short rod	-
KT9S13	+	Rod	-
KT9S14	+	Rod	-
KT9S15	+	Rod	-
KT9S16	+	Rod	-
KT9L17	+	Rod	-
KT9L18	+	Rod	-
KT9L19	+	Rod	-
KT9L20	+	Rod	-
KT9L21	+	Rod	-
KT9L22	+	Rod	-
KT9L23	+	Rod	-
KT9L24	+	Rod	-
KT9CE25	+	Rod	-
KT9CE26	+	Rod	-
KT9CE27	+	Rod	-
KT9CE28	+	Rod	-
KT9CE29	+	Rod	-
KT9CE30	+	Rod	-
KT9CE31	+	Rod	-
KT9CE32	+	Rod	-
KT10CR1	+	Short rod	-
KT10CR2	+	Short rod	-
KT10CR3	+	Short rod	-
KT10CR4	+	Rod	-
KT10CR5	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT10CR6	+	Rod	-
KT10CR7	+	Short rod	-
KT10CR8	+	Short rod	-
KT10S9	+	Cocci	-
KT10S10	+	Cocci	-
KT10S11	+	Rod	-
KT10S12	+	Cocci	-
KT10S13	+	Short rod	-
KT10S14	+	Cocci	-
KT10S15	+	Cocci	-
KT10S16	+	Cocci	-
KT10L17	+	Cocci	-
KT10L18	+	Rod	-
KT10L19	+	Cocci	-
KT10L20	+	Rod	-
KT10L21	+	Cocci	-
KT10L22	+	Cocci	-
KT10L23	+	Rod	-
KT10L24	+	Rod	-
KT10L25	+	Rod	-
KT10L26	+	Rod	-
KT10CE27	+	Cocci	-
KT10CE28	+	Cocci	-
KT10CE29	+	Cocci	-
KT10CE30	+	Rod	-
KT10CE31	+	Cocci	-
KT10CE32	+	Rod	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Isolate	Gram stain	Shape	Catalase tast
KT10CE33	+	Cocci	-
KT10CE34	+	Cocci	-

KT : Broiler

CR : Crop, S : Small intestine, L : Large intestine, CE : Ceacum

KT1CR1* : 1st LAB from crop of 1st.broiler

ภาคผนวก ง

```
>gb|DQ337520.1|  Enterococcus sp. BBDP31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1522

 Score = 1223 bits (662),  Expect = 0.0
 Identities = 696/717 (97%), Gaps = 5/717 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GCACTCAATTGG-AAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATC  59
            ||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  83   GCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATC  142

Query  60   AGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGC  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  143  AGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGC  202

Query  120  ATAANAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  179
            |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  203  ATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  262

Query  180  TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  263  TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  322

Query  240  CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  323  CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  382

Query  300  CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  383  CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  442

Query  360  AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTA  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  443  AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTA  502

Query  420  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  479
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  503  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  562

Query  480  TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  539
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  563  TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  622

Query  540  CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGANACTTGAGTGCAAAAAAGNAAAG  599
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||| ||||| | ||
Sbjct  623  CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAAGGAGAG  682

Query  600  TGGAATTCCATGTGTANCGGTGAAATGCGTAAATNTNTGGAGGACC-CCNGTGGCNAANG  658
            |||||||||||||||| |||||||||||||| || | ||||||| | || ||||| || |
Sbjct  683  TGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG  742

Query  659  CGGCTCTCTGGTCTGTA-CTGACNCTGAAGCTCNAA-GCGTGGGGAGCAA-CAGGAT  712
            ||||||||||||||||| ||||| |||| |||| || ||||||||||||| ||||||
Sbjct  743  CGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  799
```

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT2L24 กับ *Enterococcus* sp.

```
>gb|DQ255948.1|  Enterococcus lactis strain CK1026 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1526

 Score = 1192 bits (645),  Expect = 0.0
 Identities = 684/707 (96%), Gaps = 7/707 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    TTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  64   TTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  123

Query  61   GTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  124  GTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAAT  183

Query  121  CGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGACGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGC  180
            |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  184  CGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGC  243

Query  181  GGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  244  GGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG  303

Query  241  AGAGGGTGATCGGCCACNTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAG  300
            |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  304  AGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAG  363

Query  301  TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  364  TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG  423

Query  361  TTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  424  TTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCC  483

Query  421  CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  484  CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  543

Query  481  TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAG  540
            |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  544  TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAG  603

Query  541  TCTGATGTGAAANCCCCCGGCTCANCCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT  600
            |||||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  604  TCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT  663

Query  601  GCAAAAAAG-AGAGTGNANTNCC-TGTGTAGCGGTGAAATGCNTAAATNTNTGGAG-AAC  657
            ||| || || |||||| | | || ||||||||||||||||||| || || | ||||| |||
Sbjct  664  GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAAC  723

Query  658  NCC-GTGGCGAAGGCGNCTCTCTG-TCTGTA-CTGAC-CTGAGGCTC  700
             || |||||||||||| |||||||| |||||| ||||| |||||||||
Sbjct  724  ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTC  770
```

ภาพที่ 12 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT3L20 กับ *Enterococcus lactis*

```
> gb|AF070223.1|AF070223  Enterococcus faecium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1510

 Score = 1230 bits (666),  Expect = 0.0
 Identities = 707/731 (96%), Gaps = 7/731 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GCTCC-CCGG-AAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC  58
            ||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  62   GCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC  121

Query  59   AGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGT  118
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  122  AGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGT  181

Query  119  TTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  178
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  182  TTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  241

Query  179  TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  238
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  242  TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  301

Query  239  CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  298
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  302  CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  361

Query  299  CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  358
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  362  CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  421

Query  359  AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTA  418
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  422  AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTA  481

Query  419  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  478
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  482  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  541

Query  479  TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA-GC  537
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  542  TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  601

Query  538  CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGANACTTGAGTGCAAAAAAGNAAAG  597
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| || || | ||
Sbjct  602  CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  661

Query  598  TGGAATTCCATGTGTANCGGTGAAATGCGTAAATATNTGGAG-AACCCCAGTGGCGAAGG  656
            |||||||||||||||| |||||||||||||| |||| ||||| ||| ||||||||||||
Sbjct  662  TGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG  721

Query  657  CGGCTCTCTGGTCTGTA-CTGACNCTGANGCTCNAA-GCNTGGGGANCAA-CAGGATNAA  713
            |||||||||||||||| ||||| |||| |||| || || |||||| ||| |||||| |
Sbjct  722  CGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  781

Query  714  ATNCCCTGGTA  724
            || ||||||||
Sbjct  782  ATACCCTGGTA  792
```

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT4S13 กับ *Enterococcus faecium*

```
>dbj|AB362605.1|  Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence,
strain: NRIC 0123
Length=1571

 Score = 1182 bits (640),  Expect = 0.0
 Identities = 687/719 (95%), Gaps = 4/719 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  3    CTGATTGAGATTTT-ACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG  61
            ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95   CTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG  154

Query  62   CCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCG  121
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  155  CCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCG  214

Query  122  CATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTA  181
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  215  CATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTA  274

Query  182  GCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAA  241
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  275  GCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAA  334

Query  242  TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  301
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  335  TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  394

Query  302  TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCT  361
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  395  TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCT  454

Query  362  CGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGT  421
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  455  CGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGT  514

Query  422  ATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  481
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  515  ATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  574

Query  482  AGCGTTATCCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTNAGTCTAATGG  541
            |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  575  AGCGTTATCC-GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGT  633

Query  542  GAAAGCCTTCNGCTCAACCGAANAAGTGCATTGGAAACTGGGANACTTGANTGCAAAAAA  601
            |||||||||| |||||||||| |||||||||||||||||||| |||||| |||| || |
Sbjct  634  GAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA  693

Query  602  GGACAGTGGAACTCCNTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATTTNTGGAAAAACCCCNNNG-  660
            |||||||||||||||| |||||||||||||||||||| || | ||||| ||| ||    |
Sbjct  694  GGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGG  753

Query  661  CNAANGNGGCTGTCTGGTCTGCANCTGACCCTNANGCTCCAAANCNTGGGTTANCGAAC  719
            | || | |||||||||||||||| ||||| || | |||| ||| | ||||| | |||||
Sbjct  754  CGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGT-AGCGAAC  811
```

ภาพที่ 14 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT4S13 กับ *Pediococcus pentosaceus*

```
> gb|AF070223.1|AF070223  Enterococcus faecium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1510

 Score = 1230 bits (666),  Expect = 0.0
 Identities = 707/731 (96%), Gaps = 7/731 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GCTCC-CCGG-AAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC  58
            ||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  62   GCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATC  121

Query  59   AGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGT  118
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  122  AGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGT  181

Query  119  TTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  178
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  182  TTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAG  241

Query  179  TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  238
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  242  TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  301

Query  239  CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  298
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  302  CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  361

Query  299  CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  358
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  362  CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  421

Query  359  AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTA  418
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  422  AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTA  481

Query  419  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  478
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  482  ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  541

Query  479  TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA-GC  537
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  542  TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  601

Query  538  CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGANACTTGAGTGCAAAAAAGNAAAG  597
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| || || | ||
Sbjct  602  CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  661

Query  598  TGGAATTCCATGTGTANCGGTGAAATGCGTAAATATNTGGAG-AACCCCAGTGGCGAAGG  656
            |||||||||||||||| |||||||||||||| |||| ||||| ||| ||||||||||||
Sbjct  662  TGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG  721

Query  657  CGGCTCTCTGGTCTGTA-CTGACNCTGANGCTCNAA-GCNTGGGGANCAA-CAGGATNAA  713
            |||||||||||||||| ||||| |||| |||| || || |||||| ||| |||||| |
Sbjct  722  CGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  781

Query  714  ATNCCCTGGTA  724
            || ||||||||
Sbjct  782  ATACCCTGGTA  792
```

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ KT8S16 กับ *Enterococcus faecium*

Output

Original Article

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.

มีนักศึกษาระดับปริญญาโทจบจากโครงการนี้ 1 คน คือ นางสาวหทัยรัตน์ มุสิกสังข์ โดยมีหัวข้อวิทยานิพนธ์คือ การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม