การประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่

Evaluation of Primary Probiotic Properties and Microencapsulation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract

ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์

Natthapat Sohsomboon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่

ผู้เขียน นายณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

…….....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

…….....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภคมน จิตประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

…….

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่

ชื่อผู้เขียน นายณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

จากการประเมินคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน 9 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากทางเดินอาหารของไก่ โดยทดสอบความสามารถในการยึดเกาะ mucin พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินทุกไอโซเลตไม่สามารถยึดเกาะกับ mucin และเมื่อทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทุกไอโซเลตภายใต้สภาวะแบบต่อเนื่องในระบบจำลองทางเดินอาหารที่สภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อด้วยสภาวะที่มีน้ำดีไก่ freeze dry ความเข้มข้น 3% ของน้ำหนักแห้ง ที่พีเอช 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกไอโซเลตมีการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 59.4-69.9% แบคทีเรียแลกติกทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ phytase ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase อยู่ระหว่าง 5.3-40.6 U/min×ml ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไม่สามารถย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งได้

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) ของยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด (penicillin G, erythromycin, tetracycline และ chloramphenicol) โดยวิธี broth microdilution method พบว่า แบคทีเรียแลกติกทุกไอโซเลตมีค่า MIC ต่ำกว่า 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งบ่งบอกว่าทุกไอโซเลตมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบทุกชนิด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแลกติก *Lact. salivarius* L5-4 เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตมีผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เช่นเดียวกับการขึ้นรูปเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลามากกว่า 30 นาที ไม่มีผลต่ออัตราการเหลือรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และพบว่าแบคทีเรียแลกติก *Lact. salivarius* L5-4 มีอัตราการรอดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)ที่สภาวะกรดพีเอช 2.5 เมื่อเทียบกับเซลล์อิสระ หลังจากห่อหุ้มในสภาวะที่เหมาะสม (อัลจิเนตความเข้มข้น 2% แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1M และใช้ระยะเวลาในการห่อหุ้ม 30 นาที) และเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียแลกติกที่ถูกห่อหุ้มทดสอบการรอดชีวิตที่สภาวะกรด พบว่า จำนวนเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มลดลงเล็กน้อยเมื่อผ่านสภาวะกรดพีเอช 3 และ พีเอช 4 อย่างไรก็ตามการห่อหุ้มเซลล์ที่สภาวะดังกล่าวไม่สามารถป้องกันเซลล์ได้ในสภาวะที่พีเอช 2 และต่ำกว่า 2 หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ห่อหุ้มเก็บ

รักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง (29±1 องศาเซลเซียส) พบว่า หากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์แบคทีเรียแลกติกจะลดลงอย่างช้าๆ และมีจำนวนเชื้อเหลืออยู่ 10^8 CFU/g ซึ่งเป็นปริมาณต่ำสุดที่ยอมรับว่ามีประโยชน์ต่อร่างกายหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาเม็ดเจลที่อุณหภูมิห้อง ระดับปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลกติกจะลดลงอย่างรวดเร็วและเก็บรักษาได้เพียง 1 วัน หลังจากนั้นระดับจำนวนเชื้อโปรไบโอติกจะลดต่ำกว่า 10^8 CFU/g

Thesis Title	Evaluation of Primary Probiotic Properties and Microencapsulation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract
Author	Mr. Natthapat Sohsomboon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2011

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the primary probiotic properties of bacteriocin producing lactic acid bacteria (LAB) isolated from chicken intestinal tracts. All of nine strains lacked adhesion ability to mucin. The gastrointestinal transit tolerance of the nine bacteria was determined by exposing washed cell suspensions to simulated gastric juice (pH 2.5) containing 3 mg/ml pepsin at 41°C for 2 h, followed by 3% dry basis of freeze drying chicken bile at pH 8.0 containing 1 mg/ml pancreatin to mimic the gastrointestinal environment. These studies revealed that all strains are capable of surviving the passage through the gastrointestinal conditions. The survival rate was between 59.4-69.9%. All strains were able to degrade sodium phytate and exhibited phytase activity of 5.3 to 40.6 U/min×ml at 50ºC. However, no isolates showed the ability to digest protein, starch and lipid.

The minimal inhibitory concentration (MIC) of 4 common antibiotic substances (penicillin G, erythromycin, chloramphenicol and tetracycline) was measured by the broth microdilution method. All of the selected LAB were sensitive to all of tested antibiotics (MIC < 8 µg/ml).

Microencapsulation technique was developed to increase the efficacy of capsules in protecting the selected strain *Lact. salivarius* L5-4 under simulated gastric conditions. *Lact. salivarius* L5-4 was encapsulated in calcium alginate and tested for its survival in simulated gastric conditions. The viability of the cells in the microcapsules increased as alginate concentration increased. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the viability of encapsulated cells when the concentration of calcium chloride was increased. Hardening the capsule in calcium chloride solution for a longer time (0.5 h) had no effect on increasing the viability of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in a simulated gastric environment. There was a significant increase ($p < 0.05$) in viable cell counts compared to the free cells when *Lact. salivarius* L5-4 was encapsulated under the optimal encapsulation conditions; 2.0% (w/v) alginate and 30 min hardening in 0.1 M $CaCl_2$ and subjected to pH 2.5. The survival of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in acid conditions showed the decrease in some extent at pH 3.0 and

pH 4.0. However, there were no viable cells detected at pH 2.0 and below. Viability of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 was assessed during storage at 4^{o}C and room temperature (29±1ºC). The number of viable bacteria kept at 4^{o}C decreased slowly and was in an acceptable of the recommended to potentially obtain a health benefit (>10^{8}CFU/g), by the end of 7 days. On the other hand, the viability of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 reduced to 10^{8}cfu/g after 1 days when storage at room temperature.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัยและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภคมน จิตประเสริฐ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับการวิจัยเรื่องการยึดเกาะและให้เชื้อ *Lactobacillus platarum* 299V ใช้ในการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ ด้วยความเคารพและรักยิ่ง ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องที่รักและเป็นกำลังใจที่อบอุ่นในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านสำหรับกำลังใจและการช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ…….....	(8)
LIST OF TABLES ……..	(9)
LIST OF FIGURE……..…….	(10)
LIST OF ABBREVIATIONS…….....	(11)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง……...……...	1
บทตรวจเอกสาร……...……...	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย……...…….	34
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ อุปกรณ์……..…….....	35
วิธีการทดลอง……...……...	37
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)……...…….	46
การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ……**.....**	53
ปัจจัยที่มีผลต่อการห่อหุ้มเซลล์และการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน……...	55
การรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะการจำลองทางเดินอาหารไก่ในหลอดทดลอง……	60
การเก็บรักษาเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม……	62
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ……	65
เอกสารอ้างอิง……...	68
ภาคผนวก……..	84
ภาคผนวก ก……	85
ภาคผนวก ข……	88
ภาคผนวก ค……	90
ภาคผนวก ง…….	93
ประวัติผู้เขียน…….……...	95

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Positive and negative features of extrusion and emulsion techniques……	31
2.	Adhesion capability to mucin and cell hydrophobicity of seleced LAB……	48
3.	Survival rate of seleced lactic acid bacteria in the presence of 0.5% freeze dry chicken bile and pancreatin (1 mg/ml) at pH 8.0 (6 h) after sequential incubation in simulated gastric juice (2 h)…….....	50
4.	Phytate digestion capability and phytase activity of selected lactic acid bacteria….	52
5.	Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of antibiotics toward selected lactic acid bacteria……..	55
6.	Effect of alginate concentration on viability for encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in simulated gastric conditions (pH 2.5 for 2 h at 41^{o}C)……	57
7.	Effect of calcium chloride exposure on viability of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in simulated gastric conditions (pH 2.5 for 2 h at 41^{o}C)……	59
8.	Effect of hardening time of capsule in calcium chloride on viability of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in simulated gastric conditions (pH 2.5 for 2 h at 41^{o}C)……....	60
9.	Effect of pH on viability of *Lact. salivarius* L5-4 encapsulated with optimized condition in simulated gastric conditions (2 h at 41^{o}C)……	62

LIST OF FIGURE

Figure		Page
1.	Flow diagram of encapsulation of bacteria by the extrusion and emulsion techniques……	26
2.	Chemical structure of alginate…….	28
3.	Chemical structure of carrageenan……..	28
4.	Chemical structure of gellan gum……...	29
5.	Chemical structure of chitin……	30
6.	Zone of sodium phytate hydrolysis by isolated lactic acid bacteria. A) Positive control B) Negative control……	52
7.	Survival of encapsulated lactic acid bacteria strain L5-4 in alginate beads stored in 0.1% peptone containing 0.85%NaCl and 0.05% $CaCl_2$, at room temperature and $4^{o}C$……..…….	64

LIST OF ABBREVIATIONS

Acetobacter	:	*Acet.*
Aspergillus	:	*A.*
Bacillus	:	*B.*
Bifidobacterium	:	*Bi.*
Campylobacter	:	*Camp.*
Carnobacterium	:	*Ca.*
Citrobacter	:	*Ci.*
Clostidium	:	*Cl.*
Escherichia	:	*E.*
Enterobacter	:	*En.*
Enterococcus	:	*Ent.*
Klebsiella	:	*K.*
Lactobacillus	:	*Lact.*
Lactococcus	:	*L.*
Listeria	:	*Lis*
Morganella	:	*M*
Pasteurella	:	*Past.*
Pediococcus	:	*Ped.*
Proteus	:	*Pro.*
Pseudomonas	:	*Ps.*
Salmonella	:	*Salm.*
Shigella	:	*Sh.*
Sphingomonas	:	*Sp.*
Staphylococcus	:	*Staph.*
Streptococcus	:	*Strep.*
Streptomyces	:	*S.*
Vibrio	:	*V.*
Yersinia	:	*Y.*
Lactic acid bacteria	:	LAB

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยได้อย่างมหาศาล โดยเป็นสินค้าส่งออกไปยังประเทศต่างๆทั้งไก่ดิบ ไก่สดแช่แข็ง และเนื้อไก่แปรรูป โดยในปี พ.ศ. 2551 มูลค่าการส่งออกสินค้าจากไก่สูงถึง 50,000 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2550 กว่า 20% อย่างไรก็ตามพบว่า ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ของไทยประสบกับภาวะต้นทุนการเลี้ยงไก่สูงขึ้นจากราคาอาหารสัตว์ อาหารเสริม ค่าวัคซีนในการป้องกันโรค และปัจจัยทางด้านการขนส่งที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผู้ประกอบการขนาดกลางและขนาดเล็กจำเป็นต้องลดปริมาณการเลี้ยงให้น้อยลงทำให้ปริมาณไก่ในระบบลดลง 10-15% (สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมปศุสัตว์, 2552) ดังนั้นจึงได้มีการเร่งพัฒนาและหาวิธีการเพื่อลดต้นทุนการเลี้ยงไก่และเพิ่มผลผลิต รวมถึงเพิ่มมาตรฐานด้านความปลอดภัยของเนื้อไก่ให้สูงขึ้นเพื่อเป็นมาตรฐานสากลและยอมรับจากนานาชาติ โดยวิธีที่เคยนิยมใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตคือการใช้วัตถุเสริมอาหาร (food additive) เช่น สารเคมีและยาปฏิชีวนะ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิต้านทานของไก่ให้เพิ่มขึ้นเพื่อสนองให้ทันต่อความต้องการบริโภคเนื้อไก่ทั้งในและต่างประเทศ แต่ในระยะเวลากว่าสิบปีที่ผ่านมาพบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคที่เพิ่มขึ้น (Kastner *et al*., 2006) จึงได้มีการออกกฎหมายควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ จากปัญหาดังกล่าวผู้ผลิตไก่เนื้อจึงหาวิธีการใหม่ที่จะช่วยเพิ่มผลผลิตและลดปัญหาเชื้อก่อโรคในไก่ ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกใหม่อีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่มักพบในไก่ (Taheri *et al*., 2009)และช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ (Jin *et al*., 1998)

มีการนำแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อส่งเสริมให้คนและสัตว์มีสุขภาพดี โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีชีวิตจะสามารถเพิ่มจำนวนในลำไส้ใหญ่และให้ประโยชน์มากมายต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (host) โดยการรอดชีวิตของโปรไบโอติกขึ้นกับปัจจัยหลายปัจจัยทั้งภายในและภายนอกได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พีเอช สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเชื้อ ภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษาและกระบวนการแปรรูป (Ross *et al*., 2005) เป็นต้น อย่างไรก็ตามโปรไบโอติกที่มีการนำมาใช้ในอาหารสัตว์ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากปัญหาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์เม็ดซึ่งต้องใช้ความร้อนสูงในขั้นตอนการคลุกไอน้ำ

(coditioning) และการอัดเม็ด (pelleting) นอกจากนี้ปัญหาการลดลงของจำนวนโปรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษาก็มีผลต่อการใช้ประโยชน์จากโปรไบโอติกของสัตว์เช่นกัน สำหรับปริมาณโปรไบโอติกที่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อไก่มีปริมาณแนะนำเป็น 6 log CFU/g (Simon, 2005) ดังนั้นการปกป้องโปรไบโอติกจากความร้อนในกระบวนการผลิตและการควบคุมปริมาณโปรไบโอติกในอาหารไก่ระหว่างการเก็บรักษาจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือ การห่อหุ้มเซลล์ (encapsulation)

การห่อหุ้มเซลล์ (microencapsulation) จัดเป็นเทคโนโลยีในการปกป้องตัวเซลล์ไว้ในเม็ดเจล hydrocolloid ช่วยรักษาความคงตัวและรักษาระดับจำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์และระบบทางเดินอาหาร (Rao *et al*., 1989) hydrocolloid ที่ใช้ในการตรึงโปรไบโอติก เช่น chitosan, sodium alginate, carageenan, cellulose acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น

การวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกจากทางเดินอาหารของไก่และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมรวมถึงปัจจัยที่มีผลในการห่อหุ้มเซลล์ (microencapsulation) แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและเพิ่มการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารไก่

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่ตรวจพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก น้ำนม เนื้อสัตว์ พืชผักและในธัญพืช นอกจากนี้ยังพบได้ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จากการศึกษาพบว่าใน แต่ละส่วนของทางเดินอาหารไก่ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่งบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลายมีจำนวนของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม *Lactobacillus* สูงที่สุดคือ 10^{12}-10^{15} CFU/g (ธวัชชัย โพธิ์เสือง, 2547) โดยกลุ่มของแบคทีเรียแลกติกประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล (genus) *Lactobacillus, Lactococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactosphaera, Leuconostoc*, *Melissococcus, Oenococcus*, *Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ*Weissella* (Parada *et al*., 2007) นักจุลชีววิทยาบางท่านจัดแบคทีเรียในสกุล *Aerococcus, Microbacterium*, *Propionibacterium* และ*Bifidobacterium* ไว้ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกด้วยแม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติกก็ตาม (Carr *et al.*, 2002) แบคทีเรียแลกติกมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักทั้งในผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ พืชผัก และนม โดยนอกจากเชื้อจะมีบทบาทสำคัญในการแปรรูปอาหารหมักแล้ว แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้กลายเป็นกรดแลกติก มีผลทำให้มีสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนมาในอาหารจึงช่วยยืดอายุอาหารที่ง่ายต่อการเน่าเสีย นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น กรดอินทรีย์, ไดอะเซติล (diacetyl) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มีผลทำให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะของอาหารหมัก (Lasen *et al*., 1993; Brink *et al*., 1994) อีกทั้งกลุ่มแบคทีเรียแลกติกได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี ทั้งนี้ก็เพื่อการมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารอันเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการเป็นโปรไบโอติก ซึ่งมีความหมายถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการคงไว้หรือปรับสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Saarela *et al*., 2000)

แบคทีเรียแลกติกยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Brink *et al*., 1994; Pilet *et al*., 1994; Yang and Ray, 1994) หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซินนั้นๆ (Nettles and Barefoot, 1993; Kawai *et al*., 1994) แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันนอกจากจะมี

คุณสมบัติที่แตกต่างกันแล้ว ยังมีความสามารถในการยับยั้งหรือการทำลายที่ต่างกันอีกด้วย โดยแบคเทอริโอซินจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Hoover and Harlander, 1993) ตัวอย่างเช่น nisin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่นอกจากยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียงแล้ว ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Lis. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย มีการนำ nisin ในรูปผงที่ผลิตจาก *L. lactis* ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายประมาณ 48 ประเทศทั่วโลกในผลิตภัณฑ์ต่างๆ อาทิ ในผลิตภัณฑ์นม เนย และในอาหารกระป๋อง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในรูปของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตใส่ลงไปในอาหารโดยตรง เพื่อให้จุลินทรีย์ผลิตแบคเทอริโอซินผสมอยู่ในอาหารนั้น (O'Sullivan *et al*., 2002)

1.1 แบคทีเรียแลกติกที่มักพบในระบบทางเดินอาหารไก่

1.1.1 แบคทีเรียแลกติกสกุล *Enterococcus*

ลักษณะโดยทั่วไปของ *Enterococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เซลล์มีรูปร่างเหมือนไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้น ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 40°C บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudo-catalase) ได้และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค จีโนมของเชื้อในกลุ่มมี G+C เป็นองค์ประกอบประมาณ 37-40% (Devriese *et al*., 1993)

Enterococcus sp. ในอดีตเคยรู้จักใน group D streptococci จนกระทั่งปี ค.ศ.1984 จากการ ศึกษากรดนิวคลีอิกของเชื้อ จึงถูกจัดใหม่ให้อยู่ใน genus *Enterococcus* คำว่า *Enterococcus* มาจากคำภาษาฝรั่งเศส *enterocoque* ซึ่งบ่งบอกว่าเชื้อนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์และในสิ่งแวดล้อม มีมากกว่า 10 สายพันธุ์ *Enterococcus* ส่วนใหญ่แล้วไม่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร บางสายพันธุ์ เช่น *Ent. faecalis* เป็นเชื้อฉวยโอกาส จึงไม่นำมาใช้กับอาหารแต่ก็มีการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกและเป็นกล้าเชื้อในการหมักฟางเป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นแม่แบบของแบคทีเรียแลกติกในการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา เช่น ลักษณะของผนังเซลล์เป็นต้น (Axelsson, 1998) แต่ก็มีบางสายพันธุ์ เช่น *Ent. faecium* ได้มีการนำไปผลิตเป็นโปรไบโอติกเพื่อจำหน่ายทางการค้าเนื่องจากมีความสามารถทนต่อสภาวะรุนแรง (harsh condition) ในกระบวนการผลิตได้ดี (Fuller, 1989)

Strompfova และ Laukova (2007) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus* จากทางเดินอาหารไก่กระทง สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus* ได้ 17 สายพันธุ์ และพบว่า 5 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* EF55, *Ent. faecium* EF3S1, *Ent. faecium* EF2S3, *Ent. faecium*

EF2S1 และ *Ent. faecium* EFH31 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินและมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดี คือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Ent. avium* EA5, *Ent. casseliflavus* 20332, *Ent. durans* 5A, *Ent. faecalis* EE P4, *Ent. faecium* EF 43, *Lact. acidophilus* LA 99, *Lact. johnsonii* LJ 4982, *L. lactis* 96RS, *Micrococcus* sp. 4898, *Staph. aureus* SA2, *S. lentus* SL 163, *S. xylosus* SX 310, *S. aureus* SA 105, *Strep. bovis* AO 24/85, *Strep. bovis* SB 357 และ *En. georgiviae* EG3 รวมถึงสามารถยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ ทนกรดและน้ำดีได้ดี

Shin และคณะ (2008) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารไก่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งสิ้น 291 สายพันธุ์ พบว่า 3 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* SH 528, *Ent. faecium* SH 632 และ *Ped. pentosaceus* SH740 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินและมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดี คือยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Cl. perfringens* และ *Lis. monocytogenes* และทนต่อกรดและน้ำดีได้

1.1.2 แบคทีเรียแลกติกสกุล *Lactobacillus*

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ส่วนมากจะเป็นแท่งยาวต่อกันเป็นสายไม่สร้างสปอร์ มีทั้งที่เป็น homofermentative และ heterofermentative เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสเทียม ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ กรดนิวคลีอิก วิตามิน เกลือ กรดไขมัน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 2-53 °C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40°C พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-6.2 มีเปอร์เซนต์ G+C สูงคือประมาณ 32-53% (Hammes and Vogel, 1995)

Mojgani และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติก 75 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก คือ ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค การทนกรดและน้ำดี พบมีเพียง 3 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดี เมื่อนำทั้ง 3 ไอโซเลต ไปเทียบเคียงสายพันธุ์ พบว่าทั้งหมดเป็น *Lactobacillus* คือ *Lact. acidophilus* RNL 26, *Lact. fermentum* RNL 44 และ *Lact. salivarius* RNL 49

1.1.3 แบคทีเรียแลกติกสกุล *Streptococcus*

Streptococcus เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน มักจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (homofermentative) เจริญที่อุณหภูมิ 20-42°C ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ (species) มีหลายสปีชีส์ที่เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางสปีชีส์ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-46% (Hardie and Whiley, 1995)

Conllins และคณะ (2002) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่ พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์ พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* คือ *Strep. acidominimus*, *Strep. ovis* และ *Strep. suis*

1.1.4 แบคทีเรียแลกติกสกุล *Pediococcus*

Pediococcus เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวโดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางด้านขวามือของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศผลิตกรดแลกติกชนิด DL และ L (+) จากการหมักกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 25-40°C บางสปีชีส์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม และบางสปีชีส์เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ได้แก่ *Ped. acidilactici, Ped. damnosus, Ped. dextrinicus, Ped. inopinatus, Ped. parvulus, Ped. pentosaceus* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-44% (Simpson and Taguchi, 1995)

Torshizi และคณะ (2008) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติก 650 สายพันธุ์ นำแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *E. coli* และ *Salmonella* sp. พบว่ามี 3 สายพันธุ์ คือ TMU121, 094 และ 457 มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดีและสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อนำทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปเทียบเคียงสายพันธุ์ พบว่า เป็น *Ped. pentosaceous* TMU457, *Lact. rhamnosus* TMU094 และ *Lact. fermentum* TMU121

1.2 โปรไบโอติก (Probiotic)

โปรไบโอติกเป็นคำที่มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก-ลาติน หมายถึง เพื่อชีวิต (for life) ในปี ค.ศ. 1955 ได้เริ่มมีการนำเอาคำว่าโปรไบโอติกมาใช้เป็นครั้งแรกแต่ยังไม่มีใครให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกไว้อย่างชัดเจน ต่อมา Lilly และ Stillwell (1965) ได้ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกไว้เป็นคนแรกว่า โปรไบโอติก คือสารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและสารนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ คำจำกัดความของโปรไบโอติกที่นำมาใช้มากที่สุดเป็นของ Fuller (1989) ซึ่งได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โปรไบโอติก คือ อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิตส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่จุลินทรีย์นั้นเข้าไปอาศัยอยู่ โดยอาหารเสริมช่วยเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารของสัตว์

จุลินทรีย์โปรไบโอติกไม่จำเป็นต้องเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ (Fuller *et al*., 1989; Havenaar *et al*., 1992; Salminen *et al*., 1998) ดังนั้นจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถ

ส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก Bifidobacteria และยีสต์ (Fuller, 1992) โดยแบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกมากที่สุด แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารและส่งผลให้เกิดประโยชน์ในระบบนิเวศน์วิทยาของสัตว์ ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกจึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก (Holzapfel and Schillinger, 2002)

โปรไบโอติกประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิดซึ่งช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารและป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญ โดยเมื่อสัตว์ได้รับโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายจะผ่านกระเพาะอาหารและไปเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหารและมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อบุผนังลำไส้โดยเฉพาะผนังลำไส้เล็กทุกส่วนโดยแทรกตัวอยู่ที่ร่องผนังลำไส้ (villi) จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากทางเดินอาหาร (Karpinska *et al*., 2001) และการที่โปรไบโอติกแปลกปลอมนี้เองจึงสามารถดึงดูดให้แมคโครฟาร์จเดินทางมามาก จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้ดีขึ้น นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารซึ่งสามารถทำลายหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Mead, 2000) โดยสร้างสารเมทาบอไลท์ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษหรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539)

การคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการนำมาใช้ไม่มีข้อกำหนดตายตัว แต่มักจะเอาวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้เป็นข้อกำหนดหรือคัดเลือก ถ้าหากนำไปใช้ในอาหารควรมีเรื่องของความปลอดภัย การเหลือรอดในลำไส้ การยับยั้งเชื้อก่อโรค การคงทนต่อกระบวนการผลิตอาหาร อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกควรมีคุณสมบัติดังนี้

1.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกต้องได้รับการยอมรับแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized As Safe) ซึ่งจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ปลอดภัยต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้(Salminen *et al.,* 2000)

- แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องเป็นแหล่งที่มีความปลอดภัย เมื่อตรวจสอบสกุล (genus) และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในเบื้องต้นต้องพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย
- เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ
- จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่จะเป็นโปรไบโอติกต้องมีความสัมพันธ์เกื้อกูลหรือเป็นสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์เจ้าบ้าน

1.2.2 สามารถทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน รวมทั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องเดินทางผ่านและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่บริโภคโปรไบโอติก สภาวะแวดล้อมแรกที่ส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกคือสภาวะแวดล้อมในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูง

(Lankaputhra and Shah, 1995) และการหลั่งน้ำดีในลำไส้เล็กสามารถทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไลปิดและกรดไขมัน ดังนั้นโปรไบโอติกจึงต้องสามารถทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดในทางเดินอาหารของสัตว์ได้ (Reuter, 2001)

1.2.3 สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านและแข่งขันการยึดติดกับจุลินทรีย์ก่อโรคการยึดติดของจุลินทรีย์กับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านเป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกนอกเหนือจากคุณสมบัติการทนต่อกรดและน้ำดีและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Mattila-Sandholm *et al*., 1999) เนื่องจากการยึดติดกับลำไส้ทำให้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในระบบทางเดินอาหารและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เจ้าบ้าน (Ouwehand *et al.,* 1999) ช่วยในการซ่อมแซมผนังทางเดินอาหารและต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (Reid and Burton, 2002)

1.2.4 มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้มาก

1.2.5 ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร

1.2.6 ป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรคและช่วยเพิ่มระดับของภูมิคุ้มกัน

- แบคทีเรียที่สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ เช่น *Lact. johnsonii* Lj1 และ *Bi. lactis* Bb12 ทำให้เพิ่มความสามารถในการกำจัด *E. coli* ด้วยกระบวนการ phagocyte ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Schiffrin *et al*., 1994) การยึดติดผนังลำไส้สัตว์เจ้าถิ่นของจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ โดยเนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และถัดมาจนเกือบถึงชั้นของกล้ามเนื้อ (Mardara, 1997) โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้โดยตัวโปรไบโอติกหรือชิ้นส่วนโปรไบโอติกหรือสารเมทาบอไลท์ที่โปรไบโอติกผลิตขึ้น เรียกสิ่งเหล่านี้ว่า เอนติเจน (antigen) เมื่อเอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวเป็น M-cells เรียกว่า follicle associated epithelium (FAE) ที่ต่อมน้ำเหลืองภายในลำไส้หรือ Payer's patches (Laissue *et al*., 1993) ซึ่ง M-cells สามารถรับเอนติเจนได้

- แบคทีเรียที่ไม่ยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าถิ่นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้โดยตรง เช่น เพิ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์ กระตุ้นการดูดซึมเอนติเจนของสัตว์และผลิตสารช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน เช่น อินเตอเฟอรอน (interferon) เป็นต้น (Ouwehand *et al*., 1999) โดยการทดลอง *in vitro* พบว่า การบริโภคแบคทีเรียแลกติกสามารถเพิ่มการหมุนเวียนของแอนติบอดี (antibody)ในร่างกาย เพิ่มกิจกรรมของมาโครฟาจ (macrophage) และเพิ่มจำนวน natural killer cells (NK-cells) (Perdigon *et al*., 2000) Payer's patche แทรกระหว่างเยื่อบุลำไส้ Villi FAE

1.2.7 มีความคงตัวสูง โดยเมื่อเซลล์อิสระของแบคทีเรียผ่านกระบวนการผลิตแล้วต้องสามารถที่จะมีชีวิตอยู่และเก็บรักษาได้นาน (Holzapfel *et al*., 1998)

1.2.8 ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสารอาหารบางชนิดได้ เช่น β-galactosidase เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ β-galactosidase ในคน โดยแบคทีเรียแลกติกจะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ β-galactosidase ในการช่วยย่อยน้ำตาลกาแลกโตสในน้ำนม (Marteau *et al*., 1997) ลดการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น β-glucuronidase และ azoreductase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่เร่งหรือกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง (Rowland *et al*., 1992)

Jin และคณะ (2000)ใช้ *Lact. acidophilus* เสริมในอาหารไก่กระทง 2 แบบคือ เสริม *Lact. acidophilus* อย่างเดียวในอาหาร และใช้เชื้อ *Lactobacillus* ผสมกัน 12 สายพันธุ์เสริมลงในอาหารไก่กระทง พบว่า หลังจากไก่กระทงกินอาหารที่เสริม *Lactobacillus* แล้วจะมีปริมาณของเอนไซม์ amylase ในลำไส้เล็กสูงขึ้น แต่เอนไซม์ proteolytic และ lypolytic คงที่ นอกจากนี้พบว่าไก่กระทงที่กินอาหารเสริมที่มี *Lactobacillus* ผสมกัน 12 สายพันธุ์ จะทำให้มีเอนไซม์ β-galactosidase และ β-glucuronidase ในมูลลดลง

1.2.9 ทนต่ออุณหภูมิสูง การผลิตโปรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการ spray-drying ผสมกับอาหารและส่วนประกอบต่างๆ เนื่องจากสะดวกในการเก็บรักษาและขนส่ง (Ross *et al*., 2005) ซึ่งในกระบวนการผลิตจะใช้อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำและตายทำให้ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกลดลง (Teixeira *et al*., 1995) ดังนั้นคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกจึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญปัจจัยหนึ่งของแบคทีเรียโปรไบโอติก (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

1.3 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเข้าไปอยู่ในเจ้าบ้าน เป็นอาหารเสริมที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านโดยจะช่วยในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Adhikari *et al*., 2000) ดังนั้นโปรไบโอติกจึงต้องมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ทดสอบกันมีดังนี้

1.3.1 ทดสอบการทนต่อกรด

ภายในกระเพาะอาหารจะมีสภาพเป็นกรดเนื่องจากการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกออกมาเพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพและง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่สัตว์หลั่งออกมาในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยโปรตีนคือเอนไซม์ pepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะกรดพีเอชอยู่ในช่วง 2-3 การทำงานร่วมกันของกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์นี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกทำให้แบคทีเรียไม่สามารถรอดชีวิตได้ (Johnson *et al*., 2006) การทดสอบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการจึงนิยมทดสอบ

โปรไบโอติกในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2-3 และมีเอนไซม์ pepsin ร่วมกัน ซึ่งระยะเวลาในการทดสอบจะขึ้นอยู่กับการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิตใด เมื่อเปรียบเทียบไก่กับมนุษย์และสัตว์จำพวกสุกรและโคแล้วทางเดินอาหารของไก่จะสั้นกว่า ดังนั้นระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารก็สั้นด้วย คือประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที (รุจา มาลัยพวง, 2544)

Mojgani และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติก 75 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไปทดสอบคุณสมบัติการการทนกรดที่พีเอช 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่าแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ทนกรดได้ในช่วงของพีเอช 4-5 มีเพียง 3 สายพันธุ์ คือ *Lact. acidophilus* RNL 26, *Lact. fermentum* RNL 44 และ *Lact. salivarius* RNL 49 ที่สามารถทนต่อสภาวะกรดที่พีเอช 3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยจำนวนเซลล์ลดลง 1-2 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/ml และสายพันธุ์ *Lact. fermentum* RNL 44 ทนต่อกรดได้ในช่วงพีเอชที่ต่ำกว่า 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลง 3 log CFU/ml

Shin และคณะ (2008) ศึกษาสมบัติการทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน 3 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* SH 528, *Ent. faecium* SH 632 และ *Ped. pentosaceus* SH 740 ที่สภาวะกรดพีเอช 2.0, 2.3, 2.5 และ 3.0 ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *Ent. faecium* SH 528 สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีกว่า 2 สายพันธุ์ โดยที่สภาวะกรดพีเอช 3.0 มีจำนวนเซลล์ลดลง 1-2 log CFU/ml และจำนวนเซลล์จะลดลง 4-5 log CFU/ml เมื่อทดสอบที่สภาวะกรดพีเอช 2.0 โดยทุกสายพันธุ์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/ml

Musikasang และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถในการทนกรดและเอนไซม์ pepsin ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทง 226 ไอโซเลต โดยทำการทดสอบในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin ที่ 41°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบมีเพียง 20 ไอโซเลต ทนต่อกรดและเอนไซม์ pepsin ได้ดี โดยจำนวนเซลล์ลดลง 1-2 log CFU/ml โดยทุกสายพันธุ์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/ml

Guo และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถในทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียแลกติก 15 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารสุกร โดยทำการทดสอบในสภาวะกรดพีเอช 3.0 และ 2.0 ที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียแลกติกเกือบทุกไอโซเลตไม่มีการลดลงของเซลล์ที่สภาวะกรดพีเอช 3.0 แต่เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทดสอบที่สภาวะกรดพีเอช 2.0 จำนวนเซลล์จะลดลง 4-5 log CFU/ml โดยทุกสายพันธุ์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/ml

โดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งประกอบด้วย peptidoglycan, teichoic acid และ churonic acid และมากกว่า 50% โดยน้ำหนักของผนังเซลล์คือ เปปติโดไกลแคนซึ่งเป็นสายพอลิเมอร์สายตรงของ disaccharide pentapeptide

ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดคือ N-acetylglucosamine (NAG) และ N-acetylmuramic acid (NAM) โดยมีกรดอะมิโน 4 กลุ่ม (tetrapeptide) เชื่อม NAG และ NAM เข้าด้วยกันด้วยพันธะเปปไทด์ทำให้เปปติโดไกลแคนมีโครงสร้างแบบร่างแหและมีผลึกโปรตีน (protein crytal) หรือ S-layer แทรกอยู่ ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเปปติโดไกลแคนหนาถึงประมาณ 20-80 นาโนเมตร (Firtel *et al*., 2004; Johnon *et al*., 2006) สำหรับผนังเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหารในสภาวะที่มีทั้งกรดและเอนไซม์ pepsin ซึ่งจะเข้าไปทำลายชั้นเปปติโดไกลแคนตรงตำแหน่งพันธะเปปไทด์ทำให้โครงสร้างแบบร่างแห NAG และ NAM แยกออกจากกัน เมื่อผนังเซลล์เสียหายแบคทีเรียจึงไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ ทั้งนี้ความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกอาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีการสัมผัสและทำปฏิกิริยากับกรดตลอดเวลา จึงทำให้แบคทีเรียแลกติกมีความทนต่อกรดได้ (Franz *et al*., 1999) นอกจากนี้การทนต่อกรดของแบคทีเรียยังเกี่ยวข้องกับโปรตีนกลุ่มหนึ่งคือ heat shock protein เป็นโปรตีนที่จะแสดงออก (expresssion) เมื่อเซลล์สัมผัสกับ heat shock factor เช่น ความร้อน กรดและสารเคมี เป็นต้น โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น methionine sulfoxine reductase, F1F0-ATPase เป็นต้น heat shock protein แบ่งได้เป็น 3 Family คือ Hsp60, Hsp70 และ Hsp90 ซึ่งในแต่ละ family จะประกอบด้วยโปรตีนอีกหลายชนิด เช่น F1F0-ATPase จัดอยู่ในกลุ่ม Hsp60 เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ adenosine triphosphate (ATP) กลายเป็น adenosine diphosphate (ADP) โดยเอนไซม์ ATPase จะทำหน้าที่ดึง phosphate ออกจาก ATP เป็น ADP โดยสามารถพบ heat shock protein ได้ในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์ ATPase จะถูกสร้างขึ้นโดยมีกรดเป็น heat shock factor แบ่งออกตามโครงสร้างได้ 5 ชนิด คือ F-ATPase, V-ATPase, A-ATPase, P-ATPase และ E-ATPase ซึ่งเอนไซม์ ATPase ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทนกรดของแบคทีเรียคือ F-ATPase เอนไซม์นี้เป็น transmembrane protein ที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ ATP โดยชักนำโปรตอน (proton) เช่น โซเดียมไอออน (Na^+) และ โปแตสเซียมไอออน (K^+) มาอยู่ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สภาวะที่ผิวเซลล์เป็นด่าง ดังนั้น เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด เช่น กระเพาะอาหาร แบคทีเรียก็จะสามารถอยู่รอดได้เนื่องจากเกิดสภาวะที่เป็นกลางบริเวณผนังเซลล์ (Schlesinger, 1990) สำหรับแบคทีเรียแลกติกมีหลายสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *Lact. acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999) *Lact. lactis* (Koebmann *et al*., 2000)

1.3.2 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

น้ำดีสังเคราะห์จากโคเลสเตอรอลโดยเซลล์ pericentral hepatocytes ของตับ มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอมเขียว โดยทั่วไปมีพีเอชอยู่ในช่วง 7.5-8.0 องค์ประกอบหลักของน้ำดีประกอบด้วย กรดน้ำดี (bile acids) โคเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) และสารสี biliverdin นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง Immunoglobulin A และ mucus เข้าสู่น้ำดีเพื่อช่วยในการ

ป้องกันการเจริญและเกาะติดของแบคทีเรียในลำไส้ น้ำดีที่สร้างแล้วจะถูกกักเก็บไว้ในถุงน้ำดี (gall bladder) และน้ำดี 80% ของถุงน้ำดีจะถูกปล่อยเข้าสู่ลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum เมื่อได้รับการกระตุ้นจากอาหารที่เดินทางมาถึง โดยอาหารเหล่านั้นจะกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน secretin และ cholecystokinin ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองนี้มีความสำคัญต่อการหลั่งและการไหลเวียนของน้ำดีในท่อน้ำดีและลำไส้ (Hofmann, 1999) หน้าที่หลักของน้ำดีคือทำให้ไขมันแตกตัวและเข้ากับน้ำได้ดีขึ้น น้ำดียังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร เนื่องจากเกลือน้ำดี (bile salt) ซึ่งเป็นกรดน้ำดีชนิดหนึ่งจะไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายโดยไปละลายไขมันในส่วนโครงสร้างฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ลดน้อยลงเป็นสาเหตุสำคัญให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแยกออกจากกัน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้มีผลมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารเป็นสำคัญ (Coleman *et al*., 1980) นอกจากเกลือน้ำดีภายในทางเดินอาหารส่วนท้ายยังมีเอนไซม์ pancreatin จากตับอ่อนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มด้วยกันคือ amylase, lipase และ protease ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสารอาหารแตกต่างกันออกไป และยังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายในทางเดินอาหารอีกด้วย การทดสอบการทนเกลือน้ำดีของโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการจึงนิยมทดสอบโปรไบโอติกในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนพีเอช 8 และมีเอนไซม์ pancreatin ร่วมกัน (Begley *et al*., 2005)

Lin และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของ *Lact. fermentum* 20 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารสัตว์ปีกและสุกรโดยทดสอบในสภาวะที่มีน้ำดี 3% พบว่ามี *Lact. fermentum* 6 สายพันธุ์ คือ PG1, PGM1, PL1, PLM1, SG2 และ SS1 ที่สามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 80% ของเชื้อเริ่มต้น 10 log CFU/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Musikasang และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทง โดยทำการทดสอบในสภาวะที่มีน้ำดีสดของไก่กระทงและมีเอนไซม์ pancreatin ที่สภาวะด่าง พีเอช 8.0 ที่ 41°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 20 ไอโซเลต จาก 103 ไอโซเลต สามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 7 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/ml

Raghavendra และ Halami (2009) ศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ ที่แยกจากไก่กระทง คือ *Ped. pentosaceus* CFR R38 และ *Ped. pentosaceus* CFR R35 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phytase โดยทดสอบแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 ที่สภาวะที่มีน้ำดี 0.3% พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ทนต่อสภาวะที่มีน้ำดีได้ โดยจำนวนเซลล์รอดชีวิตได้มากกว่า 80% ของเชื้อเริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Taheri และคณะ (2009) ศึกษาคุณสมบัติการทนต่อสภาวะน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะผนังลำไส้ 62 ไอโซเลต โดยศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดี 0.075, 0.15, 0.3 และ 1.0% ผสมอยู่ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้งหมดไม่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดีมากกว่า 0.3% แต่เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารที่มีน้ำดีต่ำกว่า 0.15%

ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียนั้นอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ bile salt hydrolases (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น โดย BSH สามารถย่อยกรดน้ำดีและทำลายความเป็นพิษของน้ำดี โดยการเข้าไปรวมตัว (conjugated) กับน้ำดี (Moser and Savage, 2001)

Hosseini และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของ *Ent. faecium* 4 สายพันธุ์ (*Ent. faecium* LHICA28-4, *Ent. faecium* LHICA 34-5, *Ent. faecium* LHICA 40-4, *Ent. faecium* LHICA 46) ซึ่งคัดแยกจากอาหารสัตว์ทางการค้า พบว่า ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถทนต่อสภาวะน้ำดีได้และเมื่อนำทั้ง 4 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยเกลือน้ำดี พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ได้เช่นกัน ซึ่งคือเหตุผลที่ทำให้ *Ent. faecium* 4 สายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะน้ำดีได้

Guo และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ของแบคทีเรียแลกติก 15 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารสุกร พบว่า ทุกไอโซเลตสามารถผลิต เอนไซม์ bile salt hydrolase และเมื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีได้เช่นกัน

1.3.3 ทดสอบการเกาะติดกับผนังลำไส้

คุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเป็นโปรไบโอติก คือ การยึดเกาะกับผนังลำไส้ โดยปกติเชื้อก่อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังลำไส้นอกจากโปรไบโอติกจะสามารถลดปริมาณการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคด้วยการการแย่งพื้นที่ในการจับกับผนังลำไส้ได้แล้ว ในบริเวณผนังลำไส้ที่มีการยึดเกาะนี้ก่อจะเกิดการก่อตัว (colonize) และเพิ่มจำนวนโปรไบโอติกขึ้นในบริเวณนี้ซึ่งจะส่งผลให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993) นอกจากนี้ยังไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เจ้าบ้าน (Ouwehand *et al*., 1999) ช่วยในการซ่อมแซมผนังทางเดินอาหารและต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (Reid and Burton, 2002)

Schillinger และคณะ (2005) ทดสอบการยึดเกาะผนังลำไส้ของ *Lactobacillus* sp. 18 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์นม โดยทดสอบการยึดเกาะกับ cell line ชนิด HT-29 MTX พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ใช้ทดสอบทุกสายพันธุ์สามารถยึดเกาะเซลล์ HT-29 ได้ดี โดยกลุ่มของ

Lact. acidophilus และ *Lact. casei* มีการยึดเกาะที่ดี มีค่าการยึดเกาะอยู่ในช่วง 20-40% ของเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/ml

Lin และคณะ (2007) ทดสอบกิจกรรมการยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้หมูและไก่ของ *Lact. fermentum* 20 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารสัตว์ปีกและสุกร พบว่า *Lact. fermentum* PG1, PG3, PS1, PSM1, PL1 และ PLM2 ซึ่งคัดแยกจากไก่สามารถยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของไก่ได้เท่านั้น นอกจากนี้ *Lact. fermentum* SGM1 ซึ่งแยกจากสุกรก็สามารถยึดเกาะเซลล์ผนังสุกรได้เท่านั้นเช่นกัน อย่างไรก็ตาม *Lact. fermentum* สายพันธุ์ PGM1, PGM2, PGM3 และ PLM1 ซึ่งคัดแยกจากไก่สามารถยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของไก่และสุกรได้ดี เช่นเดียวกับ *Lact. fermentum* SS1 ซึ่งแยกจากสุกรสามารถยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของไก่และสุกรได้เช่นกัน

Strompfova และ Laukova (2007) ทดสอบการยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้มนุษย์ สุกร และสุนัข ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่ จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถยึดเกาะเซลล์ของผนังลำไส้ของมนุษย์ สุกร และสุนัขได้ โดย *Enterococcus* ที่แยกได้สามารถยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ของสุนัขได้ดีที่สุดโดยมีค่าการยึดเกาะ 70-90%

Izquierdo และคณะ (2008) ทดสอบการยึดเกาะ mucin ของ *Bi. longum* 8 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอุจจาระมนุษย์และที่ใช้ทางการค้า พบว่า *Bi. longum* ทุกสายพันธุ์มีค่าการยึดเกาะ mucin ค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าการยึดเกาะแตกต่างกันออกไป โดย *Bi. longum* NCC 2705 ซึ่งแยกจากอุจจาระมนุษย์มีค่าการยึดเกาะเพียง 5.75% ของเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสูงกว่า *Bi. longum* ที่แยกได้จากแหล่งอื่นรวมถึงสายพันธุ์ที่ใช้ทางการค้า

1.3.4 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

โปรไบโอติกที่ดีจำเป็นต้องสามารถสร้างสารประกอบออกมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคซึ่งสารประกอบต่างๆที่โปรไบโอติกผลิตออกมานี้มีผลต่อแบคทีเรียได้ 2 ลักษณะคือ มีฤทธิ์ในยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) และฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal) (González *et al*., 2007) กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกอาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่ผลิตออกมาทำให้พีเอชในสภาวะแวดล้อมลดลงหรืออาจเกิดจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น แบคเทอริโอซิน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น

Shin และคณะ(2008) คัดแยกแบคทีเรียแลกติก 291 สายพันธุ์ จากทางเดินอาหารไก่ พบว่ามี 3 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* SH 528, *Ent. faecium* SH 632 และ *Ped. Pentosaceus* SH740 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Cl. Perfringens* และ *Lis. monocytogenes*

Musikasang และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระทง 20 ไอโซเลต พบแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคคือ *E. coli, Salmonella* sp. และ *Staph. aureus* ได้ดี อย่างไรก็ตามการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากกรดอินทรีย์

Hosseini และคณะ (2009) ศึกษาการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11040, *Ca. maltaromaticum, Lis. monocytogenes* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค ของ *Ent. faecium* 4 สายพันธุ์ โดย พบว่า *Ent. faecium* 4 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งหมดได้ ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากแบคเทอริโอซิน

Taheri และคณะ (2009) คัดแยกแบคทีเรียแลกติก 291 สายพันธุ์ จากทางเดินอาหารไก่ พบว่ามี 62 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *Salm.* Enteritidis, *Salm.* Typhimurium และ *E. coli* O78:K80 ได้ดี

Guo และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* O55, *Salm.* Typhimurium ST302 และ *Staph. aureus* ATCC 25923 ของแบคทีเรียแลกติก 15 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากทางเดินอาหารสุกร พบว่า มี 5 ไอโซเลต คือ A11-1, A2-3, B4-5, E4, G1-1, G3-4 และ G7-2 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกชนิดที่ทดสอบ ซึ่งเมื่อทำการทดสอบพบว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากอิทธิพลของแบคเทอริโอซิน

1.4 สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกอาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์หรืออาจเกิดจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น แบคเทอริโอซิน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (González *et al*., 2007) โดยรายละเอียดของสารที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นที่สำคัญมีดังนี้

1.4.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ กรดแลกติกและกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกเป็นตัวยับยั้งที่แรงที่สุดและมีช่วงของการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย (Ouwehand *et al*, 1999) ค่า pKa ของกรดอะซิติกสูงกว่ากรดแลกติก (4.75 และ 3.08 ตามลำดับ) (Narendranath *et al.*, 2001) การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salm.* Typhimurium ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity (Rubin, 1978) เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรด จึงทำให้เกิดการ

ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Salmond *et al.*, 1984) กรดอินทรีย์มีผลยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์โดยการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซลล์นั้นๆ (Fuller, 1989)

1.4.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2)

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง (Lindgren and Dobrogosz, 1990) และมีผลต่อเซลล์แบคทีเรียทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลิอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะรวมตัวกับ thiocyanate โดยเอนไซม์ lactoperoxidase เกิดเป็น hypothiocyanate ทำให้โครงสร้างเมมเบรนของแบคทีเรียถูกทำลาย (Banks *et al.*, 1986)

1.4.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide, CO_2)

ส่วนใหญ่คาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลกติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้วิถีเมตาบอลิซึมอื่นๆก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการ decarboxylation และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นสาเหตุให้เซลล์เมมเบรนมีคุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

1.4.4 ไดอะซิทิล (diacetyl)

ไดอะซิทิลเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้าง กรดแลกติก เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะในการผลิตนมหมักและมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยไดอะซิทิลที่มีความเข้มข้น 200 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียส่วนที่ความเข้มข้น 300 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลกติก ส่วนแบคทีเรียแลกติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 μg/ml (Helander *et al.*, 1997)

1.4.5 สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลางทนต่อความร้อน มีฤทธิ์ในการทำงานได้กว้างและละลายได้ในอะซิโตน เช่น reuterin ผลิตโดย *Lact. reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Ouwehand and Salminen, 1998) reuterin สามารถยับยั้งแบคทีเรีย รา โปรโตซัวและไวรัสได้ โดยจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ribonucleotide reductase ซึ่งสำคัญสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ DNA (Helander *et al.*, 1997)

1.4.6 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรม การดัดแปลงหลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม (post-translational modification) (Brink *et al*., 1994)

1.5 แบคเทอริโอซิน

คำนิยามของแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ สารประกอบโปรตีน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst and Vandamme, 1994) แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกมีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบ คือ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิด รวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีความต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลายโดยแบคเทอริโอซิน มีการกำหนดคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินไว้ 6 ข้อดังนี้

- แบคเทอริโอซินเป็นสารพวกโปรตีน ซึ่งถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน (Torodov and Dicks, 2005)
- แบคเทอริโอซินจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) และทำลายแบคทีเรีย (bactericidal) ได้ (Sobrino *et al*., 1991)
- แบคเทอริโอซินจะมีบริเวณจำเพาะในการจับกับแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ (Bhunia *et al*., 1991)
- ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่จะพบว่าอยู่บริเวณพลาสมิด (Hyronimus *et al*., 1998)
- แบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินเมื่อหลั่งแบคเทอริโอซินออกมานอกเซลล์จะทำให้เซลล์ตาย (Jack *et al*., 1995)
- แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น (Brink *et al*., 1994)

ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคทีเรียแลกติกมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคเทอริโอซินซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสายเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กและในบางครั้งอาจพบ

กรดอะมิโนที่ปกติไม่พบในโปรตีนทั่วไป เช่น dehydroalanine, dehydrobutyrine ดังที่พบในไนซิน (nisin) โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แบคเทอริโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียแลกติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ *Acetobacter, Bacillus, Brevibacterium, Clostridium, Erwinia, Haemophilus, Haloferax, Listeria, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Propionibacterium, Shigella, Staphylococcus* และ *Yersinia* (Montville and Kaiser, 1993)

Shin และคณะ (2008) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารไก่กระทง สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งสิ้น 291 สายพันธุ์ นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้มาทดสอบหาคุณสมบัติการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่ามี 3 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* SH 528, *Ent. faecium* SH 632 และ *Ped. pentosaceus* SH 740 สามารถยับยั้ง *Cl. perfringens* และ *Lis. monocytogenes* ได้ดี หลังจากนั้นนำสารยับยั้งที่ผลิตมาย่อยด้วยเอนไซม์ protease พบว่าไม่มีกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ และเมื่อนำสารที่ผลิตไปเทียบเคียงเพื่อหาชนิดของแบคเทอริโอซิน พบว่า *Ent. faecium* SH 528 ผลิต enterocin A และ B ส่วน *Ent. faecium* SH 632 ผลิต enterocin L50 และ P ในขณะที่ *Ped. pentosaceus* SH 740 ผลิต pediocin PA-1 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดี คือ ทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีได้ดี

Line และคณะ (2008) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากไก่ โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ NRRLB-30745 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้แบบ broad spectrum คือ สามารถยับยั้ง *Salm.* Enteritidis, *Salm.* Choleraesuis, *Salm.* Typhimurium, *Salm.* Gallinarum, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Ci. freundii*, *K. pneumoniae*, *Sh. dysenteriae*, *Ps. aeruginosa*, *Pro. mirabilis*, *M. morganii*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Lis. monocytogenes* และ *Camp. jejuni* หลังจากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ NRRCB-30745ไปเทียบเคียงสายพันธุ์ พบว่า เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus* และหาสารยับยั้งที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตพบว่าเป็น bacteriocin E-760

1.6 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซินโดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุล มวลโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติในการทนต่อความร้อน สามารถจัดแบ่งแบคเทอริโอซินออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1.6.1 กลุ่มแลนติไบโอติก (lantibiotic enterocins) เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydrobutyrine, dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β-methyl lanthionine เป็นแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลักคือ กลุ่มย่อย A หรือ subclass Ia ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาว ไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้คือ ไนซินอีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่มย่อย B หรือ subclass Ib มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุมีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้คือ mersacidin ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้

1.6.2 กลุ่ม nonlantibiotic peptides มีขนาดเล็กและทนความร้อน ทนความร้อนได้ดีตั้งแต่ 100-121°C เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโน lanthionine สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อยหรือ 3 subclass แต่ปัจจุบันพบมากมี 2 subclass คือ subclass IIa และ subclass IIb โดยทั้ง 3 กลุ่มย่อยมีรายละเอียดดังนี้

- กลุ่มย่อย 1 หรือ subclass IIa (pediocin-like หรือ *Listeria*-active) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* sp. ได้ดีจะถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่เป็นสายเปปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่จะถูกดัดแปลงโดยการตัดสายเปปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเปปไทด์ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย เช่น pediocin PA-1, sakacin A, leucocin A

- กลุ่มย่อย 2 หรือ subclass IIb (two-component bacteriocins) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน ถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มีกิจกรรมหรือมีกิจกรรมเหลือเล็กน้อยเท่านั้น เช่น lactococcins G และ F, lactacin F, plantaricin EF และ JK

- กลุ่มย่อย 3 หรือ subclass IIc (*sec*-dependent bacteriocins) เช่น aidocin B, divergicin A และ enterocin P

1.6.3 กลุ่ม cyclic enterocins เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 15 กิโลดาลตัน เช่น helveticins J และ V-1829, acidophilucin A, lactacins A และ B

1.6.4 กลุ่ม large proteins เป็นแบคเทอริโอซินที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต เช่น lactocin 27

1.7 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน กรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน (Jack *et al*., 1995) โดยแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lact. lactis* subsp. *lactis* เป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ (Sahl *et al*., 1995)

ในกรณีที่เป็นสปอร์ของแบคทีเรียพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอกออกมาและพบว่าไนซินที่ความเข้มข้นสูงๆสามารถยับยั้งการสร้างเปบติโดไกลแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *B. stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Klaenhammer, 1993)

ส่วนแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน เช่น pediocin PA-1 และ sakacin A พบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N-terminal ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งมีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C-terminal ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิลของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al*., 2000)

การยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซินนอกจากจะมีผลในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายแบบฆ่าทำลาย (bactericidal) แล้วยังอาจมีผลทำให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย ดังเช่นที่พบใน leuconocin S โดยแบคเทอริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ใน

ลักษณะใดนั้นขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน สภาพแวดล้อมรวมถึงชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (Sobrino *et al*., 1991)

1.8 การใช้ประโยชน์โปรไบโอติกในไก่

มีการนำโปรไบโอติกมาใช้ในอาหารสัตว์เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิต โดยปรับปรุงลักษณะที่ต้องการทางเศรษฐกิจ เช่น การเจริญเติบโต อัตราการใช้อาหาร (conversion rate) เนื่องจากโปรไบโอติกสามารถปรับปรุงสุขภาพของสัตว์โดยเฉพาะในสัตว์ที่ยังไม่โตเต็มวัยหรือยังเป็นสัตว์รุ่นๆ อยู่ ในปี 1993 สหภาพยุโรปได้มีการใช้โปรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้นซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ Council Directive 70/524/EEC on additive in animal nutrition (Becquet, 2003)

การใช้โปรไบโอติกในไก่นิยมใช้เพื่อเสริมการเจริญเติบโตและลดปริมาณของการใช้ยาปฏิชีวนะในไก่ Sabatková และคณะ (2008) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก BioPlus 2B ซึ่งประกอบ ด้วย *B. licheniformis* CH 200 และ *B. subtilis* CH 201 เปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะในไก่ พบว่า กลุ่มไก่ที่กินอาหารเสริมโปรไบโอติกที่มีอายุ 45 วัน จะมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างของกลุ่มไก่ที่ใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาเรื่องการสั่งห้ามนำเข้าไก่ที่ใช้ยาปฏิชีวนะของประเทศผู้นำเข้าและการยอมรับของผู้บริโภคการใช้โปรไบโอติกในไก่จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ การใช้โปรไบโอติกในไก่สามารถแบ่งตามวัตถุประสงค์การนำไปใช้ได้ดังนี้

1.8.1 การใช้โปรไบโอติกในไก่เพื่อป้องกันเชื้อก่อโรค

Hakkinen และ Schneitz (1999) ใช้โปรไบโอติก (Broilact) ซึ่งเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ทางการค้ากับลูกไก่อายุ 1 วัน หลังจากนั้นนำลูกไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกเมื่อมีอายุ 12 วันตรวจสอบ *Camp. jejuni* ซึ่งเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคต่อระบบทางเดินอาหารในไก่ พบว่า ลูกไก่อายุ 12 วัน ที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณ *Camp. jejuni* อยู่ในมูล 0-62% ในขณะที่ลูกไก่ที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกตรวจพบเชื้อ *Camp. jejuni* ในมูล 100% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pascual และคณะ (1999) ที่ใช้ *Lact. salivarius* CTC2197 เสริมในอาหารไก่ โดยวันแรกของการทดสอบตรวจพบ *Salm.* Enteritidis แต่หลังจากเสริมโปรไบโอติกให้ไก่กินเป็นเวลา 14 วัน ตรวจไม่พบเชื้อ *Salm.* Enteritidis

Kralik และ Milakovic (2004) ศึกษาอิทธิพลของการใช้โปรไบโอติกในไก่ โดยใช้ *Ent. faecium* M-74 ซึ่งเป็นโปรไบโอติกที่มีจำหน่ายทางการค้าเติมลงในน้ำดื่ม 3 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร พบว่าไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกจะมีปริมาณของ *Staph. aureus*, *Ent. faecalis* และตระกูล Enterobacteriaceae ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม

1.8.2 การใช้โปรไบโอติกเพื่อเร่งการเจริญเติบโต

การใช้โปรไบโอติกทางการค้าละลายน้ำให้ไก่กินในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ทุกวัน ทำให้ไก่กระทงมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวันและอัตราการแลกเนื้อดีขึ้นเมื่อเทียบกับไก่กระทงที่ไม่ได้ให้โปรไบโอติก ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อไก่กระทงมีอายุ 45 วัน (ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ, 2547)

Jin และคณะ (1998) ศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่กระทง โดยการเสริมแบคทีเรีย *Lact. acidophilus* I26 ชนิดเดียวและเสริมแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จำนวน 12 สายพันธุ์ คือ *Lact. acidophilus* 2 สายพันธุ์ *Lact. fermentum* 3 สายพันธุ์ *Lact. crispatus* 1 สายพันธุ์ และ *Lact. brevis* 6 สายพันธุ์ ในอาหารไก่ พบว่า ไก่ที่ได้รับอาหารที่เสริมโปรไบโอติกทั้ง 2 แบบ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าไก่ที่ได้รับอาหารธรรมดาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไก่ที่ได้รับอาหารเสริมแบคทีเรีย *Lact. acidophilus* I26 และกลุ่มของ *Lactobacillus* มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเท่ากับ 2.17 และ 2.02 ตามลำดับ ในขณะที่ไก่ในชุดควบคุมมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 2.27 นอกจากนี้ไก่ที่ได้รับอาหารเสริมแบคทีเรียกลุ่มของ *Lactobacillus* มีอัตราการตายเพียง 3.3% ไก่ที่ได้รับอาหารเสริมแบคทีเรีย *Lact. acidophilus* I26 มีอัตราการตาย 6.7% ส่วนไก่ในชุดควบคุมมีอัตราการตายสูง 8.3%

1.8.3 การใช้โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตในไก่ไข่

Panda และคณะ (2003) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก (Probiolac) ซึ่งเป็นโปรไบโอติกทางการค้า ซึ่งประกอบด้วย *Lact. acidophilus, Lact. casei, Bi. bifidum, A. oryzae, Strep. faceium* และ *Torulopsis* spp. ในอาหารไก่ไข่พันธุ์ White Leghorn ที่อัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารไก่ 1 กิโลกรัม พบว่า ผลผลิตไข่ น้ำหนักไข่ ความหนาของเปลือกไข่ และความเข้มข้นของแคลเซียมในซีรั่มเพิ่มขึ้นและสามารถลดปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรั่มได้อย่างมีนัยสำคัญ

Kurtoglu และคณะ (2004) เสริมโปรไบโอติกที่ใช้ทางการค้าในไก่ไข่พันธุ์ Brown-Nick โดยเสริมลงไปในอาหารปริมาณ 0, 250, 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของอาหารไก่เป็นเวลา 90 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกที่ระดับ 250, 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลผลิตไข่เพิ่มขึ้นและลดความเสียหายของไข่ได้อย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งยังสามารถลดปริมาณของโคเลสเตอรอลในไข่แดงและในซีรั่มอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการทดลองของ Kalavathy และคณะ (2003) ที่ทำการทดลองเสริม *Lactobacillus* ในไก่ไข่พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารในระยะก่อนให้ไข่ สามารถเพิ่มน้ำหนักไข่และยังมีผลต่อการเพิ่มขนาดของไข่ตลอดระยะการให้ไข่

1.9 เอนไซม์ phytase และการใช้ประโยชน์เอนไซม์ phytase ในไก่

เอนไซม์ phytase เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้เติมลงไปในอาหารสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเอนไซม์ phytase มีความสามารถในการย่อยไฟเตต (myo-inositol hexakisphosphate) ซึ่งเป็นแหล่งเก็บสะสมฟอสฟอรัสที่สำคัญในเมล็ดพืชและธัญพืชซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญในอาหารสัตว์ โดยปกติสัตว์ไม่สามารถย่อยไฟเตตได้ ทำให้ฟอสฟอรัสที่ถูกเก็บสะสมไม่ถูกปลดปล่อยออกมาให้อยู่ในรูปของฟอสฟอรัสอิสระซึ่งเป็นรูปแบบที่สัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Ravindran *et al*., 2001) จากโครงสร้างของไฟเตตที่ประกอบด้วยกลุ่มฟอสเฟตจำนวนมาก ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต (chelating agent) ทำให้ไฟเตตสามารถจับกับสารที่มีประจุสองบวก (divalent cation) เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กและสังกะสีได้ดี จากคุณสมบัติของไฟเตตดังกล่าวจึงมีผลกระทบต่อการดูดซึมและนำแร่ธาตุไปใช้ นอกจากนี้ยังเชื่อว่าไฟเตตขัดขวางการใช้ประโยชน์ของแร่ธาตุอื่น เช่น ทองแดง แมงกานีส โมลิบดินัม และโคบอลท์ นอกจากไฟเตตจะขัดขวางการใช้ประโยชน์ได้ของแร่ธาตุประจุบวกหลายชนิดแล้ว ยังมีรายงานว่าไฟเตตสามารถเข้าจับกับโปรตีน โดยเมื่อมีค่าพีเอชต่ำโปรตีนซึ่งมีประจุบวกจะจับกับประจุลบของไฟเตตทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อมีค่าพีเอชสูงขึ้นโปรตีนจะกลายเป็นประจุลบ และเมื่อมีแร่ธาตุที่มีประจุบวก เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม หรือสังกะสี มาเป็นตัวเชื่อมประจุลบของโปรตีนและไฟเตตเข้าด้วยกัน ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนรูปไปจึงทำให้การละลาย การย่อยและการใช้ประโยชน์ของโปรตีนลดลง (Yi *et al*., 1996) ไฟเตตสามารถยับยั้งการทำงานของ proteolytic enzyme เช่น เปปซิน โปรติเอส นอกจากนี้ไฟเตตยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสและไลเปส เนื่องจากแคลเซียมจำเป็นสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ เมื่อแคลเซียมจับกับไฟเตตเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำจึงส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ด้วย ทำให้การใช้ประโยชน์ของอาหารประเภทแป้งและไขมันลดลง (Shelton *et al*., 2004) เอนไซม์ phytase มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยและปลดปล่อยออร์โธฟอสเฟต (ortho-phosphate) จากโมเลกุลไฟเตต ทำให้ได้สารตัวกลางคือ inositol-penta-phosphate (IP_5) และถูกสลายต่อไปได้สารตัวกลางที่มีฟอสเฟตลดลงคือ IP_4 IP_3 IP_2 และ IP_1 ตามลำดับ จนในที่สุดจะได้อิโนซิทอลอิสระและฟอสเฟตทั้งหมด 6 โมเลกุล เอนไซม์ phytase สามารถย่อยสลายไฟเตตหรือกรดไฟติกและปลดปล่อยอิโนซิทอลอิสระ (inositol) เมื่อไฟเตตถูกสลายด้วยเอนไซม์ phytase ส่งผลให้เซลล์ใช้ฟอสฟอรัสและแร่ธาตุได้เพิ่มขึ้น ซึ่งฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่พบอยู่ภายในเซลล์ทุกเซลล์ (Liu *et al*., 1998)

Huff และคณะ (1998) ศึกษาการเสริมเอนไซม์ phytase (500 U/kg) ในอาหารไก่กระทงซึ่งมีข้าวโพดที่มีฟอสฟอรัสสูงเป็นองค์ประกอบหลัก โดยเทียบกับไก่กระทงที่ให้อาหารปกติที่ไม่เสริมเอนไซม์เป็นตัวอย่างควบคุม ซึ่งจากการเลี้ยงไก่กระทงด้วยอาหารทั้ง 2 ชนิด เป็นเวลา 49

วัน พบว่า ไก่กระทงที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ phytase มีน้ำหนักตัวสูงกว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุมในระยะเวลาการเลี้ยง 49 วัน อย่างมีนัยสำคัญ

Ravindran และคณะ (2001) เสริมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ phytase (Natuphos 5000) ที่ใช้ทางการค้าในไก่ โดยเสริมลงในอาหารไก่ที่มีธัญพืชเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ได้เสริมกรดอะมิโน (lysine, methionine, cysteine) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของไก่ โดยใช้ไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกันแต่ไม่เสริมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ phytase เป็นตัวอย่างควบคุม พบว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ phytase จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างอาหารที่เสริมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ phytase มาตรวจสอบค่าทางเคมี พบว่า ในอาหารจะมีปริมาณของฟอสฟอรัสอิสระสูงขึ้นและมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ phytase สามารถเพิ่มการปลดปล่อยฟอสฟอรัสอิสระและลดการจับกันระหว่าง phytate และ กรดอะมิโน ทำให้สามารถนำไปใช้และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มน้ำหนักไก่

Levic และคณะ (2006) ศึกษาการเสริมเอนไซม์ phytase (500 fyt/kg) ในอาหารไก่โดยเทียบกับไก่ที่ให้อาหารปกติที่ไม่เสริมเอนไซม์เป็นตัวอย่างควบคุม ซึ่งจากการเลี้ยงไก่ด้วยอาหารทั้ง 2 ชนิด เป็นเวลา 42 วัน พบว่า ไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ phytase มีขนาดน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 2.0-18.7% เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้เมื่อนำมูลของไก่ทั้ง 2 กลุ่มมาตรวจสอบทางเคมี พบว่า มูลไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ phytase มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำกว่าไก่ในชุดควบคุม โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่ลดลงในมูลไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ phytase เกิดจากเอนไซม์ phytase ช่วยปลดปล่อยฟอสฟอรัสอิสระในอาหารไก่และไก่สามารถนำฟอสฟอรัสอิสระไปใช้ประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต

2. การห่อหุ้มโปรไบโอติกในเม็ดเจล

การทำ microencapsulation จัดเป็นเทคโนโลยีในการปกป้องตัวเซลล์ช่วยรักษาความคงตัวและรักษาระดับจำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์และระบบทางเดินอาหาร (Rao *et al*., 1989) เทคนิคการทำ microencapsulation มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ประโยชน์ เช่น spray drying, fluidized bed coating, pan coating และ freeze drying เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้เซลล์จะถูกปลดปล่อยแบบสมบูรณ์และสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงและเซลล์จะได้รับผลกระทบจากสภาวะที่รุนแรงเมื่อผ่านสภาวะระบบทางเดินอาหาร จึงทำให้วิธีการเหล่านี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมนำไปใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย สำหรับวิธีการที่นิยมปกป้องตัวเซลล์จากสภาวะรุนแรงนิยมใช้การห่อหุ้มหรือตรึงเซลล์ไว้ใน hydrocolloid เนื่องจากสามารถปกป้องเซลล์ในสภาวะที่รุนแรงของกระเพาะอาหารได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับ hydrocolloid ที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ เช่น sodium alginate, carageenan, cellulose

acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น การห่อหุ้มเซลล์ในเม็ดเจลโดยทั่วไปนิยมทำกัน 2 วิธี คือ extrusion technique (droplet method) และ emulsion technique (two phase system) (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

Extrusion technique (droplet method) เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันโดยทั่วไปในการทำเม็ดเจลด้วย hydrocolloid วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เตรียมสารละลาย hydrocolloid แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมกัน ปล่อย suspension ของเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยดลงไปในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) (Figure 1) ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้และความสูงของการหยด suspension ของเซลล์ลงใน hardening solution วิธีการนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ วัสดุที่นิยมใช้ห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกได้แก่ อัลจิเนต ซึ่งการฟอร์มตัวเป็นเจลเกิดขึ้นจากเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในโซเดียมอัลจิเนต (suspension) ถูกหยดลงไปในสารละลาย hardening solution ซึ่งเป็นสารละลายที่มีค่าความแรงประจุบวกสูงกว่าแขน (binding sind) ของวัสดุแขวนลอย ส่วนใหญ่นิยมใช้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในรูปของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ หยดของ suspension จะฟอร์มตัวทันทีในรูปของโครงสร้างที่สานเป็นร่างแหสามมิติที่เชื่อมกันด้วยพันธะไอออนิกระหว่างแคลเซียมไอออนกับ binding sind ของพอลิเมอร์ การห่อหุ้มเซลล์จะให้ผลดีหรือไม่ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับตัวดักจับ (entrapped material) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการฟอร์มตัวเป็นเม็ดเจลโดยวิธีนี้ค่อนข้างใช้เวลานาน ทำให้การขยายการผลิตให้อยู่ในรูปอุตสาหกรรมทำได้ค่อนข้างยากเมื่อเทียบกับเทคนิคอิมัลชัน

Emulsion technique (two phase system) เทคนิคนี้ใช้การเติมเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในโซเดียมอัลจิเนต (suspension) ปริมาตรเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่า (conola oil) หรือน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจนอยู่ในรูปของอิมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) ซึ่งเฟสน้ำจะประกอบด้วยวัตถุดิบที่ใช้เคลือบเซลล์และตัวเซลล์โปรไบโอติกอยู่ในรูปของอนุภาคเม็ดเล็กๆภายในเฟสน้ำมัน จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) ลงไป ส่วนใหญ่จะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น hardening solution (Figure 1) ขนาดของเม็ดเจลจะถูกควบคุมโดยความเร็วในการกวน (agitation speed) และความหนืดของวัสดุพยุงที่ใช้ โดยแคปซูลที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร เทคนิคนี้เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์แบคทีเรียแลกติก (Krasaekoopt *et al.,* 2003)

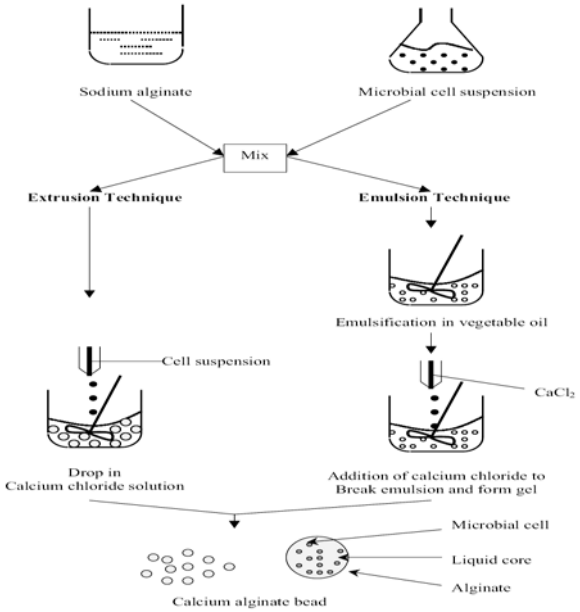


Figure 1. Flow diagram of encapsulation of bacteria by the extrusion and emulsion techniques.
ที่มา : Krasaekoopt และคณะ (2003)

เนื่องจากมีความนิยมในการเสริมโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ จึงได้มีการศึกษาจำนวนมากเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยการห่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นการป้องกันเซลล์จากสภาวะรุนแรงต่างๆ Chistopher และคณะ (2008) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lact. reuteri* และ *Bi. longum* ซึ่งห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและเคลือบผิวด้วย poly-L-lysine หลังจากผ่านสภาวะกรด 4 ชั่วโมง และน้ำดี 10 ชั่วโมง พบว่า *Lact. reuteri* และ *Bi. longum* ที่ห่อหุ้มไม่มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ลดลงที่สภาวะน้ำดี ในขณะที่สภาวะกรดพีเอช 3.0 และ 2.5 มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ลดลงเพียง 0.3-0.5 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10 log CFU/ml นอกจากนี้การศึกษาการทนต่อกรด เกลือน้ำดีและความร้อนของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lact. acidophilus* ATCC 43121 ซึ่งห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต พบว่าการห่อหุ้มเซลล์จะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะที่เป็นกรด เกลือน้ำดีและอุณหภูมิสูงได้เพิ่มขึ้น (Kim *et al*., 2008)

Muthukumarasamy และคณะ (2006) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lact. reuteri* ในเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มโดยวิธีที่ต่างกัน พบว่า *Lact. reuteri* ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตโดยวิธี extrusion technique มีจำนวนรอดชีวิต 7.78 log CFU/ml ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยวิธี emulsion technique ที่มีจำนวนรอดชีวิต 7.12 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.09 log CFU/ml เมื่อผ่านการบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารพีเอช 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Annan และคณะ (2008) ทดลองห่อหุ้ม *Bi. adolescentis* 15703T ด้วยโซเดียมอัลจิเนตและเคลือบเม็ดเจลด้วยเจลาตินโดยใช้ emulsion technique หลังจากนั้นศึกษาการรอดชีวิตของ

Bi. adolescentis 15703T ที่ถูกห่อหุ้ม ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง พีเอช 2.0 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *Bi. adolescentis* 15703T ที่ถูกห่อหุ้มและเคลือบผิวเม็ดเจลจะมีจำนวนเซลล์ลดลงเพียง 1.2 log CFU/ml ในขณะที่เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่ได้เคลือบผิวเจลจะมีจำนวนเซลล์ลดลง 2.6 log CFU/ml และเซลล์อิสระจะมีจำนวนเซลล์ลดลง 3.5 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 9.5 log CFU/ml ซึ่งการเคลือบผิวเม็ดเจลสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น

Musikasang และคณะ (2009) ทดสอบการรอดชีวิตของเป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Ent. durans* KT3L20 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตโดยใช้ extrusion technique และ emulsion technique พบว่า *Ent. durans* KT3L20 ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอิสระที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ภายหลังจากการบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหาร 2 ชั่วโมง และสภาวะลำไส้เล็ก 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย extrusion technique และ emulsion technique สูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรียอิสระ 5.8% และ 3.56% ตามลำดับ

Chávarri และคณะ (2010) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lact. gasseri* และ *Bi. bifidum* ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและเคลือบผิวเม็ดเจลด้วยไคโตซานโดยใช้ extrusion technique ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลอง พีเอช 2.0 อุณหภูมิ 37°C เวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มทั้ง 2 สายพันธุ์ มีจำนวนเซลล์ลดลงเพียง 1.3 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 7 log CFU/ml ในขณะที่เซลล์อิสระไม่สามารถตรวจพบจำนวนการเหลือรอดของเซลล์แบคทีเรีย โดย *Bi. bifidum* ที่ถูกห่อหุ้มสามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีกว่า *Lact. gasseri* เล็กน้อย

2.1 วัสดุห่อหุ้มที่นิยมใช้ในการทำ microencapsulation

วัสดุห่อหุ้มที่นิยมใช้ที่ใช้ในการห่อหุ้มโปรไบโอติก เช่น sodium alginate, carageenan, cellulose acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น

2.1.1 อัลจิเนต (alginate)

อัลจิเนตได้จากการสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลขนาดใหญ่ กรดอัลจินิก (alginic acid) เป็นพอลิเมอร์ของ anhydro β-D-mannuronic acid ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 และยังประกอบด้วย α-L-guluronic acid (Figure 2) มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 32,000-200,000 ดาลตัน อัลจิเนตมีสมบัติละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในสารละลายด่างทำให้ได้สารเหนียว อัลจิเนตสามารถเกิดเจลได้ในสภาวะที่มี Ca^{2+} หรือ Ca^{2+} ผสมกับกรด และเกิดเป็นเจล ตั้งแต่เจลเหลวถึงเจลแข็ง จึงสามารถใช้ห่อหุ้มเอนไซม์หรือเซลล์ได้ อัลจิเนตนิยมใช้ในรูปของเกลือโซเดียม

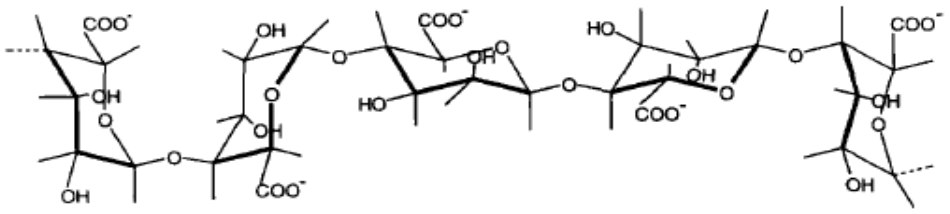


Figure 2. Chemical structure of alginate

ที่มา : Murano (1998)

Muthukumarasamy และ Holley (2007) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lact. reuteri* ATCC 55730 และ *Bi. longum* ATCC 15708 ที่ห่อหุ้มใน sodium alginate ความเข้มข้น 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 M เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับโปรไบโอติกอิสระในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอก พบว่า จำนวนของ *Lact. reuteri* อิสระลดลงจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 7.24 log CFU/g เป็น 4.66 log CFU/g และ *Bi. longum* อิสระลดลงจาก 7.31 log CFU/g เป็น 5.53 log CFU/g หลังจากการหมักไส้กรอกเป็นเวลา 27 วัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *Lact. reuteri* ร่วมกับ *Bi. longum* อิสระ พบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงเป็น 4.42 log CFU/g หลังจากการทำให้ไส้กรอกแห้งแต่โปรไบโอติกที่ทำการห่อหุ้มทุกชุดการทดลองมีจำนวนลดลงน้อยกว่า 0.92 log CFU/g หลังจากการหมักไส้กรอกเป็นเวลา 27 วัน

2.1.2 คาราจีแนน (carrageenan)

คาราจีแนนสกัดจากสาหร่ายสีแดงที่เรียกว่า Irish moses เป็นพอลิเมอร์ของกาแลคโตส (galactose) และ 3,6 anhydrogalactose (3,6-AG) (Figure 3) มีทั้งชนิดที่มีหมู่ซัลเฟต และไม่มีหมู่ซัลเฟตทำให้ได้คาราจีแนน 5 แบบคือ แคปปา (κ), แลมป์ดา (λ), ไอโอตา (ι), มิว (μ) และ นู (nu) แต่ที่สำคัญมี 3 ชนิดคือ แคปปา, แลมป์ดา และไอโอตา คาราจีแนนมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันไปตั้งแต่ 100,000 ถึง 800,000 ดาลตัน โดยทั่วไปนิยมใช้แคปปาคาราจีแนนในอาหารเป็น food additive และใช้อุณหภูมิ 60-80°C ในการละลายคาราจีแนนที่มีช่วงความเข้มข้น 2-5% และสามารถชักนำการเกิดเจลโดยการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง ชนิดที่จำหน่ายในเชิงการค้ามีชนิดแคปปา 60% และชนิดแลมป์ดา 40% พอลิเมอร์มีความคงตัวที่พีเอชสูงกว่า 7 แต่ที่พีเอชน้อยกว่า 5 จะเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว

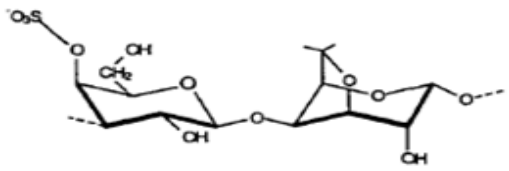


Figure 3. Chemical structure of carrageenan

ที่มา : Murano (1998)

Adhikari และคณะ (2000) เพิ่มการรอดชีวิตของ *Bi. longum* B6 และ *Bi. longum* ATCC 15708 ในโยเกิร์ตโดยใช้แคปปาคาราจีแนนห่อหุ้มด้วยการใช้เทคนิค emulsion พบว่า หลังจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน ตัวอย่างของโยเกิร์ตที่หุ้ม Bifidobacteria ด้วยแคปปาคาราจีแนน มีปริมาณเชื้อเหลือรอดสูงกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เซลล์อิสระ

2.1.3 Gellan gum

Gellan gum เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่ละลายได้ในน้ำ (Figure 4) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก กระบวนการหมักของเชื้อ *Ps. elodea* หรือ *Sp. elodea* เป็น hydrocolloid ที่ทำหน้าที่หลายอย่าง ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อให้เกิดเจล เนื้อสัมผัส ความคงตัว การเกิดสารแขวนลอย การเกิดฟิล์ม และโครงสร้างที่ต้องการ สามารถทำให้เกิดลักษณะของเนื้อสัมผัสที่หลากหลายตั้งแต่เป็นเจลเหลว เจลนุ่มและยืดหยุ่น จนถึงเจลแบบเปราะบาง ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ เช่น ขนมหวานจากน้ำตาล เจลลี่ ผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์จากผลไม้ เป็นต้น

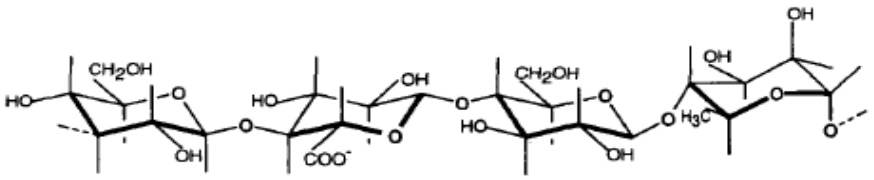


Figure 4. Chemical structure of gellan gum
ที่มา : Murano (1998)

Ding และ Shah (2009) ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกคือ *Lact. rhamnosus*, *Bi longum*, *Lact. salivarius*, *Lact. plantarum*, *Lact. acidophilus*, *Lact. paracasei*, *Bi. lactis* type Bl-04, *Bi. lactis* type B-07 ที่ห่อหุ้มด้วยวัสดุตัวพยุงต่างชนิดกันคือ alginate, guar gum, xanthan gum, locust bean gum, และ carrageenan gum โดยใช้ emulsion technique พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห่อหุ้มมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2 ที่ 37°C 2 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห้อหุ้มด้วยอัลจิเนต มีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกสูงสุด ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห้อหุ้มด้วย guar gum และ locust beangum มีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกต่ำสุด ซึ่งจะพบว่าการใช้ guar gum และ locust beangum ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการห่อหุ้มเชื้อแบคทีเรีย

2.1.4 ไคโตซาน (chitosan)

ไคโตซาน คือโมเลกุลพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีหมู่อะมิโน (NH_2) มาประกอบเรียกว่า Poly amino glucose หรือ Poly (D-glucosamine) สูตรโมเลกุล $[C_6H_{12}O_4N]n$ ไคโตซานเป็น

อนุพันธ์ (derivative) ชนิดหนึ่งของไคติน (Figure 5) ที่ได้จากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะเซทิล (CH_3CO) ของไคติน ด้วยสารละลายด่างเข้มข้น เรียกว่า ปฏิกิริยาดีอะเซทิเลชัน (deacetylation) ทำให้โครงสร้างของไคตินบางส่วนเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะหมู่ฟังก์ชันที่มีธาตุไนโตรเจน ในรูปของหมู่อะเซตามิโด ($NH\text{-}CO\text{-}CH_3$) เปลี่ยนไปเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (Krasaekoopt *et.,* 2003)

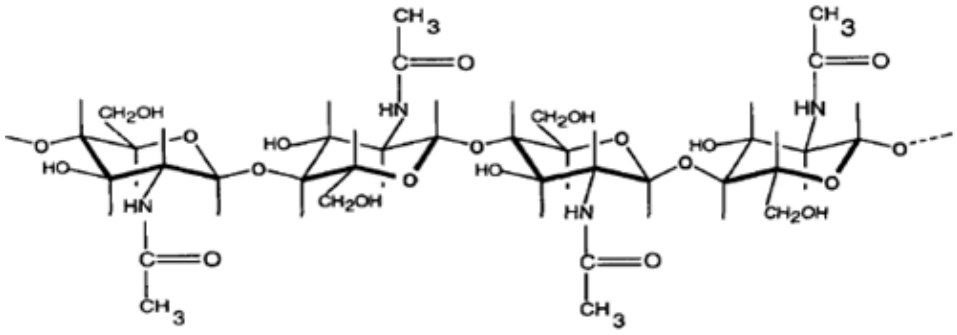


Figure 5. Chemical structure of chitin

ที่มา : Murano (1998)

ไคโตซานเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับอัลจิเนตและมีราคาต่ำกว่าการใช้อัลจิเนต อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าไคโตซานมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ด้วยเช่นกัน (Groboillot *et al*., 1993) จึงทำให้ไคโตซานไม่เป็นที่นิยมนำไปห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยตรงโดยทั่วไปไคโตซานนิยมนำไปใช้เพียงเคลือบผิวเม็ดเจลเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์เท่านั้น จากการศึกษาถึงการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus, Lact. casei* และ *Bi. bifidum* โดยนำเอาพอลิเมอร์ธรรมชาติหรือสารอย่างอื่นที่ได้จากธรรมชาติมาทำการเคลือบผิวเม็ดเจลภายนอก เช่น การเคลือบเม็ดเจลที่ห่อหุ้มจาก sodium alginate ด้วย chitosan, sodium alginate และ poly-L-lysine (PLL) พบว่า การเคลือบเม็ดเจลด้วยวัสดุต่างๆไม่มีผลต่อขนาดเม็ดเจลโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.89 มิลลิเมตร ส่วนเม็ดเจลที่ไม่มีการเคลือบมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.62 มิลลิเมตร และเมื่อบ่มเม็ดเจลทั้งหมดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียที่เคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซานมีการรอดชีวิตมากที่สุดเมื่อเทียบกับเม็ดเจลที่เคลือบด้วยวัสดุอื่น ๆ และเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการลดลง 1 log cycle ของเซลล์ (destructive value : *D*-value) การเคลือบเม็ดเจลสามารถเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้แบคทีเรียตายได้ และการเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซานมีค่า *D*-value สูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเจลที่เคลือบด้วยวัสดุอื่น ๆ (Krasaekoopt *et al*., 2004) อย่างไรก็ตามการเคลือบเม็ดเจลต้องคำนึงถึงการนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากต้นทุนในการห่อหุ้มเซลล์จะเพิ่มขึ้น และจากผลการศึกษาไคโตซานเป็นวัสดุที่มีความ

เหมาะสมมากที่สุดในการเคลือบเซลล์ เนื่องจากไคโตซานเป็นวัสดุที่สามารถผลิตได้ในประเทศไทย และราคาค่อนข้างต่ำ

2.2 ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้หลายปัจจัยด้วยกันคือ

2.2.1 วิธีการห่อหุ้ม

วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์แบ่งเป็น 2 วิธีคือ extrusion technique และ emulsion technique นอกจากขั้นตอนในการทำของทั้งสองวิธีจะต่างกันแล้วยังพบข้อดีและข้อด้อยในการตรึงเซลล์ของทั้งสองวิธีซึ่งแสดงดัง Table 1.

Table 1. Positive and negative features of extrusion and emulsion techniques.

	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 mm–2 mm

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

2.2.2 วัสดุห่อหุ้ม

วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น alginate, cellulose acetate phthalate, gum arabic เป็นต้น ซึ่งวัสดุห่อหุ้มที่แตกต่างกันก็จะมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ต่างกัน Ding และ Shah (2009) ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกคือ *Lact. rhamnosus*, *Bi. longum*, *Lact. salivarius*, *Lact. plantarum*, *Lact. acidophilus*, *Lact. paracasei*, *Bi. lactis* Bl-04 และ *Bi. lactis* B-07 ที่ห่อหุ้มด้วยวัสดุห่อหุ้มต่างชนิดกันคือ alginate, guar gum, xanthan gum, locust bean gum และ carrageenan gum โดยใช้ emulsion technique พบว่า แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห่อหุ้มมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระที่ไม่ถูกห่อหุ้มในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2 ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห้อหุ้มด้วยอัลจิเนต มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด ในขณะที่แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห้อหุ้มด้วย guar gum และ locust beangum มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด

2.2.3 ความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มที่ใช้

ระดับความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มมีผลต่อการรอดชีวิตแบคทีเรียโปรไบโอติกโดย Chandramouli และคณะ (2004) ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วย calcium alginate โดยให้ความเข้มข้นของอัลจิเนต ต่างกันคือ 0.75%, 1%, 1.5%, 1.8% และ 2% น้ำหนัก/ปริมาตร พบว่า เมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะเป็นกรดพีเอช 2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 จะสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นของอัลจิเนต

2.2.4 ขนาดของเม็ดเจล

จากการศึกษาความแตกต่างของขนาดเม็ดเจลต่อความสามารถในการรอดชีวิตของโปรไบโอติก พบว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตมีผลต่อขนาดของเม็ดเจล โดยถ้าอัลจิเนตมีความเข้มข้นสูงขึ้นเม็ดเจลจะมีขนาดเล็กลง จากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (2004) ที่ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วย calcium alginate โดยให้มีขนาดของเม็ดเจลที่ต่างกันคือ 200, 450, 1,000 μm พบว่าเมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา3 ชั่วโมงการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 จะสูงขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่ใหญ่ขึ้นโดยเม็ดเจลขนาด 1,000 μm มีการรอดสูงที่สุด รองลงมาคือเม็ดเจลขนาด 450 และ 200 μm ตามลำดับ

2.2.5 จำนวนเซลล์เริ่มต้น

จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในการห่อหุ้มเซลล์นั้นอาจขึ้นกับปัจจัยอื่นหลายข้อ เช่น ระยะเวลาในการเก็บรักษาเม็ดเจล เนื่องจากเมื่อระยะเวลาผ่านไปแบคทีเรียภายในเม็ดเจลจะมีการตายเพิ่มขึ้น หากคำนึงถึงจำนวนของแบคทีเรียที่อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการนำไปใช้เมื่อระยะเวลาผ่านไป ในการห่อหุ้มเซลล์เริ่มแรกจึงควรใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่สูง ๆ ปัจจัยอีกข้อที่ควรคำนึงถึงคือความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียเอง หากเป็นแบคทีเรียที่สามารถรอดชีวิตในสภาวะต่าง ๆ ได้น้อยแต่จำเป็นต้องใช้แบคทีเรียชนิดนั้นจึงควรใช้จำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นในปริมาณที่สูงด้วยเช่นกัน

Chandramouli และคณะ (2004) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นต่างกันคือ 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/ml พบว่าเมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2 อุณหภมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง การรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml มีจำนวนเซลล์ลดลงหลังจากบ่มที่กรดพีเอช 2.0 เวลา 3 ชั่วโมง เป็น 10^6 CFU/ml ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในขณะที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^7 และ 10^8 CFU/ml มีจำนวนเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองต่ำเกินไปคือที่ 10^5 CFU/ml

2.2.6 เวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ช่วยในการแข็งตัวหรือการขึ้นรูปเม็ดเจล จากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (2004) ทดลองแช่เม็ดเจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1 M เป็นเวลา 5 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง เมื่อศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C แบคทีเรียในเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 M เวลา 30 นาทีหรือมากกว่า 30 นาที มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 5 นาทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

2.2.7 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

สายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการห่อหุ้มเซลล์ Krasaekoopt และคณะ (2004) เปรียบเทียบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก 3 สายพันธุ์คือ *Lact. acidophilus* 547, *Bi. bifidum* ATCC 1994 และ *Lact. casei* 01 ที่ผ่านการห่อหุ้มโดยใช้วัสดุห่อหุ้มต่างชนิดกันคือ chitosan, sodium alginate และ poly-L-lysine หลังจากบ่มที่สภาวะกรดพีเอช 1.55 และสภาวะที่มีน้ำดีร้อยละ 0.6 ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *Lact. acidophilus* 547 และ *Lact. casei* 01 ที่หุ่อหุ้มด้วยมีการรอดไคโตซานชีวิตได้สูงสุดในทั้งสองสภาวะ ในขณะที่ไม่พบการรอดชีวิตของ *Bi. bifidum* ATCC 1994 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ มีการรอดชีวิตแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์นั้น ๆ

ดังนั้นก่อนการห่อหุ้มเซลล์จึงควรศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการห่อหุ้มทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตให้กับแบคทีเรียเพิ่มประโยชน์ในการนำไปใช้งานต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดีของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกจากทางเดินอาหารของไก่เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่
2. ศึกษาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกโปรไบโอติกที่มีความเหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายใต้สภาวะกรดโดยวิธี Extrusion
4. ศึกษาประสิทธิภาพการทนต่อกรดที่ระดับต่างๆและระยะเวลาการเก็บรักษาเซลล์โปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย

1.1 แบคทีเรียที่ประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

แบคทีเรียแลกติกที่นำมาศึกษาเป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน 9 ไอโซเลต โดยแยกจากส่วนต่างๆของทางเดินอาหารไก่ ดังนี้ *Lact. salivarius* CR5-1, CR5-15, CR6-3 และ *Lact. agilis* CR6-1 แยกได้จากกระเพาะพัก (crop) *Lact. salivarius* S6-10 แยกได้จากลำไส้เล็ก (small intestine) *Lact. salivarius* L5-4 และ *Lact. salivarius* L3-7 แยกได้จากลำไส้ใหญ่ (large intestine) และ *Lact. salivarius* CE5-10 และ *Lact. salivarius* CE5-3 แยกได้จากไส้ติ่ง (ceca) โดย *Lact. salivarius* CR5-1, CR5-15, L5-4, CR6-3 และ S6-10 มีกิจกรรมการยับยั้ง *Ent. faecalis, Lact. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 และ *Lis. monocytogenes* ส่วน *Lact. salivarius* L3-7 ยับยั้ง *Ent. faecalis* และ *Lact. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 ในขณะที่ *Lact. salivarius* CE5-10 ยับยั้ง *Lis. monocytogenes* ส่วน *Lact. salivarius* CE5-3 และ *Lact. agilis* CR6-1ยับยั้ง *Lact. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 ซึ่งทั้งหมดคัดแยกโดยนางสาวหทัยรัตน์ มุสิกสังข์ นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.2 แบคทีเรียที่ใช้เป็น positive control การทดสอบการยึดเกาะ mucin

Lact. plantarum 299V ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารมนุษย์และใช้เป็นโปรไบโอติกทางการค้าได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

MRS broth (de Man Rogosa and Sharpe) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

3. สารเคมี

3.1 Bromocresol purple ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2 Bovine serum albumin (BSA) บริษัท Sigma, France

3.3 Partially purified type III porcine gastric mucin บริษัท Sigma, France

3.4 L-cysteine จากบริษัท Fluka Biochemika, Japan

3.5 Skim milk จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

3.6 Triton X-100 (Sigma) บริษัท Amesco, USA

3.7 Soluble starch ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.8 โซเดียมอัลจิเนต บริษัท Fluka, USA.

3.9 โซเดียมคลอไรด์ บริษัท HiMedia Lab scan, Thailand

3.10 เปปโทน บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India

3.11 แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท HiMedia Lab scan, Thailand

3.12 กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany

3.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany

3.14 โซเดียมไฟเตต บริษัท HiMedia Lab scan, Thailand

3.15 Ammonium molybdate บริษัท Fluka, USA.

3.16 Ammonium meta vanadate บริษัท Fluka, USA.

3.17 3-(N-Mopholino) propanesulfonic acid บริษัท Fluka, USA.

3.18 Tris-HCl บริษัท Merck, Germany

3.19 Cobalt Choride บริษัท Merck, Germany

3.20 $NaH_2PO_42H_2O$ บริษัท Merck, Germany

3.21 $Na_2HPO_47H_2O$ บริษัท Merck, Germany

3.22 กลีเซอรอล ยี่ห้อ AnalaR® บริษัท VWR International Ltd., England

3.23 น้ำมันปาล์ม ยี่ห้อ มรกต

3.24 น้ำดีไก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย

4. เอนไซม์

4.1 เอนไซม์ pancreatin บริษัท Sigma, Germany

4.2 เอนไซม์ pepsin บริษัท Fluka, USA.

5. ยาปฏิชีวนะ

5.1 penicillin G (13752) บริษัท Fluka, USA

5.2 tetracycline (87128) บริษัท Fluka, USA

5.3 chloramphenicol (C0378) บริษัท Sigma, Germany

5.4 erythromycin (45673) บริษัท Fluka, USA

6. อุปกรณ์และเครื่องมือ

6.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR20B

6.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Eppendorf Centrifuge รุ่น 5415R

6.3 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-120

6.4 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s

6.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A

6.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350

6.7 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212

6.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325

6.9 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044

6.10 เครื่องตีปั่น (stomacher) ยี่ห้อ Seward รุ่น stomacher® 400 Circulator

6.11 เครื่องโฮโมจิไนซ์ ยี่ห้อ Kika Labortechnik รุ่น T25 basic

6.12 Peristaltic pump ยี่ห้อ Perista semipump รุ่น SJ-1211

6.13 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ EYELA รุ่น SLI – 400

6.14 เข็มฉีดยาขนาด 24G

6.15 สายยางซิลิโคน

6.16 เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกเลี้ยงในอาหาร MRS broth โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินมา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณภูหมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 10% ลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 41ºC เวลา 12 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญเติบโตอยู่ในช่วง early stationary phase หลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาสมบัติต่างๆ ดังนี้

1.1 การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะ mucin

ละลาย mucin ด้วยสารละลาย 0.5M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดสารละลาย mucin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well polystyrene microtiter plate เพื่อตรึงสารละลาย mucin ลงใน well หลังจากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย mucin ที่อยู่ใน well ออก ล้าง well ที่มี mucin ตรึงอยู่ด้วยสารละลาย 0.5M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นเคลือบ well ที่ถูกตรึงด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้าง well ด้วยสารละลาย 0.5M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำไปทดสอบการยึดเกาะ โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน 9 ไอโซเลต ที่เลี้ยงใน MRS broth อุณหภูมิ 41ºC เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง (early stationary phase) โดยการทดลองนี้ใช้ *Lact. plantarum* 299V ที่เลี้ยงใน MRS broth อุณหภูมิ 37ºC เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง (early stationary phase) เป็น positive control

นำแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.5M ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำไปเจือจางด้วยสารละลาย 0.5M ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.1 ดูดสารแขวนลอยของเชื้อที่ปรับค่า OD เท่ากับ 0.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน well ที่เตรียมไว้ข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง well ด้วยสารละลาย 0.5M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 12 ครั้ง เพื่อชะเซลล์ที่ไม่มีกิจกรรมการยึดเกาะ mucin ออก ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีกิจกรรมการยึดเกาะ mucin ด้วยการดูดสารละลาย 0.05% Triton X 100 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน well นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจนับปริมาณเชื้อที่ยึดเกาะโดยวิธีการ drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีกิจกรรมการยึดเกาะโดยเทียบกับเชื้อที่เป็น positive control คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยึดเกาะกับ mucin ได้ใกล้เคียงกับเชื้อที่เป็น positive control หรือสามารถยึดเกาะกับ mucin ไม่ต่ำกว่า 2 log CFU/ml เมื่อเทียบกับ positive control นำไปทดลองในขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก Tallon *et al*., 2007) โดยคำนวณได้จากวิธีการดังนี้

$$\text{Adhesion (\%)} = (A/A_0) \times 100$$

เมื่อ A_0 = log number of free cells before adhesion to mucin per microtiter plate well (CFU/ml)

A = log number of free cells in mucin well after adhesion to mucin per microtiter plate well (CFU/ml)

1.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการทนต่อกรดและน้ำดีโดยการทดสอบต่อเนื่องกัน

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่เก็บในอาหาร MRS broth ที่มีกลีเซอรอล 30% มา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 10% ลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกันจากนั้นปิเปต culture broth 1 มิลลิลิตรลงใน eppendorf ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% สองครั้ง หลังจากนั้นแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ปรับพีเอชเป็น 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin อยู่ด้วย 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารแขวนลอยของเชื้อที่บ่มในสภาวะกรดครบ 2 ชั่วโมงมาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% สองครั้ง แล้วจึงเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำดีไก่ freeze dry ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของน้ำหนักแห้ง อยู่ด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิต่ออีกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาการรอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีจำนวนเซลล์เหลือรอดไม่ต่ำกว่า 7 log CFU/ml นำไปทดลองในขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก Madureira *et al*., 2005) โดยคำนวณการรอดชีวิตตามวิธีการดังนี้

$$\text{Log survival (\%)} = (N/N_0) \times 100$$

เมื่อ N = log number of viable cells survived (CFU/ml)

N_0 = log number of initial viable cell inoculated (CFU/ml)

1.3 การทดสอบความสามารถในการย่อย phytate

นำแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 เลี้ยงในอาหาร de Man Rogosa and Sharpe-3-(N-Mopholino) propanesulfonic acid (MRS-MOPS) (ภาคผนวก ก) ในอัตรา 5%

(ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2 ครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารและสภาวะเดิมจนเชื้ออยู่ในระยะ early stationary phase แล้วแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C ล้างเซลล์ด้วย 50 mM Tris-HCl pH 6.5 นำเซลล์ไปแขวนลอยใน 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 10^7-10^8 CFU/ml เตรียม MRS-MOPS agar ซึ่งใช้ sodium phytate เป็นซับสเตรทโดยละลาย sodium phytate ในน้ำกลั่นและฆ่าเชื้อด้วยการกรอง (0.45 µm) ก่อนนำมาใช้ นำเซลล์ที่แขวนลอยใน 0.85% NaCl ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวของอาหาร MRS-MOPS agar บ่มที่อุณหภูมิ 41ºC เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างโคโลนีที่เจริญบน MRS-MOPS agar ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เทน้ำออกแล้วเททับโคโลนีด้วยสารละลาย 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) cobalt choride ให้ท่วมผิวอาหาร บ่ม 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เท cobalt choride ออก แล้วเทสารลายผสม (เตรียมแล้วใช้เลย) 6.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ammonium molybdate และ 0.42% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ammonium meta vanadate ที่ผสมกันในอัตราส่วนเท่ากัน เทให้ท่วมผิวอาหาร บ่ม 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นวัดวงใสที่เกิดขึ้น (ดัดแปลงจาก Raghavendra and Halami, 2009) นำแบคทีเรียที่สร้างวงใสมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างวงใสมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ phytase โดยเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกในอาหาร de Man Rogosa and Sharpe-3-(N-Mopholino) propanesulfonic acid (MRS-MOPS) (ภาคผนวก ก) ในอัตรา 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2 ครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารและสภาวะเดิมจนเชื้ออยู่ในระยะ early stationary phase (12 ชั่วโมง) แล้วแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ล้างเซลล์ด้วย 50 mM Tris-HCl pH 6.5 นำเซลล์ไปแขวนลอยในสารละลาย 100 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.5) หลังจากนั้นนำเซลล์แขวลอยมา 250 µl ทำปฏิกิริยากับ 250 µl [100 mM sodium acetate–acetic acid buffer (pH 5.5) ที่มีโซเดียมไฟเตทเป็นซับสเตรทอยู่ 2 mM] บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) trichloroacetic acid solution (TCA) ปริมาตร 500 µl วัดการปลดปล่อย inorganic phosphate โดยเติม 750 µl ของสารละลายผสมระหว่าง 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ammonium molybdate ซึ่งละลายใน 5.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) sulphuric acid solution ผสมกับ 2.7% (ปริมาตร/ปริมาตร) ferrous sulphate นำไปวัดความเข้มแสงที่ 700 นาโนเมตร ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ phytase ได้ตามวิธีการภาคผนวก ค (ดัดแปลงจาก De Angelis *et al*., 2003) โดยกราฟมาตรฐานการปลดปล่อย inorganic phosphorous เตรียมได้จาก KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 1.0 ppm

โดย 1 unit ของเอนไซม์ phytase คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย 1 nmol inorganic phosphorous ต่อนาที ที่ 50°C

1.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่คัดเลือกซึ่งเก็บไว้ในกลีเซอรอลมา 0.1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41°C จนมีอายุครบ 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบ

- ทดสอบการย่อยโปรตีน : หยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ใช้ casein ความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ (ดัดแปลงจาก Michael and Pelezar, 1995)

- ทดสอบการย่อยไขมัน : หยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 1% น้ำมันปาล์ม นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ (ดัดแปลงจาก Michael and Pelezar, 1995)

- ทดสอบการย่อยแป้ง : หยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ใช้ soluble starch ความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้งโดยการวางเกล็ดไอโอดีนลงบนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ไอโอดีนระเหยไปสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (ดัดแปลงจาก Mitidieri *et al*., 2006) คัดเลือกไอโซเลตที่มีการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน MRS broth ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10% ลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน เจือจางยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด คือ penicillin G, tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วย MRS broth โดยใช้วิธีเจือจางแบบ two–fold serial dilutions ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 180 ไมโครลิตร ลงใน 96 well polystyrene microtiter plate โดยให้มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะดังนี้ penicillin G (β-lactum group, inhibitor of cell wall), tetracycline (inhibitors of protein synthesis) และ chloramphenicol (broad spectrum) อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ erythromycin (inhibitor of protein syntesis-Gram positive spectrum) ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะอยู่ในช่วง 2-2,560 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมได้ตามภาคผนวก ค) หลังจากนั้นปิเปตเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFU/ml มา 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well polystyrene microtiter plate แต่ละหลุม โดยปริมาตรรวมของสารละลายในระบบคือ 200 ไมโครลิตรและความเข้มข้นสุดท้ายของ

เชื้อเป็น 10^5 CFU/ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินได้โดยนำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินได้ โดยใช้ลูปแตะสารละลายใน 96 well polystyrene microtiter plate แต่ละหลุมที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อ จากนั้นนำมา steak ลงบนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 % แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินเจริญบนอาหาร MRS agar ภายหลังจากการบ่มถือเป็นค่า MBC

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกดีที่สุดจากการประเมินสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการห่อหุ้มเซลล์ และการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

ถ่ายเชื้อ *Lact. salivarius* L5-4 ซึ่งคัดเลือกจากคุณสมบัติการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีต่อเนื่องได้สูงและมีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ phytase รวมถึงความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะได้ เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10% ลงใน MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปหมุนหวี่ยง 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นและนำเซลล์ที่ไปศึกษาปัจจัยของการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ต่อไป

3.1 ผลของความเข้มข้นของอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

แขวนลอยเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 ที่เตรียมได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 6.9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที โดยสารแขวนลอยอัลจิเนตมีปริมาณเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 เป็น 9 log CFU/ml หยดสารแขวนลอยลงในสารละลายแคลซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1M โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G ความสูงของปลายเข็มฉีดยาและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 5 เซนติเมตร ควบคุมความเร็วในการหยดด้วย peristaltic pump ด้วยอัตราเร็วในการปล่อยเม็ดเจล 11 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเริ่มนับเวลา

ที่ทำให้เม็ดเจลแข็งตัวเมื่อเม็ดเจลหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนับต่อไปอีก 30 นาที จึงแยกเม็ดเจลโดยการกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5M 2 ครั้ง จากนั้นนำเม็ดเจลมาทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิต (Annan *et al*., 2008) โดย

- ทดสอบความสามารถในการทนต่อกรด

ชั่งเม็ดเจลมา 1 กรัมเติมลงในสารสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ปรับพีเอชเป็น 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin อยู่ด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การทดลองนี้ใช้เซลล์อิสระที่ไม่ห่อหุ้มเป็นตัวอย่างควบคุม ตรวจหาการรอดชีวิตของเซลล์ภายในเม็ดเจลหลังจากผ่านสภาวะกรดเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้นในเม็ดเจล โดยนำเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มที่สภาวะกรดมาโฮโมจิไนซ์ในสารละลาย 0.5M ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ที่ปรับพีเอชเป็น 7.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยใช้ vortex เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยของเซลล์ที่ได้ต่อแบบ ten-fold serial dilution และตรวจหาการรอดชีวิตโดยวิธีการ drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต คำนวณเปอร์เซนต์การรอดชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{Log survival (\%)} = (N/N_0) \times 100$$

เมื่อ N = log number of viable entrapped cells released after pass acid condition (CFU/g)

N_0 = log number of free cells added to the biopolymer mix during the production of the microspheres (CFU/g)

เลือกความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ให้การรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 สูงที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.2 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

แขวนลอยเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 ที่เตรียม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 พีเอช 6.9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที โดยมีปริมาณเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 สุดท้ายเป็น 9 log CFU/ml หยดสารแขวนลอยลงในสารละลาย

แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5M โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G ความสูงของปลายเข็มฉีดยาและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 5 เซนติเมตร ควบคุมความเร็วในการหยดด้วย peristaltic pump ด้วยอัตราเร็วในการปล่อยเม็ดเจล 11 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเริ่มนับเวลาที่ทำให้เม็ดเจลแข็งตัวเมื่อเม็ดเจลหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนับต่อไปอีก 30 นาที จึงแยกเม็ดเจลโดยการกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05M 2 ครั้ง จากนั้นนำเม็ดเจลมาทดสอบการรอดชีวิตตามวิธีการข้อ 3.1 เลือกความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ให้การรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 สูงที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

แขวนลอยเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 ที่เตรียมปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 พีเอช 6.9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 log CFU/ml แล้วหยดสารแขวนลอยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G ความสูงของปลายเข็มฉีดยาและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 5 เซนติเมตร ควบคุมความเร็วในการหยดด้วย peristaltic pump ด้วยอัตราเร็วในการปล่อยเม็ดเจล 11 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเริ่มนับเวลาที่ทำให้เม็ดเจลแข็งตัวเมื่อเม็ดเจลหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนับต่อไปอีก 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที แยกเม็ดเจลโดยการกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเปบโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 M 2 ครั้ง จากนั้นนำเม็ดเจลมาทดสอบการรอดชีวิตตามวิธีการข้อ 3.1 เลือกระยะเวลาที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ที่ให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินสูงที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

4. ศึกษาผลการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะการจำลองทางเดินอาหารไก่ในหลอดทดลอง

นำแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่ถูกห่อหุ้มตามวิธีการที่เหมาะสมจากข้อ 3 ไปทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะการจำลองของกระเพาะในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระ

นำเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มา 1 กรัม เติมลงในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % และปรับ

พีเอชต่างๆได้แก่ 1, 2, 2.5, 3 และ 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1N นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Conway *et al*., 1987; Charteris *et al*., 1998) จากนั้นนำไปหาปริมาณการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่เหลือในเม็ดเจล

โดยนำเม็ดเจลที่ผ่านการบ่มที่สภาวะกรดมา 1 กรัม โซโมจิไนซ์ในสารละลาย 0.5M ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ที่ปรับพีเอชเป็น 7.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยใช้ vortex เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยของเซลล์ที่ได้ต่อแบบ ten-fold serial dilution และตรวจหาการรอดชีวิตโดยวิธีการ drop plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต คำนวณเปอร์เซนต์การรอดชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{Log survival (\%)} = (N/N_0) \times 100$$

เมื่อ N = log number of viable entrapped cells released after pass acid condition (log CFU/g)

N_0 = log number of free cells added to the biopolymer mix during the production of the microspheres (log CFU/g)

5. ศึกษาผลของการเก็บรักษาเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม

นำเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มไปเก็บรักษาในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05M ซึ่งบรรจุในขวดแก้ว (Duran) ที่ปิดฝาสนิท หลังจากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4ºC และอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 9, 12, 15 และ 18 วัน มาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่รอดชีวิตในเม็ดเจลตามวิธีการข้อ 3.1 (Ann *et al*., 2007)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Scince) Version 10.0

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

1.1 ความสามารถในการยึดเกาะ mucin

การยึดเกาะผนังลำไส้ถือเป็นคุณสมบัติสำคัญของการเป็นโปรไบโอติกที่ดีและใช้เป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยแสดงให้เห็นว่าเมื่อแบคทีเรียแลกติกเข้าสู่ร่างกายผ่านกระเพาะอาหารไปได้แล้วจะสามารถเกาะติด (adhesion) ที่ลำไส้และก่อให้เกิดประโยชน์กับร่างกายได้ แม้ว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกบางประการ เช่น สามารถทนต่อระบบกรดในกระเพาะอาหารหรือเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กตอนต้นแต่ถ้าไม่มีความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้ก็แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนั้นมีเวลาอยู่ในลำไส้สั้นและไม่ส่งผลใดต่อร่างกายของเจ้าบ้าน (host) สำหรับวิธีการทดสอบการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมีด้วยกัน 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การทดสอบกับเยื่อเมือกผนังลำไส้โดยตรง และการทดสอบกับ cell line ชนิด epithelial cell สำหรับโปรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับมนุษย์นิยมใช้การทดสอบกับ cell line ชนิด epithelial cell เช่น Human Hep-2 cell line, HT-29 MTX cell line และ Caco2 cell line (Saarela *et al*., 2000) เนื่องจากไม่สามารถขูดเอาเยื่อเมือกผนังลำไส้ของมนุษย์โดยตรงได้ สำหรับการทดสอบแบคทีเรียโปรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับสัตว์นั้นมักจะทดสอบกับ intestinal mucus โดยตรง เนื่องจากสัตว์ไม่มี cell line ที่จะใช้เป็นตัวแทนที่ดีได้ นอกจากนั้นการแยก intestinal mucus จากสัตว์ยังสามารถทำได้ง่าย (Ehrmann, 2002) นอกจากนี้อาจมีการใช้โปรตีนอื่นเป็นตัวแทนของ intestinal mucus เช่น การใช้ mucin ในการทดสอบการเกาะติดของผนังลำไส้ (Tollon *et al*., 2007)

จากการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะ mucin ของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารไก่ทั้ง 9 ไอโซเลต โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับ *Lact. plantarum* 299V (positive control) พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินทุกไอโซเลตไม่สามารถยึดเกาะกับ mucin ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยึดเกาะของ *Lact. plantarum* 299V กับ mucin มีค่าเท่ากับ 54.51% (Table 2) การทดสอบกิจกรรมการยึดเกาะ mucin ถือเป็นวิธีการทดสอบคุณสมบัติการยึดเกาะของผนังลำไส้เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่นิยมวิธีหนึ่ง โดย mucin เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นส่วนประกอบของ mucus โดย mucin ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ได้มาจากผนังลำไส้ของสุกร ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารไก่ไม่มีความจำเพาะกับการยึดเกาะ mucin จากสุกร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ

Laukova และคณะ (2004) ที่ทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม enterococci ซึ่งแยกจากแหล่งต่างๆ นำมาทดสอบการยึดเกาะกับ intestinal mucus ที่ได้มาจากมนุษย์ สุนัข และ สุกรพบว่า enterococci ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ สามารถยึดเกาะกับ intestinal mucus ที่ได้มาจากมนุษย์และสุนัขได้ดีทุกสายพันธุ์ โดยมีค่าการยึดเกาะอยู่ระหว่าง 3.8-8.3 log CFU/well จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/well โดยเชื้อที่ยึดเกาะได้ดีที่สุดคือกลุ่มเชื้อที่แยกได้จากมูลสุนัข อย่างไรก็ตามพบว่า enterococci ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ เกือบทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยึดเกาะกับ intestinal mucus ที่ได้จากสุกร

สำหรับกลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียแลกติกสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบจำเพาะ (receptor-specific blinding) แบบใช้แรงวาลเดอวาลล์ (Val-der-Waal force) แบบใช้ประจุ (charge) และการจับกันของเซลล์กับตัวรับโดยการมีปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ (hydroprobic interaction) ซึ่งโดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะมีลักษณะ cell surface hydrophobility มีผลทำให้ผิวเซลล์ไม่ชอบน้ำ (Van Loosdrecht *et al*., 1987) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิดออกมาบนผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม extracellular matrix molecules เช่น collagen, fibronectin และ vitronectin โดยโปรตีนเหล่านี้จะยึดเกาะกับเยื่อเมือกได้ (Lorca *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามการเกาะติดผนังลำไส้ของแบคทีเรียเป็นกระบวนการซับซ้อนที่มีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องและยังไม่มีความเข้าใจกลไกที่แท้จริงอย่างสมบูรณ์ จากการทดลองของ Izquierdo และคณะ (2008) พบว่าคุณสมบัติการเกาะติดกับ mucin ของ *Bi. longum* จะหายไปเมื่อ treat เซลล์ด้วย trypsin หรือ lysozyme

Schillinger และคณะ (2005) ทดสอบประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม lactobacilli ซึ่งแยกจากแหล่งต่างๆ โดยใช้วิธีการทดสอบที่แตกต่างกันคือ ทดสอบการเกาะติดกับ cell line คือ HT-29 MTX cell ทดสอบหาค่า hydrophobicity และการจับกับโปรตีน คือ fibronectin fibrinogen และ human collagen type IV พบว่าแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม lactobacilli สามารถยึดเกาะกับ HT-29 MTX cell, fibronectin fibrinogen และ human collagen type IV โดยค่าการยึดเกาะจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ ในขณะที่ค่า hydrophobicity จะมีค่าอยู่ในช่วง 2%-94% เช่นเดียวกับการทดลองของ Tollon และคณะ (2007) ซึ่งทดสอบกิจกรรมการยึดเกาะของ *Lact. plantarum* ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ โดยทดสอบกับ cell line คือ CaCo2 cell และ ทดสอบการยึดเกาะกับ mucin พบว่า *Lact. plantarum* เกือบทุกสายพันธุ์ ยึดเกาะกับ mucin และ CaCo2 cell มีเพียง *Lact. plantarum* 3 สายพันธุ์ คือ 529, CBFM19 และ R21 ที่ยึดเกาะกับ mucin ได้แต่ไม่สามารถยึดเกาะกับ CaCo2 cell ซึ่งมี 1 สายพันธุ์ คือ *Lact. plantarum* 529 ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารไก่ ดังนั้นทดสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียแลกติกเพื่อศึกษาการเป็นโปรไบโอติกควรที่จะทำการศึกษาให้หลากหลายรูปแบบ เพื่อเพิ่มความถูกต้องและส่งผลให้การนำไปใช้มีประสิทธิภาพสูงสุด

Table 2. Adhesion capability to mucin and cell hydrophobicity of seleced lactic acid bacteria.

Strains	Adhesion (log CFU/well)		Adhesion (%)
	Before	After	
299V*	7.32±0.049	3.99±1.095	54.51
S6-10	7.35±0.030	< 1	0.00
CE5-3	7.23±0.045	< 1	0.00
CE5-10	6.85±0.545	< 1	0.00
CR5-15	7.00±0.090	< 1	0.00
CR5-1	7.26±0.030	< 1	0.00
CR6-1	7.14±0.040	< 1	0.00
CR6-3	7.25±0.033	< 1	0.00
L3-7	7.41±0.023	< 1	0.00
L5-4	6.76±0.058	< 1	0.00

***** Positive control : *Lact. plantarum* 299V

1.1 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในการทนต่อกรดและน้ำดีแบบต่อเนื่องกัน

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกควรมีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีได้ดี ซึ่งเมื่อแบคทีเรียที่ผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่จะต้องผ่านกระเพาะอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดโดยมีพีเอชอยู่ในช่วง 2.5-4.8 เมื่อผ่านสภาวะกรดของกระเพาะอาหารก็จะเดินทางผ่านลงสู่ลำไส้เล็กซึ่งมีสภาวะเป็นกรดอ่อนจนกระทั่งเป็นด่างอ่อน มีพีเอชประมาณ 5.7-8.4 (รุจา มาลัยพวง, 2544) นอกนี้ยังมีเอนไซม์ต่างๆ และน้ำดีอยู่ด้วย ดังนั้นแบคทีเรียที่ได้รับผลกระทบจากกรดในกระเพาะอาหารจะได้รับการเปลี่ยนแปลงสภาวะอย่างกะทันหันและเป็นสภาวะที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกด้วย ดังนั้นการทดสอบที่เลียนแบบสภาวะจริงของระบบทางเดินอาหารที่เชื้อแบคทีเรียจะต้องเดินทางผ่านนั้นจึงเป็นการทดสอบที่จะบอกถึงความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกหลังจากผ่านการทดสอบต่อเนื่องด้วยสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งจำลองระบบภายในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อด้วยสถาวะที่มีน้ำดีไก่ freeze dry ความเข้มข้นร้อยละ 3

ของน้ำหนักแห้ง ที่พีเอช 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจำลองลำไส้เล็กตอนต้น พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินทั้ง 9 ไอโซเลต มีการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 59.4-69.9% (Table 3) จากผลการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่ทั้ง 9 ไอโซเลต ที่มีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/ml แต่เมื่อผ่านระบบจำลองของกระเพาะอาหารจะมีจำนวนเซลล์ลดลง 2-3 log CFU/ml หลังจากนั้นเมื่อผ่านสภาวะจำลองของลำไส้เล็กพบว่าปริมาณเซลล์ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจากสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shin และคณะ (2008) ทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน 3 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* SH 528, *Ent. faecium* SH 632 และ *Ped. pentosaceus* SH 740 ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทง โดยได้นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบคุณสมบัติในการทนต่อกรดที่พีเอช 2.0, 2.3, 2.5 และ 3.0 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีน้ำดีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.3 และ 0.5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ไม่พบการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่พีเอช 2.0 ในขณะที่พีเอช 2.3 เป็นสภาวะที่มีการลดลงของแบคทีเรียแลกติกสูงสุดคืออยู่ในช่วง 3.0-1.2 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.5 log CFU/ml อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำดีทุกความเข้มข้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Musikasang และคณะ (2009) ที่คัดแยกแบคทีเรียแลกติก 226 ไอโซเลต จากทางเดินอาหารไก่กระทง หลังจากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกโดยทดสอบการทนกรดที่พีเอช 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและทดสอบการทนต่อน้ำดีสดความเข้มข้น 0.7% และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแบบต่อเนื่อง พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลต (KT3L20, KT2CR5, KT10L22, KT5S19, KT4S13 และ PM1L12) สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวโดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 43.7, 37.6, 33.8, 32.9, 31.4 และ 27.2% ของเซลล์เริ่มต้น 9 log CFU/ml ตามลำดับ

ภายในกระเพาะอาหารจะมีสภาพเป็นกรดเนื่องจากการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกออกมาเพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพและง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่สัตว์หลั่งออกมาในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยโปรตีนคือเอนไซม์ pepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะกรดพีเอชอยู่ในช่วง 2-3 การทำงานร่วมกันของกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์นี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกทำให้แบคทีเรียไม่สามารถรอดชีวิตได้ (Johnson *et al*., 2006) ทั้งนี้ความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกอาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีการสัมผัสและทำปฏิกิริยากับกรดตลอดเวลา จึงทำให้แบคทีเรียแลกติกมีความทนต่อกรดได้ (Franz *et al*., 1999)

ในส่วนของลำไส้เล็กตอนต้นจะมีน้ำดีหลั่งออกมาเพื่อทำให้ไขมันแตกตัวและเข้ากับน้ำได้ดีขึ้น น้ำดียังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียในทางเดินอาหารได้ เนื่องจากเกลือน้ำดีซึ่งเป็น

กรดน้ำดีชนิดหนึ่ง จะไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายโดยการที่ไปละลายไขมันในส่วนโครงสร้างฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ลดน้อยลงเป็นสาเหตุสำคัญให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแยกออกจากกัน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ นอกจากเกลือน้ำดีแล้วภายในทางเดินอาหารส่วนท้ายยังมีเอนไซม์ pancreatin จากตับอ่อน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มด้วยกันคือ amylase, lipase และ protease ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสารอาหารแตกต่างกันออกไป และยังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายในทางเดินอาหาร สำหรับความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียนั้นมีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ bile salt hydrolases (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไปย่อยกรดน้ำดีและทำลายความเป็นพิษ (detoxification) น้ำดีโดยการเข้าไปรวมตัว (conjugated) กับน้ำดี (Moser and Savage, 2001) สำหรับแบคทีเรียแลกติกมีหลายสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น แบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม *Lactobacillus* (De Smet *et al*., 1995) และ *Ent. faecium, Ent. faecalis, Ent. durans* (Franz *et al*., 2001)

Table 3. Survival rate of selected lactic acid bacteria in the presence of 0.5% freeze dry chicken bile and pancreatin (1 mg/ml) at pH 8.0 (6 h) after sequential incubation in simulated gastric juice (2 h).

Strain	Viable count (log CFU/ml)			Log survival (%)
	Simulated stomach	Simulated small intestine		
	0 h	2 h	6 h	
S6-10	8.99±0.050*	6.08±0.060*	6.03±0.089*	67.1[a]**
CE5-3	9.47±0.017	6.63±0.569	6.61±0.547	69.9[b]
CE5-10	9.35±0.059	6.41±0.055	6.25±0.054	66.8[c]
CR5-15	9.17±0.031	6.15±0.054	6.04±0.040	65.8[d]
CR5-1	9.12±0.037	5.71±0.608	6.17±0.026	67.7[a]
CR6-1	9.44±0.015	5.95±0.046	5.79±0.021	61.3[e]
CR6-3	9.09±0.017	6.14±0.601	6.19±0.019	68.1[f]
L3-7	9.47±0.004	5.67±0.570	6.32±0.580	59.4[g]
L5-4	9.24±0.040	5.86±0.054	5.76±0.058	62.4[h]

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscript in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

1.2 ความสามารถในการย่อย phytate

คุณสมบัติที่สำคัญของโปรไบโอติกที่จะนำไปใช้ในอาหารสัตว์ควรมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phytase เพื่อเพิ่มปริมาณของฟอสฟอรัสและสารอาหารต่างๆให้กับสัตว์เพิ่มขึ้น การทดสอบกิจกรรมในการย่อย phytate บนอาหาร MRS ดัดแปลงของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 ไอโซเลต สามารถสร้างวงใสขนาดที่แตกต่างกันในอาหาร MRS ดัดแปลง ซึ่งใช้โซเดียมไฟเตตเป็นซับสเตรท (Figure 6) อย่างไรก็ตามขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นเป็นเพียงการสมมติฐานถึงการมีอยู่ของเอนไซม์ phytase เท่านั้น เนื่องจากวงใสที่เกิดขึ้นสามารถเกิดขึ้นได้จากการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือจากการทำงานของเอนไซม์ phytase หรือ acid phosphatase โดยปกติเอนไซม์ acid phosphatase สามารถทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกรด ส่วนเอนไซม์ phytase ทำงานได้ดีที่สภาวะกรดอ่อนๆหรือพีเอชเป็นกลางซึ่งมีสภาวะใกล้เคียงกับบริเวณลำไส้เล็ก ดังนั้นบริเวณลำไส้เล็กที่แบคทีเรียเข้าไปยึดเกาะและก่อประโยชน์ให้กับร่างกายจึงมีความเหมาะสมที่จะผลิตเอนไซม์ phytase มากกว่าเอนไซม์ acid phosphatase

จากการวัดกิจกรรมเอนไซม์ phytase ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่า *Lact. salivarius* L5-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase สูงสุดคือ 40.35 U/min×ml ที่อุณหภูมิ 50°C โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ phytase ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต อยู่ระหว่าง 40.35-5.26 U/min×ml ที่อุณหภูมิ 50°C (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Raghavendra และ Halami (2009) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตเอนไซม์ phytase จากทางเดินอาหารไก่ โดยสังเกตจากการสร้างวงใสในอาหาร MRS ดัดแปลง ซึ่งใช้โซเดียมไฟเตตและแคลเซียมไฟเตตเป็นซับสเตรท พบว่า แบคทีเรียแลกติก 40 ไอโซเลตสามารถสร้างวงใสในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีแคลเซียมไฟเตตเป็นซับสเตทและมีเพียง 2ไอโซเลต (CFR R38 และ CFR R35) สามารถสร้างวงใสในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีโซเดียมไฟเตตเป็นซับสเตท โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 ไอโซเลต มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ phytase เท่ากับ 213 และ 89 U ที่ 50°C นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 ไอโซเลต มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก คือ ทนต่อกรด น้ำดีและยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่นเดียวกับการทดลองของ Taheri และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติก 62 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากจากไก่กระทง มีความสามารถสร้างเอนไซม์ amylase และ phytaseได้

Pirgozliev และคณะ (2010) เสริมเอนไซม์ phytase ในอาหารของไก่กระทงปริมาณ 250, 500 และ 12,500 FTU เปรียบเทียบกับไก่กระทงที่ได้รับอาหารไม่มีการเสริมเอนไซม์ phytase เมื่อนำไก่กระทงที่เลี้ยงในสภาวะทั้ง 2 ที่มีอายุ 42 วัน มาเปรียบเทียบกัน พบว่าไก่กระทงที่ได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์ phytase 12,500 FTU จะมีน้ำหนักตัวมากที่สุดและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมเอนไซม์ phytase อย่างมีนัยสำคัญ

Table 4. Phytate digestion capability and phytase activity of selected lactic acid bacteria.

Isolates	Phytase activity (unit)
S6-10	22.37±0.056*[a]**
CE5-3	35.53±0.103[b]
CE5-10	5.26±0.091[c]
CR5-15	10.96±0.043[d]
CR5-1	8.77±0.072[e]
CR6-1	14.91±0.121[f]
CR6-3	5.26±0.075[c]
L3-7	14.47±0.113[f]
L5-4	40.35±0.072[g]

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscript in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

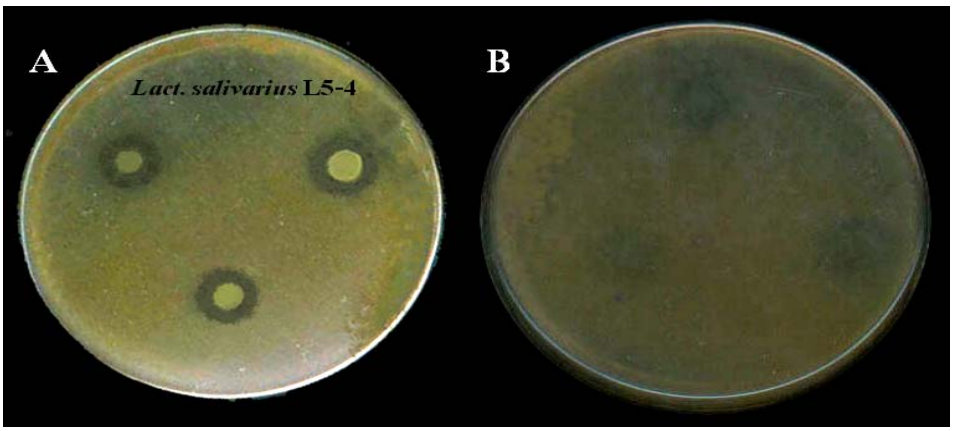


Figure 6. Zone of sodium phytate hydrolysis by isolated lactic acid bacteria. A) Positive control B) Negative control

1.4 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

ความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารเป็นคุณสมบัติสำคัญอีกประการหนึ่งของโปรไบโอติก การที่แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้สามารถย่อยโปรตีนได้นั้นจะส่งผลดีต่อการทำงานในกระบวนการย่อยอาหารของสัตว์ ซึ่งสนับสนุนคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในการเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ที่โปรไบโอติกอาศัยอยู่ได้ เนื่องจากทำให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้

ไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น ความสามารถในการใช้ประโยชน์สารอาหารของแบคทีเรียแลกติกขึ้นอยู่กับการสร้าง exoenzyme ของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยแป้งซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตได้โดยใช้เอนไซม์ amylase ในการย่อย สามารถย่อยไขมันได้เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกใช้เอนไซม์ lecitinase หรือ phosphatidase ในการตัดพันธะฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester bond) หรือแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์สามารถย่อยไขมันได้โดยกิจกรรมของเอนไซม์ lipase และสามารถย่อยโปรตีนได้โดยกิจกรรมของเอนไซม์ protease แบคทีเรียแลกติกที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสารอาหารได้เช่น *Lact. delbruekii* subsp. *bulgaricus* สามารถย่อยโปรตีนได้ *Lact. fermentum* และ *Lact. amylovorous* สามารถย่อยแป้งได้ และ *Lact. plantarum* DSMZ 12028 สามารถย่อยไขมันได้ เป็นต้น (มณฑกานต์ ทองสม, 2547; Kawai, 1999; De Fátima Silva Lopes *et al*., 2002; Duangchitchareon, 2006) การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไม่สามารถย่อย โปรตีน ไขมัน และแป้งได้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Musikrasang และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งของแบคทีเรียแลกติก 20 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทงโดยดูจากวงใสของการเจริญของแบคทีเรียแลกติกบนอาหารที่มี skim milk, tributirin และ soluble starch เป็นซับสเตรท เพื่อศึกษาการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ คือเกิดวงใสขึ้นที่แตกต่างกันในอาหารที่ใช้ skim milk เป็นซับสเตรท อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 20 ไอโซเลต ไม่สามารสร้างวงใสได้ในอาหารที่มี tributirin และ soluble starch เป็นซับสเตรท ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Taheri และคณะ (2009) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติก 332 ไอโซเลต จากไก่กระทง พบว่า มีเพียง 62 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนและเอนไซม์ amylase ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยไขมันได้

2. การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกถือได้ว่ามีความสำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียโปรไบโอติกที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ควรจะทนต่อยาปฏิชีวนะได้ในระดับหนึ่งเพราะในการเลี้ยงสัตว์แม้ผู้ผลิตจะหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะและหันมาใช้โปรไบโอติกแทน อย่างไรก็ตามหากเกิดโรคขึ้นในระบบการผลิตก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคให้แก่สัตว์ และในอาหารสัตว์อาจมียาปฏิชีวนะผสมอยู่ด้วยโดยที่ผู้ผลิตไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ดังนั้นหากแบคทีเรียที่จะนำไปใช้มีความสามารถในการทนต่อยาได้ในระดับหนึ่งจึงเป็นการส่งเสริมคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดียิ่งขึ้น

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 9 ไอโซเลต โดยใช้วิธีการ broth microdilution procedure ซึ่งทดสอบกับยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังจากการทดสอบ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ที่นำมาทดสอบกับยาปฏิชีวนะ penicillin G และ chloramphenicol มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรียได้ อยู่ในช่วง 0.25-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 5) ในขณะที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ erythromycin และ tetracycline ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงต่ำกว่า 0.25-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรียได้พบว่าค่า MBC ของ penicillin G, tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียที่ทดสอบมีความไวต่อ erythromycin (Table 5) อย่างไรก็ตามการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ควรเป็นแบคทีเรียที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้บ้างเพื่อให้สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะที่มีการเติมลงในอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามการทนต่อยาปฏิชีวนะไม่ควรสูงเกินไปเพื่อป้องกันการถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาไปยังเชื้อก่อโรคในสัตว์ซึ่งยากต่อการรักษาโรคได้

D'Aimmo และคณะ (2007) จัดระดับความสามารถของการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไว้ดังนี้ หากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) แบคทีเรียมีค่าต่ำกว่า 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดว่าแบคทีเรียนั้นมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (sensitive) แต่หากค่า MIC แบคทีเรียมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดว่าแบคทีเรียอาจมีความต้านทานยาปฏิชีวนะในระดับปานกลาง (moderately resistant) เช่นเดียวกันหากค่า MIC มีค่ามากกว่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จัดว่าแบคทีเรียมีความสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้สูงหรือดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (clinically resistant) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ เนื่องจากมีค่า MIC น้อยกว่า 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rakhavendra และคณะ (2009) นำแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Ped. pentosaceus* CFR R35 และ *Ped. pentosaceus* CFR R38 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ phytase และมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นมาทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิดคือ ampicillin, cephalotin, chloramphenicol, gentamycin erythromycin, tetracyclin, streptomycin และ polymyxin B พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด และมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะอีก 3 ชนิด คือ cephalotin, streptomycin และ polymyxin B

จากการประเมินคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่า *Lact. salivarius* L5-4 มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกดีที่สุด คือ สามารถทนต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ phytase ที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดและมีความทนต่อ

ยาปฏิชีวนะได้บ้างแต่ไม่สูงจนมีโอกาสถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาให้กับเชื้อก่อโรค โดยเลือก *Lact. salivarius* L5-4 ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

Table 5. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of antibiotics toward selected lactic acid bacteria.

Strains	Antibiotic susceptibility							
	Penicillin G		Tetracyclin		Chloramphenicol		Erythromycin	
	MIC*	MBC*	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S6-10	8	16	16	64	8	32	<2.5	<2.5
CE5-3	8	16	16	32	8	16	<2.5	5
CE5-10	4	8	8	128	2	64	<2.5	10
CR5-15	0.25	0.5	<0.25	<0.25	2	4	<2.5	<2.5
CR5-1	0.5	2	1	64	4	32	<2.5	<2.5
CR6-1	8	16	16	32	8	32	<0.25	20
CR6-3	0.25	1	<0.25	<0.25	4	8	<0.25	5
L3-7	8	32	16	32	8	64	<0.25	10
L5-4	1	2	1	32	4	8	<0.25	5

* μg/ml

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการห่อหุ้มเซลล์ และการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียนิยมทำด้วยกัน 2 วิธีการ คือ extrusion technique และ emulsion technique โดยโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธีการทั้งสองสามารถรอดชีวิตเพิ่มขึ้นถึง 80-95% (Krasaekoopt *et al.,* 2003) จากการศึกษาของ Musikrasang และคณะ (2009) พบว่าการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่กระทงด้วยวิธี extrusion technique โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นตัวพยุงจะเพิ่มการรอดของเซลล์โปรไบโอติกได้ดีกว่าวิธี emulsion technique นอกจากวิธีการและวัสดุห่อหุ้มแล้วในการห่อหุ้มเซลล์ควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกและความเหมาะสมในการนำเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นก่อนการห่อหุ้มเซลล์จึงควรศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการห่อหุ้มทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตให้กับแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประโยชน์ในการนำไปใช้งานต่อไป

3.1 ความเข้มข้นของอัลจิเนต

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยทั่วไปนิยมใช้อัลจิเนตเป็นวัสดุห่อหุ้มเนื่องจากเป็นวัสดุที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์ของแบคทีเรีย ราคาถูก สามารถนำมาใช้ได้ง่าย ไม่ซับซ้อน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Krasaekoopt *et al.,* 2003) นอกจากชนิดของวัสดุห่อหุ้มแล้วความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจล เนื่องจากความเข้มข้นของวัสดุที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจลซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เซลล์รอดชีวิตได้มากขึ้น (Chandramouli *et al*., 2004**)**

จากการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มโดยใช้อัลจิเนตในการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L5-4 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 1.5%, 2.0%, 2.5% และ 3.0% ตามลำดับ พบว่า เซลล์อิสระของ *Lact. salivarius* L5-4 ที่ไม่ห่อหุ้มมีจำนวนเชื้อลดลงประมาณ 3 log CFU/ml จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9 log CFU/ml โดยเมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเมื่อผ่านสภาวะกระเพาะอาหารที่มีพีเอช 2.5 และเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.5% จะมีการเหลือรอดของเซลล์ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัลจิเนตความเข้มข้นอื่นๆ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตเป็น 2.0%, 2.5% และ 3.0% พบว่า การรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 เมื่อผ่านสภาวะกระเพาะอาหารจำลองจะมีการเหลือรอดของเซลล์สูงขึ้นแต่จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (Table 6) โดยการเพิ่มขึ้นของเข้มข้นของอัลจิเนตคือการเพิ่มจำนวนแขน (binding sites) ที่ใช้จับกับ Ca^{2+} ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตที่สูงขึ้นก็จะส่งผลต่อความหนืดของอัลจิเนตที่สูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งยากต่อการผสมระหว่างเซลล์กับอัลจิเนตและยากต่อการควบคุมลักษณะของเม็ดเจลเนื่องจากความหนืดที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการห่อหุ้มเม็ดเจลควรเลือกความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เหมาะสม (Lee and Heo, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chandramouli และคณะ (2004) ที่ได้ทำการทดลองระดับความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้ม โดยการใช้อัลจิเนตในการห่อหุ้ม *Lact. acidophilus* CSCC 2400 และ *Lact. acidophilus* CSCC 2409 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตจาก 0.75% เป็น 1%, 1.5%, 1.8% และ 2% ตามลำดับ จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Chávarri และคณะ (2010) ที่ห่อหุ้มเซลล์ *Lact. gasseri* และ *Bi. bifidum* โดยใช้อัลจิเนตความเข้มข้น 2% และนำเม็ดเจลไปเคลือบด้วยไคโตซาน พบว่าเมื่อนำเม็ดเจลไปทดสอบกับสารละลายพีเอช 2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์จะให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 10^7 CFU/ml จากเซลล์เริ่มต้น 10^9 CFU/ml

โดย *Bi. bifidum* จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า *Lact. gasseri* ในขณะที่เซลล์อิสระของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์จะให้อัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 10 CFU/ml เมื่อผ่านสภาวะดังกล่าว

ระดับความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาต่อไปคือที่ระดับความเข้มข้น 2% เนื่องจากให้การรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 ในขั้นตอนไม่แตกต่างกับการใช้อัลจิเนต 2.5% และ 3% นอกจากนี้การใช้อัลจิเนตที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้ความหนืดของอัลจิเนตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการกระจายตัวของเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับอัลจิเนต

Table 6. Effect of alginate concentration on viability for encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in simulated gastric conditions (pH 2.5 for 2 h at 41°C).

Alginate concentration (%)	Viable count (log CFU/ml)		Log survival (%)
	Before	After	
Free cell	9.14±0.058*	5.86±0.054*	64.11[a]**
1.5	8.88±0.017	6.77±0.067	76.24[b]
2.0	8.91±0.016	7.09±0.021	79.57[c]
2.5	8.95±0.005	7.13±0.039	79.66[c]
3.0	8.97±0.041	7.18±0.028	80.04[c]

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscript in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.2 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ช่วยในการฟอร์มตัวและขึ้นรูปเม็ดเจล โดยการขึ้นรูปของเม็ดเจลเกิดขึ้นจากโซเดียมอัลจิเนตที่หยดลงไปในสายละลายแคลเซียมคลอไรด์ เกิดการแลกเปลี่ยนประจุ โดยแคลเซียมไอออนเข้าไปจับกับสายพอลิเมอร์อัลจิเนตแทนที่โซเดียมไอออนที่มีประจุต่ำกว่าโดยแคลเซียมไอออนจะเข้าไปจับทั้งสองแขนของพอลิเมอร์หรือเรียกว่า cross linking ทำให้พอลิเมอร์จับกันเป็นร่างแหจนขึ้นรูปเป็นเม็ดเจล โดยความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์จะมีผลต่อการจับของแคลเซียมไอออนกับพอลิเมอร์ ซึ่งความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปเจลมีการใช้อย่างหลากหลายโดยทั่วไปนิยมใช้อัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1-2% และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.05-1.5M (Krasaekoopt *et al*., 2003) จากการทดลองของ Jankowski และคณะ (1997) ใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นต่ำมากคือ 0.6% และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง 0.3M

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* 5-4 โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M และ 0.5M ในการห่อหุ้ม พบว่า *Lact. salivarius* L5-4 ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% และทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1M เมื่อผ่านสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารจะมีการเหลือรอดของเซลล์ต่ำสุดลดลงมากที่สุด ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มากกว่า 0.1M พบว่า *Lact. salivarius* 5-4 มีจำนวนเซลล์เหลือรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (Table 7) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chandramouli และคณะ (2004) ถึงระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในการห่อหุ้ม *Lact. acidophilus* CSCC 2400 และ *Lact. acidophilus* CSCC 2409 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.1M, 0.2M และ 1.0M ตามลำดับ พบว่าระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่ออัตราการลดลงของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปเม็ดเจลคือการเพิ่มปริมาณของ Ca^{2+} ซึ่งใช้ในการจับกับพอลิเมอร์ (biopolymer) เพื่อขึ้นรูปเม็ดเจล อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อความคงตัวของเม็ดเจลน้อยมาก เนื่องจากเมื่อแขน (binding sites) กับพอลิเมอร์ขึ้นรูปและจับกันครบทุกแขนจะทำให้ Ca^{2+} ที่เหลือไม่มีโอกาสจับกับบริเวณของเม็ดเจลได้อีก (Tanaka *et al*., 1984) ดังนั้นการขึ้นรูปเม็ดเจลควรหาความเข้มข้นของพอลิเมอร์และแคลเซียมคลอไรด์ให้มีความเหมาะสมเพื่อเพิ่มความคงตัวและลดค่าใช้จ่ายจากการเพิ่มการใช้แคลเซียมคลอไรด์โดยที่ไม่จำเป็น

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lact. salivarius* L5-4 ควรใช้โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 2% และทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.1M เป็นระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่สุด เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

Table 7. Effect of calcium chloride concentration on viability for encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in simulated gastric conditions (pH 2.5 for 2 h at 41°C).

Calcium chloride concentration (M)	Viable count (log CFU/g)		Log survival (%)
	Before	After	
Free cell	9.26±0.043*	5.95±0.064*	64.25[a]**
0.1	9.02±0.063	6.90±0.010	77.13[b]
0.2	8.97±0.028	6.97±0.011	77.70[b]
0.3	8.89±0.066	6.97±0.036	78.40[b]
0.4	8.89±0.011	6.91±0.091	77.72[b]
0.5	8.92±0.020	6.94±0.025	77.80[b]

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscript in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3 เวลาที่ใช้ในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัว

นอกจากความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้ว ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลยังขึ้นกับเวลาที่เม็ดเจลแข็งตัว (capsule in calcium chloride exposure) ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อีกด้วย

จากการศึกษาผลของเวลาที่แตกต่างกันคือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ในการขึ้นรูปเม็ดเจลของอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1M โดยห่อหุ้ม *Lact. salivarius* L5-4 พบว่า ระยะเวลาที่ทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1M นานขึ้นจะทำให้การรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 เพิ่มสูงขึ้น ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นระยะเวลา 30 นาทีหรือมากกว่าจะพบการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อผ่านการทดสอบในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองเช่นกันแต่ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และมีการรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียในเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 10 และ 20 นาที ($p < 0.05$) (Table 8) เช่นเดียวกับการศึกษาถึงผลของเวลาในการขึ้นรูปเม็ดเจลของ Chandramouli และคณะ (2004) ที่แช่เม็ดเจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1 เป็นเวลา 5 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อศึกษาถึงความสามารถในการรอดชีวิตของ *Lact. acidophilus* CSCC 2400 และ *Lact. acidophilus* CSCC 2409 พบว่า ที่พีเอช 2 เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C แบคทีเรียในเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1M เวลา 30 นาทีหรือมากกว่า 30 นาที มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 5 นาที ในสารละลาย

แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ระยะเวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย เนื่องจากเมื่อใช้ระยะเวลาเพิ่มจะทำให้เม็ดเจลมีความคงตัวและมีความแข็งแรงมากขึ้น เมื่อนำเม็ดเจลไปบ่มในสภาวะต่าง ๆ เม็ดเจลจึงสามารถปกป้องเซลล์ที่อยู่ภายในได้ดีขึ้น

จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 ควรใช้อัลจิเนตที่ความเข้มข้น 2% และทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.1M เป็นเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตามการหาสภาวะที่เหมาะสมของการห่อหุ้มเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น โดยวิธีการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติกให้เพิ่มขึ้นยังมีอีกหลายวิธี เช่น การเคลือบเม็ดเจล การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับพรีไบโอติก เป็นต้น ซึ่งการเลือกแต่ละวิธีการนั้นควรคำนึงถึงความเหมาะสมและรูปแบบที่จะนำไปใช้เพื่อเพิ่มประโยชน์ให้สูงยิ่งขึ้น

Table 8. Effect of calcium chloride exposure on viability of encapsulated *Lact. salivarius* L5-4 in simulated gastric conditions (pH 2.5 for 2 h at 41°C).

Time (min)	Viable count (log CFU/g)		Log survival
	Before	After	(%)
Free cell	9.14±0.053*	5.95±0.026*	65.09[a]**
10	8.83±0.045	6.11±0.035	69.19[b]
20	8.95±0.038	6.41±0.067	71.62[c]
30	8.97±0.034	6.98±0.028	77.82[d]
40	8.94±0.042	6.93±0.017	77.51[d]
50	8.93±0.066	6.94±0.054	77.51[d]
60	8.99±0.023	7.00±0.013	77.86[d]

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscript in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

4. การรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะการจำลองทางเดินอาหารไก่ในหลอดทดลอง

การห่อหุ้มเซลล์เป็นเทคโนโลยีที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียเมื่อต้องผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะกรด จากการศึกษาพบว่าระบบทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่จะต้องผ่านกระเพาะอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดโดยมีพีเอชในช่วง 2.5-4.8 ซึ่งพบว่าค่าพีเอชในกระเพาะอาหารมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง (รุจา มาลัยพวง, 2544) ขึ้นกับปริมาณของอาหารที่มีอยู่ในกระเพาะอาหาร โดยหลังจากไก่กินอาหารพบว่าอาหารที่ลงไปสู่กระเพาะจะส่งผลต่อการเพิ่ม

สูงขึ้นของพีเอชภายในกระเพาะอาหาร (Haung and Adam, 2004) ดังนั้นการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มที่สภาวะพีเอชต่างๆ จึงมีความสำคัญต่อการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อการรอดชีวิตของ *Lact. salivarius* L5-4 ซึ่งผ่านการห่อหุ้มในสภาวะที่เหมาะสม โดยบ่มเม็ดเจลในสารละลายที่จำลองสภาวะในกระเพาะอาหารให้มีพีเอช 1, 2, 2.5, 3, และ 4 มีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 41°C 2 ชั่วโมง ซึ่งการศึกษานี้ใช้เม็ดเจลที่บ่มในสารละลาย NaCl 0.85% (pH 6.9) เป็นตัวอย่างควบคุม (control) พบว่า *Lact. salivarius* L5-4 ที่ห่อหุ้มในเม็ดเจลเมื่อบ่มที่พีเอช 4 และ 3 จะมีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 95% และ 93% ของเซลล์เริ่มต้น 9 log CFU/ml ($p < 0.05$) ตามลำดับ ในขณะที่การบ่มที่พีเอช 2.5 จะมีการรอดชีวิตของเซลล์เหลือเพียง 77% ของเซลล์เริ่มต้น อย่างไรก็ตามหากบ่มที่พีเอช 1 และ 2 ไม่พบการรอดชีวิตของเซลล์ (Table 9) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hansen และคณะ (2002) พบว่าเซลล์ของ *Bifidobacterium* 4 สายพันธุ์ (*Bi. adolescentis* 15703, *Bi. breve* 15700, *Bi. lactis* Bb-12 และ *Bi. longum* Bb-46) ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตไม่สามารถปกป้องเซลล์ที่สภาวะพีเอชต่ำมากๆ ได้

อัลจิเนตคือพอลิเมอร์ของ anhydro β-D-mannuronic acid ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 กับ α-L-guluronic acid โดยปกติอัลจิเนตค่อนข้างมีความคงตัวต่อสภาวะที่พีเอชเป็นกรด อย่างไรก็ตามพบว่าหากอัลจิเนตต้องอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรดต่ำมากๆ จนมีค่า pKa ต่ำกว่า β-D-mannuronic acid และ α-L-guluronic acid (3.6 และ 3.7 ตามลำดับ) จะส่งผลให้อัลจิเนตเปลี่ยนเป็นกรดอัลจินิก ซึ่งจะไม่มีสมบัติจับกับ Ca^{2+} ทำให้เม็ดเจลคลายตัว (Doumeche *et al*., 2004) สารละลายกรดจากภายนอกจึงสามารถเข้าไปในเม็ดเจลและทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ โดยทั่วไปการเพิ่มประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ที่ห่อหุ้มให้มีการรอดชีวิตในสภาวะที่ค่าพีเอชต่ำๆ สามารถทำได้หลายวิธีการด้วยกัน เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตหรือการเคลือบผิวเม็ดเจลอีกชั้นหนึ่ง จากการศึกษาของ Annan และคณะ (2008) ทดลองห่อหุ้ม *Bi. adolescentis* 15703T ด้วยโซเดียมอัลจิเนตและเคลือบเม็ดเจลด้วยเจลาตินโดยใช้ emulsion technique หลังจากนั้นศึกษาการรอดชีวิตของ *Bi. adolescentis* 15703T ที่ถูกห่อหุ้ม ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง พีเอช 2.0 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *Bi. adolescentis* 15703T ที่ถูกห่อหุ้มและเคลือบผิวเม็ดเจลจะมีจำนวนเซลล์ลดลงเพียง 1.2 log CFU/ml ในขณะที่เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่ได้เคลือบผิวเจลจะมีจำนวนเซลล์ลดลง 2.6 log CFU/ml และเซลล์อิสระจะมีจำนวนเซลล์ลดลง 3.5 log CFU/ml จากเซลล์เริ่มต้น 9.5 log CFU/ml ซึ่งการเคลือบผิวเม็ดเจลสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น การที่เซลล์มีปริมาณการอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรด นอกจากจะเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการทนกรดแล้วยังเป็นผลมาจากการที่เซลล์ได้รับการป้องกันจากวัสดุห่อหุ้มที่ใช้ จึงทำให้เซลล์อยู่รอดได้ดียิ่งขึ้น (Champagne and Baillargeon-Cote, 1987)

Table 9. Effect of pH on viability of lactic acid bacteria strain L5-4 encapsulated with optimized condition in simulated gastric conditions (2 h at 41°C).

pH	Viable count (log CFU/g)		Log survival
	Before	After	(%)
Control (pH 6.9)	8.95±0.049*	8.90±0.029*	99.44[a]**
1	8.95±0.049	ND	ND
2	8.95±0.049	ND	ND
2.5	8.95±0.049	6.96±0.028	77.76[b]
3	8.95±0.049	8.41±0.055	93.96[c]
4	8.95±0.049	8.51±0.063	95.08[d]

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscript in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

ND: Not detected

5. การเก็บรักษาเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม

การห่อหุ้มจัดเป็นเทคโนโลยีในการปกป้องตัวเซลล์ไว้ในเม็ดเจล hydrocolloid เพื่อช่วยรักษาความคงตัวและรักษาระดับจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์และระบบทางเดินอาหาร (Rao *et al.*, 1989) ซึ่งจากประโยชน์ดังกล่าวปัจจุบันจะพบว่าในอาหารที่มีการเสริมโปรไบโอติกนิยมนำโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มไปใช้ ดังนั้นการนำเซลล์ที่ห่อหุ้มไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องศึกษาถึงอายุการเก็บรักษาเม็ดเจลที่ทำให้ระดับความคงตัวของเม็ดเจลและระดับปริมาณเชื้อโปรไบติกในผลิตภัณฑ์ไม่ต่ำกว่าที่กฎหมายกำหนด

สำหรับปริมาณโปรไบโอติกที่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อไก่มีปริมาณแนะนำเป็น 6 log CFU/g (Simon, 2005) โดยปริมาณเม็ดเจลที่ถูกห่อหุ้มควรนำไปผสมกับอาหารไก่ในปริมาณไม่เกิน 1% ของปริมาณอาหารไก่ ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มเริ่มต้นที่เหมาะสมก่อนนำไปผสมกับอาหารไก่ควรมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นในเม็ดเจลไม่ต่ำกว่า 8 log CFU/g จึงจะมีปริมาณที่เหมาะสมที่สามารถสร้างประโยชน์ให้กับเจ้าบ้านได้ จากการศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษา *Lact. salivarius* L5-4 ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1M ใช้ระยะเวลา 30 นาที โดยเก็บรักษาในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05M ซึ่งบรรจุในขวดแก้ว (Duran) ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C ซึ่งเป็นการเก็บรักษาเม็ดเจลในลักษณะที่สะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้งานหากนำไป

ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่โดยเกษตรกรสามารถนำไปผสมโดยตรงกับอาหารไก่ในแต่ละครั้งได้เลย พบว่า การเก็บรักษาเม็ดเจลที่อุณหภูมิ 4°C เก็บรักษาได้ไม่เกิน 7 วัน หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 จะลดลงในปริมาณลงและต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสมที่ก่อประโยชน์ให้กับเจ้าบ้าน ในขณะที่การเก็บรักษาเม็ดเจลที่อุณหภูมิห้องระดับจำนวน *Lact. salivarius* L5-4 จะลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 วัน ระดับจำนวน *Lact. salivarius* L5-4 จะลดต่ำกว่า 10^8 CFU/g และเม็ดเจลจะไม่มีความคงตัวและปลดปล่อยเซลล์แบคทีเรียแลกติกออกมานอกเม็ดเจล (Figure 7) จากการศึกษาของ Rodrigues และคณะ (2011) นำ *Lact. paracasei* L26 ที่ผ่านการห่อหุ้มในลักษณะแตกต่างกัน 3 แบบ คือ ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซาน, ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและเคลือบเม็ดเจลด้วย dextran sulphate และ ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตอย่างเดียว ไปศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำส้มและสารละลายเปปโตน (0.1% peptone, 0.85% NaCl) ที่อุณหภมิ 5°C เป็นเวลา 50 วัน พบว่า การเก็บรักษาเซลล์ที่ห่อหุ้มในน้ำส้มจะสามารถรักษาระดับจำนวนเซลล์ได้คงที่ตลอดการเก็บรักษา ในขณะที่การเก็บรักษาเซลล์ที่ห่อหุ้มในสารละลายเปปโตน พบว่า เม็ดเจลที่เคลือบด้วยไคโตซานและ dextran sulphate จะมีปริมาณเซลล์ลดลง 0.2-0.3 log CFU/g ส่วนเม็ดเจลที่ไม่เคลือบ จะมีปริมาณเซลล์ลดลง 2 log CFU/g จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น 6.5 log CFU/g จากการศึกษาพบว่าสภาวะแวดล้อมที่ใช้เก็บรักษาเซลล์ที่ห่อหุ้มจะมีอิทธิพลสำคัญต่อความคงตัวของเซลล์ในการเก็บรักษานอกจากนี้ยังพบว่าการเคลือบผิวเม็ดเจลอีกหนึ่งชั้นก็สามารถรักษาระดับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจลได้ด้วยเช่นกัน

ดังนั้นการนำ *Lact. salivarius* L5-4 ที่ผ่านการห่อหุ้มเก็บรักษาไว้ในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05M ควรมีการเคลือบผิวเม็ดเจลอัลจิเนตเพื่อเพิ่มจำนวนการเหลือรอดของเซลล์และความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา ควรที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

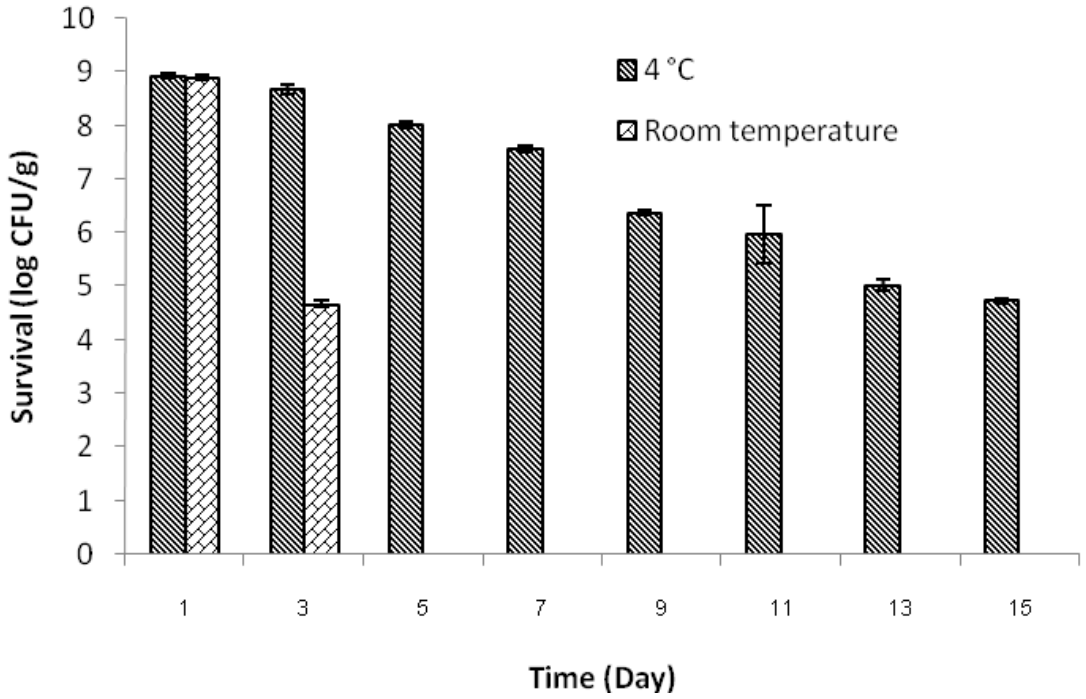


Figure 7. Survival of encapsulated lactic acid bacteria strain L5-4 in alginate beads stored in 0.1% peptone containing 0.85%NaCl and 0.05% $CaCl_2$, at room temperature and 4°C.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการนำแบคทีเรียที่แลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน 9 ไอโซเลต (*Lact. salivarius* CR5-1, CR5-15, CR6-3, L5-4, L3-7, CE5-3, CE5-10, S6-10 และ *Lact. agilis* CR6-1) ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ มาประเมินคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น โดยทดสอบความสามารถในการยึดเกาะ mucin เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับ *Lact. plantarum* 299V (positive control) พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยึดเกาะกับ mucin ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยึดเกาะของ *Lact. plantarum* 299V กับ mucin มีค่าเท่ากับ 54.5% นอกจากนี้เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดมาทดสอบการรอดชีวิตแบบสภาวะต่อเนื่องในระบบทางเดินอาหารที่สภาวะกรด พีเอช 2.5 มีเอนไซม์ pepsin 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจำลองระบบภายในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อด้วยสภาวะที่มีน้ำดีไก่ freeze dry ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของน้ำหนักแห้ง พีเอช 8.0 และมีเอนไซม์ pancreatin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจำลองลำไส้เล็กตอนต้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 41°C พบว่า แบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์มีความทนทานต่อสภาวะดังกล่าวและมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 59.4-69.8% และเมื่อนำแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ phytase พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ phytase และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์phytase อยู่ระหว่าง 40.35-5.26 U/min×ml ที่อุณหภูมิ 50°C อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทุกสายพันธุ์ไม่สามารถย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งได้

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (penicillin G, erythromycin, tetracycline และ chloramphenicol) พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลต ที่นำมาทดสอบมีความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ *Lact. salivarius* L5-4 พบว่าการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้อัลจิเนตความเข้มข้น 2.0% แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1M และใช้เวลาในการห่อหุ้ม 30 นาที จะพบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในสภาวะทางเดินอาหารจำลองสูงที่สุด

การทดสอบการเหลือรอดของ *Lact. salivarius* L5-4 ที่ผ่านการห่อหุ้มที่สภาวะที่เหมาะสมในการทนต่อสภาวะกรดพีเอชที่แตกต่างกันในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง พบว่า *Lact. salivarius* L5-4 ที่ถูกห่อหุ้มสามารถทนต่อสภาวะที่สูงกว่าพีเอช 2.5 ได้ดี อย่างไรก็ตามการห่อหุ้มที่สภาวะดังกล่าวไม่สามารถป้องกันเซลล์ได้ในสภาวะที่พีเอชต่ำกว่า 2 นอกจากนี้เมื่อนำ *Lact.*

salivarius L5-4 ที่ผ่านการห่อหุ้มที่สภาวะที่เหมาะสมมาทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษา พบว่าการเก็บรักษาเม็ดเจลที่อุณหภูมิ 4°C จะสามารถรักษาระดับของจำนวนจุลินทรีย์ได้ไม่เกิน 7 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเก็บรักษาได้เพียง 1 วัน หลังจากนั้นเม็ดเจลจะไม่มีความคงตัวและจุลินทรีย์จะลดลงต่ำกว่า 10^8 CFU/g ซึ่งเป็นปริมาณเซลล์โปรไบโอติกในอาหารสัตว์เม็ดขั้นต่ำที่สามารถสร้างประโยชน์ให้กับเจ้าบ้านได้

อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ถือเป็นการประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติกและหาสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งหากต้องการนำโปรไบโอติกที่ได้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จริง ควรจะทำการศึกษาและประเมินคุณสมบัติในด้านอื่นๆร่วมถึงปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก นอกจากนี้การทดลองใช้กับไก่จริงๆ ก็อาจจะทำให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือเพิ่มขึ้นในการตัดสินใจเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดสอบประสิทธิภาพการยึดเกาะ mucin ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ พบว่าแบคทีเรียแลกติทั้งหมดไม่สามารถยึดเกาะกับ mucin ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจาก mucin ได้มาจากลำไส้สุกร ทำให้เชื้อที่แยกได้มาจากไก่ไม่มีความจำเพาะจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อมีความสามารถในการเกาะติดหรือไม่ สำหรับความสามารถในการยึดเกาะสามารถทดสอบได้หลากหลายวิธี เนื่องจากกลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียแลกติกสามารถเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ ดังนั้นการศึกษาการยึดเกาะของโปรไบโอติกควรศึกษาและเลือกวิธีการให้เหมาะสมกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้การศึกษาการยึดเกาะด้วยหลากหลายวิธีการก็สามารถเพิ่มความถูกต้องและส่งผลให้การนำไปใช้มีประสิทธิภาพสูงสุด

2. จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ phytase ของแบคทีเรียแลกติก 9 ไอโซเลต พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ phytase ได้ อย่างไรก็ตามการวัดกิจกรรมเอนไซม์ phytase ในการทดลองนี้วัดที่อุณหภูมิ 50°C แต่อุณหภูมิภายในตัวไก่จะอยู่ที่ 40-41°C จึงควรทดลองวัดกิจกรรมที่อุณหภูมิดังกล่าวด้วยเพื่อดูว่าในสภาพอุณหภูมิในตัวไก่จริงจะมีค่ากิจกรรมเท่าใด

3. จากการศึกษาการทนต่อสภาวะกรดของ *Lact. salivarius* L5-4 ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า *Lact. salivarius* L5-4 ที่ถูกห่อหุ้มไม่ทนต่อสภาวะกรดพีเอชต่ำกว่า 2 ได้ ดังนั้นหากต้องการนำ *Lact. salivarius* L5-4 ที่ถูกห่อหุ้มไปใช้ในสภาวะกรดต่ำๆ ควรเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ใช้ในการหุ่อหุ้มให้สูงขึ้นหรือเคลือบผิวของเม็ดเจลอีกชั้นหนึ่ง

4. การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาเม็ดเจลในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น

0.1% ที่มีเกลืออยู่ 0.85% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05M ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C เป็นการศึกษาการเก็บรักษาเม็ดเจลในลักษณะที่สะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้งานเท่านั้นซึ่งอาจจะมีผลต่อระยะเวลาในการเก็บรักษา ดังนั้นควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

5. การทดลองครั้งนี้ถือเป็นการประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติกและหาสภาวะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งหากต้องการนำโปรไบโอติกที่ได้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จริง ควรจะทำการศึกษาและประเมินคุณสมบัติในด้านอื่นๆร่วมถึงปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก นอกจากนี้การทดลองใช้กับไก่จริงๆ ก็อาจจะทำให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อเพิ่มขึ้นในการตัดสินใจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. 2544. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยคุณภาพสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 51.

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

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง, เชิดชาย รัตนเศรษฐากุล และกัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. ว. สัตวแพทยศาสตร์ มข 2: 52-61.

รุจา มาลัยพวง. 2544. การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลกติกของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมปศุสัตว์. 2552. ข้อมูลการการส่งออก (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.dld.go.th/transfer/th/index. (4 ตุลาคม 2552)

Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. J. Dairy Sci. 83: 1946-1951.

Ann, E. Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J. Y., Park, D. J., Han, K. S. and Kim, S. H. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. Int. J. Food Sci. Technol. 42: 411-419.

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.

Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology. *In* Lactic Acid Bacteria. 2nd ed (Salminen, S. and Wright, A. V., ed.). p. 1-72. New York. Marcel Dekker.

Banks, J. G., Broad, R. G. and Sparks, N. H. C. 1986. Natural antimicrobial system and their potential in food preservation of the future. Biotech. Appl. Biochem. 8: 103-147.

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.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. J. Appl. Bacteriol. 70: 25-33.

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.

Carr, F. J., Hill, D. and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. Crit. Rev. Microbiol. 28: 281-370.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 1998. Development and application 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.

Champagne, C. P. and Baillargeon-Cote, P. 1987. Cream fermentation by immobilized lactic acid bacteria. Biotechnol. Let. 9: 329-332.

Chandramouli, V., Kailasapathya, K., Peirisb, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation toprotect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. J. Appl. Microbiol. 56: 27-35.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. and Villarán, M. D. C. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. Int. J. Food Microbiol. 142: 185-189.

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

Christopher, M., Jasmine, B., Aleksandra, M. U. and Satya, P. 2008. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted deliveryin the gastrointestinal tract. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81: 225-233.

Coleman, R., Lowe, P. J. and Billington, D. 1980. Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. Biochim. Biophys. Acta. 588: 294-300.

Collins, M. D., Hutson, R. A., Falsen, E., Inganäs, E. and Bisgaard, M. 2002. *Streptococcus gallinaceous* sp. nov., from chickens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1161-1164.

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.

D'Aimmo, M. R., Modesto, M. and Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolate from dairy and pharmaceutical product. Int. J. Food Microbiol. 155: 35-42.

De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L. H., Faccia, M., Giovine, M. N. and Gobbetti, M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria:purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. Int. J. Food Microbiol. 87: 259-270.

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.

De Vyust, L. and Vandamme, E. J. 1994. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. (De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., ed.). p. 91-142. Blackie Academic & Professional. London.

Devriese, L. A., Pot, B. and Collins, M. D. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. J. Appl. Bacteriol. 75: 399-408.

Ding, W. K. and Shah, N. P. 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. J. Food Sci. 74: 100-107.

Doumeche, B., Kuppers, M., Stapf, S., Blumich, B., Hartmeier, W. and Ansorge-Schumacher, M. B. 2004. New approaches to the visualization, quantification and explanation of acid-induced water loss from Ca-alginate hydrogel beads. Journal of Microencapsulation, 21: 565-573.

Duangchitchareon, Y. 2006. Selection of probiotic lactic acid bacteria from pickles and fermented plant products . Master of Science Degree Thesis. Chiang Mai University.

Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J. and Vogel, R. F. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J. Appl. Microbiol. 92: 966-975.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class II a bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev. 24: 85-106.

Fávaro-Trindade, C. S. and Grosso, C. R. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. J. Microencap. 19: 485-494.

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

Franz, C. M., Holzapfel, W. H. and Stiles, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety. Int. J. Food Microbiol. 47: 1-24.

Franz, C. M., Specht, I., Haberer, P. and Holzapfel, W. H. 2001. Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. J. Food Prot. 64: 725-729.

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

Fuller, R. 1992. History and Development of Probiotics. *In* Probiotics : The Scientific Basic. 1st ed (Fuller, R.,ed) pp. 1-8. Chapman & Hall. London.

Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developmenteds. Int. Food Ingred. 3: 23-26.

Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J., 1984. Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a diatery adjunct. J. Dairy Sci. 67: 3045-3051.

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.

Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D. and Poncelet, D. 1993. Membrane formation by interfacial cross-linkingof chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. Biotechnol. Bioeng. 42: 1157-1163.

Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y. and Kim, J. M. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. Anaerobe 16: 321-326.

Hammes, W. P. and Vogel, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. *In* The Genera of Lactic Acid Bacteria. Vol. II. 2nd ed. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., ed). p. 19-54. Chapman & Hall. London.

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

Hansen, L. T., Allan-Wajtas, P. M., Jin, Y. L. and Paulson, A. T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulation *Bifidobacterium* spp. in milk and simulate gastrointestinal condition. Food Microbial. 19: 35-45.

Hardie, J. M. and Whiley, R. A. 1995. The Genus *Streptococcus*. *In* The Genera of Lactic Acid Bacteria. Vol. II. 2nd ed. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., ed). p. 55-125. Chapman & Hall. London.

Harper, A. A., Hood, A. J. C., Mushens, J. and Smy, J. R. 1979. Pancreotone, an inhibitor of pancreatic secretion in extracts of ileal and colonic mucosa. J. Physiol. 292: 455-467.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: A General View. *In* The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. 1st ed. (Wood, B. J. B, ed). p. 151-170. Elsevier Applied Science. London.

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. Technol. 8: 146-150.

Hofmann, A. F. 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. News Physiol. Sci. 14: 24-29.

Holzapfel, W. H., Haberer, P. J., Snel, U. and Huis in't Veld, J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 4: 85-101.

Holzapfel, W. H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to prebiotic and probiotics. Food Res. Int. 35: 109-116.

Hoover, D. G. and Harlander, S. K. 1993. Antimicrobial Protein. *In* Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. (Hoover, D. G. and Steeson, L. R. ed.). p.1-10. Academic Press. California.

Hou, R. C. W., Lin, M. Y., Wang, M. M. C. and Tzen, J. T. C. 2003. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. J. Dairy Sci. 86: 424-428.

Hosseini, S. V., Arlindo, S., Bohme, K., Fernandez-No, C., Calo-Mata, P. and Barros-Vela´ zquez, J. 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing

Enterococcus faecium strains isolated from nonfermented animal foods. J. Appl. Microbiol. 107: 1392-1403.

Huang, Y. and Adams, M. C. 2004. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria . Int. J. Food Microbiol. 9: 253-260.

Huff, W. E., Moore, P. A., Waldroup, P. W., Waldroup, A. L., Balog, J. M., Huff, G. R., Rath, N. C., Daniel, T. C. and Raboy, V. 1998. Effect of dietary phytase and high available phosphorus corn on broiler chicken performance. Poult. Sci. 77: 1899-1904.

Hyronimus, B., Le Marrec, C. and Urdaci, M. C. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I. J. Appl. Microbiol. 85: 42-50.

Izquierdo, E. Medina, M. Ennahar, S. Marchioni, E. and Sanz, Y. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. Curr. Microbiol. 56: 613-618.

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200 .

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, Abdullah, Y. W. N. and Jalaludin, S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. Poultry Sci. 79: 886-891.

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.

Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S. and Ho, Y. W. 2003. Effect of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipid and weight of organs of broiler chickens. Brit. Poultry Sci. 44: 139-144.

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. 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. 1993. Genetic of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-86.

Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S. and Park, H. J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT Food Sci. Technol. 41: 493-500.

Knarreborg, A, Simon. M. A., Engberg, R. M., Jensen, B. B. and Tannock, G. W. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5918-5924.

Koebmann, B. J., Nilsson, D., Kuipers, O. P. and Jensen, P. R. 2000. The membrane-bound H1-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 182: 4738-4743.

Kralik, G. and Milakovic, Z. S. 2004. Effect of probiotic supplementation on the perforemance and the composition of the intestinal microflora in broilers. Acta Agric. Scand. Sect A. 8: 23-31.

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.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth**,** H. C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. Food Sci. Technol. 39: 177-183.

Kullen, M. J. and Klaenhammer, T. R. 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F_1F_0-ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. Mol. Microbiol. 33: 1152-1161.

Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B. T. and Polat, E. S. 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and eggyolk cholesterol. Food Addit. Contam. 21: 817-823.

Laissue, J. A., Chappuis, B. B., Muller, C., Reubi, J. C. and Gebbers, J. O. 1993. The intestinal immune system and its relation to disease. Digest. Dis. 11: 298-312.

Lankaputha, W. E. V. and Shah, N. P. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in the presence of acid and bile salt. Cult. Dairy Prod. J. 51: 65-70.

Lasen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolate from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J. Appl. Bacteriol. 75: 113-122.

Laukova, A., Strompfova, V. and Ouwehand, A. 2004. Adhesion properties of enterococi to intestinal mucus of different hosts. Vet. Res. Commun. 28: 647-655.

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

Levic, J., Djuragic, O. and Sredanovic, S. 2006. Phytase as a factor of improving broilers growth performance and enviromental protection. Arch. Zootech. 9: 95-100.

Line, J. E., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., Seal, B. S., Siragusa, G. R. and Stern, N. J. 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 1094-1100.

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

Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87: 149-163.

Lilly, D. M., and Stillwell, R. H. 1965. Probiotic : growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 744-748.

Liu, J., Bollinger, D. W., Ledoux, D. R. and Veum, T. L. 1998. Lowering the dietary calcium to total phosphorus ratio increases phosphorus utilization in low-phosphorus corn-soybean meal diets supplemented with microbial phytase for growing-finishing pigs1. J. Anim. Sci. 76: 808-813.

Lorca, G., Torino, M. I., De Valdez, G. F. and Ljungh, A. S. 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and bronectin. FEMS Microbiol. Lett. 206: 31-37.

Madara, J. L. 1997. The chameleon within: improving antigen delivery. Science. 277: 910-911.

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.

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.

Marteau, P., Vaerman, J. P., Dehennin, J. P., Bord, S., Brassart, D., Pochart, P., Desjeux, J. F. and Rambeau, J. C. 1997. Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobcillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. Gastroenterol. Clin. Biol. 21: 293-298.

Mattila-Sandholm, T., Matto, J. and Saarela, M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. Int. Dairy J. 9: 25-35.

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.

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.

Mojgani, N., Torshizi, M. A. K. and Rahimi, S. 2007. Screening of locally isolate lactic acid bacteria for use as probiotic in poultry in Iran. J . Poult. Sci. 44: 357-365.

Montville, T. J. and Kaiser, A. L. 1993. Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity and Relationship. *In* Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria (Hoover, D. G. and Steenson, L. R., ed.). p. 1-22. Academic Press. California.

Moser, S. A. and Savage, D. C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. Appl. Environ Microbiol. 67: 3476-3480.

Murano, E. 1998. Use of natural polysaccharides in the microencapsulation techniques. J. Appl. Ichthyol. 14: 245-249.

Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1337-1345.

Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P. and Holley, R. A. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. J. Food Sci. 71: 20-24.

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.

Narendranath, N. V., Thomas, K. C. and Ingledew, W. M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 171-177

Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 54: 349-353.

O' Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

Ouwehand, A. C. and Salminen, S. J. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. Int. Dairy J. 8: 749-758.

Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J. 9: 43-52.

Panda, A. K., Reddy, M. R., Rao, R. S. V. and Praharaj, N. K. 2003. Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of white leghorn layers as influenced by dietary supplementation with probiotic. Trop. Anim. Health Prod. 35: 85-94.

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. and Soccol, C. R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Braz. Arch. Biol. Technol. 50: 521-542.

Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J. I., Monfort, J. M. and Garriga, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC 2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4981-4986.

Perdigon, G., Medina, M., Vintini, E. and Valdez, J. C. 2000. Intestinal pathway of internalization of lactic acid bacteria and gut mucosal immune stimulation. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 13: 141-150.

Pilet, M. F., Dousset, X., Maree, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Paird, J. R. 1994. Evidence for two bacteriocins produce by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolate from fish and active against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 58: 256-262.

Pirgozliev, V., Karadas, F., Pappas, A., Acamovic, T. and Bedford, M. R. 2010. The effect on performance, energy metabolism and hepatic carotenoid content when phytase supplemented diets were fed to broiler chickens. Res. Vet Sci. 89: 203-205.

Raghavendra, P. and Halami, P. M. 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. Int. J. Food Microbiol. 133: 129-134.

Rao, A. V., Shiwnavain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolohgum* in simulated gastric and intestinal juiced. Can. Int. Food Sci. Technol. 22: 345-346.

Ravindran, V., Selle, P. H., Ravindran G., Morel, P. C. H., Kies, A. K. and Bryden, W. L. 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. Poultry Sci. 80: 338-344.

Reid, G. and Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbe. Infect. 4: 319-324.

Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2: 43-53.

Rodrigues, D., Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., Rocha-Santos, T. and Freitas, A. C. 2011. Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. Food Bioprocess Technol. 4: 328-335.

Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. J. Appl. Microbiol. 98: 1410-1417.

Rowland, S. S., Falker Jr., W. A. and Bashirelahi, N. 1992. Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 42: 721-727.

Rubin, H. E. 1978. Toxicology model for a two-acid system. Appl. Environ. Microbiol. 36: 623-624.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215.

Sabatková, J., Kumprecht, I., Zobac, P., Suchy. P. and Cermak, B. 2008. The probiotic BioPlus 2B as an alternative to antibiotics in diets for broiler chickens. Acta Vet. Brn. 77: 569-574.

Sahl, H. G., Jack, R. W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post- translational modifications. Eur. J. Biochem. 230: 827-853.

Salminen, S., Wright, A. V., Morelli, L., Marteau, P., Brassarte, D., de Vosf, W. M., Fonde´ng, R., Saxelinh, M., Collinsi, K., Mogensenj, G., Birkelandk, S. E. and Mattila-Sandholmb, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics. Int. J. Food Microbiol. 44: 93-106.

Salminen, E., Rintala, J., Lokshina, L. Y. and Vavilin, V. A. 2000. Anaerobic batch degradation of solid poultry slaughterhouse waste. Water Sci. Technol. 41: 33-41.

Salmond, C. V., Kroll, R. G. and Booth, I. R. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis *Escherichia coli.* J. Gen. Microbiol. 130: 1845-2850.

Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M. and Donnet-Hughes, A. 1994. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 78: 491-497.

Schillinger, U., Guigas, C. and Holzapfel, W. H. 2005. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int. Dairy J. 15: 1289-1297.

Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. J. Biol. Chem. 265: 12111-12114.

Simpson, W. J. and Taguchi, H. 1995. The Genus *Pediococcus,* with Notes on the Genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. *In* The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B. J .B. and Holzapfel, W. H., ed). p. 125-172. Chapman & Hall. London.

Simon, O. 2005. Micro-Organisms as Feed Additives-Probiotics. Adv. Pork Prod. 16: 161-167.

Shelton, J. L., Southern, L. L., Gaston, L. A. and Foster, A. 2004. Evaluation of the nutrient matrix values for phytase in broilers. J. Appl. Poult. Res. 13: 213-221.

Shin, M. S., Han, S. K., Ji, A. R., Kim, K. S. and Lee, W. K. 2008. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. J. Appl. Microbiol. 105: 2203-2212.

Sobrino, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Fernandez, M. F., Sanz, B. and Hernandez, P. E. 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol.13: 1-10.

Strompfova, V. and Laukova, A. 2007. *In vitro* study on bacteriocin production of enterococci associated with chickens. Anarobe 13: 228-237.

Stevens C. E. 1988. Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. Vol. 52. 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge. UK.

Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M. and Shivazad, M. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Poultry Sci. 88: 1586-1593.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. and Mierau, I. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. J. Dai Sci. 82: 2530-2535.

Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2007. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. J. Appl. Microbiol. 102: 442-451.

Teixeira, P. C., Castro, M. H., Malcata, F. X. and Kirby, R. M. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying . J. Dairy Sci. 78: 1025-1031.

Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolate from molasses produce bacteriocins active against gram-negative bacteria. Enz. Microbiol. Technol. 36: 318-326.

Torshizi, M. A. K., Rahimi, S. H., Mojgani, N., Esmaeilkhanian, S. and Grimes, J. L. 2008. Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. J. Anim. Sci. 21: 1495-1500.

Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl. Environ Microbiol. 53: 1893-1897.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11: 281-292.

Yi, Z., Kornegay, E. T., Ravindran, V. and Denbow, D. M. 1996. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values of inorganic P by phytase. Poultry Sci. 75: 240-249.

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. Protien hydrolysis agar

ประกอบด้วย

Skim milk 20%	100	มิลลิลิตร
MRS agar	900	มิลลิลตร

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 MRS agar ที่ปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากันจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. 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

4. Palm oil 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
Palm oil	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น palm oil ด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช เป็น 6.5 จากนั้นเติม palm oil แล้วนำไปโฮโมจิไนซ์ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1. de Man Rogosa and Sharpe-3-(N-Mopholino) propanesulfonic acid (MRS-MOPS) agar

ประกอบด้วย

Dextrose	10	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	4	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Sodium phytate	0.65	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
0.1M-3-(N-Mopholino) propanesulfonic acid	11	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียม MRS agar ที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเตรียมสารละลายโซเดียมไฟเตท 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรนหลังจากนั้นเทสารละลายโซเดียมไฟเตทผสมลงใน MRS agar ที่ปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากันจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

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	

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

2. สารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ประกอบด้วย

sodium acetate	0.1	โมลาร์
acetic acid	0.1	โมลาร์
pH	5.5	

ใช้สารละลาย acetic acid ปรับ สารละลาย sodium acetate จนได้พีเอชที่ต้องการ จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ประกอบด้วย

This (hydroxyl methyl)		
aminomethane	0.05	โมลาร์
HCl	0.05	โมลาร์
pH	6.5	

ใช้สารละลาย HCl ปรับ สารละลาย This (hydroxyl methyl) aminomethane จนได้พีเอชที่ต้องการ จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phytase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phytase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phytase คือ การวัด soluble orthophosphate ซึ่งได้จากการย่อยไฟเตทของเอนไซม์ phytase โดยการทำให้ soluble orthophosphate เกิดสี (color delvelopment) ทำได้โดยวิธี Vanado molybdophosphoric acid method ซึ่งมีหลักการ คือ สารละลาย orthophosphate เมื่อทำปฏิกิริยากับ ammonium molybdate ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดเกิดเป็นสารเชิงซ้อน ammoniumphosphomolybdate (สมการที่ 1) สารนี้จะถูกรีดิวส์เป็นสารประกอบสีน้ำเงิน (molybdenum blue) (สมการที่ 2) เมื่อตัวรีดิวส์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาได้แก่ Fe^{2+} , Sn^{2+} หรือ ascorbic acid ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณฟอสเฟตที่มีอยู่ ดังสมการ

$$PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 24H^+ \longrightarrow (NH_4)_3PO_4.12MoO_3 + 21NH_4 + 12H_2O \text{ .....(1)}$$

$$(NH_4)_3PO_4.12MoO_3 \xrightarrow[\text{agent}]{\text{reducing}} \text{molybdenum blue} \quad \text{.....(2)}$$

สารละลาย

1. 10% Trichloroacetic acid solution (TCA)
2. Vanadate-Molybdate reagent เตรียมได้ดังนี้

   Solution A ละลาย ammonium molybdate 1.5 กรัม ใน 5.5% sulphuric acid solution 100 มิลลิลิตร

   Solution B ละลาย ferrous sulphate 2.7 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

   ผสม Solution A กับ Solution B
3. Standard phosphate solution ละลาย KH_2PO_4 ในน้ำกลั่นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

วิธีวิเคราะห์

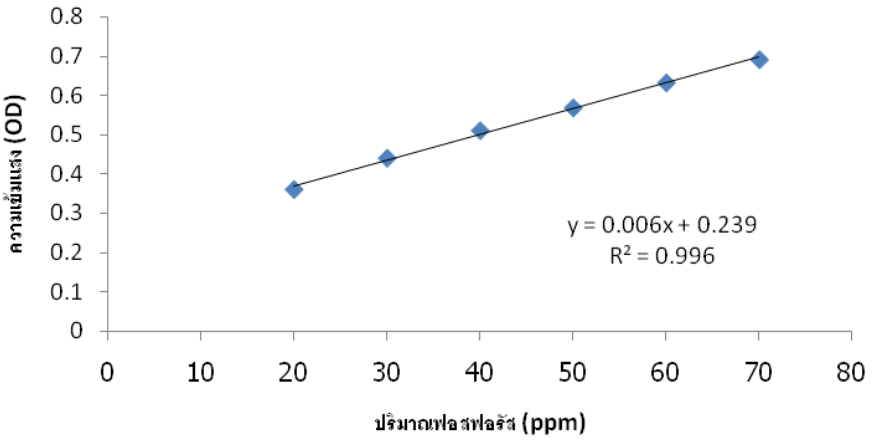
1. นำเซลล์ไปแขวนลอยใน 100 mM sodium acetate–acetic acid buffer (pH 5.5) 250 µl
2. เติม [100 mM sodium acetate–acetic acid buffer (pH 5.5) ที่มีโซเดียมไฟเตทเป็นซับสเตรทอยู่ 2 mM] 250 µl
3. หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที

4. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) trichloroacetic acid solution (TCA) ปริมาตร 500 µl
5. วัดการปลดปล่อย inorganic phosphate โดยเติม 750 µl ของสารละลาย Vanadate-Molybdate reagent
6. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร อ่านค่า soluble orthophosphate ของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น

โดย 1 unit ของเอนไซม์ phytase คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย 1 nmol inorganic phosphorous ต่อนาที ที่ 50°C

การเตรียม Standard curve

1. ปิเปต standard phosphate solution (KH_2PO_4 ละลายในน้ำ) ตั้งแต่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ในแต่ละหลอดทดลองเติม Vanadate-Molybdate reagent 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ค่า standard phosphate reagent ที่เป็น 0 เรียกว่า “reagent blank”
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ของ standard phosphate ไปพล็อตกับค่าความเข้มข้นของฟอสเฟตบนกระดาษกราฟชนิด semilog จะได้กราฟเป็นเส้นตรง



การคำนวณ

ตัวอย่างเช่น *Lact. salivarius* L5-4

- วัดความเข้มแสงของการปลดปล่อยฟอสเฟตได้ก่อนทำปฏิกิริยา OD = 0.274
- วัดความเข้มแสงของการปลดปล่อยฟอสเฟตได้หลังทำปฏิกิริยา OD = 0.329

นำค่า OD (y) มาแทนค่าในสมการ y = 0.006x + 0.239 ซึ่งเป็นสมการของกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่า X จะได้ $X_{(หลังปฏิกิริยา)}$ = 12.781 และ $X_{(ก่อนปฏิกิริยา)}$ = 4.187 แทนค่าในสมการ

ปริมาณฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจริง = $X_{(หลังปฏิกิริยา)} - X_{(ก่อนปฏิกิริยา)}$

= 12.781 – 4.187

= 8.593 ppm (mg/L)

โดย 1 unit ของเอนไซม์ phytase คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย 1 nmol inorganic phosphorous ต่อนาที ที่ 50°C

ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ phytase ที่ผลิตโดย *Lact. salivarius* L5-4 คำนวณได้จากการแปลงหน่วยของปริมาณฟอตเฟส 8.593 mg/L ให้อยู่ในหน่วย nmol/ml×min

$$= \frac{8.593 \times 1{,}000{,}000{,}000 \times 1{,}000}{95 \times 1000 \times 0.25 \times 30}$$

= 40.35 nmol/ml×min

ดังนั้น *Lact. salivarius* L5-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ phytase 40.35 U/min

ภาคผนวก ง

ยาปฏิชีวนะสำหรับวิเคราะห์

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ

- penicillin G (β-lactum group, inhibitor of cell wall) ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะอยู่ในช่วง 0.25 - 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- tetracycline (inhibitors of protein synthesis)ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะอยู่ในช่วง 0.25 - 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- chloramphenicol (broad spectrum) ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะอยู่ในช่วง 0.25 - 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- erythromycin (inhibitor of protein syntesis-gram positive spectrum) ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะอยู่ในช่วง 2-2,560 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการเตรียมยาปฏิชีวนะ

- penicillin และ tetracycline สามารถละลายได้ในน้ำกลั่น ดังนั้นยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด สามารถละลายด้วย MRS broth ได้โดยตรงเพื่อลดอิทธิพลการทำให้ MRS broth เจือจางหากละลายยาปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่น ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นของยาปฏิชีวนะเตรียมด้วยวิธีการดังนี้

เตรียม stock solution (1,000 µl/ml) โดยยาปฏิชีวนะ 0.01 กรัม ละลายใน MRS broth 10 มิลลิลิตร จะได้ยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หากต้องการปรับความเข้มข้นเป็น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบ คำนวณดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$(1{,}000\ \mu l/ml)\ V_1 = (512\ \mu l/ml)(10\ ml)$$

$$V_1 = 5.12\ ml$$

ดังนั้นยาปฏิชีวนะที่จะทดสอบต้องนำมาจาก stock solution 5.12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย MRS broth จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นเริ่มต้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น เจือจางยาปฏิชีวนะแบบ แบบ two–fold serial dilutions ด้วยอาหาร MRS broth ให้ได้ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใน 96 well polystyrene microtiter plate หลังจากนั้นศึกษาผลของยาปฏิชีวนะต่อการดื้อยาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

- chloramphenicol และ erythromycin สามารถละลายได้ใน 95% เอทานอล ดังนั้นยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดต้องละลายด้วยเอทานอลในปริมาณที่น้อยที่สุดเพื่อลดอิทธิพลของเอทานอลต่อเซลล์แบคทีเรียโดยการเตรียมยาปฏิชีวนะควรเตรียมใหมีความเข้มข้นสูงๆ คือ ละลายยาปฏิชีวนะให้หมดด้วย 95% เอทานอล ในปริมาณที่น้อยที่สุด หลังจากนั้นจึงนำมาปรับความเข้มข้นตามต้องการด้วย MRS broth ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นของยาปฏิชีวนะเตรียมด้วยวิธีการดังนี้

เตรียม stock solution (chloramphenicol 10,000 µl/ml, erythromycin 100,000 µl/ml) เช่น เตรียม erythromycin ชั่ง 0.1 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล โดยใช้ปริมาตรให้น้อยที่สุด หลังจากนั้นปรับปริมาตรยาปฏิชีวนะที่ละลายในเอทานอลด้วย MRS broth ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หากต้องการปรับความเข้มข้นเป็น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบคำนวณดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$(100{,}000\ \mu l/ml)\ V_1 = (5{,}120\ \mu l/ml)(10\ ml)$$

$$V_1 = 0.512\ ml$$

ดังนั้นยาปฏิชีวนะที่จะทดสอบต้องนำมาจาก stock solution 0.512 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย MRS broth จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าใช้ MRS broth ในการปรับความเข้มข้นในปริมาตรที่สูงมาก ดังนั้นจึงสามารถลดอิทธิพลของเอทานอลต่อเซลล์แบคทีเรียและการเจือจางของ MRS broth ได้ ซึ่งเมื่อได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเจือจางยาปฏิชีวนะแบบ แบบ two–fold serial dilutions ด้วยอาหาร MRS broth ให้ได้ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใน 96 well polystyrene microtiter plate หลังจากนั้นศึกษาผลของยาปฏิชีวนะต่อการดื้อยาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะที่ละลายด้วย 95% เอทานอล ต้องศึกษาปริมาณต่ำสุดของเอทานอล (negative control) ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก ซึ่งจากการศึกษาปริมาณเอทานอลต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ทดสอบคือ 5% เอทานอล ดังนั้น แบคทีเรียแลกติกที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ไม่ได้รับอิทธิพลของปริมาณเอทานอลต่อการยับยั้งเนื่องจากระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณเอทานอลต่ำกว่า 5%

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ ชื่อสกุล นายณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5211020034

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

ทุนการศึกษาที่ได้รับในระหว่างการศึกษา

ทุนการศึกษาจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) ปีการศึกษา 2552

Japan – East Asia Network of Exchange for Students and Youths (JENESYS programme) at Okayama University Japan.

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Natthapat Sohsomboon, Hatairat Musikrasang and Suppasil Maneerat. 2011. Evaluation of primary probiotic properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestinal tracts. Poster presentation. The 21th Thaksin University Annual Conference. Thaksin University. Thailand. May 25-28. 2011.