บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างมูลลูกสุกรและการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

จากการเก็บตัวอย่างมูลสุกรที่สดใหม่จากลูกสุกรที่มีอายุประมาณ 10-60 วัน ในแหล่งต่าง ๆ จำนวน 250 ตัวอย่าง ได้แก่ ฟาร์มสุกรจังหวัดตรัง จำนวน 100 ตัวอย่าง จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 80 ตัวอย่าง และจากฟาร์มของคณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จำนวน 70 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 306 สายพันธุ์

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จำนวน 306 สายพันธุ์ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ ตามลำดับดังนี้คือ การอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารสุกร โดยการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30 % ซึ่งเป็นความสามารถในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกระหว่างการเดินทางมายังทางเดินอาหารนั้นขึ้นกับความทนทานต่อน้ำดี (Gilliland *et al.*, 1984 ; Gilliland, 1987) น้ำดีเป็นสารเกี่ยวกับการย่อยอาหาร มีความสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญไขมัน (Charteris , 2000) น้ำดีสร้างจากคลอเรสเตอรอลในตับ และถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี หลังจากการย่อยสลายไขมันแล้วจึงปลดปล่อยสู่ลำไส้เล็กส่วน duodenum (Erkkila and Petaja, 2000) น้ำดีเป็นสารอันตรายต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี (Jin *et al.*, 1998 ; Erkkila and Petaja, 2000) ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีจึงมีความสำคัญสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Chateau *et al.*, 1994 ; Kociubinski *et al.*, 1999) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้สามารถทนเกลือน้ำดีได้จำนวน 289 สายพันธุ์ คิดเป็น 94.44 % ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ จะเห็นได้ว่าผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Erkkila and Petaja (2000) ที่ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยการทดลองในสภาวะที่คล้ายกับระบบทางเดินอาหาร ในส่วนลำไส้เล็กโดยใช้ MRS broth ที่มี pH 4-7 และเกลือน้ำดีที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ที่ pH 6.0 เนื่องจากการที่เชื้อสามารถสร้าง bile salt hydrolase enzyme (BSH) นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่า *L. johnsonii* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้มากกว่า *L.*

johnsonii BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *L. bulgaricus, L. fermenti, L. casei, L. acidophilus* และ *L. casei shirota* ที่แยกได้จากลำไส้ของสัตว์น้ำสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ในระดับร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ (shirota, 1962) และจากการทดลองของ Brennan และคณะ (1993) พบว่า *L. acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *L. acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ด้วย Gilliland (1977) ได้แยก *Lactobacillus* ที่ทนน้ำดีโดยใช้อาหาร Lactobacillus Selection Agar ซึ่งเติม oxgall 0.15 % และได้รายงานว่า *L. plantarum, L. fermentum, L. acidophilus, L. brevis* และ *L. casei* เจริญได้ดีในสภาวะดังกล่าว ส่วน *L. bulgaricus* และ *L. lactis* เจริญไม่ได้ Collins (1978) ได้แยก *L. acidophilus* ที่ทนเกลือน้ำดีโดยใช้อาหาร MRS agar ซึ่งเติม Oxgall 0.2 % Jin และคณะ (1996a) ได้ทดลองพบว่า *Lactobacillus* 7 สายพันธุ์ จัดเป็นกลุ่มต้านทานต่อน้ำดีและมี 5 สายพันธุ์ จัดเป็นกลุ่มทนทานต่อน้ำดี Kimoto และคณะ (1999) ได้ศึกษา *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* NIA 527 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ยึดเกาะกับเซลล์ enterocyte-like Caco-2 พบว่า สามารถเจริญได้บน MRS agar ที่ประกอบด้วย oxgall 0.5 – 0.9 % นอกจากนี้ Arihara และคณะ (1998) ได้ศึกษาการทนเกลือน้ำดีของเชื้อ *L. gasseri* บน MRS agar ที่มี pH 5, 6, 7 แล้วเติมเกลือน้ำดีชนิดผงเข้มข้น 0 -200 ppm พบว่า *L. gasseri* เจริญได้มากที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 125, 250 และ 500 ppm

ถึงแม้ว่ากลไกความทนทานต่อน้ำดีของ Lactobacilli จะไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก แต่น่าจะเนื่องมาจากผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันน้ำดี (Chateris *et al.*, 2000) จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายน้ำดีได้โดยเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส (bile salt hydrolase, BSH) ซึ่งช่วยลดความสามารถในการละลายของน้ำดี และทำให้การทำงานอ่อนฤทธิ์ลง (Erkkila and Petaja, 2000) แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ซึ่งรวมถึง *Lactobacillus* พบว่ามีกิจกรรมของ BSH (Gilliland and Spack, 1977)

มีปัจจัยอีกประการหนึ่งในการควบคุมจำนวนและชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร คือน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Hawlay *et al.*, 1959; Sandine, 1979) ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ดีในสภาพ pH ต่ำ สภาวะที่เป็นกรดรุนแรงของกระเพาะพัก กระเพาะขั้วกึ๋น และกระเพาะกล้ามเนื้อ จะเป็นผลร้ายต่อแบคทีเรีย (Jin *et al.*, 1998) ดังนั้นการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อเสริมการเจริญ ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดตลอดจนต้องมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Conway *et al.*, 1987; Holzapfel *et al.*, 1998) ซึ่งระดับพีเอชของลูกสุกรที่กำลังกินนมอายุ 10 – 60 วัน จะอยู่ระหว่าง 3.46 $\pm$ 0.23 –

5.02 ± 0.34 (Kidder and Manners, 1978) จึงนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 289 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้มาทดสอบสมบัติการทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 3, 4, 5 และ 6 พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 146 สายพันธุ์ คิดเป็น 50.52 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ สามารถทนกรดที่ระดับพีเอช 4 ได้ โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Gilliland (1979) ซึ่งได้รายงานถึงการทนกรดในกระเพาะอาหารของแบคทีเรียแลกติกชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *L. casei* สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คืออยู่รอดอย่างสมบูรณ์ใน 3 ชั่วโมงในสารละลาย gastric juice สังเคราะห์ ซึ่งมี pH 3.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วน *L. acodophilus* และ *L. plantarum* สามารถทนกรดได้ดีเช่นกัน (Erkkila and Petaja, 2000) ผลการทดสอบการทนต่อกรดโดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับระบบทางเดินอาหาร ภายในส่วนกระเพาะอาหารใช้ phosphate-buffered saline ที่มี pH 1-5 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่ระดับ pH 3.0 นอกจากนี้พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อก็มีผลต่อการทนกรดด้วย โดยพบว่า *L. johnsonii* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 มีความสามารถในการทนต่อกรดได้ดีกว่า *L. johnsonii* BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *L. acidophilus* ADH ทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ (Conway *et al.*, 1987) *L. gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่ระดับ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998) *Lactobacillus acidophilus* และ *L. casei* สามารถทนกรดที่ระดับ pH 4.0 ได้นานถึง 21 วัน (Shirota. 1969) มีรายงานว่าระดับ pH ของของเหลวในท่อทางเดินอาหารสุกรนั้นแตกต่างกันดังนี้ คือ ในกระเพาะอาหารมี pH ต่ำสุด (4.2-5.1) ลำไส้เล็กตอนต้นมี pH 6.2-7.1 ระดับ pH ของลำไส้เล็กตอนปลายสูงกว่าลำไส้เล็กตอนต้นเล็กน้อยคืออยู่ระหว่าง 6.8 – 8.0 ระดับ pH ของของเหลวใน caecum มีค่าประมาณ 6.5 – 7.2 ส่วน pH ของของเหลวในบริเวณลำไส้ใหญ่มีความแตกต่างกันในช่วงค่อนข้างกว้างคือ 6.4 – 8.0 (Riis and Jakobson, 1969) ดังนั้น *Lactobacillus* ที่แยกได้จากไส้ติ่งมีความทนทานต่อกรดได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่แยกจากลำไส้เล็กส่วน ileum โดยทั่วไปแล้ว *Lactobacillus* สายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ใน ileum สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาพ pH 1.0 และ 2.0 เจริญได้ดีที่ pH 3.0 สำหรับสายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ในไส้ติ่งจะมีชีวิตที่ pH 1.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงขึ้นไป มีการเจริญปานกลางที่ pH 2.0 และเจริญได้ดีมากที่ pH 3.0 และ 4.0 ตามลำดับ (Jin *et al.*, 1996a) *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* NIA 527 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ยึดเกาะที่ microvilli ของเซลล์ได้ดี มีความทนทานต่อสภาพกรดต่ำที่ pH 2.5 เป็นเวลา 30 นาที (Kimoto *et al.*, 1999)

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 146 สายพันธุ์ มาทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน เพื่อความสะดวกในการผลิตเชื้อจำนวนมาก รวมถึงการเก็บรักษาเชื้อ และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อความจำเป็นในการนำไปใช้ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบใน

ระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright, 1993) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกจำนวน 146 สายพันธุ์ คิดเป็น 100 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ นำแบคทีเรียแลกติก 146 สายพันธุ์ มาทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 พบว่ามีเชื้อจำนวน 110 สายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 ซึ่งคิดเป็น 75.34 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิลาวัณย์ (2524) ที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 ซึ่งวิตามินนี้เป็นสารที่มีราคาแพง และเป็นสารที่มีความสำคัญทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นในการคัดเลือกโปรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารจึงต้องแน่ใจว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ต้องไม่แย่งวิตามินบี 12 ในระบบทางเดินอาหารของสุกร ซึ่งอาจทำให้สุกรขาดสารอาหารได้ และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 110 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยทั้งโปรตีน ไขมัน และแป้งได้จำนวน 20 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.18% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง จะช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร ทำให้สามารถดูดซึมอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Austin และคณะ (1995) แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง เป็นการช่วยเร่งการเจริญของสุกร

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น

มีรายงานเป็นจำนวนมากกล่าวถึงความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 9799, *Salmonella typhi, E. coli, Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus, Micrococcus flavus, Clostridium perfringens* และอื่น ๆ อีกมากมายที่ส่วนใหญ่เป็นเชื้อก่อโรค รวมทั้งทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย (Neri, 1974; Pulusani *et al.*, 1979; Singh *et al.*, 1979; Collins and Aramaki, 1980; Gandhi and Nambudripad, 1980; Korhonen *et al.*, 1980; Gilliland and Martin, 1981; จารุวรรณ, 2539; ปิยะนุช, 2540; อัจฉรา, 2541; Jin *et al.*, 1996b; อรัญญา, 2542; Widerdyke *et al.*, 2004) ในขณะที่ Blomberg และคณะ (1993) พบว่า *L. plantarum* 104R ซึ่งแยกจากกระเพาะสุกรสามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E.coli* K 88 บนเยื่อเมือกลำไส้เล็กส่วน ileum ของลูกสุกรได้คิดเป็นร้อยละ 50 โดยการผลิตสารประกอบโปรตีน ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80 °C แต่ถูกทำลายด้วยโปรเนส สารประกอบโปรตีนจะไปจับกับองค์ประกอบของเยื่อเมือก จึงขัดขวางการเข้าจับโดย K88ab และ K88ac fimbriae ของ *E. coli* K88 และ Chih Tsai และคณะ (2005)

ระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright, 1993) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติก จำนวน 146 สายพันธุ์ คิดเป็น 100 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบสามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ นำแบคทีเรียแลกติก 146 สายพันธุ์ มาทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 พบว่ามีเชื้อจำนวน 110 สายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 ซึ่งคิดเป็น 75.34 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิลาวัณย์ (2524) ที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 ซึ่งวิตามินนี้เป็นสารที่มีราคาแพง และเป็นสารที่มีความสำคัญทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นในการคัดเลือกโปรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารจึงต้องแน่ใจว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ต้องไม่แย่งวิตามินบี 12 ในระบบทางเดินอาหารของสุกร ซึ่งอาจทำให้สุกรขาดสารอาหารได้ และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 110 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยทั้งโปรตีน ไขมัน และแป้งได้จำนวน 20 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.18% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง จะช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร ทำให้สามารถดูดซึมอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Austin และคณะ (1995) แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง เป็นการช่วยเร่งการเจริญของสุกร

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น

มีรายงานเป็นจำนวนมากกล่าวถึงความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 9799, *Salmonella typhi, E. coli, Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus, Micrococcus flavus, Clostridium perfringens* และอื่น ๆ อีกมากมายที่ส่วนใหญ่เป็นเชื้อก่อโรค รวมทั้งทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย (Neri, 1974; Pulusani *et al.*, 1979; Singh *et al.*, 1979; Collins and Aramaki, 1980; Gandhi and Nambudripad, 1980; Korhonen *et al.*, 1980; Gilliland and Martin, 1981; จารุวรรณ, 2539; ปิยะนุช, 2540; อัจฉรา, 2541; Jin *et al.*, 1996b; อรัญญา, 2542; Widerdyke *et al.*, 2004) ในขณะที่ Blomberg และคณะ (1993) พบว่า *L. plantarum* 104R ซึ่งแยกจากกระเพาะสุกรสามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E.coli* K 88 บนเยื่อเมือกลำไส้เล็กส่วน ileum ของลูกสุกรได้คิดเป็นร้อยละ 50 โดยการผลิตสารประกอบโปรตีน ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80 °C แต่ถูกทำลายด้วยโปรเนส สารประกอบโปรตีนจะไปจับกับองค์ประกอบของเยื่อเมือก จึงขัดขวางการเข้าจับโดย K88ab และ K88ac fimbriae ของ *E. coli* K88 และ Chih Tsai และคณะ (2005)

ศึกษาความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกจากสุกรและสัตว์ปีก จำนวน 31 และ 15 สายพันธุ์ ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์คือ LAP 5 และ LF 33 ซึ่งแยกได้จากลำไส้สุกร และสัตว์ปีก ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง และการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 โดยวิธี Agar spot พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 สายพันธุ์ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 ได้ทั้งในสรูปที่มีและไม่มีออกซิเจน และเมื่อทดสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ L74. L124, L125, L134, L164 และ L281 สามารถยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 , *E. coli* K 88 และ *E. coli* K99 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 90% คุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นกลไกสำคัญที่ช่วยป้องกันการบุกรุกหรือการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อโรคต่าง ๆ แบคทีเรียก่อโรคที่มักเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารส่วนมาก ได้แก่ *Campylobacter, Escherichia coli* และ *Salmonell* sp. (Garriga *et al.*, 1998) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ จะไปขัดขวางกลไกการทำงานของเนื้อเยื่อภายในร่างกายสัตว์ แย่งดูดซึมอาหารจากสัตว์ และสร้างสารพิษหรือน้ำย่อยที่สามารถทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ควรมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งนอกจากจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคติดเชื้อในสัตว์แล้ว ยังสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาใช้ในระดับการรักษาโรคติดเชื้อได้ สาเหตุที่แบคทีเรียแลกติก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้นั้น มีผู้ศึกษาถึงสารที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น พอสรุปเป็น 3 ประการ คือประการแรกการยับยั้งการเจริญเกิดจากแบคทีเรียแลกติกสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก หรือกรดอะซิติก มีผลทำให้ระดับความเป็นกรดเป็นด่างลดลง ไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด (Spillman *et al.*, 1978; Parkul *et al.*, 1979; Amster and Jost, 1980: Gilliland, 1985; Schillinger and Lucke, 1989; Klaenharmmer, 1993; Jin *et al.*, 1996b; Garriga *et al.*, 1998) หรือประการที่สองเชื้ออาจใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง มีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย (Gilliland and Speck, 1977) สามารถทำลายโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลกรดนิวคลีอิคและโปรตีน นอกจากนี้การยับยั้งยังอาจเกิดจากผลร่วมกันระหว่างกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Dahiya and Speck, 1968; Price and Lee, 1978; Reiter, 1978; Collins and Aramaki, 1980, Talon *et al.*, 1980) และสาเหตุประการสุดท้ายเนื่องจากการสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นในกลุ่มที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ที่ผลิตสารนี้ บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

ได้ (Barefoot and Klaenharmmer, 1983; Murina and Klaenharmmer, 1991; Biswas *et al.*, 1991; Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Gonzalez *et al.*, 1994) ทั้งนี้แม้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สร้างแบคเทอริโอซินได้ แต่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น ดังนั้นสารยับยั้งพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นจึงมีความสำคัญมากกว่า เนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งได้กว้างกว่า โดยสามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค (Ogawa *et al.*, 2001; Saarela *et al.*, 2000) และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อโปรไบโอติก (Saarela *et al.*, 2000) จากการนำ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งหลังจากการผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ catalase เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ pepsin, protease และ proteinase K เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน และเอนไซม์ amylase เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นคาร์โบไฮเดรต พบว่า การทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase ส่วนใสมีการยับยั้งลดลง แสดงว่าเชื้อมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ pepsin, protease และ proteinase K พบว่าส่วนใสมีการยับยั้งลดลงเช่นกัน แสดงว่าเชื้อมีการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์ amylase พบว่าขนาดขอบวงใสการยับยั้งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงว่าเชื้อไม่มีการผลิตสารยับยั้งที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นจะมีความไวต่อเอนไซม์แตกต่างกัน เช่น Plantaricin C ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LL441 ที่ไวต่อเอนไซม์ pronase, trypsin และ chymotrypsin (Gonzalez *et al.*, 1994) pediocin AcH ที่ผลิตโดย *L. plantarum* WHE92 ไวต่อเอนไซม์ pepsin, trypsin, chymotrypsin , pronase และficin แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ catalase, amylase และ lipase (Ennahar *et al.*, 1996) Lactocin A เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. amylovorus* LMGP-13139 ไวต่อเอนไซม์ proteinase K, trypsin และ chymotrypsin แต่ไม่ไวต่อ catalase, amylase, lysozyme และ lipase (Contreras *et al.*, 1997) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. lactis* KCA2386 ไวต่อเอนไซม์ pronase แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ amylase, lysozyme และ RNase (Ko and Ahn, 2000) และแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* F1 และ *L. brevis* OG1 ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ไม่ไวต่อ lipase, catalase, phospholipase C, amylase, lysozyme และ dextranase เช่นเดียวกัน (Ogunbanwo *et al.*, 2003)

จากการทดสอบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ นอกจากเป็นกรดอินทรีย์แล้วยังมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ

จากการทดสอบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ นอกจากเป็นกรดอินทรีย์แล้วยังมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารประกอบโปรตีนด้วย และจากการทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี agar spot พบว่าผลการยับยั้งเชื้อ β-hemolytic *E. coli* 240/2 โดยแบคทีเรียแลกติกในสภาพที่มีออกซิเจนสามารถยับยั้งได้ดีกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจนดังกล่าวข้างต้น ก็น่าจะมีสาเหตุมาจากสารยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งนี้เพราะสารนี้ถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

3. การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

การใช้ยาปฏิชีวนะในทางการแพทย์และใช้ในการกระตุ้นการเติบโตของสัตว์ ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์โตเร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริม เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์มักเกิดปัญหาขึ้นเนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินกว่าที่กำหนด การใช้นานเกินโดยไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า ทำให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อดื้อยาที่ใช้บางชนิด โดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคน จึงทำให้เกิดปัญหาการรักษาในภายหลัง ทำให้ลักษณะการดื้อยาของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่น่าเป็นห่วงมากในการรักษาโรคติดเชื้อ แต่สำหรับแบคทีเรียแลกติกพวกแลกโตบาซิลลัสแม้มีการดื้อยาโดยธรรมชาติอย่างกว้างขวาง แต่การดื้อยาส่วนใหญ่ของแลกโตบาซิลลัสไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ ดังนั้นการนำแบคทีเรียแลกติกมาเสริมในอาหารเพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ สำหรับรูปแบบการดื้อยาของแลกโตบาซิลลัสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค (Charteris *et al.*, 1998) และการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในอาหารสัตว์ ก็เป็นคุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก (Havenaar *et al.*, 1992; Nousiainen and Stela, 1998) ซึ่งจากการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก จำนวน 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion ตามวิธีของ Charteris และคณะ (1998) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ chloramphinicol และ erythromycin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ amikacin, nalidixic acid และ polymycin B

4. การศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

การเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็นสมบัติที่ต้องการอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก จึงได้นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษาการเจริญในอาหาร MRS broth ในสภาพที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm และไม่มีการเขย่า พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์ มี lag phase ใกล้เคียงกันคือประมาณ 3 ชั่วโมง เจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L124 เจริญได้ดีที่สุดโดยมีค่า generation time เท่ากับ 2.25 และ 2.00 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนโปรไบโอติกแบคทีเรียสายพันธุ์ L74 เจริญช้าที่สุด มีค่า generation time เท่ากับ 3.00 และ 2.80 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญในสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า พบว่าเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์มีการเจริญในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าดีกว่าสภาวะที่มีการเขย่า คือมีค่า generation time 2.00 – 2.80 ชั่วโมง และ 2.25 – 3.00 ชั่วโมง ตามลำดับ

5. การเทียบเคียงชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

ชนิดของ *Lactobacillus* ในระบบทางเดินอาหารสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (Gilliland *et al.*, 1975) *Lactobacillus* ที่มักพบในระบบทางเดินอาหารได้แก่ *L. acidophilus, L. bifidus, L. casei, L. fermentum* และ *L. plantarum* (Gilliland, 1979) เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกและมีการเจริญเติบโตได้ดีมาทำการศึกษาลักษณะต่าง ๆ และบ่งชี้ชนิดด้วย program computer ของบริษัท Biomerieux พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นชนิดเดียวกันคือ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของวิลาวัณย์ (2524) ได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการทดลองเสริมอาหารสุกรในรูปเชื้อแห้งได้ 6 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus* (I9, K2, P6, T20, N1 และ T2) ซึ่งแยกได้จากมูลสุกรและเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *L. plantarum* ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกหลายชนิดมาใช้เป็นอาหารเสริมเลี้ยงสุกรเช่น *B. cereus* (Zani *et al.*, 1998) *Bacillus licheniformis, B. toyoi* (Kypiakis *et al.*, 1999) *Enterococcus faecium* 18C23 (Jin *et al.*, 2000) *Lactobacillus acidophilus* (Carlos *et al.*, 2002) *Lactobacillus johnsonii* และ *Lactobacillus reuteri* (Haberer *et al.*, 2003) *L. casei* shirota (LCS) (Ohashi *et al.*, 2004) *Enterococcus faecium* SF 68 (Scharek *et al.*, 2005) เป็นต้น สำหรับ *L. plantarum* จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกได้ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539