รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียและมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ

Isolation, identification and exploitation of probiotic properties and antimicrobial agent against on gastrointestinal and urogenital pathogen from difference source of lactic acid bacteria

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

โดย

ดร. พรรณนภา เภาทอง

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2554

ชื่อเรื่อง : การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียและมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ
ผู้วิจัย : ดร.พรรณนภา เภาทอง สถาบัน: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีที่พิมพ์ : 2556 สถานที่พิมพ์: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต
จำนวนหน้างานวิจัย 165 หน้า คำสำคัญ: lactic acid bacteria, antimicrobial activity, Probiotics
ลิขสิทธิ์ : ดร.พรรณนภา เภาทอง

บทคัดย่อ

แลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 700 ตัวอย่างที่แยกเพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ของไทย (160 ตัวอย่าง) ลำไส้ไก่(10 ตัวอย่าง) ลำไส้หมู(10 ตัวอย่าง) ดิน(10 ตัวอย่าง) และ คีเฟอร์ (2 ตัวอย่าง) รวมทั้งหมด 192 ตัวอย่าง นำมาตรวจกรองหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะทั้งสิ้น 20 ชนิดด้วยวิธี direct spot agar พบว่ามี 48 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด จากนั้นจึงนำมาทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก ประกอบด้วย การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ การทนต่อสภาวะที่เป็นเกลือ, กรด, และเกลือน้ำดี, ความไวต่อยาปฏิชีวนะ, การทดสอบ hydrophobicity, การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และspot on lawn technique ซึ่งพบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก และมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคจำนวนทั้งสิ้น 10ไอโซเลท เมื่อนำมาจำแนก สปีชีส์ ด้วยชุดทดสอบAPI 50CH พบว่ามี4ไอโซเลทอยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus plantarum* มี 2ไอโซเลทอยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus pentosus* มี1ไอโซเลทอยู่ในสปีชีส์ *LactococcuslactisLactis* และอีก 3ไอโซเลทอยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus bevis* ดังนั้นโพรไบโอติกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลองในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารต่อไปได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Title: Isolation, identification and exploitation of probiotic properties and antimicrobial agent against on gastrointestinal and urogenital pathogen from difference source of lactic acid bacteria

Researcher: Pannapa Powthong Ph.D.

Institution: Faculty of Medical Technology, Rangsit University

Year of Publication: 2013 Publisher: Faculty of Medical Technology, Rangsit University

Sources: Research Institute No. of page: 165 pages

Keyword: lactic acid bacteria, antimicrobial activity, Probiotics

Copyright: Pannapa Powthong Ph.D.

ABSTRACT

A total of 700 lactic acid bacteria were isolated from 192 samples of traditional Thai fermented food (160 samples) chicken intestines (10 samples), pork intestines (10 samples), soil (10 samples), and kefir (2 samples). Antimicrobial activities of all isolates grown under oxygen-restricted conditions to eliminate the effect of hydrogen peroxide were tested against 20 intestinal and urogenital pathogenic bacterial using direct spot agar technique. Forty-eigth isolates exhibited antimicrobial activity against at least one indicator strain tested. The characterization of the microorganism as probiotic were tested by temperature tolerant, bile salt tolerant, acid tolerant, salt tolerant, antibiotic sensitivity, cell surface hydrophobicity, haemolysis test, and spot on lawn technique. Results showed that there were 10 isolates which showed effective antimicrobial activities and probiotic properties. Diversity of lactic acid bacteria with antimicrobial activities was studied by identification to the species level of the 8 isolates by using API 50 CHL test kit. Of the 8 isolates, 4 isolates were identified as *Lactobacillus plantarum*, the other 4 isolates were identified as *Lactobacillus pentosus* (2 isolates), *Lactococcuslactis Lactis* (1 isolates), and *Lactobacillus bevis* (3 isolate). Therefore, these strains may have potential use as an alternative to antibiotics. The strains can also be used to produce antimicrobial compounds which can be a substitute for chemical preservatives in food industry.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน โดยเฉพาะ ดร. อภิชัย ศรีเพียร และ ดร.พัตรา สุนทรฐิติเจริญ อาจารย์คณะเทคนิคการแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำ ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งให้คำแนะนำทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ และ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์, สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ประโยชน์ที่พึงได้รับจากรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้ทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้

ดร.พรรณนภา เภาทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(4)
สารบัญรูปภาพ	(6)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แลคติกแอสิดแบคทีเรีย	4
2.2 การจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	5
2.3 กระบวนการหมักกรดแลคติค (Lactic acid fermentaton)	12
2.4 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียแลคติก	15
2.5 สารยับยั้งที่ได้จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (Antimicrobial substance)	16
2.6 การประยุกต์ใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรีย	29
2.7 ประโยชน์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	35
2.8 โพรไบโอติก (Probiotics)	39
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของโพรไบโอติกแบคทีเรียทางสรีรวิทยาในมนุษย์	49
2.10 การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ	54
2.11 การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร	60
2.12 หลักการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก	66
2.13 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count)	69

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย 72

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 72

3.2.1 เครื่องมือ 72

3.2.2 อุปกรณ์ 73

3.2.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ 73

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี 75

3.3 วิธีการทดลอง 75

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง 75

3.3.2 การทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย 75

3.3.2.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่าง 75

3.3.2.2 การจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตามลักษณะทางชีวเคมี 76

3.3.2.3 การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยวิธี direct agar spot method 76

3.3.2.4 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ 77

3.3.2.5 การศึกษาการทนต่อกรด 78

3.3.2.6 การศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดี 78

3.3.2.7 การศึกษาการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ 78

3.3.2.8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 78

3.3.2.9 การศึกษา Cell surface hydrophobicity 79

3.3.2.10 การศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย 79

3.3.2.11 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn 79

3.3.2.12 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 80

มหาวิทยาลัยราชภัฏ Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง	82
4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยวิธี direct spot method	86
4.3 จำนวนและลักษณะทางชีวเคมีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจแยกตามตัวอย่างอาหาร	93
4.4 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ	96
4.5 การทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ในการทนต่อความเป็นกรด	99
4.6 การทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ในการทนต่อเกลือน้ำดี	102
4.7 การทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์	105
4.8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	108
4.9 การทดสอบ Cell surface hydrophobicity	111
4.10 การทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย	113
4.11 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn	116
4.12 อนุกรมวิธานของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	116
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	**117**
บรรณานุกรม	**132**
ภาคผนวก	**146**
ประวัติผู้วิจัย	**162**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สปีชีส์ของ *Lactobacillus* ในกลุ่มต่างๆ แบ่งตามลักษณะการใช้น้ำตาลและการสร้างสารยับยั้ง	11
2.2	การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามลักษณะขบวนการหมัก	12
2.3	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารยับยั้ง (inhibitory substance) ที่สร้างจาก แบคทีเรียแลคติกกับยาปฏิชีวนะ (antibiotic)	23
2.4	คำนิยามของโปรไบโอติก	41
2.5	จุลชีพที่ใช้เป็นสาร probiotics	42
2.6	ตัวอย่างของแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค	42
2.7	แสดงการเปรียบเทียบสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ	49
2.8	Causative agents of urinary tract infection	54
4.1	จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง	82
4.2	ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ 20 ชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ	86
4.3	ร้อยละการตรวจพบไอโซเลทที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพแยกตามชนิดเชื้อทดสอบ	90
4.4	ร้อยละการตรวจพบไอโซเลทที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพแยกตามชนิดเชื้อทดสอบ	91
4.5	จำนวนและลักษณะทางชีวเคมีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจแยกตามตัวอย่างอาหาร	93
4.6	ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ	96
4.7	ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อความเป็นกรด	99
4.8	ผลการทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่างๆ	102
4.9	ผลการทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	105
4.10	ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	108

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.11	ผลการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	113
4.12	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn	116
ภาคผนวกที่ 1	การแปลผลสำหรับการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion	156
ภาคผนวกที่ 2	Cell surface hydrophobicity	157

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
2.1	การผลิตแลคติคโดยกระบวนการหมักแบบ homofermentation และ heterofermentation	14
2.2	โครงสร้างของไนซิน	24
4.1	แสดงการเปรียบเทียบค่า hydrophobicity index ของไอโซเลทต่างๆ ด้วยสารละลาย Xylene, Toluene และ Octan	112
ค.1	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	160
ค.2	ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี direct agar spot method	160
ค.3	ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของ ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50CHL	161

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	Acid
A. hydrophila	=	*Aeromonas hydrophila*
Bifidobacterium spp.	=	*Bifidobacterium* species.
β	=	Bêta
BSM	=	Bacteriocin screening medium
cm	=	Centimeter
CFU	=	Colony Forming Unit
C. freundii	=	*Citrobactor freundii*
dl	=	Deciliter
^{o}C	=	Degree celcious
E. coli	=	*Escherichia coli*
E. agglomerans	=	*Enterobacter agglomerans*
et al.	=	and others
E. tarda	=	*Edwardsiella tarda*
γ	=	Gamma
HPBI	=	Hydrophobicity index
K	=	Alkaline
α	=	Alpha
Lactobacillus sp.	=	*Lactobacillus* species.
μm	=	Micrometer
μl	=	Microliter
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
MRS	=	Man – Rogosa-Sharoe agar
NaCl	=	Sodium Choride
nm	=	Nanometer
OD	=	Ornithine decarboxylase

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

%	=	Percent
P. mirabilis	=	*Proteus mirabilis*
P. rettgeri	=	*Providencia rettgeri*
P. aeruginosa	=	*Pseudomonas aeruginosa*
NaCl	=	Sodium chloride
S. aureus	=	*Staphylococcus aureus*
S. rubidaea	=	*Serratia rubidaea*
S. marcescens	=	*Serratia marcescens*
S. saprophyticus	=	*Staphylococcus saprophyticus*
S. agalactiae	=	*Streptococcus agalactiae*
S. typhi	=	*Salmonella* typhi
S. paratyphi	=	*Salmonella* paratyphi *A*
S. flexneri	=	*Shigella flexneri*
S. boydii	=	*Shigella boydii*
TSI	=	Triple Iron Sugar
TSB	=	Tryptic Soy Broth
VP	=	Voges-Proskauer
V. cholerae	=	*Vibrio cholera*
Y. enterocolitica	=	*Yersinia enterocolitica*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาของปัญหา

เชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบต่างๆของเรานั้น มีทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อร่างกาย เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายจะทำหน้าที่ในการสนับสนุนระบบต่างๆ ในร่างกาย ช่วยในการดูดซึมสารอาหารของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่และยังช่วยควบคุมแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อร่างกายด้วย ในขณะเดียวกันแบคทีเรียบางชนิดอาจก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคอุจาระร่วง โรคลำไส้อักเสบ โรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ บางชนิดอาจผลิตสารก่อมะเร็ง และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ระหว่างกระบวนการเผาผลาญพลังงาน รวมถึงเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก เช่น แอมโมเนีย เอมีน และฟีนอล ซึ่งอาจจะเป็นอันตราย ปกติร่างกายเราจะมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้อยู่แล้วในปริมาณมาก แต่ด้วยวิถีการดำรงชีวิตทำให้มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายไม่สมดุลหรือมีปริมาณลดลง ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ได้แก่ การกินยาปฏิชีวนะ การกินยาแก้ปวดบ่อยๆ กินอาหารที่มีไขมันสูงน้ำตาลและโปรตีนสูงหรือกินอาหารไม่สมดุล การดื่มแอลกอฮอล์ และสูบบุหรี่ ความเครียดหรือความวิตกกังวล เป็นต้น จากปัญหาดังกล่าวทำให้ความมีความพยายามหากลวิธีใหม่ๆ ในการต่อต้านกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในร่างกายรวมถึงการเสาะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพิ่มสูงขึ้น สารดังกล่าวต้องมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคและสารที่ได้ต้องมีความปลอดภัยต่อการบริโภค

แลคติคแอซิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจากกระบวนการหมักของคาร์โบไฮเดรต และยังสามารถสร้างผลิตภัณฑ์อื่น เช่น formic, benzoic acids, hydrogen peroxide, siderophore, reuterin, acetoin and bacteriocins, (Delgado *et al.*, 2001) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการผลิตอาหารหมัก ตัวอย่างเช่น โยเกิร์ต, เนยแข็ง และไส้กรอก เป็นต้น แลคติคแอซิดแบคทีเรียได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรืออาจเติมแลคติคแอซิดแบคทีเรียในรูปเชื้อตั้งต้น (starter culture) ลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus* spp.,*Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp.และ *Carnobacterium* spp. (Stiles *et al.* 1991) ในร่างกายของมนุษย์มีแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลากหลาย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร แลคติคแอซิดแบคทีเรียหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในมนุษย์ เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า โพรไบโอติก (Probiotics) ซึ่งมีรากศัพท์เดิมจากภาษากรีก ที่หมายถึง "เพื่อชีวิต" มีการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาใช้เป็นเวลานานกว่า 100 ปีแล้ว เพื่อรักษาโรคติดเชื้อของเยื่อบุเมือกต่างๆ ในร่างกาย เช่น ทางเดินอาหาร ลำไส้ ช่องคลอด แต่ปัจจุบันคนส่วนใหญ่ยังขาดความรู้ความเข้าใจถึงกลไกบทบาทหน้าที่และคุณสมบัติของโพรไบโอติกอย่างแท้จริง และแบคทีเรียยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโพรไบโอติกในการป้องกันและรักษาโรคกำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และเอเชีย เนื่องจากมีความปลอดภัยสูง ไม่มีผลข้างเคียง และเป็นการรักษาที่ต้นเหตุของโรค ซึ่งเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างร่างกายมนุษย์และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีหลักฐานการศึกษาที่ชัดเจนว่า โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการป้องกันและลดอาการของโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารได้และมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะภูมิแพ้ เสริมสร้างการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน ตลอดจนการรักษาและป้องกันโรคต่างๆได้อีกหลายโรค

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพาะเลี้ยงและแยกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ และนำมาตรวจกรองหาฤทธิ์ในการเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียและฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ เพื่อที่จะสามารถนำความรู้ความเข้าใจไปใช้เพื่อผลิตหรือปรับปรุงดัดแปลงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และนำไปพัฒนาสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. คัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ลำไส้สัตว์, ดิน, อาหารหมักดองต่างๆ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและผลิตแบคเทอริโอซินได้
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านสรีรวิทยา และชีวเคมีของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย
3. เพื่อศึกษาและระบุสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกและเปรียบเทียบโพรไบโอติกแบคทีเรียจากแหล่งที่มาต่างๆ รวมถึงศึกษาคุณสมบัติด้านสรีรวิทยาพันธุศาสตร์ และชีวเคมีของแบคทีเรียเหล่านั้นและศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ *Citrobacter freundii, Enterobacter agglomerans, Serratia rubidaea, Serratia marcescens, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Providencia rettgeri* และความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร ได้แก่ *Aeromonas hydrophila,*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Edwardsiella tarda, Escherichia coli, Salmonella Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Shigella flexneri, Shigella boydii, Staphylococcus aureus, Vibrio cholera Yersinia enterocolitica* รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก เช่น การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การทนต่อกรดและเกลือน้ำดี การทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง ทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะ การประเมินความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรีย (hydrophobicity) รวมทั้งการศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบต่างๆโดยวิธี spot-on-lawn

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ เนื่องจากคนไทยป่วยเป็นโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะบ่อยครั้งและมากขึ้นทุกปี ทั้งนี้มีสาเหตุอันเนื่องมาจากคนไทยมีสุขอนามัยที่ไม่ถูกต้อง หรือต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีแบคทีเรียในกลุ่มนี้กระจายตัวมากขึ้น ปัจจุบันการรักษาโรคดังกล่าวต้องใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิด แต่เนื่องจากการใช้วิธีการเหล่านี้รักษาจะทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และอาจทำให้เกิดการดื้อยาได้ในอนาคต ดังนั้นวิธีการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อใช้ในป้องกันและบำบัดโรคที่มีราคาถูกและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2. การนำโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือพัฒนาในเชิงพาณิชย์ อาทิเช่น นมเปรี้ยว นมหมัก โยเกิร์ต และเนยแข็ง เป็นการส่งเสริมให้ประชาชนทั่วไปได้รับประทานผลิตภัณฑ์ที่ดีในราคาที่ย่อมเยาและที่สำคัญสามารถป้องกันโรคในกลุ่มดังกล่าวได้อีกทางหนึ่งด้วย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติคแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bateria : LAB) จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นพวกแกรมบวกไม่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนยาว ท่อนสั้นหรือกลม หรือเกาะกันเป็นสายยาว รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม ไม่ผลิตเอนไซม์ catalase (อัจฉราพร, 2546) เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะขาดสารไซโตโครม(cytochromes) และพอร์ไฟริน (prophyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์ catalase และ oxidase สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาลและสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนมากไม่ต้องการอากาศเลย(anaerope) หรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย(Microaerophile) แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็สามารถเจริญเติบโตได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดได้ออกซิเจนโดยผ่านเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (flavoprotein oxidase) และใช้ออกซิเจนในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือใช้เพื่อรีออกซิไดซ์ NADH ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการดีไฮโดรจิเนชั่นของน้ำตาล อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 °C ช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ดีที่ pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดหรือด่าง (Salminen & Wright, 1993) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ความต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อน (fastidious microorganism) ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารช่วยในการเจริญ และวิตามินต่างๆ เช่น ไบโอติน(Biotin) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส(manganese) แมกนีเซียม (magnesium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) วิตามิน (vitamin) กรดอะมิโน (amino acid) ไพริมิดีน (pyrimidine) เพปโตน(peptone) อะซิเตต (acetate) และทวีน80 (Tween 80) เป็นต้น และต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดหมักได้ โคโลนีขนาดเล็ก สามารถทนกรดได้ดี แหล่งที่พบแลคติคแอซิดแบคทีเรียได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากนม อาหารหมักดองต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในโพรงจมูก สิ่งปฏิกูลต่างๆ เป็นต้น ปัจจุบันแลคติคแอซิดแบคทีเรียถูกจัดจำแนกเป็น 12 สกุล ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติค รวมถึงข้อมูลด้านพันธุกรรม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.2 การจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

2.2.1 การจำแนกในระดับจีนัส

เป็นการจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยศึกษารูปร่าง เช่น รูปกลม และรูปแท่ง เป็นต้น การเรียงตัว เช่น คู่สี่ โซ่ และคู่ การหมักน้ำตาลกลูโคส(glucose fermentation) มี 2 แบบ คือ homofermentative และ heterofermentative การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การเติบโตที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C การสร้างไอโซเมอร์ของกรดแลคติกในระหว่างการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีทั้งแบบ D และ L การเติบโตที่ระดับ pH 4.4 และ 9.6 เป็นต้น

2.2.2 การจำแนกในระดับสปีชีส์

เป็นการจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยดูความสัมพันธ์ของ DNA การใช้ 16s rRNA มาช่วยในการจำแนก ทำให้สามารถนำมาใช้ในการเขียนสายวิวัฒนาการเพื่อจัดกลุ่มของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยอาศัยการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ การไฮโดรไลซิสอาร์จีนีน (argenine) การสร้างอะซิโตน (acetone) การทนต่อเกลือน้ำดี ชนิดของการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง(hemolysis) การสร้าง extracellular polysaccharide การสร้างเอนไซม์ β-galactosidase และ β-glucuronidase การศึกษาทางซีรัม (serological typing) การศึกษาส่วนประกอบของกรดไขมัน electrophoresis ของ lactate dehydrogenase (LDH) และการศึกษาสัดส่วน G+C content เป็นต้น เดิมมีการแบ่งแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็น 4 สกุล คือ *Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc* และ *Lactobacillus* แต่ในปัจจุบันได้มีการจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียใหม่โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียจากคุณสมบัติต่างๆ ได้ดังนี้ คือ แบคทีเรียสกุล *Aerococcus, Carnobacterium, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactococcus, Oneococcus, Enterococcus, Bifidobacterium, Propionibacterium, Lactobacillus, Weissella, Vagococcus, Tetragenococcus, Streptococcus* และ *Pediococcus*

2.2.2.1 แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามรูปร่างลักษณะการเรียงตัว คือ

1) เชื้อรูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus, Bifidobacterium* และ *Carnobacterium*

2) เชื้อรูปร่างกลม โดยมีการแบ่งเซลล์ 2 ระนาบเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ *Aerococcus, Tetragenococcus* และ *Pediococcus*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3) เชื้อรูปร่างกลม เป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus* และ *Leuconostoc*

นักจุลชีววิทยาบางคนจัด *Bifidobacterium* ไว้ในกลุ่มที่ให้กรดแลคติกด้วย แม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกก็ตาม ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้เพิ่มเติมอีก

2.2.2.2 การจัดจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถแบ่งได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ (มีชัย, 2554)

1) *Streptococcus* spp.

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 – 1.2µm จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) Streptococcus เป็น facultative anaerobic ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ให้ผลcatalase เป็นลบ ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ บางสายพันธุ์ต้องการกรดอะมิโน วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน และกรดไขมัน เป็นต้น มีการเจริญที่อุณหภูมิ 20-42 °C ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ รวมทั้งสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรค และสปีชีส์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมการหมัก (Hardie and Whilej, 1995) บางสปีชีส์มีการสร้างแคปซูล และมีหลายสปีชีส์ที่มีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่มีซูโครส

2) *Vagococcus* spp.

เป็นแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus และ fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *streptococci* กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles & Holzapfel, 1997) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม หรือรูปไข่ ท่อนสั้น เซลล์อยู่เป็นแบบเดี่ยว ๆ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นเซลล์ที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10 °C แต่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 °C สามารถเติบโตได้ในบริเวณที่มีเกลือแกง 4% แต่ไม่เติบโตในบริเวณที่มีเกลือแกง 6.5% ใน pH ที่ 9.6 จะไม่พบการเติบโตของเชื้อนี้ เป็นเชื้อที่มีปริมาณเบสกัวนีน และไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ 33.6 %โมล แหล่งที่พบเชื้อนี้ คือ ปลา อุจจาระ น้ำ และอาหาร (บุษกร, 2545)

3) *Lactococcus* spp.

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 µm จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10°C แต่ไม่เจริญที่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

45°C พบในแหล่งต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus Lactis* ssp. Lactic, *Lc. Lactis* ssp. cremoris, *Lc. lactis* ssp. hordniae, *Lc. Garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มี mol % G + C ระหว่าง 34 – 43 % (Teuber, 1995) เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากแบคทีเรียสกุล *streptococcus* ติดสีแกรมบวก ไม่มีแคปซูล และเคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์catalase ต้องการอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10-30°C แต่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45°C พบได้ในนม และผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่าง ๆ

4) *Enterococcus* spp.

เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติก ชนิดL (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่ 10 °C หรือ 45 °C บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ catalase เทียมได้ และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่ กลุ่ม *Enterococcus faecalis*, กลุ่ม *Ent. avium*, กลุ่ม *Ent. gallinarum* และกลุ่ม *Ent. cecorum* มี mol % G + C ระหว่าง 37--40 % (Devriese & Pot, 1995)

5) *Pediococcus* spp.

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36--1.43 µm แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส(tetrad formation)ในสภาวะไม่มีออกซิเจน ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย Pediococcus สามารถเจริญได้เมื่อมี vancomycin หรือ avoparcin (50 ml/L) จึงทำให้สามารถจำแนก *Pediococcus* spp. ออกจากแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมชนิดอื่นได้ ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Stiles & Hozapfel, 1997) มี mol % G + C ระหว่าง 34 – 44 % (Simpson & Taguchi, 1995) โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 mm. ขอบเรียบ กลม สีไม่แตกต่างกัน เป็นพวกที่เติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน(aerobe) บริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน(facetative anaerobe) ทำให้เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลกติก ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารจะเจริญตามรอยแทง (stab) และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอด ไม่ทำให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์ มักพบในอาหารหมัก ไม่ค่อยพบในนม และผลิตภัณฑ์นม (วิลาวัณย์, 2536)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

6) *Tetragenococcus* spp.

Tetragenococcus halophilus เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์หรือคู่ หรือเซลล์เดี่ยว ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นสี่เซลล์ และ คุณสมบัติทางการเจริญเป็นเชื้อที่เจริญได้ช้าบนอาหารแข็ง มี colony เป็นทรงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm. ผิว colony เรียบ และมีสีขาวเทา ใช้เวลา 4-5 วันสำหรับการเจริญเติบโตในอาหารเหลว คุณสมบัติทางสรีรวิทยา เป็นเชื้อที่ต้องการ pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตระหว่าง 7-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 30-35 °C เป็นแบคทีเรียชอบเค็ม สามารถเติบโตได้ในที่ที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง18% คุณสมบัติทางชีวเคมี เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ชนิด homofermentative ที่หมักน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกที่มีไอโซเมอร์แบบแอล (L) และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บ้างเล็กน้อย ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ catalase ไม่ย่อยอาร์จีนีน (arginine) ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท แต่สามารถหมักน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) ไรโบส (ribose) มอลโทส(maltose) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) มอลโทไทรโอส (maltotriose) กลีเซอรอล (glycerol) และมีค่าเปอร์เซ็นต์โมลของ G+C เป็น 34-36 %

7) *Aerococcus* spp.

เซลล์มีรูปร่างกลม ลักษณะการแบ่งตัวเป็นคู่หรือเป็นสี่เซลล์ติดกันเหมือนกับ *Pediococcus* แต่มีลักษณะที่แตกต่างคือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงที่ pH เท่ากับ 9 ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaeequi* ตามลำดับ โดย *A viridians* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stiles & Holzapfel, 1997) โคโลนีที่เจริญบน blood agar บริเวณรอบๆโคโลนีจะเป็นสีเขียว จึงได้ชื่อว่า *A. viridans* (viridans = green) พบแบคทีเรียพวกนี้ในอากาศ ในฝุ่นละออง ในคนที่มีโรคติดเชื้อ ในอาหาร เช่น เนื้อสัตว์และผักดิบเป็นต้น

8) *Leuconostoc* spp.

รูปร่างของเซลล์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเจริญ เซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสจะมีรูปร่างค่อนข้างยาวคล้าย lactobacilli มากกว่า streptococci แต่เมื่อเจริญในน้ำนมจะมีลักษณะกลม Leuconostoc มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ไม่เคลื่อนที่ เป็น facultative anacrobes อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 20 ถึง 30 °Cเป็นพวกที่มีความต้องการสารอาหารซับซ้อน เช่น ต้องการวิตามินกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตบางชนิดที่แบคทีเรียพวกนี้สามารถทำการหมักและนำไปใช้ได้ ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuc. lactis*, *Leuc. Gelidum*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. Citreum*, *Leuc. Carnosum*, *Leuc. argentinum*, และ*Leuc. Fallax* (Stiles & Holzapfel, 1997) มี mol% G + C ระหว่าง 37-40 % (Dellaglio *et al.*, 1995) เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เมื่อมีการเติบโตในอาหารแข็งโคโลนีมีขนาดเล็กมาก โดยมากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมักน้อยกว่า 1 mm. มักต้องการกรดอะมิโน(amino acid) และสารเร่งการเจริญเติบโตทุกชนิด ต้องการกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ไทอะมีน (thiamine) ไบโอติน (biotin) และกรดเพนโททินิก (pentotinic acid) หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติก (lactic acid) เอทานอล (ethanol) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไม่ย่อยอาร์จีนีน (arginine) สามารถสังเคราะห์ไดอะซิทิล (diacetyl) จากซิเตรต (citrate) ในนมได้ (วิลาวัณย์, 2536)

9) *Oenococcus* spp.

เซลล์มีรูปร่างกลม ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจาก ดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio *et al.*, 1995) จึงถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มใหม่

10) *Weissella* spp.

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเดียว ที่มีทั้งสปีชีส์ที่มีรูปร่างกลมและแท่ง ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะคล้าย *leuconostoc* (leuconosdoc – like bacteria) รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม มีสปีชีส์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. Paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*), *Lactobacillus confuses* (*W. confusus*), *Lb. halotolerans* (*W. halotoleran*), *Lb. Kandleri* (*W. kandleri*), *Lb. Minor* (*W. minor*), *Lb. Viridescens* (*W. viridescen*) และสปีชีส์ใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles & Holzapfel, 1997)

11) *Lactobacillus* spp.

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ทนต่อกรดและต้องการสารอาหารหลายชนิด (เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เพปไทด์ กรดไขมัน เกลือ กรดนิวคลีอิก และวิตามิน) มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของ mol % G + C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32- 53 % (Axelsson, 1998) พบในแหล่งต่างๆ เช่น เยื่อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ (Barefoot & Klaenhamer, 1983) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และจะติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เป็นพวกที่ทนกรด (aciduric) pH ที่เหมาะสมในการเติบโต 5.5-6.2 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง เป็นพวกต้องการออกซิเจนน้อย (microaerophilic) การสร้างสารสีพบได้น้อยมาก ถ้าพบก็จะมีสีเหลืองส้มจนถึงสีแดงอิฐ มักพบในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไวน์ เบียร์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง บริเวณเนื้อเยื่อในท่อทางเดินอาหาร และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิลาวัลย์, 2536) ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles & Holzapfel, 1997) คือ

กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลกโทส (มากกว่า 85 %) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate – aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคเนทไม่ได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้

กลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทได้ แลคเตต เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ กลุ่ม Obilgately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็น แลคเตท, เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์

Lactobacillus จัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (Axelesson, 1993) ตามการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ตารางที่ 1) คือ *Streptobacterium* เชื้อกลุ่มนี้สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15°C อาจเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45°C หรือไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45°C และ Thermobacterium เชื้อกลุ่มนี้สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45°C แต่ไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15°C

12) *Carnobacterium* spp.

เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว (Slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 µm และยาว 1.1 – 3.0 µm จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ให้ผล catalase เป็นลบ ไม่สร้างสปอร์ เชื้อ *Carnobacterium* แตกต่างจาก *Lactobacilli* ตรงที่ไม่สามารถจะเติบโตได้บนอาหารอะซิเตต (acetate medium) และไม่สามารถสังเคราะห์กรดโอเลอิก (oleic acid) สามารถหมักกลีเซอรอลและ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แมนนิทอลได้ด้วย ซึ่งพบได้ยากมากในพวก lactobacilli ค่าpH 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ Carnobacterium ได้ แต่พวก lactobacilli สามารถเจริญได้ที่ pH ที่ต่ำกว่า นอกจากนั้น Carnobacterium ยังสามารถเจริญได้ที่pH 9.0 จึงทำให้ต่างจากพวก lactobacilli มักพบเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมทั้งปลาและไก่ที่บรรจุแบบสุญญากาศมีปริมาณเบสก้วนีนและไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเออยู่ระหว่า 33-37.2 %โมล (บุษกร, 2545) แบคทีเรียในจีนัสนี้ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens, C. funditum, C. gallinarum, C. mobile, C. piscicola* และ *C. alterfunditum* (Stiles and Holzapfel, 1997)

ตารางที่ 2.1 สปีชีส์ของ *Lactobacillus* ในกลุ่มต่างๆ แบ่งตามลักษณะการใช้น้ำตาล และการสร้างสารยับยั้ง

แบ่งตามลักษณะการใช้น้ำตาล และการสร้างสารยับยั้ง	
Homofermantative	**Heterofermantative**
Obligately homofermentative lactobacilli - *Lactobacillus acidophilus, L. ruminis, L. delbrueckii,* *L. helveticus, L. jensenii,* และ *L. amylovorus*	**Facultatively heterofermentative lactobacilli** - *L. plantarum, L. pentosus, L. casei, L.sake,* และ *L. rhamnosus* **Obligately heterofermentative lactobacilli** - *L. brevis, L. buchneri, L. bifermentans, L. cinfusus* และ *L. hilgardii*
แบ่งตามการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ	
เติบโตที่อุณหภูมิ 15 °C	**ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 15 °C**
Streptobacterium - *L. casei* และ *L. plantarum*	**Thermobacterium** - *L. helveticus, L. bulgaricus, L. lactis, L. jugurti,* *L. acidophilus, L. leichmannii, L. delbrueckii* และ *L. salivarius*

ที่มา : Axelsson, 1993

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

นอกจากนี้ การจำแนก *Lactobacillus* แต่ละกลุ่มอาจศึกษาจากการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากกลูโคเนส (gluconase) การสร้าง FDP aldolase และการสร้าง phosphoketolase

ตารางที่ 2.2 การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามลักษณะขบวนการหมัก

คุณสมบัติ	Obligately homofermentative	Facultatively heterofermentative	Obligately heterofermentative
- การหมักน้ำตาลเพนโทส	-	+	+
- การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	+[a]	+
- การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	+	+[b]	-
- การสร้าง FDP aldolase	-	+	+
- การสร้าง phosphoketolase	-	+	+

[a] เกิดจากกระบวนการหมัก [b] ชักนำน้ำตาลเพนโทส **ที่มา** : Kandler & Weias, 1986

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.3 กระบวนการหมักกรดแลคติค (Lactic acid fermentaton)

เนื่องจากอาหารเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างดีในการเจริญ กระบวนการหมักดองของอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอาหาร เนื่องจากการกระทำของเอนไซม์ ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์มาจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักดองหรือเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหารนั้นโดยทั่วไปกระบวนการหมักดองจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเป็นจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แต่ในบางครั้งในโรงงานอุตสาหกรรมจะมีการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรส กลิ่นและเนื้อสัมผัสที่ได้ตามต้องการ สำหรับกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติกจะเกิดในไซโทพลาสซึม มีการสร้างพลังงานแบบ substrate level phosphorylation และมีระดับ

ความเป็นกรดสูง เนื่องจากค่า pH ต่ำ ประสิทธิภาพการเกิด Oxidation-Reduction ก็จะทำให้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมักกรดแลคติก กระบวนการหมักดองแลคติกที่สำคัญมี 2 กระบวนการคือ

2.3.1 Homofermentative

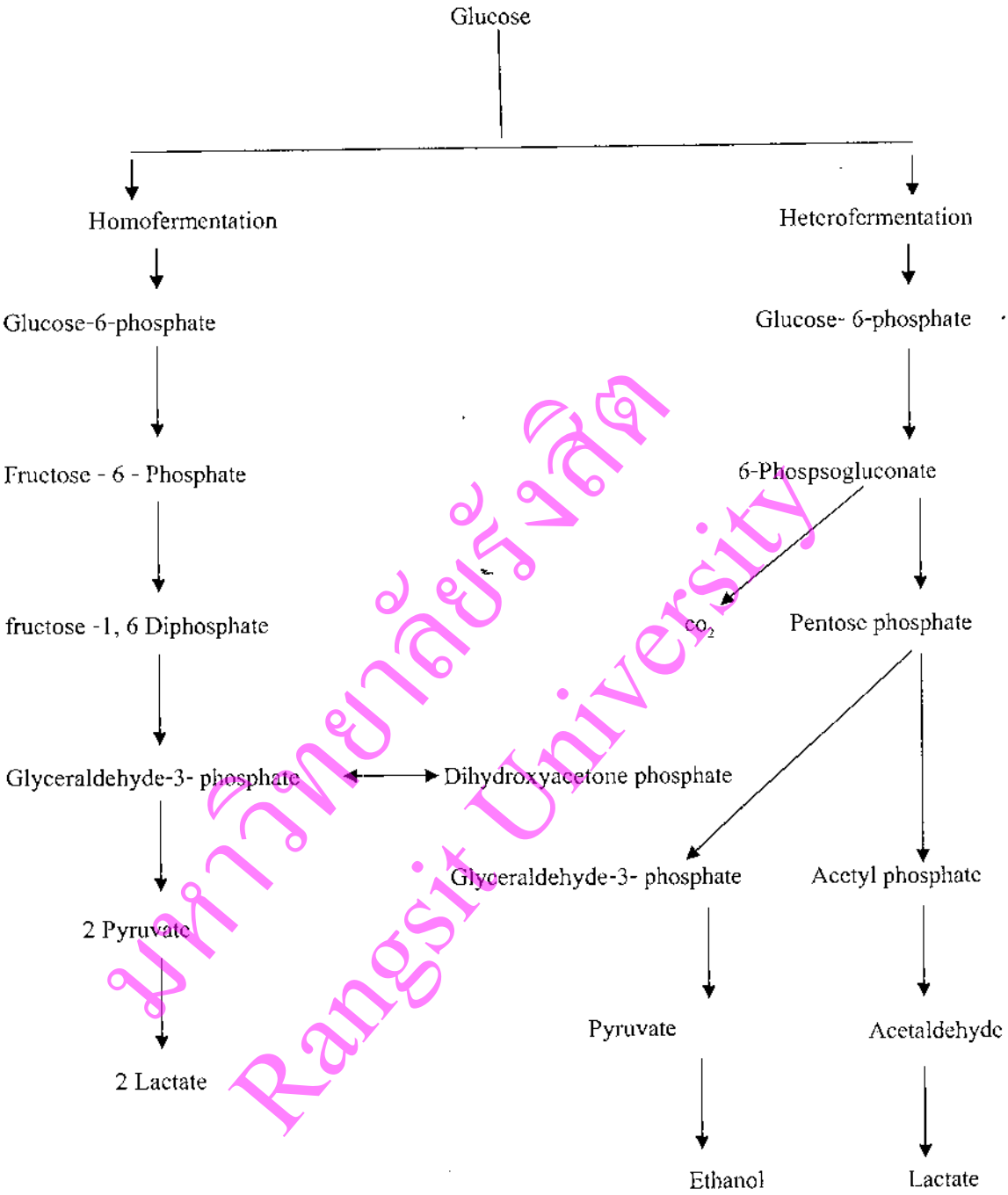
เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตเพียงชนิดเดียว คือ กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80% โดยผ่าน glycolysis (Embdem Meyerhof pathway: EMP) และเรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่า homofermentative bacteria เช่น *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด

ขั้นตอนการผลิตกรดแลคติคเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าเซลล์ของ lactic acid bacteria โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมที่เรียกว่า Phosphoenol-Pyruvate Dependent Phosphotransferase System (PEP-PST) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorelation) อยู่ในรูปแลคโตส Lactose-6-Phosphate กับ Glucose-6-Phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ Phopho-ß-Galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น Galactose-6-Phasphate กับ Glucose ซึ่ง Glucose จะถูกส่งเข้าสู่กระบวนการต่างๆ โดย D-Tagatose-6-Phosphate Pathway ได้เป็น Tagatose-1,6-Dophosphate และเปลี่ยนเป็น Dihydroxyacetone-Phosphate ท้ายสุดเอนไซม์ Tagatose-1,6-Aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Glyceraldehyde-3-Phosphate โดนเอนไซม์ Tritose Phosphate Isomerase ซึ่ง Glyceraldehyde-3-Phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway แลกเปลี่ยนเป็นแลคโตส (Lactose) ในที่สุด

2.3.2 Heterofermentative หรือ mixed acid fermentation

เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตหลายชนิด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก 20-25% กรดแลคติก 50% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25% โดยผ่าน phosphoglyconate หรือ phosphoketolase pathway และเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า heterofermentative bacteria เช่น *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิดbacteria ในกลุ่มนี้จะมีเอนไซม์ Aldose ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ Glycolysis จึงทำให้ไม่สามารถย่อยสลาย fructose-1,6-Diphosphate เป็น Triose-Phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ Glucose-6-Phosphate ได้เป็น 6-Phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา Decaboxylate ได้เป็น Pentose-Phosphate กับคาร์บอนได-ออกไซด์ซึ่ง Pentose Phosphate จะแตกตัวเป็น Triose-Phosphate และ Acetyl-Phosphate โดยเอนไซม์ Phosphoketolase โดยที่ Triose-Phosphate จะเปลี่ยนเป็น Lactase ได้เป็น Acetyl-Phosphate จะเปลี่ยน Acetyldehyde

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



ภาพที่ 2.1 การผลิตแลคติคโดยกระบวนการหมักแบบ homofermentation และ heterofermentation

ที่มา: Forsythe, S.J. (2000)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.4 ความต้องการสารอาหารของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการสารอาหารพิเศษ หรือเฉพาะในการเจริญเติบโต (Fastidious microorganism) และมีความต้องการสารอาหารต่างๆ (Salminen & Wright, 1993) ดังต่อไปนี้ คือ

2.4.1 ไนโตรเจน

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ต้องการกรด อะมิโนหลายชนิด และจะเจริญได้น้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนที่แบคทีเรียแลคติกต้องการ เช่น Serine และ Arginine เป็นต้น

2.4.2 วิตามิน

วิตามินที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ thiamine : B1, riboflavin : B2, pyridoxine : B6, folic acid : B9, cyanocobalamine : B12 และ nicotinic acid โดยที่ *Bifidobacterium infantis* สามารสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนมาก ส่วน *Bifidobacterium brevis* และ *Bifidobacterium longum* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนน้อย และ *Bifidobacterium adolescentis* ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้แลคติกแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์ยังต้องการกรดนิโคตินิก (nicotinic acid), กรดแพนโททินิก (pantothenic acid), ไบโอติน (biotin), ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และโฟลินิก(folinic)

2.4.3 คาร์โบไฮเดรต

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภทน้ำตาลเพนโทส (pantose) เช่น arabinose, ribose และ xylose เป็นต้น น้ำตาลเฮกโซส (hexose) เช่น fructose และ mannose ไดแซคคาร์ไรด์ (disaccharide) เช่น maltose ไตรแซคคาร์ไรด์ (trisaccharide) เช่น maltotriose และโพลิเมอร์ (polymer) เช่น แป้ง นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้พวกคาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น ราฟีโนส (raffinose) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (fructooligosaccharide : FOS) เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซด์ที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้ ในการะบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ผลิตผล 2 แบบ คือ homofermentative ได้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียว และ heterofermentative ได้กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.5 สารยับยั้งที่ได้จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (Antimicrobial substance)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งมีบทบาทในอาหารหมักมากมายหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก เนยผักดอก ไส้กรอกหมัก และแหนม เป็นต้น ในกระบวนการหมักแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารหลายชนิด ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Inhibitory substances) เหล่านี้ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2), ไดอะซิทิล(diacetyl), แบคเทอริโอซิน(bacteriocin), ไมโครแกรด (microgrard), กรดแลคติก (lactic acid), และ รูทีริน (ruterin) เป็นต้น ชนิดต่างๆ ของสารยับยั้งที่สร้างโดย แลคติกแอซิดแบคทีเรีย มีดังนี้ คือ

2.5.1 กรดแลคติค (Lactic acid)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติก ทำให้ pH ของอาหารลดลง มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในอาหารหมักดองประเภทต่าง ๆ เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ใช้ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมอื่นๆ ด้วย

Ziauddin *et al.* พบว่า กรดแลคติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียก่อโรค โดยกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 1.5-2.5 % จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ เช่น *Bacillus, E.coli, Salmonella, Staphylococcus และ Streptococcus* ได้อย่างสมบูรณ์ (Ziauddin *et al*., 1993)

Torriani *et al.* ทำการทดสอบกรดแลคติกที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในผักสลัด และพบว่าเมื่อเติมกรดแลคติก 1 % ลงไปจะทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ แต่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมด (total bacteria) และฟีคัลโคลิฟอร์ม (faecal coliform) ได้เพียงบางส่วน และเมื่อเติมกรดแลคติก 0.5 % ลงไป จะไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผัก (Torriani *et al*., 1997)

2.5.2 กรดอะซิติก (Acetic acid)

กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative lactobacilli ซึ่งกรดดังกล่าวมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์

จากการทดลองของเยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ พบว่า สามารถใช้กรดอะซิติกใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองชนิดต่างๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเมื่อนำมาใช้ในการถนอมอาหารต้องใช้ความเข้มข้นอย่างต่ำ 3.6% (เยาวลักษณ์, 2536)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Koutula & Thelappurate, 1994 รายงานว่า มีการใช้กรดแลคติกและกรดอะซิติกร่วมกัน หรือใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์อื่นๆ ในเนื้อวัวที่ขายปลีก สามารถลดแบคทีเรียเป็นจำนวน 1 log แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการทดสอบให้นานขึ้น สามารถลดจำนวนเชื้อลง 2 log (Koutula & Thelappurate, 1994)

Conner *et al* .รายงานผลการศึกษากรดอินทรีย์ต่อเชื้อ *E.coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* โดยใช้กรดอะซิติก และกรดแลคติกความเข้มข้น 2 และ 4% ฉีดพ่นในชิ้นเนื้อ แล้วนำชิ้นเนื้อมาบด นำไปนับจำนวนเชื้อ *E.coli* O157:H7 และ *L.monocytogenes* ลดลง 0.1 log และ0.36 log ตามลำดับ แสดงว่ากรดอินทรีย์ทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* (Conner *et al*., 1997)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia coli, Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ปัจจัยที่มีผลในการยับยั้งเชื้อมาจากการลดลงของพีเอช และการสะสมของกรดอินทรีย์ โดยปกติเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์จะทำหน้าที่คัดเลือกสารเข้าออกภายในเซลล์ และไม่ยอมให้สารที่มีประจุผ่านเข้าเซลล์ได้ เพื่อรักษาสภาพความเป็นกลางภายในเซลล์ แต่เนื่องจากกรดอินทรีย์เป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile Fatty Acid; VFA) มักจะมีโมเลกุลขนาดเล็กโดยมีน้ำหนักน้อยกว่า 700 ดาลตัน จึงสามารถซึมผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคได้ดี กรดอินทรีย์อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย และเกิดการแตกตัวให้ประจุบวก (H^+) และประจุลบ ($RCOO^-$) ภายในเซลล์ ประจุบวก (H^+) ซึ่งมีสมบัติเป็นกรดจะทำให้ความเป็นกรดภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น พีเอชภายในเซลล์แบคทีเรียก่อโรคจึงลดลง การสะสมของกรดที่เกิดขึ้นจะขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึม ในการสังเคราะห์สารต่างๆภายในเซลล์ เช่น RNA DNA และโปรตีน รวมทั้งการขนส่งสารต่างๆในเซลล์ที่จำเป็นต่อการอยู่รอดจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ทำให้เชื้อก่อโรคที่ฉวยโอกาสเข้ามากับอาหารตายลง หรือไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยหลังจากที่กรดอินทรีย์แตกตัวให้ประจุบวก (H^+) และประจุลบ ($RCOO^-$) แบคทีเรียจะมีการพยายามที่จะขับกรดที่แตกตัวนี้ออก แต่การขับออกจะขับออกได้แต่ประจุบวก (H^+) ในขณะที่ประจุลบ ($RCOO^-$) จะมีการขับออกได้น้อยมาก ทำให้มีการสะสมอยู่ภายในเซลล์สูง ประจุลบเหล่านี้เป็นพิษต่อระบบการสังเคราะห์โปรตีน RNA และDNA ภายในเซลล์ และในการขับประจุบวก (H^+) ออกจากเซลล์นั้น แบคทีเรียต้องอาศัยพลังงานภายในเซลล์ (ATP) เข้าช่วย ทำให้เซลล์สูญเสียพลังงานมาก ไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการอื่นๆ ไม่ว่าการเจริญเติบโตหรือการสืบพันธุ์ และหากต้องขับกรดออกมามากๆเซลล์จะสูญเสียพลังงานจนหมดและตายได้ นอกจากนั้นสภาวะที่เป็นกรดภายในลำไส้ยังช่วยทำให้เอนไซม์ และน้ำย่อยต่างๆทำงานได้อย่างมี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประสิทธิภาพ รวมทั้งเป็นผลดีต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เป็นเชื้อประจำถิ่นภายในลำไส้อยู่แล้ว ส่งผลให้อัตราการย่อยและการดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดีขึ้น (รจเรข, 2546)

จากสมบัติที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การทำงานของกรดอินทรีย์ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคล้ายกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ เช่น การเข้าขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนที่ผนังเซลล์ หรือขัดขวางการสังเคราะห์ RNA DNA ในนิวเคลียสของเซลล์ ตลอดจนขัดขวางการขนส่งสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตภายในเซลล์แบคทีเรียก่อโรค แต่แท้ที่จริงแล้วการทำงานนี้มีความแตกต่างกันอย่างมาก เนื่องจากการทำงานของสารปฏิชีวนะนั้น การที่จะออกฤทธิ์ดังที่กล่าวมานี้จะต้องอาศัยความจำเพาะต่อรีเซ็ปเตอร์(receptor) คือ จุดหรือตำแหน่งที่สารปฏิชีวนะจะเข้าไปเกาะกับผนังเซลล์หรือภายในเซลล์ เพื่อที่สารปฏิชีวนะจะสามารถออกฤทธิ์ได้ ซึ่งจุดรีเซ็ปเตอร์นี้เองที่เป็นวิธีที่แบคทีเรียจะปรับตัวต่อสู้กับสารปฏิชีวนะได้ โดยแบคทีเรียจะมีพัฒนาการปรับตัวให้จุดรีเซ็ปเตอร์นี้เปลี่ยนแปลงไป ทำให้สารปฏิชีวนะซึ่งออกแบบมาจำเพาะต่อจุดรีเซ็ปเตอร์เดิมนั้นไม่สามารถจับกับรีเซ็ปเตอร์ใหม่ที่เปลี่ยนแปลงไปได้ เป็นสาเหตุของการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่างๆหลังจากมีการใช้สารปฏิชีวนะไปได้ระยะหนึ่ง แต่การออกฤทธิ์ของกรดอินทรีย์นั้นแตกต่างกับสารปฏิชีวนะ กรดอินทรีย์ไม่จำเป็นต้องอาศัยจุดรีเซ็ปเตอร์ เนื่องจากสมบัติของกรดอินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก ทำให้กรดที่ยังไม่แตกตัวสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ทันที และทำการแตกตัวออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียดังที่กล่าวมาข้างต้น (รจเรข, 2546)

Chapman (1988) ได้สรุปประโยชน์ที่ได้จากการเสริมกรดอินทรีย์ในอาหารสัตว์ไว้ดังนี้ กรดอินทรีย์จะช่วยเสริมกรดที่มีไม่เพียงพอในกระเพาะอาหารโดยเฉพาะในลูกสัตว์กรดที่เติมลงในอาหารจะไปลดระดับพีเอชในกระเพาะอาหารของสัตว์ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนเพปซิโนเจน (pepsinogen) ไปเป็น เพปซิน (pepsin) เร็วขึ้น ทำให้สัตว์ย่อยอาหารประเภทโปรตีนได้ดีขึ้นสภาพพีเอชที่ลดลงนี้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ โดยเฉพาะ *E. coli* ในทางตรงข้ามจะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์ได้ดียิ่งขึ้น กรดอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารยังทำหน้าที่เป็น chelating agent ช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดในระบบทางเดินอาหาร และทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวิถีการสร้างพลังงาน และมีบทบาทโดยตรงในกระบวนการเมแทบอลิซึม

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี Ramphai Phanni University

2.5.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมในระหว่างการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก โดยในสภาพที่มีออกซิเจนแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากการทำงานของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) ของเอนไซม์ oxidase, NADH oxidases และ superoxide dismutase ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็ก แลคติกแอซิดแบคทีเรียจะไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส(catalase) ที่ใช้กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ระบบอื่นซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพน้อยกว่าการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเหตุให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากไปทำให้เกิด peroxidation ของไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้วทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้นความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ จึงเสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลอื่น ๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรง แล้วยังมีผลในทางอ้อมด้วย เช่น เมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นคะตะเลส จะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system นอกจากนี้ปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะมีการขับออกซิเจนออก ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้

แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีดังนี้

1. $NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{1} NAD^+ + H_2O_2$
2. $Pyruvate + Phosphate + O_2 \xrightarrow{2} Acetylphosphate + CO_2 + H_2O_2$
3. $\alpha\text{-}Glycerophosphate + O_2 \xrightarrow{3} Dihydroxyacetonephosphate + H_2O_2$
4. $2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{4} H_2O_2 + O_2$

จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่หลายชนิด เช่น *S. aureus* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L.delbrueckii* subsp. bugaricus และ *L. delbrueckii* subsp. lactis (Dahiya & Speck, 1968) *Pseudomonas* spp. ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. plantarum* (Price & Lee, 1970) และ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Psuedomonas fragi ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. acidophilus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบอยู่ใน skim milk และ low fat milk เป็นต้น

Edward (1980) รายงานว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ใช้ในการถนอมอาหาร โดยเติมลงในน้ำนมดิบที่ความเข้มข้น 0.02-0.05 % จะฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ เมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.04-0.08 % ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 53° C นาน 30 นาทีในนมพาสเจอไรซ์ ปรากฏว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด รวมทั้งพวกโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่พบในนมได้ (Edward, 1980)

2.5.4 เอทานอล (ethanol)

การหมักแบบ heterofermentative ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดเอทานอลขึ้น สารนี้มีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นและทำให้แลคติกแอซิดแบคทีเรียได้เปรียบในการแข่งขันกับแบคทีเรียอื่น ๆ ในการเจริญเติบโต แม้ว่าเอทานอลจะเกิดขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม

2.5.5 ไดอะซิติล (diacetyl)

ไดอะซิติล หรือ 2,3-butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างไดอะซิติลได้จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซิติลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการทำงานของไดอะซิติลเกิดจากการไปรบกวนการใช้อาร์จินิน(arginine) ภายในเซลล์ โดยไดอะซิติลจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ

ไดอะซิติลเป็นสารให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ชีส ไวน์แดง ไวน์ขาว บรั่นดี และกาแฟ เป็นต้น ความเข้มข้นของไดอะซิติลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไปจะมากกว่า 400 µg/ml ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น ปริมาณ 200 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบได้ ปริมาณ 300 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวกอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แลคติคแอสิดแบคทีเรียได้ เป็นต้น ถึงแม้ว่าไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารที่ให้กลิ่นหอม ดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) เพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แต่มักจะนิยมใช้เป็น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

aseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า เนื่องจากไดอะซิติลเป็นสารที่ระเหยได้เร็ว

จากการทดลองของสุกานดา วนิชวัฒนะ พบว่า หากมีการใช้ไดอะซิติลที่มีความเข้มข้นมากกว่า 400 µg/L สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (สุกานดา, 2538)

De Vuyst & Vandamme รายงานว่า การใช้สารไดอะซิติลเพียงเล็กน้อยก็สามารถยับยั้ง *E.coli* ได้ (De Vuyst & Vandamme, 1994)

2.5.6 อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

อะซิตัลดีไฮด์เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแลคติกแอสิดแบคทีเรียขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จะทำให้มีอะซิตัลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะซิตัลดีไฮด์ยังเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในโยเกิร์ตอีกด้วย อะซิตัลดีไฮด์ที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียบางชนิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 100 ppm. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ *เช่น E coli, S aureus* และ *S. typhimurium* เป็นต้น (Tamblyn & Corner, 1997) เนื่องจากปริมาณอะซิตัลดีไฮด์ที่พบในอาหารมีน้อยมาก เช่น ในโยเกิร์ตจะพบอะซิตัลดีไฮด์ ประมาณ 25 ppm. เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะซิตัลดีไฮด์จึงนับว่าน้อยมาก

2.5.7 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักน้ำตาลเฮกโซสโดยการหมักแบบ heterofermentative Lactobacilli ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมัก โดยจะมีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก คาร์บอนไดออกไซด์มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียสองแบบ คือ หนึ่งทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจน และสองทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน(decarboxylation) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียสมบัติในการซึมผ่านของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ แต่ความเข้มข้นสูงจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ (Ouwehand & Vesterlund, 2004)

2.5.8 รูเทอริน (reuterin)

รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากได้มาจากรูเทอรินที่สร้างจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactobacillus reuterin) รูเทอรินมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำ ไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โอซิน (Axellson, 1993) เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอริน พบว่าเป็น β-hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimer โดยเกิดขึ้นในกระบวนการออกซิไดซ์ของ glycerol ในสภาพที่มีอากาศ โดยทั่วไปแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะไม่มี oxidative pathway สำหรับ glycerol ทำให้ไม่สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นวิธีการที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียจะใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ การทำให้ glycerol ให้เข้าสู่ intermediate state ของ 3-hydroxypropionaldehyde

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นของรูเทอรินค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากรูเทอริน ได้แก่ *Samonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus* และ *Listeria* spp. เป็นต้น (Axellsson *et al.*, 1989) กลไกการทำงานของรูเทอรินเชื่อว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างรูเทอรินได้จึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อถนอมอาหารหรือในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ ที่ต้องการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

2.5.9 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

เป็นสารประเภทโปรตีน หรือโปรตีนเชิงซ้อนพวกลิโพโปรตีน (lipoprotein) หรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบสร้างขึ้น มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียสร้างขึ้นเป็นสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ อาทิเช่น *Bacillus, Enterococcus, Clostridium, Listeria* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Tagg *et al.*, 1976; Klaenhammer, 1988; Shehane *et al.*, 2002) แบคเทอริโอซินที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียสร้างขึ้นได้แก่ nisin, lacticin 3147, lacticin 481, lactococcin A, lactocin 27, sakacin A, plantaricin C, pediocin A และ enterocin A เป็นต้น สมบัติของแบคเทอริโอซินจะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรม การดัดแปลงหลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม(post-translation modification) และกลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซินซึ่งมีความแตกต่างกัน แบคเทอริโอซินจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่ pH เป็นกรดหรือเป็นกลาง แบคเทอริโอซินจะถูกทำลายเมื่อเก็บไว้ที่ pH สูงกว่า 10 (Nealson, K. H. & Hastings, J. W., 1979) นอกจากนั้นแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดยังมีความไวต่อโปรติโอไลติกเอนไซม์ต่างกัน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การศึกษาสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมักจะมีความสับสนกันระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ โดย Cleveland *et al.*,2001 ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารยับยั้ง (inhibitory substance) ที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียกับยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

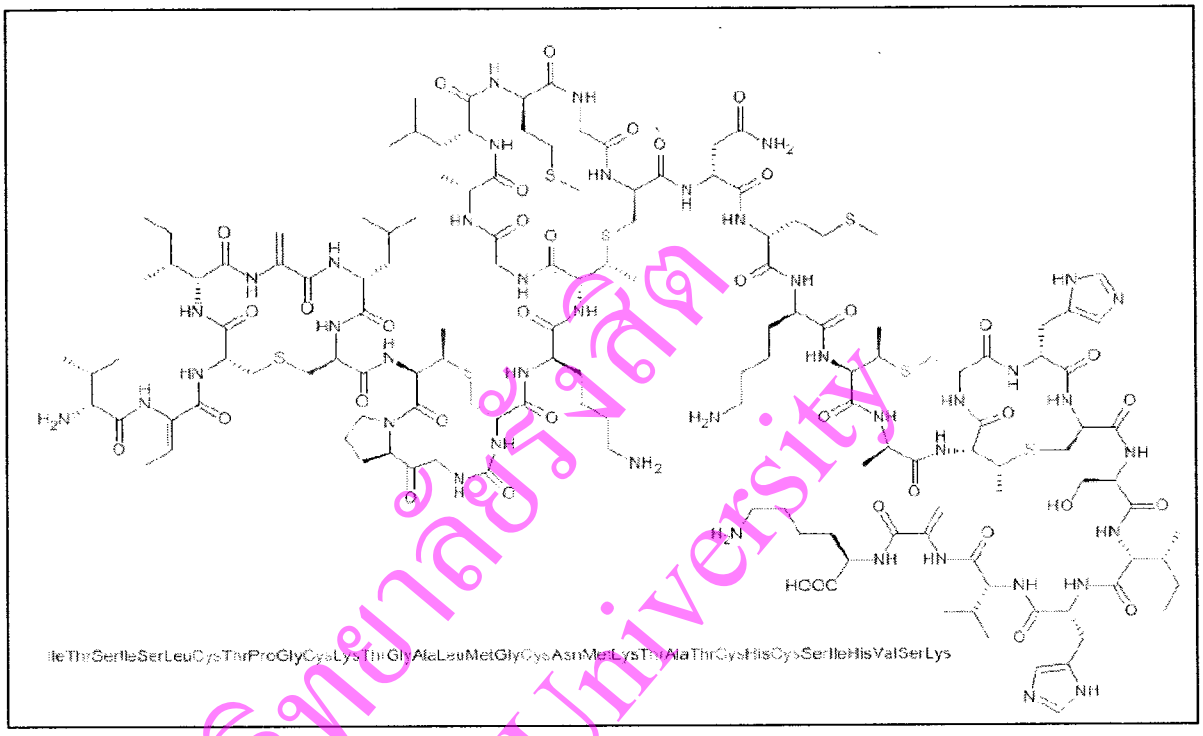
สมบัติ	แบคเทอริโอซิน	ยาปฏิชีวนะ
การประยุกต์ใช้	อาหาร	การแพทย์
การสังเคราะห์	Primary metabolite หรือ secondary metabolite	secondary metabolite
การดูดซึมในทางเดินอาหาร	ไม่มี	มี
การตกค้างในเนื้อเยื่อ	ไม่มี	มี
การกลายพันธุ์หรือดื้อยา	ไม่เกิด	เกิด
แหล่งที่สร้าง	จุลินทรีย์	จุลินทรีย์ หรือสังเคราะห์ทางเคมี
ประเภทของสาร	โปรตีน เช่น แบคเทอริโอซิน สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น รูทีริน	โปรตีน สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น เททราไซคลิน และ คลอแรมฟีนิคอล เป็นต้น
กิจกรรม	ให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ เฉพาะที่ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร	ให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อได้ทั่วร่างกาย และออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด
กลไกการทำงาน	เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียความสามารถในการนำสารผ่านเข้าออก	ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ DNA RNA และโปรตีน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cleveland *et al.*, 2001

ปัจจุบันแบคทีริโอซินบางชนิดมีขายในรูปผงแห้ง ที่รู้จักกันดี เช่น ไนซิน (nisin) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า NisaplinTM (บริษัท Aplin and Barrett Ltd., UK) ซึ่งสร้างจาก *Lactoccocus lactis* และ เพดดิโอซิน PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า ALTATM 2431 (บริษัท Quest International, Australia) ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus acidilactici* ไนซินถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Rogers และ Whittier ในปี 1928 (Rogers and Whittier, 1928) ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 34 ตัว (รูปที่ 2.4) ให้ผลในการยับยั้งได้ในอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีค่า pH ต่ำ (O'Sullivan *et al.*, 2002) ไนซินมีการใช้แพร่หลายมากกว่า 48

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประเทศ โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ชีส นม และอาหารกระป๋อง (Delves-Broughton, 1990) โดยองค์การทางอาหารและยา (Food and Drug Administration) ได้ยอมรับว่า NisaplinTM สามารถใช้ในรูปของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ (O'Sullivan *et al.*, 2002)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไนซิน

(ที่มา: http://www.vandvdevelopments.com/nisin.php)

แบคทีริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ไนซิน จะมีประสิทธิภาพในการใช้มากกว่า โดยพบว่า ไนซินมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วย (Tagg *et al.*, 1976) ซึ่งมักจะก่อโรคในอาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมที่นำมาแปรรูปเป็นเนยซึ่งความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะแพร่ผ่านได้ลำบาก ในขณะที่แบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์แคบก็สามารถยับยั้งเชื้อเฉพาะกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่น

แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร กล่าวคือ

1. เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย
2. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3. สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร

4. มักจะทนต่อ pH และความร้อน

5. บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum*

6. มักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิด จึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation

7. ช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น เพิ่มความปลอดภัย และรสชาติดีขึ้น

8. มีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) สูง (O'Sullivan *et al*., 2002)

การประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินเป็นสารกันเสียในอาหาร มีข้อดีหลายประการ คือ

- ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร
- ช่วยในการรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่างๆ
- ลดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในอาหาร
- ลดค่าใช้จ่ายจากการเน่าเสียของอาหาร
- ลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร
- ช่วยลดการใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อในอาหาร ทำให้รักษาคุณค่าของสารอาหารและวิตามินในอาหาร
- เป็นที่ต้องการของโรงงานและผู้บริโภค โดยแนวทางที่โรงงานอุตสาหกรรมอาหารในยุโรปนิยมในปัจจุบัน คือ ไม่ใช้สารปรุงแต่ง ลดกระบวนการแปรรูปอาหารเพื่อให้อาหารสดใหม่

2.5.9.1 การจัดจำแนกแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก

แบคทีริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์อื่น คือสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และจัดเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Hurst, 1981) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างจะพบเป็นคลัสเตอร์ (cluster) ในโอเปอรอน (Jack *et al.*, 1995) ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคทีริโอซิน ออกเป็น 4 class ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีริโอซินที่พบมักจัดอยู่ใน class I และ class II

2.5.9.1.1 Class I

Class I มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) (Chatterjee *et al.*, 2005) ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้ว จะเข้ารวมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (lanthionine; Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไธโออีเทอร์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมธิลแลนไธโอนีน (methyllanthionine; MeLan) (Hurst, 1981) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่าแลนติไบโอติก (lantibiotics)

แลนติไบโอติกมักแบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลักคือ type A หรือ subclass Ia ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาว ไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย บางสปีชีส์ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือไนซิน อีกกลุ่มหนึ่งคือ type B หรือ subclass Ib มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ (Delves-Broughton, 1990; Klaenhammer, 1993) มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เมอซาซิดิน (mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ (Brotz *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งมักจะเกิดความสับสนเนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรูและยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Breukink *et al.*, 1999) ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติกออกเป็น 11 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ (Cotter *et al.*, 2005) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อดังนี้ คือ ไนซิน (nisin) อีพิเดอมิน (epidermin) สเตรปติน (streptin) เปป 5 (pep 5) แลคติซิน 481 (lacticin 481) เมอซาซิดิน (mersacidin) แอลทีเอ็นเอ 2 (LtnA 2) ไซโตไลซิน (cytolysin) แลคโตซิน S (lactocin S) ซินนามัยซิน (cinnamycin) และซับแลนซิน (sublancin)

2.5.9.1.2 Class II

Class II มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ปัจจุบันที่พบมากมี 2 subclass คือ subclass IIa มีชื่อว่า pediocin -like (หรือเรียกว่า *Listeria*-active) และ subclass IIb หรือ แบคทีริโอซินที่มี 2 องค์ประกอบ (two-component bacteriocins) ใน class IIa ตัวที่มีการศึกษามากที่สุด คือ เพดดิโอซิน AcH/PA-1 สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับของกรดอะมิโน 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YGNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge) subclass IIa ปัจจุบันได้รับความสนใจมากเนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ (Ennahar *et al.*, 1999) ในอาหาร subclass IIb หมายถึงแบคทีริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Nissen-Meyer *et al.*, 1999) ถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มี activity หรือมี activity เหลือเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ แลคตาซินเอฟ (lactacin F) และแลคโตคอกซินจี (lactococcin G) นอกจากนี้ยังมี subclass IIc (*sec*-dependent bacteriocins) ตัวอย่างเช่น อะซิโดซิน B (acidocin B) ไดเวอจิซิน A (divergicin A) แบคทีริโอซิน 31 (bacteriocin 31) และเอนเทอโรซิน P (enterocin P) และ subclass IId ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่น ตัวอย่างเช่น แลคโตคอกซิน A และ ไดอะเซติน B (diacetin B) อะซิโดซิน 8912 (acidocin 8912) เป็นต้น (Klaenhammer, 1993)

2.5.9.1.3 Class III

Class III ประกอบด้วยแบคทีริโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน จึงแตกต่างจาก class I และ II ตัวอย่าง Delves ของกลุ่มนี้ คือ เฮลเวติซิน J (helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (enterolysin A) (Delves-Broughton, 1990)

2.5.9.1.4 Class IV

Klaenhammer (1993) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือ class IV ซึ่งแบคทีริ-โอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิดิค (glucidic) และ/หรือลิปิดในโครงสร้างด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคทีริโอซินกลุ่มนี้ เช่น ลิวโคซิน S (leucocin S) และลิวโคซิน 27 (leucocin 27) ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง หรือมีเซ็นเทอโรซิน 52 (mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิโพโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น (Delves-Broughton, 1990)

กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

โดยทั่วไปแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูใน cytoplasmic membrane ของเซลล์ เป็นเหตุให้เกิดการรั่วของสารต่างๆภายในเซลล์ และสูญเสียแรงขับเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force) แบคเทอริโอซินเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวกที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับกลุ่มฟอสเฟต (phosphate groups) บนเมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะแทรกเข้าไปในเมมเบรนทำให้เกิดเป็นรูจากนั้นจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเป้าหมาย เช่น DNA RNA เอ็นไซม์ และตำแหน่งอื่นๆเพื่อฆ่าเซลล์เป้าหมาย (Bruno *et al.*, 1992; Chikindas *et al.*, 1993; Cleveland *et al.*, 2001) โดยทั่วไปแล้วแบคเทอริโอซินไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane (OM) ทำหน้าที่ป้องกัน cytoplasmic membrane และชั้นเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ของแบคทีเรียแกรมลบ OM แบ่งออกเป็นชั้นในและชั้นนอก ชั้นในประกอบด้วยglycerophospholipids แต่ชั้นนอกเป็น lipopolysaccharide (LPS) ซึ่ง LPS ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นไขมัน และ complex heteropolysaccharide ที่มีลักษณะ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บางส่วนเป็นประจุลบ จึงเกิดการจับกันแน่นและมีสมบัติเป็น hydrophillic ดังนั้น OM จึงทำหน้าที่ป้องกันสารที่มีสมบัติเป็น hydrophobic และโมเลกุลขนาดใหญ่ เป็นเหตุให้แบคเทอริโอซินซึ่งมีสมบัติเป็น hydrophobic ไม่สามารถผ่าน OM เข้าไปทำปฏิกิริยาที่บริเวณเป้าหมายได้ (Helender and Mattila-Sandholm, 2000)

แบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ ทั้งในด้านกลไกการสังเคราะห์ กลไกการทำงาน ช่วงการยับยั้งจุลินทรีย์ความเป็นพิษ และกลไกการต้านทาน โดยแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์จากไรโบโซม มีช่วงการยับยั้งแคบสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ใกล้เคียงได้ดี เซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีการสร้างภูมิต้านทานต่อแบคเทอริโอซินขึ้นมา กลไกการทำงานโดยทั่วไปจะทำให้เกิดรูและมีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์เล็กน้อย เซลล์ที่ต้านทานแบคเทอริโอซินจะมีการดัดแปลงองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรน ยังไม่มีรายงานความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงของการใช้แบคเทอริโอซิน ส่วนสารปฏิชีวนะเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีช่วงการยับยั้งกว้าง เซลล์ที่สร้างสารปฏิชีวนะไม่มีการสร้างภูมิต้านทาน กลไกการทำงานมีความจำเพาะต่อเป้าหมาย โดยทั่วไปจะทำปฏิกิริยาบริเวณเซลล์เมมเบรน หรือภายในเซลล์ เซลล์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม จึงทำให้เกิดผลข้างเคียงในการใช้สารปฏิชีวนะ (Cleveland *et al.*, 2001) จากความแตกต่างดังกล่าวจึงได้มีการนำแบคเทอริโอซินไปใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพในอาหารซึ่งต่างจากสารปฏิชีวนะที่ส่วนใหญ่นำไปใช้เพื่อการรักษา ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาแบคเทอริโอซินถูกนำมาใช้แทนการใช้สารเคมีในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และเพิ่มความปลอดภัยในอาหาร เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น (Soomro *et al.*, 2002) ประกอบกับแบคเทอริโอซินเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติจึงง่ายต่อการยอมรับจากผู้บริโภค (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

จากการทดลองของ Yan & Lee พบว่า *Lactobacillus fermentum* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเรียกว่า fermencin B จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Lactobacillus brevis* , *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus pentosus* , *Lactobacillus delbrueckii* และ *Micrococcus luteus* (Yan & Lee ,1997)

Bogovic-Matijasic *et al.* รายงานว่า *Lactobacillus acidophilus* LF221 จะผลิตแบคเทอริโอซินอย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ acidocin A และ acidocin B จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium Listeria*, *Staphylococus aureus* และ *Streptococcus* (Bogovic-Matijasic *et al.* ,1998)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

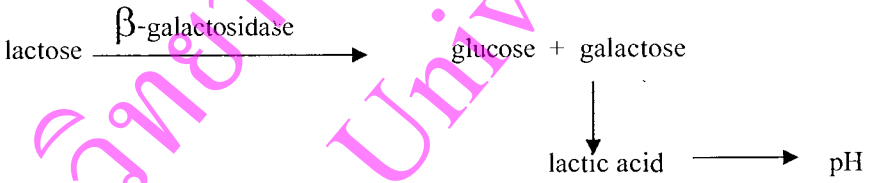
2.6 การประยุกต์ใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย(lactic acid bacteria : LAB) มีส่วนร่วมในกระบวนการหมักอาหารประเภทนม เนื้อสัตว์ ผัก เครื่องดื่ม และหญ้าหมัก ทำให้เกิดอาหารหมัก (fermented food) สิ่งที่เกิดขึ้นก็คือ การนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของกลิ่น รส เนื้อสัมผัส ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฟิสิกส์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารเสียไป สามารถเก็บรักษาอาหารให้อยู่ได้นาน รสชาติและลักษณะผลิตภัณฑ์นั้นก็เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ และมีผลในการช่วยรักษาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้อยู่ในสภาพที่ดีได้อีกด้วย (ลูกจันทร์, 2524)

2.6.1 ผลิตภัณฑ์นมหมัก (Fermented Dairy Products)

2.6.1.1 การหมักน้ำตาลแลกโทส (Lactose fermentation)

แลกโตสถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และกาแลกโตส โดยเอนไซม์เบต้า-กาแลกโตซิเดส (β-galactosidase) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยนี้ จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ซึ่งมีผลทำให้ pH ในอาหารลดลง ดังแสดงในสมการนี้

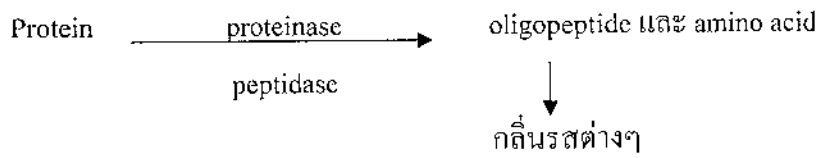


จากการศึกษายีนส์ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์มีส่วนเข้าร่วมในกระบวนการเมทาบอลิซึมของ น้ำตาลแลกโตส ได้ทำการศึกษาการใช้น้ำตาลแลกโตสของเชื้อ *Streptococus thermophilus* พบว่า *lac* operon ประกอบด้วยหลายยีนส์ที่น่าสนใจ ได้แก่ *lacZ* แสดง β-galactosidase activity ส่วน *lacS* จะแสดง galactose transport protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านน้ำตาลกาแลกโตสเข้าสู่เซลล์ โดยดำเนินในลักษณะที่เรียกว่า Stoichiometric exchange จากแลกโตสเป็นกาแลกโตส ดังนั้นจะมีการปล่อยน้ำตาลกาแลกโตสออกสู่ภายนอกเซลล์ ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า gal phenotype (วิเชียร, 2534)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.6.1.2 การพัฒนารสชาติ (Flavor development)

1) คุณสมบัติของเอนไซม์โพรทเนส (proteinase) และเพปทิเดส (peptidase)



แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการสารอาหารเฉพาะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต(fastidious microorganism) ได้แก่ นิวคลีโอไทด์(nucleotide) วิตามิน(vitamin) และกรดอะมิโน(amino acid) โปรติเนส(proteinase) และเพปทิเดส(peptidase) จึงมีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีน กรดอะมิโน และสารประกอบเพปไทด์ กรดอะมิโนที่เหลือเป็นตัวทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะในอาหารชนิดนั้น

2.6.1.3 นมหมัก (fermented milk)

นมหมักเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านที่มีการพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรม โดยการอาศัยแบคทีเรียตามธรรมชาติมาเป็นการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสำหรับการหมัก มีการพัฒนาสูตรเพื่อเพิ่มมูลค่า โดยการเติมสารบำรุงสุขภาพ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ลดพลังงาน เป็นอาหารสำหรับผู้ต้องการลดน้ำหนัก เพื่อนำผลิตภัณฑ์เข้าสู่ตลาดเจาะกลุ่มผู้บริโภคเป้าหมาย

นมหมักสามารถจำแนกโดยอาศัยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวการหมัก มี 4 ประเภท (สุมณฑา, 2545) คือ

1) นมหมักจากบัตเตอร์มิลล์ (Butter milk)

เป็นส่วนของนมที่เป็นผลพลอยได้จากการทำเนยสด (butter) หรือเป็นซีรัมสดที่เหลือจากการตกตะกอนแยกครีมไปใช้ทำเนย บางประเทศมีการใช้บัตเตอร์มิลล์เป็นอาหารคน แต่บางประเทศมีการใช้เป็นอาหารสัตว์ เชื้อหมักประกอบด้วยแบคทีเรีย *Lactococci* ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และในบางครั้งมีการเติม *Leuconostoc* ลงไปด้วย ในการค้านิยมใช้ *Lactococcus lactis* spp.lactis, *Lactococcus lactis* spp.cremoris และ *Leuconostoc mesenteroides* spp.cremoris และ *Leuconostoc lactis* spp.lactis var.

2) นมหมักจากเชื้อแลกโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*)

นมหมักประเภทนี้ ได้แก่ การหมักนมของชาวบัลแกเรีย (Bulgaria) มีการใช้ *Lactobacillus* ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางจนถึงอุณหภูมิสูง คือ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus และนมหมักของชาวญี่ปุ่น ที่มีชื่อการค้าว่า ยาคูลท์ ซึ่งใช้ *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยโรคท้องร่วง

3) นมหมักจากแบคทีเรียแลคติกที่ชอบอุณหภูมิสูง

มีการใช้แบคทีเรียที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงกว่า 40°C ในการหมักนม คือ *Lactobacillus delbrueckii* spp. bulgaricus สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42-45°C และ *Streptococcus thermophilus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 38-45°C แบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความสามารถในการหมักนมได้แตกต่างกัน ทำให้นมหมักที่ได้มีคุณค่าทางอาหารและมีผลต่อสุขภาพที่แตกต่างกันด้วย

โยเกิร์ต มีแถบกำเนิดในทวีปเอเชีย โยเกิร์ตแบบดั้งเดิมมีวิธีการผลิตคล้ายกับนมหมักบัลแกเรีย โดยนำนมวัวหรือนมแพะมาต้ม ใช้นมที่มีปริมาณของแข็งสูงเพาะเชื้อหมักจากนมที่ผ่านการหมักในรุ่นก่อน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40-45°C จนได้ตะกอนนิ่มเนื้อเนียน อาจมีน้ำจากหางนมแยกตัวออกมาด้วย ในปัจจุบันการผลิตโยเกิร์ตนิยมใช้กล้าเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* spp. bulgaricus บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40-45°C pH ประมาณ 4.2-4.3 ทำให้เกิดการหมักแบบ homofermentative ในขณะการหมักดำเนินอยู่จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น จนตรวจนับจำนวนเชื้อได้ระหว่าง 200-1000 ล้าน CFU/mL ของโยเกิร์ต การเก็บโยเกิร์ตไว้นานจะมีผลทำให้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียลดจำนวนลง แบคทีเรียทั้ง 2 สปีชีส์ ในโยเกิร์ตจะเสริมประโยชน์ซึ่งกันและกัน การใช้เชื้อผสมจะมีผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลเจริญเติบโตดี และให้กรดสูง เช่น *streptococci* เจริญอย่างรวดเร็วในตอนเริ่มต้นของการหมัก ทำให้เกิดการสะสมของการหมักของกรดแลคติก และกรดอะซิติก อะเซทัลดีไฮด์ ไดอะซิติก และกรดฟอร์มิก กรดอะมิโนถูกปล่อยออกมาจากโปรตีนในนมจำนวนมากเกินกว่า *Streptococcus thermophilus* จะได้ใช้หมด จึงมีกรดอะมิโนอิสระเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต กรดอะมิโนที่มีมาก ได้แก่ กรดกลูตามิก และโฟลีน โยเกิร์ตอิสระเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีกรดอะมิโนอิสระสูง

4) นมหมักจากแบคทีเรียแลคติกและยีสต์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้หมักนมประเภทนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางถึงอุณหภูมิสูง ยีสต์ที่ใช้ ได้แก่ *Candida* spp. และ *Saccharomyces* spp. ผลผลิตที่ได้ คือ กรดแลคติก และเอทานอล ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีการเรียกชื่อแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น

คีเฟอร์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมกันในทวีปเอเชีย และในตะวันออกกลาง เชื้อหมักคีเฟอร์ มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ ผิวนอกมักจะยับยู่ยี่ เกาะกันเป็นก้อนคล้ายข้าวสุก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เมล็ดคีเฟอร์ที่ใช้ผลิตนมเปรี้ยวแบบดั้งเดิมได้จากธรรมชาติ สามารถใช้หมักซ้ำได้หลายครั้ง เมื่อเติมลงในนม เมล็ดจะพองออกและเปลี่ยนเป็นสีขาว เป็นเมือก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะยืดหยุ่นคล้ายเจลลี่ โดยทั่วไป *Lactobacilli* จะมีอยู่ในเมล็ดคีเฟอร์ประมาณ 65-80% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยที่ *Lactococci* ทำให้เกิดกลิ่นรส

การหมักคีเฟอร์ในระดับอุตสาหกรรม การผลิตกล้าเชื้อคีเฟอร์มี 2 ระยะ คือ ระยะแรกใช้เมล็ดคีเฟอร์เป็นหัวเชื้อ เพื่อนำมาผลิตกล้าเชื้อจำนวนมาก ในระยะที่สองใช้เมล็ดคีเฟอร์ต่อนมในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก (Libudzisz & Piatkiewcz, 1990) เมล็ดคีเฟอร์หลังจากกรองได้สามารถใช้เติมในนมสด เพื่อทำเชื้อหมักเก็บไว้ หรือล้างน้ำเย็นและเก็บในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว หรือเก็บไว้ในสารละลายเกลือแกง 0.9% สัดส่วนระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ในคีเฟอร์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการหมัก เช่น หลังจาก 3 วันไปแล้ว จำนวนแบคทีเรียจะลดลง ในขณะที่ยีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้น

2.6.2 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (meat products)

จัดเป็นอาหารหมักจากเนื้อสัตว์ ตัวอย่างเช่น ไส้กรอกหมัก และแหนม เป็นต้น ในอาหารหมักใส่เกลือ เครื่องเทศ น้ำตาล และสารกันเสีย (chemical preservative) ซึ่งผลจากการถนอมอาหารของสารเหล่านี้จะร่วมกับกรดที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้อาหารหมักมีระยะเวลาการเก็บที่ยาวนานขึ้น (วิลาวัณย์ และคณะ, 2532)

เนื้อเป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากคุณสมบัติของอาหารเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น water activity (aw) สูงถึง 0.97-0.98 pH 5.6 และส่วนประกอบของธาตุอาหารต่าง ๆ ดังนั้นจึงได้มีการถนอมอาหารโดยวิธีการต่างๆ เช่น การตากแห้ง และที่น่าสนใจ คือ การหมัก (อิเชียร, 2534)

2.6.2.1 ตัวอย่างอาหารหมักจากเนื้อสัตว์

1) แหนม

เป็นอาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อสัตว์ที่นิยมบริโภคกันทั่วประเทศ การหมักแหนมเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก โดยในระยะแรกของการหมักจะมีจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดี และเติบโตในที่มีอากาศน้อย ได้แก่ homofermentative cocci เช่น *Pediococcus cerevisiae P.pentosaceus* และ *P.acidilactici* เติบโตไปพร้อมกับ heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *Lactobacillus brevis* หลังจากการหมัก 3 วัน homofermentative cocci จะใช้น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ทำให้ pH ลดลง ต่อมาการหมักในวันที่ 4 จะพบเชื้อ heterofermentative lactobacilli คือ *L.plantarum* สร้างกรดออกมา ในขณะที่ *Pediococcus* ซึ่งทนกรดได้น้อยจะเจริญช้าลงและหยุดเจริญในที่สุด ในระยะนี้ pH ต่ำกว่า

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.5 มีผลทำให้จุลินทรีย์บางชนิด คือ แบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ*Salmonella* ตายเกือบหมด (วิลาวัณย์ และ อุบลวรรณ, 2540)

2) ไส้กรอกเนื้อหมัก

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมักติดมันบดรวมกับเครื่องปรุง ประกอบด้วยเกลือ น้ำตาล เครื่องเทศบรรจุในไส้ อาจเป็นไส้สัตว์หรือไส้เทียมที่เป็นพลาสติก สังเคราะห์จากเซลลูโลส เครื่องปรุงที่เป็นเกลือจะยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ในขณะที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียเจริญได้ก็จะเกิดการหมักกรดแลคติกเกิดขึ้น ในขณะที่เก็บไส้กรอกไว้หลังบรรจุ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก เกิดการหมักกรดแลคติกโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (lactic acid fermentative) และขั้นที่สองจะเกิดกลิ่นรสในระหว่างการบ่ม (ageing) (สุมณฑา, 2545)

3) ไส้กรอกเปรี้ยว

เป็นอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ มีต้นกำเนิดมาจากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย บางครั้งจึงเรียก ไส้กรอกอีสาน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักไส้กรอกเปรี้ยว ได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สำหรับชนิดที่พบมาก คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบ *L.brevis* และ *P.halophilus* แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการหมัก (วิลาวัณย์, 2536)

2.6.3 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Fermentation Fish Products)

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิดในแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เกี่ยวข้องกับ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ ปลาร้า, ปลาเจ่า, ปลาส้ม, และส้มฟัก ซึ่งผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้จัดอยู่ในชนิด fermented fish/salt/carbohydrate products และยังมีผลิตภัณฑ์ชนิด fish sauce เช่น น้ำปลา และ กะปิ ซึ่งส่วนผสมหลักในการผลิตประกอบด้วยปลา เกลือ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ *Lactobacillus farciminis, L. pentosus, L. plantarum, Lactobacillus spp.* และ *Leuconostoc spp.* จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำปลาเป็นกลุ่มที่ทนเกลือได้ดี และเจริญได้บ้างเล็กน้อยในระหว่างการหมัก จึงมีส่วนช่วยเสริมรสชาติของอาหารหมักได้เป็นอย่างดี

2.6.4 การหมักผัก (vegetable fermentation)

การหมักผักหรือการดองผัก เป็นการแปรรูปผักอีกวิธีหนึ่งที่นำผักสดที่มากเกินการบริโภคมาแปรรูป ทำให้เก็บไว้บริโภคได้นานและยังรวมไปถึงการผลิตผลไม้ดองด้วย การหมักหรือการดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีอยู่ในผักและผลไม้ การเติมเกลือจะทำให้แบคทีเรียอื่นๆหลายชนิดที่ทำให้ผักและผลไม้เน่าเสียไม่สามารถเจริญได้ และจำกัด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

อากาศเป็นการกระตุ้นให้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเจริญ ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการอากาศจะเจริญได้ไม่ดี การหมักแลคติกจึงเกิดขึ้น ส่วนจะเกิดกรดแลคติก กรดอินทรีย์อื่นๆ และสารให้กลิ่นรสอย่างอื่นมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสปีชีส์และสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตลอดจนการควบคุมสิ่งแวดล้อม

2.6.4.1 ตัวอย่างอาหารหมักจากพืช

1) ผักกาดดอง เป็นผักดองเปรี้ยวของไทยอย่างหนึ่ง พบว่าเมื่อเริ่มหมักแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นชนิด heterofermentative rod ได้แก่ *Lactobacillus spp.* และ *L.brevis* การหมักในระยะต่อมาแบคทีเรียพวก heterofermentative cocci จะเด่นขึ้นมา ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* ในช่วงหลังของการหมักจะพบพวก heterofermentative rod ได้แก่ *L.plantarum* (ลูกจันทร์, 2524)

2) หน่อไม้ดองมีหลักการเดียวกับการทำกะหล่ำปลีดองของประเทศตะวันตก โดย *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* จะผลิตกรดแลคติกในระยะเริ่มแรกของกระบวนการหมัก ส่วนในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมักจะพบ *L.buchneri, L. fermenti* และ *L. mesenteriodes* ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่พบในผักเสี้ยนดองมีทั้ง heterofermentative และ homofermentative และส่วนใหญ่ก็เป็นแบคทีเรียที่พบในการดองหน่อไม้ (ลูกจันทร์, 2524)

3) กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) เป็นกะหล่ำปลีที่มีรสเปรี้ยว นิยมรับประทานกันมากในประเทศแถวยุโรป ไม่ใช่อาหารหมักของไทย การผลิตในเชิงอุตสาหกรรมแม้ว่าจะมีกล้าเชื้อสำหรับการทำกะหล่ำปลีดองขายเป็นการค้า แต่ก็ความนิยมน้อยกว่าการหมักแบบดั้งเดิมที่เป็นวิธีธรรมชาติ ซึ่งมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียง 1% ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด หลังจากการหมักดำเนินไป 2 วัน จำนวนของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็น 90% ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และจะมีการสร้างกรดทำให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และกลิ่นรสของกะหล่ำปลีดองขึ้นอยู่กับการควบคุมแบคทีเรียแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (ลูกจันทร์, 2524)

4) กิมจิเป็นอาหารของชาวเกาหลี ส่วนใหญ่ทำจากกะหล่ำปลี วิธีการหมักมีดังนี้ คือ ใช้เกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 3%) ระยะเวลาในการหมักสั้น คือ 3 วัน หมักที่อุณหภูมิ 20°C เกิดกรดประมาณ 0.6 % และมี pH ประมาณ 4.2 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการหมัก คือ *Leuconostoc mesenteriodes* ตัวที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเสียไป คือ *Lactobacillus plantarum* ดังนั้นจึงไม่นิยมไว้หลายวัน เพราะจะทำให้เนื้อสัมผัสนิ่ม และมีรสเปรี้ยวมาก (สุมณฑา, 2545)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.6.5 ผลิตภัณฑ์จากถั่วและธัญพืช (Legume and cereal products)

ผลิตภัณฑ์จากพืชที่นอกเหนือจากผักและผลไม้แล้ว ถั่วและธัญพืชนับเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษา โดยเป็นการหมักที่ใช้ถั่วและธัญพืชเป็นสับสเตรท (substrate) เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมีหลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ตัวอย่างได้แก่ ซีอิ๊ว ซึ่งสับสเตรทในการหมักส่วนใหญ่ประกอบด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักได้แก่ *Aspergillus oryzae, P. halophillus* และ *L. delbrueckii* อาหารหมักชนิดนี้ใช้เป็นเครื่องปรุงรส ในอาหารหมักกลุ่มของ fermented bean เช่น hamanatto, tou-shin และ tao-si ซึ่งเป็นอาหารหมักของญี่ปุ่นใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและแป้งข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Aspergillus, Streptococcus* และ *Pediococcus* เต้าเจี้ยว เป็นอาหารหมักประเภท semi-solid นิยมบริโภคเช่นเดียวกับซีอิ๊ว เต้าเจี้ยวเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเช่นเดียวกับซีอิ๊ว

2.6.5.1 ซีอิ๊ว เป็นเครื่องปรุงรสอาหารที่ทุกประเทศนิยมบริโภค

2.6.5.2 หญ้าหมัก (silage) คือ อาหารหมักของสัตว์ วัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ หญ้า หรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เป้าหมายในการทำหญ้าหมัก คือ ต้องการให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้ออื่นๆ และเพื่อให้เก็บไว้ได้นาน แต่ปริมาณน้ำตาลที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้ได้มีอยู่ต่ำมากในหญ้าหมัก ดังนั้นจึงต้องมีการเติมยีสต์ alpha-amylase และ endoglucanase เข้าไปในแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อให้ผลผลิตน้ำตาลที่จะใช้เปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้อย่างเพียงพอ

2.6.6 การใช้ร่วมกับยีสต์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียใช้ร่วมกับยีสต์ได้ โดยในน้ำผลไม้ปกติจะมีน้ำตาลกลูโคส ซึ่งยีสต์จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล นอกจากกลูโคสแล้วในน้ำผลไม้จะมีกรดซิตริก ซึ่งแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum*

2.6.7 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็นอาหารเสริมซึ่งมีประโยชน์ต่อผู้ที่ได้รับ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ปัจจุบันโพรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

2.7 ประโยชน์ของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย

2.7.1 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาที่พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีความไวต่อ macrophage และ lymcocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(IgA) และผลิต gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *L. acidophilus* แลคโตบาซิลลัสที่พบในโยเกิร์ตจะสามารถจับส่วนนอกของเซลล์ CD4 และ CD8 T lymphocyte ได้ ในขณะที่แลคโตบาซิลลัสที่สามารถเกาะกับเซลล์อีพิทีเลียลของลำไส้มนุษย์ จะสามารถกระตุ้นการสร้างแมคโครฟาจก์ (macrophage) ได้

จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในหลายระดับด้วยกัน ได้แก่ การสร้างไซโตไคน์(cytokine) ช่วยเพิ่มปริมาณของเซลล์โมโนนิวเคลียร์(mononuclear) การเกิด macrophage phagocytosis การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอัตโนมัติ และภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียและโปรโตซัวก่อโรค การทดลองในระบบห้องปฏิบัติการพบว่าบิฟิโดแบคทีเรีย จะเหนี่ยวนำการสร้าง IgA เพิ่มขึ้น

นอกจากโพรไบโอติก จะช่วยในเรื่องของระบบภูมิคุ้มกับและสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในลำไส้แล้ว โพรไบโอติกยังสร้างสารอาหารหลายชนิดที่มีประโยชน์ เช่น ไฟเบอร์(กากอาหาร) ที่ละลายน้ำได้ กรดไขมันสายสั้นๆ เช่น กรดบิวไทริก (butyric acid) และกรด โพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งกรดเหล่านี้จะทำให้ค่า pH ในลำไส้ลดลง ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นเมื่อใดที่ร่างกายมีอาการภูมิแพ้หรืออ่อนแอนั้นเป็นสัญญาณบ่งบอกว่าจุลินทรีย์ในลำไส้เริ่มไม่สมดุลย์แล้ว ดังนั้นต้องกลับมาทำให้ร่างกายคืนสู่สมดุลด้วยการรับประทานอาหารจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เสริม และรับประทานอาหารที่มาจากธรรมชาติทั้งสิ้นและเกิบประโยชน์สูงสุดต่อร่างกาย

2.7.2 ป้องกันโรคออสทีโอโพโรซิส (โรคกระดูกผุ)

อาการของโรคนี้คือ การผุกร่อนของกระดูก ทำให้เป็นอันตรายต่อสุขภาพหรือถึงตายได้ มักพบในสตรีวัยหมดประจำเดือน สาเหตุหลักมาจากการที่ปริมาณแคลเซียมในกระดูกลดลง เพราะอาหารที่กินแต่ละวันมีแคลเซียมน้อยเกินไป หรือความเครียดเนื่องจากวัยที่มากขึ้นและสุขภาพที่เสื่อมถอยทำให้ร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้น้อยลง ปัญหาเหล่านี้แก้ไขได้ด้วยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

2.7.3 ความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์ให้โทษ

การหมักน้ำนมด้วยแลคโตบาซิลัส (*Luctobacillus*) ทำให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid) กรดเบนโซอิก(benzoic acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2) ซึ่งทุกตัวมีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ นมที่หมักด้วย *Lactobacillus acidophilus* จะมีสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ อะซิโดลิน(acidolin) อะซิโดฟิลิน(acidophilin) และแลคโตซิดิน(lactocidin) นมที่หมักด้วย *Lactobacillus bulgaricus* จะผลิตสารปฏิชีวนะ 1 ชนิด คือ บุลแกริแคน(bulgarican) โดยที่อะซิโดฟิลิน(acidophilin) และบุลแกริ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แคน(bulgarican) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้ป่วยเนื่องจากอาหารเป็นพิษคือ *Clostridium botulinum* และ *Sallmonella* spp.

การบริโภค *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ GG ในรูปของนม และนมผงที่ทำแห้งมีประสิทธิภาพในการลดระยะเวลาของอาการท้องเดินอย่างรุนแรง และสามารถนำมาใช้บำบัดอาการกำเริบของโรคลำไส้อักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Clostridum difficile* (Chang *et al.*, 1990)

2.7.4 การลดอาการแพ้น้ำนม

คนที่มีอาการแพ้น้ำนมจะขาดเอนไซม์ชื่อ แลคเตส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแลคโตส แลคติกแอซิดแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์แลคเตสชื่อ เบตา-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) ทำหน้าที่ไฮดรอไลซ์แลคโตสให้เป็นกลูโคสกับกาแลคโตส จากนั้นนำกลูโคสมาใช้ผลิตกรดแลคติก นอกจากนี้แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ยังช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแลคเตสขึ้นมาย่อยแลกโตสในลำไส้เล็ก ดังนั้นการกินน้ำนมที่ผ่านการหมักด้วยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ช่วยให้คนที่มีอาการแพ้น้ำนมได้รับสารแคลเซียมและสารอาหารอื่นๆ ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นที่นิยม การนำนมสดไปผ่านกระบวนการหมักโดยใช้แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) ทำให้คนที่แพ้นมเพราะขาดเอมไซม์แลคเตสจะสามารถกินได้โดยไม่มีปัญหา ผลิตภัณฑ์จากการหมักนมนี้มีแคลเซียมในปริมาณมากเท่าๆกับนมสด ทำให้ลดปัญหาการขาดแคลเซียมและการไม่ดูดซึมแคลเซียมของร่างกายลงไปได้ แลคติกแอซิดแบคทีเรียยังช่วยให้ร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้มากขึ้น ทำให้มีการทดแทนแคลเซียมในกระดูกที่ลดลง

2.7.5 การแก้สิว และฝ้า

การกิน *Luctobacillus acidophilus* ช่วยลดการเกิดสิวและอาการบวมแดง และช่วยให้ผิวพรรณผ่องใสขึ้น ดังนั้นเราสามารถใช้ *Lactobacillus acidophilus* จาก OMX ผสมกับหางนม แล้วทำเป็นครีมลอกหน้า สำหรับผิวปกติหรือผิวแห้ง สำหรับคนผิวมันแนะนำให้ใช้ OMX โลชั่น

2.7.6 การขจัดสารพิษจากตับ

ความเครียดจากสภาวะแวดล้อมภายนอก และความผิดปกติภายในร่างกาย มลพิษในอากาศ การกินเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และใช้สารเสพย์ติดล้วนส่งผลกระทบอย่างมากต่อตับและอาจทำให้ไม่สามารถกำจัดสารพิษออกจากเลือดได้ดีเท่าที่ควร โดยมีการให้คนไข้โรคตับ 20 คนกิน *Bifidum* และพบว่า แอมโมเนีย ในเลือดลดลง พีนอลในซีรัม และอะมิโนไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารพิษลดลงด้วย (ธารารัตน์, 2542)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.7.7 ลดการแพ้อาหาร และความไม่สามารถในการย่อยอาหาร

Lactobacillus bulgaricus บางสายพันธุ์ สามารถลดกรดในกระเพาะได้ดี ช่วยลดอาการท้องอืดเฟ้อ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่พบขณะเตรียม Lactobacillus มีฤทธิ์เป็นบัฟเฟอร์ ช่วยลดความเป็นกรดของน้ำย่อยในกระเพาะ นอกจากนี้ *Lactobacillus bulgaricus* ยังเป็นตัวควบคุม transient flora ทำให้ช่วยเพิ่มปริมาณของอุจจาระ อันเป็นแฟกเตอร์สำคัญต่อสุขภาพของระบบย่อยอาหาร หน้าที่อันนี้ของ Lactobacillus เกิดขึ้นโดยผ่านระบบน้ำเหลือง ทำให้ไม่ขัดขวางการทำงานของ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Bifidobacterium bifidum* ซึ่งทำงานในลำไส้

2.7.8 การรักษาโรค Traveller's Trots

โรค Traveller's Trots เป็นโรคบิดชนิดหนึ่ง เกิดขึ้นกับนักท่องเที่ยวที่เพิ่งเคยมาประเทศที่มีอากาศร้อน เนื่องจากได้รับเชื้อ *Escherichia coli* ถ้ารับประทานอาหารเสริม *Lactobacillus acidophilus* ติดต่อกัน 2 อาทิตย์ ก่อนเดินทางและนำติดตัวไปด้วยระหว่างเดินทางจะช่วยป้องกันโรคนี้ได้

2.7.9 นมหมักย่อยง่าย และมีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่านมสด

แบคทีเรียในนมหมักสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถย่อยสารอาหารได้มากกว่าปกติ ร่างกายจึงสามารถนำสารเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่ เช่น แบคทีเรียให้กรดแลคติกมีเอนไซม์ย่อยน้ำตาลแลกโตส (β-galactosidase) และเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) เป็นผลให้นมหมักมีสารอาหารโมเลกุลเล็กที่ร่างกายสามารถย่อย หรือนำไปใช้ได้มากกว่านมสด

2.7.10 การเพิ่มการดูดซึมเกลือแร่และธาตุเหล็ก

การหมักมีผลต่อปริมาณเกลือแร่ในนมหมักเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คุณค่าทางอาหารมิได้ขึ้นอยู่กับว่าในอาหารจะมีธาตุอาหารมาเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับความสามารถของร่างกายในการนำธาตุอาหารไปใช้ประโยชน์ด้วย ในกรณีของผู้สูงอายุที่ต้องการแคลเซียมเพิ่มขึ้น แต่มีการหลั่งน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การบริโภคนมหมักจะช่วยเพิ่มการละลายและการดูดซึมของแคลเซียมและเหล็ก ทดแทนปัญหาการลดลงของความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (สุมณฑา, 2545)

2.7.11 ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

2.7.12 ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

2.7.13 ด้านเส้นใย และแผ่นผ้าแบบ non-woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.7.14 ด้านยานยนต์ เช่น อุปกรณ์ลดแรงกระแทก (bumpers) แผ่นรองพื้น (floor mats) และอุปกรณ์ตกแต่งภายใน

2.7.15 ด้านอุปกรณ์การแพทย์

เนื่องจาก PLA เป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อ (biocompatible) และสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) ได้โดยระบบชีวภาพ (biological system) ในร่างกาย จึงทำให้ PLA เป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงสำหรับงานทางการแพทย์ และถูกนำมาใช้ทางด้านนี้มานานกว่า 2 ทศวรรษ เช่น ไหมเย็บแผล (sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.7.16 ด้านอื่นๆ คือ การนำกรดแลคติกไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพอลิแลกเทต ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่อใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

2.8 โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก (Probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” Lilly & Stillwell (1965) เป็นบุคคลแรกที่นำมาอธิบายว่า สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุ ลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุ ลินทรีย์เกือบทุกชนิด ขณะที่ Parker (1974) ให้คำจำกัดความไว้ว่า โพรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ หรือสสารซึ่งสามารถปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ต่อมา Fuller (1989) ได้ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติก คือ อาหาร(เสริม) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และยังก่อให้เกิดประโยชน์ ช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต ในปีเดียวกันนี้ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration; FDA) ได้ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติก คือ ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารที่ให้กินโดยตรง และจัดให้โพรไบโอติกเป็นสารที่เติมลงในอาหารมนุษย์และสัตว์ ที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) ต่อผู้บริโภค โดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกร และนักพิษวิทยาแล้ว (Pollman, 1986)

นิยามหนึ่งของอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) คือ กลุ่มอาหารที่เชื่อว่าส่งผลดีต่อสุขภาพ ซึ่งผลิตหรือบรรจุด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต อาหารเหล่านี้เรียกว่าโปรไบโอติกนั่นเอง โพรไบโอติกเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่มุ่งหมายจะช่วยเสริมสร้างสุขภาพและช่วยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกายผู้ถูกอาศัย ผู้เชียวชาญหลายท่านได้ถกเถียงกันเพื่อหานิยามของโพรไบโอติก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

นานมาแล้วคำนิยามของโพรไบโอติกค่อนข้างแคบมากและมีการประยุกต์ใช้เฉพาะกับสัตว์เท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ มีนิยามที่เกี่ยวข้องกับโพรไบโอติกเกิดขึ้นมากมาย ซึ่งส่วนใหญ่จะพิจารณาจากผลกระทบโดยตรงที่สัมพันธ์กับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในร่างกาย คำนิยามที่เกี่ยวข้องกับโพรไบโอติกแสดงดังตารางที่ 2.4

คำนิยามเกี่ยวกับโพรไบโอติกอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงได้อีกตลอดเวลา โดยเฉพาะหากนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นยังคงค้นคว้าเกี่ยวกับโพรไบโอติก หรือโครงสร้างของเซลล์นั้นๆ ที่อาจก่อให้เกิดประโยชน์กับสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้นด้วยเหตุนี้เองจึงยังคงมีคำนิยามใหม่ๆ เกิดขึ้นเสมอ และอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงได้อีกเรื่อยๆ ในอนาคตข้างหน้า (Lee *et al.* 1999; Salminen *et al.* 1999)

โพรไบโอติก จึงต้องมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ โดยส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มแบคทีเรีย *Lactobacilus* และ *Bifidobacterium* นอกจากนี้ยังมีโพรไบโอติกกลุ่มอื่นๆ ซึ่งแสดงใน ตารางที่ 2.5 โดยโพรไบโอติกจะทำหน้าที่ในการย่อยอาหารและผลิตสารที่มีประโยชน์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิดซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ร่างกาย (ธารารัตน์, 2542) โพรไบโอติก สามารถปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ โดยการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ การใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic) จะทำลาย หรือยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งที่มีประโยชน์และมีโทษ แต่การใช้โพรไบโอติกจะทำให้จุลินทรีย์เหล่านั้นมีชีวิตอยู่อย่างสมดุล (balance flora) (Fuller, 1989; Reid, 2003) จากลักษณะดังกล่าวจึงทำให้มีการสนใจนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์ เพื่อหลีกเลี่ยงผลเสียอันเกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะ เนื่องจากการนำสารปฏิชีวนะมาใช้เลี้ยงสัตว์ทางการค้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอัตราการตายที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ทำให้เกิดพัฒนาการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์ นอกจากนั้นการตกค้างของสารปฏิชีวนะในตัวสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ยังส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคในคนเกิดการดื้อต่อสารปฏิชีวนะตามไปด้วย สหภาพยุโรป (European Union) จึงมีประกาศห้ามใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2549 เป็นต้นไป เนื่องจากเล็งเห็นผลกระทบที่มีต่อผู้บริโภคดังกล่าว ดังนั้นการนำโพรไบโอติกมาใช้แทนการใช้สารปฏิชีวนะจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ (Araneo *et al.*, 1996; Cavazzoni *et al.*, 1998; Eren *et al.*, 1999) โดยโพรไบโอติกกลุ่มที่มีการเติมลงในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค ได้แก่ *Lactobacilli, Bifidobacteria, Streptococci* และ *Enterococci* ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.6

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2.4 คำนิยามของโปรไบโอติก

อดีต	ปัจจุบัน
"อาหารเสริมของสัตว์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ที่ถูกอาศัย โดยส่งผลต่อจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร" (Parker, 1974) "อาหารเสริมจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งส่งผลต่อร่างกายสัตว์ที่ถูกอาศัย โดยการช่วยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Fuller, 1989) "เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเดี่ยวหรือผสม ซึ่งเมื่อประยุกต์ใช้ในคนและสัตว์แล้วก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้ถูกอาศัย โดยจะช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ในลำไส้" (Havenaar & Huis in't Veld, 1992) "เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และ/หรือเซลล์ตายแล้ว ซึ่งมีจุดมุ่งหมายเพื่อช่วยปรับปรุงสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ในผนังเนื้อเยื่อเมือก หรือช่วยกระตุ้นกลไกของระบบภูมิต้านทาน" (Reuter, 1997)	"ส่วนผสมอาหารจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์" (Salminen *et al.*, 1998) "อาหารเสริมที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่พอเพียง จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อระบบลำไส้ของร่างกายมนุษย์" (Dimer & Gibson, 1998; Zimmer & Gibson, 1998; Holzapfel & Schillinger, 2002; Fuller, 1989) "จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งยังคงเหลือรอดหลังจากผ่านระบบทางเดินอาหาร และก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้ถูกอาศัย" (De Roos & Katan ,2000; Lee & Salminen, 1995; WHO/FAO, 2002)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2.5 จุลชีพที่ใช้เป็นสาร probiotics

Lactobacillus species	**Bifidobacterium**	**Species Others**
L. acidophilus	*B. bifidum*	*Bacillus cereus*
L. casei (rhamnosus) - LGG	*B. longum*	*Escherichia coli*
L. reuteri	*B. breve*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. bulgaricus	*B. infantis*	*Saccharomyces boulardii*
L. plantarum	*B. lactis*	*Enterococcus faecalis*
L. johnsonii	*B. adolescentis*	*Streptococcus thermophilus*
L. lactis		*Trichuris suis*

ที่มา: อุทัย เก้าเอี้ยน (2549)

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างของแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค

Lactobacilli	**Bifidobacteria**	**Streptococci**	**Enterococci**
Lactobacillus delbrueckii subsp *bulgaricus*	*B. bifidum*	*S. thermophilus*	*E. faecalis*
L. aciddophilus	*B. longum*		*E.enterococcus faecium*
L. rhamnosus	*B. breve*		
L . reuteri	*B. infantis*		
L. casei			

ที่มา : Fook *et al.*, 1999

การใช้โพรไบโอติกในการควบคุมเชื้อโรคในลำไส้สัตว์ ต่างจากการควบคุมทางชีวภาพ (Biological control) เนื่องจากการควบคุมทางชีวภาพ คือ การนำจุลินทรีย์ไปใช้กับศัตรูในธรรมชาติเพื่อลดการทำลายของเชื้อก่อโรค หรือควบคุมไม่ให้เชื้อก่อโรคมีการเพิ่มจำนวน แต่โพรไบโอติกไม่จำเป็นต้องจู่โจมเชื้อก่อโรค มันจะทำหน้าที่ปกป้องเจ้าบ้าน (host) จากเชื้อก่อโรคด้วยการเจริญแบบแข่งขัน หรืออาจมีการสร้างสารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (รจเรข, 2546)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การเสริมโพรไบโอติกลงในอาหารสัตว์มีจุดประสงค์เพื่อการถนอมอาหาร เพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารอาหาร สร้างสารที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ และปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ลดอัตราการตายของสัตว์ได้ โดยเฉพาะระยะตัวอ่อน หรือวัยเด็กที่ระบบการย่อยอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันยังทำงานได้ไม่ดีนัก (Wallace & Newbold, 1992; Becquet, 2003; Casanova *et al*., 2006) การนำโพรไบโอติกมาใช้อาจใช้ในรูปสายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสม โดยอาจใช้ในรูปผง แกรนูล หรือในรูปสารละลายเซลล์ โดยการป้อนให้สัตว์ทางปากโดยตรง หรือผสมในอาหารและน้ำดื่ม เมื่อสัตว์กินโพรไบโอติกเข้าไป โพรไบโอติกจะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโต หรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วนโดยจะแทรกตัวอยู่ตามร่องวิลไล (villi) ของลำไส้เล็ก และมีการย่อยสลายกากอาหาร ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น กรดแลคติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การเกาะติดของโพรไบโอติกจะแผ่กระจายทุกพื้นที่ ทำให้ปิดทางหรือการเกาะติดของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรียและไวรัส (เกรียงศักดิ์, 1991) เมื่อโพรไบโอติกสามารถจับกับเยื่อบุผิวของลำไส้ได้ จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถมายังบริเวณนี้ได้เร็วขึ้น จึงช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อฉวยโอกาสได้ (opportunistic pathogen) (Ouwehand *et al*., 1999) มีหลายรายงานที่พบว่า เซลล์ของโพรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตสามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการมีชีวิตของเชื้อ (Hood & Zottola, 1988; Coconier *et al*., 1993) นอกจากนั้นยังพบว่า โพรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ในช่วงแรกต้องสามารถเจริญได้ดี เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่สูงในผลิตภัณฑ์ แต่ไม่จำเป็นต้องดำรงชีวิตได้ดีในระหว่างการเก็บรักษา (Mattila-Sandholm *et al*., 2002) ความสามารถในการยึดเกาะของโพรไบโอติก ยังทำให้เกิดการยึดเกาะกันแบคทีเรียก่อโรคเกิดการรวมกลุ่ม (coaggregation) ซึ่งเป็นทางหนึ่งที่ใช้ในการขับแบคทีเรียก่อโรคออกจากร่างกาย และยังทำให้โพรไบโอติกที่มีการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ดี เนื่องจากอยู่ในระยะที่ใกล้มาก (Reid *et al*., 2003) นอกจากนี้โพรไบโอติกยังช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ (gut peristalsis) เมื่อมีการเคลื่อนที่ของอาหารผ่านระบบทางเดินอาหาร จึงช่วยจำกัดการเจริญของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารได้อีกทางหนึ่ง จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ กลุ่ม lactobacilli, streptococci, lactococci และ bifidobacteria (Fuller & Perdigon, 2003) จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bi. breve*, *Bi. bifidum*, *Bi. infantis*, *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* (Fuller, 1989; Gordin and Gorbach,

มหาวิทยาลัยราชภัฏ Rajabhat University

1992) นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* (Kozasa, 1988) ยีสต์ *Saccharomyces* spp. และรา *Aspergillus* spp.เป็นต้น (Fuller & Perdigon, 2003)

2.8.1 การทำงานของโพรไบโอติก

การใช้โพรไบโอติกในอาหารสัตว์ มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงสมรรถภาพการผลิตและป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ แม้จะยังไม่ทราบกลไกการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกแน่ชัดนักแต่อาจอธิบายได้ดังนี้

2.8.1.1 ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์วิตามิน และสารอาหารที่จำเป็น เช่น จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในกลุ่ม *Bacillus* spp. เช่น *B. cereus* และ*B. subtilis* หรือกลุ่ม *Clostridium* spp. สามารถสังเคราะห์วิตามินบีได้ (Patterson & Burkholder, 2003)

2.8.1.2 สร้างกรดอินทรีย์ (organic acids) เช่น กรดฟอร์มิก (formic) กรดซอร์บิก (sorbic) กรดโพรพิโอนิก (propionic) กรดแลคติก (lactic) และกรดอะซิติก (acetic) เป็นต้น ทำให้เกิดสภาวะความเป็นกรดมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคลดจำนวนลง (Reid *et al*., 1987)

2.8.1.3 สร้างสารเมแทบอไลท์ ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษ หรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยากำจัดสารพิษ (Hood & Zottola, 1988)

2.8.1.4 กระตุ้นการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Lactobacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. เช่น *B. cereus* หรือกลุ่ม *Clostridium* spp. สามารถสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส และโพรติเอส (protease) *Enterococcus faecium* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) (Casanova *et al*., 2006)

2.8.1.5 สร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น สารปฏิชีวนะและแบคเทอริโอซิน เป็นต้น โพรไบโอติกที่สร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* สร้าง ampicillin, neomycin และ amoxicillinclavulanate สายพันธุ์ *Bifidobacterium longum* สร้าง erythromycin โพรไบโอติกที่สร้างแบคเทอริโอซิน เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* sp. สร้างแบคเทอริโอซิน nisin, lacticin 3147 และ lacticin 481 แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. สร้างแบคเทอริโอซิน lactosin 27, sakacin A, sakacin B และ plantaricin C (O'Sullivan *et al*., 2002) และแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococcus* sp. สร้าง pediocin เป็นต้น

2.8.1.6 รักษาภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ โดยโพรไบโอติกจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ขณะเดียวกันจะไปเพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* sp. จึงทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เมื่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเจริญเพิ่มขึ้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และโรคลำไส้อักเสบได้ (Patterson & Burkholder, 2003)

2.8.1.7 ลดปริมาณแอมโมเนีย โพรไบโอติกที่เตรียมจากเชื้อ *B. cereus* สามารถลดระดับแอมโมเนียในลำไส้ ในอุจจาระและในกระแสโลหิตได้ (Pollmann, 1986; Patterson & Burkholder, 2003)

2.8.1.8 ลดปริมาณโคเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือด โพรไบโอติกบางสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น สามารถสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส (Bile Salt Hydrolase; BSH) ซึ่งทำให้น้ำดี (bile) แตกตัวออกเป็นกรดน้ำดีอิสระและกรดอะมิโน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการละลายไขมันลดลง เนื่องจากกรดน้ำดีอิสระมีประสิทธิภาพการละลายไขมันต่ำกว่าน้ำดี นอกจากนั้นกรดน้ำดีอิสระส่วนใหญ่ยังถูกขับออกจากร่างกายไปพร้อมกับมูล ดังนั้นเพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมไขมันไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีการนำโคเลสเตอรอลมาใช้ในการสังเคราะห์น้ำดีขึ้นมาใหม่ เป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลลดลง (Fuller, 1989; Reid, 1999)

2.8.1.9 แบคทีเรียจำพวก Bifidobacteria ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสามารถป้องกันการสร้างสารพิษเอมีน (toxic amine) จากจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารได้ (Pollmann, 1986)

2.8.1.10 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากผนังเซลล์ของโพรไบโอติกมีสมบัติเป็นแอนติเจนจึงสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาได้ เช่น ผนังเซลล์ของ Lactobacilli ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เมื่อถูกย่อยเป็น muramyl peptides จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนั้นสารเชิงซ้อน เช่น lipoteichoic acid และ S-layer proteins ก็สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ (Casanova *et al.*, 2006)

2.8.2 คุณสมบัติและกลไกการทำงานของโพรไบโอติกแบคทีเรีย

เมื่อเจ้าบ้าน (host) ได้รับโพรไบโอติกเข้าไปแล้วมันจะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วน โดยเฉพาะการแทรกตัวอยู่ตาม villi ของลำไส้เล็ก มีการย่อยสลายกากอาหารแล้วสร้างกรดแลกติก กรดแลกติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การเกาะติดของจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะแพร่กระจายทุกพื้นที่ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ไม่มีพื้นที่สำหรับการเกาะติด การรับจุลินทรีย์โปรไบโอติกเข้าไปเป็นสิ่งแปลกปลอมจะดึงดูดพวกแมคโครฟาจ จึงเป็นการกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันแห่งได้ดีขึ้น นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังมีความสามารถในการผลิตสารซึ่งจำเป็นต่อเจ้าบ้านเช่น กรดอะมิโน กรดแลกติกและวิตามิน (ธารา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รัตน์, 2542) ความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะทำให้เกิดการพัฒนาในลำไส้เล็ก ทำให้คนและสัตว์มีความสามารถในการต้านทานโรค โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ซึ่งในการสร้างความสมดุลนี้เรียกว่า แบคทีเรียลแอนตาโกนิซึ่ม (Bacterial Antagonism) หรือโคโลไนเซชั่นรีสีสแตนส์ (Colonization resistance) ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดยูไบโอซีส (Eubiosis) ขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้จะทำให้ระบบการย่อยอาหารและการดูดซึมดีขึ้นตามปกติ ในการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะเกิดจากสภาพแวดล้อมและอาหารที่กินเข้าไป การใช้สารปฏิชีวนะและความเครียด ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ จะมีผลทำให้เกิดแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะโคลิฟอร์ม ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถลดอาการดังกล่าวได้โดยการทำงานดังนี้

2.8.2.1 เป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก และตรวจสอบแล้วว่าเป็นที่ยอมรับและมีความปลอดภัย (Generally Regarded As Safe; GRAS) ไม่ทำให้เกิดโรค ไม่ก่อมะเร็ง และไม่เป็นพิษ (Reid, 1999; Kaur *et al*., 2002; Fuller and Perdigon, 2003; Oyetayo and Oyetayo, 2005)

2.8.2.2 แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีต้องมีคุณสมบัติในการทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontulu, 1998) ซึ่ง pH ของกรดในกระเพาะอาหารโดยปกติจะอยู่ในช่วง 1-3 นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกจะมีความสามารถในการทนกรดได้แตกต่างกัน เช่น *L. lactis* , *L. plantarum* และ *Lactobacillus fermentum* ทนต่อกรดและ pH ต่ำ สามารถรอดชีวิตที่ pH 2.5 - 6.5 เวลา 1.5 ชั่วโมง แต่ไม่พบการรอดชีวิตที่ pH 1.0 – 2.0 ยกเว้น *L. platarum* (Balcazar *et al.*, 2008) *Lactobacillus sake* (RM 10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงที่ pH 3.0 (Erkkila and Peteja, 2000) ซึ่งการทนต่อกรดของโพรไบโอติกยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกจุลินทรีย์ โดย Khalil และคณะ (2007) ได้แยกโพรไบโอติกของอุจจาระเด็กทารกจากประเทศอียิปต์ที่รับประทานนมแม่ซึ่งได้โพรไบโอติกทั้งหมด 55 สายพันธุ์ พบว่า 28 สายพันธุ์จาก 55 สายพันธุ์ สามารถทนกรดที่ pH 3.0 นาน 3 ชั่วโมงได้ (Khalil *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Maragkoudakis และคณะ (2006) ได้ทำการแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก จากนมหมัก ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 29 สายพันธุ์ และพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อกรด pH 3.0 ได้ 6 ชั่วโมง สามารถทนต่อกรด pH 2.0 ได้ 3 ชั่วโมง และสามารถทนต่อกรด pH 1.0 ได้ 1 ชั่วโมง (Maragkoudakis *et al.*, 2006)

2.8.2.3 โพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ เนื่องจากในทางเดินอาหารโดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีเกลือน้ำดีที่หลั่งจากตับอ่อนเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 – 0.30 (Erkkial and Petaja, 2000) ซึ่ง Succi และคณะ (2005) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติก *L. rhamnosus*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากเนยแข็ง Parmigiano Reggiano ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0% (Succi *et al.*, 2005)

2.8.2.4 สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้เคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (Peristalsis) การที่โพรไบโอติกเกาะเคลือบที่ผนังทางเดินอาหารจะช่วยในการ colonization ของโพรไบโอติกได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยในการย่อยอาหาร และการดูดซึมให้เป็นไปอย่างปกติอีกด้วย (Fuller, 1993) ซึ่งจากการศึกษาของ Zhong และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* และ *Clostridium difficile* ในเยื่อบุผนังลำไส้ โดยใช้ adhesion จากเชื้อ *B.adolescentis* 1027 พบว่า adhesin ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 µg/ml สามารถยังยั้งการยึดเกาะของ enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* และ *C. difficile* ที่เยื่อบุผนังลำไส้ได้(Zhong *et al.*, 2004)

2.8.2.5 กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งสามารถพบได้ในแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacillus ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำกัดจุลินทรีย์ก่อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) อีกทั้ง *Lactobacillus* sp. จากผลิตภัณฑ์นมและโยเกิร์ตที่ให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทานพบว่าทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น 90 % เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus* sp. มีการสร้างภูมิคุ้มกัน 46% (Kaila *et al.*, 1992)

2.8.2.6 สามารถสร้างสารต่างๆ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีจำนวนมากเกินไป เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Fullur, 1993) Con และคณะ (2001) ได้แยกแบคทีเรีย *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 4 สายพันธุ์ จาก sucuk ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ จากนั้นศึกษาผลการยับยั้ง *Listeria* 16 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจาก sucuk เช่นกัน พบว่า *Pediococcus* สายพันธุ์ 413, 416, 419, และ 446 สามารถยับยั้ง *Listeria* สายพันธุ์ที่ทดสอบได้ และนอกจากนี้ยังพบว่า reuterin ซึ่งเป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่ pH เป็นกลาง ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L.reuteri* (Helander *et al.*, 1997) สามารถยังยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้ง โปรโตซัว (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

2.8.2.7 ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้

2.8.2.8 ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) และต้านการเกิดมะเร็ง (anticarcinogenic) โดยโพรไบโอติกบางสายพันธุ์ ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในอุจจาระและสารก่อมะเร็งลดลง จึงช่วยลดการเกิดมะเร็งในลำไส้ (Fuller, 1989; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.8.2.9 สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulose มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆ ดีขึ้น (อุทัย, 2535)

2.8.2.10 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) โดยจะไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรงมะเร็ง เช่น β-glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β-glucosidase (Saarela *et al*., 2000) Goldin และ Gorbach (1980) รายงานว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. acidophilus* ไม่เพียงแต่ช่วยลดการทำงานของเอ็นไซม์ dimethylhydrazine (DMH) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ แต่ยังช่วยเพิ่มระยะ latency ในหนูได้อีกด้วย (Goldin & Gorbach ,1980)

2.8.2.11 ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหารเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่างๆ ในร่างกาย (อุทัย, 2535)

2.8.2.12 ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด Buke และ Gilliland (1994) ได้แยก *L. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัครจากนั้นได้ศึกษาการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด พบว่า *L. acidophilus* O16 สามารถดูดซึมคอเลสเตอรอลได้มากที่สุด คือ 50.9 µg/ml และ *L. acidophilus* O14 ดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ 47.1 µg/ml (Buke & Gilliland 1994)

2.8.2.13 เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์, 2533)

2.8.2.14 ป้องกันการเกิด lactose intolerance ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์แลกเตสมาย่อยน้ำตาลแลกโตสได้ ทำให้เกิดอาการท้องอืดหรือท้องเสีย เมื่อรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลแลกโตสเข้าไป ส่วนใหญ่จะพบมากในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ โดยโพรไบโอติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งป้องกันการเกิด lactose intolerance (Fook *et al.,* 1999)

2.8.2.15 สามารถแย่งอาหารของจุลินทรีย์ก่อโรค (Fuller, 1993)

2.8.2.16 สามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ เพาะเลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และราคาไม่แพง

2.8.2.17 มีชีวิตอยู่ได้ในระหว่างกระบวนการ มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์และในระหว่างการเก็บรักษา (Oyetayo & Oyetayo, 2005)

2.8.2.18 สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างสาร antibody ขึ้นได้โดยเฉพาะที่เรียกว่า “Local immunity”

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.8.2.19 สร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายของคนและสัตว์ เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโนและวิตามิน

2.8.2.20 สามารถกระตุ้นให้เกิดเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซด์หรือแมโคฟาร์จ มารวมตัวกันซึ่งแมคโคฟาจจะเป็นตัวทำลายเชื้อโรคโดยตรง

ตารางที่ 2.7 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ (Parker,1974;Fuller,1989)

โพรไบโอติก	ปฏิชีวนะ
<u>คุณสมบัติ</u> 1. เป็นสิ่งมีชีวิต 2. ไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร 3. เพิ่มการเจริญและเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้อาหาร 4. ไม่ตกค้างในเนื้อเยื่อ 5. ไม่เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา	<u>คุณสมบัติ</u> 1. เป็นสารเคมีบริสุทธิ์ 2. ดูดซึมในทางเดินอาหาร 3. ตกค้างในเนื้อเยื่อ 4. ทำให้เชื้ออื่นเกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา
<u>กลไกการออกฤทธิ์</u> 6. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฉพาะที่ 7.เจริญได้ในทางเดินอาหารและแข่งการเจริญกับเชื้อก่อโรคได้	<u>กลไกการออกฤทธิ์</u> 6.ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ทั่วร่างกายและออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด 7.ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์, DNA, RNA และโปรตีนของแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของโพรไบโอติกแบคทีเรียทางสรีรวิทยาในมนุษย์

2.9.1 การดูดซึมสารอาหาร

การดูดซึมสารอาหาร ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่มีความซับซ้อนและมีเมแทบอลิซึ่มต่าง ๆ กัน หน้าที่เริ่มต้นของจุลินทรีย์คือการสร้างพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน ซึ่งจะทำให้เกิดการหมักและการดูดซึมผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น คือกรดไขมันสายสั้น โดยกรดไขมันสายสั้น อะซิเตท โพรพิโอเนต และบิวทิเรต ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานในลำไส้ (บิวทิเรต) ตับ (โพรพิโอเนต) และกล้ามเนื้อ (อะซิเตท)

Naidu et al. (1999) แสดงให้เห็นว่ากรดไขมันสายสั้น เช่น กรดแลคติกโพรพิโอนิก และบิวทีริก จะเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ในการสร้างพลังงานสะสมและแสดงกิจกรรมทางชีววิทยาของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย การหมักของโปรตีนและไขมันในลำไส้ใหญ่จะช่วยเสริมสร้างปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ปลายลำไส้ใหญ่ เนื้อเยื่อเมือกของปลายลำไส้ใหญ่จะทำการดูดซึมกรดไขมันสายสั้นอย่างรวดเร็วจากลูเมน (lumen) โดยเฉพาะกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก ซึ่งอาจจะไปช่วยสนับสนุนการสร้างพลังงานให้แก่ผู้ถูกอาศัย ในขณะเดียวกันกรดไขมันสายสั้นบางตัวอาจจะช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อเยื่อเมือกของลำไส้ เช่น การที่กรดบิวทีริกแสดงผลในการช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอกในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ (Naidu *et al.*, 1999)

2.9.2 ช่วยบรรเทาอาการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus bulgaricus* และจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสอื่นๆ ที่ใช้โดยทั่วไปในอุตสาหกรรมนมหมักนั้นจะช่วยส่งเสริมให้เอนไซม์แลคเตสย่อยแลคโตสในผลิตภัณฑ์นมได้ (Naidu *et al.*, 1999) ชี้ให้เห็นว่าโยเกิร์ตที่มีเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* จะช่วยลดอาการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้ ในขณะเดียวกันเขายังกล่าวว่าอาการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้อย่างสมบูรณ์ในเด็กเล็กจะลดลงหลังจากที่ให้รับประทานโยเกิร์ตที่มีเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* มากกว่าการบริโภคนมธรรมดา

2.9.3 ป้องกันฟันผุ

โรคฟันผุเป็นโรคที่พบได้ทั่วไปในมนุษย์และมีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus mutans* จากงานวิจัย 2 ชิ้น พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus rhamnosus* GG สามารถช่วยลดอาการฟันผุได้ ซึ่ง Nase *et al.* (2001) ศึกษาผลของโพรไบโอติกในเด็กอายุ 1-6 ขวบ จำนวน 594 คน เมื่อมีการให้รับประทานนมที่มีและไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* GG นาน 7 เดือน พบว่าเด็กที่ได้รับโพรไบโอติกมีการผุของฟันน้อยลง ทั้งนี้กลไกการทำงานอาจจะยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* จะเข้าไปแทนที่หรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *S. mutans* (Nase *et al.*, 2001)

2.9.4 การป้องกันโรคทอนซิลและการติดเชื้อในลำคอ

Reid *et al.* (2006) รายงานว่าจากการทดลองสุ่มโดยใช้ยาที่บังเกิดผลทางจิตใจแต่ไม่มีฤทธิ์รักษาโรคต่อการกลับมาอีกครั้งของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค α *Streptococcal* โดยการให้โพรไบโอติกซ้ำๆ ซึ่งผู้ป่วย 36 คนที่เป็นโรคทอนซิลจากการรับเชื้อ *Streptococcal* group A จะได้รับสารปฏิชีวนะตามการรักษาแบบให้ยาที่บังเกิดผลทางจิตใจแต่ไม่มีฤทธิ์รักษาโรค 19 คน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

และได้รับเชื้อ α *Streptococcal* 16 คน ผลการทดลองพบว่าการรักษาแบบไม่ได้รับ โพรไบโอติก จะทำให้ผู้ป่วยกลับมาเป็นทอนซิลก่อน 2 เดือน ส่วนผู้ป่วย 1 คนที่ได้รับโพรไบโอติก และ 11 คนที่ได้รับการรักษาแบบให้ยาที่บังเกิดผลทางจิตใจแต่ไม่มีฤทธิ์รักษาโรคจะกลับมาเป็นทอนซิลอีกครั้งหลังจาก 3 เดือน (Reid *et al.*, 2006)

2.9.5 ประโยชน์ต่อระบบปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์

การศึกษาเริ่มขึ้นจากงานของ Bruce ในปี 1973 (Bruce *et al.*, 1973) เขารายงานว่าผู้หญิงที่อาการติดเชื้อกระเพาะปัสสาวะน้อยลงนั้น เกิดจากการที่มีเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* ในช่องคลอด จึงเชื่อว่าเชื้อดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวกีดกันจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจากทวารเข้าสู่กระเพาะปัสสาวะ ดังนั้นก่อนปี 1978 สายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัสจึงถูกเลือกมาเพื่อใส่ในช่องคลอดเพื่อลดการติดเชื้ออีก เกณฑ์ที่ใช้เลือกในเวลานั้นคือความสามารถในการเกาะติดและการรวมตัวในช่องคลอดเพื่อป้องกันการการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Reid *et al.*, 1987; Reid *et al.*, 2006) ทั้งนี้กว่า 22 ปีมาแล้วที่มีการแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus reuteri* B-54 และ *Lactobacillus reuteri* RC-14 มีความสามารถในการรวมตัวที่ช่องคลอดและสามารถลดการรวมตัวของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและการติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะและช่องคลอดได้ (Reid *et al.*, 1995, 2001, 2003, 2006; Cadieux *et al.*, 2002)

ในขณะเดียวกันเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 และ *Lactobacillus reuteri* RC-14 ยังมีความสามารถในการฆ่าเชื้อไวรัสเอชไอวี (Cadieux *et al.* 2002; Reid, 2006) ได้ และยังแสดงให้เห็นอีกว่า ผู้หญิงที่มีเชื้อ *Lactobacillus* อาจจะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อ HIV ต่ำ (Sewankambo *et al.* 1997; Reid, 2006)

2.9.6 การปรับปรุงความสามารถในการเคลื่อนไหวของลำไส้

Naidu *et al.* (1999) รายงานว่าโรคท้องผูกเป็นโรคหลักของผู้ป่วยสูงอายุในโรงพยาบาลเนื่องจากการสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหวของลำไส้และยังพบว่าการให้นมที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* แก่ผู้ป่วยสูงอายุที่มีปัญหาโรคท้องผูกในโรงพยาบาลจำนวน 42 คน พบว่า การรับประทานนมที่มีเชื้อ *L.acidophilus* 200-300 ml ต่อวันจะช่วยบรรเทาอาการดังกล่าวได้ (Naidu *et al.*, 1999)

2.9.7 การลดคอเลสเตอรอลในเซรั่ม

เชื้อจุลินทรีย์ *L. acidophilus* มีคุณสมบัติที่ดีในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพ โดยการช่วยป้องกันมะเร็งและป้องกันคอเลสเตอรอลสูง รวมถึงเป็นศัตรูกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้และในอาหาร เชื้อจุลินทรีย์ *L. acidophilus* สามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่ดีและ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สามารถตั้งรากฐานได้ในระบบนิเวศวิทยาที่ซับซ้อนของทางเดินอาหาร ซึ่งผลของการที่คอเลสเตอรอลลดต่ำลงอาจเกิดเนื่องจากความพยายามในการยับยั้งของเอนไซม์ 3-ไฮดรอกซี-3-เมทิลกลูทาริล โคเอ รีดัคเตส โดยไปช่วยจำกัดอัตราการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกายและเสริมการขับออกของคอเลสเตอรอลผ่านทางอุจจาระในขณะเดียวกันก็เป็นผลมาจากการทำงานร่วมของกรดน้ำดีในลำไส้

นอกจากนี้ Naidu *et al.*, 1999 รายงานถึงผลของโยเกิร์ตธรรมดาและโยเกิร์ตที่มีเชื้ออะซิฟีลัสต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คอเลสเตอรอลในเซรั่ม คอเลสเตอรอลที่ดี คอเลสเตอรอลที่ไม่ดี ไตรกลีเซอไรด์และจำนวนของเชื้อแลคโตบาซิลลัสในอุจจาระของหนู ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับโยเกิร์ตธรรมดาและโยเกิร์ตที่มี *L. acidophilus* จะมีน้ำหนักมากกว่าหนูที่ไม่ได้รับโยเกิร์ต ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นคอเลสเตอรอลในเซรั่มและคอเลสเตอรอลที่ไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่กินโยเกิร์ตที่มีเชื้อ *L. acidophilus* ทั้งนี้โยเกิร์ตธรรมดาและโยเกิร์ตที่มีเชื้ออะซิฟีลัสไม่ส่งผลต่อคอเลสเตอรอลที่ดีและไตรกลีเซอไรด์ ในขณะเดียวกันปริมาณของเชื้อแลคโตบาซิลลัสจะมีปริมาณสูงในอุจจาระของหนูที่กินโยเกิร์ตที่มีเชื้อ *L. acidophilus* (Naidu *et al.*, 1999)

2.9.8 การจัดการโรคกระดูกพรุน

โยเกิร์ตเป็นแหล่งที่ดีของแคลเซียมในนมสำหรับหนูที่มีอาหารขาดแคลเซียม (Naidu *et al.*, 1999) จากรายงานพบว่าโยเกิร์ตมีประโยชน์ต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ สิ่งที่น่าสนใจคือการขาดเอนไซม์แลคเตสจะพบได้อย่างแพร่หลายในคนที่เป็นโรคกระดูกพรุน

2.9.9 การป้องกันการติดเชื้อในลำไส้

ในช่วงต้นจะพบว่าโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อระบบนิเวศวิทยาของลำไส้ โดยจะช่วยป้องกันการติดเชื้อและการอักเสบของลำไส้ โพรไบโอติกบางสายพันธุ์ถูกคัดเลือกมาเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Bielecka *et al.*, 1998; Bielecka, 2002) การเพิ่มขึ้นของเชื้อบิฟีโดแบคทีเรียม ในปลายลำไส้ใหญ่ส่งผลต่อทั้งสุขภาพและการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Bielecka, 2002) กลไกการทำงานของโพรไบโอติกในลำไส้อาจจะยังไม่มีหลักฐานที่แน่นอน อย่างไรก็ตามคาดว่าโพรไบโอติกน่าจะมีกลไกการทำงานดังนี้ คือ มีการแข่งขันเพื่อแย่งสารอาหาร มีการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ มีการป้องกันการเกาะติด มีการทำให้สารพิษที่สร้างขึ้นลดลง ตัวรับมีการป้องกันสารพิษ มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีการกำจัดสารพิษออกไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.9.10 ผลต่อการป้องกันสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งและสารที่อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์

มีข้อมูลจากการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งในแบบจำลองของมนุษย์และสัตว์เกี่ยวกับคุณสมบัติของโพรไบโอติกในการป้องกันมะเร็ง (Burns & Rowland, 2000; Chadwick *et al.*, 2003) ยกตัวอย่างเช่น โพรไบโอติกสามารถช่วยลดการเกิดเนื้องอกในปลายลำไส้ใหญ่ของสัตว์ทดลอง (Goldin *et al.*, 1996; Reddy & Riverson, 1993) ซึ่งเป็นการยากมากที่จะทำการศึกษาผลต่อการป้องกันสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ (Goldin *et al.*, 1996; Reddy & Riverson, 1993) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานบ้างเกี่ยวกับผลของเชื้อจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส คาเซอิ สายพันธุ์ชิโรต้าต่อการเกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะ (Aso *et al.*, 1995) จากหลักฐานการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าการบริโภคโยเกิร์ตอาจจะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งลำไส้ได้แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานที่แท้จริง ส่วนกลไกของผลดังกล่าวก็ยังคงไม่เป็นที่รู้แน่ชัด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการบริโภคเชื้อแลคโตบาซิลลัสยังสามารถช่วยลดการเกิดสารที่อาจก่อให้เกิดกลายพันธุ์ได้ในอุจจาระและปัสสาวะของอาสาสมัคร

2.9.11 ผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

จากการทดลองนำแลคติกเอซิดแบคทีเรียมาใช้ศึกษาในหลอดทดลองเพื่อการชักนำให้ผลิตสารไซโตคีน (cytokines) ซึ่งเป็นสารที่ร่างกายตอบสนองต่อสารพิษหรือจุลินทรีย์ จะเป็นโมเลกุลที่ช่วยให้เกิดการทำงานร่วมกันของปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต่างๆ (Miettinen *et. al.*, 1996) โดยจะเกิดเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่สภาวะที่ละเอียดอ่อนในระบบทางเดินอาหาร (Miettinen *et. al.*, 1998) ผลชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้อาจจะเข้ามาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกันแต่ยังคงมีรายงานเพียงเล็กน้อยที่กล่าวว่าเกิดอะไรขึ้นในระบบทางเดินอาหาร โดยความจริงการเข้าไปแทรกของโพรไบโอติกอาจเพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารต่อต้านเชื้อโรต้าไวรัสที่มีความจำเพาะ (Kaila *et. al.*, 1992; Chadwick *et. al.*, 2003) ซึ่งโพรไบโอติกน่าจะสามารถช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้

มีการศึกษาที่ประสบความสำเร็จในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus rhamnosus* GG ในการรักษาเด็กที่เป็นโรคภูมิแพ้เรื้อรัง (Isolauri *et al.* 2000) และแพ้อาหาร (Majamaa & Isolauri, 1997; Kalliomki *et al.* 2001) โดยผลชี้ให้เห็นว่าโพรไบโอติกอาจเข้าไปพัฒนาและสร้างเครื่องป้องกันในระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในมนุษย์บางคนพบว่าโพรไบโอติกอาจเข้าไปเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันได้ในรูปแบบของการเพิ่มระดับการขับสารต่อต้านเชื้อโรคในร่างกาย (Schiffrin *et al.* 1996; Marteau *et al.* 1997)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.10 การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ

การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ Urinary tract infections (UTI) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่เกิดขึ้นกับคนนับล้านคนในแต่ละปี การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะพบบ่อยเป็นอันดับที่สอง รองจากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ พบบ่อยในผู้หญิงมากกว่าชาย 1 ใน 5 ของผู้หญิงจะเกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะอย่างน้อย 1 ครั้งในช่วงชีวิต แม้ว่าจะพบไม่บ่อยที่สุด แต่ก็สามารถเป็นอันตรายได้เมื่อเกิดโรคนี้ขึ้น การติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นการย้อนของเชื้อจากส่วนล่างขึ้นไป (ascending infection) คือเชื้อเข้าทางท่อปัสสาวะแล้วลุกลามต่อมาในกระเพาะปัสสาวะหรือไต โดยพบว่าเพศหญิงมีโอกาสติดเชื้อได้มากกว่าเพศชายโดยเฉพาะในช่วงวัยเจริญพันธุ์มีโอกาสเกิดการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะได้บ่อย เนื่องจาก urethra ของผู้หญิงสั้นกว่าผู้ชายจึงทำให้ส่วนปลายของ urethra ถูกปนเปื้อนได้ง่ายจากเชื้อในอุจจาระ หรือจากช่องคลอดระหว่างที่มีเพศสัมพันธุ์ ในกรณีของผู้ชายมีน้ำเมือกที่หลั่งจากต่อมลูกหมากยังมีฤทธิ์เป็น antibacterial ทำให้โอกาสติดเชื้อยากขึ้น การติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะ มีอาการแตกต่างกัน เช่น การติดเชื้อที่ bladder และ urethra มักมีอาการปัสสาวะบ่อย ปวดแสบ หรือปัสสาวะไม่ออก ส่วนการติดเชื้อที่ไตและหลอดไต เช่น กรวยไตอักเสบเฉียบพลัน มักมีอาการไข้ หนาวสั่นและเจ็บบริเวณไต ผู้ป่วยบางรายมีการติดเชื้อแบคทีเรียในปัสสาวะโดยไม่มีอาการ หรือผู้ป่วยบางรายมีอาการปัสสาวะบ่อยและปวดคล้ายกับการติดเชื้อบริเวณ bladder และ urethra แต่เมื่อนำปัสสาวะมาเพาะเชื้อปรากฏว่าไม่พบเชื้อ ดังนั้นการเพาะเชื้อจากปัสสาวะจึงเป็นตัวช่วยบอกได้แน่นอนว่ามีการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะหรือไม่

ตารางที่ 2.8 Causative agents of urinary tract infection

Pathogen	Uncomplicated: Cystitis	Complicated UTIs
Escherichia coli	70-95%	40-55%
Klebsiella spp.	2-6%	10-17%
Enterobacter spp.	0-2%	5-10%
Proteus mirabilis	2-4%	5-10%
Pseudomonas aeruginosa	0-1%	2-10%
Enterococcus spp.	2-5%	1-20%
Staphylococcus saprophyticus	5-20%	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.10.1 เชื้อก่อโรคในทางเดินปัสสาวะที่นำมาทดสอบ

1) *Proteus mirabilis*

Proteus spp. จัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็น facultative anaerobic แกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ มี frimbriae ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกาะติดกับเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อของ host และ *Proteus mirabilis* เป็น normal flora ที่อยู่ในทางเดินอาหารของคน พบได้ในขยะ ดิน และอาจพบในอุจจาระคนปกติบ้าง

ในการตรวจพิสูจน์จำแนกบนอาหารแข็งจะพบ *P.mirabilis* และ *P.vulgaris* แผ่เป็นวงซ้อนๆกัน *Proteus mirabilis* จะสามารถเจริญได้บน selective media, EMB agar และ MacConkey agar สามารถสร้างแก๊สในTSI ได้, สร้างแก๊ส hydrogen sulphide ได้ และสามารถสลายยูเรียได้ ซึ่งจะให้สีชมพูบน urea agar slant แต่จะไม่ ferment น้ำตาลแลกโตส, ไม่สร้าง indole จาก tryptophan

Proteus mirabilis มี virulence Factors คือ สามารถเกาะติดกับผิวของเนื้อเยื่อ host ได้ โดยอาศัย frimbriae สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้าง endotoxin และ urease enzyme ได้ ที่สำคัญ *Proteus* spp. ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะในชุมชนเป็นอันดับสองรองจาก *E.coli* โดยเฉพาะ *Proteus mirabilis* ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรคติดเชื้อจาก *Proteus* ประมาณ 90 % แต่เมื่อมีการติดเชื้อ *Proteus mirabilis* ในทางเดินปัสสาวะแล้วจะทำให้มีโอกาสติดเชื้อที่ไตได้มากกว่า *E.coli* เมื่อมีการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจะทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ซึ่งจะมีอาการเจ็บแสบหรือปวดเมื่อปัสสาวะและปัสสาวะบ่อย รู้สึกหนาวสั่น มีอาการเจ็บที่ท้องน้อย

การที่ *Proteus mirabilis* มี frimbriae ซึ่งช่วยในการเกาะติดกับเยื่อบุผิวของทางเดินปัสสาวะ และสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถสร้าง enzyme urease ได้ นั้นส่งผลทำให้เกิดโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะส่วนบนได้อีกด้วย enzyme urease ที่ *Proteus mirabilis* สร้างขึ้นนี้ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำปัสสาวะสูงขึ้น ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ของไตอาจส่งผลให้ไตและกรวยไตอักเสบและทำให้มีการสร้างก้อนนิ่วขึ้น ซึ่งก้อนนิ่วนี้จะทำให้เกิดการเรื้อรังของโรค เนื่องจาก *Proteus mirabilis* จะเข้าไปหลบอยู่ภายในก้อนนิ่วระหว่างการรักษาได้และก้อนนิ่วยังไปขัดขวางการไหลของน้ำปัสสาวะด้วยซึ่งเป็นการขัดขวางกระบวนการทำความสะอาดตามธรรมชาติของร่างกาย

2) *Citrobacter freundii*

Citrobacter เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ พบอาศัยในทางเดินอาหารของคน และในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางพันธุกรรมได้ 11 spp.สปีชีส์ที่พบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ก่อโรคในคนคือ *C.freundii,C.koseri* พบเป็นสาเหตุการติดเชื้อในโรงพยาบาล มีการดื้อยาในอัตราสูง และพบการสร้างเอนไซม์ cephalosporinase และเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่อยู่ในลำไส้ สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้อย่างช้า ๆ ทุกชนิดของเชื้อนี้สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในอาหาร คือ *C. freundii* โดยเฉพาะพบในผักและเนื้อ มีปริมาณเบสกัวนีนและไซโทซีนที่เป็นองค์ประกอบของ DNA อยู่ระหว่าง 50-52 เปอร์เซ็นต์โมล

Citrobacter freundii เป็น anaerobic facultatively แบคทีเรียรูปแท่งที่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ รวมทั้ง นกสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สามารถแยกได้จากดินและน้ำ รวมถึงจากตัวอย่างทางคลินิก เช่น ปัสสาวะ, เสมหะ, เลือด และ swabs แผลที่ติดเชื้อโรคฉวยโอกาส

3) *Klebsiella pneumonia*

สัณฐานวิทยาของ *Klebsiella pneumonia* มีลักษณะเป็น gram negative bacilli ที่ค่อนข้างกลม มีแคปซูลหนา เมื่อย้อมแกรมจะเห็นเป็นวงใสๆ รอบตัวเชื้อ เคลื่อนที่ไม่ได้เพราะไม่มี Peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ Mucoid colony เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพบาบาล มักก่อโรคในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินปัสสาวะ มักเกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน

Klebsiella pneumonia เป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบบเรื้อรังในทางเดินปัสสาวะมากที่สุดทำให้มีอาการเจ็บปวดขณะถ่ายปัสสาวะ (burning) เนื่องจากมีการบีบตัวของกระเพาะปัสสาวะ เกิดการระคายเคืองของผิวกระเพาะปัสสาวะ เนื่องจากเชื้อโรคที่เข้าสู่กระเพาะปัสสาวะจะไปเกาะบริเวณเยื่อเมือก (mucous) ของกระเพาะปัสสาวะ เกิดการอักเสบและระคายเคือง จะปัสสาวะบ่อยและบางครั้งกลั้นปัสสาวะไม่ได้ และอยากถ่ายปัสสาวะบ่อย (urgency) ปวดบริเวณหัวเหน่า ปัสสาวะขุ่น หรือสีโคล่าหรือสีแดง

การก่อโรคและอาการความรุนแรงของโรคที่เกิดจาก *Klebsiella pneumonia* ขึ้นกับชนิดของแอนติเจนที่เรียกว่า Type-specific antiphagocytic capsule (K antigen) โรคที่เกิดจากเชื้อนี้มักทำให้เกิดโรคปอดอักเสบ (Pneumonia) นอกจากนี้ยังมีระบบทางเดินปัสสาวะอักเสบกรวยไตอักเสบ

4) *Providencia rettgeri*

Providencia เป็นสกุล(genus) ของ แบคทีเรีย กลุ่มแกรมลบ (Gram negative bacteria) อยู่ในวงศ์ (family) *Enterobacteriaceae* มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) และเป็นพวก facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาจไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Providencia เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) หลายชนิด เช่น การเสื่อมเสียของไข่ ไข่ที่มีการปนเปื้อนโดย *Providencia* ทำให้เกิดการเน่าที่เรียกว่าblack rot มีการผลิตและสะสมของแก๊ส ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) มีกลิ่นเหม็นเน่าคล้ายอุจจาระ เนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีนในไข่โดยเกิดกับกรดอะมิโน (amino acid) ที่มีซัลเฟอร์ในโมเลกุล (Sulfur containing amino acid) เช่น cysteine แก๊สที่เกิดขึ้นอาจทำให้ไข่ระเบิดได้

5) *Enterobacter agglomerans*

Enterobacter เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียมีลักษณะสำคัญ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อน เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาจไม่เคลื่อนที่ หรือ เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella สร้างแคปซูล ทำให้เกิดเมือก (slime former) ในอาหาร

6) *Staphylococcus saprophyticus*

Staphylococcus เป็นจุลินทรีย์ใน Family Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะกลม (0.5 – 1.0 µm) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ (โดยมากไม่เกิน 4 cells) อยู่ปะปนด้วยกันเสมอเวลาย้อมแกรม

Staphylococcus saprophyticus เป็นเชื้อที่มักก่อให้เกิดการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ มักพบว่าเป็นสาเหตุการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะของผู้หญิงที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ *S. saprophyticus* สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะ novobiocin เป็น coagulase-negative แต่ novobiocin-sensitive

7) *Serratia marcescens*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritricous flagella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ให้แก๊สจากการหมักย่อยกลูโคส สามารถสร้างรงควัตถุสีแดงได้ (red pigment) การสร้างรงควัตถุเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 15-20 °C ในภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Enterobacter Serratia* มีอยู่ทั่วไปในดิน ในน้ำ และอาจทำให้เกิดโรคในคนได้ จัดเป็นเชื้อประเภทฉวยโอกาส ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ โลหิตเป็นพิษ เป็นต้น *S. marcescens* ทำให้ท่อปัสสาวะอักเสบ Urethritis จะมีอาการปัสสาวะบ่อย ปัสสาวะจะสุดแล้วจะปวด บางรายมีคราบหนองติดกางเกง กระเพาะปัสสาวะอักเสบจะมีอาการ ปวดหน่วงๆท้องน้อย ปัสสาวะออกครั้ง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ละน้อยๆ ปวดมากเมื่อปัสสาวะจะสุด บางรายมีเลือดออกนอกจากนี้ยังทำให้กรวยไตอักเสบ pyelonephritis จะมีอาการเหมือนกระเพาะปัสสาวะอักเสบ แต่จะมีไข้ ปวดเอว ปัสสาวะขุ่น

8) *Pseudomonas aeruginosa*

สัณฐานวิทยาและโครงสร้าง *P.aeruginosa* มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยโพลาร์แฟลกเจลลามีขนาด 0.5 – 1.0 - 1.5 – 5.0 µm ติดสีแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide , LPS) ที่มีโครงสร้างของแบคทีเรียในตระกูลเอนโทโรแบคทีริเอซี (Enterobacteriaceae) แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน ส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ไซด์เชน (polysaccharide side chain) ที่ยื่นออกมาจากเมมเบรนชั้นนอก (LPS) เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (susceptible) ต่อแบคทีริโอซินหรือไพโอซิน(bacteriocin หรือ pyocin) และแบคทีริโอเฟค *P. aeruginosa* ยังมีชั้นเมือก (smile layer) ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์และมีพิไลอยู่ที่ผิวเซลล์ด้วยให้ชอบเพียง 1 สปีชีส์เท่านั้น

การเจริญและเมแทบอลิซึม *P .aeruginosa* ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน สามารถเจริญและได้พลังงานโดยได้แหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนจากสารอาหาร ธรรมดา เช่น แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเจริญจึงไม่ต้องการอาหารซับซ้อน สามารถมีชีวิตและเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ 20 - 42 °C ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ รวมทั้งในสภาพที่มีเกลือสูงๆได้ เชื้อสามารถได้พลังงานจากการะบวนการออกซิเดทีฟ และสร้างไซโทโครมออกซิเดส (cytochrome oxidase) ได้มาก จึงให้ผลกับออกซิเดสเป็นบวก ถึงแม้จะเป็นพวกใช้ออกซิเจนในการเจริญ แต่ส่วนใหญ่ก็เพิ่มจำนวนได้ช้าๆ ในที่ไม่มีออกซิเจน ถ้ามีไนเตรตเป็นตัวรับไฮโดรเจน *P .aeruginosa* เป็นเชื้อประเภทฉวยโอกาสที่จะทำให้เกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ เกิดฝี หนองนอกจากนี้ยังเป็นเชื้อฉวยโอกาส ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งระบบทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ

โครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคปัจจัยที่ร่วมกันทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการในการเกิดโรค มีหลายชนิด ได้แก่

1. พิไลหรือฟิมเบเรีย (pili หรือ fimdriae) พิไลหรือโครงสร้างที่คล้ายสร้างเส้นขนเล็กๆ ยื่นออกจากผิงเซลล์เพื่อจับกับเยื่อบุผิวทางเดินหายใจ

2. แคปซูล หรือ เมือก เป็นสารพอลิแซ็กไรด์ที่ทำให้โคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม แคปซูลช่วยป้องกันเชื้อจากการะบวนการฟาโกไซโทซิส และยังช่วยให้เชื้อเกาะติดกันและติดกับผิวเซลล์ โดยเฉพาะคนไข้ที่เป็นโรคทางเดินหายใจเรื้อรัง

3. เอนโดทอกซิน (endotoxin) หรือลิพิดเอ (lipid A) เอนโดทอกซินเป็นลิโพพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ รวมทั้ง *P.aeruginosa* เป็น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แอนติเจนที่สำคัญ ส่วนลิพิดเอซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนโดทอกซินเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ แต่ความเป็นพิษของ รวมทั้ง *P.aeruginosa* จะน้อยกว่าของแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริซีเอ ประมาณ 10 เท่า

4. เอกโซทอกซิน เอ (Exoenzyme A) เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดอันหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงมาก ทอกซินนี้จะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยูคาริโอต ในทำนองเดียวกับดิฟทีเรียทอกซิน โดยทำให้เซลล์ตาย แต่โครงสร้างและสมบัติทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน และมีความเป็นพิษน้อยกว่าดิฟทีเรียทอกซิน

5. เอกโซเอนไซม์ เอส (Exoenzyme S) เป็นทอกซินที่ขับออกมานอกเซลล์ พบใน *P.aeruginosa* บางสายพันธุ์ สารนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่ที่แตกต่างจากเอกโซทอกซิน เอ คือทนความร้อนได้

6. อีลาสเทส (Elastase) เป็นเอนไซม์ที่ทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ที่ผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดเลือดออกและเชื้อแพร่กระจายออกไป

7. โปรตีเอส (Proteases) เป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ นอกจากช่วยให้เชื้อบุกรุกและแพร่กระจายออกไปแล้วเอนไซม์นี้ยังย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์และทำลายอิมมิวโนกลอบิวลินและคอมพลีเมนต์ด้วย

9) *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae (*streptococcus* Group B) เป็น Gram-positive coccus, catalase negative, facultatively anaerobic, spherical or ovoid (ทรงกลมหรือรูปไข่) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 μm ส่วนใหญ่เป็น β-hemolytic

การติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* พบได้ทั่วไป ผู้ที่ได้รับเชื้อบางรายไม่เกิดอาการผิดปกติแต่อย่างใด ตัวเชื้อเองพบได้ในลำไส้ ช่องคลอด กระเพาะปัสสาวะ และลำคอ 25 % ของหญิงตั้งครรภ์ จะพบ *S. agalactiae* ในช่องคลอดและทวารหนัก ผู้ที่ได้รับเชื้อแต่ไม่เกิดโรคจัดเป็นพาหะ โรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ไม่ใช่โรคติดต่อทางเพศสัมพันธุ์ ครั้งหนึ่งเชื่อว่าเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อในวัว ก่อให้เกิดอาการเต้านมอักเสบที่รุนแรง ปัจจุบันพบว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* เกิดขึ้นบ่อยที่สุดภายหลังการคลอด ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของภาวะติดเชื้อรุนแรงในทารกแรกเกิด ระยะหลัง ๆ เริ่มมีรายงานทางการแพทย์มากขึ้นเกี่ยวกับการติด *S. agalactiae* ในผู้ป่วยที่ไม่ใช่หญิงมีครรภ์ โดยเฉพาะในผู้ที่สูงอายุที่มีโรคประจำตัว เช่น diabetes mellitus, liver failure, malignancy, acquired immunodeficiency syndrome, or renal failure acquired

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

อาการในรายที่การติดเชื้อรุนแรง ในรายที่รุนแรง เรียกว่า invasive disease พบว่า *Streptococcus agalactiae* จะกระจายเข้าสู่กระแสเลือด อาจทำให้เกิดภาวะปอดติดเชื้อ กระดูกและข้อติดเชื้อ และในบางรายอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบประสาทได้ มีรายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อ *S. agalactiae* เกิดภาวะลิ้นหัวใจอักเสบ ผิวหนังติดเชื้อ และพบการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคมะเร็ง และผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะยาปฏิชีวนะสำหรับ *S. agalactiae* แพทย์จะพิจารณาใช้ยาในกลุ่มเพนนิซิลลินเป็นหลัก

10) *Serratia rubidaea*

Serratia เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มีรูปร่างเป็นท่อน และเป็นพวก facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ ไม่ทนร้อน อาจไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella

Serratia เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร (microbial spoilage) หลายชนิด เช่นการเสื่อมเสียของนม ทำให้นมเปลี่ยนเป็นสีแดง (red rod) การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์

2.11 การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารเป็นโรคที่พบบ่อยมาก โดยเฉพาะในประเทศในเขตร้อนและมีระบบการสาธารณสุขไม่ดีพอ สาเหตุของการติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อหรือสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นเข้าไป ซึ่งมักเรียกว่าเป็นการติดต่อแบบ Fecal-oral route สาเหตุหลัก ๆ ของการเกิดโรค ได้แก่ การรับประทานอาหารที่ดิบหรือปรุงไม่ดีพอ หรือรับประทานอาหารดิบ, วิธีการเก็บรักษาอาหารไม่เหมาะสม เช่นเก็บในอุณหภูมิที่สูงเกินไปเชื้อแบคทีเรียจึงเจริญเติบโตได้, ได้อาหารจากแหล่งที่ไม่ปลอดภัย เช่น เห็ดพิษ, ปลาซึ่งมีพิษ และ คนปรุงอาหารมีสุขนิสัยไม่ดี ไม่ล้างมือก่อนปรุงอาหาร หรือใช้เครื่องมือในการปรุงอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อโรค โรคที่เกิดจากอาหารและน้ำอาจแบ่งได้เป็น 2 พวก คือ อาหารเป็นพิษ (food poisoning) และ การติดเชื้อจากอาหาร (food infection)

2.11.1 เชื้อก่อโรคในระบบทางดินอาหารที่นำมาทดสอบ

1) *Vibrio cholera*

Vibrio cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) ในสกุล *Vibrio* ไม่สร้างสปอร์ จัดอยู่ในกลุ่ม facultavive anaerobe คือ เจริญได้ทั้งที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (pathogen) ซึ่งมีอาหารเป็นสาเหตุ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

V.cholerae เป็นเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตอิสระอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำโซเดียม ออออนกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อได้ จึงพบเชื้อตามเขตน้ำกร่อย บริเวณปากแม่น้ำที่ติดทะเล และพบได้ในน้ำจืด และอาหารทะเล จำพวก กุ้ง หอย ปู เป็นต้น และเป็นสาเหตุให้เกิดอหิวาห์ตกโรค (cholera) เกิดจากทานอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อ *V. cholera* มักพบมีการระบาดในประเทศอินเดียและบังคลาเทศ ภายหลังจากได้รับเชื้อเข้าไป 2-5 วัน เชื้อทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง อุจจาระเหมือนน้ำซาวข้าว ผู้ป่วยมักเสียชีวิตจากการเสียน้ำและเกลือแร่จากร่างกายมาก

2) *Salmonella* Typhi

Salmonella Typhi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ยกเว้น *S. pullorum* และ *S. gallinarum* เชื้อนี้ไม่มีแคปซูลและสปอร์เจริญได้ดีในที่มี หรือไม่มีออกซิเจน สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคสและแมนโนสได้กรดบางทีได้ก๊าซด้วย แต่ไม่สามารถเฟอร์แมนน้ำตาลแล็กโทสและซูโครสได้ ให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซ จากการเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรต สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เชื้อส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามิน หรือ กรดอะมิโน ต้องการทริปโตเฟน นอกจากนี้ ยังทนต่อสารเคมีบางอย่าง เช่น บริลเลียนกรีน โวเดียมเตตราไทโอเนต โซเดียมดีออกซีโคเลต ซึ่งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อพวกโคลิฟอร์ม จึงใช้เป็นหลักการแยกเชื้อจากอุจจาระ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของเชื้อ คือ 37°C ช่วง pH 4.1-9.0 ส่วนค่า Aw (ปริมาณน้ำอิสระในส่วนอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเติบโต) ต่ำที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตประมาณ 0.93-0.95 มีความสามารถในการทนความร้อนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ และผลจากสิ่งแวดล้อมในการเติบโต

S. Typhi ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (Salmonellosis) มักก่อโรคในเด็กทารก เด็กเล็กและวัยรุ่น เชื้อจะปนเปื้อนในน้ำและอาหาร เช่น สัตว์ปีก เนื้อหมู เนื้อวัวและผลิตภัณฑ์จากนม เชื้อจะถูกแพร่กระจายจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญทั้งในคนและปศุสัตว์รวมทั้งสัตว์ชนิดอื่น ทำให้เกิดอาการท้องเสียหลังกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ 12-48 ชั่วโมงมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย เป็นเวลา 3-4 วัน จนถึงสัปดาห์ คนป่วยประมาณครึ่งหนึ่งจะมีไข้ *S.* Typhi จะบุกรุกผ่านเยื่อบุผิวของลำไส้และถูกแมคโครเฟจจับกิน แล้วนำไปยังเซลล์ของระบบเรติคิวโดทีเรียลที่มีเชื้อ จะเพิ่มจำนวนมากในตับ, ม้าม จากตับผ่านถุงน้ำดีและเข้าสู่ลำไส้อีกครั้ง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดอาการทางกระเพาะและลำไส้ การติดเชื้อจะมีการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้อาจทำให้ทะลุและเข้าสู่กระแสเลือดได้ทำให้เกิดอาการไข้เนื่องจากพิษของ endotoxin และถึงแก่ความตายได้ถ้าไม่ได้รับการรักษา วิธีการติดต่อโดยการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อน มาจากอุจจาระหรือปัสสาวะของผู้ป่วยหรือผู้เป็นพาหะ อาจพบเชื้อในหอยที่จับได้ในแถบชายฝั่งที่มีท่อน้ำเสียระบายลงทะเล ผลไม้ ผักดิบ นมและผลิตภัณฑ์จากนมซึ่งอาจเป็น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตัวกลางแพร่เชื้อ ส่วนมากเชื้อจะติดมาจากมือของผู้ที่เป็นพาหะแมลงวันอาจเป็นตัวแพร่เชื้อมาสู่อาหาร ตัวเชื้อจะเจริญจนได้จำนวนมากพอที่จะก่อให้เกิดโรคในคนได้

3) *Salmonella* Paratyphi A

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ต้องการออกซิเจนแบบ Facultative anaerobic เป็นเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างแก๊สได้จากการเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาล Glucose สามารถ ferment dulcitol แต่ไม่สามารถใช้ น้ำตาล lactose ได้ สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถย่อยสลาย lysine, ornithine ได้ ไม่สร้าง Indole และเอนไซม์ urease อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 35-37 °C

S. Paratyphi A ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (Salmonellosis) เช่นเดียวกับ *S.* Typhi สารพิษเกิดจากเมื่อทานเชื้อเข้าไป เชื้อจะไปเกาะติดกับเยื่อเมือกในลำไส้เล็กและแพร่พันธุ์บนเยื่อบุลำไส้เล็ก (epitherial cell) พร้อมกับมีการสร้างสารพิษที่ทำให้ลำไส้บวม เนื่องจากมีการสะสมของของเหลวในลำไส้ ความสามารถในการบุกรุกและทำลายเซลล์ซึ่งเกิดจากการสร้าง therostable cytotoxic facter เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างพิษที่ไม่ทนความร้อน ซึ่งมีผลต่อการหลั่งของของเหลวและสารเกลือแร่ การสร้างสารพิษขึ้นอยู่กับอัตรการโตของเชื้อ อาการของโรคจะรุนแรงมาก น้อยขึ้นกับการได้รับเชื้อในปริมาณต่าง ๆ และสุขภาพของแต่ละบุคคล โดยมีอาการดังนี้ เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน ตัวเย็น มีไข้ สำหรับเด็กทารก และคนชราจะมีอาการรุนแรง ซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้

4) *Aeromonas hydrophila*

แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแกรมลบ รูปร่างท่อน มีขนาดประมาณ 0.3-1.0 x 1.0-3.5 µm เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาเส้นเดียวที่ปลายเซลล์และบางชนิดไม่เคลื่อนที่ สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 22-28 °C เชื้อจะดื้อต่อยา Vibriostatic compound เจริญได้ดีบน blood agar รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น selective และ Differential มักจะเติม สีย้อม เกลือน้ำดี และยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สีย้อมที่เติม เช่น Basic fuchsin , Crystal violet, Brilliant green และ Eosin เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนเกลือน้ำดีจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม และการเติม Ampicillin จะมีเฉพาะ *Aeromonas* ขึ้นเท่านั้นเพราะเชื้อนี้ดื้อต่อยา และเชื้อนี้ไม่สามารถมักย่อยน้ำตาล lactose ได้ การเกิดโรคจากเชื้อพวก *Aeromonas* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่ส่วนใหญ่พบในปลาน้ำจืด และเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแรกที่ทำให้เกิดโรคระบาดในปลา ในสัตว์เลือดเย็นชนิดอื่น ๆ เช่น จระเข้ งู เต่า ตะพาบน้ำ และสัตว์เลือดอุ่น เช่น วัว ควาย รวมทั้งมนุษย์ด้วย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วยแบคทีเรีย 8 ชนิด คือ *A.caviae, A. hydrophila, A. sobria, A. eucrenophila, A. schubertii* และ *A. veronii* ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ คือ *A. media, A. salmonicida* แบคทีเรียเหล่านี้ชอบอยู่ในตามธรรมชาติ บางชนิดเป็นแบคทีเรียก่อโรคในกบ ปลา หอยทากและโค ทำให้กบเป็นโรคติดเชื้อหรือโรคขาแดง

Aeromonas มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้แบบ β-hemolysis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar จากการศึกษาพบว่า *A. hydrophila* และ *A. veronii* ไบโอไทป์ sobria เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือดและการติดเชื้อที่บาดแผล อาการส่วนใหญ่ที่พบ คือ อาการไข้ และหนาวสั่น และพบอาการอื่นร่วมด้วยเช่น ทางเดินอาหารอักเสบ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียนและอุจจาระร่วง บางรายมีอาการไอ อาหารไม่ย่อย

5) *Yersinia enterocolitica*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37 °C ต้องการออกซเจนแบบ Facultative aerobic อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต 25-29 °C โตช้าในน้ำนมและเนื้อ โตได้ใน 5% NaCl และ pH 4.6 การพาสเจอร์ไรด์สามารถฆ่าเชื้อได้ ให้ผล catalase บวก oxidase ลบ

เชื้อนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคทางกระเพาะอาหารลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ เช่น โรคไส้ติ่งอักเสบเทียม (pseudoappendicitis) ปวดท้องด้านขวา อาจจะสับสนกับอาการปวดท้องเนื่องจากไส้ติ่งอักเสบได้อาการแทรกซ้อนอื่นที่สามารถพบได้แก่ผื่นที่ผิวหนัง ปวดข้อหลังติดเชื้อ และพบว่าบางครั้งเชื้อได้แพร่เข้าสู่กระแสเลือด มีไข้ ปวดท้อง และท้องเสีย บางครั้งอาจถ่ายเป็นเลือด อาการของโรค Yersiniosis พบบ่อยในเด็กเล็ก โดยมีอาการคือปวดบริเวณท้องน้อย ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ และอาจเกิดขึ้นภายหลังได้รับเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 24-30 ชั่วโมง โดยมีอาการป่วยประมาณ 2-3 วัน

6) Shigella flexneri

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ ชอบอุณหภูมิปานกลาง เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase ใช้น้ำตาลโดยการหมักให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส ไม่เจริญในอาหารวุ้นที่มีโปรแตสเซียมไซยาไนด์ และไม่ให้ก๊าซแอมโมเนีย ตามปกติเชื้อเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสม 6-8 °C และเชื้อถูกยับยั้งโดยไนไตรท์ในสภาวะที่เป็นกรด หรือบ่มเพาะในอุณหภูมิต่ำ หรือสภาวะ NaCl สูง

การก่อโรคและอาการ เชื้อก่อให้เกิดโรคบิด (bacillary dysentery) ในคนจัดว่าเป็นเชื้อก่อโรค อาการของโรคบิด คือ ท้องเสีย มีมูกและเลือดในอุจจาระจะมีอาการเฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้น ไม่ค่อยพบว่ามีการติดเชื้อในกระแสเลือด อาจเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ โดยเกิด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Hemolytic uremic sysdrome (HUS) และภาวะไตวาย สารพิษที่ก่อโรคคือ Shiga toxin ซึ่งเป็น exotoxin ส่วน endotoxin เป็นสารพวก Lipopolysccharide ทำให้เกิดการระคายเคืองในลำไส้

7) *Shigella boydii*

มีรูปร่างเป็นรูปแท่ง(ท่อนสั้น) สามารถย้อมติดสีแกรมลบได้ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งอาศัยออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ (facultative anaerobic bacteria) สร้างสารพิษชื่อ enterotoxin (shiga toxin) ไม่มีแคปซูล ไม่มีแฟลกเจลลา เคลื่อนที่ไม่ได้ ช่วงอุณหภูมิการเจริญคือ 10-40 °C เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C pH น้อยกว่า 4 จะตายอย่างรวดเร็ว สามารถเจริญได้โดยอาศัยหรือไม่อาศัยออกซิเจนก็ได้ (facultative anaerobic bacteria) ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี Aw ต่ำกว่า 0.96 ในอาหารที่ต่างกันจะมีชีวิตอยู่ได้ในเวลาที่ต่างกัน

เป็นเชื้อที่พบในอาหารที่ยังไม่ได้ปรุงเช่น ผักสด นมดิบ เป็นต้น หรือการติดเชื้อที่เกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนอยู่ เช่นน้ำสลัดนมเปรี้ยว, เนยแข็งขาว, พุดดิ้งช็อคโกแลต, แยม, มันฝรั่ง, ปลาทูน่า, กุ้ง, มะกะโรนี, ไก่, ผักสด, นมและผลิตภัณฑ์นมและสัตว์ปีก การปนเปื้อนของอาหารหรืออุจจาระโดยสัมผัสอาหารเป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของการปนเปื้อน เชื้อก่อให้เกิดโรคบิด (Dysentery, shigellosis) เพราะเชื้อค่อนข้างมีความทนทานต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร เชื้อเพิ่มจำนวนรวดเร็วในลำไส้ จะเริ่มมีอาการประมาณ 24-36 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหารเข้าไป เชื้อบุกรุกทำลายผนังลำไส้ทำให้มีอาการปวดท้อง มีไข้ ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ ต่อมาเมื่อเชื้อเข้าไปทำลายผนังลำไส้ใหญ่ จะไม่สามารถดูดซึมน้ำและอาหารได้ก็จะเกิดอาการท้องเสียมากขึ้น

8) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus อยู่ในตระกูล Micrococcaceae มีลักษณะทรงกลม (เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5-1.5 µm) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปตามผิวหนัง และเยื่อบุต่างๆ ตามร่างกายและสามารถพบได้ในธรรมชาติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคฝีและหนองได้บ่อยที่สุด ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ทุกระบบ โดยเชื้อสามารถแพร่กระจายไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบเฉียบพลัน เชื้อจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาได้ง่าย โดยเฉพาะการดื้อต่อยา penicillin และ methicillin ลักษณะของเชื้อ *S. aureus* เซลล์จะเป็นทรงกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive cocci in cluster) แต่เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้นานๆ หรือจากสิ่งส่งตรวจเก่า ๆ อาจจะย้อมไม่ติดสี *Staphylococci* ไม่มีแฟลกเจลลา ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้น คือ กลม ขอบเรียบทึบแสงมีสีเหลือง เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 10 - 40 °C แต่อุณหภูมิที่พอเหมาะคือ 37 °C เจริญในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และอาจมีชีวิตรอดได้ในหนอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

หรือเสมหะแห้งเป็นเวลานาน สามารถย่อยสลายโปรตีนและไขมัน มีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ pH เป็นกรดหรือด่าง ความชื้นต่ำๆ ได้ สามารถอยู่ในอากาศที่แห้งแล้งได้นานเป็นเดือนสามารถเจริญเติบโตในน้ำมูก บนผิวหนัง และอาหารหลาย ๆ ชนิด การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C ในเวลา 60 นาที สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้ เชื้อนี้ยังทนต่อยาฆ่าเชื้อ และดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

Staphylococcus food poisoning เกิดจากอาหารที่มีเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงไปเจริญเติบโตและสร้าง exotoxin ที่เรียกว่า enterotoxin *S. aureus* สามารถผลิตสารพิษได้ 6 ชนิด ได้แก่ type A, B, C, C2, D และ E แต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษต่างกัน อาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A สารพิษนี้ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารมีการเปลี่ยนแปลง จึงไม่ทราบว่ามีสารพิษเกิดขึ้นและจะเริ่มแสดงอาการในเวลา 1-6 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและท้องเดิน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารพิษแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร ในอาหารประเภทแป้งและโปรตีนมักจะส่งเสริมให้ Staphylococcus สร้างสารพิษได้มากกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วนช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญและการผลิตสารพิษจะอยู่ระหว่าง 4 - 46 °C

9) *Escherichia coli* (นงลักษณ์ และปรีชา, 2539)

คุณสมบัติ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนตรง ปลายมน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่มีขนาด 0.6 x 2-4 µm เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเสริม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 mm ขอบเรียบ ตรงกลางมีลักษณะนูน ผิวเรียบมัน มีสีเทาขาวและลักษณะทึบ ซึ่ง *E. coli* นี้มีหลาย serotype และหลาย biotype ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้าแห้งและในฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้นานหลายสัปดาห์ เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 °C) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60°C 15 นาที หรือ 55°C 60 นาที

การเกิดโรคจากเชื้อพวก *Esherichia coli* แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามกลไกการเกิดอาการท้องเสียและการผลิต toxin ได้แก่ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ทำให้เกิดท้องเสียในเด็กและคนเดินทาง, enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดอาการท้องเสียจาก enterotoxin, enteroadhesive *E. coli* (EAEC) ทำให้เกิดอาการคล้ายบิดและ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิดอาการท้องเสียและมีเลือดออกกับอุจจาระโดยกลุ่มที่พบบ่อยคือ ETEC ซึ่งมักเป็นสาเหตุของ travel's diarrhea และการระบาดของอาการท้องเสียที่มีน้ำหรืออาหารเป็นต้นเหตุ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

10. *Edwardsiella tarda*

เป็น Gram negative small rod เจริญบนอาหาร BHI, TSA ที่ 26-30°C 24-48 ชั่วโมง โคโลนีมีขนาดเล็กกลม นูนขึ้น สีใส ขนาดประมาณเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm. เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella, indole production in tryptone broth, H_2S production on TSI slants สามารถเจริญได้บน EIM เกิดโคโลนีสีเขียวขนาดเล็กและมีจุดสีดำตรงกลาง Catalase positive, cytochrome oxidase negative สร้างกรดและก๊าซระหว่าง glucose fermentation พบมากเมื่ออุณหภูมิของน้ำเกิน 30 °C

2.12 หลักในการคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก

แลกติกแอซิดแบคทีเรียปะปนอยู่ในหลายรูปแบบของสิ่งแวดล้อม เช่น อยู่ในอาหารหมักดอง, ลำไส้หรือมูลสัตว์, ดิน, ผลิตภัณฑ์นมจากสัตว์, น้ำ, คีเฟอร์, น้ำนมคน, อุจจาระเด็กทารก, ช่องคลอดคน, เมล็ดพืช, หรือผลไม้ตากแห้ง, เป็นต้น ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ความต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อน ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารช่วยในการเจริญ และวิตามินต่าง ๆ เช่น ไบโอติน (Biotin) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้มักจะเจริญได้ดีใน selective media ชนิด Man – Rogosa-Sharoe agar (MRS) ที่เติม 0.004% Bromocresol purple ซึ่งใช้เป็น indicator เพื่อตรวจหาการสร้างแลคติกแอซิด วิธีการที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียดังกล่าวออกจากตัวอย่างมักนิยมใช้การทำ serial dilution ตัวอย่างก่อน และแยกด้วย pour plate technique หรือ spread plate technique หลังจากนั้นจึงนำมาพิสูจน์คุณสมบัติเบื้องต้นทางชีวเคมีแล้วจึงนำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกต่อไป อย่างไรก็ตามแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในเชิงธุรกิจนั้น จะต้องเป็นเชื้อที่เหมาะสมภายในลำไส้หรือนมหมัก และผลิตภัณฑ์หลักของเจ้าบ้านยังดำรงอยู่ได้ ดังนั้นมีหลักการซึ่งโพรไบโอติกที่ทำให้ประสบความสำเร็จได้ ประการแรก ต้องไม่ทำให้เกิดโรคภายในระบบลำไส้และต้องรักษาสภาพและทนต่อความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร และความเข้มข้นของเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กได้ดี ประการที่สอง โพรไบโอติกที่ดีจะต้องเจริญและเผาผลาญพลังงานอย่างรวดเร็ว และดำรงชีวิตอยู่ได้ภายในลำไส้ ประการที่สาม เชื้อโพรไบโอติกที่สมบูรณ์สามารถอาศัยอยู่ภายในส่วนของช่องทางเดินอาหาร สามารถยึดเกาะที่บริเวณเยื่อบุผิวซึ่งหวังว่าจะเกิดขึ้นได้ดีในคน ประการที่สี่ ต้องผลิตกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพโดยเฉพาะ ซึ่งต้องมีคุณสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรียที่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทำให้เกิดอันตราย และประการสุดท้าย ต้องง่ายต่อการผลิต มีชีวิตเจริญต่อไปและสามารถดำรงอยู่ได้ภายใต้สารที่สะสมไว้ในเซลล์ และปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและมีผลในทางการค้า หลักการที่ใช้เลือกเป็นโพรไบโอติกมีดังนี้ (Nousiainen and Setälä, 1992)

2.12.1 ทนทานต่อกรดแกสทริคและน้ำดี

สภาพความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารและความเข้มข้นของน้ำดีที่สูง ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก เป็นคุณสมบัติหนึ่งของเจ้าบ้านซึ่งจะมีผลกระทบต่อการคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ความสามารถในการเจริญได้ในภาวะความเป็นกรด - ด่าง (pH unit) 2, 3, 4, 8 และ 9 ซึ่งเป็นระดับความเป็นกรด - ด่าง เช่นเดียวกับที่พบในกระเพาะอาหารของมนุษย์ซึ่งมีความเป็นกรดที่ระดับค่าพีเอชเท่ากับ 3 หรือต่ำกว่า และในลำไส้เล็กที่มีความเป็นด่างในระดับค่าพีเอชประมาณ 8 ถึง 9 และความสามารถในการเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 ทั้งนี้เพื่อให้สัมพันธ์กับสภาวะการหลั่งเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณร้อยละ 0.30 - 0.50 และเป็นแหล่งที่โพรไบติกแบคทีเรียอาศัยอยู่ แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกต้องสามารถที่จะอยู่รอดได้ สำหรับ 0-4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C ทั้งนี้ความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าวบ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญรอดชีวิตจากภาวะความเป็นกรดด่างในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Conway *et al*., 1987)

2.12.2 การสร้างสารต้านจุลชีพ

การสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียเป็นอีกหนึ่งในคุณสมบัติที่โพรไบโอติกต้องมี ดังนั้นต้องคัดแยกเชื้อซึ่งต้องมีความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์หลายๆ ชนิด จากน้ำตาลจำพวกกลูโคสหรือแลกโตสที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรคได้ดี

2.12.3 การยึดเกาะและการเจริญเติบโตในลำไส้

ความสามารถในการยึดเกาะในลำไส้เป็นสิ่งสำคัญยิ่งในการคัดเลือกเชื้อที่จะใช้เป็นโพรไบโอติก การเสริมโพรไบโอติกที่บริเวณผนังลำไส้อาจจะช่วยป้องกันแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอันตรายที่เยื่อบุผิวได้ การยึดเกาะของเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการลอยตัวที่เซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ และการตรวจสอบดูการยึดเกาะโดยพิจารณาดูจากกล้องจุลทรรศน์การมีชีวิตรอดอยู่ที่บริเวณเยื่อบุผิวลำไส้ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคติดอยู่ การยึดเกาะอยู่ได้นั้นเป็นสัญญาณพื้นฐานในการพัฒนาของเชื้อโพรไบโอติก เหตุผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการต่อต้านกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้เมื่อนำโพรไบโอติกมาใช้ (Conway *et al*., 1987)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.12.4 การทนต่อการให้ยาต้านจุลชีพ

การดื้อต่อยาบางกลุ่มเป็นลักษณะพื้นฐานที่โพรไบโอติกแบคทีเรียควรมี เนื่องจากปัจจุบันมีการบริโภคยาต่างๆ เข้าไปเกินความจำเป็น และยาเหล่านั้นอาจไปทำลายแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์กับมนุษย์เอง ดังนั้นโพรไบโอติกแบคทีเรียควรดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้แก่ยาปฏิชีวนะ vancomycin และ bacitracin ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้แก่ยาปฏิชีวนะgentamicin kanamycin และ streptomycin ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ ยาปฏิชีวนะnorfloxacin และดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ยาปฏิชีวนะ polymyxin B นอกจากนี้ ยังต้องมีความไวต่อการตอบสนองยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ กลุ่ม Cephalosporinsและ Penicillin เช่น ampicillin cephalothin cefoperazone และ ceftazidime และไวต่อการตอบสนองยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ tetracycline chloramphenicol และ erythromycin อย่างไรก็ตาม โพรไบโอติกเป็นสารธรรมชาติที่ใช้แทนยาปฏิชีวนะได้ และในบางกรณีอาจจะมีความเหมาะสมในการใช้โพรไบโอติกและยาปฏิชีวนะประกอบกันถึงจะได้รับประโยชน์ที่สุด จุลชีพตามธรรมชาติจะต่อต้านการแพร่กระจายของเชื้อที่ทำให้เกิดอันตรายและแบคทีเรียโพรไบโอติก ถ้าจุลชีพตามธรรมชาติถูกทำให้อ่อนแอลงโดยการให้ยาต้านจุลชีพแล้วแบคทีเรียโพรไบโอติกอาจจะถูกสร้างขึ้นในลำไส้ของสัตว์เป้าหมายได้ (Nousiainen and Setälä, 1992)

2.12.5 จะต้องมีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์หรืออาหาร

แหล่งที่มาของของโพรไบโอติกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง กล่าวกันว่าจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในมนุษย์ ควรเป็นผู้อาศัยหรือผู้ที่เคยอาศัยอยู่กับเจ้าบ้านแล้วไม่ทำให้เกิดโรคกับเจ้าบ้าน ดังนั้นแหล่งในการแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกจึงควรเป็นแหล่งที่ไม่เป็นอันตรายกับมนุษย์ เช่น แยกจากมนุษย์เอง หรืออาหารและพืชที่มนุษย์ใช้รับประทาน

2.12.6 มีการพิสูจน์แล้วว่าไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค

ความปลอดภัยของโพรไบโอติกไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต หรือส่วนของจุลินทรีย์ที่อาจเป็นได้ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ เมื่อจะนำไปใช้กับมนุษย์ จะต้องมีข้อควรคำนึงถึงในเรื่องความปลอดภัย หรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่นอกเหนือจากประโยชน์ของโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว ซึ่งจะต้องมีการศึกษาและทดสอบทางวิทยาศาสตร์ เพื่อให้ทราบข้อมูลทั้งในเรื่องคุณสมบัติประสิทธิผลต่อสุขภาพและความปลอดภัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.12.7 ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะโปรไบโอติกสายพันธุ์ Lactic Acid Bacteria (LAB) ให้ผลดีในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ

2.12.8 มีความสามารถในกระบวนการเผาผลาญอาหาร

ความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ คือ แป้ง และโปรตีน ซึ่งสามารถช่วยในการส่งเสริมระบบการย่อยสารอาหารเพื่อการดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ได้

2.12.9 ความสามารถในสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ

เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ยิ่งลึกลงไปยิ่งมีปริมาณอากาศที่เบาบางหรือไม่มีอากาศเลยดังนั้น สายพันธุ์แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ต้องมีคุณลักษณะที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีอากาศได้ ยิ่งสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันในทั้งสองสภาวะ ยิ่งเป็นผลดีต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

2.13 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count)

การนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น(agar media) มาใช้ตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1800 ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี วิธีการดังกล่าวมีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่างคือ

1. เซลล์จุลินทรีย์หนึ่งเซลล์เจริญและแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีเดี่ยว
2. เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous)
3. ไม่มีเซลล์ใดๆที่อยู่รวมกัน (no aggregate)

วิธีนี้ทำง่าย นับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ (sensitive) และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งจากตัวอย่างอาหาร น้ำ และดิน ในการนับเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญ คือ ต้องมีจำนวนไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์เท่านั้น ดังนั้นเพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว ควรทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นหลายๆครั้ง โดยทั่วไปทำเป็นลำดับ ๆ ละ 10 เท่า (serial dilution) แล้วทำการเพาะเชื้อ จุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้วนับจำนวน ทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่างได้ การรายงานผลมักรายงานเป็น colony forming unit (CFU) มากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน ชัดเจนว่า 1 โคโลนีมาจาก 1 เซลล์ การนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) ซึ่งมีหลายวิธี คือ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.13.1 Pour plate

เป็นวิธีที่นอกจากจะแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์แล้วยังสามารถตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ นำ มาแยกเชื้อได้ด้วย วิธีการนี้ต้องทำ Serial dilution ก่อน จึงจะสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ต่อหน่วยปริมาตรได้

หลักการทำ Pour plate คือการนำ เอาตัวอย่างที่ต้องการแยกหรือเพาะเลี้ยงมาผสมกับวุ้นหลอมเหลวในอาหารเลี้ยงเชื้อปล่อยให้วุ้นแข็งตัวก่อน แล้วนำ ไปบ่มอุณหภูมิที่กำหนด colony ของจุลินทรีย์จะเจริญบนหรือในอาหารวุ้น ข้อดี ของวิธีนี้คือ เหมาะสำ หรับตัวอย่างที่มีปริมาณมากหรือมีความหนืดตัวอย่างคืออาหาร นม เป็นต้น ข้อเสียคือ ใช้เวลามาก colony บางส่วนอยู่ในอาหารวุ้นทำ ให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลักษณะของcolony ได้และที่สำคัญจุลินทรีย์ในกลุ่ม *psychrophiles* และ *mesophiles* อาจถูกทำลายด้วยความร้อนจากอาหารวุ้นหลอมเหลวทำ ให้เกิดการผิดพลาดได้

เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ 10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มล.หรือ 0.1 มล.หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 – 46 °C ลงไป ผสมเชื้อจุลินทรีย์ให้เข้ากับอาหารโดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆ (รูปที่ 38) ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่ม ภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมล.หรือต่อกรัมตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้วุ้นที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้

การคำนวณ Colony forming units

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ย x dilution factor}}{\text{ปริมาณน้ำตัวอย่างที่นำมา pour plate}}$$

2.13.2 Spread plate

เป็นวิธีการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 ml. หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว(spreader) วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ในบางครั้งวิธี spread plate อาจนับปริมาณเซลล์ได้มากกว่าวิธี pour plate เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้เจอกับความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลวเหมือนวิธี pour plate ในกรณีที่ตัวอย่างมีเซลล์จุลินทรีย์อยู่น้อย การใช้วิธีนี้อาจขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างน้อย (0.1 ml.) ในการ plating

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.13.3 Drop plate

วิธีนี้มีหลักการเหมือนกันกับ spread plate โดยจะหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนจานอาหารหนึ่งจานต่อ 5 จุด โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 0.02 1 ml. ตัวอย่างจะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร ซึ่งโดยปกติจะมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1.5 ถึง 3 ซม. การนับและคำนวณจำนวนโคโลนีขึ้นอยู่กับจำนวนหยดต่อจานอาหาร จำนวนหยดต่อมล. และค่าการเจือจาง (dilution factor) โดยทั่วไปเมื่อบ่มจนเชื้อเจริญแล้ว ให้เลือกจานอาหารที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมคือ มีเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารแต่ละจุดไม่เกิน 10 โคโลนี เมื่อนับจำนวนโคโลนีทั้ง 5 จุดรวมกันในแต่ละระดับการเจือจาง ก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อมล.หรือต่อกรัมตัวอย่าง

2.13.4 Membrane filtration method

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่น้อยและจำเป็นต้องใช้ปริมาตรของตัวอย่างมากเพื่อความแม่นยำในการตรจหาจุลินทรีย์แบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analyses) ตัวอย่าง 100 ml.หรือมากกว่าจะถูกกรองผ่าน membrane filter ซึ่งมีรูขนาด 0.45 μm (แบคทีเรียไม่สามารถผ่านได้) ดังนั้นจุลินทรีย์จะถูกกักอยู่บนกระดาษกรอง จากนั้นนำกระดาษกรองวางในจานอาหารที่มีกระดาษซึ่งชุ่มด้วยอาหารเหลว (liquid nutrient medium) อยู่แล้ว โคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญบนกระดาษกรองวิธีนี้มักใช้กับการตรวจวิเคราะห์ coliform bacteria ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) การปนเปื้อนจากอุจจาระในอาหาร หรือน้ำ

การคำนวณ Colony forming units

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ย x dilution factor}}{\text{ปริมาณน้ำตัวอย่างที่นำมา pour plate}}$$

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1. การออกแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัย (ประเภท) : การวิจัยประยุกต์

ในสาขา (ระบุสาขาวิชาที่ทำการวิจัย) : จุลชีววิทยาคลินิก

โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิง ทดลองเพื่อการป้องกันโรคและรักษาสุขภาพ

3.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

Incubator	binder/Germany
Raminaflow	FASTER/Germany
Candle jar	United Science Co.,Ltd/Thailand
Anarobe jar	Heraeus/USA
เครื่อง Autoclave	Tomy, SS-325/Japan
เครื่อง Centrifuge	Sanyo,Harrier/UK, Hettich,Micro200R/Germany
เครื่อง Vortex mixer	Gemmy Industrial corporation, VM-300/Taiwan
เครื่อง pH meter	Metrohm, 713 pH meter/Switzerland
เครื่อง Spectrophotometer	Thermo spectronic, Genesys 20/USA
Water bath	Julabo, TW12/Germany
เครื่องชั่ง	Ohaus, ARC120/USA
Hot air oven	Heraeus/USA

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2.2 อุปกรณ์

Erlenmeyer flask ขนาด 100, 500, 1000 ml	:Pyrex/USA
กระบอกตวง (Cylinders)	:Pyrex/USA
บีกเกอร์ (Beakers)	:Pyrex/USA
Sterile cotton swab	:Nited Science Co.,Ltd/Thailand
Inoculating loop	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Forceps	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Needle	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Dropper	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Glass slide	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Tip	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Spreader	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Auto pipette	:SARTORIU/Germany
Test Tube Racks	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Eppendorf	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Sterile Syringe Filters Size: 18mm, 0.45um	:United Science Co.,Ltd/Thailand
ตะเกียงแอลกอฮอล์	:United Science Co.,Ltd/Thailand
ช้อนตักสาร	:DEX/Thailand
แผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อ	:Advantec/Japan
กระดาษชั่งสาร	:United Science Co.,Ltd/Thailand
แท่งแก้ว	:United Science Co.,Ltd/Thailand
ไม้จิ้มฟัน	:PATUM/Thailand
ถุงพลาสติก	:PATUM/Thailand
จานเพาะเชื้อ	:HI VAN/USA

3.2.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

Sodium chloride	: QReC New Zealand
Oxidase	: Fluka Analytical/USA
Catalase	: HERCK/Germany
3% H_2O_2	: QReC New Zealand

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

KCl	: HERCK/Germany
Phosphet beffer saline	: Mallinckrodt/USA and M&B/England
NaHCO3	: UNILAB/Australia
Agar	: Lepont de clix/France
Bile salt	: SIGMA/ USA
Bromocresol purple	: UNILAB/Australia
Crystal violet	: UNILAB/Australia
Di-ammonium hydrogen citrate	: Lepont de clix/France
Di-potassium hydrogen phosphate	: Lepont de clix/France
Di-sodium hydrogen phosphate	: Lepont de clix/France
Ethanol 70%, 95%	: UNILAB/Australia
GasPak	: HEMEDIA/India
Glucose	: Lepont de clix/France
Gram's iodine	: Bio-Medical Laboratory/Thailand
Glycerol	: Lepont de clix/France
Hydrogen chloride	: Lepont de clix/France
Magnesium sulfate heptahydrate	: AJAX Chemicals/France
Meat extract	: HEMEDIA/India
Nutrient agar	: Lepont de clix/France
Octan	: CARLO ERBA/France
Peptone	: MERCK/France
Potassium di-hydrogen phosphate	: Lepont de clix/France
Safranin O	: MERCK/France
Sodium hydroxide	: Lepont de clix/France
Tri-sodium acetate Toluene	: Lepont de clix/France
Toluene	: CARLO ERBA/France
Trypticase soy agar	: Lepont de clix/France
Trypticase soy broth	: Lepont de clix/France
Tryptone	: Lepont de clix/France
Tween 80	: CARLO ERBA/France

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Xylene	:	SIGMA/ USA
Yeast extract	:	Lepont de clix/France

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Man – Rogosa-Sharoc agar (MRS) + 0.004% Bromocresol purple
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Man – Rogosa-Sharoc agar (MRS)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Man – Rogosa-Sharoc agar (MRS)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Bacteriocin screening medium (BSM)
5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Blood agar
6. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว Trypticase soy broth + 0.6% Yeast extract + 1% Soft agar

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 23 ชนิด ประกอบด้วย ไส้ไก่, ไส้หมู, หอมดอง, ผักเสี้ยนดอง, ไข่ปลาส้ม, ดิน, ผักกาดดอง, ปลาส้ม, มะม่วงดอง, ไตปลา, หม่ำ, กุ้งจ่อม, เต้าหู้ยี้, ไส้กรอกเปรี้ยว, ไส้ปลามัน, เต้าเจี้ยว, ปูดอง, ปลาฟัก, ตีเฟอร์, หอยดอง, แหนมหมู, ใบเมี่ยง, และปลาร้า รวมทั้งสิ้น 147 ตัวอย่าง ในตลาดที่พื้นที่ที่ต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างลงใน sterilized plastic bag จากนั้นนำส่งห้องห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.3.2 การทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.2.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่าง

1) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม เติมลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) ปริมาณ 90 ml จะได้สารแขวนลอยเจือจาง 10^{-1} หลังจากนั้นทำการเจือจางแบบ Serial Dilution ให้มีความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} เท่า นำตัวอย่างในหลอดที่มีความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} เท่า ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง De Man, Rogaso and Sharpe agar (MRS) ที่เติม 0.004 % bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ โดยการทำ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้ในแต่ละอัตราการเจือจาง และคำนวณจำนวนโคโลนีที่ได้ต่อกรัมของตัวอย่างที่ใช้

2) คัดเลือกโคโลนีที่แยกได้จากข้อ (1) โดยเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี มา streak ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ใน candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนเกิดโคโลนีเดี่ยว ๆ นำตัวอย่างโคโลนี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยใช้สมบัติการติดสีแกรมและทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase

3.3.2.2 การจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตามลักษณะทางชีวเคมี

1) การตรวจสอบการติดสีแกรม (Garbutt, 1997)

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด และเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 loop สเมียร์(smear)ให้เชื้อกระจาย นำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์เพื่อชะสีส่วนเกินออกไป ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย saffanin O เป็นเวลา 1 วินาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์

2) การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Garbutt, 1997)

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ สเมียร์ลงบนสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3% ลงบนสไลด์ 1 หยด ถ้าพบโคโลนีเกิดฟองอากาศ แสดงว่า แบคทีเรียนั้นให้ผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

3) การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

หยดสารละลาย 1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride ลงบนกระดาษกรอง แล้วใช้แท่งแก้วเขี่ยเชื้อมาขีดลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ ถ้ากระดาษกรองบริเวณที่ขีดเชื้อลงไปเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินภายใน 10 วินาที แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าให้ผลลบ

3.3.2.3 การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยวิธี direct agar spot method (Fleming *et al*., 1985)

นำแลคติกแอซิดแบคทีเรีย spot ลงบนผิวหน้าอาหาร bacteriocin screening medium (BSM) ที่แบ่งเป็นช่องๆช่องละ 1 ตัวอย่าง บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นเตรียมเชื้อทดสอบ 20 ชนิด ได้แก่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ	เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร
1. *Citrobacter freundii*	1. *Aeromonas hydrophila*
2. *Enterobacter agglomerans*	2. *Edwardsiella tarda*
3. *Serratia rubidaea*	3. *Escherichia coli*
4. *Serratia marcescens*	4. *Salmonella* Typhi
5. *Staphylococcus saprophyticus*	5. *Salmonella paratyphi A*
6. *Streptococcus agalactiae*	6. *Shigella flexneri*
7. *Klebsiella pneumonia*	7. *Shigella boydii*
8. *Pseudomonas aeruginosa*	8. *Staphylococcus aureus*
9. *Proteus mirabilis*	9. *Vibrio cholera*
10. *Providencia rettgeri*	10. *Yersinia enterocolitica*

Streak เชื้อทดสอบลงใน Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณ 10^8 CFU/ml ด้วย 0.85 NaCl ปริมาตร 2 ml (ความยาวคลื่น 625 nm ค่า optical density (O.D.) อยู่ในช่วง 0.08-0.1)

ดูดเชื้อทดสอบปริมาตร 50 µl ใส่ลงใน trypticase soy broth + 0.6% yeast extract + 1% soft agar ปริมาณ 5 ml เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายทั่วถึง เทลงบนจานเพาะเชื้อ BSM agar ที่มีแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเจริญอยู่ ทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่พบวงใสรอบๆ โคโลนี ซึ่งเกิดจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ นำโคโลนีดังกล่าวมา streak ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ใน candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนเกิดโคโลนีเดี่ยว ๆ นำตัวอย่างโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกต่อไป

3.3.2.4 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

เพาะเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C, 37°C, และ45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจการเจริญของเชื้อโดยวิธี spread plate บน MRS agar ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.3.2.5 การศึกษาการทนต่อกรด

เพาะเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 1 โคโลนี ลงใน MRS broth ที่ปรับ pH เป็น 1, 2, และ 3 ปริมาตร 5 ml ด้วย HCl 1 N บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบการอยู่รอดของเชื้อที่เวลา 0, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.2.6 การศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดี

เพาะเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 1 โคโลนี ลงใน MRS broth ปริมาตร 5 ml ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.15%, 0.3%, และ 0.45% (w/v) ปริมาตร 5 ml บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่เวลา 0, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.2.7 การศึกษาการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 1 โคโลนี ลงใน MRS broth ปริมาตร 5 ml ที่ปรับ pH เท่ากับ 6 และมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 4%, 8% และ 10% (w/v) บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่เวลา 0, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.2.8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Charteris *et al.*, 1998)

นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด คือ Tetracyclin (TE) 30 µg, Erythromycin (E) 15 µg, Trimethoprim (SXT) 25 µg, Penicillin(P) 6 µg, Amoxicillin(AMC) 20/10 µg, Chloramphenicol(C) 30 µg, Gentamicin (GM) 10 µg โดย agar disc diffusion sensitivity test (Bauer *et al.*, 1966) มีวิธีการดังนี้

1) เพาะเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3 ทำการปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml ด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 2 ml (ความยาวคลื่น 625 nm ค่า O.D. อยู่ในช่วง 0.08-0.1) เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบ ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงใน 0.85%NaCl ที่มีเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว กดและบิดสำลีที่ด้านข้างภายในหลอดอาหารเพื่อให้สำลีไม่ชุ่มน้ำมากเกินไป แล้วป้ายเชื้อบน MRS agar ด้วยเทคนิค three way swab ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

2) ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อคีบ antibiotic paper disc นำไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS agar ที่เกลี่ยด้วยแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท นำไปบ่มใน Candle jar ที่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุมคือ disc ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบๆ antibiotic paper disc แปลผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะตาม CLSI ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.2.9 การศึกษา Cell surface hydrophobicity

นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3 มาล้าง 2 ครั้ง ด้วย PBS buffer (pH =7) ปริมาตร 5 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณ 10^8 CFU/ml ด้วย PBS buffer ปริมาตร 3.5 ml (ความยาวคลื่น 625 nm ค่า O.D. อยู่ในช่วง 0.08-0.1(A1))

ดูดสารละลาย Xylene, Toluene, และ Octan ปริมาตร 0.5 ml ใส่ลงในเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว (1 สารละลาย: 1 ตัวอย่าง) เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วนำน้ำส่วนล่างไปวัดค่าความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 625 nm อ่านค่า O.D.(A2) ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

คำนวณค่า Hydrophobicity index (HPBI) = [(A1-A2)/A1] x100

โดย HPBI มากกว่า 70% = highly hydrophobic

HPBI อยู่ในช่วง 50-70% = moderate

HPBI น้อยกว่า 50% = lower hydrophobic

3.3.2.10 การศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย

Streak แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.3 บน Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ใน Candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสังเกตลักษณะโคโลนีบนจานอาหารซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ดังนี้

1. β - hemolysis เป็นบริเวณใสรอบโคโลนี
2. α - hemolysis เป็นบริเวณสีเขียวรอบโคโลนี
3. γ - hemolysis ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี คือ ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

3.3.2.11 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบต่างๆโดยวิธี spot-on-lawn (Ennahar *et al.*, 1999)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.3โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 1 โคโลนี มาเพาะลงใน MRS broth ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณภูมิ 30°C เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm นาน 10 นาที กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

µm (Nitrocellulose Ø 0.45 µm, Millipore, USA) จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่ปราศจากเชื้อ เจือจางสารละลายที่ผ่านการกรองแบบ 2-fold dilution ด้วย MRS broth ทั้งหมด 8 dilution ดังต่อไปนี้ undiluted, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, และ 1:128

นำเชื้อทดสอบที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งในข้อ 3.5.3 ได้มา Streak ลงใน Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณ 10^8 CFU/ml ด้วย 0.85 NaCl ปริมาตร 2 ml (ความยาวคลื่น 625 nm ค่า optical density (O.D.) อยู่ในช่วง 0.08-0.1) จากนั้นดูดเชื้อทดสอบปริมาตร 0.1 ml มาใส่ใน 1% soft agar (TSA+0.6% YE หรือ MRS agar) ปริมาณ 5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วแบ่งจานเพาะเชื้อเป็นช่องๆ ใช้ sterile pasteur pipette เจาะผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูดส่วนใสแต่ละระดับความเจือจางจากหลอด stirile eppendorf 10 µl หยดลงบนผิวหน้าอาหารแต่ละช่อง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในแต่ละความเจือจางที่หยดลงไป (Ennahar *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็น arbitrary unit (AU/ml) โดยคำนวณได้จาก (1000/10) D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจืออจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al.*,1995) ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.2.12 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

คัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการเป็นโพรไบโอติกมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อโดยใช้ API test kits 50 CHL (BioMericux)

การหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CHL ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บน MRS agar บ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อให้มากที่สุดใส่ลงใน sterile 0.85% NaCl ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เชื้อกระจายตัว แล้วเตรียมน้ำเกลือปริมาตร 10 ml โดยทำการปรับความขุ่นให้เท่ากับ 2 McFarland ใช้การวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 625 nm อยู่ในช่วง 0.35-0.4 และจดจำนวนเชื้อที่ใส่ลงไปจนมีค่า O.D. อยู่ในช่วง จากนั้นใส่เชื้อตามปริมาตรที่นับได้ลงใน API 50 CHL medium ทำการ mix ให้เข้ากัน เตรียมชุดทดสอบลงบนถาด ถ่าย API 50 CHL medium ที่มีเชื้ออยู่ลงไปทุกหลุม ประมาณ 100 ul ระวังอย่าให้เกิดฟองและปลายทิปห้ามสัมผัสกับขอบช่อง เมื่อทำการใส่ medium ครบทุกช่องแล้ว ให้ปิดด้วย oil ที่ sterile ปริมาตร 110 ul จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในถาดล่างของกล่อง เรียงชุดทดสอบลงบนถาด นำไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะทำการอ่านผลโดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API LAP Plus

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง

จากผลการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น 23 ชนิด ประกอบด้วย ไส้ไก่, ไส้หมู, หอมดอง, ผักเสี้ยนดอง, ไข่ปลาส้ม, ดิน, ผักกาดดอง, ปลาส้ม, มะม่วงดอง, ไตปลา, หม่ำ, กุ้งจ่อม, เต้าหู้ยี้, ไส้กรอกเปรี้ยว, ไส้ปลามัน, เต้าเจี้ยว, ปูดอง, ปลาฟัก, ดีเฟอร์, หอยดอง, แหนมหมู, ใบเมี่ยง, และปลาร้า รวมทั้งสิ้น 147 ตัวอย่างในอาหาร MRS ซึ่งจะพบลักษณะของโคโลนีสีเหลืองเกิดขึ้น เมื่อทำการสุ่มเลือกโคโลนีที่ให้สีเหลือง ได้แลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 700 โคโลนี พบว่า ปลาส้ม, หม่ำ, ไส้กรอกเปรี้ยว, และแหนมหมู มีปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียมากที่สุด และใบเมี่ยงมีปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียน้อยที่สุด ดังแสดงตารางที่4. 1

ตารางที่ 4.1 จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (สถานที่)	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)
1. ไส้ไก่	10 (ตลาดรังสิต,ตลาดยิ่งเจริญ)	CI	56	1.8×10^7
2.ไส้หมู	10 (ตลาดยิ่งเจริญ)	PI	39	2.7×10^7
3.หอมดอง	10 (ตลาดดาวคะนอง,ตลาดราชพฤกษ์,ตลาดพลาซ่า,ตลาดเซียร์ รังสิต,ตลาดบางบอน)	O	41	2.0×10^7
4.ผักสี้ยนดอง	10 (ตลาดลาดพร้าว, ตลาดพลาซ่า,ตลาดเซียร์ รังสิต,ตลาดสุพรรณบุรี,ตลาดดินแดง)	T	31	1.3×10^7

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.1 จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (สถานที่)	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)
5.ดิน	10 (ป่าชายเลน เกาะช้าง, ป่าชายเลน บางปู,)	S	22	2.2×10^4
6.ไข่ปลาส้ม	10 (ตลาดอุดรธานี)	F	8	8×10^7
7. ผักกาดดอง	10 (ตลาดไท, รังสิต, สี่มุมเมือง,ห้างฉัตร,	FV	28	2.8×10^5
8. ปลาส้ม	5 (ตลาดหนองคาย, รังสิต, สี่มุมเมือง,	FS	> 300	$> 3 \times 10^7$
9. มะม่วงดอง	8 (ตลาดไท, รังสิต, สี่มุมเมือง,ห้างฉัตร,	MA	22	2.2×10^5
10. ไตปลา	4 (ตลาดรังสิต, สี่มุมเมือง, นนทบุรี)	FK	34	3.4×10^5
11. หม่ำ	3 (ตลาดหนองคาย, โคราช, ยโสธร)	MM	> 300	$> 3 \times 10^7$
12. กุ้งจ่อม	5 (ตลาดหนองคาย, โคราช, ยโสธร,	FSh	46	4.6×10^6
13. เต้าเจี้ยว	4 (ตลาดรอบเวียงลำปาง, ห้างฉัตร, บ้านสัน)	FB	24	2.4×10^4
14. ปูดอง	7 (ตลาดไท, รังสิต, สี่มุมเมือง,ห้างฉัตร, ยโสธร)	CR	55	5.5×10^6
15. ปลาฟัก	2 (ตลาดรอบเวียงลำปาง, ห้างฉัตร)	HF	16	1.6×10^6

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.1 จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (สถานที่)	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)
16. คีเฟอร์	2 (ตลาดแม่สาย, กทม.)	KE	25	2.5×10^5
17. เต้าหู้ยี้	3 (ตลาดรอบเวียงลำปาง, ห้างฉัตร, บ้านสัน)	FC	17	1.7×10^4
18. ไส้กรอกเปรี้ยว	10 (ตลาดไท, รังสิต, สี่มุมเมือง, เมืองเอก, ยโสธร, โคราช, หนองคาย)	SS	> 300	$> 3 \times 10^7$
19. ไส้ปลามัน	3 (ตลาดรอบเวียงลำปาง, ห้างฉัตร, บ้านสัน)	FI	43	4.3×10^5
20. หอยดอง	6 (ตลาดรังสิต, , ยโสธร, โคราช, หนองคาย)	PS	38	3.8×10^6
21. แหนมหมู	10 (ตลาดไท, รังสิต, สี่มุมเมือง, เมืองเอก, ยโสธร, โคราช, หนองคาย)	FP	> 300	$> 3 \times 10^7$
22. ใบเมี่ยง	4 (ตลาดห้างฉัตร, บ้านสัน)	MI	12	1.2×10^4
23. ปลาร้า	10 (ตลาดไท, รังสิต, สี่มุมเมือง, ห้างฉัตร,	FF	19	1.9×10^5

หมายเหตุ ตัวอย่างอาหารที่มีจำนวนโคโลนีที่ให้สีเหลืองมากกว่า 10 โคโลนี จะทำการสุ่มเลือกโคโลนี ตัวอย่างละ 10 ไอโซเลท

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยวิธี direct spot method

จากการนำแบคทีที่แยกได้จากข้อที่ 4.1 จำนวน 700 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินปัสสาวะ เช่น *C. freundii, E. agglomerans, S. rubidaea, S. marcescens S. saprophyticus, S. agalactiae, K. pneumoniae, P. aeruginosa, P. mirabilis, P. rettgeri* และ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร เช่น *A. hydrophila, E. tarda, E. coli, S. typhi S. paratyphi A, S. flexneri, S. boydii, S. aureus, V. cholerae, Y. enterocolitica* พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 48 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้คิดเป็น 6.86% โดยไอโซเลทที่ CI 5/4 มีขนาด inhibition zone ที่กว้างมากที่สุดเท่ากับ 14 mm. รองลงมาคือไอโซเลทที่ CI 5/6 มีขนาด inhibition zone ที่มีความกว้าง 13 mm. ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุดคือ CI 5/2 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากถึง 17 ชนิด และรองลงมาคือ CI 5/6 สามารถยับยั้งเชื้อได้ 16 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.2 นอกเหนือจากที่กล่าวมาทั้งหมดพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะและเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ 20 ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจด้วยวิธี direct spot agar

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาด inhibition zone หน่วยเป็น มม.)																		รวม
		เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ									เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร									
		C. freundii	*E. agglomerans*	*S. rubidaea*	*S. marcescens*	*S. saprophyticus*	*S. agalactiae*	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	*P. mirabilis*	*P. rettgeri*	*A. hydrophila*	*E. tarda*	*E. coli*	*S. typhi*	*S. paratyphi A*	*S. flexneri*	*S. boydii*	*S. aureus*	*V. cholerae*	*Y. enterocolitica*	
1	CI 5/2	12		6	10	9	4	10	4	10		8	8	9	4	5	4	11	5	10		17
2	CI 5/3	8	10		10	10	8		8			9	12		4		10	10		9		12
3	CI 5/4	9	6		14	10	6		4	10			8	4					5			10
4	CI 5/5	9	10	10	12	11			4	12	6		10	8			4	10	10		5	14
5	CI 5/6	8	7	7	12	8	8		10	10	13		8	4	7		8	12	6	9		16
6	CI 5/9	9	6	5		7	11		6	8	10			9	7			6	10	9	4	14
7	PI 6/1	4	4		4				4	4		4		4		4	4	4				10
8	PI 7/4	4	4			4	4	4		4				4	4		4	5	6	4		12
9	O 4/2			5											5		5					3
10	O 5/4		5					6								5						3
11	O 10/3		6					6									6					3

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาด inhibition zone หน่วยเป็น มม.)																			
		เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ									เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร										
		C. freundii	*E. agglomerans*	*S. rubidaea*	*S. marcescens*	*S. saprophyticus*	*S. agalactiae*	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	*P. mirabilis*	*P. rettgeri*	*A. hydrophila*	*E. tarda*	*E. coli*	*S. typhi*	*S. paratyphi A*	*S. flexneri*	*S. boydii*	*S. aureus*	*V. cholerae*	*Y. enterocolitica*	รวม
12	T 1/1																			8		1
13	T 2/2						8															1
14	T 4/1						7															1
15	T 4/3																			7		1
16	T 8/1						8															1
17	F 11/5	4	5										4		4	4						5
18	MI 3/3			5											4							2
19	MI 4/9																				7	1
20	CR1/2		8																			1
21	CR1/4		7																			1
22	CR5/1													7								1
23	CR6/3																8					1
24	CR6/8																6					1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาด inhibition zone หน่วยเป็น มม.)																			รวม
		เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ									เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร										
		C. freundii	*E. agglomerans*	*S. rubidaea*	*S. marcescens*	*S. saprophyticus*	*S. agalactiae*	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	*P. mirabilis*	*P. rettgeri*	*A. hydrophila*	*E. tarda*	*E. coli*	*S. typhi*	*S. paratyphi A*	*S. flexneri*	*S. boydii*	*S. aureus*	*V. cholerae*	*Y. enterocolitica*	
25	CR6/10																6					1
26	PA3/7																6					1
27	KF1/1															6						1
28	KF1/2																				7	1
29	KF1/3	6																				1
30	FI 1/5	4	5										4		4	4						5
31	FI 1/7				7																	1
32	FI 4/3																	8				1
33	FI 4/4																	6	5			2
34	FB 5/1																	6				1
35	FB 5/2																	8				1
36	FB 5/5																	8				1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาด inhibition zone หน่วยเป็น มม.)																				
		เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ									เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร										รวม
		C. freundii	*E. agglomerans*	*S. rubidaea*	*S. marcescens*	*S. saprophyticus*	*S. agalactiae*	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	*P. mirabilis*	*P. rettgeri*	*A. hydrophila*	*E. tarda*	*E. coli*	*S. typhi*	*S. paratyphi A*	*S. flexneri*	*S. boydii*	*S. aureus*	*V. cholerae*	*Y. enterocolitica*	
37	SS 1/1																	7				1
38	MM 2/2					9																1
39	MM 2/3																				8	1
40	MM 3/7		5													4						2
41	MM3/9						4.5													10		2
42	FSh2/2						4										5					2
43	FSh2/3	4					4		6							7.5				6		5
44	FSh3/1				4	4																2
45	FF 4/4								4		4											2
46	FF 4/6					4															4	2
47	FF 4/7				10		4															2
48	FF 4/9		4				4															2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการตรวจพบไอโซเลทผลิตสารยับยั้งจุลชีพแยกตามแหล่งตัวอย่าง

ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทที่ตรวจพบ		
	จำนวนทดสอบ	จำนวนไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ	ร้อยละ
1.ไส้ไก่	56	6	10.71
2.ไส้หมู	43	3	6.98
3.หอมดอง	41	3	7.32
4.ผักเสี้ยนดอง	31	5	16.13
5.ไข่ปลาส้ม	8	1	12.50
6.ดิน	22	0	0.00
7. ผักกาดดอง	28	0	0.00
8. ปลาส้ม	30	4	13.33
9. มะม่วงดอง	22	0	0.00
10. ไตปลา	34	0	0.00
11. หม่ำ	30	4	13.33
12. กุ้งจ่อม	46	3	6.52
13. เต้าเจี้ยว	24	3	12.50
14. ปูดอง	55	6	10.91
15. ปลาฟัก	16	1	6.25
16. คีเฟอร์	25	3	12.00
17. เต้าหู้ยี้	17	0	0.00
18. ไส้กรอกเปรี้ยว	30	1	3.33
19. ไส้ปลามัน	43	4	9.30
20. หอยดอง	38	0	0.00
21. แหนมหมู	30	0	0.00
22. ใบเมี่ยง	12	2	16.67
23. ปลาร้า	19	0	0.00
รวม	700	48	18.28

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จากการคำนวณเปรียบเทียบสัดส่วนความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแยกตามแหล่งของตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบจำนวน 23 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 700 ไอโซเลท มีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียง 48 ไอโซเลทที่มีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็น 18.28 % และตัวอย่างจากผักเสี้ยนดองมีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบไอโซเลทที่สร้างสารยับยั้งสูงสุดคือ 16.13 % รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างจากปลาส้มและหม่ำ 13.33 % ส่วนตัวอย่างจากดิน, ผักกาดดอง, มะม่วงดอง, ไตปลา, เต้าหู้ยี้,หอยดอง, และแหนมหมู, ตรวจไม่พบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการตรวจพบไอโซเลทที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพแยกตามชนิดเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบ		จำนวนไอโซเลทที่ตรวจพบ		
		จำนวนทดสอบ	จำนวนไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ	ร้อยละ
1.	*Citrobacte rfreundii*	48	3	9.68
2.	*Enterobacter agglomerans*	48	5	16.13
3.	*Serratia rubidaea*	48	1	3.23
4.	*Serratia marcescens*	48	3	9.68
5.	*Staphylococcus saprophyticus*	48	3	9.68
6.	*Streptococcus agalactiae*	48	5	16.13
7.	*Klebsiella pneumonia*	48	0	0
8.	*Pseudomonas aeruginosa*	48	2	6.45
9.	*Proteus mirabilis*	48	0	0
10.	*Proteus rettgeri*	48	1	3.23
11.	*Aeromonas hydrophila*	48	0	0
12.	*Edwardsiella tarda*	48	1	3.23
13.	*Escherichia coli*	48	1	3.23
14.	*Salmonella* Typhi	48	2	6.45
15.	*Salmonella* Paratyphi A	48	4	12.90
16.	*Shigella flexneri*	48	5	16.13

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เชื้อทดสอบ	จำนวนไอโซเลทที่ตรวจพบ		
	จำนวนทดสอบ	จำนวนไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ	ร้อยละ
17. *Shigella boydii*	48	6	19.35
18. *Staphylococcus aureus*	48	1	3.23
19. *Vibrio cholera*	48	2	6.45
20. *Yersinia enterocolitica*	48	4	12.90

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาสัดส่วนในการตรวจพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบโดยคำนวณเปรียบเทียบแยกตามชนิดของเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบคือ *Shigella boydii* มากที่สุดคือ 6 ไอโซเลท จากเชื้อที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลชีพทั้งหมด 48ไอโซเลท หรือคิดเป็น 19.35% รองลงมาคือแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้ง *Enterobacter agglomerans*, *Streptococcus agalactiae*, และ *Shigella flexneri* จำนวนทั้งสิ้น 5 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 16.13 % และแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้ง *Salmonella paratyphi A* และ *Yersinia enterocolitica* จำนวนทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 12.19 % แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้ง *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* และ*Staphylococcus saprophyticus* จำนวนทั้งสิ้น 3 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 9.68 % แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* และ *Vibrio cholera* จำนวนทั้งสิ้น 2 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 6.45 % แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้ง*Serratia rubidaea*, *Proteus rettgeri*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จำนวนทั้งสิ้น 1ไอโซเลท หรือคิดเป็น 3.23 %

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.3 จำนวนและลักษณะทางชีวเคมีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจแยกตามตัวอย่างอาหาร

จากผลการทดสอบ Direct agar spot method พบแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 48 ไอโซเลท จึงได้ทำการศึกษาแลคติกแอซิดแบคทีเรียตามลักษณะทางชีวเคมี ประกอบไปด้วย ลักษณะรูปร่าง, การจัดเรียงตัวของเซลล์, การติดสีแกรม, และ Catalase Test ซึ่งสามารถแบ่งแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียรูปร่างแท่งติดสีแกรมบวกจำนวน 25 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปร่างแท่งติดสีแกรมลบจำนวน 1 ไอโซเลท และแบคทีเรียรูปร่างกลมติดสีแกรมบวกจำนวน 22 ไอโซเลท

ตารางที่ 4.5 จำนวนและลักษณะทางชีวเคมีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจแยกตามตัวอย่างอาหาร

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ	แกรม	รูปร่าง
1. ไส้ไก่	6	CI 5/2	+	Bacilli
		CI 5/3	+	Bacilli
		CI 5/4	+	Bacilli
		CI 5/5	+	Bacilli
		CI 5/6	+	Bacilli
		CI 5/9	+	Bacilli
2. ไส้หมู	2	PI 6/1	+	Bacilli
		PI 7/4	+	Bacilli
3. หอมดอง	3	O 4/2	+	Bacilli
		O 5/4	+	Bacilli
		O 10/3	+	Bacilli
4.ผักเสี้ยนดอง	5	T 1/1	+	Cocci
		T 2/2	+	Cocci
		T 4/1	+	Cocci
		T 4/3	+	Bacilli
		T 8/1	+	Cocci
5.ไข่ปลาส้ม	I	F 11/5	+	Bacilli

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ	แกรม	รูปร่าง
6.เมี่ยง	2	MI 3/3	+	Bacilli
		MI 4/9	+	Bacilli
7.ปูดอง	6	CR 1/2	+	Bacilli
		CR 1/4	+	Cocci
		CR 5/1	+	Cocci
		CR 6/3	+	Cocci
		CR 6/8	+	Cocci
		CR 6/10	+	Cocci
8.ปลาฟัก	1	PA3/7	+	Bacilli
9.คีเฟอร์	3	KF1/1	-	Bacilli
		KF1/2	+	Cocci
		KF1/3	+	Cocci
10.ไส้ปลามัน	4	FI 1/5	+	Cocci
		FI 1/7	+	Bacilli
		FI 4/3	+	Bacilli
		FI 4/4	+	Bacilli
11.เต้าเจี้ยว	3	FB 5/1	+	Bacilli
		FB 5/2	+	Bacilli
		FB 5/5	+	Bacilli
12. ไส้กรอกเปรี้ยว	1	SS 1/1	+	Cocci
13.หม่ำ	4	MM 2/2	+	Cocci
		MM 2/3	+	Cocci
		MM 3/7	+	Bacilli
		MM 3/9	+	Bacilli

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสเชื้อ	แกรม	รูปร่าง
14.กุ้งจ่อม	3	FSh 2/2 FSh 2/3 FSh 3/1	+ + +	Cocci Cocci Cocci
6. ปลาส้ม	4	FF 4/4 FF 4/6 FF 4/7 FF 4/9	+ + + +	Cocci Cocci Cocci Cocci

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

4.4 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

การทดสอบการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 °C, 37 °C, และ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบจำนวนเชื้อทั้งหมด 48 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 48 ไอโซเลท มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25°C, 37 °C, และ45°C ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	Temperature(°C)		
		25	37	45
1	CI 5/2	+	+	+
2	CI 5/3	+	+	+
3	CI 5/4	+	+	-
4	CI 5/5	+	+	-
5	CI 5/6	+	+	+
6	CI 5/9	+	+	-
7	PI 6/1	+	+	-
8	PI 7/4	+	+	+
9	O 4/2	+	+	-
10	O 5/4	+	+	-
11	O 10/3	+	+	+
12	T 1/1	+	+	+
13	T 2/2	+	+	+
14	T 4/1	+	+	+
15	T 4/3	+	+	+
16	T 8/1	+	+	+
17	F 11/5	+	+	-
18	M13/3	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	Temperature(°C)		
		25	37	45
19	MI4/9	+	+	+
20	CR1/2	+	+	+
21	CR1/4	+	+	+
22	CR5/1	+	+	+
23	CR6/3	+	+	+
24	CR 6/8	+	+	+
23	CR6/3	+	+	+
24	CR 6/8	+	+	+
25	CR6/10	+	+	+
26	PA3/7	+	+	+
27	KF1/1	+	+	+
28	KF 1/2	+	+	+
29	KF1/3	+	+	+
30	FI 4/4	+	+	+
31	FI 1/5	+	+	+
32	FI 1/7	+	+	+
33	FI 4/3	+	+	+
34	FB 5/1	+	+	+
35	FB 5/2	+	+	+
36	FB 5/5	+	+	+
37	SS 1/2	+	+	+
38	MM 2/2	+	+	+
39	MM 2/3	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	Temperature(°C)		
		25	37	45
40	MM 3/7	+	+	+
41	MM 3/9	+	+	+
42	FSh 2/2	+	+	+
43	FSh 2/3	+	+	+
44	FSh 3/1	+	+	+
45	FF 4/4	+	+	+
46	FF 4/6	+	+	+
47	FF 4/7	+	+	+
48	FF 4/9	+	+	+

หมายเหตุ + = มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

\- = ไม่มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.5 การทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ในการทนต่อความเป็นกรด

การทดสอบความสามารถของแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 48 ไอโซเลท ในการทนต่อค่าความเป็นกรดระหว่าง pH 1, 2, และ 3 ที่เวลา 0, 3, 6, และ 24 ชั่วโมง พบว่า มีแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน15 ไอโซเลท ได้แก่ CR 1/3 , PI 7/4, FI 4/4, KF1/2 , KF 1/3, CR1/2, FI 4/3, FB 5/2, FB 5/5, MM 3/7, FSh 2/2, FSh 3/1, FF 4/6, FF 4/7, และ FF 4/9 ที่สามารถเจริญได้ที่ pH 2 ในช่วงเวลาที่ 0-24 ชั่วโมง และมีแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 41 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่ pH 3 ในช่วงเวลาที่ 0–24 ชั่วโมงได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อความเป็นกรด

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	pH 1				pH 2				pH 3			
		Time				Time				Time			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
1	CI 5/2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
2	CI 5/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3	CI 5/4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4	CI 5/5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
5	CI 5/6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6	CI 5/9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
7	PI 6/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	PI 7/4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	O 4/2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
10	O 5/4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
11	O 10/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
12	T 1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
13	T 2/2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14	T 4/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15	T 4/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
16	T 8/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อความเป็นกรด (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	pH 1				pH 2				pH 3			
		Time				Time				Time			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
17	F 11/5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
18	MI3/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	MI4/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	CR1/2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
21	CR1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	CR5/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	CR6/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
24	CR 6/8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
25	CR6/10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
26	PA3/7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
27	KF1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
28	KF 1/2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
29	KF1/3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
30	FI 4/4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
31	FI 1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
32	FI 1/7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
33	FI 4/3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
34	FB 5/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	FB 5/2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
36	FB 5/5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
37	SS 1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	MM 2/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	MM 2/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
40	MM 3/7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
41	MM 3/9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อความเป็นกรด (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	pH 1				pH 2				pH 3			
		Time				Time				Time			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
42	FSh 2/2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
43	FSh 2/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
44	FSh 3/1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
45	FF 4/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	FF 4/6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
47	FF 4/7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
48	FF 4/9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

\- = ไม่มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.6 การทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือน้ำดี

การทดสอบความสามารถของแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 48 ไอโซเลท ในการทนต่อเกลือน้ำดี ที่ความเข้มข้น 0.15%, 0.3% และ 0.45%(w/v) ที่เวลา 0, 3, 6, และ 24 ชั่วโมง พบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 48ไอโซเลท มีความสามารถในการทนและเจริญเติบโตได้ในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.15%, 0.3% และ 0.45% (w/v) ในช่วงเวลาที่ 0 – 24 ชั่วโมงได้ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือน้ำดี

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	0.15% Bile salt (w/v)				0.3% Bile salt (w/v)				0.45% Bile salt (w/v)			
		Time (hr)				Time (hr)				Time (hr)			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
1	CI 5/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	CI 5/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	CI 5/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	CI 5/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	CI 5/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	CI 5/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	PI 6/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	PI 7/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	O 4/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	O 5/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	O 10/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	T 1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	T 2/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	T 4/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	T 4/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	T 8/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	F 11/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	MI3/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือน้ำดี (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	0.15% Bile salt (w/v)				0.3% Bile salt (w/v)				0.45% Bile salt (w/v)			
		Time (hr)				Time (hr)				Time (hr)			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
19	MI4/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	CR1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	CR1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	CR5/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	CR6/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	CR 6/8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	CR6/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	PA3/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	KF1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	KF 1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	KF1/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	FI 4/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	FI 1/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	FI 1/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	FI 4/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	FB 5/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	FB 5/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	FB 5/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	SS 1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	MM 2/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	MM 2/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	MM 3/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	MM 3/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	FSh 2/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	FSh 2/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือน้ำดี (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	0.15% Bile salt (w/v)				0.3% Bile salt (w/v)				0.45% Bile salt (w/v)			
		Time (hr)				Time (hr)				Time (hr)			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
44	FSh 3/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	FF 4/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	FF 4/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	FF 4/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	FF 4/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

\- = ไม่มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

4.7 การทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์

การทดสอบความสามารถของแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 48 ไอโซเลท ในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%, 8% และ 10% (w/v) ที่เวลา 0, 3, 6, และ 24 ชั่วโมง พบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 48ไอโซเลท มีความสามารถในการทนและเจริญเติบโตได้ในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4%, 8% และ 10% (w/v) ในช่วงเวลาที่ 0, 3, 6, และ 24 ชั่วโมง ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	4% NaCl (w/v)				8% NaCl (w/v)				10% NaCl (w/v)			
		Time				Time				Time			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
1	CI 5/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	CI 5/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	CI 5/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	CI 5/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	CI 5/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	CI 5/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	PI 6/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	PI 7/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	O 4/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	O 5/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	O 10/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	T 1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	T 2/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	T 4/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	T 4/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	T 8/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	F 11/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	4% NaCl (w/v)				8% NaCl (w/v)				10% NaCl (w/v)			
		Time				Time				Time			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
18	MI 3/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	MI 4/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	CR1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	CR1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	CR5/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	CR6/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	CR 6/8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	CR6/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	PA3/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	KF1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	KF 1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	KF1/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	FI 4/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	FI 1/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	FI 1/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	FI 4/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	FB 5/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	FB 5/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	FB 5/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	SS 1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	MM 2/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	MM 2/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	MM 3/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	MM 3/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	FSh 2/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	4% NaCl (w/v)				8% NaCl (w/v)				10% NaCl (w/v)			
		Time				Time				Time			
		0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24
43	FSh 2/3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	FSh 3/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	FF 4/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	FF 4/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	FF 4/7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	FF 4/9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

\- = ไม่มีการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.8 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ความไวต่อยาปฏิชีวนะต่ำของแลกติกแอซิดแบคทีเรียนั้นเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่โพรไบโอติกควรมี เนื่องจากต้องทนต่อการถูกทำลายของยาปฏิชีวนะเมื่อมีการรับประทานเข้าไปเพื่อฆ่าเชื้อโรคใดๆ จากผลการทดสอบการทนต่อฤทธิ์ยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 48 ไอโซเลท พบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลท คือ PI7/4 ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่ำทั้ง 7 ชนิด และมีแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลท คือ CI 5/2, CI 5/3, CI 5/4, CI 5/5, CI 5/6, T 1/1, T 2/2, T 8/1, CR 1/4, CR 5/1, CR 6/3, CR 6/10, FI 1/5, FI 1/7, FI 4/3, FB 5/1, FB 5/2, FB 5/5, MM 3/7, FSh 3/1, และ FF 4/7 ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่ำถึง 6 ชนิด นอกจากนั้นยังพบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลท คือ PI 6/1, O 10/3, T 4/1, T 4/3, F 11/5, MI 3/3, MI 4/9, CR 1/2 , CR 6/8, PA 3/7, KF 1/2 , KF 1/3, SS 1/2, MM 2/3, FSh 2/2, FSh 2/3, FF 4/4, FF 4/6 ,และ FF 4/9 ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่ำถึง 5 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.10 ดังนั้นโดยภาพรวมของการทดสอบสรุปได้ว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบนั้น มีความไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ลำดับ	รหัสเชื้อ	Antibiotics						
		AK (30µl)	TE (30 µl)	P (10 µl)	AMC (30 µl)	E (15 µl)	CN (10 µl)	CIP (5 µl)
1	CI 5/2	S	R	R	R	R	R	R
2	CI 5/3	S	R	R	R	R	R	R
3	CI 5/4	S	R	R	R	R	R	R
4	CI 5/5	S	R	R	R	R	R	R
5	CI 5/6	S	R	R	R	R	R	R
6	CI 5/9	S	S	R	R	R	I	I
7	PI 6/1	I	S	R	R	R	R	R
8	PI 7/4	R	R	R	R	R	R	R
9	O 4/2	R	S	R	R	S	I	I
10	O 5/4	R	S	R	R	S	I	I
11	O 10/3	R	S	R	R	S	R	R

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อ	Antibiotics						
		AK (30µl)	TE (30 µl)	P (10 µl)	AMC (30 µl)	E (15 µl)	CN (10 µl)	CIP (5 µl)
12	T 1/1	R	R	R	R	S	R	R
13	T 2/2	R	R	R	R	S	R	R
14	T 4/1	R	I	R	R	S	R	R
15	T 4/3	R	I	R	R	1	R	R
16	T 8/1	R	R	R	R	I	R	R
17	F 11/5	R	S	R	R	S	R	R
18	MI 3/3	R	S	R	R	S	R	R
19	MI 4/9	R	S	R	R	S	R	R
20	CR 1/2	R	S	R	R	S	R	R
21	CR 1/4	R	R	R	R	R	R	S
22	CR 5/1	R	R	R	R	R	R	S
23	CR 6/3	R	R	R	R	R	R	S
24	CR 6/8	R	R	R	R	I	R	S
25	CR 6/10	R	R	R	R	R	R	S
26	PA 3/7	R	I	R	R	S	R	R
27	KF 1/1	S	R	R	R	R	S	S
28	KF 1/2	R	R	R	R	R	S	S
29	KF 1/3	R	S	R	R	S	R	R
30	FI 4/4	S	I	R	R	R	R	S
31	FI 1/5	R	R	R	R	R	R	S
32	FI 1/7	R	R	R	R	R	R	S
33	FI 4/3	R	R	R	R	R	R	S
34	FB 5/1	R	S	R	R	R	R	R
35	FB 5/2	R	R	R	R	R	R	S

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อ	Antibiotics						
		AK (30µl)	TE (30 µl)	P (10 µl)	AMC (30 µl)	E (15 µl)	CN (10 µl)	CIP (5 µl)
36	FB 5/5	R	R	R	R	R	R	R
37	SS 1/2	S	R	R	R	R	I	S
38	MM 2/2	I	R	R	R	R	I	S
39	MM 2/3	R	R	R	R	R	I	S
40	MM 3/7	R	R	R	R	R	R	S
41	MM 3/9	S	R	R	R	R	S	S
42	FSh 2/2	R	R	R	R	R	I	S
43	FSh 2/3	R	R	R	R	R	I	S
44	FSh 3/1	R	R	R	R	R	R	S
45	FF 4/4	R	I	R	R	S	R	R
46	FF 4/6	R	S	R	R	S	R	R
47	FF 4/7	R	R	R	R	R	R	S
48	FF 4/9	R	R	R	R	R	I	S

หมายเหตุ R = resistant, I = intermediate, S = susceptible

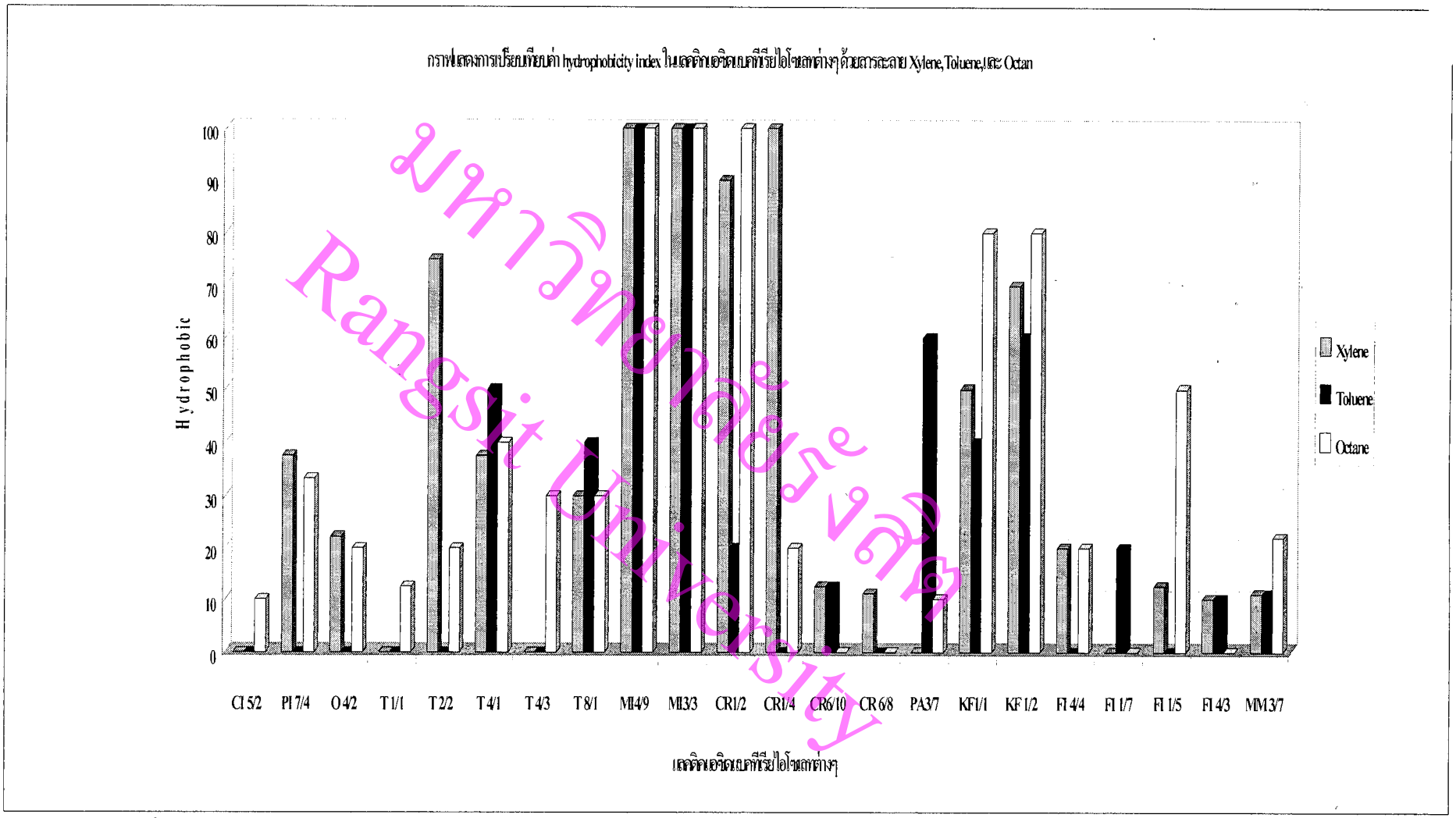
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.9 การทดสอบ Cell surface hydrophobicity

ค่า	Hydrophobicity index (HPBI)	=	[(A1 – A2)/A1] × 100
โดย	HPBI มากกว่า 70 %	=	highly hydrophobic
	HPBI อยู่ในช่วง 50 - 70 %	=	moderate hydrophobic
	HPBI น้อยกว่า 50%	=	lower hydrophobic

ผลการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยใช้การทดสอบ Cell surface hydrophobicity ด้วยการทดลองในระดับหลอดทดลองดังแสดงในรูปภาพที่ 4.1 สารอินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ คือ Xylene, Toluene และ Octan ในแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลท พบว่ามีแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท มี highly hydrophobic ต่อทั้ง Xylene, Toluene,และ Octan คือ MI4/9, MI3/3 และมี 3 ไอโซเลท ที่มี highly hydrophobic ต่อ Xylene คือ T2/2, CR 1/2, และ CR 1/4 นอกจากนี้ยังพบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่มี highly hydrophobic ต่อ Octan คือ CR 1/2, KF1/1, และ KF 1/2 อย่างไรก็ตาม แลกติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ มีความเป็น hydrophobic น้อย เนื่องจากมีค่า hydrophobicity index ที่น้อยกว่า 50 % จึงไม่สามารถแสดงผลการทดสอบในรูปกราฟได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปภาพที่ 4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า hydrophobicity index ของไอโซเลทต่างๆ ด้วยสารละลาย Xylene, Toluene และOctan

4.10 การทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแลคติดแอซิดแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลท พบว่า มีจำนวน 4 ไอไซเลท ได้แก่ CI5/2, CI5/4, CI5/5, และ MI 3/3 ที่เกิดย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ ซึ่งเป็นการเกิดในลักษณะที่เรียกว่า β-hemolysis โดยพบว่ารอบโคโลนีของเชื้อเกิดวงใส และมี 7 ไอไซเลท ได้แก่ O 4/2, O 5/4, O 10/3, T 1/1,T 2/2, T 4/1, และ F 11/5 ที่เกิดย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบไม่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นการเกิดในลักษณะที่เรียกว่า α-hemolysis นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว 37 ไอโซเลท ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในลักษณะ γ-hemolysis โดยสังเกตจากบริเวณรอบๆโคโลนีจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 4. 11)

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	Hemolysis
1	CI 5/2	β-hemolysis
2	CI 5/3	γ-hemolysis
3	CI 5/4	β-hemolysis
4	CI 5/5	β-hemolysis
5	CI 5/6	γ-hemolysis
6	CI 5/9	γ-hemolysis
7	PI 6/1	γ-hemolysis
8	PI 7/4	γ-hemolysis
9	O 4/2	α-hemolysis
10	O 5/4	α-hemolysis
11	O 10/3	α-hemolysis
12	T 1/1	α-hemolysis
13	T 2/2	γ-hemolysis
14	T 4/1	γ-hemolysis
15	T 4/3	α-hemolysis

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	Hemolysis
16	T 8/1	α-hemolysis
17	F 11/5	α-hemolysis
18	MI 3/3	β-hemolysis
19	MI 4/9	γ -hemolysis
20	CR 1/2	γ -hemolysis
21	CR 1/4	γ -hemolysis
22	CR 5/1	γ -hemolysis
24	CR 6/3	γ -hemolysis
25	CR 6/8	γ -hemolysis
26	CR 6/10	γ -hemolysis
27	PA 3/7	γ -hemolysis
28	KF 1/1	γ -hemolysis
29	KF 1/2	γ -hemolysis
30	KF 1/3	γ -hemolysis
31	FI 4/4	γ -hemolysis
32	FI 1/5	γ -hemolysis
33	FI 1/7	γ -hemolysis
34	FI 4/3	γ -hemolysis
35	FB 5/1	γ -hemolysis
36	FB 5/2	γ -hemolysis
37	FB 5/5	γ -hemolysis
38	SS 1/2	γ -hemolysis
39	MM 2/2	γ -hemolysis
40	MM 3/7	γ -hemolysis
41	MM 3/9	γ -hemolysis
42	FSh 2/2	γ -hemolysis

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	Hemolysis
43	FSh 2/3	γ -hemolysis
44	FSh 3/1	γ -hemolysis
45	FF 4/4	γ -hemolysis
46	FF 4/6	γ -hemolysis
47	FF 4/7	γ -hemolysis
48	FF 4/9	γ -hemolysis

หมายเหตุ (1) β-hemolysis รอบโคโลนีของเชื้อเกิดวงใส

(2) α-hemolysis รอบโคโลนีมีสีเขียวคล้ำหรือสีน้ำตาล แสดงว่ามีการย่อยเม็ดเลือดแดงแต่ไม่สมบูรณ์

(3) γ-hemolysis ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณรอบโคโลนี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.11 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn

จากการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 29 ไอโซเลท ซึ่งยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีและยับยั้งได้มากกว่า 1 ชนิด รวมถึงคุณสมบัติทางชีวเคมี และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกอย่างครบถ้วนได้แก่ CI 5/3, CI 5/6, CI 5/9, PI 6/1, PI 7/4, O 10/3, MI4/9, CR1/2, CR6/3, CR6/10, CR6/8, PA3/7, KE1/1, KE1/2, KE1/3, FI4/4, FI1/7, FI1/5, FI4/3, FB5/1, FB5/2, FB5/3, SS1/2, MM2/2, MM2/3, MM3/9, FSh2/3, FF4/7 และ FF4/9 มาทดสอบยืนยันความสามารถที่ยับยั้งเชื้อทดสอบที่ให้ผลดีที่สุด โดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2-fold dilution (undiluted, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) พบว่ามีเพียงส่วนใสจาก KE1/3, MM3/9 และ FF4/9 ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ดังแสดงในตารางที่ 17 โดยไอโซเลท KE1/3 สามารถยับยั้ง *Citrobacter Frundii* ได้ 6 มม. ที่ dilution 1:64, ไอโซเลท MM3/9 สามารถยับยั้ง *Vibrio Cholarae* ได้ 5 มม. ที่ dilution 1:8 และไอโซเลท FF4/9 สามารถยับยั้ง *Streptococcus agalatiae* ได้ 4 มม. ที่ dilution 1:16

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีผลต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	Dilution	เส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (มม.)	ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (AU/ml)
1	KE 1/3	*Citrobacter Frundii*	1:64	6	6,400
2	MM 3/9	*Vibrio Cholarae*	1:8	5	800
3	FF 4/9	*Streptococcus agalatiae*	1:16	4	1,600

4.13 อนุกรมวิธานของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกต่างๆ ข้างต้นอย่างครบถ้วนพบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ จำนวน 10 ไอโซเลท คือ MI 4/9,KE 1/3, FI 4/4, FB 5/3, MM 2/2, MM 3/9, FSh 2/3 และ FF 4/9 และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์ โดยอาศัยการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CH แล้วพบว่า 4 ไอโซเลท คือ FI 4/4, FB 5/3, MM 3/9 และ FSh 2/3 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus plantarum*, MI 4/9 อยู่ในสปีชีส์ *Lactococcus lactis Lactis1* และ 2 ไอโซเลท คือ MM 2/2 และ FF 4/9 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus pentosus* นอกจากนี้ 3 ไอโซเลท คือ CI 5/3, CI 5/6 และKE 1/3 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus bevis*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีสำคัญมากในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถผลิตกรดและสารที่ให้กลิ่นรสที่ดี ทำให้ปัจจุบันนิยมนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อรักษาคุณภาพของอาหาร เนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอมไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการหมักได้ เช่น กรดแลคติก ซึ่งในโรงงานอุตสาหกรรมนำมาใช้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีรส กลิ่น และมีเนื้อสัมผัสได้ตามต้องการ อีกทั้งยังเพื่อการรักษาคุณภาพของอาหารและเพิ่มประโยชน์ด้านอื่นด้วย เช่น ให้มีการขับถ่ายดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียยังมีคุณสมบัติเป็นโพรโอติกสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆได้ เป็นต้น การจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต้องอาศัยลักษณะพื้นฐานวิทยาหลาย ๆ อย่าง เช่น ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ความสามารถในการทนกรด ทนต่อ NaCl และ Bile salt เป็นต้น ซึ่งการจะได้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาได้ ต้องอาศัยการแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย เมื่อทำการตรวจสกุล (genus) และสายพันธุ์แล้วพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ถูกต้องปลอดภัย ไม่สร้างสารพิษ ไม่ทำลายแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหาร มีการยึดติดของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร ต้องมีความสัมพันธ์เกื้อกูลหรือสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์เจ้าบ้าน และสามารถทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารได้ (Salminen & Wright, 1993)

จากการทดลองนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดจากตัวอย่างทั้งสิ้น 23 ชนิด ประกอบด้วย ไส้ไก่, ไส้หมู, หอมดอง, ผักเสี้ยนดอง, ไข่ปลาส้ม, ดิน, ผักกาดดอง, ปลาส้ม, มะม่วงดอง, ไตปลา, หม่ำ, กุ้งจ่อม, เต้าหู้ยี้, ไส้กรอกเปรี้ยว, ไส้ปลามัน, เต้าเจี้ยว, ปูดอง, ปลาฟัก, คีเฟอร์, หอยดอง, แหนมหมู, ใบเมี่ยง, และปลาร้า รวมทั้งสิ้น 147 ตัวอย่างได้แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 700 โคโลนี นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาส้ม, หม่ำ, ไส้กรอกเปรี้ยว, และแหนมหมู เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียมากที่สุด และใบเมี่ยงมีปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียน้อยที่สุด

การทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในครั้งนี้ใช้เชื้อทดสอบจำนวน 20 เชื้อ โดยแบ่งเป็น เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินปัสสาวะ 10 เชื้อ ได้แก่ *C. freundii, E. agglomerans, S. rubidaea, S. marcescens, S. saprophyticus, S. agalactiae, K. pneumoniae, P. aeruginosa, P. mirabilis, P. rettgeri* และเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินอาหาร 10 เชื้อ ได้แก่ *A. hydrophila, E. tarda, E. coli, S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, *S. flexneri, S. boydii, S.*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

aureus, V. cholerae, Y. enterocolitica นำมาทดสอบร่วมกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ 700 ไอโซเลท เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี direct spot method พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิดคิดเป็น 6.86% ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุดคือ CI 5/2 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากถึง 17 ชนิด และรองลงมาคือ CI 5/6 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 16 ชนิด อย่างไรก็ตาม เมื่อคำนวณเปรียบเทียบจากไอโซเลตที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบแยกตามชนิดอาหาร พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียง 48 ไอโซเลทที่มีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็น 18.28 % และตัวอย่างจากผักเสี้ยนดองตรวจพบไอโซเลทที่สร้างสารยับยั้งสูงสุดคือ 16.13 % รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างจากปลาส้มและหมำ 13.33 % ส่วนตัวอย่างจากดิน, ผักกาดดอง, มะม่วงดอง, ไตปลา, เต้าหู้ยี้,หอยดอง, และแหนมหมู ตรวจไม่พบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vaughan *et al.*(1999) ที่ได้แยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก และพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์มากกว่าพืช โดยผลิตภัณฑ์จากสัตว์สามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ,*Listeria innocua* และ *Pseudomonas frogi* ผลิตภัณฑ์จากพืช สามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ได้ (Vaughan *et al,* 1999)

เมื่อคำนวณเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคที่เรียที่ก่อโรคทั้งในทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหารของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แยกตามชนิดของเชื้อทดสอบ พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบคือ *Shigella boydii* มากที่สุดถึง 6 ไอโซเลท จากเชื้อที่สามารถยับยั้งจุลชีพทั้งหมด 48 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 19.35% รองลงมาคือแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Enterobacter agglomerans*, *Streptococcus agalactiae*, และ *Shigella flexneri* จำนวนทั้งสิ้น 5 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 16.13 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ ที่ได้คัดแยก Lactobacillus จากนมเปรี้ยว 5 ยี่ห้อได้ 5 สายพันธุ์ คือ *L. casei*2 สายพันธุ์ *L. acidophilus*2 สายพันธุ์ *L. delbrueckii* subsp. Bulgaricus1 สายพันธุ์ ทดสอบการยับยั้งพบว่า *Lactobacillus* ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E.coli* มีการยับยั้งระหว่าง 40.5-62.1 และ 47.9-53.0% ตามลำดับซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหาร เป็นจุลินทรีย์กลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (วิลาวัณย์ และคณะ, 2539)

วิลาวัณย์ (2524) ได้ศึกษาสารที่แบคทีเรียแลคติกแอซิดสร้างขึ้น คือ การยับยั้งการเจริญเกิดจากกรดแลคติกโดยตรง แลคติกจะไปทำให้ระดับความเป็นกรดด่างลดลงไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด และปล่อยสารพิษที่มีฤทธิ์ยับยั้ง รวมทั้งการลดละดับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ความเป็นกรดด่างในไซโตพลาสซึม การยับยั้งการเจริญเกิดผลร่วมระหว่างกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแลคติกแอซิดแบคทีเรียสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญนอกเหนือจากกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คือแบคเทอริโอซิน เป็นโปรตีนเชิงซ้อนซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น บางชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและแบคทีเรียแกรมลบได้ (วิลาวัณย์, 2524)

หลังจากที่ได้ทดสอบคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่าง ๆ แล้ว พบว่ามี แลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 48 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี ได้นำไอโซเลทดังกล่าวไปทำการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น คือนำไปทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test) และการย้อมสีแกรม พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ผลการย้อมสีแกรมสามารถแบ่งแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรียรูปร่างแท่งติดสีแกรมบวกจำนวน 25 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปร่างแท่งติดสีแกรมลบจำนวน 1 ไอโซเลท และแบคทีเรียรูปร่างกลมติดสีแกรมบวกจำนวน 22 ไอโซเลท

ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของโพรไบโอติกของแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าว โดยคุณสมบัติเบื้องต้นที่ใช้ในการคัดเลือก คือ คุณสมบัติในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่างๆ, การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ pH 1-3, การทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.15%, 0.3% และ 0.45%, การทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4%, 8% และ 10%, การทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะ, ความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยใช้การทดสอบ Cell surface hydrophobicity ด้วยการทดลองในระดับหลอดทดลอง, การทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง รวมถึงการทดสอบยืนยันความสามารถที่ยับยั้งเชื้อทดสอบที่ให้ผลดีที่สุด โดยวิธี spot-on-lawn ซึ่งขั้นตอนการทดลองนั้นได้เรียงตามลำดับก่อนหลังให้คล้ายคลึงกับสถานการณ์ที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายมนุษย์

หนึ่งในคุณสมบัติเบื้องต้นของโพรไบโอติก คือ คุณสมบัติในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่างๆ จากการทดสอบการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25°C, 37°C และ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อที่นำมาทดสอบคือ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งในระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินปัสสาวะได้ดี จำนวนทั้งหมด 48 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 48 ไอโซเลท มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 °C. 37 °C และ 45°C ได้ แสดงว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติดังกล่าวทั้งหมด อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อดูลักษณะทางกายภาพของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การทดสอบข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของนิดา อาบสุวรรณและคณะที่ได้ทำการคัดเลือก แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากอาหารหมักดองโดย เมื่อนำจุลินทรีย์ที่ผลิตกรด 809 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน 21 ตัวอย่าง มาทำการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียพบว่า มีแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 526 ไอโซเลท และมีเพียง 124 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (45°C) เมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง มาทำการเทียบเคียงชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยวิธีการทางชีวเคมี พบว่าเป็นพวก *Pediococcus* sp. (นิดา และคณะ,2554)

คุณสมบัติเบื้องต้นของโพรไบโอติกอีกข้อหนึ่ง คือ คุณสมบัติในการทนต่อความเป็นกรด เนื่องจากแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนั้นต้องผ่านและอาศัยในกระเพาะอาหารซึ่งกรดไฮโดรคลอริกในกระเพาะอาหารนั้นมีค่าความเป็นกรดอยู่ที่ 0.9 เมื่อตอนกระเพาะไม่มีอาหารอยู่ และเมื่อได้รับอาหารเข้าไปในกระเพาะค่าความเป็นกรดจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 3.0 ซึ่งอาหารที่รับประทานเข้าไปจะอยู่ในกระเพาะ 2-4 ชั่วโมงก่อนที่กระเพาะจะว่างอีกครั้งหากแบคทีเรียที่เลือกมาไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดในช่วงนี้ได้ก็จะตายในที่สุด (Erkkila & Petaja, 2000)

ผลการทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อค่าความเป็นกรดระหว่าง pH 1- 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบจำนวนเชื้อทั้งหมด 48 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่า มีจำนวน 15 ไอโซเลท ที่สามารทนต่อ pH 2 ในช่วงเวลาที่ 0 – 24 ชั่วโมง และมีจำนวน 41 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่อ pH 3 ในช่วงเวลาที่ 0 – 24 ชั่วโมง ได้

ผลการทดสอบข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thanrada *et al.* ในปี 2010 ที่พบว่า *Lactobacillus salivarius* K7 ที่แยกได้ สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินไปยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นๆ หลายชนิด มีคุณสมบัติในการมีชีวิตรอดของเชื้อเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 2, 2.5, 3 และ 3.5 (Thanrada *et al.*, 2010)

ปาริชาติ พุมขจร และ พงศศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ ทดสอบเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกพบว่า เพียง 6 ไอโซเลทจากทั้งหมด 37 ไอโซเลท คือ C120, C129, C132, C133, C136 และ C140 ที่สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 2-10 (ปาริชาติ และ พงศศักดิ์, 2542)

ความสามารถในการอยู่รอดภายใต้การทำงานของน้ำดีเป็นหลักการทั่วไปที่ใช้เพื่อคัดเลือกโพรไบโอติก เนื่องจากน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.5-2.0 % ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณ 0.3 % ซึ่งสัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบของน้ำดีแตกต่างกัน เช่น ในไก่มีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบ 100 %

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ส่วนในโคมีเกลือน้ำดี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 50 % และในคนมีเกลือน้ำดี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบหลักโดยมี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบอยู่ 16-27 % ซึ่งเกลือน้ำดีที่มี taurine conjugate เป็นองค์ประกอบจะมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มากกว่าเกลือน้ำดีที่มี glycine conjugated เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเกลือน้ำดีที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น taurine conjugate จึงผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง (Taranto *et al.*, 1998)

การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียมีผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ bile salts hydrolase (BSH) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถ deconjugate กรดน้ำดีได้ (Madureire *et al.*, 2005) โดยเอนไซม์ BSH จะทำหน้าที่ในการสลายพันธะเอไมด์ของกรดอะมิโนกับกรดน้ำดี ทำให้เกิดกรดน้ำดีอิสระ เช่น deoxycholic acid และ lithocholic acid ซึ่งกรดน้ำดีเหล่านี้สามารถละลายน้ำได้น้อย จึงมีการตกตะกอนในส่วนของลำไส้ใหญ่ต่ำ (Conway *et al.*, 1987) ส่วนใหญ่จะพบเอนไซม์ BSH ในแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ BSH ได้สูงในสภาพ pH ต่ำ ในแบคทีเรีย lactobacilli พบว่าบางสายพันธุ์ เช่น *L. gasseri* ADH ทนต่อเกลือน้ำดีได้เนื่องจากสร้างเอนไซม์ BSH สูงแต่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีต่ำ เอนไซม์ BSH มีความสำคัญทางด้านโภชนาการ คือช่วยลดระดับคอเรสเตอรอลของสัตว์เจ้าถิ่น ทำให้สัตว์เจ้าถิ่นนั้นๆ มีสุขภาพดี โดยในคนที่มีการบริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกพบว่าจะมีระดับคอเรสเตอรอลต่ำ (Corzo & Gilliland, 1999)

จากการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของน้ำดีที่เพียงพอต่อการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีของแบคทีเรียคือ 0.3% (w/v) ดังนั้นการใช้น้ำดีที่ระดับความเข้มข้นสูงคือ 3 % (w/v) เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนต่อน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงได้ ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียสูง (Gilliland & Rich, 1990)

การทดลองในครั้งนี้จึงทำการทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 48 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15%, 0.3% และ 0.45% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ทั้ง 48 ไอโซเลท มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นดังกล่าว ในช่วงเวลาที่ 0 – 24 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jin *et al.* (1998) ที่พบแบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถทนต่อ 0.3 % น้ำดีบริเวณลำไส้ส่วนซีกัมมากกว่าอิเลียม (Jin *et al.*,1998)

ผลการทดสอบข้างต้นยังสอดคล้องกับการศึกษาของยศวีร์ ดวงจิตติเจริญ(2546) ที่ได้ทำการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่คัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์พืชหมัก คือ ผักดอง และน้ำหมักพืช รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง พบว่าสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ได้ และมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 (ยศวีร์, 2546)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

คุณสมบัติการทนต่อโซเดียมคลอไรด์มีความสำคัญมากเนื่องจากโซเดียมคลอไรด์เป็นสารช่วยลดความชื้น หรือ water activity ทำให้เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์อันเนื่องมาจากแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ส่งผลให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำอย่างรุนแรง และหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นในสิ่งแวดล้อมที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นมากๆ จึงเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง นอกจากนี้โซเดียมคลอไรด์ยังเป็นตัวขัดขวางการละลาย และการแพร่ของออกซิเจน ทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobic microorganism) ได้รับออกซิเจนต่ำลง และโซเดียมคลอไรด์ยังสามารถแตกตัวเป็นคลอไรด์อิออน สามารถทำลายเอนไซม์ให้เสียสภาพได้ ส่งผลให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโต (ฐิติพงษ์, 2539)

การที่เซลล์ของแบคทีเรียสามารถทนต่อแรงดันออสโมติกได้ดีนั้นขึ้นอยู่กับสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดอะมิโน อะมิโนซูการ์ คาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เรียกว่า peptidoglycan ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์โดย peptidoglycan นั้นเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่รูปร่างเป็นตาข่ายล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ ยกเว้นในแบคทีเรียแกรมลบ จะมีชั้นของ peptidoglycan เป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนที่น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวกจึงทนแรงออสโมติกได้มากกว่าแกรมบวก (ธนิกานต์, 2547)

จากการทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%, 8% และ 10% (w/v) ในช่วงเวลาที่ 0, 3, 6, และ 24 ชั่วโมง โดยทดสอบจำนวนเชื้อทั้งหมด 48 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 48 ไอโซเลท มีความสามารถในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนฤมล ทองไว ที่ศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย โดยทำการตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะมีเกลือ โดยนำเซลล์แขวนลอยของแลคติกแอซิดแบคทีเรียปริมาตร 0.1 ml ใส่ในอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4.0, 6.5, 8 และ 18 แล้วนำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบมีจำนวนทั้งหมด 5 ไอโซเลท จาก 7 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8 ได้ และ 2 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 ได้ (นฤมล, 2545)

คุณสมบัติด้านความปลอดภัยของโพรไบโอติกที่สำคัญประการหนึ่งคือความไวต่อสารปฏิชีวนะเนื่องจากการใช้สารปฏิชีวนะในทางการแพทย์และการใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ส่งผลให้แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่รอดชีวิตมีความทนทานและดื้อยามากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะเป็นจุดวิกฤตในการคัดเลือกโพรไบโอติก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ไม่ต้องการหรือความต้านทานสารปฏิชีวนะแบบผิดปกติเกิดขึ้น

จากผลการทดสอบการทนต่อฤทธิ์ยาปฏิชีวนะของแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 48 ไอโซเลท พบว่าแลกติกแอซิดแบคที่เรียจำนวน 1 ไอโซเลท คือ PI7/4 ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่ำทั้ง 7 ชนิด และมีแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลท ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่ำถึง 6 ชนิด นอกจากนั้นยังพบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลท ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบต่ำถึง 5 ชนิด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบนั้น มีความไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวค่อนข้างต่ำ การทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของสุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548 ที่ได้ทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแลคติกแอซิดแบคทีเรียพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. plantarum*(PD26), *Lb. plantarum*(PD51), *Lb. plantarum*(PD110), *Lb. cellobiosus* (PD32), *Lb. cellobiosus*(PD40), *Lb. cellobiosus* (PD55), *Lb. cellobiosus* (PD112), *Lb. cellobiosus* (RE33), *Ent. Faecalis* (PD28), *Leuco. Lactis* (PD128) มีความไวต่อ Penicillin G, Ampicillin, Cephazolin, Tetracycline, Chloramphenical, Erythromycin และ Clindamycin ที่ความเข้มข้น 10 µg, 10 µg, 30µg, 30 µg, 30 µg, 15 µgและ 2 µg ตามลำดับ (สุพรรณิการ์, 2548)

เมื่อมีการใช้สารปฏิชีวนะร่วมกับแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยทั่วไปพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะจะถูกทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตส่งผลให้สมดุลในการดำรงชีวิตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียเสียไปและตายในที่สุด แต่สารปฏิชีวนะบางชนิดก็ไม่สามารถทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้

ความสำคัญของความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะอีกประการหนึ่งคือ อาจเกิดการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะขึ้น เนื่องจากยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะอยู่บนพลาสมิดซึ่งถ่ายทอดยีนนี้ไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ได้โดยวิธี conjugation หรือ permeability mutant อาจส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมากยิ่งขึ้น ในรายงานก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาความต้านทานสารปฏิชีวนะของ Lactobacilli อย่างกว้างขวาง แต่ในการศึกษาเกือบทั้งหมดพบว่าความต้านทานของสารปฏิชีวนะไม่มีการถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์อื่นๆ สำหรับสายพันธุ์ *Lactobacillus* แม้มีการต้านทานโดยธรรมชาติตัวเองต่อสารปฏิชีวนะหลายชนิด แต่การต้านทานส่วนใหญ่ของ *Lactobacillus* ไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ เนื่องจากยีนที่ควบคุมความต้านทานสารปฏิชีวนะอยู่บนโครโมโซม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Curragh & Collins (1992); Saarela *et al.*, (2000) ได้ศึกษา cross-resistance ระหว่าง *Lb. plantarum* และ *Lb. bulgaricus* พบว่า ไม่มีการต้านทานข้ามต่อสารปฏิชีวนะ Tetracycline, Ampicillin และ Erythromycin แม้ Lactobacillus จะเกิดการมิวเทชัน โดยมีความต้านทานแบบผิดปกติต่อ Nitrofurantoin แต่สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะก็ไม่ถ่ายทอดความต้านทานนี้ไปยัง Lactobacillus สายพันธุ์อื่น เพราะเมื่อตรวจสอบพลาสมิดระหว่างเซลล์ที่ต้านทานและเซลล์ไวต่อ Nitrofurantoin พบว่า รูปแบบของพลาสมิดไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ความต้านทานเกิดจากการมิวเทชันของโครโมโซม (chromosomal mutation) ซึ่งเป็นความต้านทานที่จะไม่มีการส่งผ่านไปยังแบคทีเรียอื่น ประกอบกับรูปแบบความต้านทานที่เกิดขึ้นมีความคงทน คือไม่มีการสูญเสียความต้านทานแม้จะทำการเพาะบ่มซ้ำ นอกจากนี้ พลาสมิดที่เกี่ยวกับการดื้อยาก็พบได้ยากใน Lactobacillus ดังนั้น Lactobacillus จึงเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีการถ่ายทอดความต้านทานสารปฏิชีวนะ จึงไม่ต้องกังวลในด้านความปลอดภัย (Curragh & Collins,1992; Saarela *et al.*, 2000)

ด้วยเหตุนี้ ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ศึกษาทั้ง 48 ไอโซเลท เป็นความต้านทานที่พบโดยทั่วไป ไม่เป็นความต้านทานที่ผิดปกติ ลักษณะการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะดังกล่าว ไม่พบการถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่น และปลอดภัยต่อการใช้เป็นโพรไบโอติก

การยึดเกาะของแบคทีเรียจะถูกควบคุมในลักษณะที่มีความจำเพาะ (ligand-receptor like) และไม่จำเพาะ (physicochemical) ซึ่งความสัมพันธ์ทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติพื้นผิวของแบคทีเรีย โดยความเป็น hydrophobic จะมีบทบาทสำคัญมากในการยึดเกาะของแบคทีเรีย

การทดสอบความเป็น hydrophobic มักจะใช้สารละลาย hexadecane ในการประเมินความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรีย สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลักจะกำหนดความสามารถในการยึดเกาะของพื้นผิวแบคทีเรียที่ไม่ชอบน้ำ(hydrophobic) (Gibbons & Etherden, 1982)

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงค่า hydrophobicity index (HPBI) ของ cell surface ในแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลท ด้วยสารอินทรีย์ Xylene, Toluene และ Octan ผลการทดสอบแยกตามชนิดของสารอินทรีย์ได้ดังต่อไปนี้ พบว่ามีแลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท มี highly hydrophobic ต่อทั้ง Xylene, Toluene, และ Octan คือ MI4/9, MI3/3 และมี 3 ไอโซเลท ที่มี highly hydrophobic ต่อ Xylene คือ T2/2, CR 1/2, และ CR 1/4 นอกจากนี้ยังพบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่มี highly hydrophobic ต่อ Octan คือ CR 1/2, KF1/1, และ KF 1/2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โดยสรุปแล้วพบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีผลความเป็น hydrophobicity ที่ดีคือ MI4/9, MI 3/3 เนื่องจากมีค่าความเป็น hydrophobicity ต่อสารอินทรีย์ Xylene, Toluene และ Octan อยู่ในช่วง highly hydrophobic ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม แลกติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบ มีความเป็น hydrophobic น้อย เนื่องจากมีค่า hydrophobicity index ต่อสารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดที่น้อยกว่า 50 %

ปริยดา ตั้นจักร พบแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกจากการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากอาหารหมักพื้นเมืองจำนวน 100 ตัวอย่าง และแบคทีเรียโพรไบโอติกเหล่านั้นมีค่า hydrophobicity สูงต่อสารประกอบ hexadecane (ปริยดา, 2550)

คุณสมบัติพื้นฐานของโพรไบโอติกแบคทีเรียอย่างหนึ่งคือ การไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงจะทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย โดยอาศัย “ฮีโมโกลบิน (hemoglobin)” เป็นตัวนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ต่างๆ และพาคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาจากเซลล์เพื่อกำจัดออกจากร่างกายต่อไป หากเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะทำให้หน้าที่ของเม็ดเลือดแดงสูญเสียไป ส่งผลให้ร่างกายมีการทำงานที่ผิดปกติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบฤทธิ์ทาง hemolysis ในกรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

ในการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายเม็ดเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลท พบว่า พบว่า มีจำนวน 4 ไอไซเลท มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β-hemolysis และมี 7 ไอไซเลท มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α-hemolysis นอกเหนือจากนั้น 37 ไอโซเลท ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงหรือมีลักษณะแบบ γ-hemolysis การทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปิ่นมณี ขวัญเมืองที่ศึกษาการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากมูลทารกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยได้นำแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท มาทำการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งพบว่า แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลท ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้งแบบ β และ α-hemolysis แต่ให้การแตกของเม็ดเลือดแดงเป็นแบบชนิดแกมม่า (γ -hemolysis) คือไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (ปิ่นมณี,2546)

จากการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 29 ไอโซเลท ซึ่งยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีและยับยั้งได้มากกว่า 1 ชนิด รวมถึงมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกแบคทีเรีย มาทดสอบยืนยันความสามารถที่ยับยั้งเชื้อทดสอบที่ให้ผลดีที่สุด โดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2-fold dilution (undiluted, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) พบว่ามีเพียงส่วนใสจาก KE1/3, MM3/9 และ FF4/9 ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยไอโซเลท KE1/3 สามารถยับยั้ง *Citrobacter Frundii* ได้ดี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(6,400 AU/ml) ไอโซเลท MM3/9 สามารถยับยั้ง *Vibrio Cholarae* ได้ดี (800 AU/ml) และไอโซเลท FF4/9 สามารถยับยั้ง *Streptococcus agalatiae* ได้ดีที่ 1,600 AU/ml เช่นเดียวกับ การทดลองของนภดลและคณะ(2011)ได้ทำการคัดแยกและจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินจากแหนมปลาโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุดจำนวน 12 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth และนำไปศึกษาผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ 21 ชนิด โดยวิธี spot-on-lawn พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท ที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ คือ ไอโซเลท NP3.8 สามารถยับยั้ง *Bacillus coagulans* JCM 2257 และ *Listeria innocua* ATCC 33090ได้ดี (1,600 AU/ml) และไอโซเลท NP5.4 สามารถยับยั้ง *Lactobacillus sakei* JCM 1157 ได้ดี (3,200 AU/ml) (นภดล และคณะ, 2011)

คมแข พิลาสมบัติ และคณะได้ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงและได้ทดสอบเพื่อหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินโดยใช้วิธี spot-on-lawn พบว่า ไอโซเลท Sb2 มีจำนวนเซลล์และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบเพิ่มมากขึ้นตามระดับของค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น (3.0-6.0) โดยสามารถเจริญเติบโตและมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 12.28 log CFU/ml (OD600 เท่ากับ 2.05) และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AU/ml แต่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น (7.0-10.0) พบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตและค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงตามระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงขึ้น (มากกว่า 6) แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ปริมาณของแบคทีเรียจะมีค่าลดลงเนื่องจากเซลล์ชะลอหรือเจริญเติบโตได้ไม่ดี ซึ่งจะส่งผลทำให้แลคติกแอซิดแบคทีเรียหยุดการสร้างแบคเทอริโอซิน (คมแข และคณะ, 2553)

การคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต่างๆ ข้างต้น ได้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ จำนวน 8 ไอโซเลท คือ MI 4/9, KE 1/3, FI 4/4, FB 5/3, MM 2/2, MM 3/9, FSh 2/3 และ FF 4/9 ซึ่งเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์ โดยอาศัยการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CHI พบว่า 4 ไอโซเลท คือ FI 4/4, FB 5/3, MM 3/9 และ FSh 2/3 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลทของ MI 4/9 อยู่ในสปีชีส์ *Lactococcus lactis* ไอโซเลทของ MM 2/2 และ FF 4/9 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus pentosus* และไอโซเลทของ KE 1/3 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus bevis*

อรัญญา สังขศรี ได้ศึกษาอาหารหมักพื้นบ้านไทย 329 ตัวอย่าง แยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้ 212 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย คือ *Bacillus cereus*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Atcc11778 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *salmonella typhimurium* 3230nโดยวิธี agar spot มีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท แสดงผลการยับยั้งโดยการสร้างสารยับยั้งกรดอินทรีย์ H_2O_2 และ bacteriocin พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียงไอโซเลทเดียวคือ P5 แสดงผลการยับยั้งโดยวิธีวัดความขุ่น การทดสอบโดย agar well diffusion พบว่าไม่มีไอโซเลทใดที่แสดงผลการยับยั้งจากการเทียบเคียงแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus planterum* 6 ไอโซเลท, *L. brevis* และ *L. fermentum* อย่างละ 2 ไอโซเลท (อรัญญา , 2541)

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล ได้ศึกษาเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีประโยชน์ในการผลิตอาหารหมัก จากการตรวจสอบตัวอย่างการผลิตสารยับยั้งแบคเทอริโอซินในแบคทีเรียจำนวน 59,509 โคโลนี จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Direct plating เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเท่ากับ 0.27% ในจำนวนดังกล่าวพบ *Lactobacillus plantarum* สายพันธ์ PMU33 ที่มีความเสถียรของการผลิตสารยับยั้งจุลชีพในอาหารเหลว ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธ์ใกล้เคียง รวมทั้ง *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* และ *Listeria* หลายชนิด (ศิรินาถ, 2546)

เช่นเดียวกับการทดลองของ Jimenez-Diaz *et al.*, 1993 รายงานการแยก *Lactobacillus plantarum* LPCO10 จากการหมักมะกอกเขียว พบว่าจะผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า plantaricin S ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Ennahar *et al.*, (1996) พบว่า การแยกเชื้อแบคทีเรียจากเนยแข็งได้ 1,920 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี *Lactobacillus plantarum* WHE92 ที่สร้างแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า pediocinAcH มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus* , *Enterococcus*, *Streptococcus* spp. และ *Bacillus* spp. (Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Ennahar *et al.*, 1996)

อีกทั้งยังสอดคล้องกับงานวิจัยของวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536) ที่พบว่าอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ มีต้นกำเนิดมาจากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย บางครั้งจึงเรียก ไส้กรอกอีสาน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมัก ได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สำหรับชนิดที่พบมาก คือ *Lactobacillus plantarum* และ*Pediococcus cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบ *L. brevis* และ *P. halophilus* (วิลาวัณย์, 2536)

Cebeci & Gurakan พบว่าเชื้อ Lactobacillus 15 สายพันธุ์ ที่เป็นโพรไบโอติกมี 13 สายพันธุ์ เช่น *L. plantarum, L. acidophilus* และ *L. pentosus* ซึ่งทนต่อกรดและเกลือน้ำดี มีการหมัก ฟรุกโตสโอลิโกแซคคาไรด์ มีการศึกษากิจกรรม γ-galactosidase และไวต่อยาปฏิชีวนะ สายพันธุ์ที่ทนต่อเกลือ คือ *L. plantarum* HU, *L. plantarum* NCIMB 1193, *L. plantarum* 80,

มหาวิทยาลัยราชภัฏ Rajabhat University

L .plantarum DSM20174, *L. plantarum* DSM20246, *L. plantarum* 37 และ *L. acidophilus* ATCC4356 สายพันธุ์ที่ทนต่อเกลือและเกลือน้ำดีคือ *L. plantarum* 80, *L. plantarum* DSM20174, *L. plantarum* DSM20246, *L. plantarum* 37, *L. plantarum HU, L. acidophilus* ATCC4356 สายพันธุ์ที่มีการหมักฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ คือ *L. plantarum* 80, *L. plantarum* DSM20174, *L. plantarum* DSM20246, *L. plantarum* NCIMB1193, *L. plantarum* 37 และ *L. plantarum* HU สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ คือ *L. plantarum* 80 และ *L. plantarum* 37 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของγ-galactosidase สูงสุดคือ *L. plantarum* NCIMB1193 และ *L. pentosus* สายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็น โพรไบโอติกคือ *L. plantarum* NCIMB1193, *L. plantarum* 37, *L. plantarum* 80 และ *L. plantarum* HU (Cebeci & Gurakan, 2003)

Molin รายงานว่าการหมักกรดแลคติกเป็นวิธีที่ง่ายและปลอดภัยในอาหารหมัก จึงน่าจะมีการนำมาใช้ในมนุษย์ เช่น *Lactobacilli plantarum*, *Lactobacilli rhamnosus*, *Lactobacilli paracasei*, *Lactobacilli acidophilus* และ *Lactobacilli salivarius* ที่อยู่ในมนุษย์ตั้งแต่ปากจนถึงลำไส้ตรง, *Lactobacilli paracasei* และ *Lactobacilli rhamnosus* นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในขณะที่ *Lactobacilli plantarum* มีการใช้ในอาหารหมักของพืช (plant origin) probiotic ไม่มีการบรรจุลงในนม ผลิตภัณฑ์น้ำดื่ม ผลไม้มีการบรรจุ lactic acid bacteria โดยมีประมาณ 5x10(10) CFU ของ *L. plantarum*299 v/l จากเยื่อบุลำไส้ของมนุษย์ และมีอัตราการ translocation ลดลง มีการพัฒนาของเยื่อบุลำไส้ มีการพัฒนาของตับ มีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของเยื่อบุลำไส้ และลดการ inflammation ในการเยื่อบุลำไส้ ในมนุษย์ *L.plantarum* 299 v/l เพิ่มความเข้มข้นของ carboxylic acids ในอุจจาระและลดอาการปวดท้อง โดยที่สามารถลดความเข้มข้นของ fibrinogen ในเลือด probiotic จะต้องมีชีวิตรอดอยู่ในอาหารและทำให้อาหารมีรสชาติที่ดีเมื่อมีการบริโภค *L. plantarum* 299 v/l ไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่อยู่ในเยื่อบุลำไส้ แต่สามารถควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน host ได้ (Molin, 2001)

Lactobacillus plantarum เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ใน genus *Lactobacillus* มักพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจน *L. plantarum* ผลิตภัณฑ์ผักดอง และยังพบได้ในน้ำลาย มีคุณสมบัติในการย่อย gelatin *L. plantarum* มีความหลากหลายทาง genome สูง และยังพบว่าเป็นอีกหนึ่งสปีชีส์ที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแทบทุกชนิดสูง ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงเหมาะที่จะเป็นโพรไบโอติกในคนที่มีพฤติกรรมใช้ยาต้านแบคทีเรียเกินความจำเป็น

L. plantarum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15 °C (59 °F) แต่ไม่เจริญในอุณหภูมิ 45 °C (113 °F) ผลิตกรดแลคติกทั้งสองชนิด (lactic acid D and L) species นี้ ไม่เหมือนกับ species อื่น คือใช้ออกซิเจนในการ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เจริญเติบโต แต่ไม่มีการสังเคราะห์ ATP หรือ cytochromes ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ คือ hydrogen peroxide แบคทีเรียจะปล่อยสาร peroxide ที่มีความเป็นพิษหลังจากกระบวนการสังเคราะห์อาหารเดียวกันนั้นก็ยังมี superoxide dismutase ทำหน้าที่เป็น protective enzyme ส่วนใหญ่พบได้ในเซลล์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนแบคทีเรียชนิดนี้จะสะสม manganese polyphosphate, *L. plantarum* ผลิต Manganese ทำให้เกิด pseudo-catalase คือมีปริมาณออกซิเจนในปฏิกิริยาน้อยมาก เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของ manganese complexes จะป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายจากออกซิเจนด้วยเหล็กแต่เซลล์เหล่านี้ไม่มีอะตอมของเหล็กอยู่เลย ในขณะที่ *Escherichia coli* มีอะตอมของเหล็กเป็นส่วนประกอบ เพราะว่า *L. plantarum* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นได้ เช่น catalase *Lactobacillus plantarum* คล้ายกับ *lactobacillus* species สามารถเพาะเลี้ยงในMRS media

Lactobacillus plantarum เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนจุลชีพเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตภายใน 48 ชั่วโมง จากนั้นจะเริ่มผลิตกรดแลคติกโดยผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof Pathway ภายใต้สภาวะเหล่านี้ สายพันธ์ของ *L.plantarum*จะสร้าง heterologousproteins เป็นจำนวนมากและด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมา ทำให้เกิด an effective biological pretreatment for lignocellulosic biomass มักพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก รวมทั้ง กะหล่ำปลีดอง, ผักดอง, มะกอกดอง, กิมจิของชาวเกาหลี, Nigerian Ogi, ขนมปังหมักและการหมักที่มีพืชเป็นวัตถุดิบหลัก อีกทั้งรวมถึง cheeses, fermented sausages และ stockfish การมีปริมาณจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากในอาหารจะทำให้มีความเป็น probiotics มากขึ้น อีกทั้ง *L. plantarum* ยังสามารถสร้างสารต้านจุลชีพต่างๆ เพื่อช่วยให้อยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สารต้านจุลินทรีย์จะมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

Lactococcus lactis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบ cocci ไม่สร้างสปอร์และไม่ motile พบได้บ่อยในผลิตภัณฑ์นม เช่น น้ำนมดิบ, คีเฟอร์, บัตเตอร์มิลล์, และชีส *ฯลฯ* เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นอีกสปีชีส์ที่สร้าง L (+) lactic acid ได้จากการสร้างเอนไซม์มาใช้ย่อย lactose เพื่อสร้าง ATP จึงมักถูกใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมแปรรูป ใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพได้ และเป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่อยู่ในgenerally recognized as safe bacteria; GRAS status (GRAS) ที่ประกาศโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA)ว่าสามารถใช้เติมลงในอาหารและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Lactobacillus pentosus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบ coccobacili ไม่สร้างสปอร์และไม่ motile สามารถใช้ในการเพิ่มคุณภาพของอาหารและรสชาติได้ในกระบวนการผลิตชีส เนื่องจากเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน จึงถูกใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ประจำ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ถิ่นที่เรียกว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียไม่ใช่เชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตชีส (non-starter lactic acid bacteria; NSLAB)

L. brevis เป็น *Lactobacillus* species ที่พบมากในคีเฟอร์และสามารถระบุ species จากการสร้าง polysaccharide (dextran) ของคีเฟอร์ กระบวนการเผาผลาญหลักของ *L. brevis* จะได้ lactic acid and ethanol สายพันธุ์ของ *L. brevis* และ *L. hilgardii* สามารถพบการสร้าง biogenic amines tyramine and phenylethylamine.

แหล่งที่พบ *Lactobacillus brevis* รวมถึงแลคติกแอซิดแบคทีเรียอีกหลายสายพันธ์ ส่วนใหญ่มักพบในแหล่งที่ใกล้เคียงกัน เช่น กะหล่ำปลีดอง ผักดองอื่นๆ น้ำนมดิบ และอุจจาระวัว ฯลฯ ซึ่งขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางชีวภาพ โดยประโยชน์และการนำไปใช้งานของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้นิยมที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ขนมปัง (Sourdough bread) ชีส ผักดองโยเกิร์ต โกโก้ กาแฟ และการใช้งานด้านโพรไบติก (Kagli et al., 2007)

สำหรับประเทศไทยมีการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่ง *Lactobacillus brevis* จัดเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์พ.ศ.*2539* และคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกายอมรับให้ใช้ได้ โดยกลไกการทำงานของโพรไบโอติก คือ เมื่อเจ้าบ้าน (*host*) ได้รับโพรไบโอติกเข้าไปแล้วมันจะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วน โดยเฉพาะการแทรกตัวอยู่ตามร่องวิไล (*villi*) ของลำไส้เล็ก มีการย่อยสลายกากอาหารแล้วสร้างกรดแลกติก กรดแลกติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การเกาะติดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะแพร่กระจายทุกพื้นที่ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ไม่มีพื้นที่สำหรับการเกาะติด นอกจากนี้ยังสร้างสารบางชนิดที่ออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค ที่เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (*Bacteriocin*) จุลินทรีย์ โพรไบโอติกยังสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโน และวิตามิน ดังนั้นการรับประทานอาหารที่เติมโพรไบโอติกก็เพื่อช่วยให้มีสุขภาพแข็งแรง มีภูมิต้านทานต่อโรคโดยเฉพาะโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ยังมีการใช้โพรไบโอติกเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งพบว่าช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตดีขึ้น หรือให้ผลผลิต เนื้อ นมไข่ มากขึ้น และสิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือ สามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ใช้เติมในอาหารสัตว์ซึ่งจะมีผลตกค้างในผลผลิตสัตว์และก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรคชนิดต่างๆ (แหล่งที่มา: *http://www.rakbankerd.com/agriculture/wb/show.php?Category=agriculture&No=13321*)

Lactobacillus brevis นอกจากจะให้ประโยชน์ทางด้านโพรไบโอติกแล้ว ยังพบว่าสามารถนำไปผลิตพลาสติกชีวภาพได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า *Polylactic Acid (PLA)* วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตคือ พืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ข้าวโพด และมันสำปะหลัง โดยมี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กระบวนการผลิตเริ่มต้นจากการบดหรือโม่พืชนั้นให้ละเอียดเป็นแป้ง แล้วนำแป้งที่ได้ไปผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) โดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus brevis 3* ได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกนี้เป็นโมโนเมอร์ที่จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็นพลาสติก โดยนำไปผ่านกระบวนการ *polymerization* ได้เป็นโพลีเมอร์ที่เรียกว่า *Polylactic Acid* ทั้งนี้สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกได้เช่นเดียวกับเม็ดพลาสติกจากปิโตรเลียม อีกทั้งยังมีคุณสมบัติพิเศษคือ มีความใส ไม่ย่อยสลายในสภาพแวดล้อมทั่วไป แต่สามารถย่อยสลายได้เองเมื่อนำไปฝังกลบในดิน

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละชนิดที่คัดแยกได้ เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์และการนำไปใช้งานหลายด้าน ที่สำคัญคือ การนำไปใช้งานด้านโพรไบโอติก ดังนั้นโพรไบโอติกแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกมาในการทดสอบครั้งนี้ สามารถนำไปต่อยอดในงานด้านต่างๆได้ เช่น นำมาใช้เป็นส่วนผสมหรือเชื้อตั้งต้นในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ รวมทั้งเป็นตัวช่วยในการรักษาโรคสำคัญ หรือความต้องการทางอาหารและยาให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเพียงคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้น หากต้องการพัฒนานำไปสู่การใช้ได้จริง จำเป็นต้องทำการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ของโพรไบโอติกแบคทีเรียเพิ่มเติม เช่น ความสามารถในการยึดจับเซลลเยื่อบุผิวเพาะเลี้ยง การยับยั้งเชื้อทดสอบในสภาวะเพาะเลี้ยงร่วมกัน ทดสอบผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในมนุษย์ ความคงทนต่อการแปรรูปและเก็บรักษา ความสามารถในการเจริญสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิต ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของโพรไบโอติกแบคทีเรีย รวมทั้งระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเพื่อให้โพรไบโอติกแบคทีเรียเจริญมีปริมาณสูงสุดและผลิตสารสำคัญที่ต้องการ เป็นต้น เพื่อความปลอดภัยและได้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพสูงสุด รวมถึงการนำไปสู่การใช้งานได้จริงในอนาคต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

เกรียงศักดิ์ พูนสุข.“ตัวเสริมปฏิชีวนะ.” The Alltech-Asis pacific Lecture Tour. (1991) :5.

คมแข พิลาสมบัติ, จุฑารัตน เศรษฐกุล และอดิศร เสวตวิวัฒน์. “สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทิโอซิน ซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ : 28 ฉบับที่ : 3(2553) : 1-8

ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์ . “การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่ กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2539): 122 หน้า

ธนิกานต์ ธรสินธุ์. “การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกของนมถั่วเหลือง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อผลิตโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (2547)

ธารารัตน์ ศุภศิริ. “ PROBIOTIC : แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ.”, วารสารวิทยาศาสตร์ (2542) ,53 (6) 357-360

นฤมล ทองไว. “ การแปรสภาพของเสียหรือวัสดุชีวภาพที่มีค่าทางการค้าต่ำ จากโรงงานอุตสาหกรรม ให้เป็นกรดแล็กติก โดยแล็กติกแอสิดแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง., เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, (2545): 22 หน้า.

นิดา อาบสุวรรณ, พัฒนา เหลาไพบูลย์ และวิชัย ลีลาวัชรมาศ. “ การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรียจากอาหารหมักดอง.” วิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น (2554)

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. “จุลชีววิทยาทั่วไป.” กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2539)

นภดล เมตตาเมธา, สมใจ ศิริโภค, อดิศร เสวตวิวัฒน์ การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินจากแหนมปลา.” วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 27(1), (2011): 109-126

บุษกร อุตรภิชาติ. “ จุลชีววิทยาทางอาหาร.” สงขลา: กลุ่มงานส่งเสริมและประกันคุณภาพการศึกษา มหาวิทยาลัยทักษิณ (2545)

ปริยดา ตั้นจักร. “ การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร (2550)

ปาริชาติ พุมขจร และ พงศศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. “ การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สรางแบคเทอริโอซิน." วารสารเทคนิคการแพทยและกายภาพบำบัด (2542) ปที่ 11 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. "การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ." วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (2546)

สุรียรัตน เงินดวง. "การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก." กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, (2545): 124 หน้า

มีชัย ลัดดี. " บทปฏิบัติการที่ 2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก." (2554) [ออนไลน์].แหล่งที่มา: (www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/2.php) (วันที่สืบค้นข้อมูล: 24 ธันวาคม 2554)

ยศวีร์ ดวงจิตติเจริญ. " ผลของโพรไบโอติกต่อการจับเฮทเทอโรไซคลิกเอมีน การสลายไนโตรซามีนและจุลินทรีย์ในลำไส้หนูขาว." วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2546)

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. "การถนอมรักษาเนื้อสัตว์" ใน: เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, (2536): 47-56

รจเรข ชดทันต์บดี "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ Lactobacillus plantarum LP64 ในอาหารเปลือกกุ้ง" ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ (2546)

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์ "อาหารหมัก" ใน: อุตสาหกรรมอาหารหมักดอง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (2524): 70-155.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล "อาหารพื้นเมือง" ใน: ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (2536)

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติคที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย." วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, (2543) ปีที่ 22 ฉบับที่ 2 หน้า 177-189.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, ประเสริฐ สันตินานาเลิศ, อรุณศรี ลีจีรจำเนียร. "อาหารหมักดอง" ใน: คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (2532) 71.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, เมตตา องค์สกุล, ผกาพรรณ สิงห์ชัย . "ผลการยับยั้งของ*Lactobacillus* จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อ *Staphylococcus areus,Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน. " สงขลา: ว.สงขลานครินทร์ วทท (2539)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ . “การแยกเชื้อคัดเชื้อและเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติคจากอาหารหมักของไทย. ” สงขลา: ว.สงขลานครินทร์ วทท (2540)

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. “โพรซีดดิงส์ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย” ใน: อุตสาหกรรมอาหารไทย กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, (2534): 36-38

สุกานดา วนิชวัฒนะ . “การผลิตสารให้กลิ่นรสจากจุลินทรีย์. ว. วิทย มข; 23 (2538): 60-71

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. “การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กทิกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก.” กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (2548) 185 หน้า

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. “จุลชีววิทยาทางอาหาร.” กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, (2545)

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. “ การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทิริโอซินได้จากอาหารหมักและการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทิริโอซินที่ผลิตได้.” วารสารวิทยาศาสตร์, มศว. (2550)

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล. “การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย ที่ทำให้เกิดโรคจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก.” นครศรีธรรมราช : ภาควิชาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, (2546) :42 หน้า.

ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และอดิศร เสาวดิวัฒน์. “การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลกติกในอาหาร.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, (2548); 23(1): 88-101.

อุทัย เก้าเอี้ยน . “โปรไบโอทิคส์ .” ในบทความปริทัศน์ สงขลานครินทร์เวชสาร (2549) ปีที่ 24 ฉบับที่ 4 ก.ค.- ส.ค. น.315-323

อัจฉราพร ดำบัว. “การสำรวจแบคทีเรียแลคติกในผักดองที่จำหน่ายในจังหวัดอุบลราชธานี.” สารนิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. อุบลราชธานี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (2546)

อรัญญา สังขศรี . “การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารโดย *Lactobacillus spp.* ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย.” สงขลา: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (2541)

Araneo, B.A., Cebra, J.J., Beuth, J., *et al*. “Problems and priorities for controlling opportunistic pathogens with new antimicrobial strategies.” An Overview of current literature Zbl. Bakt. Hyg. (1996); 28: 3431-465.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Aso Y, Akazan H, Kotake T, *et al.* "Preventive effect of Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double blind trial. European Urology.(1995) 27:104-9.

Axelsson Lot "Lactic acid Bacteria: Classification and physiology" In: Salminen, S. and Von Wright, A. eds. Lactic Acid Bacteria. London: Marcel Dekker, (1993): 1-64.

Axelsson, L., "Lactic acid bacteria: classification and physiology." In: Salminen, S. & von Wright, A. (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects 2nd Edition. New York: Marcel Dekker Inc., (1998): 1-72.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. *et al.* "Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*." Microbial Ecology in Health and Disease. (1989); 2:131–136.

Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, *et al.* "Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish." Aquaculture.(2008); 278: 188-191.

Barefoot S.F and Klaenhamer T.R. "Detection and activity of lactocin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*." Appl. Environ. Microbiol. (1983); 45:1808-1815.

Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Truck M. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." Am J Clin Pathol. (1966); 45:493-6.

Bielecka M. "Probiotic in Foods" In: Sikorski, ZE. ed. Chemical and Functional Properties of Food Components. USA: CRC Press, (2002): 259-272.

Bielecka M., Biedrzycka E., Rotkiewicz Z., *et al.* "The influence of bifidobacterium on pathomorphology pattern and microflora of gastrointestinaltract in non-infected and Salmonella-administered rats." Br J Nutr Suppl. (1998); 88(1):109-110.

Bogovic-Matijasic B, Rogelj I, Nes F, Holo H. Lsolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1998);49: 606-612.

Breukink, E., Weidemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H.-G. and de Kruijff, B. "Use of Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic." Science. (1999) , 286:2361-2364.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E. and Sahl, H.-G. "The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II." Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (1998), 42: 154-160.

Bruce AW, Chadwick P, Hassan A, VanCott GF. "Recurrent urethritis in women." Cam Med Assoc J. (1973),108(8): 973-936.

Bruno, M.E., A. Kaiser and T.J. Montville. "Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells." Appl. Environ. Microbiol. (1992) 58,: 2255-2259.

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

Buck, L.M. and Gilliland, S.E. "Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth." Science. (1994) , 77:2925–2933.

Burns AJ and Rowland IR. "Anticarcinogenicity of probiotics and prebiotics." Current Issues in Intestiinal Microecology (2000); 1: 13-24.

Cadieux P, Burton J, Kang CY, and *et al.* "*Lactobacillus* strains and vaginal ecology." JAMA; (2002), 287: 1940-1941.

Casanova, S., Shine, K., Gardiner, T., and *et al.* "Assessment of the consistency of near-infrared water vapor line intensities using high-spectral-resolution ground-based Fourier transform measurements of solar radiation." Journal of Geophysical Research (2006); 111(11).

Cavazzoni, V., A. Adami and C. Castrovilli.. « Performance of broiler chickens supplemented with Bacillus coagulans as probiotic." Br. Poult. Sci. (1998),39: 526-529.

Chadwick R, Henson S, Moseley B, *et al.* "Functional Foods." Springer (2003): 161-174.

Chang, T.-W., M.-Y. Dong, and S. L. Gorbach. "Effect of bismuth subsalicylate on *Clostridium difficile* colitis in hamsters." Rev. Infect. Dis. (1990),12(Suppl. 1):S57-S58.

Charteris W.P, Kelly P.M, Morelli L, Collins J.K. "Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species." J. of Food Prot (1998); 61(12): 1636-1643.

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W. A.. "Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics." Chemistry Reviews. (2005) 105: 633-683.

Chikindas, M.L., M.J.G. Garcera, A.J. Driessen, A.M. Ledeboer, J.N. Meyer, I.F. Nes, T. Abee,

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

W.N. Konings and G. Venema. "Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells." Appl. Environ. Microbiol. (1993) 59: 3577-3584.

Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. "Chickindas. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." Int. J. Food Microbiol.(2001) 71: 1-20.

Coconier, M.-H., Bernet, M.-F., Chauvière, G., Servin, A. L. "Adhering heat-killed human lactobacillus acidophilus, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells." Journal of Diarrhoeal Diseases Research (1993)11: 235-242.

Conner D.E, Kotrola J.S, Mikel M.B, Tamblyn K.C. "Effect of acetic-lactic acid treatments applied to beef trim on populations of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in ground beef." J. Food Prot (1997); 60: 1560-1563.

Conway P.L, Corback S.L, Goldin B.R. "Survival of lactic acid bactria in the human stomach and adhesion to intestinal cell." J. Dairy Sci (1987); 70: 1-12.

Corzo, G., and Gilliland, S.E. "Bile salt hydrolase activity of three strains of Lactobacillus acidophilus." J of Dairy Science, (1999); 82: 472–480.

Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P.. "Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Therapeutic Potential." Current Protein and Peptide Science.(2005); 6: 61-75.

Curragh, H. J. & Collins, M. A. " High-levels of Spontaneous Drug-Resistance in Lactobacillus." J of Applied Bacteriology, (1992); 73: 31-36.

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

De Roos NM, Schouten G, Katan MB. "Yoghurt enriched with Lactobacillus acidophilus does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels." Eur J Clin Nutr (1999) , 53:277–80.

Delgado A., Brito D., Fevereiro P., Peres C., and Marques J. F. "Antimicrobial activity of L. plantarum, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives," INRA, EDP Sciences (2001), vol. 81, 203- 215.

Dellaglio F., L. M. T. Dicks, Torriani S. "The genus Leuconatoc" In: B.J.B. Wood, and

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

W. H. Holzapfel, eds. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Glasgow: Chapman and Hall, (1995): 235-278.

Delves-Broughton, J. "Nisin and Its Use as Food Preservative." Int J of Dairy Technology. (1990); 43(3): 73-76.

Devriese L. A. and Pot B. "The genus Enterococcus" In: B.J. B. Wood, and W. H. Holzapfel, eds. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Glasgow: Chapman and Hall, (1995): 327-367.

De vuyst L and Vandamme E.J. "Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical important" In: Bacteriocins of lactic acid bacteria microbiology genetics and applications. Oxford: The Alden Press, (1994): 1-12.

Dimer, C., & Gibson, GR,. "An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies." Int Dairy J. (1998);8: 473–9.

Edward G.F. "Acetic acid" In: antimicrobial food additives. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1980): 167-174.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. "Class IIa bacteriocins from Food Preservation." Journal of Bioscience and Bioengineering. (1999); 6: 705-716.

Eren, M., G. Deniz, H. Birickik, S.S. Gezen, I.I. Turkemen and H.M. Yavuz. "Effects of supplementation of zinc bacitracin, mannan oligosaccharide and probiotic in broiler feeds on fattening performance." Vet. Fak. Derg. Ulu. University, (1999); 18: 73–84

Erkkila S and Petaja E. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salt for potential probiotic use." J.Meat Science (2000); 55: 297-300.

Fleming, H. P., J. L. Etchells and R. L. Costilow. "Microbial inhibition by an isolate of Pediococcus from cucumber brines." Appl. Microbiol., (1985); 30: 1040-1042.

Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR. "Prebiotics, probiotics and human gut microbiology." Int. Dairy J. (1999)9: 53-61.

Forsythe, S.J. "The Microbiology of Safe Food." Oxford: Blackwell Science, Ltd. (2000); pp.124.

Fuller R. "Probiotics in man and animals." J.Appl. Bacterio (1989); 66: 365-378.

Fuller, R. and G. Perdigon. "Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health." Blackwell Publishing, Oxford. (2003).

Garbutt J. "Essentials of Food Microbiology." London England: Arnold, (1997).

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Gibbons RJ and Etherden I. "Enzymatic modification of bacterial receptors on saliva-treated hydroxyapatite surfaces." Infect Immun. (1982) Apr;36(1):52–58.

Gilliland, S.E. and C.N. Rich. "Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH." J. Dairy Sci. (1990); 73: 1187-1192.

Goldin G, Gualtieri L, Moore R. "The effect of Lactobacilli GG on the initiation and promotion of dmethylhydrazine-induced intestinal tumors in the rat." Nutritional and Cancer (1996); 25: 197-204.

Gordin BR, Gorbach SL. "Probiotics for humans." In: Probiotics, the scientific basis, Fuller R. (Eds.), London, Chapman & Hall. (1992); 355-376.

Havenaar, R. and J. Huis in't Veld. "Probiotics: A general view. In:wood ed . The lactic acid bacteria in health and disease." London Elsevier Applied Science, (1992); 209- 224.

Helander, I.M., A. von Wright and T.M. Mattila-Sandholm,. "Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria." Trends in Food Science and Technology, (1997); 8:146-150.

Helander, I.M. and T. Mattila-Sandholm. "Permeability barrier of the Gram-negativebacterial outer membrane with special reference to nisin." Int. J. Food Microbiol. (2000); 60: 153-161.

Holzapfel, W. H., Geisen, R. and Schillinger, U. "Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food-Grade Enzymes." International Journal of Food Microbiology 24: 343-362.

Hood, S.K., and Zottola, A. "Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells." J. Food. Sci. (1988); 53: 1514-1516.

Hurst, A. "Nisin." Advances in Applied Microbiology. (1981); 27: 85-123.

Isolauri E., Arvola T., Stas Y., Salminen S. "Probiotics in the management of atopic eczema." Clinical and experimental Allergy (2000); 30: 1065-1610.

Jack RW., Tagg JR. and Ray B. "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria." Microbiological Reviews. (1995); 59: 171-200.

Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R.M., Desmazeaud M., and *et al.* "two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation." Appl. Environ. Microbiol (1993); 59: 1416-1424.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Jin, L.Z., Y.W. Ho, N. Abdullah and S. Jalaludin. "Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus cultures*." Poult. Sci., (1998); 77: 1259-1265.

Kagli DM, Vancanneyt M, Hill C, Vandamme P, Cogan TM. "*Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment." International Journal of Food Microbiology, (2007). V.114, Issue 2, p.243-251

Kaila M., Isolauri E., Soppi E., and *et al*. "Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human lactobacillus strain." Pediatric Research (1992); 32; 141-144.

Kalliomki M., Salminen S., Arvilommi H., and *et al*. "Probiotics in primary prevention of atopic disease a randomized placebo-controlled trial." Lancet (2001); 357: 1076-1079.

Kandler and Weiss. "Bergey's manual determinative bacteriology." (1986); 2: 1208-1235.

Kaur I.P., Chopra K., Saini A. "Probiotics:potential pharmaceutical applications. probiotics:potential pharmaceutical applications." J.of Pharmaceutical sciences (2002); 15: 1-9.

Klaenhammer, T. R. "Bacteriocins of lactic acid bacteria." Biochimie (1988); 70: 337–349.

Koutula K.L. and Thelappurate R. "Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solutions." J. Food Prot (1994); 57: 665-670.

Kozasa M. "Probiotics (viable bacteria preparations) for animal feeding." Fine Chemical, (1988); 17: 37-49.

Lee, Y.-K., Nomoto, K., Salminen, S. and Gorbach, S.L. "Handbook of Probiotics." New York, NY: John Wiley & Sons; (1999).

Lee, YK., & Salminen, S. "The coming of age of probiotics." Trend Food Sci. Technol. (1995); 6: 241-4.

Libudzisz Z. and Piatkiewicz A. "Kefir production in Poland." Dairy Industries International. (1990); 55: 31-33.

Lilly D.M. and Stillwell R.H. "Probiotics Growth promoting factors produced by micro-organisms." Science (1965); 147: 747-748.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Majamaa H. and Isolauri E. "Probiotics: a novel approach in the management of food allergy." J Allergy Clinical Immunology (1997); 99: 179-185.

Maragkoudakis PA, Zoumpopoulor G, Miaris C, and *et al.* "Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products." Int Dairy J (2006) 16:189–199

Marteau P., Vaerman JP., Dehennin JP., and *et al.* "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." Gastroenterology and Clinical Biology (1997); 21: 293-298.

Mattila-Sandholm, T., P. Mylarinen, R. Crittenden, G. Mogensen, and *et al.* "Technological challenges for future probiotic foods." International Dairy Journal, (2002); 12: 173-182.

Miettinen M., Alander M., von Wright A., and *et al.* "The survival of and cytokine induction by lactic acid bacteria after passage through a gastrointestinal model." Microbial Ecology in Health and Disease (1998); 10: 141-147.

Miettinen M., Voupio-Varkila J., Virkila K. "Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria." Infection and Immunity (1996); 64: 5403-5405.

Molin, G. "Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to Lactobacillus plantarum 299v." Am. J. Clin. Nutr. (2001);73 (Iss. 2; Suppl. S): 380S-385S.

Naidu AS., Bidlack WR., Clemens RA., "Probotic Srectra of Lactic Acid Bacteria (LAB)." Reviews in Food Sci and Nutr (1999); 38(1): 13-126.

Nase L, Hatakka K, Savilahti E, and *et al.* "Effect of long term consumption of a probiotic bacterium, *Lacobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children." Caries Res (2001); 35: 412-420.

Nealson, K. H. & Hastings, J. W. "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." Microbiol Rev (1979); 43, 496–518.

Nousiainen, J. T.. and J. K. Seta¨ la¨ . "Feed for promoting the growth and intestinal function of animals." European Patent 0464 362 A1. (1992) Available at: http://www.european-patent-office.org. Accessed Oct. 2, 2012.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A. "A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity." J Microbiol Methods. (1995); 22(1): 95–108.

Parker R.B. Probiotics. the other half of theantibiotic story. Animal Nutr 1974; 29: 4-8

Patterson JA and Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poult. Sci. 2003; 82: 627-631.

Pollmann, D. S. Probiotics in pig diets. In: "Recent Advances in Animal Nutrition" (Ed. W. Haresign and D. J. A. Cole). Butterworth, London. (1986): 193-205.

Price, R.J. and Lee. J.S. " Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide produced by lactobacilli." J. Milk Food Technol. (1970)33: 13-18.

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

Ouwehand, A.C. and S. Vesterlund. "Antimicrobial components from lactic acid bacteria", pp. 375-395. *In* S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand, eds. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcell Dekker, Inc., New York. (2004).

Oyetayo V.O. and Oyetayo F.L. "Potential of Probiotics as Biotherapeutic agents targeting the innate immune system." African Journal of Biotechnology. (2005); 4(2): 123-127.

Reddy BS and Riverson A. "A inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary and river carcinogenesis induced by 2-amin-30-methylimidazo [4,5-f] quinoline, a food mutagen." Cancer Research (1993); 53: 3914-3918.

Reid G. "The scientific basis for probiotic strains of Lactobacillus. " Applied and Environmental Microbiology. (1999); 65(9): 3763-3766.

Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B. "Oral probiotics can resolve urogenital infections." FEMS Microbiol immunol (2001); 30: 49-52.

Reid G, Bruce AW, Taylor M. "Instillation of Lactobacillus and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections." Microecol Ther (1995); 23: 32-45.

Reid G, Cook RL, Bruce AW. "Examination of strains of lactobacilli for properties which may influence bacterial interference in the urinary tract." J Urol (1987); *138:* 330-335.

Reid G, Jass J, Sebulsky T, McCormick J. "Potential uses of probiotics in clinical practice." Clin Microbiol Rev (2003); 16(4): 658-672.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Reid G, Kim SO and Köhler GA. "Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms." FEMS Immunol Med Microbiol. (2006); 64(2): 149-157.

Reuter, G. "Present and future probiotics in Germany and in Center Europe." Biosci. Microflora. (1997)16: 43-51.

Rogers, L. A., and E. O. Whittier. "Limiting factors in the lactic fermentation." J. Bacteriol. (1928); 16:211-229.

Saarela M, Mogenensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandolm T. "Probiotic bacteria:safety,functional and technological properties." J of biotechnology (2000); 84: 197-215.

Salminen S and Wright A.V. "Lactic acid bacteria." New York : Marcel Dekker Inc, (1993).

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Rault, M-C., Cummings, JH., Franck, A., Gibson, GR., Isolauri, E., Moreau, M., Roberfroid, M., Rowland, I. "A functional food science and gastrointestinal physiology and function." British J. Nutr. (1998);80:1: S147-171.

Schiffrin E, Rochat F, Link-Amster H, , and *et al.* "Immunomudulation of blood cells following ingestion of lactic acid bacteria." (1996); 78: 491-497.

Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. N. "The genus Carnobacterium." In The Genera of Lactic Acid Bacteria, pp. 307–326. Edited by W. H. N. Holzapfel & B. J. B. Wood. London: Blackie. (1995).

Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, and *et al.* HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. Lancet 1997; 350(9077): 546-550.

Shehane, S.D., & Sizemore, R.K. "Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*." J applied microbiology, (2002) Vol.92, No.2, pp. 322-328,

Simpson W.J. and H. Taguchi. "The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*." In, B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel(eds).The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall, London. (1995); 125-172.

Soomro, A.H., T. Masud and Anwaar, K. "Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-A review.+ Pakistan J. Nutr. (2002) 1(1): 20-24.

Stiles M. E. and W. H Holzapfel. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." Int. Food Microbiol (1997) 36: 1-29.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Stiles, M. E. and Hastings, J. W. " Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation." Trends in Food Science and Technology (1991) 2: 247-251.

Succi M, Tremonte P, Raele A, *et al.* "Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano cheese." FEMS Microbiol Lett (2005) 244: 129-137.

Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. "Bacteriocins of Gram-positive bacteria." Bacteriol. Rev. (1976) 40: 722-756.

Tamblyn K.C. and Corner D.E. "Bactericidal activity of organic acids against Salmonella typhimurium attached to broiler chicken skin." J. Food Prot (1997) 60: 629-633.

Taranto, M.P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A.P. and Valdez, G.F. "Evidence for hypocholesterolemic effect of Lactobacillus reuteri in hypercholesterolemic mice." J Dairy Sci. (1998) 81: 2336–2340.

Teuber M. "The genus Lactococcuss." In B.J. B. Wood and W. H. Holzapfel. eds. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Glasgow: Chapman and Hall, (1995): 134-173.

Thanrada Narakaew., Komkhae Pilasombut., Nualphan Ngamyeesoon and Adisorn Swetwiwathana. "Preliminary characterization of Lactobacillus salivarius K7 for probiotic Properties" KKU Res J. (2010) 15(9) : 879-880.

Torriani S, Orsi C, Vescovo M. "Potential of *Lactobacillus casei*, culture permeate, and lactic acid to control microorganisms in ready-to-use vegetables." J. Food Prot (1997) 60: 1564-1567.

Vaughan, E.E., Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Satokari, R, Collins J K, Akkermans A D L and de Vos, W.M.. "Molecular approaches to study probiotic bacteria." Trends Food Sci. Technol. (1999) 10: 400–404.

Wallace, R.J., and Newbold, C.J. "Probiotics for ruminants." In: Probiotics, the scientific basis (Ed.: Fuller, R.). Chapman and Hall, London, (1992): 317-353.

FAO/WHO. "Guidelines for the evaluation of probiotics in food." London, Ontario, Canada, April 30 *and May* 1, (2002). ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf).

Yan T.R. and Lee C.S. Characterization of partially purified bacteriocin, fermencin B, from *Lactobacillus fermentum*. Biotechnol. Lett (1997) 19: 741-744.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Ziauddin K.S. Roa H.S. and Amla B.L. "In vitro study on the effect of lactic acid and sodium chloride on spoilage and pathogenic bacteria of meat." J. Food Sci Technol .(1993) 33: 255-258.

Zimmer, CJ., & Gibson, GR. "An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies." Int Dairy J (1998) 8: 473–9.

Zhong SS, Zhang ZS, Wang JD, and *et al.* "Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic Escherichia coli, enteropathogenic Escherichia coli and Clostridium difficile to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of Bifidobacterium adolescentis 1027." World J Gastroenterol. (2004); 11:1630-3.

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Culture Media)

ในการศึกษาแบคทีเรียสิ่งที่ขาดมิได้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีประโยชนในการใชเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษาในดานตางๆ ไดแก

1. การแยกและวินิจฉัยแบคทีเรีย
2. การทดสอบความปลอดเชื้อ (Sterility test)
3. การวิเคราะหน้ำและอาหาร
4. การควบคุมสภาวะแวดล้อม
5. การผลิตชีวภัณฑตาง ๆ เชน toxoid และวัคซีน เปนตน
6. การวิเคราะหยาปฏิชีวนะและวิตามิน

แบคทีเรียชนิดกอโรค (Pathogen) สวนมากสามารถเพาะเลี้ยงไดในหลอดทดลองได โดยใชอาหารที่มนุษยปรุงขึ้น (Artificial Media) ยกเวนแบคทีเรียที่เจริญยาก (Fastidious Bacteria)บางชนิดเทานั้นที่ไมสามารถเลี้ยงในหลอดทดลองได เชน Mycobacterium lapraeอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปตองประกอบดวยสารอาหารที่จำเปนไดแก แหลงของไนโตรเจน คารบอนเกลือแรและวิตามิน รวมทั้งน้ำ และGrowth factor ตาง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากนั้นความเปนกรด-ดางของอาหารตองเหมาะสมตอ Metabolism ของแบคทีเรียที่ตองการเพาะเลี้ยงดวย อีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นตองปราศจากเชื้อ (Sterilized) กอนที่จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียชนิดกอโรคเปนพวก heterotrophic microorganism ซึ่งมีความสารถในการสังเคราะหอาหารจำกัดจึงตองการอาหารซึงซับซอนขึ้น เชน complex nitrogen compound ดังนั้นจึงมักใชอาหารซึ่งเปนแหลงของโปรตีนในธรรมชาติ

(crude natural protein source) แตวาแบคทีเรียไมสามารถใชโปรตีนนี้ไดโดยตรงแตตองทำใหอยูในรูปซึ่งสามารถนำไปใชไดเสียกอน โดยการยอยโปรตีนเหลานี้ดวยกรด ดาง หรือ เอ็นไซมตางๆ โปรตีนซึ่งถูกยอยแลวนี้ (protein hydrolysates) โดยสวนใหญเรียกวา peptones ซึ่งเปนสารที่ละลายน้ำไดงายและประกอบดวย Polypeptidase ตลอดจน amino acids ในปริมาณตางๆ กันซึ่งสารเหลานี้แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ไดทันที แตอยางไรก็ตาม ปริมาณ Polypeptidase และamino acids ในpeptones แตละชนิดและจากแตละบริษัทจะไมเหมือนกัน ความตองการอาหารชนิดตางๆ ของพวกheterotrophic bacteria จะแตกตางกันไป ดังนั้นจึงตองมี peptones หลายชนิดเพื่อใช้งานตาง ๆ กันและมีสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อมากมาย ทั้งนี้เพื่อใหเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแตละชนิด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

หรือแตละกลุม ปจจุบันมีอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (dehydrated media) มากมายหลายชนิดซึ่งสามารถเก็บไวไดนานพอสมควรอีกทั้งยังสะดวกในการเตรียมอีกดวย

สวนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic nutrient Media)

1. Peptones : คือโปรตีนซึ่งถูกยอยแลว เปน Amino acid และ Simple Nitrogenous conpounds อาจโดยใชกรด ดาง หรือ เอ็นไซม คุณสมบัติของ peptones จะขึ้นอยูกับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใชและวิธีการยอยโปรตีน (ดวยกรด ดาง หรือเอ็นไซม) การยอยดวยกรดหรือดาง จะทำลายวิตามินและAmino acids บางสวนในโปรตีนไป ซึ่งผิดกับการย่อยดวยเอ็นไซม โปรตีนซึ่งใชในการผลิต Peptones มีหลายชนิด เชน Casein (โปรตีนในน้ำนม) Gelatin เนื้อ ถั่วเหลือง และ Yeast cells เปนตน Peptones เปนสวนประกอบหลักใหญของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียตองการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2. Infusion และ Extracts : เปนสารสกัดจากเซลลตางๆ ทั้งจากจุลชีพ (เชน Yeast Extract ซึ่งความเปนจริงถือวาเปน Peptone ชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช (เชน Malt Extract) และจากสัตว (เชน Beef Extract Brain- Heart infusion) เปนสิ่งที่ใชแทน Peptones กอนที่จะมีการคิดคนการผลิต Peptones ขึ้นมาใชงาน ซึ่งในปจจุบันก็ยังคงใชอยู ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และextract นี้เปนสารสกัดซึ่งมีสวนประกอบไมแนนอนและไมชัดเจน โดยเปนสารผสมระหวางโปรตีน Polypeptides, aminoacids คารโบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth factors หลายชนิด

3. Solidifying agents : เปนสารซึ่งใสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใหอาหารชนิดนั้นๆ แข็งตัวและกลายเปนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สารพวกนี้ไดแก วุน (Agar), Gelatin, Silica gel และ Polyacrylic gels แตที่นิยมใชมากที่สุดคือ วุน ซึ่งเปนPolysacharides ที่ไดจากการสกัดสาหรายสีแดง (Rhodophyceae) วุนที่ดีควรสะอาดปราศจากฝุนผงตางๆ ละลายที่ 80°C เมื่อเตรียมวุนความเขมขน 2% ในน้ำ (น้ำหนัก /ปริมาตร) แลวทิ้งใหแข็งตัว สิ่งที่ไดควรจะใสหรือหากขุนก็เพียงเล็กนอย สวน Solidifying Agents อื่นๆ นั้นไมคอยมีผูนิยม

4. Indicators : ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะมี Indicators 2 ประเภทคือ

4.1 Indicators เพื่อบอกสภาวะความเปนกรดดาง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งไดแก Phenol red, Bromothymol Blue, Bromocresol Purple, Neutral red, litmus, andrade's indicator เปนต้น

4.2 Indicators เพื่อบอกสภาวะ Oxidation- reduction potential (Eh) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Methylene Blue และ Resazurin เป็นต้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

5. เกลือ (Salt ; NaCl) ใชเติมลงไปเพื่อปรับปริมาณ Osmotic pressure ของอาหารเลี้ยงเชื้อใหเปน Isotonic สำหรับเซลลแบคทีเรีย หรือเพื่อปรับความเขมขนของเกลือของอาหารเลี้ยงเชื่อใหเปนไปตามที่แบคทีเรียตองการ

6. Dextrose ใช้เพื่อเปนแหลงของ Carbon และพลังงานแกแบคทีเรีย

7. น้ำ ใชเพื่อทำใหสวนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออยูในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใชไดสวนใหญจะใชน้ำกลั่น (Distilled water)

8. Selective agent : เปนสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใหแบคทีเรียบางชนิดเจริญได้เท่านั้น โดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะถูกยับยั้งไมใหเจริญ การใส selective agent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จะมีประโยชนในการแยกเชื้อซึ่งเปนตัวกอโรคออกจากเชื้อที่ไมกอโรค selective agents ที่ใชกันมีหลายชนิดไดแก สียอมบางชนิด เชน crystal violet และ brilliant green (ใชยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพวกแกรมบวก) sodium chloride (ใชยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Staphylococcus spp.* เนื่องจากไมสามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน Staphylococcus spp.), sodium azide, sodium citrate, sodium tellurite, sodium lauryl sulfate, sodium Selenite, iodine, phenylethanol และยาปฏิชีวนะตางๆ เปนตน นอกจากนั้นการปรับความเป็นกรดหรือดางของอาหารเลี้ยงเชื้อใหต่ำกวาปรกติ (เชน pH 5.6 ใน abouraud dextrose agar) หรือสูงกวาปรกติ (เชน pH 8.8-9.0 ใน alkaline peptone water สำหรับแยกเชื้อ Vibrio cholerae) ก็สามารถใชเปน Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

9. Reducing agent ; เปนสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชวยสงเสริมใหเกิดภาวะไรออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อไดดีขึ้น สารเหลานี้ ไดแก ascobic acid, sodium thioglycolate, sodium formaldehyde sulfoxylate, thiomalic acid, sodium hydrosulfite และcysteine เปนตน

10. เลือด ; ใชในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Enriched Media เลือดที่ใชโดยมากมี 4 ชนิด คือ

- เลือดแกะ ซึ่งเอา Fibrin ออกแลว (defibrinated sheep blood) ; เปนเลือดที่ดีที่สุดเพราะให้ hemolysis ไดถูกตองชัดเจนโดยเฉพาะ hemolysis ที่เกิดจาก *Streptococci spp.*
- เลือดกระตายซึ่งเอา Fibrin ออกแลว คุณภาพรองจากเลือดแกะ และให hemolysis ไดถูกตองเช่นกัน
- เลือดมาซึ่งเอา fibrin ออกแลว ใหhemolysis ไมถูกตองโดยเฉพาะจาก Streptococci แตมีประโยชนในการใชใสใน Mueller Hinton media เพื่อการทดสอบความไวของแบคทีเรียตอยาตานจุลชีพโดยใสในรูปของเลือดมาที่ทำใหเม็ดเลือดแดงแตก (lysed horse blood)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- เลือดคนซึ่งหมดอายุแลวจากคลังเลือด ; เปนเลือดที่ใชมากที่สุดเพราะหางาย ราคาถูก แตอาจมีผลเสียจาก citrate , antimicrobial agents และสารอื่นๆ ที่อยูในเลือด ซึ่งอาจทำใหแบคทีเรียบางชนิดไมสามารถเจริญไดหรือใหปฏิกิริยา hemolysis ที่ผิดจากความเปนจริง

2. ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 แบงตามลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบงไดเปน

1 อาหารแข็ง (Solid Media) คืออาหารที่มีการเติมวุน (Agar) 1.5 – 2 % ขึ้นไป

2 อาหารเหลว (Liquid Media or Broth) คืออาหารที่ไมมีการเติมวุนลงไป หรือหากมีจะนอยมาก คือ นอยกวา 0.1 %

3 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semisolid Media) คืออาหารที่มีการเติมวุนปริมาณนอยลงไป ประมาณ 0.5 % เพื่อประโยชนบางอยาง เชน ประโยชนในการทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test)

2.2 แบงตามคุณสมบัติของคุณคาทางอาหารและ Selective Agents ที่เติมลงไป แบงไดเปน

1. Chemical Defined Media เปนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทราบชนิดและปริมาณที่แนนอนของสารเคมีที่มีอยูในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไมเปนที่นิยมใชในงานทั่วไปนัก แตมักใชในงานวิจัยที่ตองการความละเอียดและแนนอนมากเปนพิเศษ

2. Plain MediMedia เปนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมาพอสมควร สามารถใชเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสวนมากได ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียกอโรคบางชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ ไดแก Nutrient Broth, Nutrient agar เปนตน

3. Enriched Media เปนอาหารที่ใชเฉพาะกับแบคทีเรียเพาะเลี้ยงยาก (Fastidious bacteria) เนื่องจากไมเจริญในอาหารธรรมดาเลยหรือเจริญยาก อาหารชนิดนี้ตองเติมสารอาหารพิเศษหรือ Growth Facter บางอยางลงไป เชน เลือด ซีรั่ม ไข น้ำจากชองทอง (Ascitic Fluid) หรือสารที่สกัดจากเนื้อเนื่องของสัตว เปนตน เพื่อเรงการเจริญเติบโตของเชื้อ เชน Blood Agar และ Chocolate Agar เปนตน

4. Enrichment Media เปนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใชชวยในการเจริญของแบคทีเรียชนิดหนึ่งชนิดใดโดยเฉพาะ (ซึ่งมักจะเปนแบคทีเรียที่กอใหเกิดโรค) ใหเจริญไดดีกวาแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ปะปนมาในตัวอยาง เชน Selenite broth, tetrathionate broth เปนตน

5. Selective Media เปนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใชเพื่อแยกจุลินทรียที่ตองการออกจาก จุลินทรียที่ไมตองการและปะปนอยู โดยการเติมสารเคมีบางอยาง ซึ่งเปนสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไมตองการ โดยไมมีผลเสียตอแบคทีเรียที่ตองการ เชน การเติมสี Crystal Violet Brilliant Green และเกลือน้ำดี(bile salt) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และไมยับยั้งการเจริญของ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

แบคทีเรียแกรมลบ หรือการเติมยาปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไมตองการ ตัวอยางของ Selective Media เชน Brilliant green agar, Salmonella – Shigella agar (SS Agar) Bismuth sulfite agar และ MacConkey agar เปนตน

6. Differential Media เปนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใชความแตกตางของเชื้อแตละชนิดโดยดูจากความแตกตางของลักษณะโคโลนีหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมี(Biochemical Reaction) เชน Blood agar media เปน อาหารวุนที่เติมเลือด ถาแบคทีเรียนั้นยอยสลายเม็ดเลือดแดงได (Hemolysis) จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย Lactose broth ใชแยก7 Differential และSelective media มีอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีคุณสมบัติเปนทั้ง Differential media และSelective Media คือ ยอมใหแบคทีเรียบางชนิดเจริญไดแตไมยอมใหแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เจริญ และในขณะเดียวกันก็ยังสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียที่อยูในนำดวย เชน Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งยอมใหแบคทีเรียพวก *Vibrio* เทานั้นที่เจริญไดและยังสามารถแยก *Vibrio* ชนิดที่ใช Sucrose และไมใชSucrose ออกจากกันไดโดยดูจากสีของโคโลนี หรือ Xylose lysine Dexoxycholate Agar (XLD) ที่ใชแยกแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถใชและไมใชแลคโตสออกจากกันได โดยถาแบคทีเรียใชแลคโตสได โคโลนีจะมีสีเหลือง ถาใชแลคโตสไมได โคโลนีจะมีสีชมพู และถาเปนแบคทีเรียบางชนิด เชน *Salmonella* จะมีลักษณะเฉพาะบน XLD คือ โคโลนีจะมีสีชมพูใสและมีจุดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด (H_2S) อยูตรงกลาง เปนตน

8. อาหารที่ใชวิเคราะห (Assay Media) เปนอาหารที่มีองคประกอบพิเศษเพื่อใชวิเคราะหหาปริมาณของวิตามิน กรดอะมิโนและสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใชในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใชยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย (Disinfectant) ดวย

9. อาหารที่ใชตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (Media for enumeration of bacteria) เปนอาหารที่ใชในการตรวจนับแบคทีเรียบางชนิด เชน จุลินทรียในน้ำหรือน้ำนม ซึ่งองคประกอบของอาหารจะเหมาะสมตอการเจริญของแบคทีเรียเหลานั้น ตัวอยางเชน Plate count agar และ Marine agar เปนตน

10. อาหารที่ใชศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย (Media for characterization of bacteria) ใชตรวจสอบคุณสมบัติในการเจริญของจุลินทรียในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งคุณสมบัติที่ทำใหเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physical and Biochemical test) เชน Triple sugar iron agar, Urease test medium, citrate agar, lysine decarboxylase test medium เปนตน

11. อาหารที่ใชเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย (Maintenance Media) ใชเพื่อเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียไวใหนานที่สุดโดยเชื้อยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองคประกอบบางอยางในอาหารเพื่อใหเชื้อมีการเจริญเติบโตนอยลงและปลดปลอยของเสียออกมานอยลง เชน ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

นอยลงเนื่องจากน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สรางกรดไดมากและทำให้เชื้อตายเร็ว ไมมีคารโบไฮเดรต หรือโปรตีน แตจะประกอบดวยเกลือแรตาง ๆ หลายชนิดเพื่อรักษาความเปนกรด–ด่าง ตลอดจน Oxidation Reduction Potential และความชื้นใหคงที่ เชน Stuart's transport medium, Cary – Blair transport medium เปนตน Transport Media นิยมใชในกรณีที่ไมสามารถนำสิ่งสงตรวจจากสัตวปวยมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อไดทันที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Preparation of the Culture Media)

ปจจุบันมีบริษัทที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (Dehydrated Media) ออกมาจำหนาย เชน BBL, Difco, Gibco และ Oxoid ทำใหสะดวกในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ถาตองการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Dehydrated Media ที่เปนผงหรือเกล็ด (Granules) ควรจะเตรียมตามคำแนะนำของบริษัทผูผลิตจะดีที่สุด ขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีดังนี้

3.1 ใชเครื่องแกว (Glassware) ที่สะอาด ผานการลางมาเปนอยางดีโดยไมใชสารซักฟอก (Detergent) หรือสารเคมีอื่น ๆ

3.2 ชั่งน้ำหนัก Dehydrated media ตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อแตละชนิด นำไปใสใน Flask หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น (Distilled Water) ลงไปตามปริมาณที่กำหนดไวในสูตร ควรใชน้ำกลั่นเนื่องจากเปนน้ำที่ปราศจากคลอรีน (Chlorine) สารเคมีและไอออนของโลหะหนักตาง ๆ (Heavy metal ions) ที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได

3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมในภาชนะที่มีปริมาตรมากกวาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตองการเตรียมประมาณ 2 เทา เพื่อความสะดวกในการผสมและปองกันฟองที่เกิดจากการตมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4 ทำให Dehydrated media ละลาย ถาเปน Dehydrated media ที่ผสมวุนมาดวยทำใหละลายไดโดยการนำไปตม และคนดวยแทงแกวตลอดเวลา หรืออาจใชวิธีวางไวบน Hot plate ที่เปนระบบแมเหล็ก (Magnetic stirrer system) โดยใสแทงแมเหล็กลงไปใน Flask ดวย แตถาเปน Dehydrated media ที่ไมผสมวุนลงไปอาจทำใหละลายไดดวยการคนเบา ๆ ก็เพียงพอ

3.5 หลังจากทำใหละลายเสร็จ นำไปนึ่งฆาเชื้อ (Sterilized) ใน Autoclave หรือ Pressure cooker ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด 15 นาที อยางไรก็ตามมีอาหารเลี้ยงเชื้อบางประเภทที่ไมสามารถทนความรอนสูงเชนนี้ได บริษัทผูผลิตอาจแนะนำใหนำไปฆาเชื้อที่อุณหภูมิ 118 °C หรือ 115 °C ที่เวลา 15 นาที หรือนานกวานี้เล็กนอย Selective Media บางชนิด เชน Brilliant green agar, TCBS และXLD สามารถฆาเชื้อไดโดยการนำไปตม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.6 หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จเรียบรอยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 – 56°C ใน Water bath ก่อนนำไปเทลง Plate หรือ Tube อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Agar จะแข็งตัวที่ 42°C อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร สามารถนำไปเทลง Plate ได้ประมาณ 70 – 100 Plates

3.7 สารบางชนิดที่จะต้องเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่สามารถทนความร้อนในการต้มหรือการ Autoclave ได้ ดังนั้นจะต้องเติมสารเหล่านั้นในขั้นตอนหลังจากนี้ โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50–56°C ก่อน แต่สารเหล่านี้จะต้องเป็นสารที่ปราศจากเชื้อ เช่น ถ้าเป็นเลือด ก็ต้องเป็นเลือดที่เก็บมาโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique)

3. 8 ตรวจสอบความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เย็นแล้ว (50 - 56 °C) อาจโดยการใช้ pH meter หรือ pH strips ถ้าความเป็นกรด –ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เป็นไปตามที่กำหนดในสูตร (ปกติจะกำหนดให้อยู่ในช่วง 6.8 – 7.2) ให้เติม 1-N หรือ 0.1 –N NaOH หรือ HCl ทีละหยดและปรับจนกว่าจะได้ pH ตามที่กำหนด

3.9 นำไปเทลงใน Plate หรือ Tube

3.10 หลังจากเทลง Plate หรือ Tube แล้วรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือ 37°C ประมาณ 2–3 ชั่วโมง ต้องแน่ใจว่าไม่มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝา Plate เพราะอาจทำให้เกิด Contamination ได้ หลังจากนั้นนำ Plate ที่ยังไม่ใช้ เก็บใส่ถุงพลาสติก มัดปากถุงให้เรียบร้อยแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C อาจนำไปทดสอบการปราศจากเชื้อโดยการนำไปบ่ม (Incubation) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 –14 ชั่วโมง

4. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Maintenance of Bacteria)

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มักมีการเก็บรักษาไว้เพื่อให้มีชีวิตอยู่นาน ๆ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา วิจัย การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธีได้แก่

4.1 การถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ (Subculturing Method) เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จะเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Maintenance media ระยะเวลาหนึ่ง แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อ ซึ่งอาจเก็บไว้ได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้ยังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโต การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เรื่อย ๆ นี้มีข้อเสียคือ อาจทำให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสายพันธุ์ได้ คือเกิดการกลายพันธุ์ หรือการผ่าเหล่า

4. 2 การปิดทับด้วยน้ำมัน คือ การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ขึ้นอยู่บนอาหารวุ้นเอียง (Agar slant Media) โดยการเทน้ำมันน้ำมัน เช่น ฟาราฟินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหนาประมาณครึ่งนิ้วทับลงไป สามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นปี

1) การทำให้แห้งและเย็นเยือกแข็ง (Lyophilization)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

คือ การทำให้เชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ (สวนใหญ่ใช Skim milk) แห้งโดยเร็วในสภาพที่เย็นจัดจนแข็ง (Freeze - dry) อุณหภูมิประมาณ – 60 ถึง –78 °C ในหลอดแก้วขนาดเล็ก และทำให้เกิดสภาพสูญญากาศภายในหลอด แล้วปิดปากหลอดโดยการลนไฟ วิธีการนี้สามารถเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้ได้นานมากโดยคุณสมบัติของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง แต่เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

2) การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำ คือการเก็บเชื้อไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ –196 °C โดยนำเชื้อที่ใส่ในสารละลายที่สามารถปกป้องเชื้อจากการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บด้วยวิธีนี้(จากผลึกน้ำแข็ง) เช่น กลีเซอรอล หรือ Dimethyl sulfoxide, DMSO แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว วิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานมาก ประมาณ 10 – 30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ และยังสามารถเก็บรักษาเชื้อที่ไม่สามารถทำการเก็บด้วยวิธี Lyophilization ได้ด้วยแต่เสียค่าใช้จ่ายมาก เนื่องจากต้องมีการเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะ ๆ

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

Peptone	10.0	g
Meat extract	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Glucose	20.0	g
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	g
Tween® 80	1.0	g
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g
Agar	15.0	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 L โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

5.2 bacteriocin screening medium (BSM)

Tryptone	10.0	g
Meat extract	2.0	g
Yeast extract	4.0	g

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Glucose	2.0	g
di-Potassium hydrogen phosphate	8.7	g
Potassium *di*-hydrogen phosphate	8.0	g
Tween® 80	1.0	g
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Magnesium sulfate	0.2	g
Manganese sulfate	0.05	g
Agar	15.0	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 L โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

5.3 blood agar

TSA	47.5	g
Agar	5.0	g

วิธีทำ

1. ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 L (ถ้าจะให้ดีต้องนำไปต้มก่อนให้ Agar ละลาย) ปิดจุกสำลี หุ้มกระดาษ แล้วรัดหนังยาง
2. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที
3. นำไปแกว่งกับน้ำให้อุ่นๆประมาณ 40 °C
4. ใส่ Human blood 5% หรือประมาณ 50 ml ด้วย aseptic technique ทุกขั้นตอน
5. เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงเท plate อย่าให้บางมากเกินไป หรือประมาณ 20 – 25 ml ต่อ plate

5.4 TSB + 0.6% yest extract + 1% agar

TSB	30.0	g
Yest extract	6.0	g
Agar	10.0	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 L โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

5.5 การเตรียม Suspending Medium

TSB	30.0	g

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Glycerol	200.0 ml
น้ำกลั่น	1000.0 ml

Mix final volume 20 % Glycerol in Trypticase Soy Broth

แบ่งใส่หลอด Cryotube หลอดละ 1-2 ml นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 10 นาที

6. สารเคมี

1. 0.85% NaCl

NaCl	0.85 g
น้ำกลั่น	100 ml

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

2. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7

เตรียมสารละลายต่างๆดังนี้

วิธีเตรียมสารละลาย 0.85% NaCl

NaCl	0.85 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีเตรียมสารละลาย M/15 KH_2PO_4

KH_2PHO_4	9.07 g
น้ำกลั่น	1000 ml

วิธีเตรียมสารละลาย M/15 Na_2HPO_4

Na_2HPO_4	9.46 g
น้ำกลั่น	1000 ml

วิธีเตรียม PBS pH 7 นำสารละลายที่เตรียมไว้ทั้งหมดมารวมกันตามปริมาตรดังนี้

0.85% NaCl	500 ml
KH_2PHO_4	410 ml
Na_2HPO_4	90 ml

จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดมารวมกัน นำไปปรับค่า pH ให้ได้ 7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก ข

ตารางสำหรับการวิเคราะห์แปลผล

ตารางภาคผนวกที่ 1 การแปลผลสำหรับการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion

Antibiotic agents	Disk Content (µg)	Zone Diameter (mm.)		
		R	I	S
Trimethoprim (SXT)	25	<15	16-18	>19
Tetracycline (TE)	30	< 14	15–18	> 19
Penicillin (P)	6	< 28	-	>29
Amoxicillin (AMC)	20/10	< 13	14-17	>18
Erythromycin (E)	15	<13	14-22	>23
Chloramphenicol (C)	30	<12	13-17	>18
Gentamicin (GM)	10	<12	13-14	>15

หมายเหตุ

ความไวต่อสารปฏิชีวนะ (Susceptibility): R (Resistant), I (Intermediate) และS (Susceptible)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางภาคผนวกที่ 2 Cell surface hydrophobicity

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสง						HPBI (%)		
		Xylene (A1)	Toluene (B1)	Octane (C1)	Xylene (A2)	Toluene (B2)	Octane (C2)	Xylene (A3)	Toluene (B3)	Octane (C3)
1	CI 5/2	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08	0.09	0	0	10
2	CI 5/3	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0	0	0
3	CI 5/4	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0.1	0	0	0
4	CI 5/5	0.09	0.1	0.1	0.09	0.1	0.1	0	0	0
5	CI 5/6	0.1	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08	0	0	0
6	CI 5/9	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0.1	0	0	0
7	PI 6/1	0.08	0.1	0.1	0.08	0.1	0.1	0	0	0
8	PI 7/4	0.08	0.09	0.09	0.05	0.09	0.06	37.5	0	33.33
9	O 4/2	0.09	0.09	0.1	0.07	0.09	0.08	22.22	0	20
10	O 5/4	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0	0	0
11	O 10/3	0.1	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08	0	0	0
12	T 1/1	0.1	0.09	0.08	0.1	0.09	0.07	0	0	12.5
13	T 2/2	0.08	0.1	0.1	0.02	0.1	0.08	75	0	20
14	T 4/1	0.08	0.08	0.1	0.05	0.04	0.06	37.5	50	40
15	T 4/3	0.08	0.08	0.1	0.08	0.08	0.07	0	0	30
16	T 8/1	0.1	0.1	0.1	0.07	0.06	0.07	30	40	30
17	F 11/5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0
18	MI4/9	0.09	0.07	0.10	0	0	0	100	100	100
19	MI3/3	0.10	0.08	0.11	0	0	0	100	100	100
20	CR1/2	0.10	0.10	0.10	0.01	0.08	0	90	20	100
21	CR1/4	0.10	0.11	0.10	0	0.11	0.08	100	0	20

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางภาคผนวก 2 (ต่อ) Cell surface hydrophobicity

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสง						HPBI (%)		
		Xylene (A1)	Toluene (B1)	Octane (C1)	Xylene (A2)	Toluene (B2)	Octane (C2)	Xylene (A3)	Toluene (B3)	Octane (C3)
22	CR5/1	0.10	0.11	0.08	0.15	0.14	0.12	0	0	0
23	CR6/3	0.10	0.12	0.11	0.16	0.13	0.12	0	0	0
24	CR6/10	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.09	12.5	12.5	0
25	CR 6/8	0.09	0.13	0.08	0.08	0.15	0.09	11.1	0	0
26	PA3/7	0.07	0.10	0.10	0.10	0.04	0.09	0	60	10
27	KF1/1	0.10	0.10	0.10	0.05	0.06	0.02	50	40	80
28	KF 1/2	0.10	0.10	0.10	0.03	0.04	0.02	70	60	80
29	KF1/3	0.10	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0	0	0
30	FI 4/4	0.10	0.12	0.10	0.08	0.12	0.08	20	0	20
31	FI 1/7	0.11	0.10	0.12	0.13	0.08	0.13	0	20	0
32	FI 1/5	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.04	12.5	0	50
33	FI 4/3	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	10	10	0
34	FB 5/1	0.10	0.10	0.08	0.10	0.11	0.10	0	0	0
35	FB 5/2	0.08	0.09	0.09	0.11	0.10	0.10	0	0	0
36	FB 5/5	0.09	0.10	0.07	0.09	0.09	0.09	0	0	0
37	SS 1/2	0.09	0.12	0.11	0.13	0.14	0.12	0	0	0
38	MM 2/2	0.10	0.10	0.08	0.11	0.11	0.12	0	0	0
39	MM 2/3	0.08	0.11	0.09	0.11	0.11	0.12	0	0	0
40	MM 3/7	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	11	11	22
41	MM 3/9	0.09	0.08	0.10	0.09	0.09	0.10	0	0	0
42	FSh 2/2	0.10	0.08	0.10	0.12	0.10	0.11	0	0	0

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางภาคผนวก 2 (ต่อ) Cell surface hydrophobicity

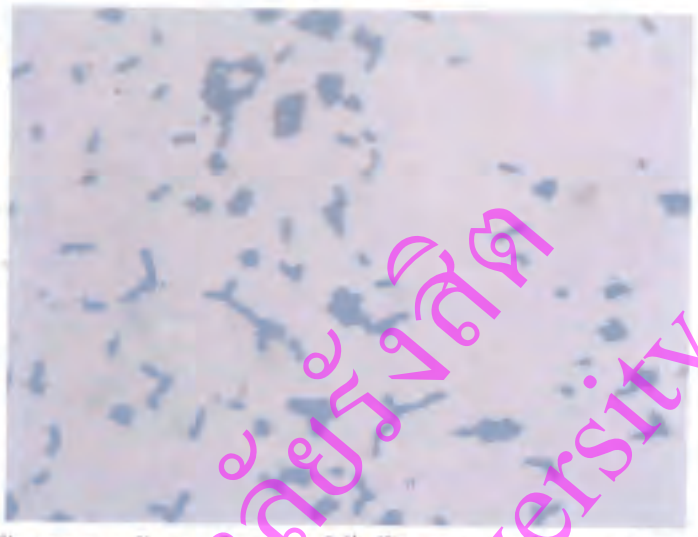
ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสง						HPBI (%)		
		Xylene (A1)	Toluene (B1)	Octane (C1)	Xylene (A2)	Toluene (B2)	Octane (C2)	Xylene (A3)	Toluene (B3)	Octane (C3)
43	FSh 2/3	0.09	0.12	0.12	0.11	0.14	0.13	0	0	0
44	FSh 3/1	0.10	0.12	0.11	0.14	0.13	0.13	0	0	0
45	FF 4/4	0.10	0.14	0.12	0.16	0.16	0.17	0	0	0
46	FF 4/6	0.10	0.11	0.13	0.13	0.16	0.13	0	0	0
47	FF 4/7	0.10	0.12	0.14	0.15	0.14	0.15	0	0	0
48	FF 4/9	0.09	0.12	0.11	0.13	0.12	0.12	0	0	0

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

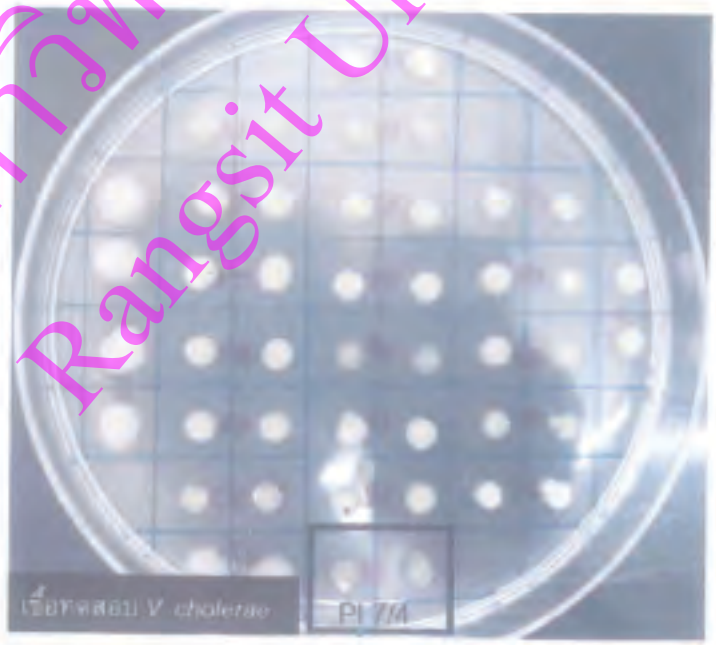
ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

ตัวอย่างลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียกรดแลกติก



รูป ค1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย



รูป ค2 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ

ด้วยวิธี direct agar spot method

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูป ค.3 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของ ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50CHL

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า	☐ นาย ☑ นาง ☐ นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ. ☐ รศ. ☐ ผศ. ☐ อื่นๆ _____ดร._____
ชื่อผู้วิจัย	พรรณนภา
นามสกุลผู้วิจัย	เภาทอง
ชื่อภาษาอังกฤษ	Pannapa
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Powthong
ที่อยู่(บ้าน)	84/27 หมู่ 5 ตำบล บางพูน อำเภอ เมือง จังหวัด ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์(บ้าน)	12000
โทรศัพท์(บ้าน)	037-314527
แฟกซ์ (บ้าน)	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	52/347 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต หมู่บ้านเมืองเอก ถนนพหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง จ. ปทุมธานี
จังหวัด(ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์(ที่ทำงาน)	0-2997-2222 ต่อ 1434
แฟกซ์(ที่ทำงาน)	0-2997-2200 ต่อ 5577
E-Mail Address :	pannapa_pt@yahoo.com

ปริญญาตรี

สาขา	คณะเทคนิคการแพทย์
ปีที่จบ	2544
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล
ประเทศ	ไทย

ปริญญาเอก

สาขา	เวชศาสตร์เขตร้อน
ปีที่จบ	2549
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล
ประเทศ	ไทย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

1. Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, Parasitology International, Vol. 55 , 107-112, 2006.

2. Population genetic structure of Plasmodium falciparum in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis, Malar J. 2008 Oct 21; 7:212.

3. Evaluation of endophytic fungi extract for their antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. Int J Pharm Biomed Res 2012, 3(2), 132-136.

4. Early adhesion molecule induction by cytoadherence of malaria-infected red blood cells and comodulation of immune cells: the roles of parasite adhesion and time course, preparing for submit.

5. Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers., J Agri Sci Tech. Vol. 15, Supplementary issue, December 2013.

6. Antioxidant and Antimicrobial activities of Endophytic Fungi isolated from Sesbania grandiflora (L.) Pers. , preparing for submit.

7. Antibacterial activity of Probiotic bacteria isolated from poultry & bovine intestine on gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, preparing for submit.

8. Antibacterial activity of Probiotic bacteria isolated from Thai treditional fermented food on gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, preparing for submit.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Oral Presentation on "Early induction of adhesion molecule in endothelial cells by *P. falciparum* -infected red blood cells (PRBC) with the co-stimulation of immunocompetent cells" Joint International Tropical Medicine Meeting 2005, Bangkok, 30 November – 2 December 2005.

2. Oral Presentation on "Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes" RGJ Seminar Series XLI , Trends and research in Parasitology, Bangkok, 2 Feb 2006.

3. Oral Presentation on "Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis" Joint International Tropical Medicine Meeting 2007, Bangkok, 29-30 November 2007.

4. Poster Presentation on "การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน" (Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) RSU conference 2010

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Poster Presentation on "Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes" Molecular Parasitology Meeting 2006, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA , 10-14 September 2006.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. Oral Presentation on "Microsatellite DNA polymorphisms flanking pfcrt of *Plasmodium falciparum* suggested different modes of evolution of chloroquine resistance in Thailand and Vietnam" 48 th Annual meeting of Japanese society of tropical medicine, Oeta prefecture, Japan, 12-13 October 2007.

3. Oral Presentation on "Microsatellite DNA analyses revealed different genetic population structures of Plasmodium falciparum isolates from patients with different clinical outcomes – A study in the Thai-Myanmar border region" 77th Annual Meeting of Japanese Society of Parasitologists (JSP) 2008, Nagasaki prefecture, 2-4 April 2008.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล(โปรดระบุรางวัลที่ได้รับด้วย)

1.การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน (Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) ได้รับรางวัลการเสนอผลงานวิจัย ประเภทโปสเตอร์ดีเด่น ประจำปี 2553 ที่ RSU conference 2010

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

จุลชีววิทยา, จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก, โลหิตวิทยา, ปรสิตวิทยา, และอณูชีววิทยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University