บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ มีรูปร่างกลม หรือเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson, 2004) จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ในการเจริญเติบโต ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน (Frazier and Westhoff, 1979) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน (เสาวนีย์, 2547) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ส่วนช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58–6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH < 5 อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ (Salminen and Wright, 1993)

2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก

Orla-Jensen (1919) เป็นผู้ริเริ่มการจัดจำแนก (classification) ของแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างเป็นระบบ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และการจัดเรียงตัวของกรดแลคติกเป็นชนิด D, L หรือทั้งสองชนิด ทำให้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 7 สกุล คือ *Betabacterium, Thermobacterium, Streptobacterium, Streptococcus, Betacoccus, Microbacterium* และ *Tetracoccus*

ปัจจุบันนอกจากลักษณะทางฟีโนไทป์แล้ว ได้มีวิธีการตรวจสอบโมเลกุลขนาดใหญ่ต่างๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิกซึ่งใช้เพื่อบอกความแตกต่างระดับสปีชีส์ (species) และสับสปีชีส์ (subspecies) โดยเทคนิคการตรวจความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) (Johnson, 1984) การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA ในไรโบโซม (rRNA) และในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์ร่วมด้วย โดยนำเทคนิค PCR มาใช้ศึกษาลำดับ

นิวคลีโอไทด์ (Axelsson, 2004) เช่น การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และ 23S rRNA ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับเบสนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) โดยตรง

การจัดจำแนกในระดับสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การจัดเรียงตัวของเซลล์ การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) และชนิดของกรดแลคติก ซึ่งสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 12 สกุล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่างๆ

ลักษณะการเจริญ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
	Carnobacterium	*Lactobacillus*	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Lactococcus Vagococcus*	*Leuconostoc Oenococcus*	*Pediococcus*	*Streptococcus*	*Tetragenococcus*	*Weissella*[a]
รูปร่างสี่เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส[b]	-[c]	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์	ND[d]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลคติก[e]	L	D, L, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[f]	L	L	D, DL[f]

หมายเหตุ + ผลการทดสอบเป็นบวก; - ผลการทดสอบเป็นลบ; ± แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์; ND ไม่มีข้อมูล

[a] *Weissela* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน

[b] - homofermentative, + heterofermentative

[c] อาจผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณน้อยขึ้นกับอาหารเพาะเชื้อ

[d] ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์

[e] ชนิดของกรดแลคติกจากการหมักกลูโคส

[f] ชนิดของกรดแลคติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

ที่มา: Axelsson (2004); Collins และคณะ (1993); Dicks และคณะ (1995)

2.3 การจำแนกสกุลแบคทีเรียกรดแลคติก

2.3.1 *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เนื่องจากมีความแตกต่างในอัตราส่วนของเบสดีเอนเอ (G+C content) ภายในสกุลถึง 32-53 โมลเปอร์เซนต์ จึงทำให้มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมี และสรีระ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน หรือทรงรี (coccobacilli) ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Hammes and Vogel, 1995) ที่พบได้บ่อย แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแบ่งกลุ่มของจีนัส *Lactobacillus*

คุณสมบัติของ *Lactobacillus*	กลุ่ม A	กลุ่ม B	กลุ่ม C
การหมักเพนโทส	-	+	+
สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	-	+	+
สร้าง FDP aldolase [a]	+	+	-
สร้าง phosphoketolase	-	+	+
ตัวอย่างเชื้อ	*L. acidophilus*	*L. casei*	*L. brevis*
	L. delbruickii	*L. curvatui*	*L. bunchneri*
	L. helvticus	*L. plantarum*	*L. fermentum*
	L. salivarius	*L. sake*	*L. ruteri*

หมายเหตุ + ให้ผลการทดลองเป็นบวก - ให้ผลการทดลองเป็นลบ

[a] หมายถึง fructose 1,6 diphosphate-aldolase

ที่มา: Axelsson (2004)

กลุ่ม A Obligately homofermentative lactobaciili แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เป็นกรดแลกติก (มากกว่า 85 เปอร์เซนต์) เกิดขึ้นโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล pentose และ gluconate ได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) ประกอบด้วย 17 สปีชีส์

กลุ่ม B Facultatively heterofermentative lactobaciili แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose ได้เป็นกรดแลกติก โดยผ่านวิถี EMP และสามารถหมักน้ำตาล pentose และ gluconate เป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติกได้ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

กลุ่ม C Obligately heterofermentative lactobaciili แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose และ pentose ผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลสได้เป็นกรดแลกติก กรดอะซิติก เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

2.3.2 *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส (homofermentative) ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ มีหลายสปีชีส์ที่เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มี mol % G+C อยู่ระหว่าง 34-46 เปอร์เซนต์ (Hardie and Whiley, 1995)

2.3.3 *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ยกเว้นบางสายพันธุ์ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis* เดิมจัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* กลุ่ม N แยกได้จากอุจจาระของไก่ และ *V. salmoninarum* แยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stlies and Holzapfel, 1997)

2.3.4 *Pediococcus* มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-0.14 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางในระนาบเดียวกัน โดยการแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางตั้งฉากของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น สี่เซลล์ติดกัน (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici, P. Domonosus, P. Dextrinicus, P. Inopinatus, P. Pavurus, P. Pentosaceus* มี mol % G-C อยู่ระหว่าง 34-44 เปอร์เซนต์ (Simson and Taguchi, 1995)

2.3.5 *Tetragenococcus* แบคทีเรียจีนัสนี้แยกตัวออกมาจากจีนัส *Pediococcus* สปีชีส์เดิมคือ *Ped. halophilus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* แต่มีลักษณะพิเศษคือสามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ และมีลำดับเบสบนยีน 16S rDNA ใกล้เคียงกับจีนัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าจีนัสเดิม (Stlies and Holzapfel, 1997)

2.3.6 *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากมีพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการใช้แลกโทส เคซีน และซิเทรตในนม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *hordniae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* และ *L. piscium* มี mol % G+C อยู่ระหว่าง 34-43 เปอร์เซนต์ (Teuber, 1995)

2.3.7 *Aerococcus* แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มนี้มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* แต่มีลักษณะที่แตกต่างคือเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (pH 9) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* สปีชีส์เดิมคือ *P. homari* และ *P. urinar-equi* ตามลำดับ โดย *A. viridans* เป็นสาเหตุทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stlies and Holzapfel, 1997)

2.3.8 *Leuconostoc* แบคทีเรียในในจีนัสนี้มีความสัมพันธ์กับจีนัส *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ในแง่สรีระวิทยา ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นกับอาหารเพาะเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์จะยืดออกคล้าย *Lactobacillus* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) เอธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative การเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lc. actis*, *Lc. pseudomesenteriodes*, *Lc. citreum*, *Lc. Argentinum* และ *Lc. fallax* เป็นต้น มี mol % G+C อยู่ระหว่าง 37-40 เปอร์เซนต์ (Dellaglio et al., 1995)

2.3.9 *Enterococcus* เซลล์มีรูปร่างไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการอาหารที่ซับซ้อนสำหรับการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสปีชีส์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudo-catalase) และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* และ *E. cecorum* (Devriese and Pot, 1995)

2.3.10 *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนกรด และผลิตเอธานอลในปริมาณสูง และจากข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ โดยการศึกษา DNA hybridization และลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าแตกต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio et al., 1995)

2.3.11 *Weissella* รูปร่างของเซลล์เป็นท่อนหรือกลมคล้ายกับ *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* แต่มีลักษณะที่แตกต่างคือ ขาดกรดอะมิโนบางชนิดที่ผนังเซลล์ ได้แก่ กรดแอสปาติก และกรดไดอะมิโนพิมิลิก ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ เดิมจัดอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ได้แก่ *Weissella paramesenteroides (Lc. paramesenteroides)*, *W. confusus* (*Lactobacillus confusus*), *W. halotolerans* (*L. halotolerans*), *W. kandleri* (*L.* kandleri), *W. minor* (*L. minor*), *W. viridescens* (*L. viridescens*), และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกหมักคือ *W.hellenica* (Stlies and Holzapfel, 1997) และ *W. thailandensis* sp. Nov. (Tanasupawat et al., 2000)

2.3.12 *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดสั้นถึงปานกลาง หรือเป็นท่อนเรียว(slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดียวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) อะซิเตท เอธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์คือ *Carnobacterium divergens, C. piscicola, C. gallinarum, C. mobile, C. funditum* และ *C. alterfunditum* มี mol % G+C อยู่ระหว่าง 31.6-37.2 เปอร์เซนต์ (Stlies and Holzapfel, 1997)

2.4 กระบวนการหมักกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอาหารพิเศษ หรืออาหารเฉพาะในการเจริญเติบโต (fastidious microorganism) มีความต้องการสารอาหารต่าง ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต (Salminen and Wright, 1993) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภท pentose เช่น arabinose, ribose และ xylose เป็นต้น และ hexose เช่น fructose และ mannose disaccharide เช่น maltose trisaccharide เช่น maltotriose polymer เช่น แป้ง นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น raffinose และ fructooligosaccharide เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่มีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้

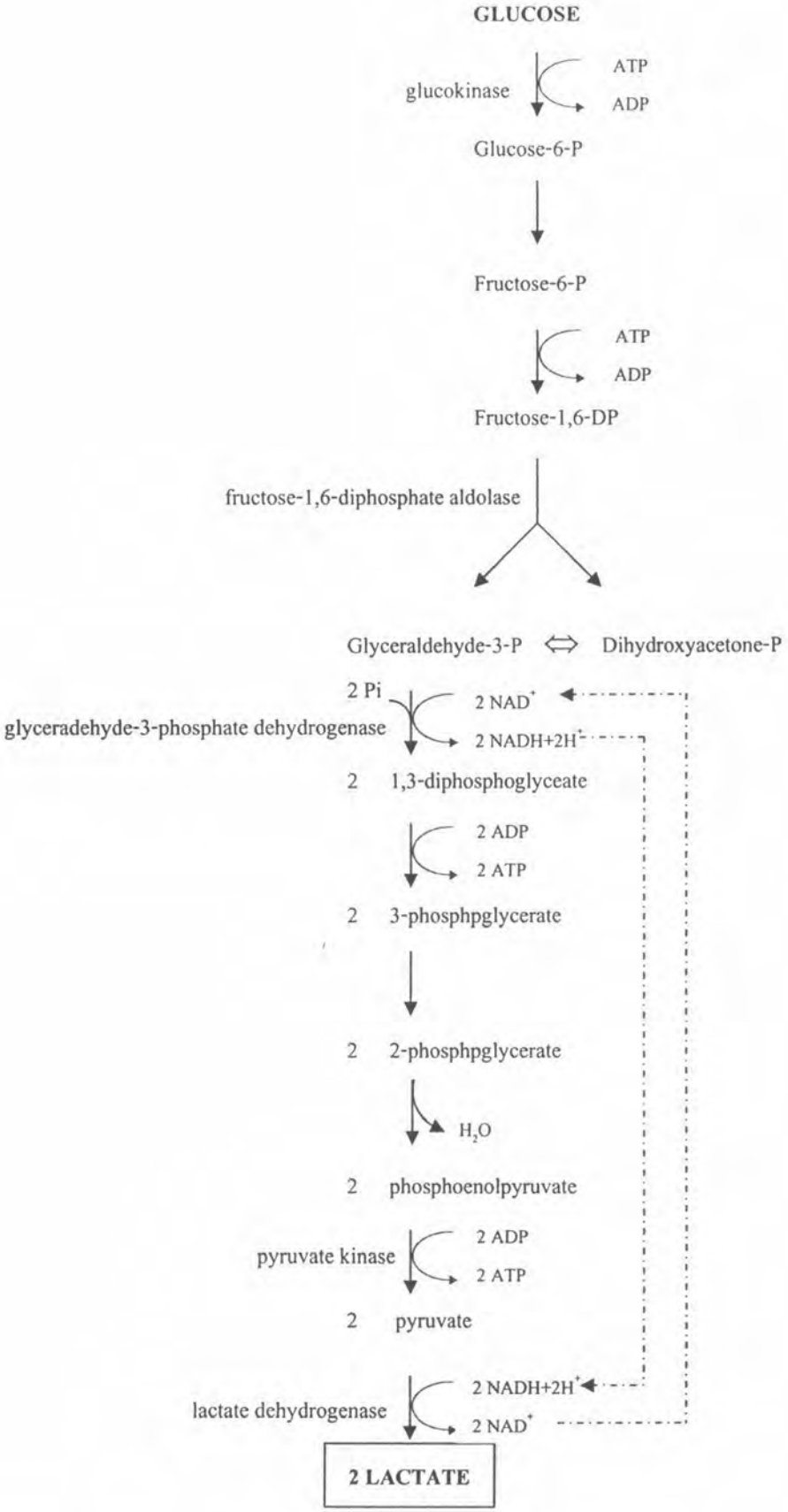
แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการหมักแตกต่างกัน ซึ่งผลจากการหมักสามารถแบ่งรูปแบบกระบวนการหมักได้ 2 แบบ คือ

2.4.1 Homofermentation

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการหมักแบบนี้ เรียกว่ากลุ่ม Homofermentative Lactic Acid Bacteria เป็นกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาลผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas Pathway (EMP) ในการหมัก แสดงดังภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ กลไกการเกิดกรดแลคติกคือ การเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) โดยเอนไซม์ dehydrogenase ด้วยวิถี glycolysis แล้วจึงเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลคติก จากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกจะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Axelsson, 2004; Cooper, 2000)

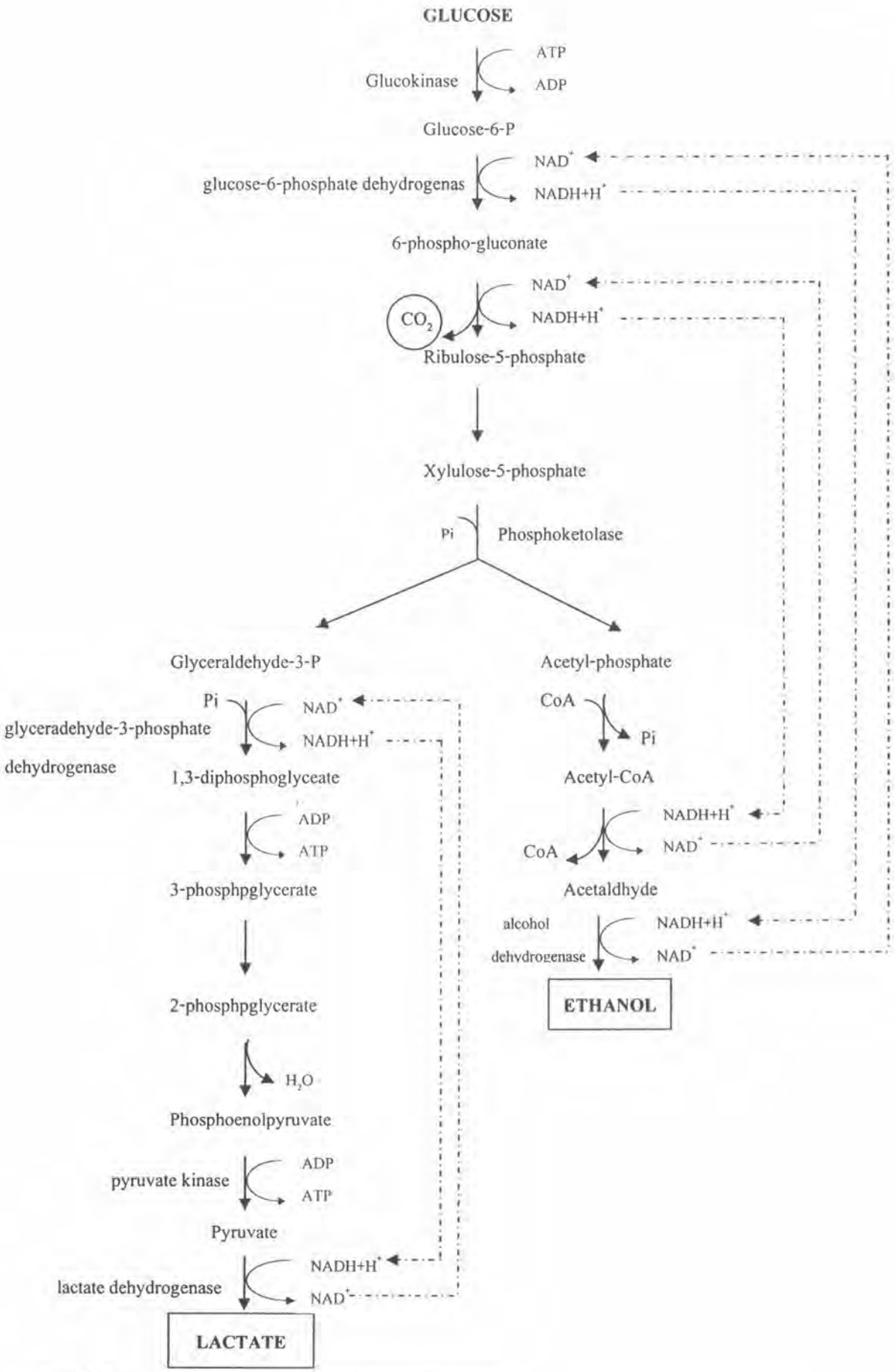
2.4.2 Heterofermentation

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการหมักแบบนี้ เรียกว่ากลุ่ม Heterofermentative Lactic Acid Bacteria เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติกได้เพียง 50 เปอร์เซนต์เท่านั้น โดยใช้น้ำตาลผ่านวิถี 6-phosphogluconate/phosphoketolase แสดงดังภาพที่ 2 จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดแอซิติก กรดฟอร์มิก เอธานอล แอซิเทต กลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Axelsson, 2004)



ภาพที่ 1 กระบวนการหมักแบบ Homofermentation

ที่มา: Axelsson (2004); Cooper (2000)



ภาพที่ 2 กระบวนการหมักแบบ Heterofermentation

ที่มา: Axelsson (2004); Cooper (2000)

2.5 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

2.5.1 กรดแลคติก (Lactic acid)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติก ทำให้ pH ของอาหารลดลง มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Torriani และคณะ (1997) ซึ่งมีการทดสอบกรดแลคติกที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในผักสลัด พบว่า ถ้าเติมกรดแลคติกร้อยละ 1 ลงไปจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ แต่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมดและ faecal coliform ได้เพียงบางส่วน และเมื่อเติมกรดแลคติกร้อยละ 0.5 ลงไป จะไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในผัก (อรวินท์, 2532)

2.5.2 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน เป็นสายเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็ก ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าว แต่ไม่ทำลายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน (พงษ์เทพ, 2546) ผลิตจากแบคทีเรีย เช่น *L. fermentum*, *L. heveticus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* (อรวินท์, 2532)

แบคเทอริโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus* ที่เรียกว่า nisin มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุด จากการรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการสร้างแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *L. acidophilus* มักมีการสร้าง acidophilin และ lactocidin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินยับยั้ง *S. aureus* แบคทีเรียแกรมบวก enteropathogen และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (Wood and Hodge, 1985) *L. salivarius* subsp. *salicinius* T140 สร้างแบคเทอริโอซินคือ salivacin 140 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus*, *Y. enterocolitica* และ *Ls. monocytogenes* (Arihara et al., 1998) *L. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 สร้างแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถทนต่อความร้อน และสามารถฆ่าจุลชีพก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ เช่น *Neisseria gonorrhoeae* (Ocana, 1999)

2.5.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิสม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เนื่องจาก *Lactobacillus* ไม่มีเอนไซม์ catalase ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย H_2O_2 นอกจากนี้ H_2O_2 สามารถทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนตมี lactoperoxidase เป็นตัวเร่งได้ผลิตผลที่ยับยั้งจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร (อรวินท์, 2532) Gilliland และ Speck (1989) พบว่า H_2O_2 ที่สร้างจาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

2.5.4 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิสมของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย ไดอะซิทิลที่มีความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรีย ส่วนที่ความเข้มข้น 300 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 µg/ml (อรวินท์, 2532)

2.5.5 รูทีริน (Reuterin)

รูทีรินมีชื่อทางเคมีว่า 3-hydroxypropanol ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่ pH ปานกลาง สร้างโดย *L. reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ เมื่ออยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน ส่วนใหญ่จะถูกสร้างในช่วง stationary phase ของการเจริญเติบโตโดยใช้พลังงานที่ได้จากการรีดิวส์กลูโคส (Axelsson et al., 1998) รูทีรินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp. และ *Clostridium* sp. (อรวินท์, 2532)

2.6 ความหมายของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotic) มาจากภาษากรีก แปลว่า "เพื่อชีวิต" ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell (1965) เพื่ออธิบายถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายขอบเขตและประเภทของโปรไบโอติกเพิ่มเติมไว้ดังนี้

Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก คือกลุ่มของจุลินทรีย์หรือสสารซึ่งสามารถปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ในความหมายนี้ได้รวมถึงจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในทางเดินอาหาร และ antibiotics ไว้ด้วย

Fuller (1989) ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก คืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต คำจำกัดความใหม่ที่ปรับปรุงขึ้นมานี้ เน้นความสำคัญของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตว่า เป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพและยังช่วยขจัดความสับสนที่เกิดจากการใช้คำว่าสสารอีกด้วย (Stavic and Kornegay, 1995)

นอกจากนี้ยังมีการให้ความหมายของโปรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดจำเพาะที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (โดยเฉพาะ *Lactobacillus*) แล้วเสริมในอาหารสัตว์ มีผลทำให้มีการเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อโทษ (Crawford, 1979; Reddy, 1984)

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา หรือ FDA (The United States Food and Drug Administration) ได้เปลี่ยนให้ใช้คำว่า DFM (Direct-Feed Microbial) แทนคำว่า Probiotic และได้ให้ความหมายว่า เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (Stavic and Kornegay, 1995) นอกจากนี้ FDA และ AAFCO (The Association of American Feed Control Official) ได้จัดจุลินทรีย์ DFM เป็น Generally recognized as safe (GRAS) ingredients ซึ่งเป็นสารที่เติมลงในอาหารมนุษย์และสัตว์ ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกร และนักพิษวิทยาแล้ว (Pollman, 1986)

2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

การใช้สารเสริมชีวนะ หรือโปรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์หลายด้าน แต่การใช้โปรไบโอติกต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยมีระดับการใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ และเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์สำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า $1x10^5$ cfu (colony forming unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ใช้ให้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อขาย ตลอดจนอัตราส่วน หรือปริมาณที่ให้ใช้หรือห้ามไม่ให้ใช้วัตถุนั้นเกินกำหนด พ.ศ. 2539 ซึ่งออกตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ได้แก่

2.7.1 แบคทีเรีย

B. coagulan, B. lentus, B. lichenniformis, B. pumilus, B. subtilis (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารปฏิชีวนะ), *B.subtilis strain* BN, *B. toyoi, Bacteroides amylophilus, Bacteroides ruminicola, Bacteroides suis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium thermophilus, L. bulgaricus, L. cellobiosus, L. culatus, L. delbruckii, L. fermentum, L. helveticus, L. lactis, L. plantarum, L. reuteri, Lc. mesenteroides, P. acidilactici, P. cerevisiae, P. pentosaceus, Propionibacterium schemanii, L. cremoris, L. lactis, L. diacetylactis, E. faecium, Streptococcus faecium cernelle 68, S. intermidius* และ *S. thermophilus.*

2.7.2 เชื้อราและยีสต์

Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Candida pintolepssi, และ *Saccharomyces cerevisiae*

2.8 คุณสมบัติโปรไบโอติก

2.8.1 สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 20-60 องศาเซลเซียส (เกรียงศักดิ์, 2535) และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง

2.8.2 สามารถสร้างกรดแลคติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อย และการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น(กิจการ, 2541) และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์, 2533)

2.8.3 สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง และวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ (Fuller, 1993)

2.8.4 สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β -galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่าง ๆ ดีขึ้น (เกรียงศักดิ์, 2535; อุทัย, 2535)

2.8.5 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogen peroxide และ bacteriocin เป็นต้น (เกรียงศักดิ์, 2535; Fuller, 1993) สอดคล้องกับ Arihara และคณะ (1998) พบว่า *Lactobacillus gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้มากในทางเดินอาหารของคน และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* รวมถึงกดการสร้าง enterotoxin ในระหว่างการหมักไส้กรอกได้ การหมักกรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

2.8.6 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula et al., 1998) เช่น *L. gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara et al., 1998) *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อ pH ต่ำดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit et al., 1998) และ *L. sake* (RM 10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่ pH 3 (Erkkila and Petaja, 2000)

ตารางที่ 3 ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารไก่

ส่วนระบบทางเดินอาหาร	pH
Crop	4.00 – 6.30
Proventiculus	3.17 – 4.80
Gizzard	2.50 – 4.74
Duodenum	5.70 – 6.00
Jejunum	5.80 – 5.90
Ileum	6.30 – 6.40
Rectum or colon	6.30 – 6.40
Ceca	5.70 – 8.40
Cloaca	5.40 – 8.40

ที่มา: Sturkie (1976)

จากค่า pH ของระบบทางเดินอาหารไก่ (ตารางที่ 3) จะเห็นว่าตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นอยู่ในสภาพเป็นกรด (3.17-6.4) ลำไส้เล็กส่วนปลายเกือบจะเป็นกลาง จะมีช่วงลำไส้ใหญ่ตรงไส้ติ่ง (ceca) และกระพุ้งก้น (cloaca) ที่จะมี pH เป็นกรดจนถึงด่าง (5.4-8.4) เมื่อเปรียบเทียบไก่กับมนุษย์ และสัตว์จำพวกหมูและวัวแล้ว ทางเดินอาหารของไก่จะสั้นกว่า ดังนั้นระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารก็สั้นด้วย ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที (Jin et al., 1998) ดังนั้นโปรไบโอติคสำหรับไก่ ควรจะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับค่า pH ของระบบทางเดินอาหาร หรือใช้เทคนิคการเคลือบ เพื่อให้คงทนและแตกตัวในลำไส้เล็กส่วนปลาย เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการทำงานได้ดี

2.8.7 สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย เช่น ยา หรือแร่ธาตุบางตัว (Kontula et al., 1998) จากรายงานของ Shirota (1962) กล่าวว่า *Lactobacillus* ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูง ได้แก่ *L. bulgaricus, L. fermemtum, L. casei, L. acidophilus* และ *L. casei* shirota ทนได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ Arihara และคณะ (1998) ศึกษาการทนเกลือน้ำดีของเชื้อ *L. gasseri* บน MRS agar ที่มี pH 5, 6, 7 แล้วเติมเกลือน้ำดีชนิดผงเข้มข้น 0 -200 ppm พบว่า *L. gasseri* เจริญได้มากที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 125, 250 และ 500 ppm *L. acidophilus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *L. acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ด้วย (Brennan et al., 1993) และ *L. sake* (RM 10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.30 (Erkkila and Petaja, 2000)

การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในระหว่างการเดินทางเข้าไปในทางเดินอาหาร นอกจากจะขึ้นอยู่กับความเป็นกรดเป็นด่างแล้ว น้ำดีก็เป็นปัจจัยที่ควบคุมจำนวนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้น แบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก จำเป็นต้องมีความทนทานต่อน้ำดี ความเข้มข้นของน้ำดีที่สูงเพียงพอสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทนทานต่อน้ำดี ซึ่งกำหนดโดย Gilliland และคณะ (1984) เฉลี่ย 0.3 เปอร์เซนต์ และมีรายงานการจำแนกความทนทานต่อน้ำดีของแบคทีเรียโดยอาศัย delay of growth (d) เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Chateau et al., 1994) ดังนี้

กลุ่ม I	$d \leq 15$ min	จัดเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อน้ำดี
กลุ่ม II	$15 \text{ min} < d \leq 40$ min	จัดเป็นสายพันธุ์ที่ทนทานต่อน้ำดี
กลุ่ม III	$40 \text{ min} < d \leq 60$ min	จัดเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อน้ำดีต่ำ
กลุ่ม IV	$d \geq 60$ min	จัดเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อน้ำดี

ที่ความเข้มข้นของน้ำดีระดับเดียวกันนี้ (0.3 เปอร์เซนต์) Jin และคณะ (1998) ได้ทดลองพบว่า *Lactobacillus* 7 สายพันธุ์ จัดเป็นกลุ่มที่ต้านทานต่อน้ำดี ($d \leq 15$ min) และมี 5 สายพันธุ์จัดที่สามารถทนต่อน้ำดีได้ ($15 \text{ min} < d \leq 40$ min)

ได้มีงานวิจัย *Lactococcus lactis* subspp. *lactis* NIA527 สายพันธุ์ที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ enterocyte-like Caco-2 พบว่า สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่ประกอบด้วย oxgall 0.5-0.9 เปอร์เซนต์ (Kimoto et al., 1999) *Lactobacillus curvarus* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะ pH 6.0 ที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซนต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยที่ปริมาณของแบคทีเรียลดลงประมาณ 1 log cycle เมื่อบ่มเชื้อทดสอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Erkkila and Petaja, 2000)

2.8.8 สามารถแข่งขันกับจุลชีพในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติจุลชีพที่เป็นตัวก่อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (Peristalsis) (Fuller, 1993) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหาร และการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993) สอดคล้องกับการศึกษาความสามารถของ probiotic lactic acid bacteria พวก *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *L. pentosus* UK1A, *L. pentosus* SK2A, *Enterococcus faecium* M74 และ *E. faecium* SF273 ในการแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกชนิดที่ทดสอบสามารถยึดเกาะผนังลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Clostridium perfringens* ได้ดี โดยสามารถลดอัตราการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของเชื้อ *C. perfringens* จากร้อยละ 79.1 เป็นร้อยละ 53.7 (Rinkinen et al., 2003)

2.8.9 เมื่อเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน (นวลจันทร์, 2533) สอดคล้องกับ Gilliland, (1979) รายงานว่า *Lactobacillus* ที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหาร คือ *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bifidus* (*Bifidobacterium bifidus*) สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถมีชีวิตรอดและเจริญในทางเดินอาหารได้

2.8.10 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* sp. ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมการทำงานของมาโครฟาจ ซึ่งเป็นการกำจัดจุลชีพออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kaila (1992) ที่มีการนำ *Lactobacillus* sp. GG จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. GG ซึ่งมีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46

2.8.11 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon adenocarcinoma) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น β - glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β - glucosidase (Kontula et al., 1998; Renner and Münzner, 1991; Naidu et al.,1999; Saarela et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gilliland และ Speck (1989) พบว่านมที่มี *L. casei* เป็นส่วนประกอบจะช่วยกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจ ในหนูได้ โดยการทดสอบให้หนูกินนมที่มี *L. casei* เป็นส่วนประกอบ หลังจากนั้น 8 วันนำหนูมาฆ่าและตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจากมาโครฟาจ ในการทดลองนี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ Lactate Dehydrogenase (LDH) พบว่าการบริโภคนมที่มีส่วนประกอบของ *L. casei* จะมีผลในการเพิ่มระดับ LDH ทำให้ลดการเพิ่มของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้

2.8.12 ลดระดับ cholesterol ในเลือด (กิจการ, 2541; Adam and Moss,1995) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Buke และ Gilliland (1990) โดยมีการใช้เชื้อ *L. acidophilus* ควบคุมระดับ cholesterol ได้ เนื่องจากจะช่วยดูดซึม cholesterol ในลำไส้ได้ โดยแยกเชื้อ *L. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัคร 9 คน พบว่า *L. acidophilus* (O16) จะดูดซึม cholesterol ได้มากที่สุดคือ 50.9 µg/ml และ D5 จะดูดซึมได้น้อยที่สุดคือ 28 µg/ml Toit และคณะ, (1998) ทดสอบการใช้เชื้อผสมของ *L. reuteri* และเชื้อ *L. johnsonii* เป็นอาหารเสริมโปรไบโอติกแก่ลูกสุกรปริมาณ 2×10^{12} cfu ต่อตัวต่อวัน ปรากฏว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด และช่วยเพิ่มความชื้นในมูลสุกรได้

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่:

Garriga และคณะ (1998) ทำการคัดเลือก *Lactobacillus* จากทางเดินอาหารของไก่เพื่อการผลิตอาหารเสริมโปรไบโอติกของไก่ ได้ Lactic acid bacteria ทั้งสิ้น 296 สายพันธุ์ มี 77 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง bacteria ในทางเดินอาหาร (*Salmonella* Enteritidis และ *Escherichia coli*) เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกต่อมา คือ *Lactobacillus salivarius* สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 8 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการยึดเกาะเซลล์บุผิวของไก่ การดื้อยาปฏิชีวนะ การทนกรดที่ pH 3 และน้ำดี ตลอดจนการศึกษาการแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารไก่และในไก่ทดลอง พบว่า *L. salivarius* CTC 2197 เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในไก่

Gusils และคณะ (1999) ศึกษาศักยภาพของการนำ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารไก่ โดยตรวจสอบคุณสมบัติการยึดเกาะเซลล์บุผิวของไก่ จากการทดสอบ cell surface hydrophobicity ตรวจสอบการเจริญร่วมกับโปรไบโอติกชนิดอื่น และการยับยั้ง *Salmonella* Gallinarum พบว่า *Lactobacillus fermentum* subsp. *cellobiosus* และ *L. animalis* มีศักยภาพในการนำมาใช้งานมากที่สุด

Elizete และคณะ (2000) ทำการแยกเชื้อจากกระเพาะพัก (crop), proventriculus, กระเพาะบด (gizzard), ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และ caeca ของไก่ที่เลี้ยงโดยปราศจากการใช้ยาปฏิชีวนะ นำเชื้อที่ได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ตามคู่มือของ Bergey ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค และทดสอบการป้อนเชื้อในไก่เนื้อ 1600 ตัว พบว่า *Lactobacillus fermentum* LPB เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในไก่

Miyamoto และคณะ (2000) ศึกษาการแยก *Lactobacillus* จากกระพุ้งก้น (cloaca) และเนื้อเยื่อช่องคลอด (vagina mucus) จากไก่ไข่ 40 ตัว และตรวจสอบการยับยั้ง *Salmonella* Enteritidis พบว่าในกระพุ้งก้นส่วนใหญ่พบ *Lactobacillus acidophillus* และ *L. salivarius* (จาก 92.5 % และ 85 % ของไก่ตามลำดับ) ส่วนในเนื้อเยื่อช่องคลอดส่วนใหญ่พบเชื้อทั้งสองชนิดนี้เช่นกัน แต่โอกาสที่พบมีน้อยกว่าในกระพุ้งก้น (จาก 42.5 % ของไก่) การทดสอบการยับยั้งพบว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis ได้

Ehrmann และคณะ (2002) ศึกษาการแยก *Lactobacillus* จากเป็ดเพื่อใช้เป็นอาหารเสริม โปรไบโอติกในสัตว์ปีก พบว่าแยก Lactic acid bacteria ได้ทั้งหมด 112 สายพันธุ์ นำมาทดสอบ aggregation, co-aggregation, cell surface hydrophobicity, การยึดเกาะเซลล์กระเพาะพักของสัตว์ปีกและ Hep2-cell ของคน ตลอดจนการทนกรดและน้ำดีของไก่ พบว่ามีเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและนำมาทดลองในเป็ด ปรากฏว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะพักและ caecum ได้นาน 18 และ 22 วันตามลำดับ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย 16S rDNA พบว่าเชื้อดังกล่าวคือ *Lactobacillus animalis* TMW 1.972 และ *L. salivarius* TMW 1.992 จึงสรุปได้ว่าเชื้อ 2 สายพันธุ์นี้ มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในสุกร :

Nemcova และคณะ (1997) ศึกษาการนำ *Lactobacillus* มาใช้เป็นโปรไบโอติกในสุกร โดยแยกจากลำไส้ลูกสุกรที่ยังไม่หย่านม ได้ทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ แยกเป็น *Lactobacillus casei* subsp. casei 4 สายพันธุ์, *L. rhamnosus* 2 สายพันธุ์, *L. reuteri* 2 สายพันธุ์, *L. salivarius* 3 สายพันธุ์ และอีก 3 สายพันธุ์พิสูจน์ไม่ได้ว่าเป็นเชื้อชนิดใด เมื่อทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก พบว่าเชื้อทั้งหมดทนกรดที่ pH 3 ได้ สามารถยึดเกาะเซลล์บุผิวลำไส้สุกรได้ดี 13 สายพันธุ์ และ *Lactobaclilus* ทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ

Kypiakis และคณะ (1999) ศึกษาผลของ Probiotic LSP 122 ในการควบคุมโรคท้องร่วงในลูกสุกรที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) โดยมีการทดสอบการเลี้ยงลูกสุกร 256 ตัวด้วยอาหาร Probiotic LSP 122 (Alpharma ®) ที่ประกอบด้วยสปอร์ที่มีชีวิตของ *Bacillus licheniformis* แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมไม่มีการให้ยาปฏิชีวนะ และโปรไบโอติก กลุ่มที่ 2 ให้อาหารเสริมโปรไบโอติกที่มีสปอร์ของ *B. toyoi* (Toyocerin ®) 10^6 cfu/g ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ให้อาหารเสริมโปรไบโอติกที่มีสปอร์ของ *B. licheniformis* จำนวน 10^6 และ 10^7 cfu/g ตามลำดับ ผลปรากฏว่าลูกสุกรทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก สามารถลดความรุนแรงของโรคท้องร่วงได้ และอัตราการตายของลูกสุกรที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำหนักของลูกสุกรที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ก็ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจนและกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม Probiotic LSP 122 10^7 cfu/g ให้ผลดีสุดในการควบคุมโรคท้องร่วงในลูกสุกรที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC)

Chang และคณะ (2001) คัดเลือก Probiotic bacteria และทดสอบในลูกสุกร 25 ตัว โดยแยกเชื้อจากอุจจาระสุกร ทดสอบความทนกรดที่ pH 2 น้ำดีเข้มข้น 0.5 % การดื้อยา และการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่า *Lactobacillus reuteri* BSA 131 มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จึงนำเซลล์ *L. reuteri* ในรูปผงแห้งมาทดสอบในลูกสุกรที่หย่านมแล้ว พบว่าได้ผลดี ดังนั้นคาดว่า *L. reuteri* สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกในลูกสุกรได้

Haberer และคณะ (2003) ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เชื้อผสมของ *L. johnsonii* และ *L. reuteri* เป็นอาหารเสริมโปรไบโอติก เพื่อช่วยลดประสิทธิภาพของเอนไซม์ ß-glucuronidase และ azoreductase ที่มีผลต่อการก่อมะเร็งในลูกสุกร โดยการให้อาหารเสริมแก่ลูกสุกรที่มีเชื้อผสมทั้งสองชนิดในปริมาณ $2x10^{12}$cfu ต่อตัวต่อวัน แล้วติดตามผล 5 สัปดาห์ พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ß-glucuronidase และ azoreductase ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 5 สัปดาห์ที่ให้อาหารเสริมโปรไบโอติก

Rodriguez และคณะ (2003) ศึกษาการผลิต reuterin โดย *Lactobacillus* ที่แยกได้จากอุจจาระสุกร เพื่อประเมินการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก พบว่าจาก *Lactobacillus* 165 สายพันธุ์ มีเพียง 28 สายพันธุ์ที่สร้าง reuterin ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพที่มักพบใน *Lactobacillus* ที่แยกจากสุกร และพบว่ามี *L. reuteri* 6 สายพันธุ์ ผลิต reuterin ในปริมาณสูง สามารถทนกรดที่ pH 3 และทนน้ำดีได้ แสดงว่าน่าจะอยู่รอดได้ในทางเดินอาหารของสุกร และนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารคนและอาหารสัตว์ได้

Carlos และคณะ (2004) ศึกษาการแยกเชื้อ Lactic acid bacteria จากลำไส้สุกรและสำลีป้ายเชื้อจากทวารหนักของสุกร 25 ตัว เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก โดยการผสมในอาหารสุกร พบว่าจากแบคทีเรียกรดแลคติก 100 สายพันธุ์ ที่แยกได้ มีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่ผ่านการทดสอบในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Enteritidis, *S.* Cholerasuis, *S.* Typhimurium และ *Yersinia enterocolitica* โดย 4 สายพันธุ์ยับยั้ง *Enterococcus faecium* และอีก 2 สายพันธุ์ยับยั้ง *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ได้รับการคัดเลือกเพื่อใช้เป็น Probiotic สำหรับใช้ในสุกร เนื่องจากมีคุณสมบัติการรวมกลุ่ม(agglutination) กับโปรไบโอติกอื่นๆ และสามารถทนกรดที่ pH 3 และน้ำดีเข้มข้น 0.4 % ได้

Feilim และคณะ (2004) ศึกษาการแยก Bifidobacteria จากอุจจาระสุกร 3 ช่วงอายุ คือ สุกรก่อนหย่านม สุกรหลังหย่านม และสุกรโตเต็มวัยเพศเมีย พบว่า *B. thermophilum* ส่วนใหญ่แยกได้จากสุกรเพศเมีย *B. boum* และ *B. choerinum* ส่วนใหญ่แยกได้จากลูกสุกร และพบ *B. suis* อีกเล็กน้อย

Ohashi และคณะ (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกของเชื้อ *L. casei* shirota (LCS) ในระบบทางเดินอาหารของสุกร โดยทำการทดลองให้นมที่มีเชื้อ *L. casei* shirota (LCS) 10^{10}cfu/ml ปริมาณ 130 ml ในแต่ละมื้อ เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างมูลสุกรมาตรวจหาปริมาณเชื้อ LCS ทุก 2 ชม. เป็นเวลา 24 ชม. ปรากฏว่าพบปริมาณเชื้อ LCS ที่แยกกลับคืนมาในมูลสุกรอยู่ในช่วง 10^4–10^6 cfu/g และปริมาณสูงสุดของ LCS ที่แยกได้เท่ากับ 10^6 cfu/g เป็นช่วง 6 ชั่วโมงหลังทำการทดลอง