

3. การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

3.1. การทดสอบความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่างของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์โปรไบโอติกควรจะมีชีวิตรอดได้ ในกระเพาะอาหารของไก่ที่มีค่าพีเอชต่ำ อันเนื่องจากการคไฮโดรคลอริก(Hydrochloric acid; HCl) ที่มีความเข้มข้นสูงในน้ำย่อยที่หลั่งออกมา (Charalampopoulos *et al.*, 2003) ดังนั้นโปรไบโอติกจึงควรมีความทนต่อกรดได้สูง โดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่พีเอช 3 หรือต่ำกว่าพีเอช 3 ได้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาเฉลี่ยในการเคลื่อนผ่านกระเพาะอาหาร (O'Sullivan *et al.*, 2002) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterococcus faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการปรับสภาพพีเอชเริ่มต้นเป็น 2, 3 7, 8 และ 9 หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แตกต่างกัน ผลการทดสอบความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดในครั้งแรกพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 2 เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไม่พบการเจริญของสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบอีกครั้ง เพื่อหาช่วงเวลาที่ยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ที่พีเอช 2 จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ สามารถทนพีเอช 2 ได้ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.37 และ 2.30 log CFU/ml หรือ 62.70 และ 33.48 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเริ่มต้น ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ สามารถทนต่อพีเอช 3 ได้นาน 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.48 และ 2.23 log CFU/ml หรือ 65.12 และ 33.28 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเริ่มต้น ตามลำดับ ดังตารางที่ 7 สำหรับสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 สามารถทนต่อพีเอช 2 ได้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.04 และ 3.07 log CFU/ml หรือ 66.01 และ 50.08 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเริ่มต้น ตามลำดับ และทนต่อพีเอช 3 ได้นาน 12 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.72 และ 5.51 log CFU/ml หรือ 76.82 และ 86.09 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเริ่มต้น ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 สำหรับความสามารถในการทนกรดได้แตกต่างกันนี้ อาจเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการรักษาค่าคงที่ของพีเอช ระหว่างพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ กับพีเอชภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ไม่เท่ากัน เมื่อพีเอชภายในเซลล์สูงถึงจุดหนึ่ง จะยับยั้งการทำงานภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย (Kashket, 1987; Charalampopoulos *et al.*, 2003) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ รุจา

(2544) ที่ไม่พบการเจริญของสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus plantarum* ที่พีเอช 2 และ 3 เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของไก่ ตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้น อยู่ในสภาพเป็นกรดในช่วงพีเอช 3.17 – 6.40 และทางเดินอาหารของไก่สั้นกว่ามนุษย์ และสัตว์จำพวกหมูและวัว ดังนั้นระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารจึงสั้นด้วย คือประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที (Sturkie, 1976) และแบคทีเรียกรดแลคติกก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อกรด (Erkkila and Petaja, 2000) ดังนั้นการที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 สามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดที่พีเอช 2 ได้เป็นเวลาถึง 4 ชั่วโมง และทนพีเอช 3 ได้นาน 6 ชั่วโมง สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 สามารถทนพีเอช 2 ได้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทนพีเอช 3 ได้ถึง 12 ชั่วโมง ประกอบกับระยะเวลาในการเคลื่อนผ่านกระเพาะอาหารโดยเฉลี่ยคือ 3 ชั่วโมง (O’Sullivan, 2001) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้จะมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดภายในทางเดินอาหารของไก่ได้

ในระบบทางเดินอาหารของไก่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย มีค่าพีเอชเกือบเป็นกลาง ในช่วงลำไส้ใหญ่บริเวณไส้ติ่ง(ceca) และกระพุ้งก้น(cloaca) มีพีเอชเป็นกรดจนถึงค่า คืออยู่ในช่วงพีเอช 5.40-8.40 (Sturkie, 1976) ดังนั้นการตรวจสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พีเอชเป็นกลางและค่าจึงมีความสำคัญเช่นกัน ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะเป็นกลางและค่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7, 8 และ 9 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการปรับพีเอชเป็น 7, 8 และ 9 และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 48 ชั่วโมงพบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ยังคงมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองที่ 0 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด และความเป็นค่าของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้จะสามารถมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและค่า ในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้ นอกจากนั้นยังมีความเป็นไปได้ว่าจำนวนเซลล์ที่ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด อาจมีการเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้อีกครั้งเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นค่าในระบบทางเดินอาหารของไก่

ตารางที่ 7 ความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่าง ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์

พีเอช	สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml) ที่เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)				
		0	6	12	24	48
2	PR-2	6.38	-	-	-	-
	MG-2	6.45	-	-	-	-
	IFS-1	6.12	4.04	-	-	-
	IG-3	6.04	3.07	-	-	-
3	PR-2	6.88	4.48	-	-	-
	MG-2	6.70	2.23	-	-	-
	IFS-1	6.86	5.90	5.72	-	-
	IG-3	6.40	6.09	5.51	-	-
7	PR-2	6.18	8.85	8.63	8.64	8.75
	MG-2	7.32	8.88	8.98	9.95	9.23
	IFS-1	6.28	7.15	7.18	6.70	6.45
	IG-3	6.24	6.70	7.30	7.99	6.89
8	PR-2	6.65	8.99	8.98	8.79	8.77
	MG-2	7.08	8.33	8.72	9.13	9.30
	IFS-1	6.32	6.78	8.72	7.60	6.48
	IG-3	6.15	6.70	8.66	8.56	6.74
9	PR-2	6.43	8.15	8.49	9.02	9.30
	MG-2	7.25	9.25	9.57	9.49	9.38
	IFS-1	6.55	6.68	7.38	9.01	8.99
	IG-3	6.13	6.90	7.50	8.30	8.43

หมายเหตุ PR-2 คือ *Enterococcus faecium* PR-2
 MG-2 คือ *Rumen bacterium* MG-2
 IFS-1 คือ *Lactobacillus plantarum* IFS-1
 IG-3 คือ *Lactobacillus plantarum* IG-3
 - หมายถึง ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย

ตารางที่ 8 ความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดที่พีเอช 2 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml) ที่เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)			
	0	2	4	6
PR-2	6.97	6.29	4.37	-
MG-2	6.87	5.35	2.30	-
IFS-1	6.76	5.37	4.48	4.08
IG-3	6.80	4.28	3.60	3.34

หมายเหตุ PR-2 คือ *Enterococcus faecium* PR-2
 MG-2 คือ Rumen bacterium MG-2
 IFS-1 คือ *Lactobacillus plantarum* IFS-1
 IG-3 คือ *Lactobacillus plantarum* IG-3
 - หมายถึง ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย

3.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำดี (bile)

น้ำดี(bile) เป็นสารละลายสีเหลืองเขียว ที่มีกรดน้ำดี(bile acid) โคลเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสโฟลิปิด(phospholipids) และสารสี biliverdin เป็นส่วนประกอบ มีค่าพีเอช ประมาณ 7.5 น้ำดีถูกสังเคราะห์มาจากตับ แล้วเก็บไว้ในถุงน้ำดี หลังจากการกินอาหารจะมีการหลั่งน้ำดีออกมายังลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม(duodenum) ในน้ำดีไม่มีเอนไซม์ แต่ทำหน้าที่เป็น emulsifies และตัวทำละลายไขมัน(solubilizes lipids) ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญไขมัน ดูดซึมวิตามินเอและเค (พิชิต, 2545; Begley *et al.*, 2006) น้ำดีเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี (Erkkila and Petaja, 2000) ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีของไก่จึงมีความสำคัญสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterococcus faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSที่มีการเติมน้ำดีที่แยกได้จากไก่ ความเข้มข้น 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องในน้ำดีที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนลง ผลการทดลองดังตารางที่ 9 สำหรับสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญได้ช้ากว่า และมีปริมาณเซลล์สูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำดี 1-5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงลดปริมาณลง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 48 ชั่วโมง พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำดีความเข้มข้น 1 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ยังคงมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองที่ 0 ชั่วโมง แต่เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำดี 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปริมาณเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง ต่ำกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองที่ 0 ชั่วโมงเล็กน้อย จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้จะสามารถรอดชีวิต และอาจมีการเจริญเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรุจา (2544) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus buchneri* A11, *L. sake* A14, *L. plantarum* C01, *L. plantarum* K01, *Leuconostoc paramesenteroides* T05, *Pediococcus dextranicus* D01, *Pediococcus dextranicus* T09 และ *Enterococcus faecium* KUPB20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของน้ำดี 1 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับใกล้เคียงกับน้ำดีภายในกระเพาะพักของไก่ หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีน้ำดีทั้งสองความเข้มข้น ถึงแม้ว่ากลไกความทนทานต่อน้ำดีของ *Lactobacilli* จะไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่สันนิษฐานว่า อาจเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส(bile salt hydrolase; BSH) ซึ่งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Lactobacillus* สร้างขึ้นมา ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำดีออกเป็น กรดน้ำดี และกรดอะมิโน ส่งผลให้ความสามารถในการละลาย และทำให้การทำงานของน้ำดีอ่อนฤทธิ์ลง(Gilliland and Speck, 1977; Erkkila and Petaja, 2000) จึงไม่สามารถทำลายไขมันที่เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ จึงทำให้แบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีน้ำดีได้

ตารางที่ 9 ความทนทานต่อน้ำดี(bile) ของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 4 สายพันธุ์

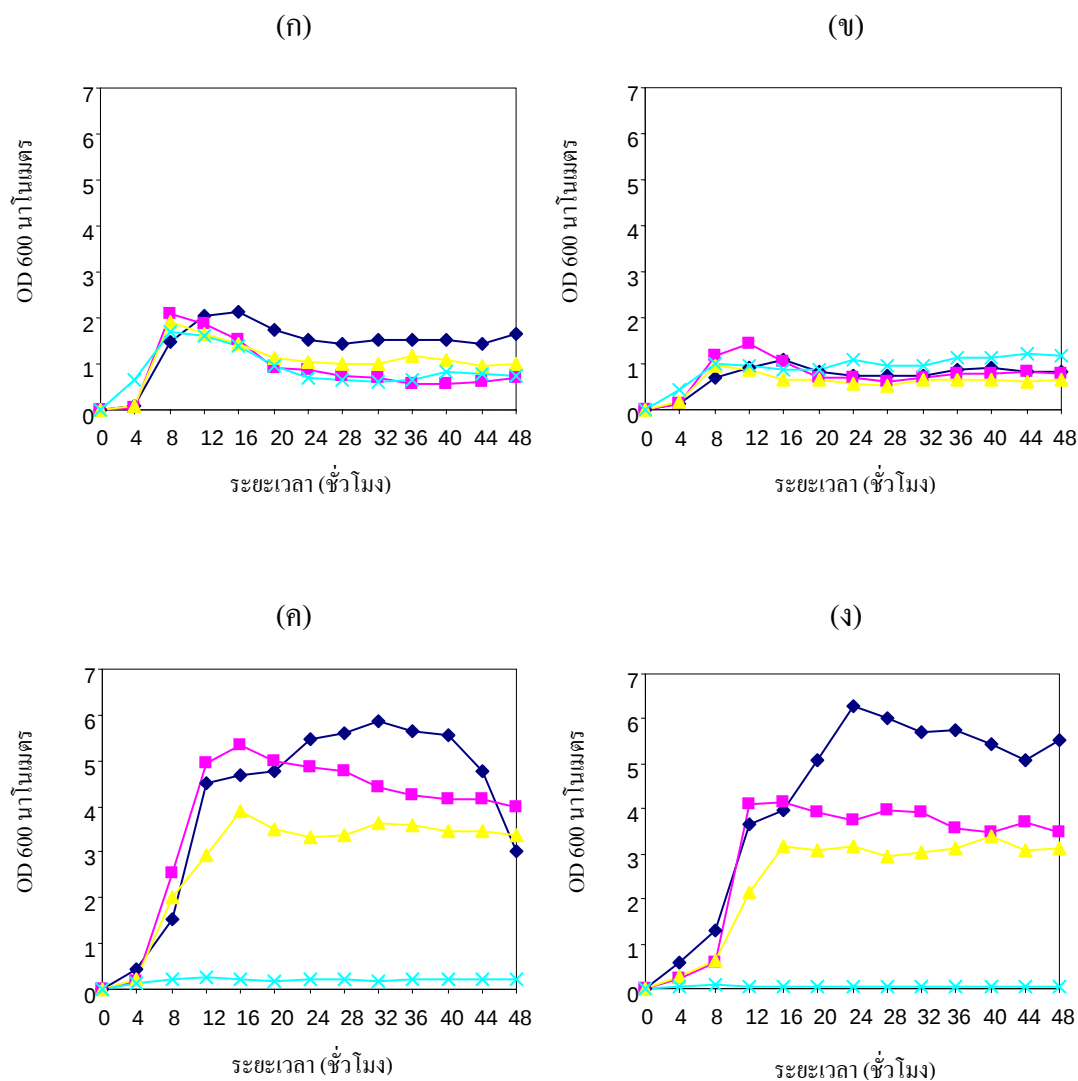
น้ำดี	สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml) ที่เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)				
		0	6	12	24	48
1%	PR-2	6.20	8.44	8.18	7.90	6.23
	MG-2	6.51	8.45	8.88	8.45	7.78
	IFS-1	5.08	6.58	6.81	7.63	6.72
	IG-3	5.06	6.33	6.63	7.57	6.78
2%	PR-2	6.60	8.28	8.36	7.81	7.32
	MG-2	7.18	8.48	8.75	7.84	8.18
	IFS-1	5.80	6.73	7.83	7.70	6.60
	IG-3	5.75	6.48	8.25	7.87	6.68
3%	PR-2	6.43	7.99	8.61	8.09	6.90
	MG-2	7.50	8.13	8.57	8.40	8.11
	IFS-1	6.70	6.70	7.36	7.84	7.30
	IG-3	6.52	6.60	7.81	7.75	7.70
4%	PR-2	6.45	8.26	8.32	8.09	7.38
	MG-2	7.61	8.15	8.35	8.38	8.10
	IFS-1	6.52	7.00	7.43	7.40	6.97
	IG-3	6.53	6.64	8.13	7.98	6.66
5%	PR-2	6.60	8.42	8.59	8.07	5.78
	MG-2	7.65	8.75	8.26	8.27	6.25
	IFS-1	6.65	6.95	7.38	7.80	5.61
	IG-3	6.03	6.70	7.76	7.41	5.48

หมายเหตุ PR-2 คือ *Enterococcus faecium* PR-2
 MG-2 คือ *Rumen bacterium* MG-2
 IFS-1 คือ *Lactobacillus plantarum* IFS-1
 IG-3 คือ *Lactobacillus plantarum* IG-3

3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ

เมื่อทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อนำไปในการเพิ่มปริมาณการผลิตในลำดับต่อไป โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterococcus faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD 600 นาโนเมตร) วัดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหาเปอร์เซ็นต์กรดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นทุก 4 ชั่วโมง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงการเจริญ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก ผลการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ในช่วงแรกหลังการถ่ายกล้าเชื้อระหว่าง 0-4 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญไม่แตกต่างกันเนื่องจากเชื้ออยู่ในระยะพัก (lag phase) จึงมีการเจริญน้อย หลังจากเชื้อมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะการเจริญได้ก็พบว่า สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว (log phase) ในช่วง 4-8 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญก็เริ่มชะลอตัวลง ซึ่งอาจเกิดจากอาหารเหลือน้อยลง หรือค่าพีเอชที่ลดลงต่ำส่งผลกระทบต่อ การเจริญของเชื้อ ผลการทดลองดังภาพที่ 14

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และสายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 มีการเจริญของเชื้อสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังภาพที่ 14 สำหรับสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 นั้นพบว่า มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30 37 42 และ 50 องศาเซลเซียสได้ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียสได้ใกล้เคียงกัน แต่มีการเจริญน้อยมากเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Angelis *et al.* (2004) ที่ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ และความร้อนต่อการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 42, 45 และ 48 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีการเจริญสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ อุณหภูมิ 42 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และไม่พบการเจริญของเชื้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่อุณหภูมิต่างๆ

(ก) *Enterococcus faecium* PR-2

(ข) *Rumen bacterium* MG-2

(ค) *Lactobacillus plantarum* IFS-1

(ง) *Lactobacillus plantarum* IG-3

หมายเหตุ สัญลักษณ์ : ◆ แสดงการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

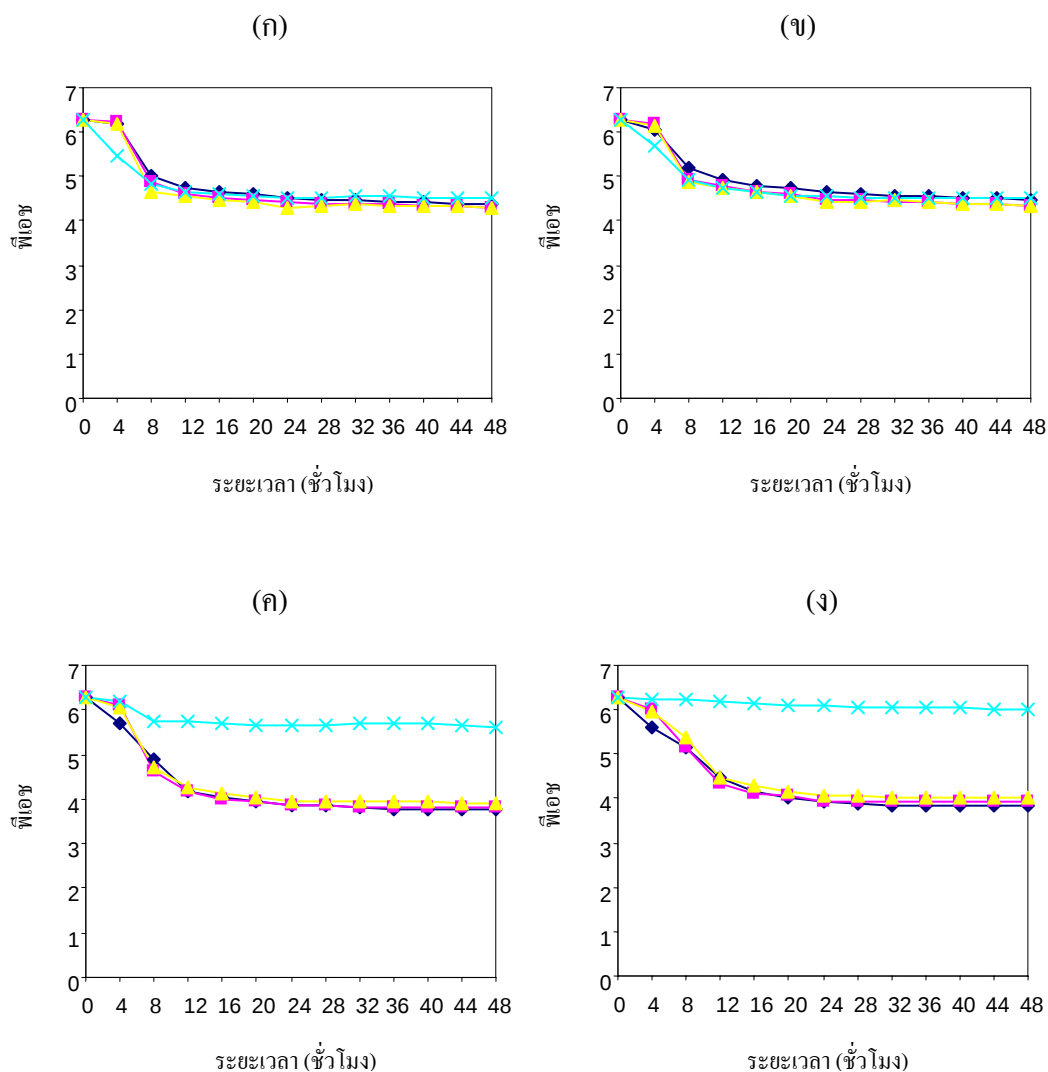
■ แสดงการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

▲ แสดงการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

× แสดงการเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในน้ำหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส ในช่วง 0-4 ชั่วโมงแรก มีค่าใกล้เคียงกัน และในช่วง 4-8 ชั่วโมง ค่าพีเอชของน้ำหมักเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นในช่วง 12-48 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 15 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 48 ชั่วโมงพบว่า ที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.30-4.52 สายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.34-4.52 จากกราฟจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่ต่างกันไม่มีผลต่อค่าพีเอชในน้ำหมักของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ สำหรับสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.78-3.92 และ 3.82-4.02 ตามลำดับ สำหรับที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อยนั้นพบว่า มีค่าพีเอชของน้ำหมักเท่ากับ 5.61 และ 6.01 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิต่างๆพบว่า อุณหภูมิที่ต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตกรดของสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า มีการผลิตกรดได้สูงสุด 1.2 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ผลการทดลองดังภาพที่ 16 สำหรับสายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 นั้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลิตกรดได้สูงสุดที่ 1.9 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส จะผลิตกรดได้สูงสุดเท่ากับ 1.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ต่างกัน มีผลต่อความสามารถในการผลิตกรดอย่างเห็นได้ชัด โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเท่ากับ 2.1, 2.0, 1.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเท่ากับ 2.0, 1.6, 1.9 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบค่าพีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติกที่อุณหภูมิต่างๆ

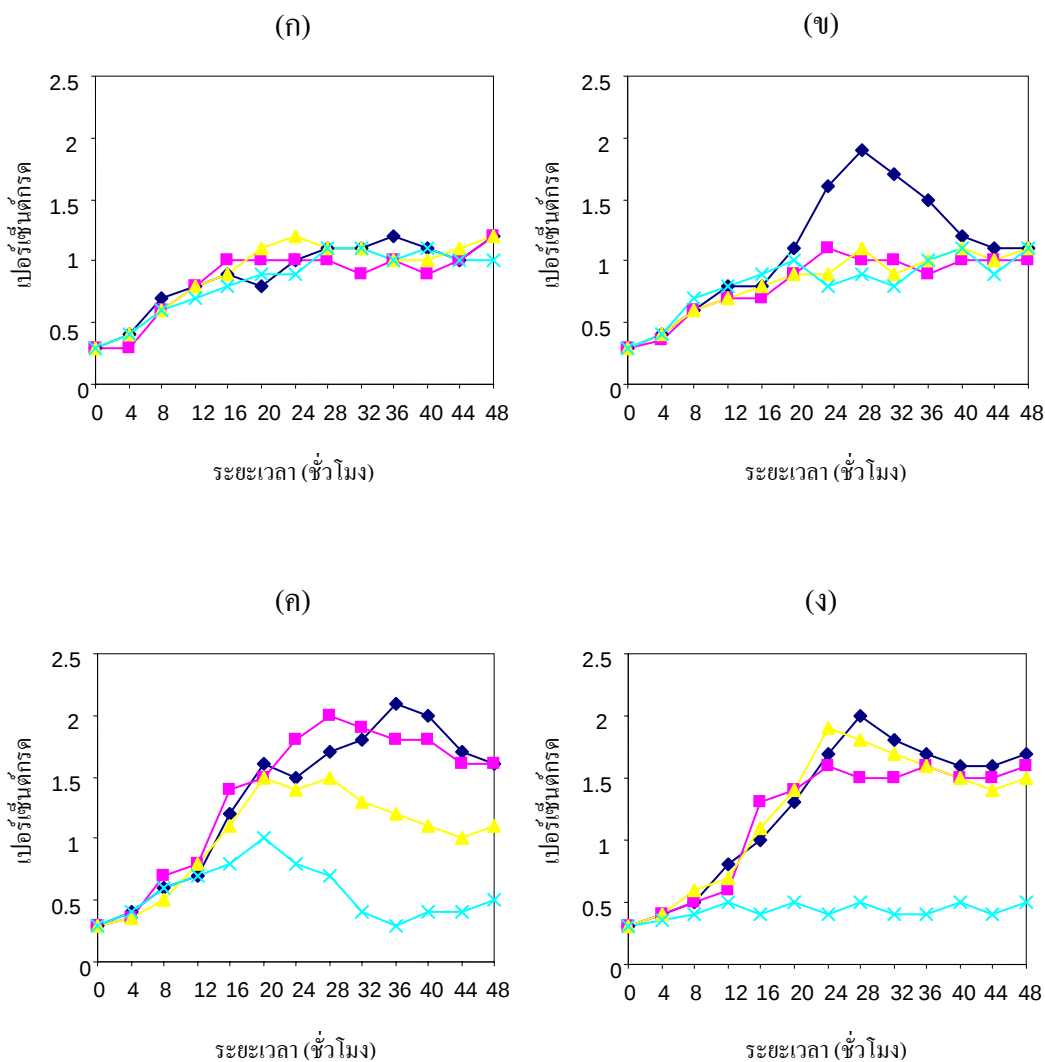
(ก) *Enterococcus faecium* PR-2

(ข) Rumen bacterium MG-2

(ค) *Lactobacillus plantarum* IFS-1

(ง) *Lactobacillus plantarum* IG-3

หมายเหตุ สัญลักษณ์ : ◆ แสดงค่าพีเอชของน้ำหมักเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
 ■ แสดงค่าพีเอชของน้ำหมักเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
 ▲ แสดงค่าพีเอชของน้ำหมักเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส
 X แสดงค่าพีเอชของน้ำหมักเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 16 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์กรดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิต่างๆ

(ก) *Enterococcus faecium* PR-2

(ข) Rumen bacterium MG-2

(ค) *Lactobacillus plantarum* IFS-1

(ง) *Lactobacillus plantarum* IG-3

หมายเหตุ สัญลักษณ์ : ◆ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์กรดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

■ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์กรดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

▲ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์กรดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

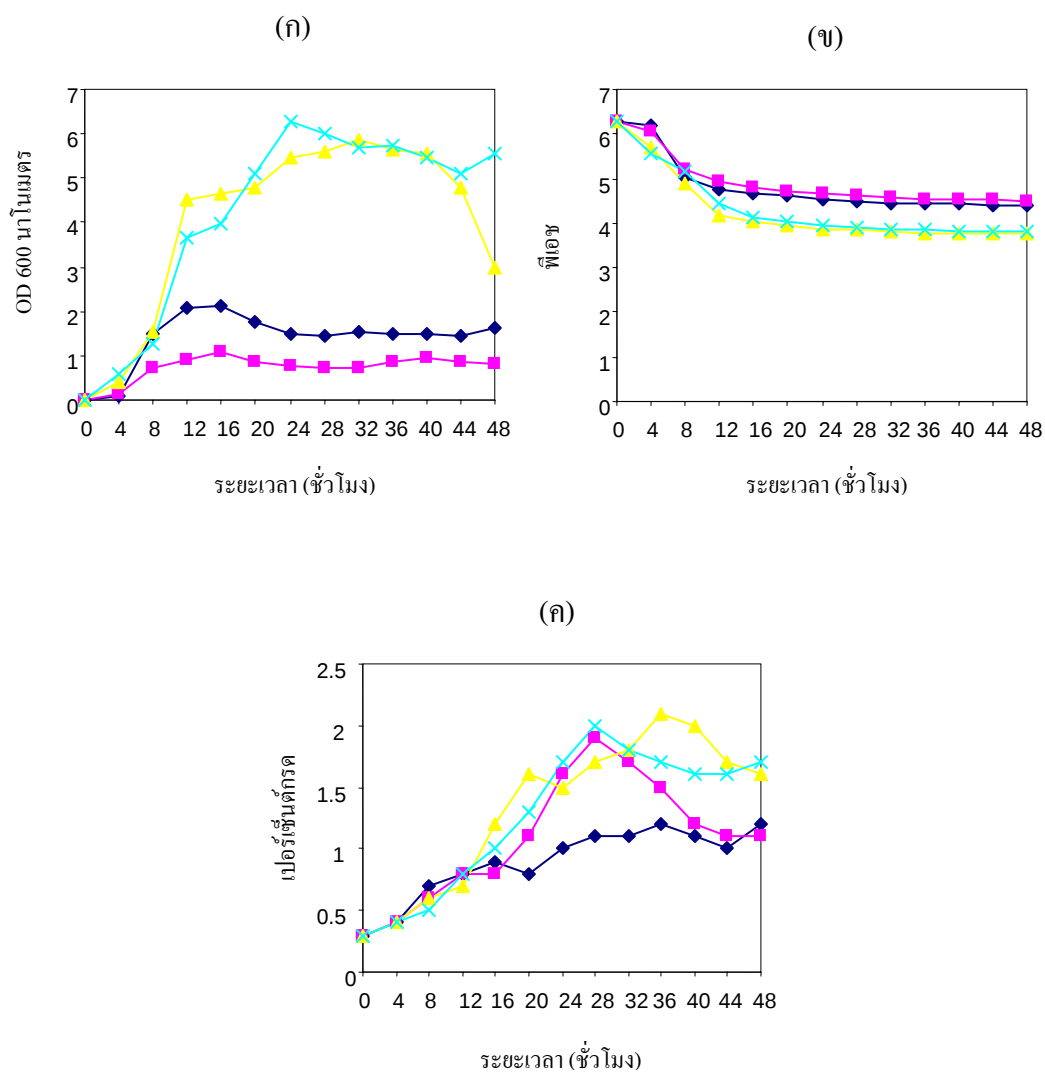
× แสดงค่าเปอร์เซ็นต์กรดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรด ที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์สร้างขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเดียวกันคือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญและผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 ส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำหมักต่ำกว่า อย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อพิจารณาการผลิตกรดพบว่า การผลิตกรดของสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีความสัมพันธ์กับการเจริญกล่าวคือ เมื่อมีการเจริญเพิ่มขึ้นจะมีการผลิตกรดเพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าการดูดกลืนแสง(OD 600 นาโนเมตร) เท่ากับ 1.44, 5.62 และ 6.00 ตามลำดับ และสามารถผลิตกรดได้ 1.1, 1.7 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การผลิตกรดของสายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 ไม่สัมพันธ์กับการเจริญกล่าวคือ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 ชั่วโมงพบว่า ในขณะที่การเจริญของเซลล์จะมีค่าต่ำมาก โดยมีค่าการดูดกลืนแสง ประมาณ 0.74 แต่มีการผลิตกรดสูงถึง 1.9 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 17 จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ และทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ด้วยวิธีการ pour plate พบว่า สายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 มีปริมาณเซลล์สูงสุด รองลงมาคือ *Lactobacillus plantarum* IFS-1, *L. plantarum* IG-3 และ *Enterococcus faecium* PR-2 ตามลำดับ (ผลการทดลองไม่ได้แสดง) แสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในการศึกษารุ่นนี้ อาจไม่สัมพันธ์กับการเจริญที่แท้จริงของสายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ความยาวคลื่นที่ไม่เหมาะสมในการวัดการเจริญ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับวัดการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว

เมื่อพิจารณาผลการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญ และผลิตกรดสูงกว่าสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 ส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำหมักต่ำกว่า สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 อย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 18 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.85, 0.68, 4.85 และ 3.73 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 1.50, 0.76, 5.48 และ 6.30

ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า พีเอชของน้ำหมัก ขณะทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงที่เซลล์มีการเจริญสูงสุดคือ 8 ถึง 12 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่ค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงต่ำ และจากนั้นจะคงที่ไปตลอดการทดลอง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการที่เชื้อไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ต่อไป อาจเกิดจากพีเอชของน้ำหมักที่ลดลงนี้ ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ แม้ว่าการเจริญของเชื้อจะหยุดชะงัก แต่การผลิตกรดยังคงดำเนินต่อไป โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ถึง 28 ชั่วโมงพบว่า *Lactobacillus plantarum* IFS-1 สามารถผลิตกรดได้สูงสุด คือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *L. plantarum* IG-3 ซึ่งผลิตกรดได้ 1.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดได้ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเป็น 1.0 และ 1.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญ และผลิตกรดได้สูงกว่าสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2

สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสนี้ เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อผลิตเป็นการค้า จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า หากจะนำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 ไปใช้ผลิตเป็นการค้าในอนาคต ควรมีการควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชให้สูงกว่า พีเอช 5 เพื่อลดผลการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากการสะสมของกรด สำหรับการยับยั้งที่เกิดจากกรดนี้ เกิดจากในสภาวะที่เป็นกรดพีเอชภายในเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกควบคุมโดยกลไกต่าง ๆ ที่สำคัญคือ การขับโปรตอนออกจากเซลล์ โดยใช้พลังงาน ATP จากการทำงานของเอนไซม์ ATPase การขับโปรตอนออกจากเซลล์นี้ ทำให้แบคทีเรียสูญเสียพลังงานที่ใช้สำหรับการเจริญไปเป็นจำนวนมาก และเมื่อเกิดการสะสมของกรดจนถึงจุดหนึ่ง จะเกิดกลไกการควบคุมทางชีวภาพ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิส ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญ (Russell, 1992; Charalampopoulos *et al.*, 2003)

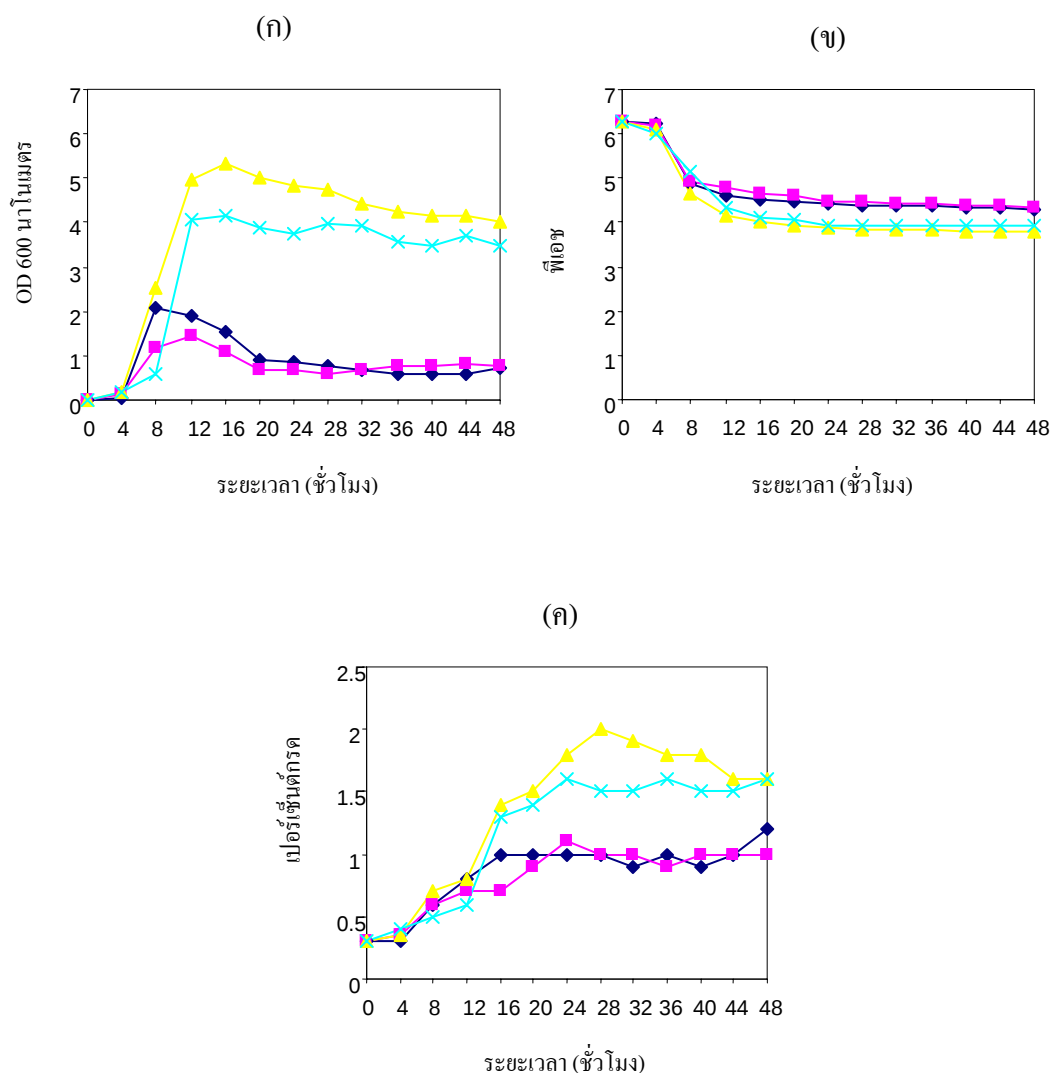


ภาพที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญ พีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

(ก) การเจริญที่ช่วงเวลาต่างๆ (ข) ค่าพีเอชที่ช่วงเวลาต่างๆ

(ค) เปอร์เซ็นต์กรดที่ช่วงเวลาต่างๆ

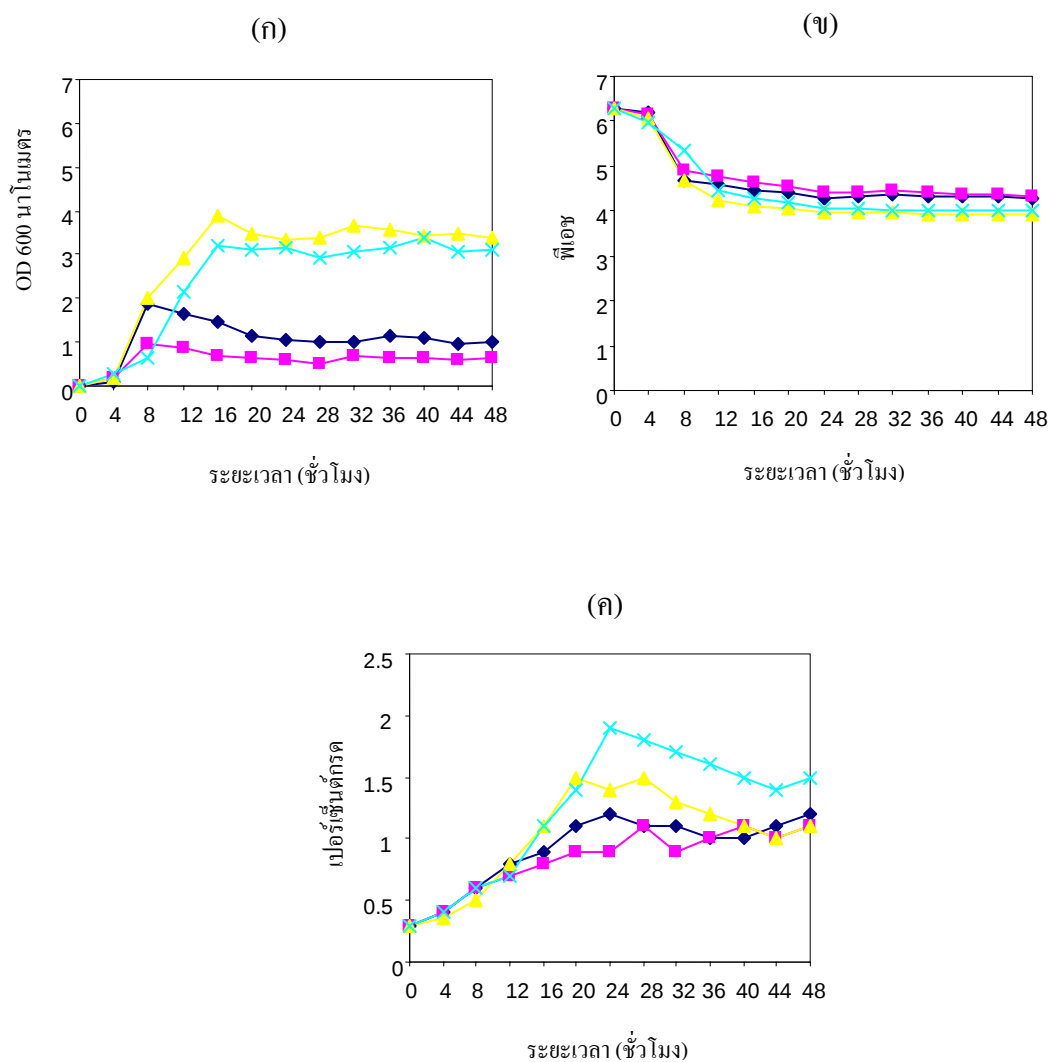
หมายเหตุ สัญลักษณ์ : ◆ สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2
 ■ สายพันธุ์ *Rumen bacterium* MG-2
 ▲ สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1
 X สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IG-3



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญ พีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
 (ก) การเจริญที่ช่วงเวลาต่างๆ (ข) ค่าพีเอชที่ช่วงเวลาต่างๆ
 (ค) เปอร์เซ็นต์กรดที่ช่วงเวลาต่างๆ

หมายเหตุ สัญลักษณ์ : ◆ สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2
 ■ สายพันธุ์ *Rumen bacterium* MG-2
 ▲ สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1
 X สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IG-3

โดยปกติอุณหภูมิภายในร่างกายของสัตว์ปีก (body temperature) ก่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยประมาณ 41 องศาเซลเซียส (เกียรติกศักดิ์, 2546) และอุณหภูมิในร่างกายของแม่ไก่ (Hen's body temperature) คือ 42 องศาเซลเซียส (ปฐม, 2540) ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติกเหล่านี้ไปใช้เป็นโปรไบโอติกในไก่กระทอง จึงควรทำการตรวจสอบผลของอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสต่อการเจริญ และการผลิตกรดของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญและผลิตกรดสูงกว่า สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 ส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำหมักต่ำกว่า สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 ดังแสดงในภาพที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส กับการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ Rumen bacterium MG-2 *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดยการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.57, 3.34 และ 3.16 ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.68, 4.85 และ 3.73 ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.06 และ 0.85 ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า สายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดคือ 1.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *L. plantarum* IFS-1, *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 ซึ่งสามารถผลิตกรดได้ 1.5 1.2 และ 1.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* ทั้งสองสายพันธุ์ มีการเจริญ และผลิตกรดได้สูงกว่า *Enterococcus faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญและสร้างกรดได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิภายในร่างกายของไก่ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นี้จะสามารถเจริญ และผลิตกรดได้ในร่างกายของไก่



ภาพที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญ พีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

(ก) การเจริญที่ช่วงเวลาต่างๆ (ข) ค่าพีเอชที่ช่วงเวลาต่างๆ

(ค) เปรอร์เซ็นต์กรดที่ช่วงเวลาต่างๆ

หมายเหตุ สัญลักษณ์ : ◆ สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2

■ สายพันธุ์ *Rumen bacterium* MG-2

▲ สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IFS-1

× สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* IG-3