

คุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ ในลำไส้ของไก่กระตัง

Suitable Characteristics of Lactic Acid Bacteria Affecting Microbial Changes in Broiler Intestine

คำนำ

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงกระบวนการผลิต ทั้งด้านสารอาหาร พันธุกรรม และกระบวนการจัดการในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต และเพิ่มผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ จึงได้มีการนำสารปฏิชีวนะ(antibiotic) มาใช้เสริมลงในอาหารสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต และป้องกันโรคในสัตว์ แต่เนื่องจากการที่สัตว์ได้รับสารปฏิชีวนะในระดับต่ำ ๆ เป็นเวลานาน ก่อให้เกิดการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ ซึ่งแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายสายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มที่ก่อโรคในคน ดังนั้นเมื่อผู้บริโภครับประทานเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีสารปฏิชีวนะตกค้างเข้าไป จึงอาจก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะในคน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการรักษาโรคในคนลดลง (Brock and Madigan, 1991; Jensen , 1998) จากผลกระทบต่อผู้บริโภคดังกล่าว สหภาพยุโรป(European Union) จึงมีประกาศห้ามใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2549 เป็นต้นไป (Harris, 2005; Anadon, 2006) การใช้สารปฏิชีวนะนั้นนอกจากจะทำให้เกิดการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคแล้ว ยังทำลายจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นคุณและที่เป็นโทษ เนื่องจากไม่สามารถแบ่งแยกได้ว่า จุลินทรีย์ชนิดใดควรทำลาย ชนิดใดไม่ควรทำลาย โดยเฉพาะเมื่อจุลินทรีย์เหล่านั้นมีที่อยู่อาศัยร่วมกัน เมื่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ ถูกทำลายไปเป็นจำนวนมาก จึงก่อให้เกิดความผิดปกติต่างๆในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ ด้วยเหตุดังกล่าวจึงได้มีการค้นคว้าหาสารอื่นเพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ (Gunal *et al.*, 2006) โดยสารนั้นต้องไม่มีสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และป้องกันโรคในสัตว์ได้เช่นเดียวกับการใช้สารปฏิชีวนะ ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก(probiotics) มาใช้เสริมลงในอาหารสัตว์ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีผู้คนให้ความสนใจกันมาก (Becquet, 2003; Martin *et al.*, 2005)

โพรไบโอติก เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง สกัดแล้วเสริมลงในอาหารสัตว์ สามารถสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเสริมสร้างสุขภาพที่ดีให้แก่สัตว์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์มากที่สุด คือ แบคทีเรียกรดแลคติก(lactic acid bacteria) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค ไม่ทำให้เกิดสารพิษ หรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษ จึงมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (food safety) นอกจากนั้นสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไคอะซิติก และแบคเทอริโอซิน ยังมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ จึงช่วยป้องกันหรือควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้ (O'Sullivan *et al.*, 2002; Soomro *et al.*, 2002)

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค และทนต่อสภาวะต่างๆภายในระบบทางเดินอาหารของไก่ เพื่อนำมาใช้เสริมสร้างสุขภาพ และป้องกันโรคในไก่กระตัง เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ปัจจุบันยังต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ประกอบกับสภาพแวดล้อมเมืองไทยไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ที่นำเข้าจากประเทศอื่น ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากภายในประเทศ จึงควรจะเป็นประโยชน์สูงสุด ทั้งในด้านการลดต้นทุน และประสิทธิภาพการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีสมบัติเป็น โปรไบโอติกเพื่อนำมาใช้ในไก่กระหว
2. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตรดของแบคทีเรียกรดแลกติก
3. ศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสด ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่กระหว

การตรวจเอกสาร

1. โพรไบโอติก(Probiotics)

โพรไบโอติก(Probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” Lilly และ Stillwell(1965) เป็นบุคคลแรกที่นำมาอธิบายสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง Parker(1974) ให้คำจำกัดความไว้ว่า โพรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ หรือสารซึ่งสามารถปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ต่อมาในปี 1989 Fuller ได้ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติก คือ อาหาร(เสริม) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และยังก่อให้เกิดประโยชน์ ช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต ในปีเดียวกันนี้ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา(The United States Food and Drug Administration; FDA) ได้ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติก คือ ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารที่ให้กินโดยตรง และจัดให้โพรไบโอติกเป็นสารที่เติมลงในอาหารมนุษย์ และสัตว์ ที่มีความปลอดภัย(Generally Recognized As Safe; GRAS) ต่อผู้บริโภค โดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกร และนักพิษวิทยาแล้ว (Pollman, 1986)

โพรไบโอติก สามารถปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ โดยการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ การใช้สารปฏิชีวนะ(antibiotic) จะทำลาย หรือยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งที่มีประโยชน์และมีโทษ แต่การใช้โพรไบโอติกจะทำให้จุลินทรีย์เหล่านั้นมีชีวิตรอดอย่างสมดุล(balance flora) (Fuller, 1989; Reid, 1999) จากลักษณะดังกล่าวจึงทำให้มีการสนใจนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์ เพื่อหลีกเลี่ยงผลเสียอันเกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะ เนื่องจากการนำสารปฏิชีวนะมาใช้เลี้ยงสัตว์ทางการค้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอัตราการตายที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ (Wegener, 2003) ทำให้เกิดพัฒนาการคือต่อสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์ นอกจากนั้น การตกค้างของสารปฏิชีวนะในสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ยังส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคในคนเกิดการคือต่อสารปฏิชีวนะตามไปด้วย 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; Harris, 2005; Martins *et al.*, 2005)

การใช้โปรไบโอติกในการควบคุมเชื้อโรคในลำไส้สัตว์ ต่างจากการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เนื่องจากการควบคุมทางชีวภาพ คือ การนำจุลินทรีย์ไปใช้กับศัตรูในธรรมชาติ เพื่อลดการทำลายของเชื้อก่อโรค หรือควบคุมไม่ให้เชื้อก่อโรคมีการเพิ่มจำนวน แต่โปรไบโอติกไม่จำเป็นต้องจู่โจมเชื้อก่อโรค มันจะทำหน้าที่ปกป้องเจ้าบ้าน(host) จากเชื้อก่อโรคด้วยการเจริญแบบแข่งขัน หรืออาจมีการสร้างสารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (รจเรข, 2546)

การเสริมโปรไบโอติกลงในอาหารสัตว์มีจุดประสงค์เพื่อการถนอมอาหาร เพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารอาหาร สร้างสารที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ และปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ลดอัตราการตายของสัตว์ได้ โดยเฉพาะระยะตัวอ่อน หรือวัยเด็กที่ระบบการย่อยอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันยังทำงานได้ไม่คึก (Wallace and Newbold, 1992; Becquet, 2003; Kacaniová *et al.*, 2006) การนำโปรไบโอติกมาใช้ อาจใช้ในรูปสายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสม โดยอาจใช้ในรูปผง แกรนูล หรือในรูปสารละลาย เซลล์ โดยการป้อนให้สัตว์ทางปากโดยตรง หรือผสมในอาหารและน้ำดื่ม เมื่อสัตว์กินโปรไบโอติกเข้าไป โปรไบโอติกจะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโต หรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วน โดยจะแทรกตัวอยู่ตามร่องวิลไล(villi) ของลำไส้เล็ก และมีการย่อยสลายกากอาหาร ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น กรดแลคติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การเกาะติดของโปรไบโอติกจะแพร่กระจายทุกพื้นที่ ทำให้ปิดทางหรือการเกาะติดของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรียและไวรัส (เกรียงศักดิ์, 1991) เมื่อโปรไบโอติกสามารถจับกับเยื่อผิวของลำไส้ได้ จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถมายังบริเวณนี้ได้เร็วขึ้น จึงช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อฉวยโอกาสได้(opportunistic pathogen) (Ouweland *et al.*, 1999) มีหลายรายงานที่พบว่า เซลล์ของโปรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตสามารถยึดเกาะกับเนื้อเยื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการมีชีวิตของเชื้อ (Hood and Zottola, 1988; Coconier *et al.*, 1993) นอกจากนั้นยังพบว่า โปรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นโปรไบโอติกที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ในช่วงแรกต้องสามารถเจริญได้ดี เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่สูงในผลิตภัณฑ์ แต่ไม่จำเป็นต้องดำรงชีวิตได้ดีในระหว่างการเก็บรักษา (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002) ความสามารถในการยึดเกาะของโปรไบโอติก ยังทำให้เกิดการยึดเกาะกับแบคทีเรียก่อโรคเกิดการรวมกลุ่ม (coaggregation) ซึ่งเป็นทางหนึ่งที่ใช้ในการจับแบคทีเรียก่อโรคออกจากร่างกาย และยังทำให้โปรไบโอติกที่มีการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ดี เนื่องจากอยู่ในระยะที่ใกล้มาก (Reid *et al.*, 1988) นอกจากนี้โปรไบโอติกยังช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้(gut peristalsis) เมื่อมีการเคลื่อนที่ของอาหารผ่านระบบทางเดินอาหาร จึงช่วยจำกัดการเจริญของแบคทีเรียใน

ระบบทางเดินอาหารได้อีกทางหนึ่ง (Newman and Spring, 2004) จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Lactococci* และ *Bifidobacteria* (Fuller and Perdigon, 2003) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย 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, 1991; Gordin and Gorbach, 1992) นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* (Kozasa, 1988) ยีสต์ *Saccharomyces* spp. และรา *Aspergillus* spp. เป็นต้น (Fuller and Perdigon, 2003)

1.1 การทำงานของโปรไบโอติก

การใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงสมรรถภาพการผลิต และป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ แม้จะยังไม่ทราบกลไกการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกแน่ชัดนักแต่อาจอธิบายได้ดังนี้

1.1.1 ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์วิตามิน (Patterson and Burkholder, 2003) และสารอาหารที่จำเป็น เช่น จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในกลุ่ม *Bacillus* spp. เช่น *B. cereus* และ *B. subtilis* หรือกลุ่ม *Clostridium* spp. สามารถสังเคราะห์วิตามินบีได้ (Kimura, 1978; Mori, 1979)

1.1.2 สร้างกรดอินทรีย์(organic acids) เช่น กรดฟอร์มิก(formic) กรดซอร์บิก(sorbic) กรดโพรพิโอนิก(propionic) กรดแลคติก(lactic) และกรดอะซิติก(acetic) เป็นต้น ทำให้เกิดสภาวะความเป็นกรดมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคลดจำนวนลง (Mitchell and Kenworthy, 1976; Kirchgessner and Roth, 1988)

1.1.3 สร้างสารเมตาบอไลต์ ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษ หรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยากำจัดสารพิษ (Rowland, 1992)

1.1.4 กระตุ้นการสร้าง และการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Lactobacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส(amylase) จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. เช่น *B. cereus* หรือกลุ่ม *Clostridium* spp. สามารถสังเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส และโปรติเอส

(protease) (Kimura, 1978) *Enterococcus faecium* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส(cellulose) (Kacaniova *et al.*, 2006)

1.1.5 สร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotics) และแบคทีเรียโอซิน(bacteriocins) เป็นต้น โปรไบโอติกที่สร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* สร้าง ampicillin, neomycin และ amoxicillin-clavulanate สายพันธุ์ *Bifidobacterium longum* สร้าง erythromycin ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces boulardii* สร้าง tetracyclins (Marteau *et al.*, 2001) โปรไบโอติกที่สร้างแบคทีเรียโอซิน เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* sp. สร้างแบคทีเรียโอซิน nisin, lacticin 3147 และ lacticin 481 แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. สร้างแบคทีเรียโอซิน lactosin 27, sakacin A, sakacin B และ plantaricin C (O'Sullivan *et al.*, 2002) และแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococcus* sp. สร้าง pediocin (Guerra *et al.*, 2001) เป็นต้น

1.1.6 รักษาภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ โดยโปรไบโอติกจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ ขณะเดียวกันจะไปเพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* sp. จึงทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Kozasa, 1989; Reid, 1999; Patterson and Burkholder, 2003) เมื่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเจริญเพิ่มขึ้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และโรคลำไส้อักเสบได้

1.1.7 ลดปริมาณแอมโมเนีย โปรไบโอติกที่เตรียมจากเชื้อ *B. cereus* สามารถลดระดับแอมโมเนียในลำไส้ ในอุจจาระและในกระแสโลหิตได้ (Kazasa, 1988; Pollmann, 1986; Patterson and Burkholder, 2003)

1.1.8 ลดปริมาณโคเลสเตอรอล(cholesterol) ในเลือด โปรไบโอติกบางสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น สามารถสร้างเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส(Bile Salt Hydrolase; BSH) ซึ่งทำให้น้ำดี(bile) แตกตัวออกเป็นกรดน้ำดีอิสระและกรดอะมิโน ส่งผลให้ประสิทธิภาพการละลายไขมันลดลง เนื่องจากกรดน้ำดีอิสระมีประสิทธิภาพการละลายไขมันต่ำกว่าน้ำดี นอกจากนั้นกรดน้ำดีอิสระส่วนใหญ่ยังถูกขับออกจากร่างกายไปพร้อมกับมูล ดังนั้นเพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมไขมันไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมี

การนำโคเลสเตอรอลมาใช้ในการสังเคราะห์น้ำดีขึ้นมาใหม่ เป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลลดลง (Corzo and Gilliland, 1999; Bertazzori *et al.*, 2001; Djovinov *et al.*, 2005; Begley *et al.*, 2006)

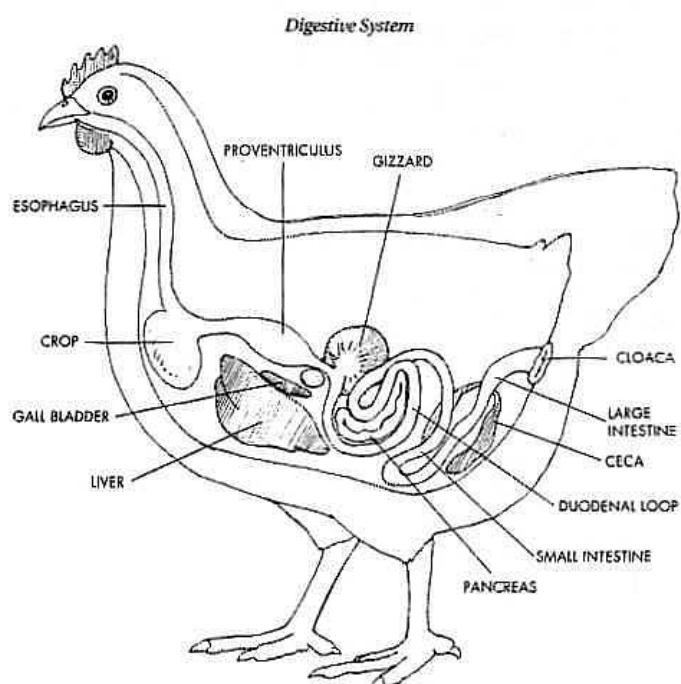
1.1.9 แบคทีเรียจำพวก Bifidobacteria ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกสามารถป้องกันการสร้างสารพิษเอมีน(toxic amine) จากจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารได้ (Kobayashi and Koralac, 1978)

1.1.10 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากผนังเซลล์ของโปรไบโอติกมีสมบัติเป็นแอนติเจนจึงสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาได้ เช่น ผนังเซลล์ของ Lactobacilli ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยเพปทิโด ไกลแคน(peptidoglycan) เมื่อถูกย่อยเป็น muramyl peptides จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Tannock, 1997) นอกจากนั้นสารเชิงซ้อน เช่น lipoteichoic acid และ S-layer proteins ก็สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ (Stewart-Tull, 1980)

1.2 สมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

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

1.2.2 มีความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด(acid tolerance)และทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร(gastric juice) (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Oyetayo and Oyetayo, 2005) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของไก่ ตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นอยู่ในสภาวะเป็นกรด(3.17 – 6.40) ลำไส้เล็กส่วนปลายเกือบจะเป็นกลาง ช่วงลำไส้ใหญ่บริเวณไส้ติ่ง(ceca) และกระพุ้งกัน(cloaca) มีสภาวะเป็นกรดจนถึงค่า ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทั่วไปทางเดินอาหารของไก่สั้นกว่ามนุษย์ และสัตว์ จำพวกหมู และวัว ดังนั้นระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารจึงสั้นด้วย ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที (Jin *et al.*, 1998a)



ภาพที่ 1 ระบบการย่อยอาหาร(digestive system) ของไก่

ที่มา: Anonymous (2006a)

ตารางที่ 1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่

Position	pH
Crop	4.00 – 6.30
Proventriculus	3.17 – 4.80
Gizzard	2.50 – 4.47
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)

1.2.3 มีความทนทานต่อน้ำดี(bile tolerance) ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญในการดำรงชีวิตภายในลำไส้เล็ก เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี (Jin *et al.*, 1998; Erkkila and Petaja, 2000; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002)

1.2.4 สามารถยิดเกาะบริเวณพื้นผิวของเยื่อบุผิวและทนทานอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002) เกิดการแข่งขันในการยิดเกาะเซลล์ป้องกันการยิดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Staphylococcus intermedius*, *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* และ *E. coli* ได้ (Adlerberth *et al.*, 2000; Rolfe, 2000; Reid and Burton, 2002; Rinkinen *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006)

1.2.5 กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน แต่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบ โดยสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ จึงช่วยป้องกันหรือควบคุมการเกิดโรคติดเชื้อ (Kostiuk *et al.*, 1992; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Patterson and Burkholder, 2003; Koenen *et al.*, 2004)

1.2.6 สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium difficile* ได้ (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002)

1.2.7 ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้

1.2.8 ด้านการกลายพันธุ์(antimutagenic) และด้านการเกิดมะเร็ง(anticarcinogenic) (Fuller, 1989; Walker and Duffy, 1998; Zabala *et al.*, 2001; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002) โดยโปรไบโอติกบางสายพันธุ์ ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในอุจจาระ และสารก่อมะเร็งลดลง จึงช่วยลดการเกิดมะเร็งในลำไส้ (Marteau *et al.*, 2001)

1.2.9 สามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ เพาะเลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และราคาไม่แพง

1.2.10 มีชีวิตอยู่ได้ในระหว่างกระบวนการ มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์ และในระหว่างการเก็บรักษา (Oyetayo and Oyetayo, 2005)

2. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

สารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์หลายด้าน แต่การใช้โปรไบโอติกจะต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยมีระดับการใช้ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU(colony forming unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กรัม จุลินทรีย์ที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 มีดังนี้

2.1 แบคทีเรีย

Bacillus coagulan, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ), *B. subtilis* strain BN, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Bacteroides suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bi. animalis*, *Bi. bifidum*, *Bi. infantis*, *Bi. longum*, *Bi. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. cellobiosus*, *L. curatus*, *L. delbruekii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. reuterii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactocii*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium shermanii*, *Lactococcus cremoris*, *L. lactis*, *L. diacetylactis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus faecium* cernelle 68, *S. intermedius* และ *S. thermophilus*

2.2 เชื้อรา

Aspergillus niger และ *A. oryzae*

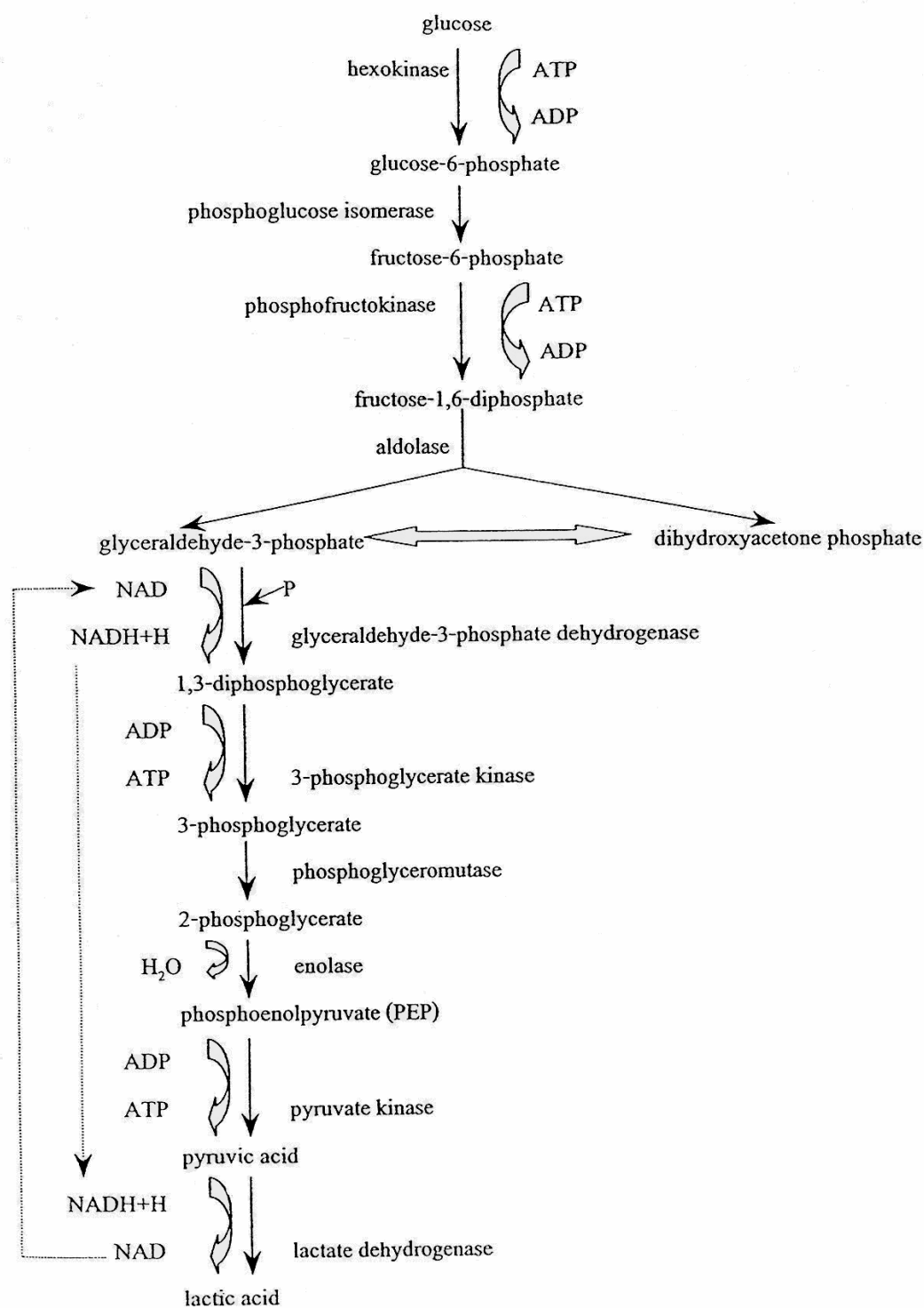
2.3 ยีสต์

Candida pintolepessi, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pediococcus* spp.

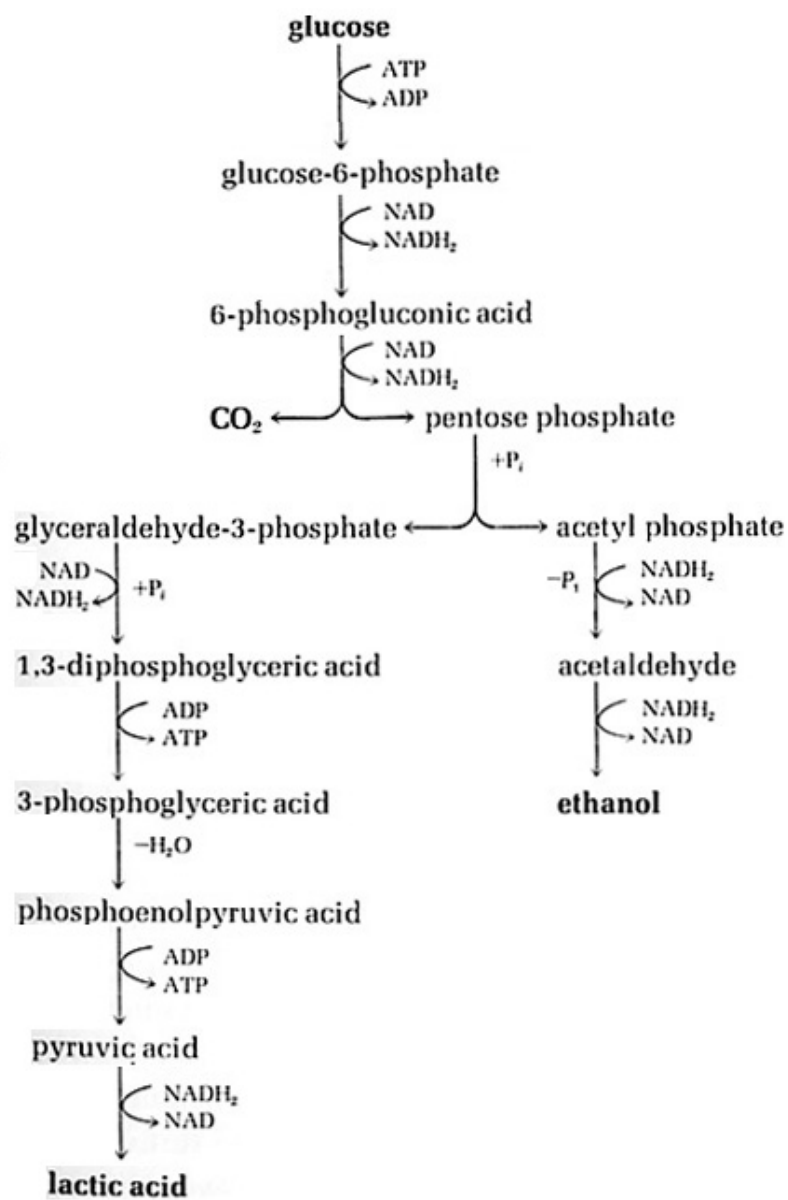
3. แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีทั้งรูปร่างเป็นแท่ง(rod) และกลม(cocci) มีลักษณะสำคัญคือ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ หมักคาร์โบไฮเดรตให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก (Axelsson, 2004) ในการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย(microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย(strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจนจึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน ไรโบฟลาวิน และส่วนใหญ่ต้องการสารอินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส (สุริย์รัตน์, 2545) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria และกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria โดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มแรก ในกระบวนการหมักจะมีการสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ส่วนกลุ่มหลังเมื่อผ่านกระบวนการหมักจะได้กรดแลคติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วย (อภิญา, 2530) ดังภาพที่ 2 และ 3

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอุณหภูมิปานกลาง สำหรับการเจริญเติบโตหรือเรียกว่า mesophiles แบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง คือตั้งแต่ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางสปีชีส์สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่าอุณหภูมิดังกล่าว แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำมักก่อให้เกิดปัญหาในโรงงานผลิตอาหารประเภทที่ต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ หรือผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นต้น (ปรียา, 2524) สำหรับในกระบวนการหมักนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการหมัก และมีสมบัติในการทนต่อกรดและเกลือได้อีกด้วย ดังนั้นถ้าในอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญเติบโตอยู่จะมีค่าพีเอชต่ำ เนื่องจากการสร้างกรดของแบคทีเรียจึงช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อชนิดอื่นๆเจริญเติบโตได้ (ปรียา, 2524)



ภาพที่ 2 วิธี Embden-Meyerhoff Pathway ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermentative
ที่มา: Hutkins (2001)



ภาพที่ 3 วิธี Phosphoketolase pathway ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative
ที่มา: Anonymous (2006b)

การนำแบคทีเรียกรดแลกติกมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก มีข้อได้เปรียบหลายประการ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค ไม่ทำให้เกิดสารพิษหรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษและเนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย และทนต่ออากาศจึงต้องการกระบวนการหมักแบบง่าย ๆ และสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาสั้นในกระบวนการหมักสามารถใช้สารตั้งต้นราคาถูกได้หลายชนิด เช่น นม โปรตีนนม พืช และ hydrolysed starch นอกจากนี้ การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในกระบวนการหมัก จะช่วยขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่นได้

3.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก

ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติก แม้ปัจจุบันจะไม่มีนิยามที่ชัดเจน แต่ลักษณะพื้นฐานที่ยอมรับโดยทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ขาดเอนไซม์คะตะเลส(catalase) ขาดไซโตโครม ทนต่อออกซิเจน(aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรด และผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาล (Axelsson, 2004) การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกในปัจจุบัน อาศัยลักษณะพื้นฐาน ลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน(quinone) รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล เพื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์และลักษณะทางพันธุกรรม โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิกซึ่งใช้ในการจัดจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ (species) และซัปสปีชีส์(subspecies) โดยใช้เทคนิคขั้นสูงทางพันธุศาสตร์ เช่น การพิจารณาความเหมือนกันของ DNA(DNA-DNA homology) การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA ในไรโบโซม (rRNA) โดยเฉพาะในส่วนของ well conserved region และ less conserved region และในปัจจุบันได้นำเทคนิค PCR มาใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Axelsson, 2004) เช่น การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ 23S rRNA ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ(phylogenetic relationships) โดยตรง (Woese, 1987) การจัดจำแนกในระดับสกุล(genera) ของแบคทีเรียกรดแลกติกอาศัยลักษณะทางพื้นฐาน วิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เช่น การเรียงตัวของเซลล์ การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์(CO₂) จากน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ระดับต่าง ๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง(pH) และชนิดของกรดแลกติกซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกได้เป็น 12 สกุล (Axelsson, 2004) ดังตารางที่ 2