



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง สมบัติของสารยับยั้งจาก *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากลำไส้ไก่

Characterization of Antimicrobial Substances from *Lactobacillus* sp. Isolated from Chicken Intestine

นามผู้วิจัย นางสาวชลดา น้อยจันทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

สมบัติของสารยับยั้งจาก *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากลำไส้ไก่

Characterization of Antimicrobial Substances from *Lactobacillus* sp.
Isolated from Chicken Intestine

โดย

นางสาวชลดา น้อยจันทิระ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2553

ชลดดา น้อยจันท์ 2553: สมบัติของสารยับยั้งจาก *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากลำไส้ไก่
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุณีย์
นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. 160 หน้า

สารยับยั้งจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแลคโตบาซิลลัสที่แยกจากลำไส้ไก่ 11 สายพันธุ์
Lactobacillus fermentum KUB-C33, KUB-D18, KUB-D39, KUB-D73, KUB-J92
L. salivarius KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 *L. reuteri* KUB-D28 และ *Lactobacillus* sp. KUB-
C44, KUB-D26 ซึ่งแสดงกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่
Staphylococcus aureus TISTR 029 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis DMST
17368, *Shigella. dysenteriae* DMST 15111 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 317802
ประกอบด้วย กรดแลกติก 0.101 ถึง 0.191 M กรดอะซิติก 0.055 ถึง 0.098 M และสารประกอบ
ชนิดอื่น จากการทดสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีทางเอนไซม์ พบว่าสารประกอบชนิดอื่น
ประกอบด้วย โครงสร้างโปรตีน(P) คาร์โบไฮเดรต(C) และไลปิด(L) แบ่งเป็นสารกลุ่มคล้ายแบ
คทีริโอซิน (bacteriocin-like) ได้แก่สารที่มีโครงสร้าง P, P-C, P-L และ P-C-L และสารยับยั้ง
กลุ่มไม่ใช่แบคทีริโอซิน (non-bacteriocin) ได้แก่ C, L, L-C เชื้อแลคโตบาซิลลัสแต่ละ
สายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้ง 1 ถึง 3 ชนิดขึ้นกับสายพันธุ์ทดสอบ เมื่อคัดเลือกเชื้อแลคโต
บาซิลลัสจากความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ระดับพีเอชของระบบทางเดินอาหารของไก่ พบกลุ่ม
เชื้อ KUB-D28, KUB-D73, KUB-I49, KUB-J61 กลุ่มเชื้อ KUB-I49, KUB-J61, KUB-I48 กลุ่ม
เชื้อ KUB-I48, KUB-I49 กลุ่มเชื้อ KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 และกลุ่มเชื้อ KUB-D73, KUB-
I48, KUB-I49, KUB-J61 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อเป้าหมาย 56.79 ถึง 100, 63.20 ถึง 100, 59.71
ถึง 100, 29.21 ถึง 100 และ 20.02 ถึง 100 ในสภาวะพีเอชของทางเดินอาหาร crop, duodenum,
jejunum, ileum และ clocca ตามลำดับ เมื่อศึกษาเชื้อผสมที่คัดเลือกได้ประกอบด้วย KUB-D28,
KUB-D73, KUB-I48, KUB-I49 และ KUB-J61 พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายทุกสายพันธุ์
100% ในสภาวะพีเอชของระบบทางเดินอาหาร crop และ duodenum ขณะที่ส่วนของ jejunum,
ileum และ clocca มีประสิทธิภาพการยับยั้งบางส่วนเป็น 71 ถึง 100%, 55.8 ถึง 100% และ 10.9 ถึง
64% ตามลำดับ

Chollada Noychantira 2010: Characterization of Antimicrobial Substances from *Lactobacillus* sp. Isolated from Chicken Intestine. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sunee Nitisinprasert, D.Sc. 160 pages.

Eleven strains of Lactobacilli (LAB), *Lactobacillus fermentum* KUB-C33, KUB-D18, KUB-D39, KUB-D73, KUB-J92 *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 *L. reuteri* KUB-D28 and *Lactobacillus* sp. KUB-C44, KUB-D26 isolated from chicken intestine, were studied for their antimicrobial activities against both Gram-positive and Gram-negative pathogenic indicator strains of *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Shigella dysenteriae* DMST 15111 and *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 317802. Their antimicrobial compounds produced consisted of 0.101 to 0.191 M lactic acid, 0.055 to 0.098 M acetic acid and other substances. Investigation of chemical structure of other substances by enzymatic treatment showed that these substances were possible to be protein (P), carbohydrate (C), and lipid (L) which could be divided into two groups. The first group designed as bacteriocin like substance with various structure of P, P-C, P-L and P-C-L while the latter one were non-bacteriocin of C, L and L-C. Each LAB could produce different antimicrobial substances of 1 to 3 types. When these 11 LAB strains were screened for competitive inhibition activity against target strains at different pH of chicken gastro-intestinal tract, it was found that the group1 of KUB-D28, KUB-D73, KUB-I49, KUB-J61; group2 KUB-I49, KUB-J61, KUB-I48; group 3 KUB-I48, KUB-I49; group4 KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 and group 5 KUB-D73, KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 exhibited inhibitory activity against all target strains of 56.79 to 100, 63.20 to 100, 59.71 to 100, 29.21 to 100 and 20.02 to 100 at pH of crop, duodenum, jejunum, ileum and cecum, respectively. The mixture of 5 selected LAB strains of KUB-D28, KUB-D73, KUB-I48, KUB-I49 and KUB-J61 displayed 100% inhibition activity against all target strains at pH of crop and duodenum while it did partial activity of 71 to 100%, 55.8 to 100% and 10.9 to 64% at pH of jejunum, ileum and cecum, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

___ / ___ / 10

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้สั่งสอนให้ความรู้ ข้าพเจ้ามาตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน ขอขอบคุณ รศ. ดร. สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ ผศ.ดร. สุทธิพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ทั้งสองท่านคอยสอน ให้คำแนะนำที่ดีตลอดมา

ขอบคุณพ่อแม่ และครอบครัวที่คอยให้การสนับสนุนทุกเรื่องทุกอย่าง และเป็นกำลังใจตลอดเวลา ขอขอบคุณ เพื่อน-พี่-น้อง ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ทำให้กำลังใจและสร้างประสบการณ์ที่ดี รวมถึงให้คำแนะนำในทุกเรื่อง

ชลดา น้อยจันทิระ

กันยายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	105
สรุป	105
ข้อเสนอแนะ	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	107
ภาคผนวก	126
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	127
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	132
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	135
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	160

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกเชื้อจีนัสแลคโตบาซิลลัส	10
2	สมบัติของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากสัตว์ปีก	11
3	กระบวนการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียกรดแลคติก	15
5	สารยับยั้งโมเลกุลเล็กที่ผลิตโดยแลคโตบาซิลลัสสกุลแลคโตบาซิลลัส	24
6	ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารไก่	30
7	สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเจริญเติบโต	33
8	เอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบหาโครงสร้างทางเคมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน	37
9	กิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	42
10	ค่าพีเอช ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ที่พบใน CFS ของแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์	50
11	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. fermentum</i> KUB-C33 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	54
12	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. fermentum</i> KUB-D18 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	55
13	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. fermentum</i> KUB-D39 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	55
14	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. fermentum</i> KUB-D73 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	56
15	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. fermentum</i> KUB-J92 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	57
16	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. salivarius</i> KUB-I48 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	57
17	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. salivarius</i> KUB-I49 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. salivarius</i> KUB-J61 หลังย่อยด้วย เอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	59
19	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ <i>L. reuteri</i> KUB-D28 หลังย่อยด้วย เอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	59
20	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ undefined <i>Lactobacillus</i> sp. KUB-C44 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	60
21	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ undefined <i>Lactobacillus</i> sp. KUB- D26 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	61
22	ปริมาณแลคโตบาซิลลัสเมื่อเลี้ยงร่วมกับ <i>E. coli</i> O157:H7 ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่าน ทางเดินอาหารส่วนนั้น	66
23	ปริมาณ <i>E. coli</i> O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แลคโตบาซิลลัส ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่าน ทางเดินอาหารส่วนนั้น	67
24	ปริมาณแลคโตบาซิลลัสเมื่อเลี้ยงร่วมกับ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ใน สภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหาร เคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น	68
25	ปริมาณ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แลคโตบาซิลลัส ใน สภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหาร เคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น	79
26	ปริมาณแลคโตบาซิลลัสเมื่อเลี้ยงร่วมกับ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ในส ภาวะพีเอชจำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหาร เคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น	68
27	ปริมาณ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแลคโตบาซิลลัสใน สภาวะพีเอชจำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหาร เคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น	71

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
28	ปริมาณแลคโตบาซิลลัสเมื่อเลี้ยงร่วมกับ <i>St. aureus</i> TISTR 029 ในสภาวะ พีเอชจำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น	72
29	ปริมาณ <i>St. aureus</i> TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแลคโตบาซิลลัสในสภาวะ พีเอชจำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น	73
ตารางผนวกที่		
ค1	ค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์หลัง ย่อยด้วยเอนไซม์ catalase ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย	138
ค2	ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>E. coli</i> O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ <i>E. coli</i> O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	139
ค3	ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368, เปอร์เซ็นต์ การยับยั้งต่อ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	140
ค4	ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน สภาวะ crop (พีเอช 5.5)	141
ค5	ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>St. aureus</i> TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งต่อ, <i>St. aureus</i> TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	142
ค6	ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>E. coli</i> O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ <i>E. coli</i> O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	143
ค7	ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368, เปอร์เซ็นต์ การยับยั้งต่อ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	144

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค8 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	145
ค9 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>St. aureus</i> TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, <i>St. aureus</i> TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	146
ค10 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>E. coli</i> O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ <i>E. coli</i> O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5)	147
ค13 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>St. aureus</i> TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, <i>St. aureus</i> TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5)	150
ค14 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>E. coli</i> O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ <i>E. coli</i> O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	151
ค15 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	152
ค16 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	153
ค17 คำพิเษ, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, <i>St. aureus</i> TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, <i>St. aureus</i> TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	154

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการหมักแบบ Homofermentative	7
2	กระบวนการหมักแบบ Heterofermentative	8
3	กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซิน	20
4	ระบบทางเดินอาหารของไก่	26
5	กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม <i>L. fermentum</i>	46
6	กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม <i>L. salivarius</i>	47
7	กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม <i>L. reuteri</i>	48
8	กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม undefined <i>Lactobacillus</i> sp.	49
9	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>E. coli</i> O157:H7 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	75
10	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	76
11	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	77
12	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>St. aureus</i> TISTR 029 15111 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)	78
13	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>E. coli</i> O157:H7 ในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	81
14	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	82
15	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 ในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	83
16	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>St. aureus</i> TISTR 029 ในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0)	84
17	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>E. coli</i> O157:H7 ในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5)	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5)	87
19	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 ในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5)	88
20	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>St. aureus</i> TISTR 029 ในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5)	89
21	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>E. coli</i> O157:H7 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	91
22	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	92
23	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	93
24	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>St. aureus</i> TISTR 029 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0)	94
25	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>E. coli</i> O157:H7 ในสภาวะ clocca (พีเอช 8.0)	95
26	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 ในสภาวะ clocca (พีเอช 8.0)	97
27	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 ในสภาวะ clocca (พีเอช 8.0)	98
28	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ <i>St. aureus</i> TISTR 029 ในสภาวะ clocca (พีเอช 8.0)	99
29	การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมและจุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสมในสภาวะพีเอช ทางเดินอาหารส่วนต่างๆ	102

สมบัติของสารยับยั้งจาก *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากลำไส้ไก่

Characterization of Antimicrobial Substances from *Lactobacillus* sp. Isolated from Chicken Intestine

คำนำ

ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์ไก่เนื้อ สร้างรายได้เข้าประเทศสูงถึง 49,039 ล้านบาทจาก ข้อมูลปี 2552 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกเนื้อไก่ราย ใหญ่เป็นอันดับ 10 ของโลก ตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น สิงคโปร์ ฮองกง แคนาดา และเกาหลีใต้ (ศูนย์วิจัยระยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2550) มีการส่งออกทั้งแบบไก่สด และเนื้อไก่ปรุงสุก ส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปแบบสินค้าปรุงสุก เนื่องจากมีประเทศคู่แข่งในตลาดโลกเพิ่มขึ้น ไทยจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการเลี้ยงไก่เพื่อให้ได้คุณภาพของเนื้อไก่และ ผลิตภัณฑ์ที่ดียิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ไก่ให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาดเพื่อให้ ได้ผลผลิตสูงสุดภายในระยะเวลาที่สั้นลง นอกจากนี้ผู้ประกอบการมีการผสมสารปฏิชีวนะหรือ สารเคมีสังเคราะห์สำหรับควบคุมเชื้อโรคในอาหาร และใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต แต่การใช้ สารนี้เป็นระยะเวลานานจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคในฟาร์มเกิดการดื้อยาทำให้การรักษา โรคยากยิ่งขึ้น ถ้าหากไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนส่งไก่ออกจำหน่ายเป็นระยะเวลาอย่างเพียงพอ จะทำ ให้สารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อไก่หรือในผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่ผู้บริโภคได้ มีผลทำให้ เชื้อโรคในคนดื้อยาตามไปด้วย ประกอบกับมาตรการด้านความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภค ของกลุ่มประเทศผู้นำเข้าประเทศสหภาพยุโรป (EU) ได้ออกมาตรการด้านความปลอดภัยใน ผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ โดยห้ามไม่ให้มีสารตกค้างได้แก่สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในเนื้อไก่ และได้ ประกาศออกมาใช้เมื่อเดือนมกราคม 2550 ดังนั้นการใช้สารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกจึงเป็น ทางเลือกใหม่สำหรับใช้ทดแทนสารเคมีและสารปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่เพื่อส่งออกและใช้เป็น ยุทธศาสตร์สำหรับแข่งขันกับประเทศคู่แข่งผู้ผลิตเนื้อไก่ส่งออกในอนาคต

แลคโตบาซิลลัสเป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์ที่มาจากนม นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินหายใจ ระบบสืบพันธุ์ และ ระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Pot *et al.*, 1994) แลคโตบาซิลลัสส่วนใหญ่ได้รับการศึกษา มาเป็นเวลานานจนเป็นที่ยอมรับว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดปลอดภัยต่อสุขภาพ (GRAS: Generally

Recognized As Safe) ในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแลคโตบาซิลลัส ทำให้เกิดสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial substance) ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไดอะซีทิล (diacetyl) อะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น (Ouweland, 1998)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาลักษณะของสารยับยั้งที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่แยกมาจากลำไส้ไก่ (ปรีชดา, 2550) ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Lactobacillus* ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Vibrio parahaemolyticus* ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาชนิดของสารยับยั้ง และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะ พิเศษ จำลองของระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้อ เพื่อทดแทนสารเคมีและยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ทั่วไปในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์

1. การศึกษากิจกรรมการยับยั้งและชนิดของสารยับยั้งต่อเชื้อก่อโรค จากแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์
2. เพื่อศึกษาผลของ *Lactobacillus* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะ พีเอช จำลองของระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้อ



การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียที่เป็นปัญหาในการเลี้ยงไก่มีหลายชนิดทั้งที่ก่อให้เกิดโรคในไก่ และปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร การปนเปื้อนของแบคทีเรียมาจากหลายทางทั้งจากอาหารสัตว์ น้ำ สุขอนามัยในการเลี้ยง การระบาดของโรค การปนเปื้อนระหว่างการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ฯลฯ Jon *et al* (2008) รายงานการสำรวจฟาร์มเลี้ยงไก่ระบบเปิดในทางตอนเหนือของสเปนพบเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนได้แก่ *Campylobacter coli* มากที่สุด รองลงมาเป็น *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* Enteritidis ซึ่งในการสำรวจนี้ไม่พบการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* O:157 ในฟาร์มที่ศึกษา (Anonymus, 2004)

ในระบบทางเดินอาหารไก่มีแบคทีเรียก่อโรคอาศัยอยู่หลายชนิด เช่น *E. coli* ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ เนื้อเยื่ออักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิดโรคสะดืออักเสบ ซึ่งเป็นกลุ่มอาการและการตายของลูกไก่แรกเกิด ที่มีการติดเชื้อโดยผ่านสายสะดือทำให้เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่อง อาการดังกล่าวพบได้อย่างสม่ำเสมอทุกครั้งที่มีการฟักไข่

Salmonella spp. ทำให้เกิดโรคอุจจาระขาว (pullorum disease) โรคพาราไทฟอยด์ (paratyphoid) โดยขึ้นกับซีรัมวิทยา (serology) ของเชื้อ เช่น *Salmonella enterica* serova Enteritidis มักพบที่เปลือกไข่สามารถสร้างสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภครวม เมื่อผู้บริโภครับเข้าไปจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและเสียชีวิตได้ (Ziprin, 1994) *Salmonella enterica* subsp. Enterica เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์และโรคเกี่ยวกับเลือดเช่น เลือดเป็นพิษ เม็ดเลือดขาวลดลงหรือเลือดไหลไม่หยุดในไก่ (Kwon *et al.*, 2002) สามารถติดต่อมาสู่มนุษย์โดยการบริโภคเนื้อไก่ที่ติดเชื้อ หรือไข่ไก่จากไก่ที่เป็นโรคทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาเจียน ท้องร่วงและเสียชีวิต (Suzuki, 1994)

Clostridium colinum, *C. perfringens* ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ หรือผิวหนังอักเสบ *Pasteurella* ทำให้เกิด โรคอหิวาต์เฉียบพลัน และทำให้ไก่เสียชีวิตทันที *L. monocytogenes* ทำให้เกิด โรคโลหิตเป็นพิษในไก่ *L. monocytogenes* มักถูกมองข้ามความสำคัญ ไม่ค่อยมีการตรวจเชื้อมันใน ฟาร์มเลี้ยงไก่บ่อยนัก แต่มักพบเชื้อมันปนเปื้อนอย่างมากในผลิตภัณฑ์ไก่สด (Uyttendaele *et al.*, 1999; Rorvik *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อตาอักเสบ

Campylobacter jejuni เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในสัตว์ปีก แต่เมื่อมนุษย์ได้รับเชื้อเข้าไปจะทำให้ เกิดโรคท้องร่วง อาเจียน และมีไข้ (จันทนา, 2529; Franco and Williams, 1994; Helm, 2004) มี รายงานว่ามีอัตราการติดเชื้อของ *S. Entertidis* และ *Campylobacter* sp. ในคนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั้งสอง มีการปรับตัวให้สามารถมีชีวิตอยู่ในทางเดินอาหารของไก่ได้ดี ซึ่งการติดเชื้อในคนมักเกิดจากการ บริโภคผลิตภัณฑ์ไก่ที่มีการปนเปื้อนเข้าไป (Adak *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์จากไก่ยังเกิดการปนเปื้อนจาก *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นแบคทีเรีย ประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบมากในลำไส้ของคนและ สัตว์ แต่มีเชื้อ *E. coli* บาง serotype ที่ทำ ให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในคนและในสัตว์ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม นอกจาก *E. coli* O157:H7 แล้ว ยังมี serotype อื่น ๆ เช่น *E. coli* O26:H11, O26:H-, O111:H- โดยในการเกิดโรค เชื้อจะเกาะติดกับเซลล์เยื่อผนัง ลำไส้ และสร้างสารพิษ ที่เรียกว่า Shiga toxin1 และ Shiga toxin2 ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ Shiga toxin ของเชื้อ *Shigella dysenteriae* type I การแพร่กระจายของเชื้อ ใน สัตว์กบ เช่น วัว, ควาย, แพะ และ แกะ จะเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ (reservoirs) ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบในหมูและไก่วง ซึ่งตรวจพบเชื้อทั้งในสัตว์ที่มีสุขภาพแข็งแรง และในสัตว์ที่มี อาการอุจจาระร่วง (สรายุทธ, ม.ป.ป.)

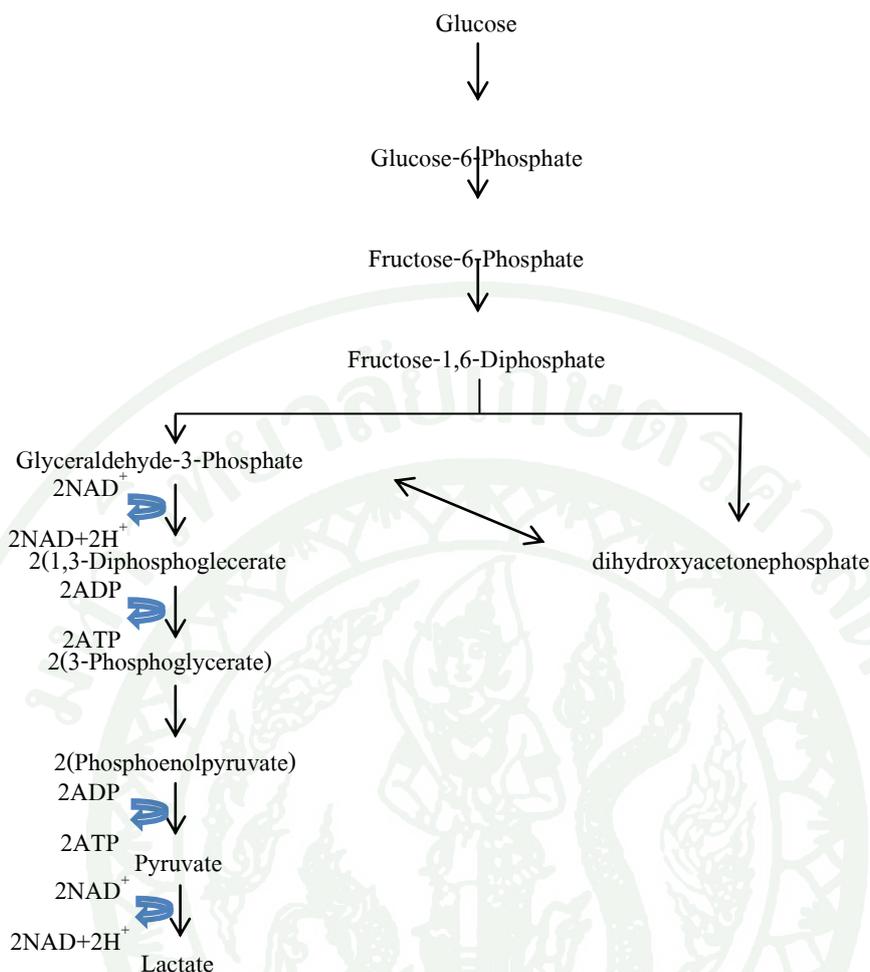
2. แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

2.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถจำแนกตามสมบัติทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะเซลล์รูปร่างกลม ท่อน หรือเรียงตัวเป็นสี่เหลี่ยม สมบัติทางชีวเคมี เช่น การทนเกลือและความเป็นกรด-ด่าง การหมักน้ำตาล ชนิดของกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้น การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การสลายอาร์จินีน การสร้างอะซิโตอิน (acetoin) การทนต่อน้ำดี การสลายเม็ดเลือดแดง ลักษณะการเจริญเติบโตในน้ำนม ชนิดซีโรไลย์ องค์ประกอบของกรดไขมัน และการเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าของเอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) รวมทั้งการจำแนกทางพันธุกรรม ได้แก่ อัตราส่วนของเบสในดีเอ็นเอ และ ลำดับเบส (16sDNA) เป็นต้น (Axeleson, 2004) ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 21 จินัส ได้แก่ *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Oneococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum* และ *Lactosphaera* บางสปีชีส์จัดเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Streptococci* เช่น *Streptococcus fecalis*, *Streptococcus zooepidermicus* ที่ทำให้เกิดโรคโลหิตเป็นพิษในไก่ (จันทนา, 2529; De Vuyst and Vandamme, 1994) การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกตามกระบวนการใช้น้ำตาลกลูโคสสามารถแบ่งเป็น 2 กระบวนการ คือ

2.1.1 Homofermentation

เป็นการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยเอนไซม์ฟอสโฟอินอล-ไพรูเวต-ดีเพนเดนต์ ฟอสโฟทรานส์เฟอเรส ซิสเต็ม (phosphoenol-pyruvate-dependent phosphotransferase system, PEP-PTS) จากนั้นเอนไซม์กลูโคไคเนส (glucokinase) เปลี่ยนกลูโคสให้อยู่ในรูปกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-P) แล้วเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof pathway (EMP) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการหมักเป็นแลคเตต 2 โมเลกุล (ภาพที่ 1)



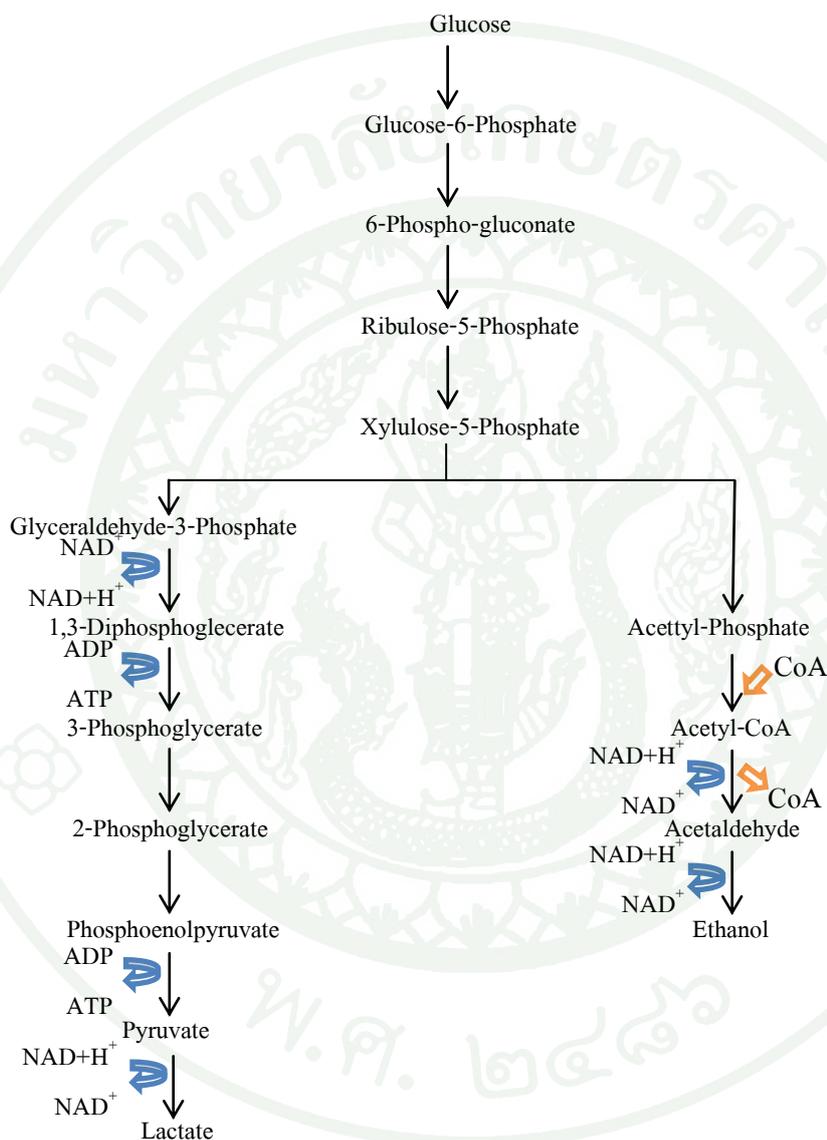
ภาพที่ 1 กระบวนการหมักแบบ Homofermentative

ที่มา: Rees (1997)

2.1.2 Heterofermentation

เป็นกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสโดย 1 หน่วยกลูโคส เปลี่ยนเป็นกรดแลคติก 50 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์อื่น เช่นกรดอะซิติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนฟรุกโทส-1,6-ไดฟอสเฟต (fructose-1,6-diphosphate) เป็นไตรโอส-ฟอสเฟต (triose-phosphate) แต่สามารถนำหมู่คาร์บอนออกมา 1 ตัว (decarboxylation) เปลี่ยน 6-ฟอสโฟ-กลูโคนต (6-phospho-gluconate) เป็นไรโบส-5- ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเอนไซม์ฟอส

โพลีโตเลส (phosphoketolase) ทำการเปลี่ยนไรโบส -5- ฟอสเฟตเป็นไตรโอส-ฟอสเฟต และอะซีทิลฟอสเฟต (acetyl-phosphate) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นแลคเตต และอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ตามลำดับ และอะซีทัลดีไฮด์เปลี่ยนเป็นเอทานอลในที่สุด (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กระบวนการหมักแบบ Heterofermentation

ที่มา: Rees (1997)

แบคทีเรียกรดแลคติกจีนัสแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* sp.) เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ในช่วง 32-53 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) สามารถแบ่งกลุ่มย่อยตามสมบัติทางชีวเคมี สรีรวิทยา และความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ได้เป็น 3 กลุ่ม (Pot *et al.*, 1994)

กลุ่มที่ 1 Obligate homofermentative lactobacilli หรือ *Themobacterium* แลคโตบาซิลลัสกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ ฟรุกโทส-1,6-ไดฟอสเฟต-อัลโดเลส (fructose-1,6-diphosphate-aldolase) ทำให้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติกในปริมาณมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ทำให้ไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทส หรือน้ำตาลกลูโคเนต

กลุ่มที่ 2 Facultatively heterofermentative lactobacilli หรือ *Streptobacteria* สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถีไกลโคไลซิสได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ส่วนในสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสจำกัด สามารถผลิตเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอล ส่วนการหมักน้ำตาลเพนโทส มีเอนไซม์เพนโทสฟอสโฟคีโตเลส (pentose phosphoketolase) เปลี่ยนน้ำตาลเพนโทสเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติก

กลุ่มที่ 3 Obligate heterofermentative lactobacilli หรือ *Betabacterium* แลคโตบาซิลลัสกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์เพนโทสฟอสโฟคีโตเลส สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนน้ำตาลเพนโทสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก และกรดอะซิติก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของแลคติกแบคทีเรียแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกเชื้อยีสแผลโคบาซิลลัส

สมบัติ	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
	Obligate	Facultatively	Obligately
	Homofermentative	heterofermentative	heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโทส	-	+	+
ผลิต CO ₂ จากกลูโคส	-	-	+
ผลิต CO ₂ จากกลูโคเนต	-	+	+
ผลิตเอนไซม์ FDP aldolase*	+	+	-
ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟลิโคเลส	-	+	+
สปีชีส์ที่พบ	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbruckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

หมายเหตุ

+ ให้ผลการทดลองเป็นบวก

- ให้ผลการทดลองเป็นลบ

* เอนไซม์ฟรุกโทส-1,6-ไดฟอสเฟต-อัลโดเลส

ที่มา: Axelsson (1998)

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในทางเดินอาหารไก่

Sarra *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ไก่ พบว่า จินัสที่พบส่วนใหญ่ คือ แผลโคบาซิลลัส โดยปริมาณของแผลโคบาซิลลัสมีอัตราสูงในลำไส้ตอนปลายมีสปีชีส์ที่แตกต่างกันตามสภาวะของแหล่งอาหาร และสิ่งแวดล้อม โดยสปีชีส์ที่พบมาก ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. fermentum* และ *L. reuteri* การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้สภาวะภายในลำไส้เป็นกรด มีค่าพีเอช อยู่ในช่วง 4.2-4.5 ทำให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด

L. salivarius และ *L. acidophilus* จัดเป็นแบคทีเรียชนิด homofermentation สามารถพบได้ในทุกส่วนของลำไส้ ส่วน *L. fermentum* และ *L. reuteri* เป็น heterofermentation ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา แต่แตกต่างที่ปริมาณเปอร์เซ็นต์โมล G+C โดย *L. reuteri* มีเปอร์เซ็นต์โมล G+C ประมาณ 40.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *L. fermentum* มีประมาณ 50.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สมบัติของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากสัตว์ปีก

สมบัติ	Homofermentation		Heterofermentation	
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. fermentum</i>
การใช้น้ำตาล				
- ไรโบส (ribose)	-	-	+	+
- แมนโนส (mannose)	+	+	-	-
- เซลโลไบโอส (cellobiose)	-	-	+	+
- ทรีฮาโลส (trehalose)	+	-	-	-
- อะมิกดาลิน (amigdaline)	-	+	-	-
- ซาลิซิน (salicin)	←	+	-	-
- ซอร์บิทอล (sorbital)	+	+	-	-
- แมนนิทอล (manitol)	+	-	-	-
การผลิต CO ₂ จากกลูโคส	-	-	+	+
การผลิต NH ₃ จากอาร์จินิน	-	-	+	+
การสลายเอสคูลิน (aesculin)	←	+	-	-
รูปแบบ (form) กรดแลคติก	L(+)	DL	DL	DL
เปอร์เซ็นต์โมล (G+C)	35.3←0.7	35.8-43.3	40.4←0.3	50.4←0.7

หมายเหตุ - ไม่สามารถใช้ได้
 - สามารถใช้ได้
 ← ไม่สามารถใช้ได้บางส่วน

ที่มา: Sarra *et al.* (1992)

ปรียดา (2550) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่ทั้งหมด 194 สายพันธุ์ พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกอยู่ในแต่ละส่วนทางเดินอาหาร ดังนี้ ในลำไส้เล็กส่วนต้น(duodenum) พบ *L. fermentum* KUB-D18, KUB-D39, KUB-D73 *L. reuteri* KUB-D28 *Lactobacillus* sp. KUB-D26 ลำไส้เล็กส่วนกลาง(jejunum) พบ *L. salivarius* KUB-J61, *L. fermentum* KUB-J92 และลำไส้เล็กส่วนปลาย(ileum) *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49 และไส้ติ่ง (ceacum) *L. fermentum* KUB-C33 *Lactobacillus* sp. KUB-C44 โดยแลคโตบาซิลลัสทั้ง 11 สายพันธุ์ สามารถทนต่อน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 3% ทนต่อ พีเอช ช่วงกว้าง 2-8 สามารถผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase ได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.997-3.538 Units/ml และมีความสามารถในการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ โดยมีประสิทธิภาพการยึดติดอยู่ในช่วง 58.46-79.05% นอกจากนี้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Sh. dysenteriae*, *S. Enteritidis* DMST 17368, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *V. parahaemolyticus* และ *Campyrobacter jejuni* ได้

2. สารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถผลิตสารยับยั้งได้หลายชนิด เช่น การผลิตกรดอินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์หมักมีพีเอชลดลงเนื่องจากกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดฟอรั่มิก หรือการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล (Lindgren and Dobrogosz, 1990) แต่กลไกหรือปฏิกิริยาในการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้น มีความซับซ้อนเนื่องมาจากการทำงานร่วมและส่งเสริมกันระหว่างสารประกอบหลายๆ ชนิด มีงานทดลองที่ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกความแตกต่างของสารยับยั้งแต่ละชนิดในระดับห้องปฏิบัติการ แต่การศึกษาถึงความซับซ้อนของระบบการยับยั้งในสิ่งแวดล้อมหรือในอาหารคนและอาหารสัตว์ที่ใช้จริงยังมีข้อมูลน้อย

3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดแลกติกเป็นส่วนส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตขึ้น และทำให้พีเอชลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ทนกรด (Eklund, 1984) นอกจากนั้นยังพบว่าในรูปของกรดไม่แตกตัวมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะเกิดการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ จากนั้นจึงแตกตัวแล้วปลดปล่อย H^+ -ions มีผลให้ไซโตพลาสซึมภายในเซลล์เกิดสภาวะที่เป็นกรด ส่งผลให้เสียสมดุลความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้แรงขับเคลื่อนโปรตรอนถูกทำลาย ซึ่งจะขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เซลล์จึงไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ (Axelsson, 1998; Piard *et al.*, 1992) ทำให้เกิดการยับยั้งและทำให้จุลินทรีย์ที่ไวต่อกลไกนี้ตายได้

กรดอินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกส่วนใหญ่ได้แก่ กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ในกระบวนการหมักแบบ homofermentative ได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ในกระบวนการหมักแบบ heterofermentative นอกจากสามารถผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์แล้ว ยังได้ผลผลิตที่เป็นกรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกในปริมาณต่ำ โดยกรดทั้งสองนี้มีค่า pK_a สูงกว่ากรดแลกติก และมีสัดส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวสูง ในสภาวะค่าพีเอชต่ำ กรดที่มีค่าคงที่การแตกตัวสูง (pK_a) สามารถอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่า pK_a ต่ำ ดังนั้นค่าพีเอชที่เท่ากัน กรดอะซิติก ($pK_a=4.87$) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลกติก ($pK_a=3.08$) (Earnshaw, 1992)

กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกจะมีฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ผลการทำงานของกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกนั้นจะขึ้นกับ ระดับพีเอชที่ลดลงเนื่องมาจากกรดแลกติกด้วย (Schnürer and Magnusson, 2005) แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตกรดแลกติกอยู่ในรูปแบบแอล (L-form) และรูปแบบดี (D-form) โดยแอล-แลกติกสามารถทำลายแบคทีเรีย รวมถึงเชื้อราและยีสต์ (Yang, 2000) นอกจากนี้ในการศึกษาการทำงานร่วมกันของกรดแลกติกกับกรดอะซิติก ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhimurium* พบว่า การทำงานร่วมกันของกรดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าการยับยั้งด้วยกรดเพียงชนิดเดียว (Rubin, 1978)

Murry *et al.* (2004) พบว่าการหมักคาร์โบไฮเดรตของ *L. salivarius* และ *L. plantarum* ซึ่งเป็นโพรไบโอติกทางการค้า ทำให้ ฟิเชซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไก่ลดลง เนื่องจาก กรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก และกรดแลคติก ส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *Clostridia perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไก่ได้

3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารประกอบที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยการทำงานของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) ทำการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน จาก NADH ไปให้ออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากไพรูเวตออกซิเดส (pyruvate oxidase) และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตออกซิเดส (α -glycerophosphate oxidase) ตามลำดับ และยังพบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในขั้นตอนการเปลี่ยนแลคเตตเป็นไพรูเวต โดยเอนไซม์แอล-แลคเตตออกซิเดส (L-lactate oxidase) และดี-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (NAD-independent D-lactate dehydrogenase) (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเกิดการแตกตัวของ H_2O_2 ให้ O_2^- และ OH^- ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ มีผลทำให้โปรตีนในชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรน และโปรตีนภายในเซลล์ของแบคทีเรียถูกออกซิไดซ์ที่หมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group) โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์จึงเปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันบริเวณไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สารจากภายนอกสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Kong and Davidson, 1980) ทำให้เซลล์ตาย แต่ในแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการรีดิวซ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (NADH peroxidase) และซูโดคะตะเลส (Mn^{2+} pseudocatalase) (Fortaine *et al.*, 1996)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยในแบคทีเรียแกรมบวกเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบยับยั้งแบบทำลาย (bacteriocidal) (Conner, 1993; Ouwehand, 1998) การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Lactococcus* สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* และเชื้ออื่นๆ ที่เป็นเชื้อก่อโรคในอาหาร (Cord and Dychdala, 1993) ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ทำให้เปลี่ยนสารไทโอไซยานเนตเป็นไฮโปไทโอไซยานเนต (OSCN⁻) และเพิ่มหมู่กรดออกซิ (oxyacid) มากขึ้นเป็น O₂SCN⁻ และ O₃SCN⁻ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 กระบวนการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ปฏิกิริยา	เอนไซม์
$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	NADH:H ₂ O ₂ oxidase
$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Superoxidase dismutase
$\text{Pyruvate} + (\text{PO}_4^{4-})^3 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Acetyl-phosphate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Pyruvate oxidase
$\text{D-glycerophosphate} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Dihydroxyacetonephosphate} + \text{H}_2\text{O}_2$	D-glycerophosphate oxidase
$\text{Lactate} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Pyruvate} + \text{H}_2\text{O}_2$	L-lactate oxidase
$\text{Lactate} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Pyruvate} + \text{H}_2\text{O}_2$	NAD-independent D-lactate dehydrogenase
$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	NADH peroxidase
$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Mn ²⁺ pseudocatalase

ที่มา: De Vuyst and Vandamme (1994)

3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentative สามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคสในขั้นตอนดีคาร์บอกซิเลชัน พบน้ำตาลฟรุกโทส-1,6-ไดฟอสเฟต เปลี่ยนเป็นไรโบส-5-ฟอสเฟต ส่วนกลุ่ม homofermentation สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากสารประกอบซิเตรทและมาเลต (malate) หรือจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคาร์บอนไดออกไซด์ เกิดจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปแทนที่ก๊าซออกซิเจน ทำให้ความเป็นกรดเบสทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายในที่สุด (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

Wager and Moberg (1989) ทำการทดลองการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าเมื่อใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์และเมื่อใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20-50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

3.4 ไดอะซีทิล (diacetyl)

ไดอะซีทิลเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของซิเตรท โดยซิเตรทเปลี่ยนเป็นไพรูเวตและไดอะซีทิล ตามลำดับ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่จับกับหมู่อาร์จินิน (arginine-binding protein) ของแบคทีเรียและขัดขวางการใช้อาร์จินินภายในเซลล์ (Jay, 1982) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อยีสต์ต้องใส่ปริมาณไดอะซีทิล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกใช้ไดอะซีทิลปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นมากกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Jay, 1982) Motlagh *et al.* (1991) พบว่าไดอะซีทิลปริมาณ 334 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้ง *Salmonella anatum*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, และ *Aeromonas hydrophila* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Listeria*

ไคอะซิติลเป็นสารที่มีกลิ่น ให้กลิ่นรสในเนย เนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมหมัก นอกจากนี้ยังพบในไวน์ขาว บรันดี กาแฟคั่ว หนุ้าหมัก และอาหารหมักชนิดอื่นๆ (De Vuyst and Vandamme, 1994) เนื่องจากไคอะซิติลที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้ปริมาณมากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณที่ผู้บริโภคให้การยอมรับ (acceptable sensory) อยู่ในช่วง 2-7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการนำไคอะซิติลใส่ในอาหารเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงจึงมีข้อจำกัดด้านกลิ่น (Earnshaw, 1992) อย่างไรก็ตามไคอะซิติลสามารถใช้เป็นสารฆ่าเชื้อสำหรับพื้นผิวต่างๆ หรือเครื่องมือในการผลิตอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร (Jay, 1982)

3.5 กรดไขมัน (fatty acid)

Lactobacillus และ *Lactococci* สามารถผลิตกรดไขมันที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา ความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่คาร์บอน ความเข้มข้น และค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อม โดยกรดไขมันอยู่ในรูปไม่แตกตัว มีประจุบวก (Kabara, 1993)

Silva *et al.* (1987) ทำการแยกสารยับยั้งจากเชื้อ *Lactobacillus casei* GG พบว่ามีโครงสร้างเบื้องต้นเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ (short chain fatty acids SCFA) ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แสดงค่ากิจกรรมการยับยั้งได้ดีในค่าพีเอช 3-5 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* และ *Bifidobacterium* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus* ในสปีชีส์เดียวกันได้

แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถผลิตกรดไขมัน (Fatty acids) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และมีผลต่อคุณภาพของกลิ่น รสของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก และพบว่ามีการผลิตกรดไขมันจำนวนหนึ่งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมหมัก Woolford (1975) ได้ทดลองเกี่ยวกับความยาวของสายโซ่ของกรดไขมัน ที่ผลต่อความสามารถในการยับยั้ง คือเมื่อความยาวของสายโซ่เพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งก็จะเพิ่มขึ้นด้วย caprylic acid (C_8) และพวกกรดไขมันที่เป็นสายยาวนั้นมีความสามารถในการยับยั้งได้ดี แต่หากยาวมากกว่า 10 คาร์บอนขึ้นไปจะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ลดลง

3.6 แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin)

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนหรือเปปไทด์ที่สร้างโดยกระบวนการทางไรโบโซม (De Vuyst *et al.*, 1994; Cotter *et al.*, 2005; Klaenhammer, 1993) มีการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 โดย Gratia ตัวแรกที่พบคือ colicin สร้างโดย *E. coli* CA7 ต่อมาในปี 1953 Jacob *et al.* พบสารประกอบคล้ายโคลิซิน (colicin-like substance) ในแบคทีเรียแกรมบวก เรียกว่า “แบคทีเรียโอซิน” หลังจากนั้นก็มี การค้นพบแบคทีเรียโอซินอีกหลายชนิดในเวลาต่อมา ส่วนใหญ่ผลิตมาจากแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากกลุ่มนี้แล้วยังมีแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *Bacillus coagulans* (Hyronimus *et al.*, 1998) *B. polyfermenticus* (Lee *et al.*, 2001) *B. cereus* (Oscariz and Pisaborro, 2002) *E. coli* (Braun *et al.*, 1994) *Staphylococcus aureus* (Netz *et al.*, 2002) *St. warneri* (Sashi *et al.*, 2000) และ *Xanthomonas carpestris* (Heu *et al.*, 2001) เป็นต้น

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอซิน มีสองกลไก แบบแรกคือการฆ่า (bactericidal) เช่น plantaricin KW 30 (Kelly *et al.*, 1996) acidocin J 1229 (Tahara and Kanatani, 1996) เป็นต้น ในขณะที่แบคทีเรียโอซินบางชนิดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดย ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายหยุดการเจริญ (bacteriostatic) เช่น แบคทีเรียโอซินจาก *L. sake* 148 (Sobrinho *et al.*, 1991) แต่กลไกการยับยั้งอาจเปลี่ยนแปลงได้เมื่อสภาวะต่างกัน จากการศึกษาของ Schillinger *et al.* (1991) พบว่ามีแบคทีเรียโอซินบางชนิดเมื่อศึกษาในระบบที่เป็นแบบจำลอง (model system) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการฆ่า แต่เมื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตอาหารกลับไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยหยุดการเจริญของจุลินทรีย์

แบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างจำเพาะ คุณสมบัตินี้เป็นลักษณะที่ทำให้แบคทีเรียโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารพวกนี้เป็นการยับยั้งแบบไม่จำเพาะ ซึ่งการยับยั้งแบบจำเพาะของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากการจับกับตำแหน่งจำเพาะ (specific binding site หรือ specific receptor) ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอซิน นอกจากนี้การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายสายพันธุ์ หรือยับยั้งได้อย่างจำกัด แต่โดยทั่วไป การยับยั้งมักเกิดกับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเปอร์เซ็นต์ G+C ต่ำ และในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าเกิดจากการรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Cotter *et al.*, 2005)

แบคทีเรียโอซินประกอบด้วยเปปไทด์และโปรตีน ซึ่งสามารถจัดกลุ่ม แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 4 กลุ่ม (Cotter *et al.*, 2005)

กลุ่มที่ 1 แลนไทไบโอติก (lantibiotic)

แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นเปปไทด์สายสั้น (ความยาวประมาณ 19-38 กรดอะมิโน) ประกอบด้วยอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไทโอนิน (lantionine) แอลฟา-เมทิลแลนไทโอนิน ดีไฮโดรอลานิน (dehydroalanine) และ ดีไฮโดรบิวทีรีน (dehydro-butyryne) แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ยังสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ group Ia และ group Ib bacteriocins โดยอาศัยโครงสร้างทางเคมีและกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์

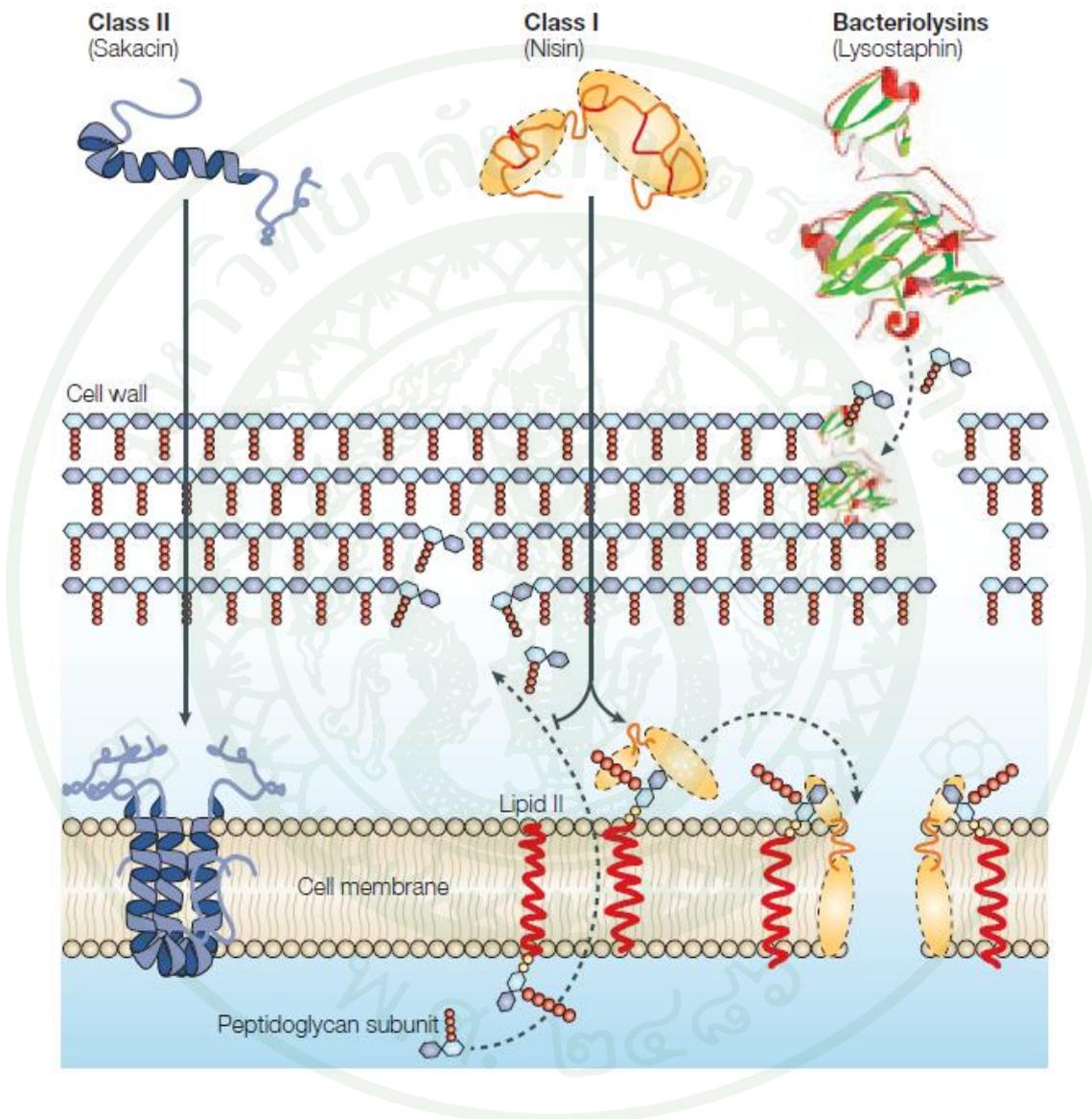
กลุ่ม Ia เป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (elongation) มีประจุทั้งหมดเป็นบวก (net positive charge) เช่น nisin กลไกการยับยั้งคือ ทำให้เกิดรูพรุนที่ผิวของแบคทีเรีย ทำให้สูญเสียการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการไหลออกของสารเมตาบอไลต์ขนาดเล็ก

กลุ่ม Ib เป็นเปปไทด์รูปร่างกลม (globular) และมีประจุลบปนอยู่หรือไม่มีประจุ (no net charge) เช่น mutacin A, mersacidin, actagardin และ cinnamycin เป็นต้น การยับยั้งเกิดจากการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์จำเพาะของเซลล์แบคทีเรีย ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์

นอกจากนี้ยังมีแลนไทไบโอติกที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น Lacticin 3147 ซึ่งเป็นแลนไทไบโอติกที่ประกอบด้วยเปปไทด์สองสาย การทำงานเกิดจากการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ทั้งสอง นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้มีสมบัติหลากหลาย การจัดกลุ่มย่อยของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ทำได้ยาก ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้มีข้อเสนอว่าให้แบ่งแลนไทไบโอติกออกเป็น 11 กลุ่ม ตามรหัสพันธุกรรมของ pro-peptide ที่ไม่ถูกตัดแปลง (Cotter *et al.*, 2005)

ถึงแม้ว่าจะยังไม่ทราบกลไกการทำงานของที่แน่ชัดของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มแลนไทไบโอติกได้ทุกตัว แต่พบว่ากลไกเกี่ยวข้องกับโมเลกุลหรือเซลล์เป้าหมายในชั้นไลปิด II ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ตัวอย่างเช่น ไนซินจับกับไลปิด II จากนั้นขัดขวางไม่ให้เกิดการสังเคราะห์ peptidoglycan ทำให้สารภายในเซลล์ ถูกปล่อยออกมาออกเซลล์ และทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ระบบการลำเลียงสารทำให้ไม่สมดุล ทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด (Breukink *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2004; Brotz *et al.*, 1998) โครงสร้างของไนซินมีส่วน N-Terminal ช่วยให้

โนซินจับกับ pyrophosphate ในไลปิด II (Hsu *et al.*, 2004) นอกจากนี้ส่วน C-Terminal และส่วน hinge region มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดเกิดรูพรุน (Wiedemann *et al.*, 2001; van Heusden *et al.*, 2002) กลไกการยับยั้งแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของแบคทีริโอซิน

ที่มา: Cotter *et al.* (2005)

กลุ่มที่ 2 นอน-แลนไทโอบิติก (non-lantibiotic)

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน หนอณภูมิตั้งแต่ 100 – 121 องศาเซลเซียส ไม่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส การทำงานของแบคทีเรียโอซินกลุ่ม 2 นี้ ับกระบวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดการไหลออกขององค์ประกอบภายในเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ทำให้ตายในที่สุด แสดงในภาพที่ 3 โดยสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

กลุ่ม 2a (pediocin-like หรือ Listeria-active) กลุ่มนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ (antilisterial bacteriocins) มี consensus sequence YGNGV (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val) ที่บริเวณ N-terminus และฆ่าเซลล์เป้าหมายโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เซลล์เป้าหมายตายในที่สุด เนื่องจากเซลล์เป้าหมายไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ของสารและไอออนต่างๆ ได้ แบคทีเรียโอซินกลุ่มย่อยนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 37-48 residues ได้แก่ leucocinA, mesentericin (Hastings *et al.*, 1991; Hechard *et al.*, 1992) และ canobacteriocin B2 (Quadri *et al.*, 1994) นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ยังได้แก่ pediocin PA-1, Pediocin AcH (Bennik *et al.*, 1997) เป็นต้น

กลุ่ม 2b กลุ่มนี้ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สาย เช่น enterocin L50A ต้องทำงานร่วมกับ enterocin L50B lactococcinG α ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin G β (Meyer *et al.*, 1992) และ lactococcin M ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin N เป็นต้น

กลุ่ม 2c bacteriocins ประกอบด้วยแบคทีเรียโอซินที่ไม่สามารถจัดอยู่ในสองแบบก่อนหน้านี้ได้ ได้แก่ ไทออลเปปไทด์ (thiol-activated peptides) หรือแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเป็นวง (cyclic peptides) เช่น เอนเทอโรซิน AS-48 (enterocin AS-48) (Folli *et al.*, 2003) กาสเซอร์ซินเอ (gassericin A) (Kawai *et al.*, 1994)

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียโไลซิน (bacteriolysin)

Cotter *et al.* (2005) รายงานว่าแบคทีเรียโไลซินกลุ่มที่ 3 มีลักษณะไม่ทนความร้อน (heat labile) ขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30kDa แบคทีเรียโไลซินกลุ่มนี้มีโครงสร้างแบบ domain-type ซึ่งเกี่ยวข้องกับตำแหน่งการจับของตัวรับ และการฆ่าเซลล์เป้าหมาย ปัจจุบันมีการศึกษาพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโไลซินชนิดนี้เพียงสี่ชนิด (Joerger and Klaenhammer, 1990; Simmonds *et al.*, 1997; Hickey *et al.*, 2003; Nilsen *et al.*, 2003; Beukes *et al.*, 2000) กลไกการทำงานของแบคทีเรียโไลซินกลุ่มนี้แตกต่างจากแบคทีเรียโไลซินชนิดอื่น คือทำให้เกิดการย่อยที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายที่ไวต่อแบคทีเรียโไลซินชนิดนี้ ดังภาพที่ 3 โดยโปรตีนชนิดนี้อยู่ในส่วนโครงสร้างและมีส่วน catalytic domain ที่ส่วน N-terminus และ C-terminus อาจเป็นส่วนจดจำต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย (Lan *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005) ซึ่งทั้งหมดนี้แตกต่างจากแบคทีเรียโไลซินที่แท้จริง ตรงที่ไม่มียีนภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity gene) บนยีนแบคทีเรียโไลซิน โดยแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโไลซินมีการป้องกันตนเองต่อแบคทีเรียโไลซิน โดยมีการปรับแต่งของผนังเซลล์เพื่อป้องกันตัวเอง ได้แก่ lysostaphin และ enterolysin A (Lan *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005)

กลุ่ม 4 แบคทีเรียโไลซิน โครงสร้างเชิงซ้อน

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโไลซินที่มีโครงสร้างเป็น glycoprotein เช่น Lacticin 27 และโครงสร้างแบบ lipo protein ตัวอย่างเช่น lactostrepcins (Nes *et al.*, 1996)

3.7 สารยับยั้งน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low-molecular weight compounds)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งโมเลกุลต่ำที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 1,000 ดาลตัน และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ข้ามสายพันธุ์ (broad spectrum) (Davidson and Hoover, 1993) สารแลคโตซิดิน (lactocidin) จาก *L. acidophilus* (Gilliland and Speck, 1997) สมบัติของสารทำงานในค่าพีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้ง *St. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* และ *C. perfringen* นอกจากนี้ สารอะซิโดลิน (acidolin) จาก *L. acidophilus* 2181 (Hamdan and Mikolajcik, 1974) มีมวลโมเลกุลประมาณ 200 ดาลตัน ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบรวมถึงกลุ่ม Enteropathogens และกลุ่มแบคทีเรียสร้างสปอร์ แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก

สารบูลการิเคน (bulgarican) จาก *L. bulgaricus* DDS14 (Reddy *et al.*, 1983) แสดงกิจกรรมยับยั้งในค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดและเสถียรที่ค่าพีเอช 2.2 ทนร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Proteus vulgaricus*, *Sarcina lutea*, *St. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* และ *Serratia marcescense* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีสารยับยั้งโมเลกุลต่ำอื่น ๆ สรุปได้ดังตารางที่ 5



ตารางที่ 5 สารยับยั้งโมเลกุลเล็กที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลแลคโตบาซิลลัส

สายพันธุ์	สารยับยั้ง	มวล โมเลกุล (ดาลตัน)	สายพันธุ์ที่เชื้อยับยั้ง	แหล่งที่มา
<i>Lactobacillus</i> sp.				
<i>L. acidophilus</i> isolate from mammalian intestine	Lactocidin	ND	Wide spectrum*	Vincent <i>et al.</i> (1959)
<i>L. acidophilus</i> DDS1	Acidophilin	ND	Wide spectrum	Vaki and Shahani (1965)
<i>L. acidophilus</i> 2181	Acidolin	~200	Enteropathogenic organisms Sporeformers bacteria	Hamdan and Mikolajcik (1974)
<i>L. brevis</i>	Lactobrevin	ND	Wide spectrum	
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> strains	Mixture of small antibiotics, peptide and organic acid	↑1000	<i>E. coli</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Kavasnikov and Sudenko (1967)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bugaricus</i> DDS14	Bulgarican	ND	Wide spectrum	
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bugaricus</i> 7994	Aromatic group	↑700	<i>Pseudomonas fragi</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Lortie <i>et al.</i> (1993) Reddy <i>et al.</i> (1983) Abdel-Bar <i>et al.</i> (1987)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

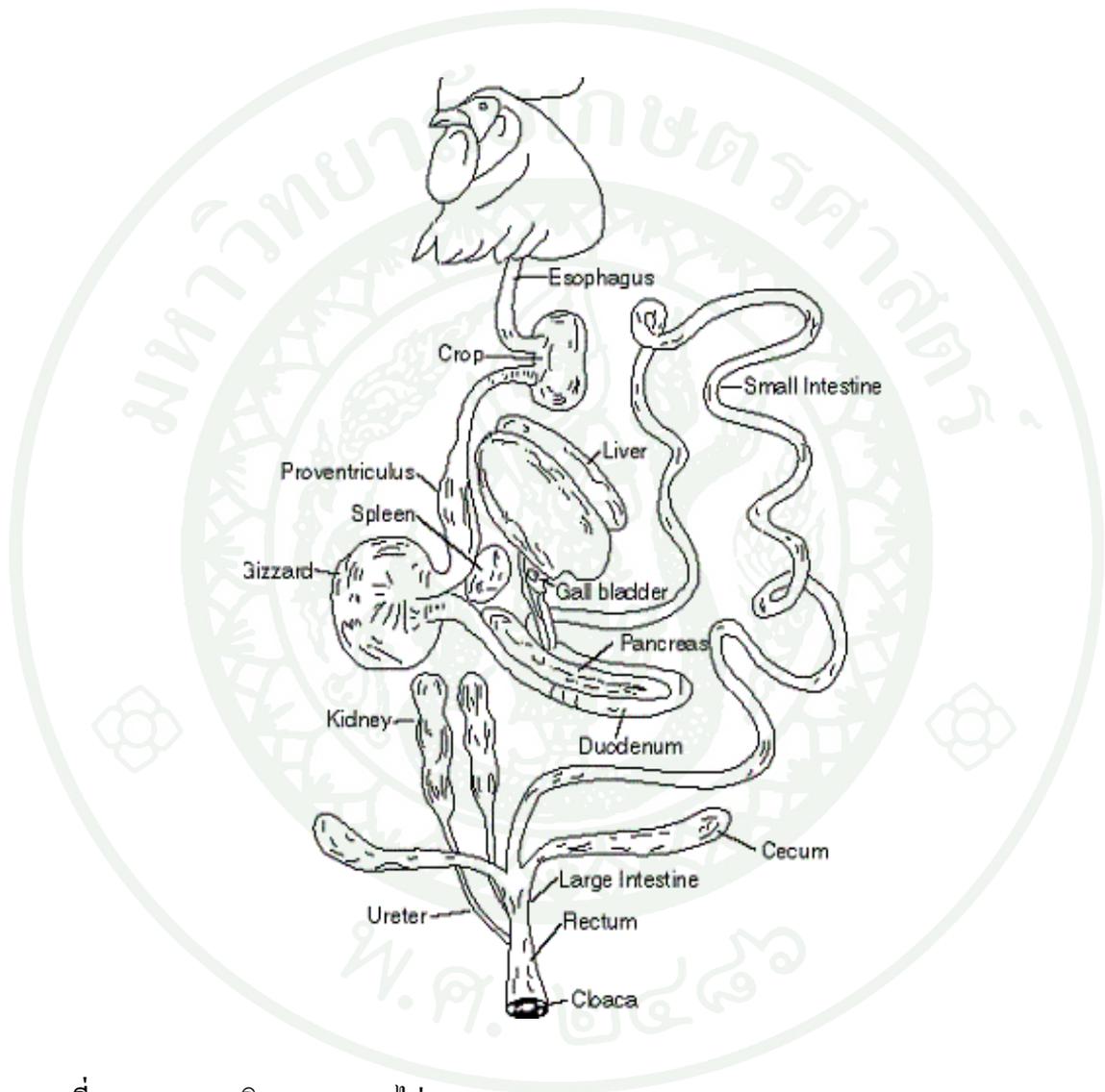
สายพันธุ์	สารยับยั้ง	มวล โมเลกุล (ดาลตัน)	สายพันธุ์ที่เชื้อยับยั้ง	แหล่งที่มา
<i>L. plantarum</i> isolate from fish		700-1500	Wide spectrum	Schroder <i>et al.</i> (1979)
<i>L. plantarum</i> A2	Lactolin	ND	Wide spectrum	Kodama (1952)
<i>L. plantarum</i> VTT E-78076	Containing several low molecular mass compounds	↑700	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Fusarium avenaceum</i>	Niku-Paavola <i>et al.</i> (1999)
<i>L. reuteri</i>	Reuterin	↑200	<i>Salmonella, Shigella, Listeria, Clostridium, Staphylococcus</i> Yeast, Mold and protozoa	Talarico and Dobrogosy (1989)
	Reutericyclin	349	<i>Lactobacillus, Bacillus subtilis, B. cereus, Enterococcus faecalis, S. aureus, Listeria innocua</i>	Ganzle <i>et al.</i> (2000)

หมายเหตุ *สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก และแกรมลบ
ND = ไม่มีการระบุ

ที่มา: De Vuyst and Vandamme (1994)

3. สรีรวิทยาระบบทางเดินอาหารของไก่

ลักษณะทางเดินอาหารของไก่ หมายถึงช่องทางที่อาหารที่ไก่กินเข้าไป เริ่มจากปากจนถึงทวารหนัก ภาพที่ 4 แสดงทางเดินอาหารของไก่ประกอบด้วยส่วนต่างๆ (Acker and Cunningham, 1991)



ภาพที่ 4 ระบบทางเดินอาหารของไก่

ที่มา: Acker and Cunningham (1991)

สภาพแวดล้อมภายในลำไส้ของสัตว์ส่งผลต่อระบบนิเวศน์วิทยาในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้มีความสามารถในการทนต่อน้ำย่อย เอนไซม์ และการดูดซึมในลำไส้ที่แตกต่างกัน ความต้องการอาหารเพื่อทำกิจกรรมต่างกัน การเจริญเติบโตจึงแตกต่างกันออกไป (Wagner and Thomas, 1987; Savory, 1992) ความหลากหลายของจุลินทรีย์สามารถพบได้ตลอดทางเดินอาหาร ระบบนิเวศน์ของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารไก่อเริ่มหลังจากฟักออกจากไข่ ในวันที่สามหลังจากฟักเริ่มพบจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *faecal streptococi* และ *coliforms* ในทุกๆส่วนของทางเดินอาหาร (Barnes *et al.*, 1980; Coloe *et al.*, 1984)

4.1 ปาก (mouth) เป็นส่วนที่รับอาหารเข้าสู่ร่างกายและทำหน้าที่ในการบดอาหารด้วยวิธีการที่ไม่มียิมฝีปาก ฟันและแก้ม แต่จะมีจะงอยปากเพื่อใช้ในการจิกอาหารและฉีกอาหาร ในปากจะมีต่อมน้ำลายเพื่อทำให้ปากมีความชุ่มชื้นและช่วยในการคลุกเคล้าและกลืนอาหารลงสู่หลอดอาหาร น้ำลายเป็นด่างและมีเอนไซม์ ptyalin ซึ่งย่อยแป้งเป็นน้ำตาล อาหารจะผ่านส่วนนี้เป็นเวลาสั้นๆ ซึ่งกิจกรรมการย่อยโดยเอนไซม์นี้เกิดขึ้นที่ส่วนนี้เพียงเล็กน้อย

4.2 กระเพาะพัก (crop) อาหารเคลื่อนที่จากปากมาสู่ส่วนหลอดอาหาร (esophagus) จากนั้นเคลื่อนลงมาสู่กระเพาะพัก ซึ่งเป็นส่วนของหลอดอาหารที่ขยายตัวเป็นถุง ทำหน้าที่ในการเก็บกักอาหาร ระยะเวลาที่อาหารจะอยู่ในกระเพาะพักขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร ปริมาณอาหารที่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกิ้น (gizzard) อาหารที่อยู่ในส่วนกระเพาะพักจะนิ่มลงและเอนไซม์ ptyalin จากปากทำงานต่อเนื่องในส่วนนี้ ในกระเพาะพักจะไม่มีการสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยอาหาร

4.3 กระเพาะอาหาร (stomach) กระเพาะไก่อแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือกระเพาะส่วนหน้า เรียกว่ากระเพาะจริง (proventriculus) หรือ glandular stomach ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ pepsin และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) โดย HCl ทำให้ โปรตีนเสียสภาพและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ pepsin ในการย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง กระเพาะจริงมีขนาดเล็กและกักเก็บอาหารได้เล็กน้อย ดังนั้นอาหารจะผ่านไปสู่ส่วนต่อไปอย่างรวดเร็ว กระเพาะส่วนหลังเรียกว่ากระเพาะบด (gizzard) หรือ muscular stomach เป็นอวัยวะที่มีผนังกล้ามเนื้อหนา แข็งแรง สามารถบดตัวได้ด้วยแรงหลายร้อย ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารแทนฟันทำให้อาหารมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้อาหารสามารถสัมผัสกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น การเสริมก้อนกรวดลงในอาหารจะทำให้กระเพาะ

บดทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้น กระเพาะส่วนหลังประกอบด้วยน้ำ 50% และไม่มีการผลิตเอนไซม์ (วิทธีวัช, 2540; สาทโรช, 2542) เมื่ออาหารถูกย่อยจนมีขนาดเล็กลงแล้วอาหารจะถูกลำเลียงเข้าสู่ลำไส้เล็กต่อไป

4.4 ลำไส้เล็ก (small intestine) มีความยาว 62 นิ้วเป็นส่วนที่มีความยาวมากที่สุดในระบบทางเดินอาหารของไก่ ลำไส้เล็กทำหน้าที่สำคัญในการย่อยและการดูดซึมอาหารเข้าสู่ร่างกายเพราะที่ผนังภายในลำไส้เล็กจะมีส่วนที่ยื่นออกมาเรียกว่า villi จำนวนมากเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสารอาหารให้เป็นสารอาหารที่มีขนาดเล็กและจะทำการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อเลี้ยงส่วนต่างของร่างกายต่อไป ส่วนลำไส้เล็กจะเริ่มเกิดระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ในสัปดาห์ที่สอง จุลินทรีย์ที่พบในส่วนนี้ได้แก่ *faecal streptococci* และ *coliform* ในช่วงอายุ 40 วันหลังจากนั้น จุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* ค่อยๆเพิ่มจำนวนขึ้นและกลายเป็นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในทางเดินอาหารส่วนนี้ (Smith, 1965; Coloe *et al.*, 1984) นอกจากนี้ Gong *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2006; Dumonceaux *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2003 ได้มีการรายงานถึงชนิดจุลินทรีย์ที่พบในแต่ละส่วนของลำไส้เล็กระหว่างสัปดาห์ที่ 2-7 โดยลำไส้เล็กแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนดังนี้

4.4.1 ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) มีตับอ่อนที่ผลิตน้ำย่อย ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipase) และทริปซิน (trypsin) ส่วนนี้เกิดการย่อย ส่วนนี้มีน้ำดีที่เป็นน้ำสีเขียวขุ่นที่ผลิตจากตับ ช่วยให้ไขมันเป็นสารแขวนลอย ทำให้ lipase ทำงานได้ดีขึ้น จุลินทรีย์ที่พบได้แก่ *Actinobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium sp.*, *Gemmiger sp.* (Gong *et al.*, 2001; 2006; Dumonceaux *et al.*, 2006)

4.4.2 ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) นอกจากมีการดูดซึมสารอาหารมากที่สุดแล้วยังมีการดูดกลับของน้ำดี ในส่วนนี้มี mucosal cell ที่มีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตและเปปไทด์ที่จำเพาะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายออกมา จุลินทรีย์ที่พบได้แก่ *Actinobacterium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Eubacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Macroccoccus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Weissella sp.*, *Pseudomonas sp.* (Gong *et al.*, 2001 2006; Dumonceaux *et al.*, 2006)

4.4.3 ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) เป็นส่วนสุดท้ายที่มีการดูดซึมของสารอาหาร (สาโรช, 2542; ประภาพร, 2545) อาหารที่ออกจากมาจาก gizzard จะมีความเป็นกรดสูง แต่จะมีความเป็นด่างเพิ่มมากขึ้นเมื่อเดินทางผ่านส่วนของ jejunum และ ileum เนื่องจากการทำงานของน้ำดี พบ *Actinobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp., *Globicatella* sp., *Lactobacillus* sp., *Macrocooccus* sp., *Pediococcus* sp., *Ruminococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacteroid* sp., *Escherichia coli*, *Fusobacterium* sp. (Gong *et al.*, 2002; 2006; Dumonceaux *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2003)

4.5 ไส้ติ่ง (caecum) ไก่มีไส้ติ่ง 2 อัน มีลักษณะเป็นถุงขยายใหญ่เชื่อมต่อกับทางเดินอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กกับลำไส้ใหญ่ เป็นส่วนสุดท้ายสำหรับการย่อยอาหารซึ่งเกิดการหมักย่อยเยื่ออาหารโดยแบคทีเรีย มีค่า พีเอช 5.8 (van der Wielen *et al.*, 2000) นอกจากนี้ไส้ติ่งยังทำหน้าที่ในการดูดกลับของน้ำ

พบความหลากหลายของจุลินทรีย์มากในส่วนไส้ติ่ง (caecum) ที่การย่อยเกิดจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในส่วนนี้ช่วยลดการเกิดโรคลงได้ (Barrow, 1992) caecum เป็นส่วนที่มีการย่อยจากการหมักของจุลินทรีย์นั้นเกิดชุมชนของจุลินทรีย์ใน 6-7 สัปดาห์ (Coloe *et al.*, 1984) ประกอบไปด้วยพวก facultative และ strictly anaerobic ได้แก่ faecal streptococci, clostridia, enterobacteria, pediococci และบางครั้งอาจพบ *Pseudomonas aeruginosa* ได้บ้าง จุลินทรีย์เหล่านี้มาจากอาหารน้ำที่ทานเข้าไป ชนิดของจุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งหลังวันที่ 40 ชนิดของจุลินทรีย์เริ่มคงที่ Van der Wielen *et al.* (2002) รายงานว่าอายุเป็นปัจจัยหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในส่วน caecum

การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ในการศึกษาระบบนิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารพบว่า ในทางเดินอาหารส่วน caecum ในไก่โตมักพบจุลินทรีย์กลุ่ม Clostridiaceae 65% เป็นประชากรส่วนใหญ่ โดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ *Fusobacterium* 14% *Lactobacillus* 8% และ *Bacteroides* 5% ซึ่งในกลุ่มหลังนี้ พบว่ามี *Pseudomonas* spp. และกลุ่ม *Bifidobacterium infantis* ในปริมาณน้อยกว่า 2% จากทั้งหมด ส่วนในไก่เด็กที่มีอายุน้อยกว่า 14 วัน จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้เล็กและ caeca เป็นพวก *Lactobacillus* เช่นกัน (Amit-Romach *et al.*, 2004) พบว่าลำดับเบสของกลุ่ม *Lactobacillus* ที่ได้จากการทดลองที่ต่างกันมีความหลากหลาย ปัจจัยที่

เกี่ยวข้องกับจะมาจากเจ้าบ้าน สิ่งแวดล้อมและอาหาร (Lan *et al.*, 2002; Zhu and Joerger, 2003; Amit-Romach *et al.*, 2004)

4.6 ลำไส้ใหญ่ (Large intestine) อยู่ต่อจากลำไส้และไส้ติ่ง ที่ส่วนนี้ไม่มีการผลิตเอนไซม์แต่มีการย่อยต่อเนื่องมาจากลำไส้เล็ก ที่ส่วนนี้มีการดูดกลับของน้ำทำให้กากอาหารมีลักษณะแข็งขึ้น ลำไส้ใหญ่มีขนาดใหญ่แต่สั้น ในไก่ลำไส้ใหญ่จะรวมกับท่อน้ำเสียและขับถ่ายมูลกับปัสสาวะออกทางทวารรวม (cloaca) อาหารซึ่งถูกย่อยและดูดซึมแล้วจะเคลื่อนตัวมาเก็บที่ลำไส้ใหญ่ เพื่อดูดน้ำออกจากกากอาหารกลับเข้าสู่ร่างกายเพื่อทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้ง

4.7 ทวารรวม (Clocca) เป็นส่วนสุดท้ายของท่อทางเดินอาหาร มีกล้ามเนื้อสำหรับปิดเปิดเพื่อส่งกากอาหารออกนอกร่างกาย ทวารรวมเป็นท่อรวมทั้งระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์

สภาพพีเอชในระบบทางเดินอาหาร (ตารางที่ 6) ก็เป็นอีกปัจจัยในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ และส่งผลต่อระบบนิเวศน์ภายในทางเดินอาหารอีกด้วย

ตารางที่ 6 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารไก่

ตำแหน่ง	พีเอช
Crop	5.5
Proventriculus and gizzard	2.5-3.5
Duodenum	5-6
Jejunum	6.5-7
Ileum	7-7.5
Ceca	5.8
Clocca	8

ที่มา : Simon and Versteeg (1989); van der Wielen *et al.* (2000)

การใช้ประโยชน์จากโปรไบโอติกในการลดและป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร

ในทางเดินอาหารมีระบบการป้องกันจุลินทรีย์แปลกปลอมตามธรรมชาติอยู่แล้ว เช่น น้ำลาย กรดจากกระเพาะ เนื้อเยื่อ mucus น้ำย่อยโปรตีนในลำไส้ จุลินทรีย์ในลำไส้ และ เนื้อเยื่อ epithelial cell แต่ก็ยังมีจุลินทรีย์บางส่วนสามารถรอดชีวิตและก่อให้เกิดโรคต่อสัตว์ได้ ซึ่งมักป้องกันและแก้ปัญหานี้โดยการให้ยาปฏิชีวนะ แต่การให้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานอาจเกิดการดื้อยา และไม่สามารถใช้ได้ผลอีก นอกจากนี้ยังสามารถตกค้างและถ่ายทอดสู่ผู้บริโภคได้ จึงได้มีแนวคิดในการป้องกันการบุกรุกจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารโดยใช้ชีววิธี

แบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่ สามารถใช้ประโยชน์เป็นโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกัน และช่วยเร่งการเจริญเติบโต โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตอยู่ในลำไส้ สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร (Casas *et al.*, 2000) การนำแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่ใช้ในอาหารสัตว์เป็นวิธีการเพิ่มเชื้อที่มีประโยชน์จากแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ ทำให้ลดปริมาณการใช้สารปฏิชีวนะ

Yeo and Kim (1997) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของไก่ โดยให้อาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ เปรียบเทียบกับอาหารที่เติมแบคทีเรียกรดแลคติกแทนสารปฏิชีวนะในอัตราส่วนที่เท่ากัน พบว่าไก่กลุ่มที่กินอาหารที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกมีน้ำหนักเพิ่มมากกว่ากลุ่มที่กินอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ ดังนั้นสามารถใช้แบคทีเรียกรดแลคติกทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้

Pascual *et al.* (1999) ศึกษาการผสมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. salivarius* CTC2197 กับ เชื้อก่อโรคในไก่ได้แก่ *Salmonella* Enteritidis C-114 โดยป้อนในไก่อายุ 1 วัน พบว่าเชื้อก่อโรคสามารถหมดไปภายใน 21 วัน ในช่วงระยะเวลา 1 สัปดาห์แรก แสดงให้เห็นว่า *L. salivarius* CTC2197 สามารถลดจำนวนของเชื้อก่อโรค *S. Enteritidis* C-114 ในลำไส้ไก่

การทำงานของโปรไบโอติกในทางเดินอาหารยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าสามกลไกต่อไปนี้เป็นส่วนหนึ่งการทำงานของโปรไบโอติกได้แก่ การผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย (เช่น แบคเทอริโอซิน) การควบคุมการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (เช่น ปริมาณแอนติบอดี กิจกรรมของมาโครฟาจ จำนวน T cell interferon และ interleukins) สุดท้ายคือ การแข่งขันเพื่อจับกับเซลล์ epithelium

กล่าวกันว่า การสร้าง short chain fatty acid (SCFA) และการลดค่า พีเอช ในทางเดินอาหาร ของโปรไบโอติกในทางเดินอาหารนั้น เป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการลดจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรครในทางเดินอาหาร (Hinton *et al.*, 1991; Ziprin *et al.*, 1990; Nisbet *et al.*, 1993a; Corrier 1994, b; Hume *et al.*, 1996; Scanlan, 1997; Kubena *et al.*, 2001a, b) แต่อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาการยับยั้ง *Salmonella* พบว่าไม่เกี่ยวข้องกับการปริมาณ SCFA (Nisbet *et al.*, 1993b; Ziprin *et al.*, 1993; Corrier *et al.*, 1994) หรือค่า พีเอช ในทางเดินอาหาร (Ziprin *et al.*, 1993)

จุลินทรีย์โปรไบโอติกทางการค้าชนิดแรกได้แก่ Broilact™-(Orion Corporation) เป็นแบบเชื้อผสมมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคจาก *Samonella* ซึ่งนิยมใช้กันมากในประเทศฟินแลนด์ สวีเดน และประเทศอังกฤษ นอกจากนี้ยังมี Aviguard™ (Bayer AG) และ PREEMPT™ (MS Bioscience) (Nava *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติอื่นในการลดการบุกรุกของ *S. Enteritidis* ซึ่งคาดว่าอาจเกี่ยวกับการสร้างสารคล้ายแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-like inhibitory substances: BLIS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกหรือจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารชนิดอื่น (Ganzle *et al.*, 1999; Portrait *et al.*, 1999, 2000; Carina *et al.*, 2000; Jennes *et al.*, 2000) มีสมมติฐานว่าความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์และเป็นกลไกการป้องกันตนเองในสภาวะแวดล้อมที่มีความซับซ้อน เช่น ในทางเดินอาหาร (Gomez *et al.*, 1997; Audisio *et al.*, 1999; Balla *et al.*, 2000; Jennes *et al.*, 2000; Dabard *et al.*, 2001) ซึ่งทำให้เราทราบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตออกมานั้น เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณหรือการขับไล่จุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งลักษณะนี้เป็นสมบัติพื้นฐานของจุลินทรีย์ประจำลำไส้ (Dabard *et al.*, 2001) การศึกษาของ Audisio *et al.* (1999) และ Jennes *et al.* (2000) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกมาจากทางเดินอาหารมีความสามารถในการป้องกัน *Salmonella* ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตแบคทีริโอซิน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแลคโตบาซิลลัสแยกจากลำไส้ไก่ และผ่านการทดสอบว่ามีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (ปรียดา, 2550) ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ จากหน่วยปฏิบัติการเฉพาะทางโปรไบโอติกและพรีไบโอติก เพื่อสุขภาพ (Specilaized Research Unit of Probiotic and Prebiotic for Health promotion) ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย (target strain) จากแหล่งเก็บเชื้อต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อทั้งหมดเก็บที่อุณหภูมิ -87 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ตารางที่ 7 สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเจริญเติบโต

สายพันธุ์	อาหาร	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
ก. แลคโตบาซิลลัส		
<i>L. fermentum</i> KUB-C33	MRS	37
KUB-D18	MRS	37
KUB-D39	MRS	37
KUB-D73	MRS	37
KUB-J92	MRS	37
<i>L. salivarius</i> KUB-I48	MRS	37
KUB-I49	MRS	37
KUB-J61	MRS	37
<i>L. reuteri</i> KUB-D28	MRS	37
<i>Lactobacillus</i> sp. KUB-C44	MRS	37
KUB-D26	MRS	37

ตารางที่ 7 (ต่อ)

สายพันธุ์	อาหาร	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
ข. เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย		
<i>Salmonella enterica</i> serova Enteritidis DMST 17368	NB, XLD	37
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 029	NB, MSA	37
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NB, EMB	37
<i>Shigella dysenteriae</i> DMST 151111	NB, XLD	37
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	Brucella + Blood	42
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 317802 (DMST 21243)	TSB+3%NaCl	37

หมายเหตุ DMST = Department of Medical Science Thailand, Thailand
TISTR = Thailand Institute of Science and Technological Research, Thailand
ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

2. เอนไซม์

- เอนไซม์คะตะเลส (catalase); Sigma, USA
- เอนไซม์โปรตีนเอส (proteinase K); Sigma, USA
- เอนไซม์เปปซินเอ (pepsin A); Sigma, USA
- เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสชนิด X-A (α -amylase Type X-A); Sigma, USA
- เอนไซม์ไลเปส ชนิด VII (lipase Type VII); Sigma, USA

วิธีการ

1. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายโดยสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 การเตรียมสารละลายไฮปราตจากเซลล์ (Cell-free supernatant:CFS)

ถ่ายเชื้อแลคโตบาซิลลัส 1 โคโลนีในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนไฮปราตที่เอช ให้เป็น 5 และ 6 โดยใช้ 5M NaOH และ 6N HCl จากนั้นกำจัดเชื้อปนเปื้อนโดยกรองผ่าน membrane ขนาด 0.22 μm (Hur *et al.*, 2000) แล้วนำไปใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

1.2 การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี spot on lawn

ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn ตามวิธีการของ Hoover and Harlender (1993) โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่วุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.146 (จากการคำนวณ) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่วุ้นแข็งที่มีวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ วางในตู้ปลอดเชื้อนานประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารที่เททับไว้แข็งตัว และผิวน้ำแห้ง ทำการเจือจาง CFS ครั้งละหนึ่งเท่า (ดัดแปลงจากวิธีการของ Maldonado *et al.*, 2002) จากนั้นหยด CFS ที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวอาหาร ร่อนสารละลายซึมผ่านวุ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตจากบริเวณใส (clear zone) แล้วคำนวณกิจกรรมการยับยั้ง (Antimicrobial activity) เป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (Arbitrary unit, AU/ml) จากลำดับการเจือจางสูงสุดที่สังเกตเห็นบริเวณใสได้ชัดเจน (Ennahar *et al.*, 2000) นำผลที่ได้มาคำนวณ ดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมการยับยั้ง(AU/ml)} = \frac{\text{ระดับการเจือจางสูงสุดที่เกิดบริเวณใส} \times 1000}{\text{ปริมาตรของสารละลายที่หยดบนผิวน้ำอาหาร}}$$

2. การศึกษาคุณลักษณะของสารยับยั้งในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย

2.1 การศึกษาผลของกรดในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย

แบ่ง CFS ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 11 สายพันธุ์ ออกเป็น 3 ส่วน คือส่วนแรกไม่ปรับค่า พีเอช ส่วนที่สองปรับ พีเอช เป็น 5 และส่วนที่สามปรับ พีเอช เป็น 6 โดยใช้ 5M NaOH และ 6N HCl ทำการเจือจางโดยใช้น้ำ DI และทดสอบกิจกรรมยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย ทั้ง 6 ชนิด ด้วยวิธี spot on lawn

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ใน CFS ด้วยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) โดยคอลัมน์ Rezex organic acid analysis column (300x7.8 mm, Phenomenex, CA) ป้อนชนิด P100 ตัวรับสัญญาณระบบ UV150 ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ตัวควบคุมระบบชนิด SN4000 (Thermo Finnigan, USA) ใช้กรดทาร์ทาริกเป็น internal standard และใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์เป็นตัวชะคอลัมน์ ปรับอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (Cheigh *et al.*, 2002) จากนั้นฉีดสารละลายมาตรฐาน (แสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ข) และสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ วิเคราะห์ปริมาณกรดในสารละลายตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม ChromQuest version 2.51 (ThermoQuest, Inc., USA)

2.3 การศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย

ปรับ พีเอช CFS ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้ง 11 ไอโซเลท ให้เป็น 6.9 เพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ catalase จากนั้นเติมเอนไซม์ catalase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชุคควบคุมทำโดยการเติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์ แทนการใส่เอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำ 100 °C นาน 5 นาที จากนั้นปรับ พีเอช ให้เท่ากับพีเอชเริ่มต้น จากนั้นทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยวิธี spot on lawn

2.4 การทดสอบโครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งจุลินทรีย์

นำ CFS มาปรับ พีเอช ให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทดสอบซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ย่อยโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ proteinase K, pepsin A เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ α -amylase และเอนไซม์ย่อยไขมัน ได้แก่ lipase (Sigma, USA) โดยใช้สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ดังตารางที่ 8) นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (Choi *et al.*, 2000) จากนั้นปรับ พีเอช ของ CFS ให้เท่ากับ พีเอช เริ่มต้นก่อนทำปฏิกิริยา นำไปทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้สารตัวอย่างที่เติมบัฟเฟอร์แทนการเติมเอนไซม์เป็นชุดควบคุม จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงหลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงหลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์} = \frac{\text{Activity}_c - \text{Activity}_{\text{nt}}}{\text{Activity}_c} \times 100$$

Activity_c = กิจกรรมการยับยั้งในชุดควบคุม (AU/ml)

Activity_{nt} = กิจกรรมการยับยั้งในชุดทดลอง (AU/ml)

ตารางที่ 8 เอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบหาโครงสร้างทางเคมี พีเอช และ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน

ชนิด	พีเอช ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
pepsin A	2	37
α -amylase	6.9	20
lipase	7.2	37
proteinase K	7.5	37

3. ทดสอบการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมายที่ ฟีเอช ในทางเดินอาหาร

3.1 ทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการ pour plate เชื้อแลคโตบาซิลลัส และ จุลินทรีย์เป้าหมาย ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* DMST 17368, *Sh. dysenteriae* DMST 15111, *St. aureus* TISTR 029 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและ selective media ได้แก่ MRS+0.1%CaCO₃, NA, EMB, XLD และ MSA (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง สังเกตความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะ โคลโลนี่ที่เกิดขึ้น

3.2 การจำลองสภาวะ ฟีเอช จำลองในระบบทางเดินอาหารไก่

ทำการจำลอง ฟีเอช ในระบบทางเดินอาหารในส่วน crop, proventriculus and gizzard, duodenum, jejunum, ileum และ clocca ที่มีสภาวะ ฟีเอช แตกต่างกันให้เป็น 5.5, 2.5, 5.0, 6.5, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 10 ml ปรับค่า ฟีเอช โดยใช้ 5M NaOH และ 6N HCl เพื่อจำลองสภาวะ ฟีเอช ให้ใกล้เคียงกับทางเดินอาหารของไก่

3.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ถ่ายเชื้อแลคโตบาซิลลัส 1 โคลโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย 1 โคลโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.4 การทดสอบเบื้องต้นในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย

ทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัส *L. salivarius* KUB-I49, undefined *Lactobacillus* sp. KUB-C44 และจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยเจือจางแลคโตบาซิลลัสให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10⁶ CFU/ml และจุลินทรีย์เป้าหมาย 10⁵ CFU/ml (Millette *et al.*, 2007) เลี้ยงในอาหาร TSB 10 ml ที่จำลองสภาวะ ฟีเอช ในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารไก่ วัดค่า ฟีเอช และหาปริมาณเชื้อ

เริ่มต้นด้วยวิธี standard plate count ในอาหาร selective media ที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย (ตารางที่ 7) บ่มที่ 42 → C เท่ากับเวลาที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วน crop, proventriculus and gizzard, duodenum, jejunum, ileum, clocca ได้แก่ 50, 90, 10, 30, 70 และ 25 นาที วัดค่า พีเอช และหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

3.5 ทดสอบการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

ทดสอบการยับยั้งโดย ทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยเจือจางแลคโตบาซิลลัสให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml และจุลินทรีย์เป้าหมาย 10^5 CFU/ml (Millette *et al.*, 2007) เลี้ยงในอาหาร TSB 10 ml ที่จำลองสภาวะ พีเอช ในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารไก่ (วิธีเตรียม ข้อ 3.2) วัดค่า พีเอช และหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธี standard plate count ในอาหาร selective media ที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย (ตารางที่ 7) นำไปบ่มใน waterbath ที่อุณหภูมิ 42 → C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดค่า พีเอช และหาปริมาณเชื้อชุดควบคุมเตรียมโดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะที่ไม่มีแลคโตบาซิลลัส เปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายโดยมีวิธีคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย} = \frac{(T_c - T_{nt})}{T_c} \times 100$$

T_c = ปริมาณจุลินทรีย์เป้าหมายในชุดควบคุมที่เวลา 18 ชั่วโมง (log CFU/ml)

T_{nt} = ปริมาณจุลินทรีย์เป้าหมายในชุดทดลองที่เวลา 18 ชั่วโมง (log CFU/ml)

3.6 ทดสอบการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสมโดยใช้แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสม

เตรียมแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสม โดยผสมเชื้อแลคโตบาซิลลัส ได้แก่ *L. reuteri* KUB-D28, *L. fermentum* KUB-D73, *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 เจือจางให้แต่ละเชื้อมีปริมาณ 10^6 cfu/ml และเตรียมจุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสม ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *Sal. Enteritidis* DMST 17368, *Shi. dysenteriae* DMST 15111 และ *St. aureus* TISTR 029 โดยเจือจางให้แต่ละเชื้อมีปริมาณ 10^5 cfu/ml

เลี้ยงเชื้อร่วมกันโดยใช้แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml และ จุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสม 10^5 CFU/ml เลี้ยงในอาหาร TSB 10 ml สภาวะจำลอง พีเอช ในแต่ละ ส่วนของทางเดินอาหารไก่ (วิธีเตรียม ข้อ 3.2) วัดค่า พีเอช และหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธี standard plate count ในอาหาร selective media ที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย นำไปบ่มที่ 42 → C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดค่า พีเอช และหาปริมาณเชื้อ ชุดควบคุมเตรียมโดยทำการ เลี้ยงจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะที่ไม่มีแลคโตบาซิลลัส กำหนดค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ เป้าหมาย ดังหัวข้อ 3.5

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาในการทำวิจัย

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2550 และสิ้นสุดเดือน มกราคม 2553

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายโดยสารยับยั้งที่ผลิตจากแลคโตบาซิลลัส

การผลิตสารยับยั้งเป็นสมบัติหนึ่งของแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์ โดยเชื้อกลุ่มนี้ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วว่ามีความเป็นโปรไบโอติก (ปริยดา, 2551) ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย ได้แก่ *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Salmonella Enteritidis* DMST 17368, *Shigella dysenteria* DMST 15111, *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 317802 (DMST 21243) โดยใช้ CFS จากแลคโตบาซิลลัสทั้ง 11 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามสปีชีส์ได้แก่ กลุ่มที่ 1 *L. fermentum* ประกอบด้วยสายพันธุ์ KUB-C33, KUB-D18, KUB-D39, KUB-D73 และ KUB-J92 กลุ่มที่ 2 *L. salivarius* ประกอบด้วย KUB-I48, KUB-I49 และ KUB-J61 กลุ่มที่ 3 *L. reuteri* มี 1 สายพันธุ์คือ KUB-D28 และ กลุ่มที่ 4 undefined *Lactobacillus* sp. ประกอบด้วย KUB-C44 และ KUB-D26

ผลการทดลองพบว่าแลคโตบาซิลลัสทุกสายพันธุ์แสดงกิจกรรมการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย ยกเว้น *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 ดังแสดงในตารางที่ 9

1.1 กิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสกลุ่มที่ 1 *L. fermentum*

พบว่าค่า พีเอช ของ CFS อยู่ระหว่าง 3.95-4.26 โดย KUB-D73 ให้ค่า พีเอช ต่ำที่สุด แลคโตบาซิลลัสกลุ่มนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 และ *Sh. dysenteriae* DMST 15111 ได้สูงสุด 400-500 AU/ml ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายรองลงมาคือ *S. Enteritidis* DMST 17368 300-400 AU/ml *St. aureus* TISTR 029 200-500 AU/ml และ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 มีกิจกรรมการยับยั้ง 100-500 AU/ml โดยพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ KUB-D73 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ดีที่สุดในกลุ่มนี้ มีกิจกรรมการยับยั้ง 500 AU/ml ยกเว้น *S. Enteritidis* DMST 17368 ที่ค่ามีกิจกรรมการยับยั้ง 400 AU/ml

ตารางที่ 9 กิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

แลคโตบาซิลลัส		กิจกรรมการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย (AU/ml)						
		พีเอช	<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	<i>E. coli</i> 0157:H7	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368	<i>Shi. dysenteriae</i> DMST 15111	<i>St. aureus</i> TISTR 029	<i>V. paprahemolyticus</i> ATCC 317802
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	4.26	-	400	300	500	300	100
	KUB-D18	4.22	-	400	300	500	200	200
	KUB-D39	4.22	-	500	400	400	300	300
	KUB-D73	3.95	-	500	400	500	500	500
	KUB-J92	4.21	-	500	300	400	300	200
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	3.39	-	500	400	500	500	500
	KUB-I49	4.01	-	500	400	500	500	500
	KUB-J61	3.94	-	500	400	500	300	300
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	4.20	-	500	400	500	100	300
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	3.77	-	400	400	500	300	400
	KUB-D26	3.84	-	500	300	500	200	200

หมายเหตุ - ไม่พบกิจกรรมการยับยั้ง

ผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Hutt *et al.* (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. fermentum* ME-3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 700336, *E. coli* ATCC 700414 และ *Sh. sonnei* ATCC 25931 ในทางเดินอาหาร โดยยับยั้ง *S. enterica*

ATCC 13076 ได้สูงสุด นอกจากนี้ Koga *et al.* (1998) รายงานว่า *L. fermentum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio sp.* ได้เล็กน้อย

1.2 กิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลล์สกลุ่มที่ 2 *L. salivarius*

ค่าพีเอช ของ CFS มีค่าอยู่ระหว่าง 3.39-4.01 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายทุกตัวได้ดี มีกิจกรรมการยับยั้งอยู่ระหว่าง 300-500 AU/ml โดยเฉพาะ KUB-I48 และ KUB-I49 มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุด 400-500 AU/ml เช่นเดียวกับกับกลุ่ม 1 ขณะที่ KUB-J61 แสดงการยับยั้งต่อ *St. aureus* TISTR 029 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 300 AU/ml

ข้อมูลจากการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Klose *et al.* (2010) ที่พบว่า *L. salivarius* FACA12, LSS, LSC แยกจากลำไส้หนูและไก่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Choleraesuis* DSM 554, *S. Typhimurium* USDA 554, *S. Enteritidis* USDA 59, *E. coli* O8 K88 F4, O138 K1, K82, O147 K(89)K88ac:H19 O157:H7 ได้ นอกจากนี้ Olivares *et al.* (2006) รายงานว่า *L. salivarius* สามารถยับยั้งการเจริญของ *St. aureus* 976, *St. aureus* 4013, *E. coli* 433 และ *E. coli* 4070 ได้ แต่ไม่มีการรายงานการยับยั้ง *Shigella* และ *Vibrio* ซึ่งส่วนนี้แตกต่างจากการผลการศึกษาข้างต้น

1.3 กิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลล์สกลุ่มที่ 3 *L. reuteri*

ค่าพีเอช ของ CFS คือ 4.2 สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และ *Sh. dysenteriae* DMST1511 ได้สูงสุดเป็น 500 AU/ml ขณะที่ยับยั้ง และ *St. aureus* TISTR 029 ได้ต่ำสุด โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเพียง 100 AU/ml

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีการตีพิมพ์ ซึ่งรายงานว่ *L. reuteri* จากทางเดินอาหารของคน สามารถผลิตสาร reutericin ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *Enterogenic S. Enterica*, *Sh. sonnei* และ *V. cholera* (Spinler *et al.*, 2008) Klose *et al.* (2010) ก็ รายงานว่า *L. reuteri* FACA2, LRS, S6 ที่แยกจากลำไส้หนู ก็สามารถยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *E. coli* ได้หลายสายพันธุ์

1.4 กิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสกลุ่มที่ 4 undefined *Lactobacillus* sp.

พบว่าฟิเซ ของ CFS มีค่า 3.77 และ 3.84 กลุ่มนี้สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และ *Sh. dysenteriae* DMST 15111 สูงสุดเป็น 400-500 AU/ml โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน KUB-C44 มีกิจกรรมการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมายทุกชนิดสูงสุด 400-500 AU/ml ยกเว้นใน *St. aureus* TISTR 029 มีกิจกรรมการยับยั้ง 300 AU/ml

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นพบว่าแลคโตบาซิลลัสที่แยกจากลำไส้ไก่ สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้สูงสุด และ *L. fermentum* KUB-D73, *L. salivarius* KUB-I48, *L. salivarius* KUB-I49 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายทุกสายพันธุ์สูงสุด สอดคล้องกับการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยแลคโตบาซิลลัส โดย ปรียดา (2550) พบว่า CFS ของ KUB-D18, KUB-D26, KUB-D28, KUB-D39, KUB-D73, KUB-J61, KUB-J92, KUB-I48, KUB-I49, KUB-C33 และ KUB-C44 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sh. dysenteriae*, *S. Enteritidis* DMST 17368, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 และ *V. parahaemolyticus* จากการทดสอบนี้ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อ *C. jejuni* ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Strus *et.al.*(2001) ที่ทำการทดสอบการยับยั้งของ *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากมนุษย์ ต่อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศ ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้ง *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Clostridium difficile* ได้ และต่างจากงานวิจัยของ ปรียดา (2550) ที่ทดสอบการยับยั้ง *Campyrobacter jejuni* ATCC 33291 ด้วยวิธี direct method ที่พบว่าแลคโตบาซิลลัสสามารถยับยั้ง *Campyrobacter jejuni* ATCC 33291 ได้

การทดสอบในเบื้องต้นทำให้ทราบว่า สารที่แลคโตบาซิลลัสผลิตขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ทดสอบนั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ต่างสายพันธุ์ได้ การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสในสปีชีส์เดียวกันต่อจุลินทรีย์เป้าหมายมีค่าไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารยับยั้งใน CFS ที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวของแลคโตบาซิลลัสแต่ละสายพันธุ์ การเจริญของแลคโตบาซิลลัสทำให้ ฟิเซ ของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจาเซลล์ลดลง โดยที่ค่า ฟิเซ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ จากการทดลองนี้ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งต่อ *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 จึงตัดการทดสอบต่อจุลินทรีย์ชนิดนี้ออกในการทดลองต่อไป

2. การศึกษานิคมของสารยับยั้ง

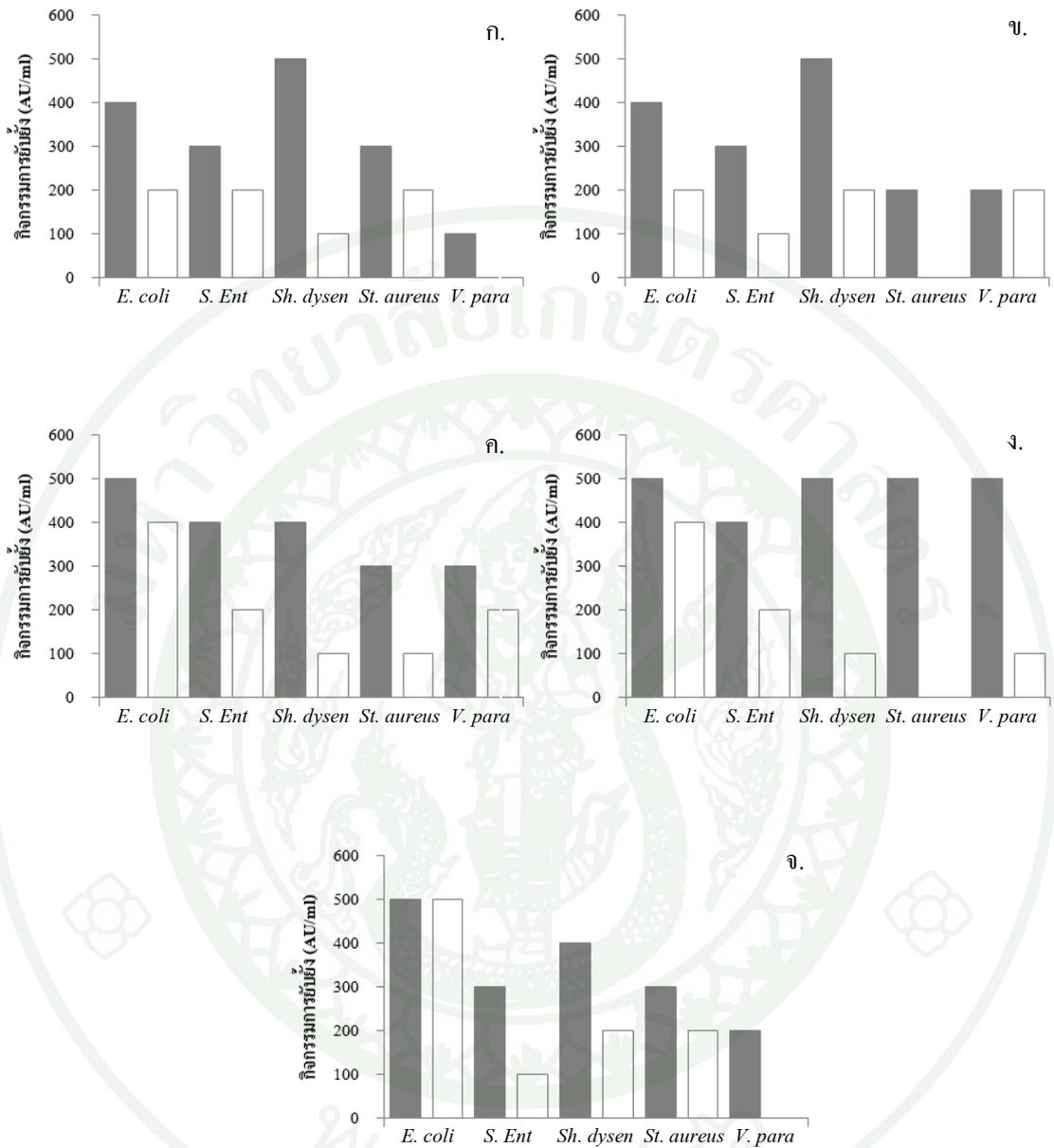
2.1 ผลการยับยั้งและชนิดของกรดอินทรีย์

2.1.1 การศึกษาอิทธิพลของกรดในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย

ในการเจริญของแลคโตบาซิลลัสมีผลให้ CFS มีค่าพีเอชต่ำลง ส่งผลต่อแบคทีเรียพวกที่ไม่ทนกรด นอกจากนี้มีรายงานว่ากิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้น ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยปัจจัยที่เป็นตัวบอกระดับการแตกตัวของกรดก็คือ ค่า pKa โดยค่า พีเอช ที่ต่ำกว่าค่า pKa มีผลการแตกตัวของกรดอินทรีย์ลดลง ส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาในสภาวะ พีเอช ของ CFS ที่ต่ำกว่าค่า pKa โดยปรับค่า พีเอช น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ให้มีค่า เป็น 5 (CFSพีเอช5) และ 6 (CFSพีเอช6)

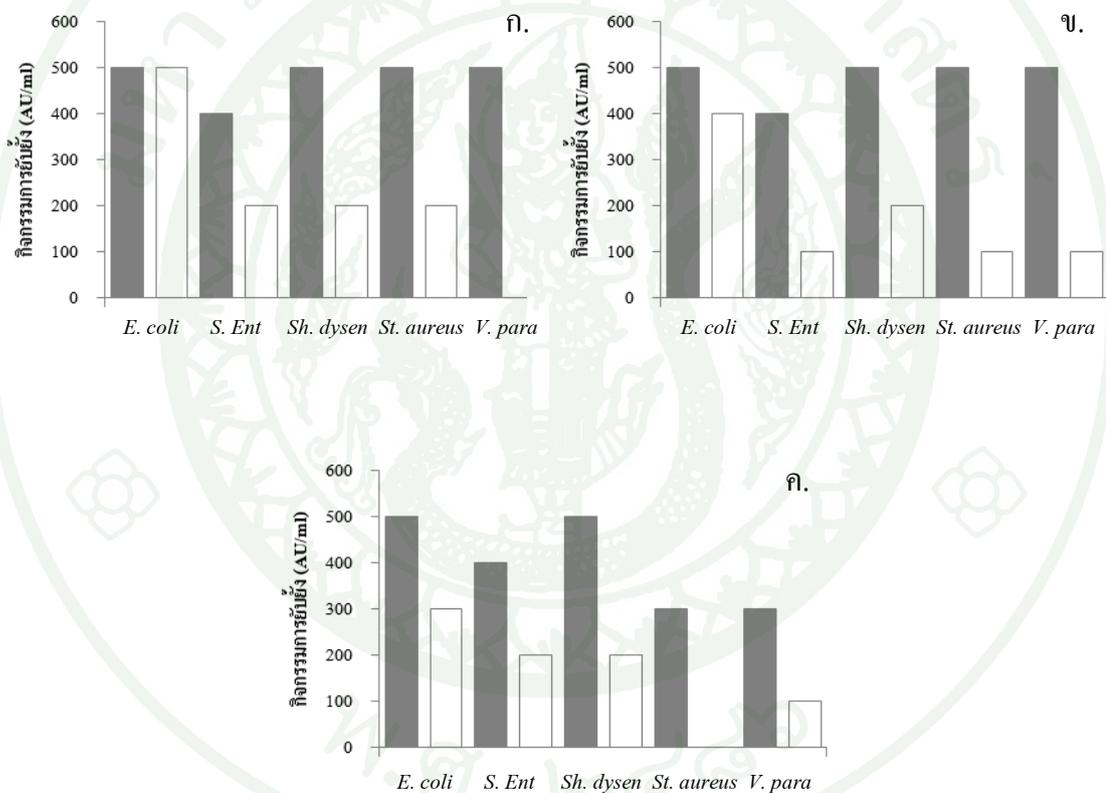
จากการทดลองส่วนใหญ่พบว่า CFSพีเอช5 ของแลคโตบาซิลลัสทุกตัว มีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงต่ำกว่า CFS ที่ไม่ปรับ พีเอช และ กิจกรรมการยับยั้งของ CFSพีเอช6 ส่วนใหญ่หายไป แสดงผลการทดลองแบ่งตามกลุ่มแลคโตบาซิลลัส ดังภาพที่ 5-7

กลุ่มที่ 1 *L. fermentum* ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 5 หลังจากทำการปรับพีเอช น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์เป็น 5 และ 6 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ CFSพีเอช6 ของแลคโตบาซิลลัสทุกตัวไม่มีกิจกรรมการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย (ไม่แสดงข้อมูล) ขณะที่กิจกรรมการยับยั้งของ CFSพีเอช5 มีค่าลดลง สายพันธุ์ KUB-C33 และ KUB-J92 ที่ทดสอบกับ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 และ KUB-D18 และ KUB-D73 ที่ทดสอบกับ *St. aureus* TISTR 029 มีกิจกรรมการยับยั้งลดลงเป็น 0 AU/ml เห็นได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งเกิดจากกรดอินทรีย์ ขณะที่สายพันธุ์ KUB-J92 มีกิจกรรมการยับยั้งต่อ *E. coli* O157:H7 ทั้งก่อนและหลังปรับ พีเอช เป็น 500 AU/ml ซึ่งสามารถสรุปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งของ KUB-J92 เกิดจากสารอื่นที่ไม่ใช่กรดอินทรีย์ ขณะที่กิจกรรมของสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายอื่นๆที่ลดลงบางส่วนเป็นผลจากกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ



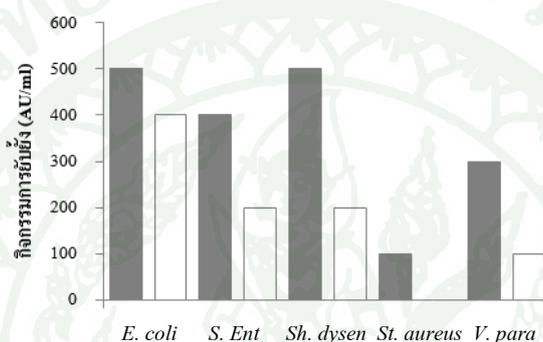
ภาพที่ 5 กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม *L. fermentum* ก. KUB-C33 ข. KUB-D18 ค. KUB-D39 ง. KUB-D73 และ จ. KUB-J92 ในสภาวะไม่ปรับ พีเอช (■) และ พีเอช 5 (□) ต่อ จุลินทรีย์เป้าหมาย

กลุ่มที่ 2 *L. salivarius* ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 6 กิจกรรมการยับยั้งส่วนใหญ่ลดลงหลังปรับ พีเอช เป็น 5 KUB-I48 ที่ทดสอบกับ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 และ KUB-J61 ที่ทดสอบกับ *St. aureus* TISTR 029 มีค่าเป็น 0 AU/ml แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการยับยั้งเป็นผลจากกรดอินทรีย์ ขณะที่ KUB-I48 ที่ทดสอบกับ *E. coli* O157:H7 ค่ากิจกรรมการทั้งก่อนและหลังปรับ พีเอช มีค่าเท่ากับ 500 AU/ml เห็นได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งเป็นผลจากสารอื่นที่ไม่ใช่กรดอินทรีย์ นอกจากนี้ KUB-I48 CFSพีเอช6 สามารถยับยั้ง *Sh. dysenteriae* DMST1511 ได้ มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 100 AU/ml ขณะที่กิจกรรมของสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายอื่นๆที่ลดลงบางส่วนเป็นผลจากกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ



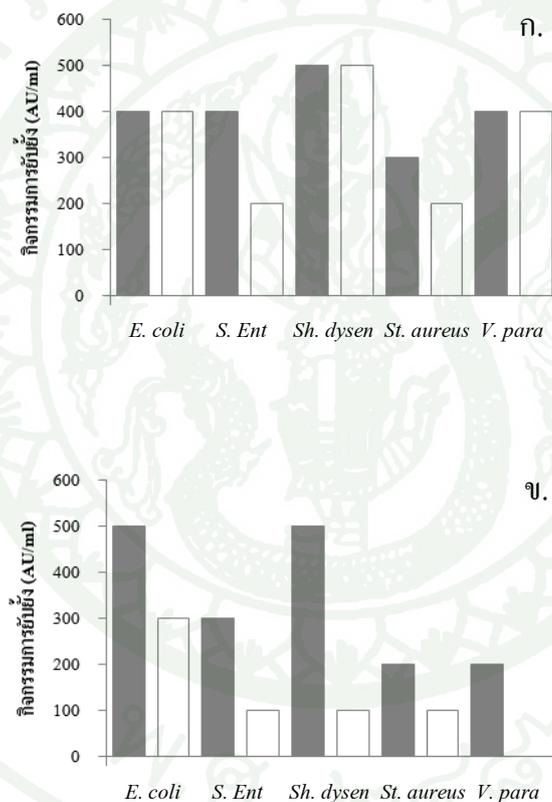
ภาพที่ 6 กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม *L. salivarius* ก. KUB-I48 ข. KUB-I49 และ ค. KUB-J61 ในสภาวะไม่ปรับ พีเอช (■)และพีเอช 5 (□) ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลุ่มที่ 3 *L. reuteri* มีสายพันธุ์เดียวคือ KUB-D28 กิจกรรมการยับยั้งดังแสดงในภาพที่ 7 กิจกรรมการยับยั้งของ CFS พีเอช 6 มีค่าเป็น 0 AU/ml ค่ากิจกรรมการยับยั้งของ CFS พีเอช 5 เมื่อทดสอบกับจุลินทรีย์เป้าหมายส่วนใหญ่ลดลงแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการยับยั้งเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ร่วมกับสารอื่น และเมื่อทดสอบกับ *St. aureus* TISTR 029 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเป็น 0 AU/ml แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการยับยั้งเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ ขณะที่กิจกรรมของสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายอื่นๆ ที่ลดลงบางส่วนเป็นผลจากกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ



ภาพที่ 7 กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม *L. reuteri* KUB-D28 ในสถานะไม่ปรับ พีเอช (■) และ พีเอช 5 (□) ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลุ่มสุดท้าย undefined *Lactobacillus* sp. ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 8 กิจกรรมการยับยั้งของ CFSพีเอช6 มีค่า 0 AU/ml กิจกรรมการยับยั้ง CFSพีเอช5 ต่อจุลินทรีย์เป้าหมายส่วนใหญ่มีค่าลดลง KUB-D26 ที่ทดสอบกับ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 กิจกรรมการยับยั้งลดลงเป็น 0 AU/ml เห็นได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งเกิดจากกรดอินทรีย์ KUB-C44 เมื่อทดสอบกับ *E. coli* O157:H, *Sh. dysenteriae* DMST 15111 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 ทั้งก่อนและหลังปรับ พีเอช มีค่าเท่ากันคือ 400, 500 AU/ml ทำให้ทราบได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งเป็นผลเนื่องจากสารอื่นที่ไม่ใช่กรดอินทรีย์ ขณะที่กิจกรรมของสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัส ต่อจุลินทรีย์เป้าหมายอื่นๆ ที่ลดลงบางส่วนเป็นผลจากกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ



ภาพที่ 8 กิจกรรมการยับยั้งของ CFS ในกลุ่ม undefined *Lactobacillus* sp. ก. KUB-C44 ข. KUB-D26 ในสภาวะไม่ปรับ พีเอช (■)และ พีเอช 5 (□) ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

2.1.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์

แลคโตบาซิลลัสสามารถผลิตกรดอินทรีย์ ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักเพื่อใช้สร้างพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต โดยความสามารถในการหมักน้ำตาลจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย กรดอินทรีย์ที่ผลิตโดยแลคโตบาซิลลัสส่วนใหญ่ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ฯลฯ การศึกษานี้ใช้วิธีการ HPLC โดยใช้คอลัมน์ Rezex organic acid analysis column พบว่าแลคโตบาซิลลัสในแต่ละกลุ่มผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก รองลงมาคือกรดอะซิติก โดยผลิตในปริมาณต่างกัน ไม่พบกรดบิวทริกและโพรพิโอนิก ข้อมูลแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าพีเอช ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ที่พบในน้ำ CFS ของแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์

กลุ่มของแลคโตบาซิลลัส		พีเอช	ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ (M)		
			แลคติก	อะซิติก	กรดทั้งหมด
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	4.26	0.132	0.098	0.230
	KUB-D18	4.22	0.101	0.069	0.170
	KUB-D39	4.22	0.111	0.094	0.205
	KUB-D73	3.95	0.148	0.077	0.225
	KUB-J92	4.21	0.162	0.070	0.232
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	3.39	0.191	0.089	0.280
	KUB-I49	4.01	0.131	0.079	0.210
	KUB-J61	3.94	0.147	0.086	0.233
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	4.20	0.111	0.096	0.207
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	3.77	0.105	0.055	0.160
	KUB-D26	3.84	0.103	0.074	0.177

จากการวิเคราะห์พบว่าใน CFS ของแลคโตบาซิลลัสทั้ง 11 สายพันธุ์ มีปริมาณกรดแลคติก 0.101-0.191 M และ กรดอะซิติกปริมาณ 0.055-0.098 M เมื่อพิจารณาจากปริมาณกรดทั้งหมดพบว่า *L. salivarius* KUB-I48 ผลิตกรดทั้งหมดมากที่สุดคือ 0.280 M และเชื้อที่ผลิตน้อยที่สุดคือ *L. fermentum* KUB-D18 มีปริมาณกรดทั้งหมด 0.170 M

เมื่อศึกษาอิทธิพลของกรดต่อกิจกรรมการยับยั้งซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 รูปแบบคือแบบแรก กิจกรรมการยับยั้งทั้งก่อนและหลังไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่ากรดไม่มีผลต่อการยับยั้งแบบที่ 2 กิจกรรมการยับยั้งหายไปหลังปรับ พีเอช แสดงว่ากรดมีผลต่อการยับยั้ง และแบบสุดท้าย กิจกรรมการยับยั้งหายไปบางส่วนหลังปรับ พีเอช แสดงว่ากรดมีผลบางส่วนต่อการยับยั้ง ซึ่งแลคโตบาซิลลัสหนึ่งสายพันธุ์สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ละชนิดต่างกัน

แบบที่ 1 กรดอินทรีย์ไม่มีผลต่อการยับยั้ง พบในกิจกรรมการยับยั้งของ *L. fermentum* KUB-J92 ต่อ *E. coli* O157:H7, *L. salivarius* KUB-I48 ต่อ *E. coli* O157:H7 undefined *Lactobacillus* sp. KUB-C44 ต่อ *E. coli* O157:H7, *Sh. dysenteriae* DMST 15111 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 เห็นได้ว่าถึงแม้ว่ามีปริมาณกรดแลคติกสูงในช่วง 0.105-0.191M และกรดอะซิติก 0.055-0.089M ปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.16-0.280M ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *E. coli* O157:H7, *Sh. dysenteriae* DMST 15111, *V. parahaemolyticus* ATCC 317802

แบบที่ 2 กรดอินทรีย์มีผลต่อการยับยั้ง พบในกิจกรรมการยับยั้งของ *L. fermentum* KUB-C33 และ KUB-J92 ต่อ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802, KUB-D18 และ KUB-D73 ต่อการยับยั้ง *St. aureus* TISTR 029, *L. salivarius* KUB-I48 ต่อ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 และ KUB-J61 ต่อ *St. aureus* TISTR 029, *L. reuteri* KUB-D28 ต่อ *St. aureus* TISTR 029 และในกลุ่ม undefined *Lactobacillus* sp. KUB-D26 ต่อ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 เห็นได้ว่าแลคโตบาซิลลัสที่กล่าวถึงนี้มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.101-0.191M กรดอะซิติก 0.069-0.098M กรดอินทรีย์ทั้งหมดมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.170-0.280M มีผลต่อเชื้อในกลุ่ม *St. aureus* TISTR 029 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 317802

แบบที่ 3 กรดอินทรีย์มีผลบางส่วนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย พบได้ใน *L. fermentum* KUB-D39 และ *L. salivarius* KUB-I49 ต่อจุลินทรีย์เป้าหมายทุกสายพันธุ์ มีปริมาณกรดแลกติก 0.111M และ 0.131M กรดอะซิติก 0.094M และ 0.079M ตามลำดับ นอกจากนี้การยับยั้งแบบนี้ยังพบได้ในแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์อื่นต่อจุลินทรีย์เป้าหมายบางสายพันธุ์อีกด้วย อย่างไรก็ตามปริมาณของกรด ในการยับยั้งทั้ง 3 แบบอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดอินทรีย์และกิจกรรมการยับยั้งได้

จากข้อมูลชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ที่พบใน CFS ของแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hutt *et al.* (2006) ซึ่งรายงานว่า *L. fermentum* ME-3 ที่เลี้ยงในสภาวะมีอากาศเล็กน้อย สามารถผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติก ได้ในปริมาณ 103.3±65.7 mM, 6.8±3.9 mM ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 700336, *E. coli* ATCC 700414 *S. enterica* ssp., *S. enterica* ATCC 13076 และ *Sh. sonnei* ATCC 25931 ได้ ดังนั้นเห็นได้ว่าแลคโตบาซิลลัสที่ใช้ในการศึกษาสามารถผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก รองลงมาเป็นกรดอะซิติก

มีการศึกษาการทำงานกรดแลกติกในการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ Alakomi *et al.* (2000) ทำให้ทราบว่ากรดแลกติกที่ความเข้มข้น 0.005M ที่พีเอช 4.0 สามารถรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ได้ ทั้งกรดแลกติกและกรดอะซิติกทำให้เซลล์ของ *E. coli* เกิดการบาดเจ็บซึ่งมีสาเหตุมาจากเข้าไปรบกวนการทำงานของ Lipopolysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ outer membrane

Roe *et al.* (2002) ศึกษากลไกของกรดอะซิติกในการยับยั้ง *E. coli* พบว่าเกิดจากการยับยั้งการสังเคราะห์เมไทโอนิน (methionine) และพบว่าจะไม่เกิดการยับยั้งถ้ามีการเติมเมไทโอนินลงไปในการเลี้ยง ซึ่งกลไกการยับยั้งนี้เป็นผลมาจากการลดลงของเมไทโอนินและสารสะสมสารตัวกลางในการสังเคราะห์เมไทโอนิน (homocysteine)

ถึงแม้จะทราบชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ แต่ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายของแลคโตบาซิลลัสยังอาจมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย

2.2 การศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแลคโตบาซิลลัสสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ซึ่งสารนี้ทำให้เกิดการออกซิไดซ์องค์ประกอบภายในเซลล์ จึงมีฤทธิ์ในทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ เพื่อที่จะทดสอบผลการยับยั้งจุลินทรีย์จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแลคโตบาซิลลัส จึงนำมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ catalase ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง

พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายทุกตัว ทั้งก่อนและหลังการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ catalase เท่ากัน ข้อมูลดังแสดงในภาคผนวก ค จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นไม่ใช่จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แลคโตบาซิลลัสผลิตขึ้น

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Klose *et al.* (2010) ที่ศึกษาอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของ *L. salivarius* FACA12, LSS, LSH *L. reuteri* FACA2, LRS พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ *C. perfringens*, *E. coli* O8 K88. O157:H7, *S. Choleraesuis* และ *B. pilosicoli* ไม่ใช่ผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.3 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งกลุ่มแบคทีริโอซิน

นอกจากกรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แลคโตบาซิลลัสยังสามารถผลิต แบคทีริโอซินได้ด้วย ดังนั้นจึงนำ CFS ของเชื้อแลคโตบาซิลลัสทั้ง 11 สายพันธุ์มาทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinaseK และ pepsinA เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต α -amylase และเอนไซม์ย่อยไขมัน lipase จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml ไม่พบการย่อย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ปริมาณความเข้มข้นสุดท้าย 10 mg/ml เพอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 11-21

2.3.1 *L. fermentum* KUB-C33

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-C33 ต่อ *E. coli* ลดลง 50% เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase และ pepsinA แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนมีผลต่อการยับยั้ง *E. coli* ขณะที่เอนไซม์ α -amylase, Lipase และ pepsinA ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 50% ดังนั้นแสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรต ไลปิด และโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus*

ตารางที่ 11 เปรอ์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-C33 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	50	0	50	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	50	50	50	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	0	0

2.3.2 *L. fermentum* KUB-D18

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-D18 ต่อ *S. Enteritidis* และ *St. aureus* ลดลง 50% และ 75% ตามลำดับ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *St. aureus* ขณะที่เอนไซม์ pepsinA ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 75% ดังนั้นแสดงว่า สารที่มีโครงสร้างโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus*

ตารางที่ 12 เปรูเซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-D18 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	50	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	75	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	75	0

2.3.3 *L. fermentum* KUB-D39

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ protinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีนมีผลต่อการยับยั้ง *S. Enteritidis* เอนไซม์ α -amylase, lipase และ pepsinA ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 100%, 50% และ 50% ตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรต ไลปิดและโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus* เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ pepsinA กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 50% แสดงว่าสารโครงสร้างโปรตีนมีผลต่อการยับยั้ง *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 13 เปรูเซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-D39 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	50
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	100	50	50	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	50	0	50	0

2.3.4 *L. fermentum* KUB-D73

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *E. coli* และ *St. aureus* ลดลง 75% และ 50% ตามลำดับ แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการยับยั้ง *E. coli* และ *St. aureus* เอนไซม์ lipase และ pepsinA ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีนและไลปิด มีผลต่อการยับยั้ง *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-D73 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	75	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	50	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	50	50	0

2.3.5 *L. fermentum* KUB-J92

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ proteinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ลดลง 75% และ 50% ตามลำดับ แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีนมีผลต่อการยับยั้ง *E. coli* และ *V. parahaemolyticus* ขณะที่เอนไซม์ pepsinA และ proteinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 75% และ 50% ตามลำดับ แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus*

ตารางที่ 15 เปร้เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L. fermentum* KUB-J92 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	75
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	0	0	75	50
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	0	50

2.3.6 *L.salivarius* KUB-I48

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ lipase ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* และ *V. parahaemolyticus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างไลปิดมีผลต่อการยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *V. parahaemolyticus* ขณะที่เอนไซม์ α -amylase และ lipase ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตและไลปิด มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus*

ตารางที่ 16 เปร้เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L.salivarius* KUB-I48 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	50	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	50	50	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	50	0	0

2.3.7 *L.salivarius* KUB-I49

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ pepsinA กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L.salivarius* KUB-I49 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	0	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	50	0

2.3.8 *L.salivarius* KUB-J61

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ lipase และ proteinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีนและไขมันมีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus* ขณะที่เอนไซม์ pepsinA ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 18 เปรูเซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L.salivarius* KUB-J61 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	0	50	0	50
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	50	0

2.3.9 *L.reuteri* KUB-D28

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 19 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ lipase และ pepsin ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *E. coli* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างไลปิด และ โปรตีนมีผลต่อการยับยั้ง *E. coli* ขณะที่เอนไซม์ lipase pepsinA และ proteinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 50%, 50% และ 87.5% ตามลำดับ แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างไลปิด และ โปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus* นอกจากนี้เอนไซม์ α -amylase มีผลให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 50% เห็นได้ว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการยับยั้ง *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 19 เปรูเซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ *L.reuteri* KUB-D28 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	50	50	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	0	50	50	87.5
<i>V. parahaemolyticus</i>	50	0	0	0

2.3.10 undefined *Lactobacillus sp.* KUB-C44

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 20 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ lipase ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างไลปิดมีผลต่อการยับยั้ง *S. Enteritidis* ขณะที่เอนไซม์ lipase และ proteinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างไลปิด และ โปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus*

ตารางที่ 20 เปรูเซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ undefined *Lactobacillus sp.* KUB-C44 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	50	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	0	50	0	50
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	0	0

2.3.11 undefined *Lactobacillus sp.* KUB-D26

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 21 พบว่าหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *St. aureus* ลดลง 50% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการยับยั้ง *St. aureus* ขณะที่เอนไซม์ proteinaseK ทำให้กิจกรรมการยับยั้งต่อ *V. parahaemolyticus* ลดลง 87.5% แสดงว่าสารที่มีโครงสร้างโปรตีน มีผลต่อการยับยั้ง *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 21 เปรูเซ็นต์กิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของ undefined *Lactobacillus* sp. KUB-D26 หลังย่อยด้วยเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

จุลินทรีย์เป้าหมาย	α -amylase	lipase	pepsinA	proteinaseK
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>St. aureus</i>	50	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	0	0	87.5

2.4 การจำแนกกลุ่มสารยับยั้งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี

จากผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัสแต่สายพันธุ์ ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นโครงสร้างเคมีที่ซับซ้อน ประกอบด้วยโครงสร้างมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป ซึ่งแต่ละโครงสร้างสามารถยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมายได้ต่างกัน จากผลการทดลองข้างต้นสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต(carbohydrate:C), ลิพิด(lipid:L), โปรตีน(protein:P), P-C(Complex of Protein and Carbohydrate), L-P(Complex of Lipid and Protein), L-C(Complex of Lipid and Carbohydrate), P-C-L(Complex of Protein Carbohydrate and Lipid)

2.4.1 กลุ่ม C สารยับยั้งมีโครงสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต จัดเป็นสาร non-bacteriocins พบว่าผลิตจากเชื้อ *L. fermentum* KUB-D18 KUB-D73 KUB-J92 Undefined *Lactobacillus* sp. KUB-D26 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง *St. aureus* TISTR 029, *Sh. dysenteriae* DMST 15111 *E. coli* 0157:H7 และ *S. Enteritidis* DMST 17368

2.4.2 กลุ่ม L สารยับยั้งมีโครงสร้างเป็นลิพิด จัดเป็นสาร non-bacteriocins ผลิตโดย *L. salivarius* KUB-I48 และ Undefined *Lactobacillus* sp. KUB-C44 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. Enteritidis* DMST 17368

2.4.3 กลุ่ม P สารยับยั้งมีโครงสร้างเป็น โปรตีน ซึ่งจัดเป็นสาร bacteriocins พบว่าผลิตจากเชื้อ *L. fermentum* KUB-D18 KUB-D39 KUB-D73 KUB-J92 *L. salivarius* KUB-I49 KUB-J61 *L. reuteri* KUB-D28 และ Undefined *Lactobacillus* sp. KUB-D26 มีความสามารถในการยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ATCC 317802, *Sh. dysenteria* DMST 15111, *E. coli* 0157:H7 *S. Enteritidis* DMST 17368 และ *St. aureus* TISTR 029

2.4.4 กลุ่ม P-C สารยับยั้งกลุ่มนี้จัดเป็น bacteriocins ที่มีโครงสร้างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต แลคโตบาซิลลัสที่ผลิตสารกลุ่มนี้คือ *L. fermentum* KUB-C33 และ KUB-D39 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *V. parahaemolyticus* ATCC317802

2.4.5 กลุ่ม L-P สารยับยั้งกลุ่มนี้จัดเป็นสาร non-bacteriocins โครงสร้างสารประกอบด้วยไลปิดและโปรตีน ผลิตโดย *L. reuteri* KUB-D28 และ Undefined *Lactobacillus* sp. KUB-D26 มีความสามารถในการยับยั้ง *St. aureus* TISTR 029 และ *E. coli* 0157:H7

2.4.6 กลุ่ม L-C สารยับยั้งกลุ่มนี้จัดเป็นสาร non-bacteriocins โครงสร้างสารประกอบด้วยไลปิดและคาร์โบไฮเดรต พบว่าผลิตจากเชื้อ *L. salivarius* KUB-I48 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง *St. aureus* TISTR 029

2.4.7 กลุ่ม P-C-L สารยับยั้งกลุ่มนี้จัดเป็นสาร bacteriocins โครงสร้างสารประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไลปิด แลคโตบาซิลลัสที่ผลิตสารกลุ่มนี้คือ *L. fermentum* KUB-C33 และ KUB-D39 สารนี้มีความสามารถในการยับยั้ง *St. aureus* TISTR 029

ผลการศึกษาโครงสร้างทางเคมีพบว่า สารออกฤทธิ์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีน หรือมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบจัดเป็นสารในกลุ่ม สารคล้ายแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-like) ตามคำจำกัดความของ Boris and Barbe's (2002) กล่าวว่าเป็นสารซึ่งทราบเบื้องต้นมีความคล้ายกับแบคทีริโอซิน อาจต้องรอการศึกษาขั้นต้นในขั้นตอนต่อไป หรือเป็นสารที่มีสมบัติไม่ตรงตามคำจำกัดความหลักของแบคทีริโอซินและมีแนวโน้มว่าสารนี้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ได้นอกเหนือจากสายพันธุ์ใกล้เคียง

มีความเป็นไปได้ว่าสารกลุ่ม P-C-L, P-C และ L-P อยู่ในแบคทีเรียโอซินกลุ่มที่ 4 (Klaenhammer, 1993) โดยแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้เป็นสารมีลักษณะเป็น โครงสร้างเชิงซ้อน เช่น พวก glycoprotein lipoprotein ได้แก่ Lacticin 27 และ lacstrepcins Amanda *et al.* (2007) ศึกษา โครงสร้างสารยับยั้งจาก *Bacillus* sp. พบว่าเป็น สารคล้ายแบคทีเรียโอซิน ที่มีโครงสร้างเป็น lipopeptide โดยถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ pronaseE และ lipase สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ หลากหลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Erwinia carotovora*, *Pasteurella haemolytica*, *S. Gallinarum* นอกจากนี้ *Leuconostoc paramesenteroides* OX สามารถสร้างสาร leuconocin S เป็นสารประเภท glycoprotein ที่ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ α -amylase, trypsin, α -chymotrypsin, protease และ proteinase สามารถยับยั้ง *L. sake* ATCC 15521 ได้ (Catherine *et al.*, 1992)

นอกจากนี้กลุ่มที่ไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ C, L, L-C จัดเป็นสารกลุ่ม non-bacteriocin เนื่องจากไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ

จากการศึกษาชนิดของสารยับยั้งที่ผลิตจากแลคโตบาซิลลัสทำให้ทราบว่า สารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ละชนิดถึงแม้จะผลิตจากแลคโตบาซิลลัสสปีชีส์เดียวกันก็มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ลักษณะของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *Bifidobacterium* ถึงแม้จะเป็นสายพันธุ์เดียวกันและมีที่มาจากแหล่งเดียวกัน พบว่ามีสารยับยั้งได้หลายชนิด (Toure *et al.*, 2003) ในการศึกษาพบสารจากแลคโตบาซิลลัสที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายมีหลายชนิด จากการทดลองทำให้ทราบว่ากรดอินทรีย์มีอิทธิพลต่อการยับยั้ง และบางส่วนเป็นการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์ร่วมกับสารแบคทีเรียโอซินและ non-bacteriocin ซึ่งมีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์เป้าหมายต่างกันออกไป

3. ผลของแลคโตบาซิลลัสต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะ พิเศษทางเดินอาหารไก่

3.1 ผลของแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะพิเศษทางเดินอาหารไก่

พบว่า CFS ของแลคโตบาซิลลัสสามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ แต่ในการนำแลคโตบาซิลลัสนี้ไปใช้ในระบบทางเดินอาหารของไก่มีปัจจัยอีกหลายประการซึ่งอาจส่งผลต่อการยับยั้ง ได้แก่ เกลื่อน้ำดี เอนไซม์ และกรด เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย ปรีชดา (2550) ได้ทำการศึกษาก่อนหน้าต่อเกลื่อน้ำดีของ แลคโตบาซิลลัสทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าสามารถทนต่อกรดได้ โดยมีค่ากิจกรรมทนต่อกรดอยู่ระหว่าง 8.73-55.92 เปอร์เซ็นต์ และแลคโตบาซิลลัสเหล่านี้ยังสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดภายในทางเดินอาหารได้ด้วย

ในการศึกษานี้ต้องการศึกษาผลของของพิเศษในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ crop, proventriculus and gizzard, duodenum, jejunum, ileum และ clocca โดยทำการเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml ร่วมกับจุลินทรีย์เป้าหมาย เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ATCC 317802 ที่โดยทั่วไปไม่พบในทางเดินอาหารสัตว์บก ทำการศึกษาโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 cfu/ml ที่สภาวะพิเศษในทางเดินอาหารไก่ เลี้ยงที่อุณหภูมิ $42 \rightarrow C$ ซึ่งใกล้เคียงกับภายในตัวไก่ จากนั้นหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายโดยพิจารณาในแต่ละส่วนทางเดินอาหาร

3.1.1. การศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

การศึกษากการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า แลคโตบาซิลลัสและ *St. aureus* สามารถเจริญบนอาหาร MSR ที่ใส่ 1% $CaCO_3$ โดยเกิดเป็นโคโลนีสีขาวและรอบโคโลนีเกิดบริเวณใส (clear zone) โดยโคโลนีของแลคโตบาซิลลัสมีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีของ *St. aureus* มาก การเจริญของจุลินทรีย์บนอาหาร selective media ได้แก่ EMB, XLD และ MSA พบว่า *E. coli* เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหาร EMB โดยเกิดโคโลนีสีดำวาวแบบโลหะ *S. Enteritidis* และ *Sh. dysenteriae* เท่านั้นสามารถเจริญบนอาหาร XLD โดยเกิดเป็นโคโลนีสีดำ และ สีเหลืองตามลำดับ และพบว่า *St. aureus* เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหาร MSA โดยโคโลนีมีสีเหลืองและเปลี่ยนอาหารเป็นสีเหลือง ซึ่งเห็นได้ว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของจุลินทรีย์เมื่อเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้อาหาร MRS+ $CaCO_3$, EMB, XLD และ MSA ใน

การนับปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp., *E. coli*, *S. Enteritidis*, *Sh. dysenteriae* และ *St. aureus* ตามลำดับ

3.1.2 การศึกษาผลของแลคโตบาซิลลัสต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะที่เอชทางเดินอาหารไก่ที่ระยะเวลาของการเคลื่อนที่ผ่านของอาหาร

ในการศึกษาเบื้องต้น โดยการเลี้ยง *L. salivarius* KUB-I49, undefined *Lactobacillus* sp. KUB-C44 ร่วมกับจุลินทรีย์เป้าหมาย ที่สภาวะที่เอช ทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ที่ระยะเวลาที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วน crop, proventriculus and gizzard, duodenum, jejunum, ileum และ clocca ได้แก่ 50, 90, 10, 30, 70 และ 25 นาที พบว่าปริมาณแลคโตบาซิลลัส และจุลินทรีย์เป้าหมายมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ยกเว้นในส่วน proventriculus and gizzard ข้อมูลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 22-29 เห็นได้ว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสยังไม่มีการเจริญ และผลิตสารยับยั้งในช่วงเวลาสั้น 25-90 นาที

ตารางที่ 22 ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนผ่าน (นาที)	ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (cfu/ml)	
		ชุดทดลอง	
		เวลาเริ่มต้น	เวลาสูงสุด
Crop	50	2.55-3.55x10 ⁶	2.00-3.55x10 ⁶
Proventriculus	90	3.00-3.60x10 ⁴	<10
Duodenum	10	3.10-3.35x10 ⁶	3.35-3.50x10 ⁶
Jejunum	30	3.05-3.80x10 ⁶	3.15-4.20x10 ⁶
Ileum	70	2.75-3.60x10 ⁶	2.50-3.60x10 ⁶
clocca	25	2.90-3.60x10 ⁶	2.14-3.98x10 ⁶

ตารางที่ 23 ปริมาณ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แลคโตบาซิลลัส ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนผ่าน (นาที)	ปริมาณ <i>E. coli</i> O157:H7 (cfu/ml)							
		ชุดควบคุม				ชุดทดลอง			
		เวลาเริ่มต้น	พีเอช	เวลาสูงสุด	พีเอช	เวลาเริ่มต้น	พีเอช	เวลาสูงสุด	พีเอช
Crop	50	5.20-6.05X10 ⁵	5.50-5.61	5.50-6.15x10 ⁵	5.50-5.60	3.80-7.95X10 ⁵	5.50-5.56	3.67-6.95x10 ⁵	5.49-5.56
Proventriculus	90	1.00-2.30X10 ²	2.48-2.50	<10	2.49-2.50	1.00-2.10X10 ²	2.48-2.50	<10	2.48-2.50
Duodenum	10	4.05-4.45X10 ⁵	5.00-5.13	3.95-6.70x10 ⁵	5.00-5.03	3.854.30X10 ⁵	5.09-5.50	3.90-4.60x10 ⁵	5.01-5.09
Jejunum	30	6.45-7.10x10 ⁵	6.50-6.60	4.20-6.60x10 ⁵	6.50-6.60	4.20-6.000x10 ⁵	6.49	2.90-3.90x10 ⁵	6.49
Ileum	70	4.75-5.05x10 ⁵	7.00-7.12	1.48-5.00x10 ⁵	7.03-7.12	3.55-4.55x10 ⁵	7.01-7.02	1.05-4.50x10 ⁵	7.01-7.02
clocca	25	4.25-5.35x10 ⁵	8.05-8.14	4.00-5.35x10 ⁶	8.05-8.14	4.85-5.15x10 ⁵	8.01-8.10	4.95-5.00x10 ⁵	8.00-8.01

ตารางที่ 24 ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. Enteritidis* DMST 17368 ในสภาวะฟิโอส จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนผ่าน (นาที)	ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (cfu/ml)	
		ชุดทดลอง	
		เวลาเริ่มต้น	เวลาสูงสุด
Crop	50	$1.50-4.95 \times 10^6$	$1.50-5.00 \times 10^6$
Proventriculus and Gizzard	90	$<10-6.04 \times 10^4$	$<10-2.43 \times 10^2$
Duodenum	10	$3.95-4.50 \times 10^6$	$3.55-4.50 \times 10^6$
Jejunum	30	$3.50-4.35 \times 10^6$	$3.50-4.70 \times 10^6$
Ileum	70	$1.30-5.25 \times 10^6$	$1.30-5.75 \times 10^6$
clocca	25	$2.00-4.60 \times 10^6$	$2.00-4.74 \times 10^6$

ตารางที่ 25 ปริมาณ *S. Enteritidis* DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แลคโตบาซิลลัส ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนผ่าน (นาที)	ปริมาณ <i>S. Enteritidis</i> DMST 17368 (cfu/ml)							
		ชุดควบคุม				ชุดทดลอง			
		เวลาเริ่มต้น	พีเอช	เวลาสูงสุด	พีเอช	เวลาเริ่มต้น	พีเอช	เวลาสูงสุด	พีเอช
Crop	50	2.02-5.70x10 ⁵	5.50-5.60	2.70-7.15x10 ⁵	5.51-5.60	4.65-4.80x10 ⁵	5.50-5.58	4.70-6.85x10 ⁵	5.50-5.58
Proventriculus	90	<10-5.07x10 ⁵	2.50-2.56	<10	2.50-2.56	0-3.0x10 ⁵	2.49-2.58	<10	2.49-2.58
Duodenum	10	3.90-4.22x10 ⁵	5.07-5.51	2.25-3.85x10 ⁵	5.03-5.07	3.05-3.45x10 ⁵	5.00-5.09	3.10-3.90x10 ⁵	5.00-5.09
Jejunum	30	1.35-5.70x10 ⁵	6.50-6.57	3.60-7.00x10 ⁵	6.49-6.57	5.05-8.50x10 ⁵	6.49-6.58	8.80-8.95x10 ⁵	6.49-6.58
Ileum	70	2.39-4.75x10 ⁵	6.92-7.01	3.00-7.00x10 ⁵	6.92-7.01	3.80-4.80x10 ⁵	6.91-7.02	4.85-8.95x10 ⁵	6.91-7.02
clocca	25	1.36-4.05x10 ⁵	7.84-8.05	1.44-4.96x10 ⁵	7.84-8.05	1.27-1.25x10 ⁵	7.87-8.00	1.00-1.33x10 ⁵	7.87-8.00

ตารางที่ 26 ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Sh. dysenteriae* DMST 15111 ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนผ่าน (นาที)	ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (cfu/ml)	
		ชุดทดลอง	
		เวลาเริ่มต้น	เวลาสูงสุด
Crop	50	1.1-8.65X10 ⁶	1.1-8.00X10 ⁶
Proventriculus	90	6.00-9.35X10 ⁴	<10-9.35x10 ⁵
Duodenum	10	7.60-8.65X10 ⁶	8.40-8.60x10 ⁶
Jejunum	30	1.05-1.50x10 ⁶	1.15-1.50x10 ⁶
Ileum	70	1.20-7.30x10 ⁶	2.20-7.50x10 ⁶
clocca	25	1.10-8.80x10 ⁶	1.74-8.40x10 ⁶

ตารางที่ 27 ปริมาณ *Sh. dysenteriae* DMST 15111 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แลคโตบาซิลลัส ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่าน (นาที)	ปริมาณ <i>Sh. dysenteriae</i> DMST 15111 (cfu/ml)							
		ชุดควบคุม				ชุดทดลอง			
		เวลาเริ่มต้น	พีเอช	เวลาสูงสุด	พีเอช	เวลาเริ่มต้น	พีเอช	เวลาสูงสุด	พีเอช
Crop	50	4.10-7.60X10 ⁵	5.50-5.66	4.50x-7.9510 ⁵	5.50-5.66	5.40-7.40X10 ⁵	5.02-5.59	1.19-5.50x10 ⁵	5.50-5.54
Proventriculus	90	<10	2.50-2.60	<10	2.50-2.61	<10	2.50-2.60	<10	2.50-2.56
Duodenum	10	1.21-6.70X10 ⁵	5.00-5.11	7.00 x10 ⁵	5.00-5.11	5.50-8.65X10 ⁵	5.02-5.09	1.14-5.40x10 ⁵	5.02-5.09
Jejunum	30	1.03-1.64x10 ⁵	6.51-6.63	1.12-3.15x10 ⁵	6.63-6.50	1.38-6.50x10 ⁵	6.50-6.57	3.35-6.30x10 ⁵	6.50-6.57
Ileum	70	1.36-7.05x10 ⁵	6.97-7.01	1.08-5.00x10 ⁵	6.97-7.01	1.70-6.30x10 ⁵	6.91-7.01	1.06-6.00x10 ⁵	6.91-7.01
clocca	25	3.35-7.10x10 ⁵	7.96-8.03	3.20-6.70x10 ⁶	7.96-8.03	1.81-8.35x10 ⁵	7.92-8.00	3.35-8.55x10 ⁵	7.92-8.00

ตารางที่ 28 ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* TISTR 029 ในสภาวะพีเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนผ่าน (นาที)	ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (cfu/ml)	
		ชุดทดลอง	
		เวลาเริ่มต้น	เวลาสูงสุด
Crop	50	3.35-6.35X10 ⁶	4.20-6.00X10 ⁶
Proventriculus and Gizzard	90	<10-2.05X10 ⁴	<10-3.40x10 ⁴
Duodenum	10	3.75-5.50X10 ⁶	4.20-5.15x10 ⁶
Jejunum	30	5.50-6.65x10 ⁶	4.50-6.50x10 ⁶
Ileum	70	2.42-2.75x10 ⁶	3.45-2.20x10 ⁶
clocca	25	5.80-6.75x10 ⁶	6.10-6.00x10 ⁶

ตารางที่ 29 ปริมาณ *St. aureus* TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แลคโตบาซิลลัส ในสภาวะฟิเอช จำลองทางเดินอาหารไก่ ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนั้น

ทางเดินอาหาร	เวลาสูงสุดที่อาหารเคลื่อนที่ผ่าน (นาที)	ปริมาณ <i>St. aureus</i> TISTR 029 (cfu/ml)							
		ชุดควบคุม				ชุดทดลอง			
		เวลาเริ่มต้น	ฟิเอช	เวลาสูงสุด	ฟิเอช	เวลาเริ่มต้น	ฟิเอช	เวลาสูงสุด	ฟิเอช
Crop	50	4.85-5.20X10 ⁵	5.51-5.56	4.50-4.85x10 ⁵	5.51-5.56	4.85-5.67X10 ⁵	5.52-5.80	3.70-4.40x10 ⁵	5.51-5.56
Proventriculus	90	0-1x10	2.48-2.50	<10	2.48-2.50	0-4.0x10	2.48-2.50	<10	2.49-2.50
Duodenum	10	5.34-6.80X10 ⁵	5.01-5.10	5.90-6.95x10 ⁵	5.00-5.10	7.10X10 ⁵	5.00-5.10	6.90x10 ⁵	5.00-5.10
Jejunum	30	2.30-5.60x10 ⁵	6.49-6.55	2.20-5.80x10 ⁵	6.50-6.55	3.40-5.30x10 ⁵	6.49-6.60	4.00-5.30x10 ⁵	6.49-6.58
Ileum	70	1.30-5.00x10 ⁵	7.00-7.12	2.30-4.700x10 ⁵	7.00-7.12	2.20-4.40x10 ⁵	6.89-7.00	5.10-4.50x10 ⁵	7.00-7.01
clocca	25	6.55-7.00x10 ⁵	7.85-8.00	5.90-6.80x10 ⁶	7.85-8.01	5.00-5.20x10 ⁵	7.88-8.00	6.75-5.75x10 ⁵	7.88-8.00

3.1.3 การศึกษาผลของแลคโตบาซิลลัสต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะ พีเอชจำลองของทางเดินอาหารไก่ที่เวลา 18 ชั่วโมง

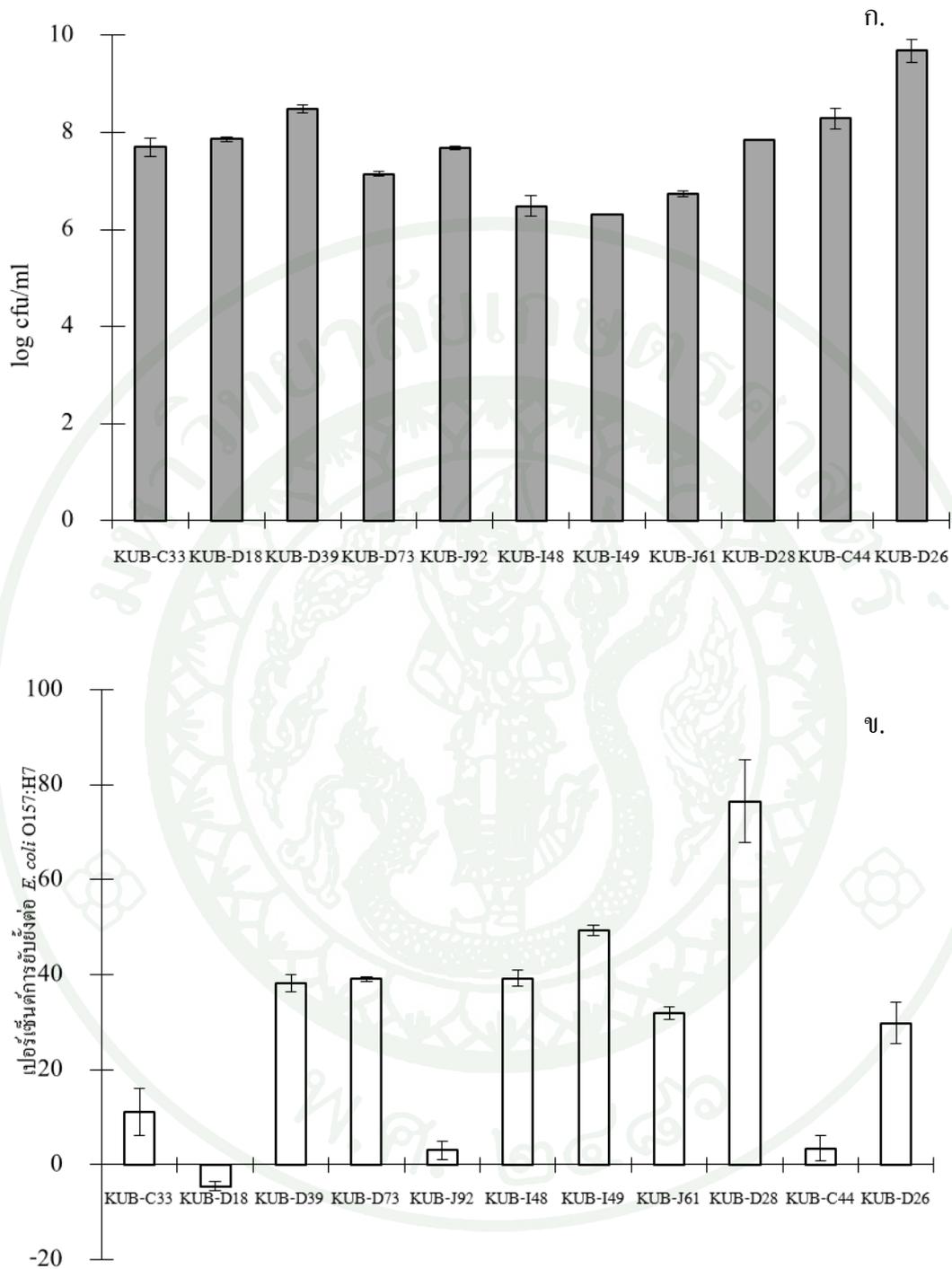
ก. กระเพาะปัสสาวะ (crop) (พีเอช 5.5)

ผลการทดลองพบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* มีปริมาณเชื้อรอดชีวิตแตกต่างกันอยู่ในช่วง 6.30-9.68 log(cfu/ml) (ภาพที่ 9ก.) มีค่าพีเอชอยู่ใน 4.14-5.07 พบว่า *L. reuteri* KUB D28 สามารถยับยั้ง *E. coli* สูงสุด 76.53% (ภาพที่ 9ข.)

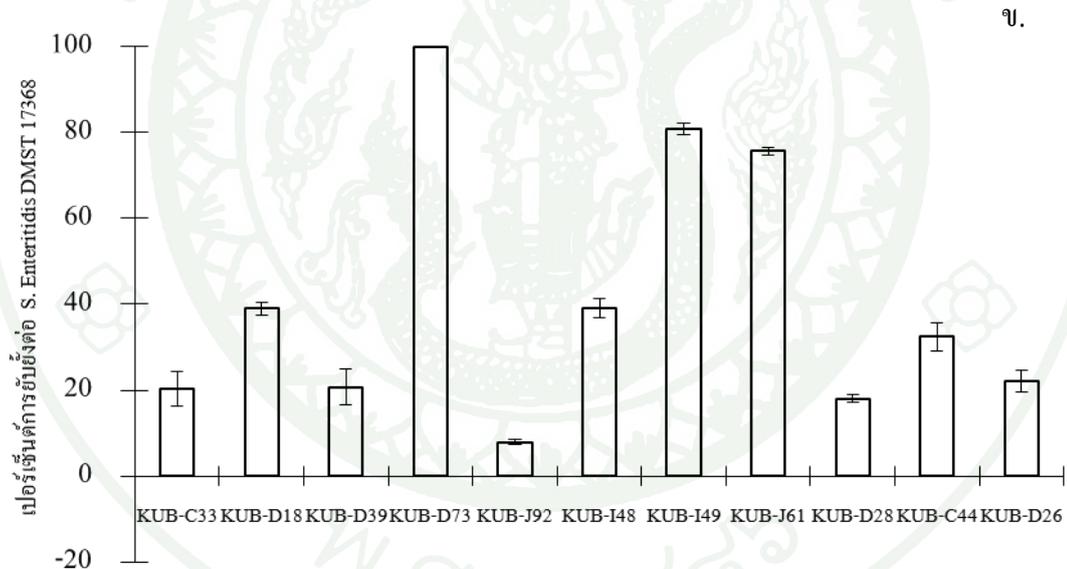
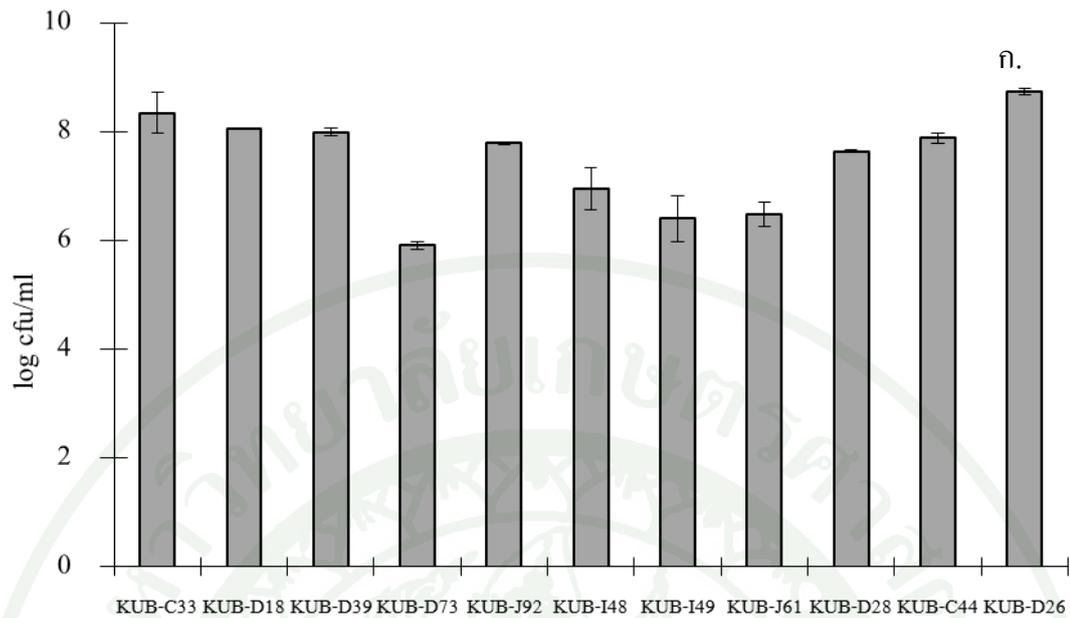
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *S. Entertidis* มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 5.90-8.74 log(cfu/ml) (ภาพที่ 10ก.) มีค่าพีเอชอยู่ใน 4.13-4.75 พบว่า *L. fermentum* KUB-D73 สามารถยับยั้ง *S. Entertidis* ได้สูงที่สุด 100% (ภาพที่ 10ข.)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *Sh. dysenteriae* มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 6.00-7.76 log(cfu/ml) (ภาพที่ 11ก.) มีค่าพีเอชอยู่ใน 4.14-4.83 พบว่า *L. fermentum* KUB-J61, KUB-J92 และ *L. reuteri* KUB-D28 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* ได้สูงที่สุด 100% (ภาพที่ 11ข.)

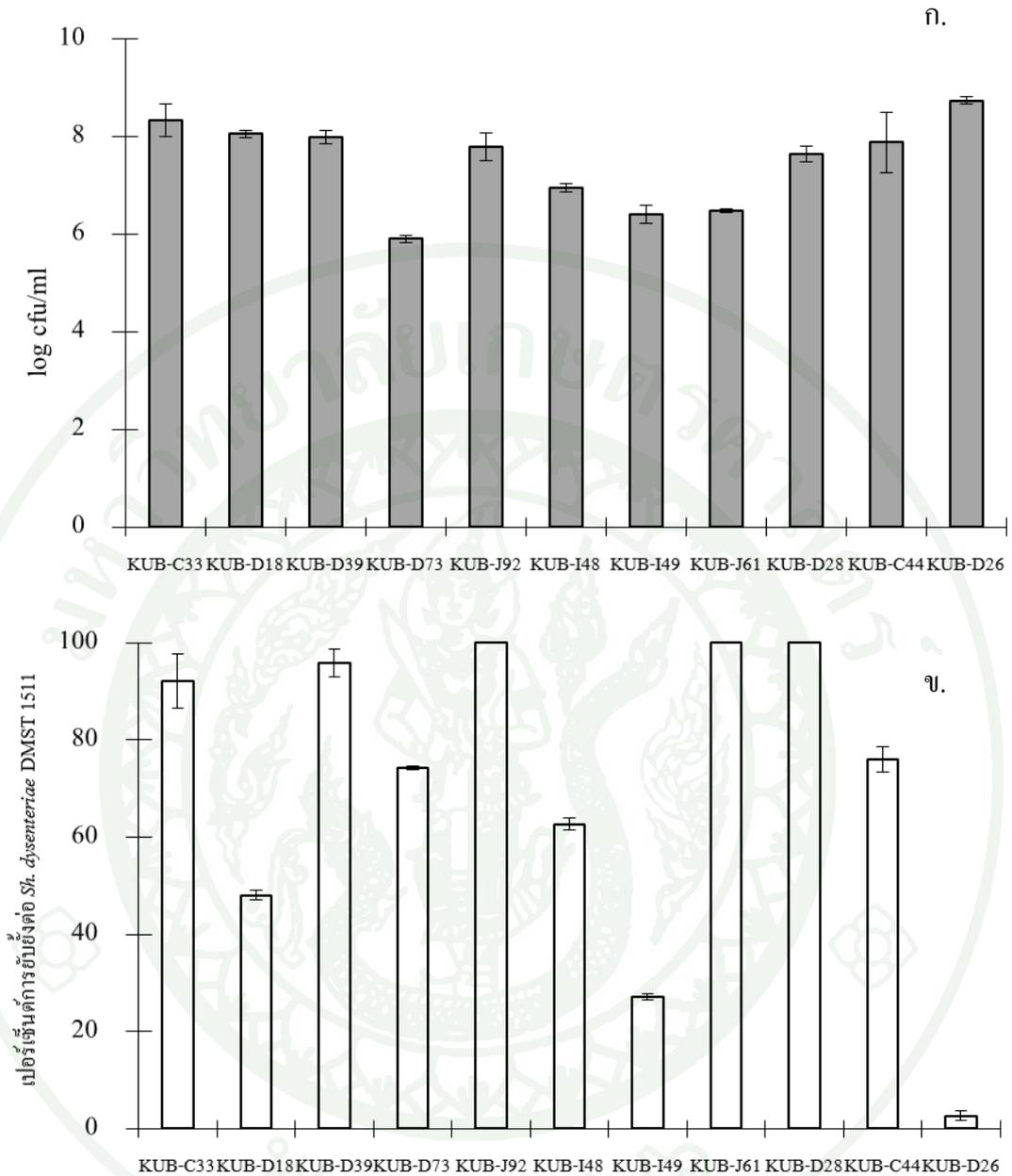
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 6.00-8.29 log(cfu/ml) (ภาพที่ 12ก.) มีค่าพีเอชอยู่ใน 4.09-4.66 โดยพบว่า *L. fermentum* KUB-C33 ยับยั้ง *St. aureus* ได้สูงที่สุด 59.02% (ภาพที่ 12ข.)



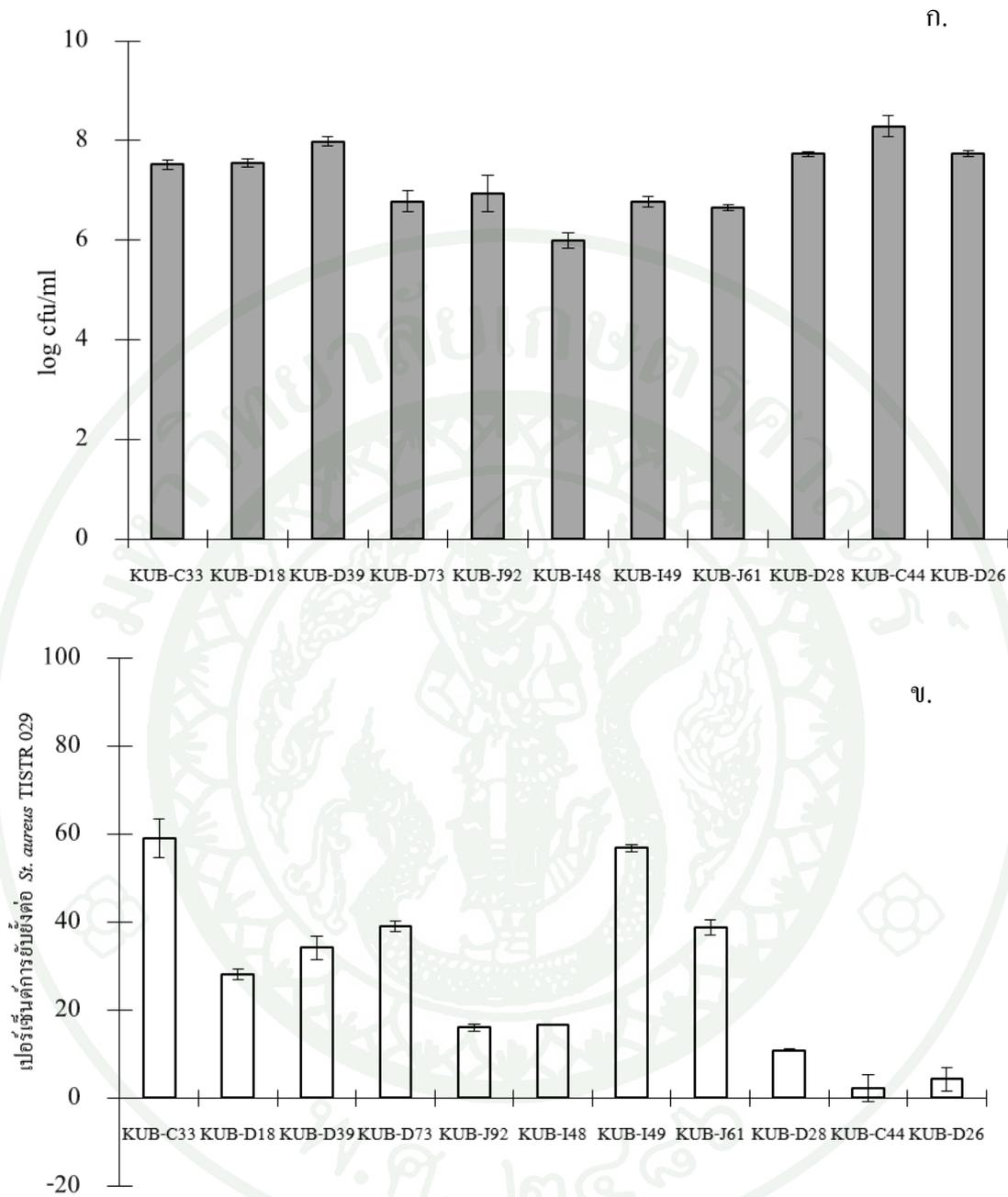
ภาพที่ 9 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5)
 ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *E. coli* O157:H7



ภาพที่ 10 การเลี้ยวร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *S. Enteritidis* DMST 17368 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง
 ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368



ภาพที่ 11 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *Sh. dysenteriae* DMST 1511 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 1511



ภาพที่ 12 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *St. aureus* TISTR 029 1511 ในสภาวะ crop (พีเอช 5.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *St. aureus* TISTR 029

เห็นว่าแลคโตบาซิลลัสส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ เป้าหมายทุกตัวได้ดีในทางเดินอาหารส่วนนี้ โดยเฉพาะต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 15111

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์ เป้าหมายสภาวะ พิเอซ ของทางเดินอาหาร crop พบว่า *L. reuteri* KUB-D28 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* *L. fermentum* KUB-D73 ยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *St. aureus* *L. salivarius* KUB-I49 ยับยั้ง *E. coli*, *S. Enteritidis* และ *St. aureus* และ *L. salivarius* KUB-J61 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* และ *S. Enteritidis*

แลคโตบาซิลลัส *L. fermentum* KUB-D18 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง -4.56% เนื่องจากปริมาณจุลินทรีย์เป้าหมายในชุดทดลองมีปริมาณมากกว่าในชุดควบคุมเล็กน้อย ซึ่งอาจถือได้ว่าไม่เกิดการยับยั้ง

นอกจากนี้ในทางเดินอาหารส่วนนี้มี พิเอซ ใกล้เคียงกับ ceacum ที่พบว่ามีการสะสมของจุลินทรีย์อยู่ที่ส่วนนี้มาก โดยมีค่า พิเอซ 5.8 (van der Wielen, 2000) ผลการทดลองนี้อาจแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของกิจกรรมการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ เป้าหมายใน พิเอซ ทางเดินอาหารส่วน ceacum

ข. กระเพาะจริง (proventriculus) และส่วนกระเพาะบด (gizzard) (พิเอซ 2.5)

ทางเดินอาหารส่วนนี้มีการผลิตกรด HCl ทำให้ส่วนนี้มีสภาวะแวดล้อม ส่วนนี้มีความเป็นกรดอย่างรุนแรง จากการศึกษเบื้องต้นในการเลี้ยง *Lactobacillus salivarius* KUB-I49 พบว่าจุลินทรีย์เป้าหมายมีจำนวนลดน้อยลงตั้งแต่เริ่มต้น (\blacktriangle 0-4 logcfu/ml) และมีจำนวนลดลงเป็น 0 log cfu/ml ที่เวลา 90 นาที ซึ่งเป็นเวลาสูงสุดที่อาหารจะเคลื่อนที่ผ่านทางเดินอาหารส่วนนี้

ค. ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) (พีเอช 5.0)

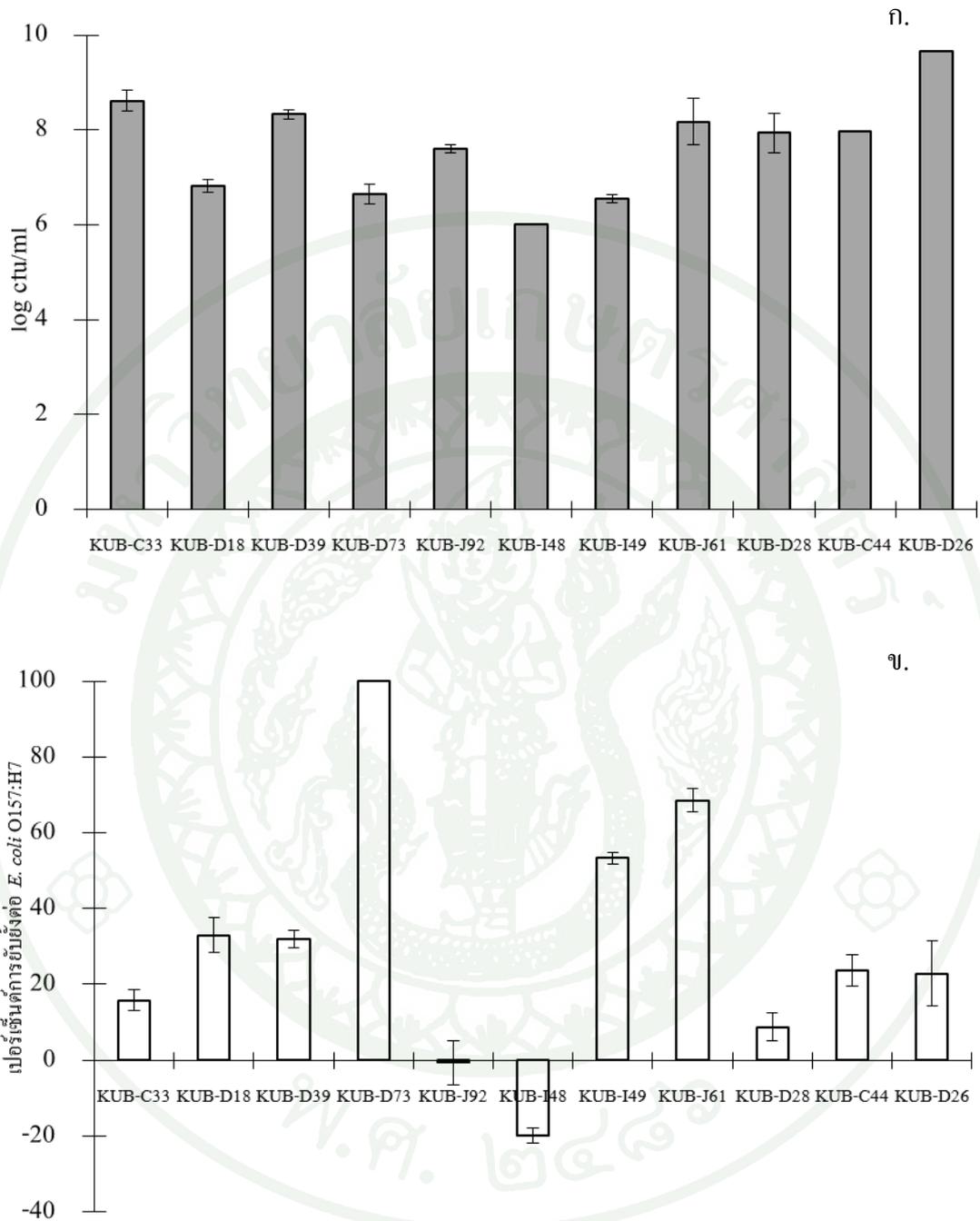
จากการทดลองพบว่าแลคโตบาซิลลัสทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* และ *S. Enteritidis* มี ปริมาตรรอดชีวิตแตกต่างกันอยู่ในช่วง 6.00-9.66 และ 6.00-7.84 log(cfu/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 13ก. และ 14ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.99-4.98 และ 3.98-4.52 ตามลำดับ *L. fermentum* KUB-D73 สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. Enteritidis* ได้สูงสุด 100% (ภาพที่ 13ข. และ 14ข.)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *Sh. dysenteriae* อยู่ในช่วง 4.02-8.53 log(cfu/ml) (ภาพที่ 15ก.) ค่า พีเอช อยู่ในช่วง 3.95-4.56 *L. salivarius* KUB-J61, KUB-I49, *L. reuteri* KUB-D28 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* ได้สูงสุด 100% (ภาพที่ 15ข.)

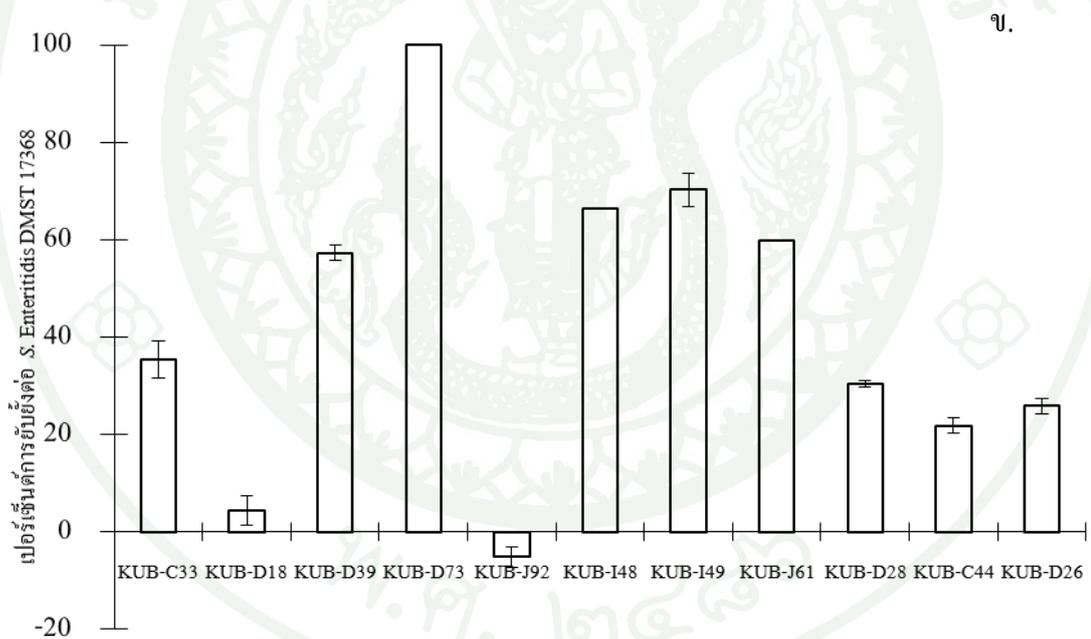
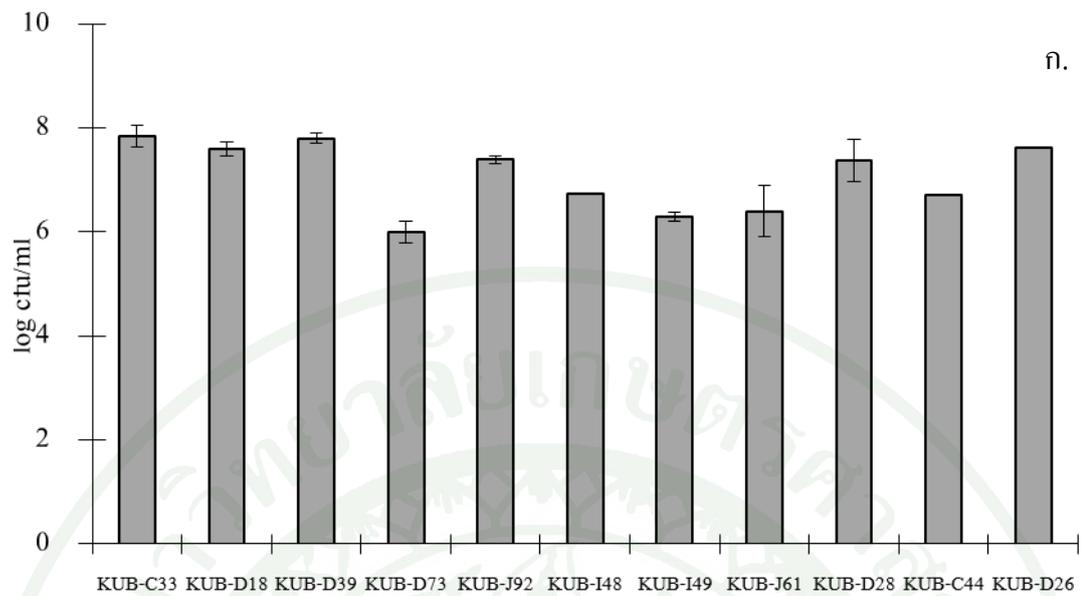
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* อยู่ในช่วง 6.05-7.92 log(cfu/ml) (ภาพที่ 16ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.97-5.20 *L. fermentum* KUB-D39 สามารถยับยั้ง *St. aureus* ได้สูงสุด 64.06% (ภาพที่ 16ข.)

เมื่อพิจารณาการประสิทธิภาพของเชื้อแลคโตบาซิลลัสจากความสามารถในยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ พีเอช ของ duodenum พบว่า *L. salivarius* KUB-I49 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Sh. dysenteriae* และ *S. Enteritidis* *L. salivarius* KUB-I48 ยับยั้ง *St. aureus* และ *Sh. dysenteriae* และ *L. salivarius* KUB-J61 ยับยั้ง *E. coli* และ *Sh. dysenteriae*

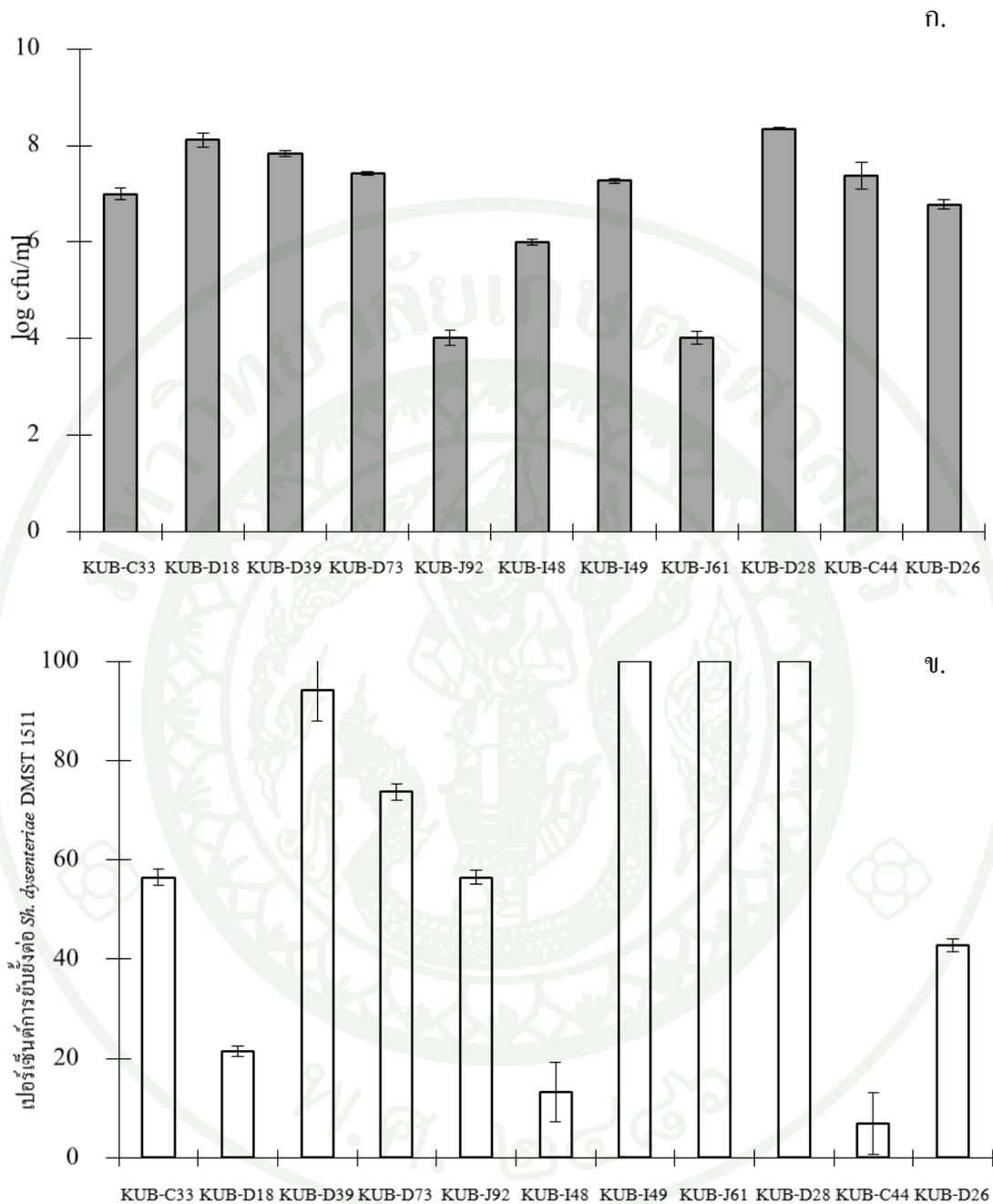
L. fermentum KUB-J92 ที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* DMST 17368 และ *L. salivarius* KUB-I48 ที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* และ undefined *Lactobacillus* KUB-C44 ที่เลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง -0.69%, -5.16%, -19.86% และ -8.80% ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณจุลินทรีย์เป้าหมายในชุดทดลองสามารถเจริญได้ดีกว่าในชุดควบคุมเล็กน้อย ซึ่งในกรณีของ KUB-I48 ที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* อาจเกิดการแข่งขันการใช้สารอาหาร สังเกตว่าปริมาณแลคโตบาซิลลัสไม่ต่างจากเริ่มต้น (\blacktriangle 6.0 log cfu/ml)



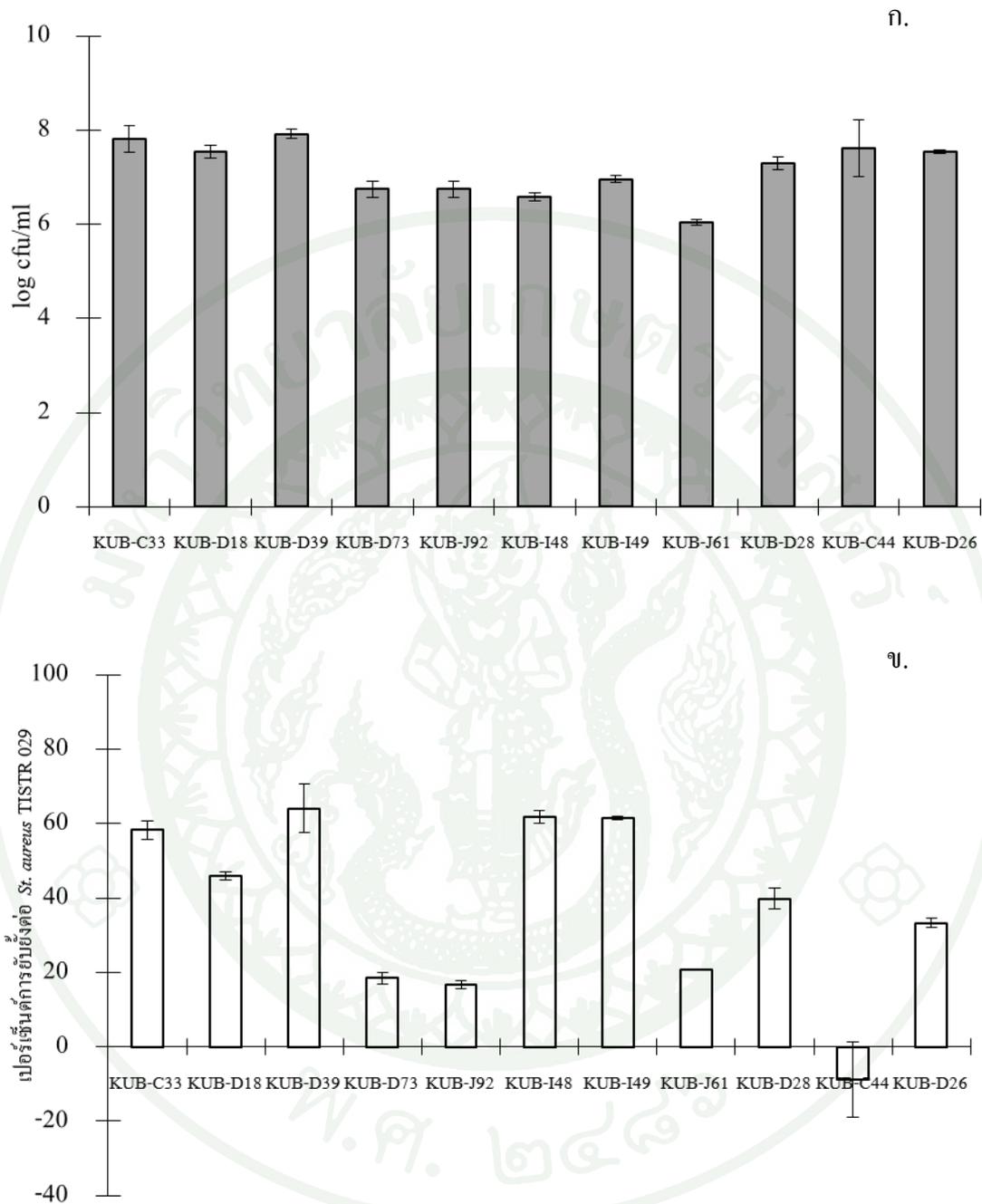
ภาพที่ 13 การเลียงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *E. coli* O157:H7



ภาพที่ 14 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *S. Enteritidis* DMST 17368 ในสภาวะ duodenum (พีเอช 5.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368



ภาพที่ 15 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *Sh. dysenteriae* DMST 1511 ในสภาวะ duodenum (พีเอช5.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 1511



ภาพที่ 16 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *St. aureus* TISTR 029 ในสภาวะ duodenum (พีเอช5.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *St. aureus* TISTR 029

ง. ลำไส้เล็กตอนกลาง jejunum (พีเอช 6.5)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* มีปริมาณรอดชีวิตต่างกันอยู่ในช่วง 7.078-9.51 log(cfu/ml) (ภาพที่ 17ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.42-5.78 *L. salivarius* KUB-I49 สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้สูงสุด 60.50% (ภาพที่ 17ข.)

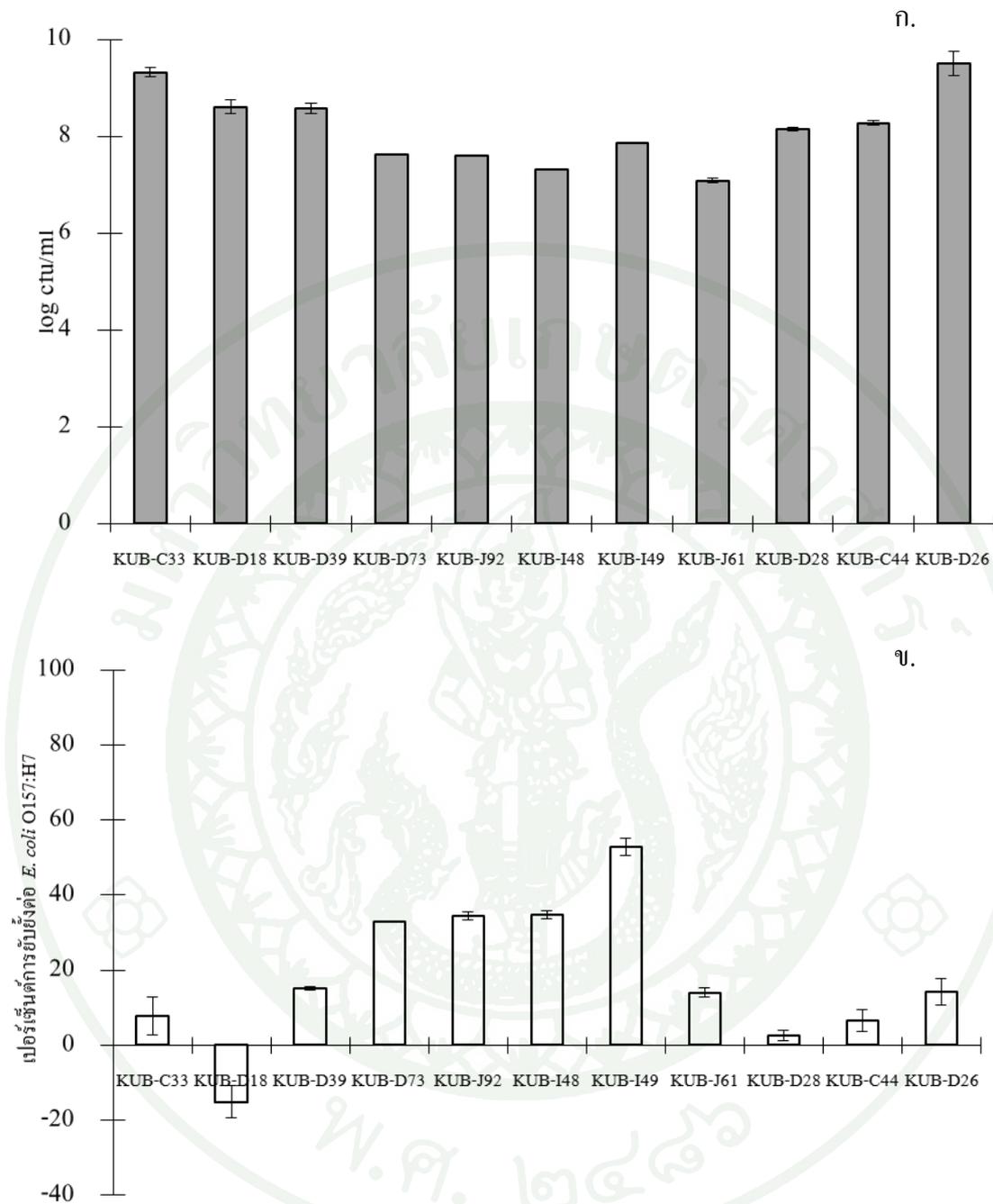
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *S. Enteritidis* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.19-8.65 log(cfu/ml) (ภาพที่ 18ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.41-5.28 *L. salivarius* KUB-I48 ยับยั้ง *S. Enteritidis* ได้สูงสุด 64.10% (ภาพที่ 18ข.)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *Sh. dysenteriae* มีปริมาณอยู่ในช่วง 6.36-8.34 log(cfu/ml) (ภาพที่ 19ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.35-5.33 *L. salivarius* KUB-I48, KUB-J61 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* ได้ 100% (ภาพที่ 19ข.)

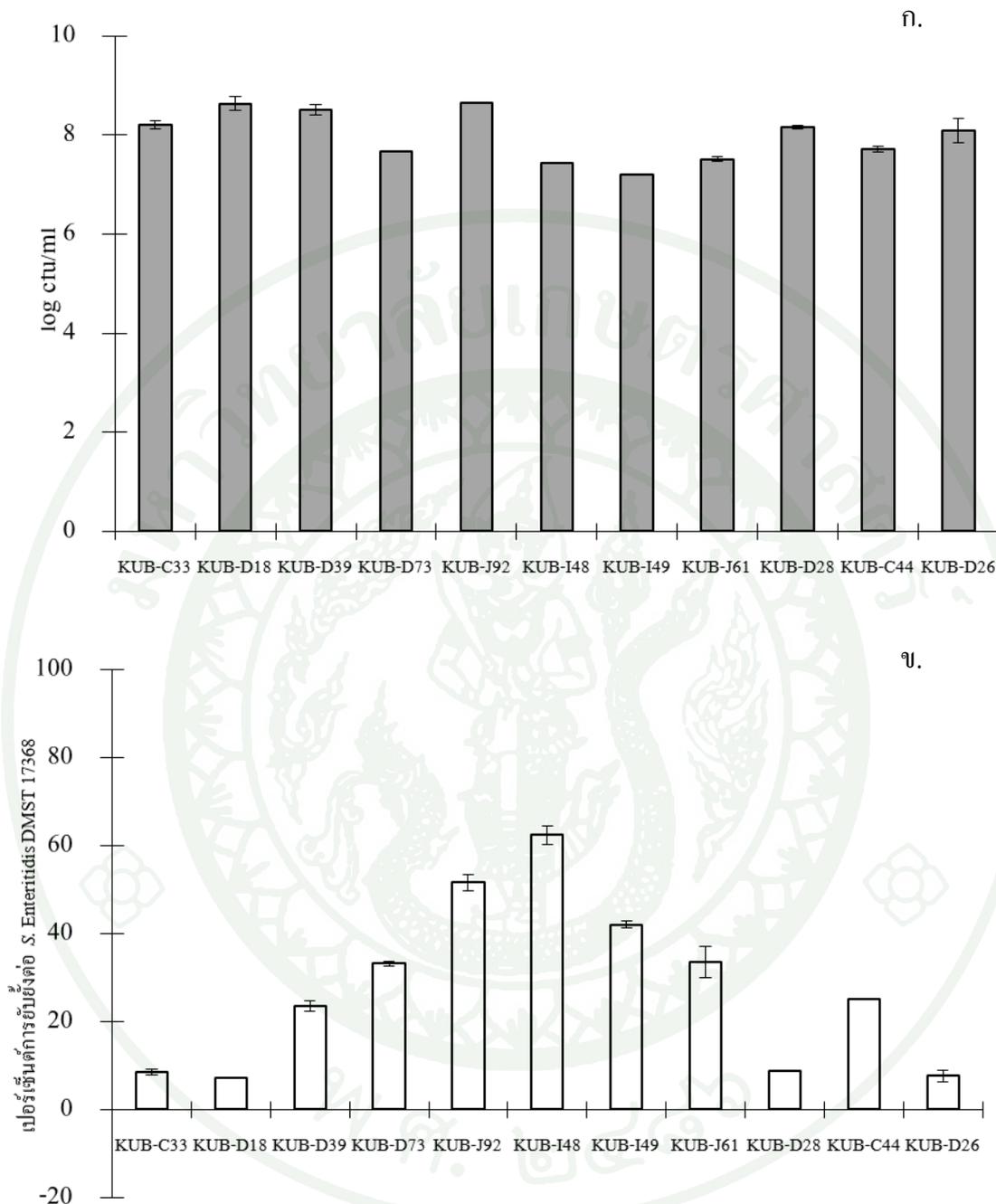
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.40-9.11 log(cfu/ml) (ภาพที่ 20ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.35-5.20 *L. salivarius* KUB-I49 ยับยั้ง *St. aureus* ได้ 59.71% (ภาพที่ 20ข.)

พิจารณาประสิทธิภาพการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสต่อจุลินทรีย์เป้าหมายในพีเอชทางเดินอาหารส่วน jejunum พบว่า *L. salivarius* KUB-I48 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. Enteritidis* และ *Sh. dysenteriae* และ KUB-I49 ยับยั้ง *E. coli* และ *St. aureus*

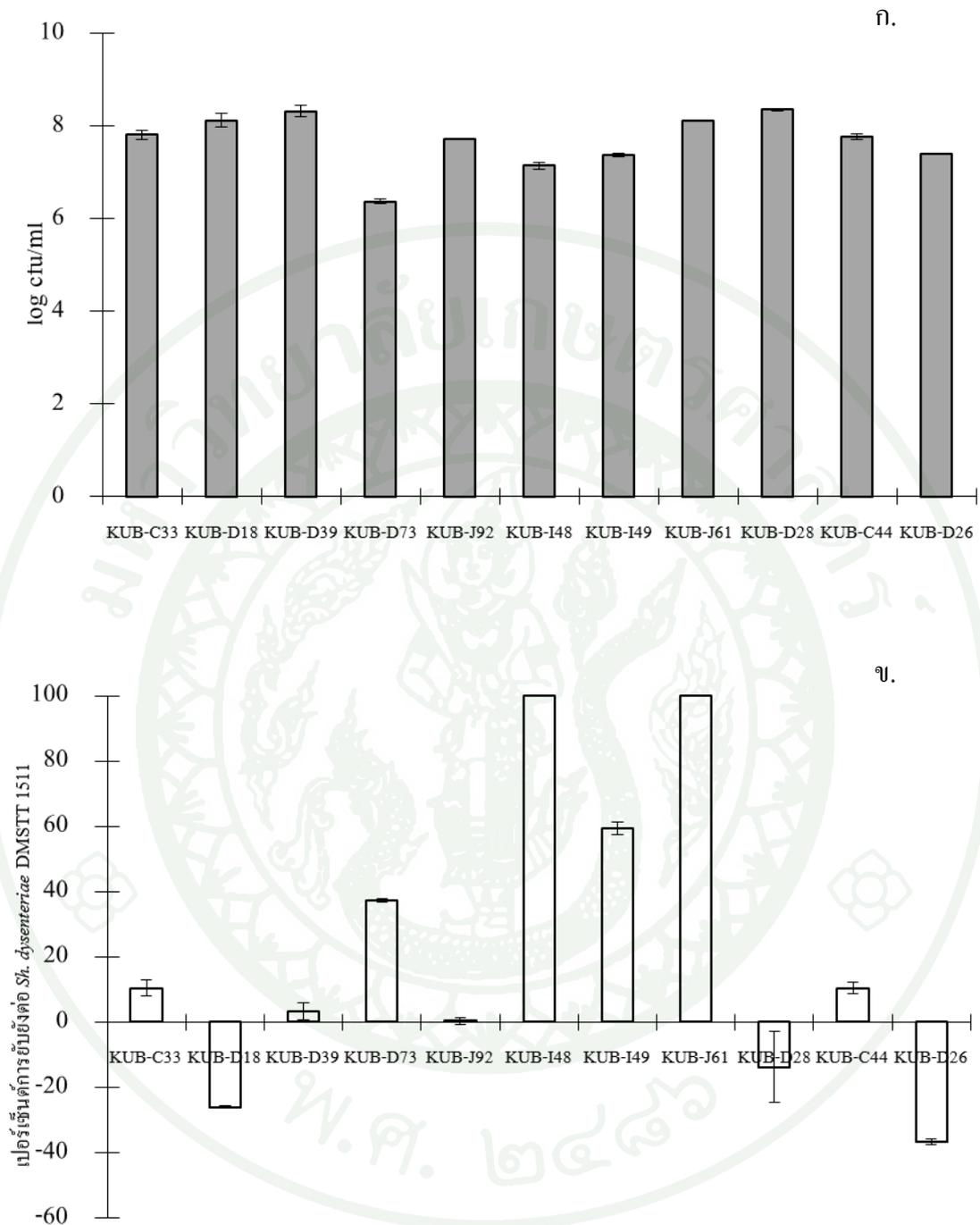
สังเกตได้ว่าที่สภาวะ พีเอช ที่ทางเดินอาหารส่วนนี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายได้น้อย ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากค่าพีเอช 6.5 ที่ค่อนข้างกลาง อาจมีผลทำให้สารยับยั้งที่ผลิตโดยแลคโตบาซิลลัสทำงานได้ไม่ดี เมื่อสังเกตจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่เป็นลบในหลายการทดลอง อาจเนื่องจาก พีเอช ที่สภาวะนี้ เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายทำให้สามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้ดีถึงแม้จะทำเลี้ยงร่วมกับแลคโตบาซิลลัสก็ตาม



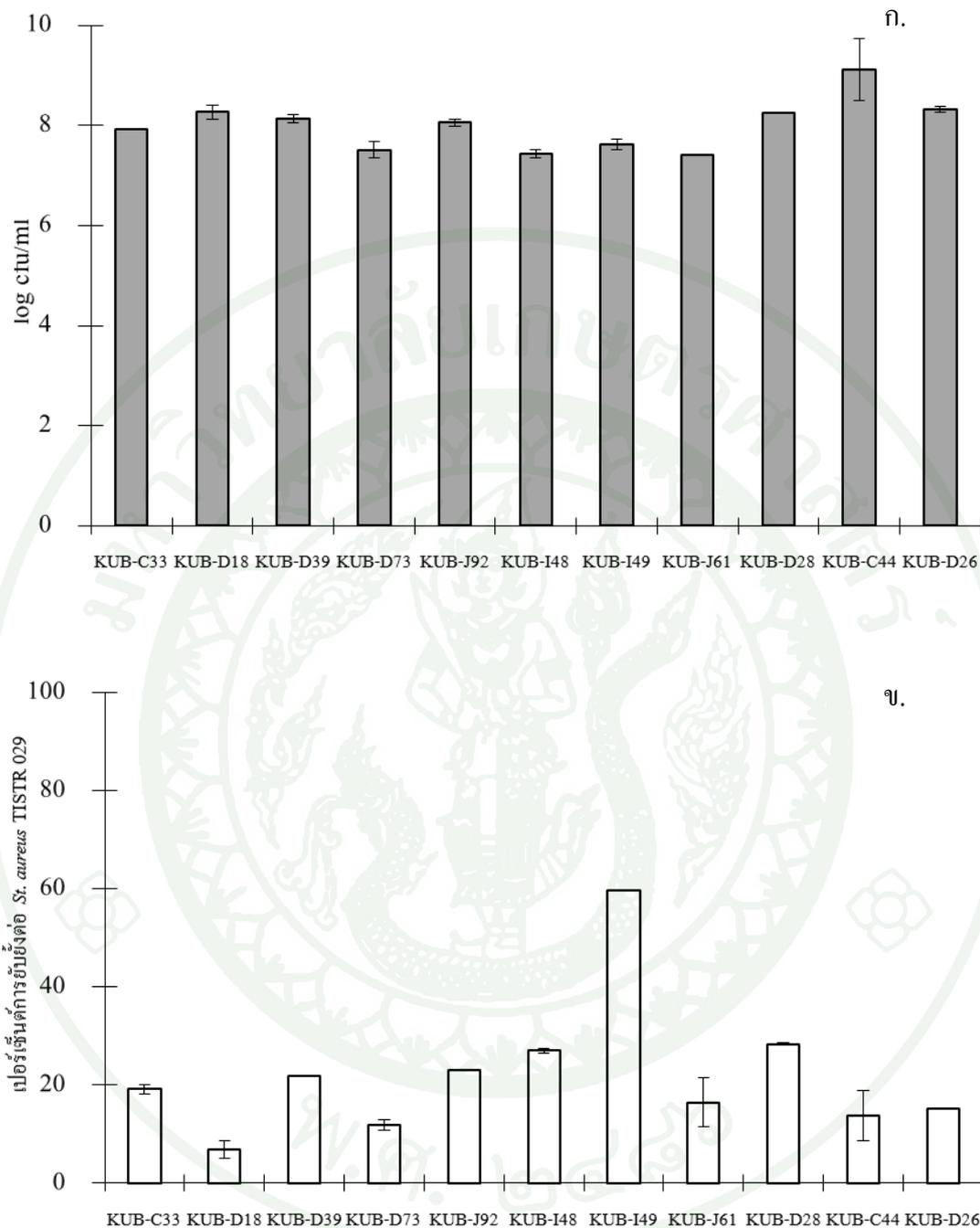
ภาพที่ 17 การเลี้ยวร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะ jejunum (พีเอช6.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *E. coli* O157:H7



ภาพที่ 18 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *S. Enteritidis* DMST 17368 ในสภาวะ jejunum (พีเอช6.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *Sh. dysenteriae* DMST 1511 ในสภาวะ jejunum (พีเอช6.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 1511



ภาพที่ 20 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *St. aureus* TISTR 029 ในสภาวะ jejunum (พีเอช 6.5) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *St. aureus* TISTR 029

จ. ลำไส้เล็กส่วนสุดท้าย ileum (พีเอช 7.0)

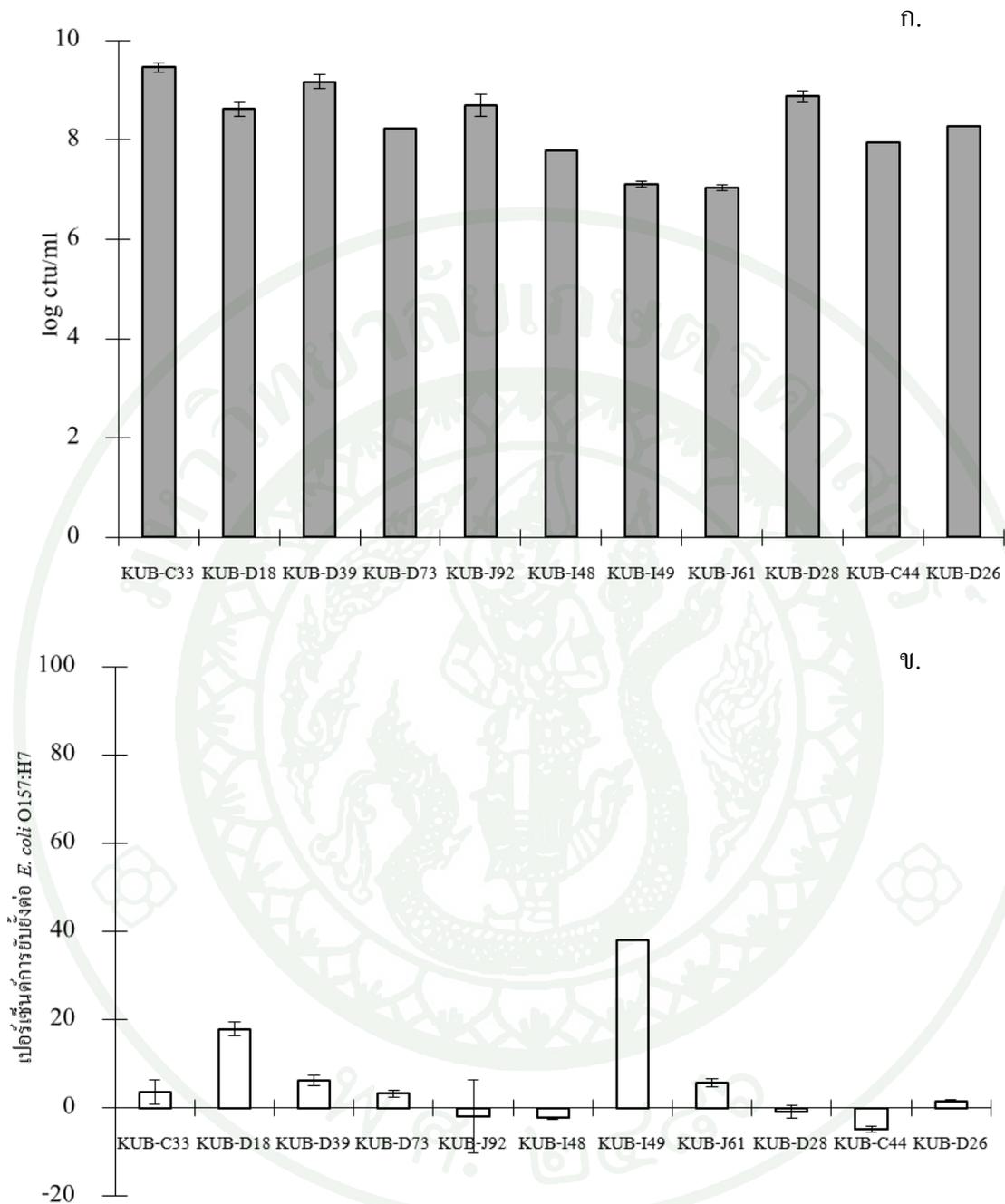
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.04-9.45 log(cfu/ml) (ภาพที่ 21ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.66-6.15 *L. salivarius* KUB-I49 ยับยั้ง *E. coli* ได้สูงที่สุด 38.38% (ภาพที่ 21ข.)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *S. Enteritidis* มีปริมาณอยู่ในช่วง 6.74-8.59 log(cfu/ml) (ภาพที่ 22ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.55-5.69 *L. salivarius* KUB-I48 ยับยั้ง *S. Enteritidis* ได้สูงที่สุด 38.85% (ภาพที่ 22ข.)

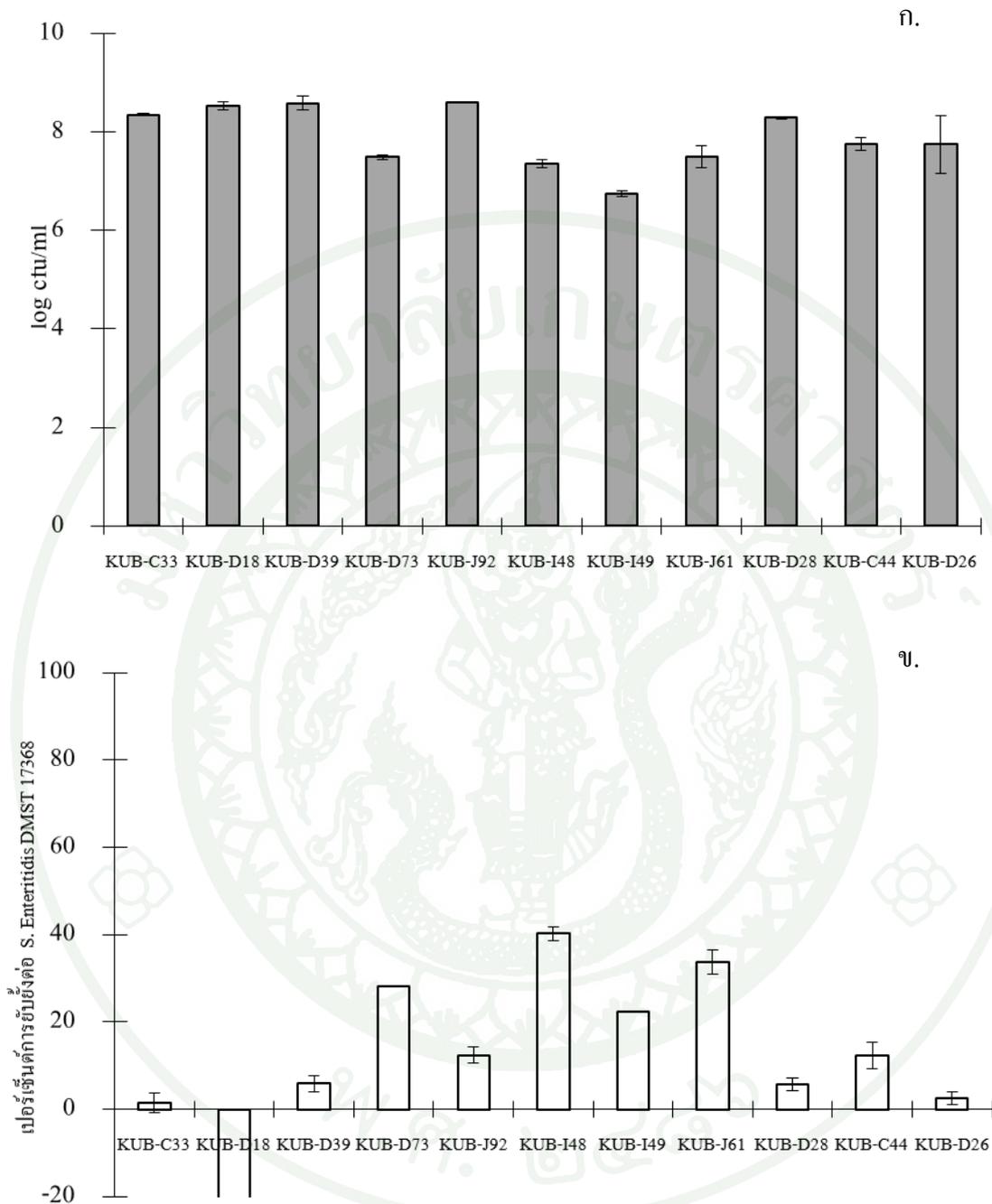
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *Sh. dysenteriae* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.37-8.92 log(cfu/ml) (ภาพที่ 23ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.56-5.72 *L. salivarius* KUB-I48, KUB-J61 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* ได้สูงสุด 100% (ภาพที่ 23ข.)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.57-8.89 log(cfu/ml) (ภาพที่ 24ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.50-5.71 *Lactobacillus* KUB-C44 ยับยั้ง *St. aureus* ได้สูงสุด 55.35% ขณะที่ *L. salivarius* KUB-I49 มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 29.21% (ภาพที่ 24ข.)

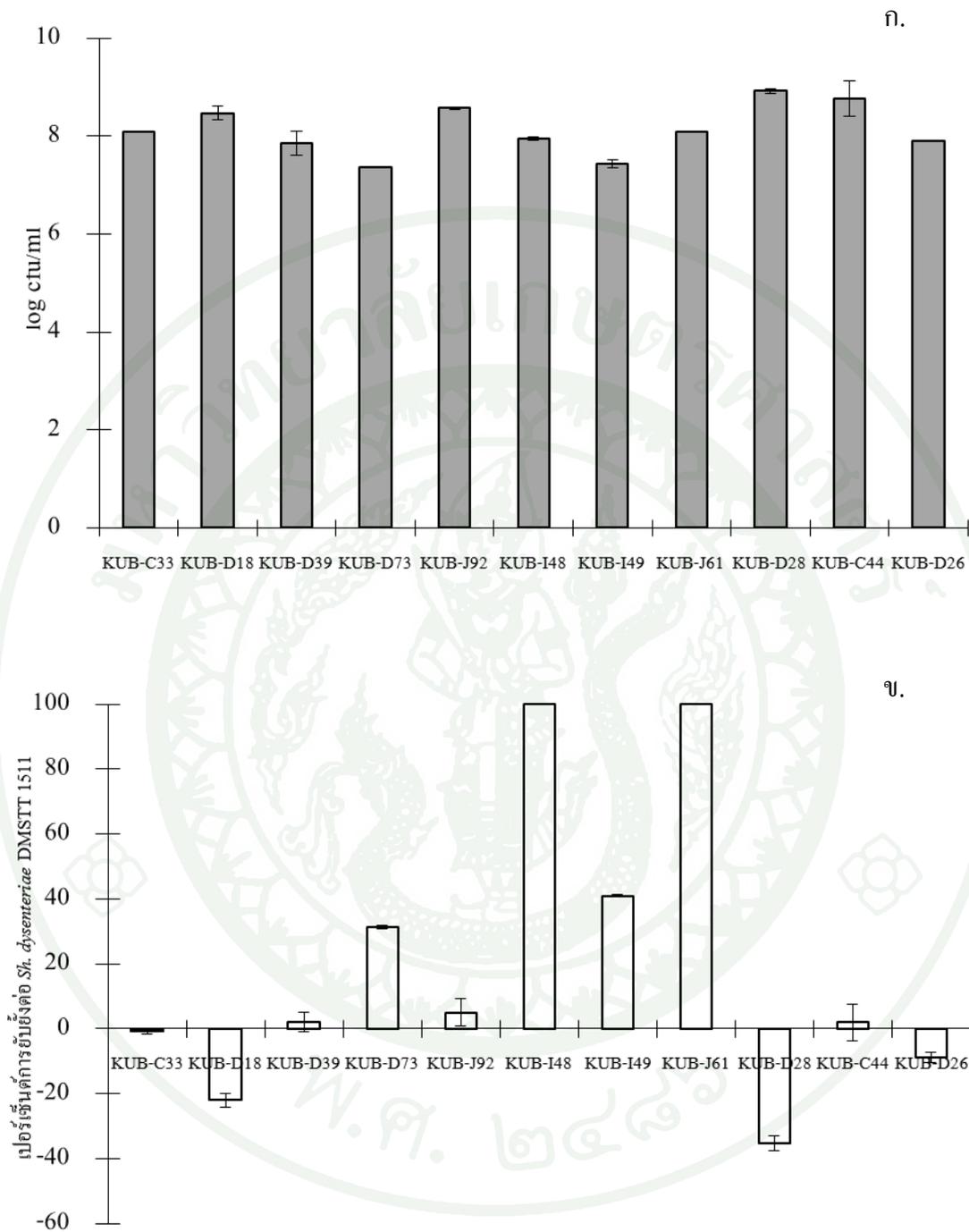
ประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่พีเอชทางเดินอาหารส่วน ileum พบว่า *L. salivarius* KUB-I49 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ขณะที่ *L. salivarius* KUB-I48 และ KUB-J61 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Sh. dysenteriae* และ *S. Enteritidis*



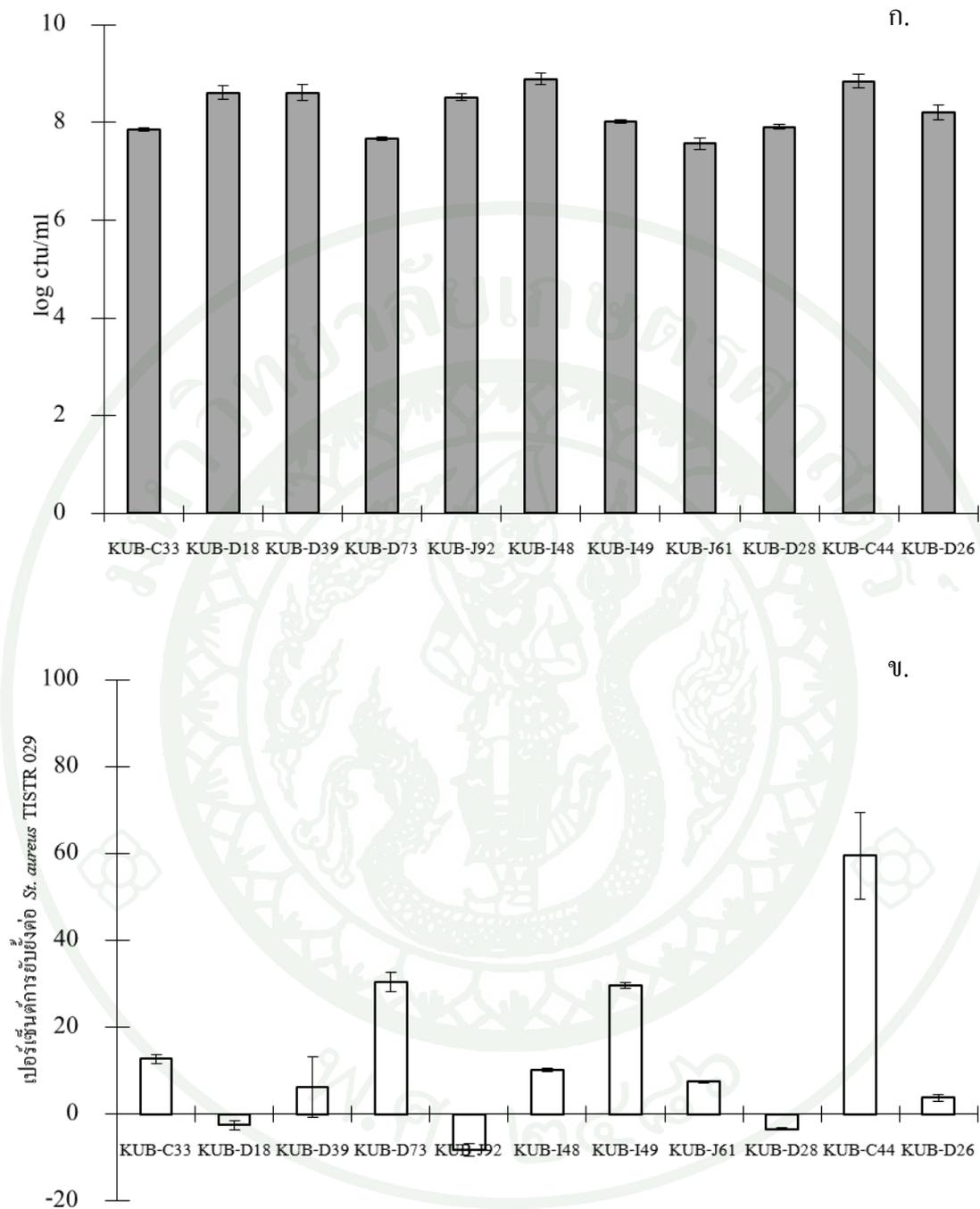
ภาพที่ 21 การเปรียบเทียบระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *E. coli* O157:H7



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *S. Enteritidis* DMST 17368 ในสภาวะ ileum (พีเอช7.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368



ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *Sh. dysenteriae* DMST 1511 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 1511



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *St. aureus* TISTR 029 ในสภาวะ ileum (พีเอช 7.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *St. aureus* TISTR 029

ฉ. ทวารรวม (clocca) (พีเอช 8.0)

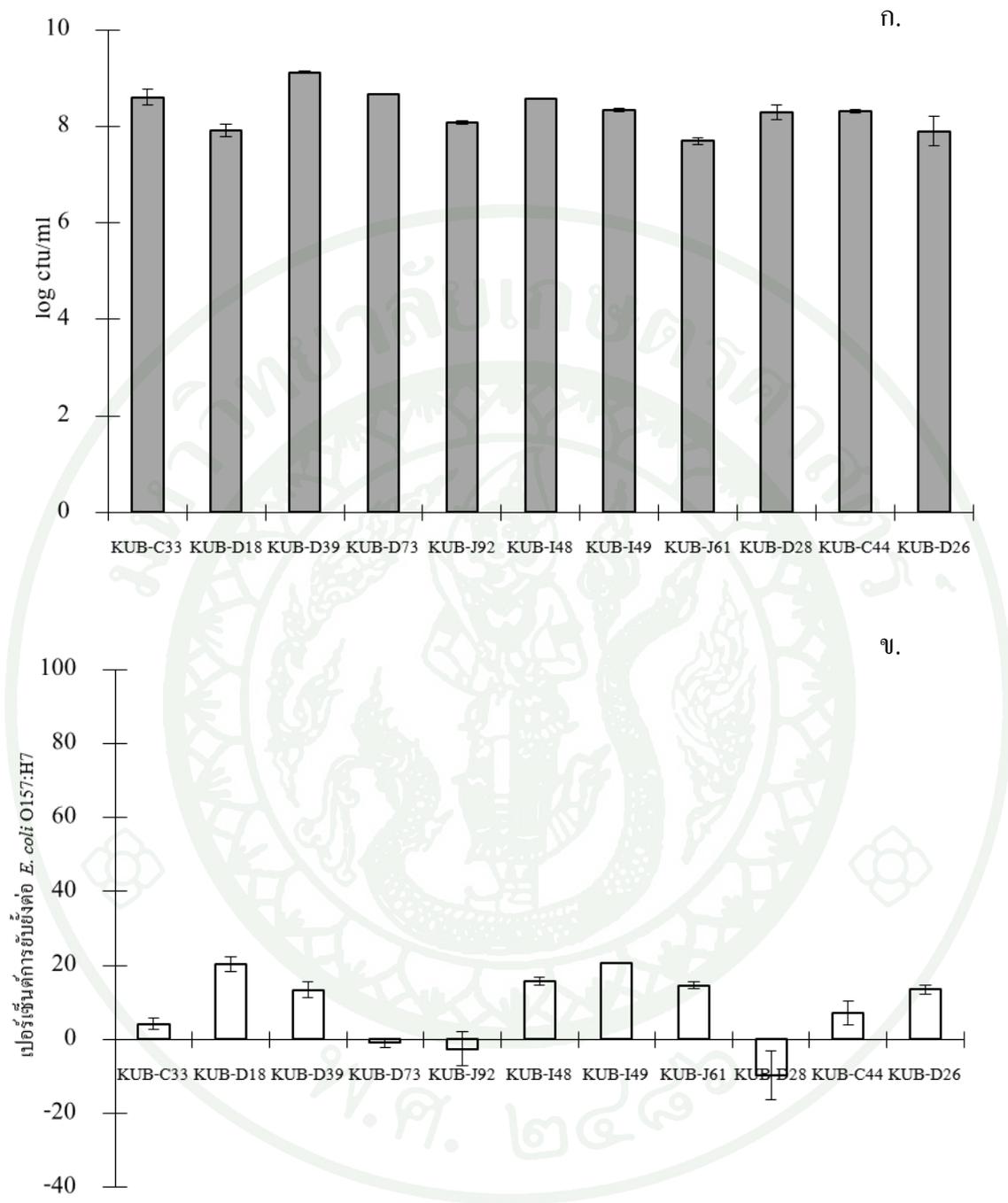
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *E. coli* มีปริมาณรอดชีวิตต่างกันอยู่ในช่วง 7.69-9.11 log(cfu/ml) (ภาพที่ 25ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.98-6.68 *L. fermentum* KUB-D18 ยับยั้ง *E. coli* ได้สูงสุด 20.24% (ภาพที่ 25ข.) ขณะที่ *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49 และ KUB-J61 ยับยั้ง *E. coli* ได้ 18.41, 19.72 และ 18.41%

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *S. Enteritidis* มีปริมาณอยู่ในช่วง 6.70-8.85 log(cfu/ml) (ภาพที่ 26ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.99-5.98 *L. fermentum* KUB-J92 ยับยั้ง *S. Enteritidis* ได้สูงสุด 77.40% (ภาพที่ 26ข.)

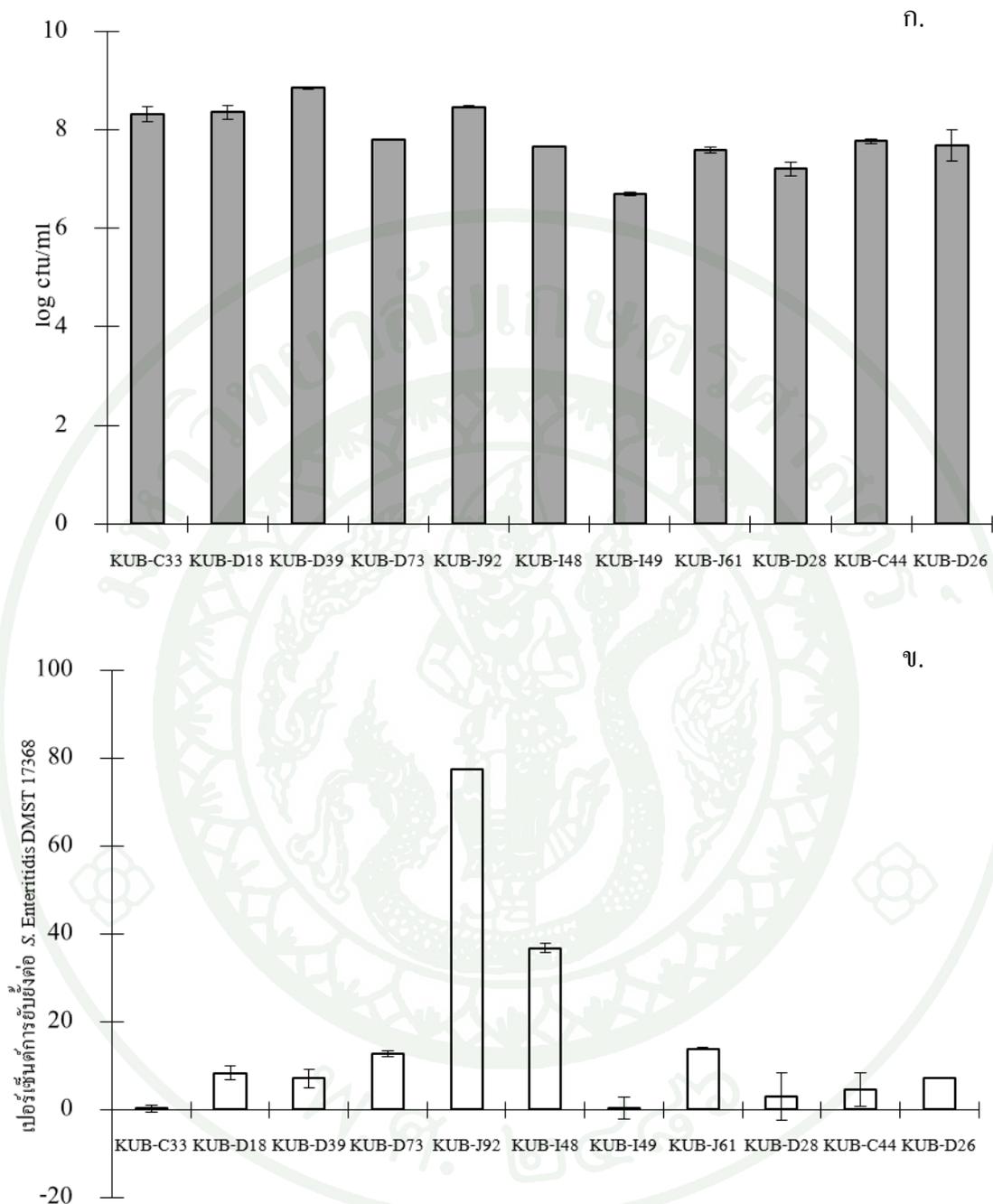
ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *Sh. dysenteriae* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.31-8.31 log(cfu/ml) (ภาพที่ 27ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.80-5.92 *L. salivarius* KUB-I48 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* ได้สูงสุด 100% (ภาพที่ 27ข.)

ปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *St. aureus* มีปริมาณอยู่ในช่วง 7.23-8.62 log(cfu/ml) (ภาพที่ 28ก.) มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.20-5.94 undefined *Lactobacillus sp.* KUB-C44 ยับยั้ง *St. aureus* ได้สูงสุด 27.97% (ภาพที่ 28ข.)

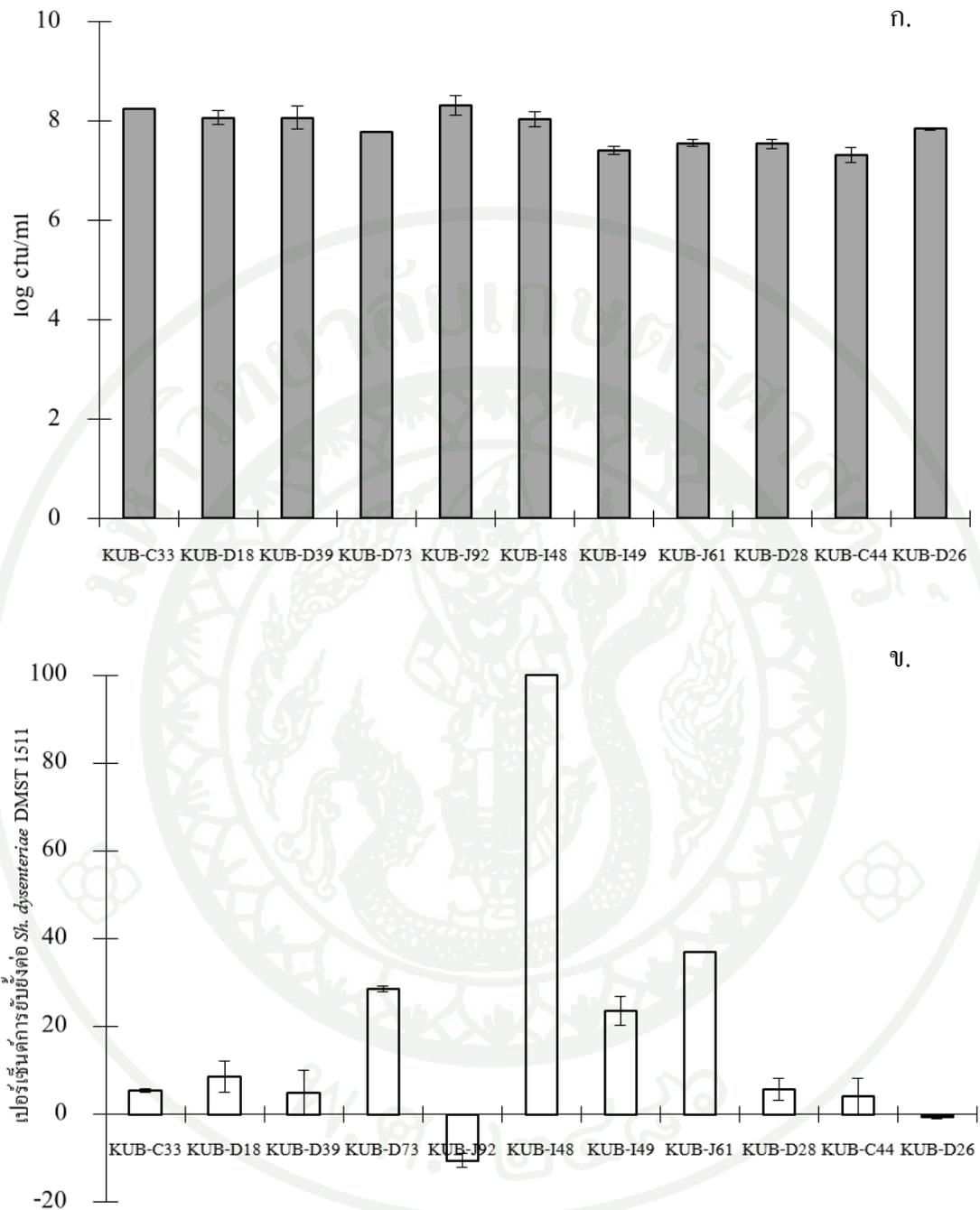
พิจารณาเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายที่พีเอชทางเดินอาหาร clocca พบว่า *L. salivarius* KUB-I48 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Sh. dysenteriae*, *S. Enteritidis* และ *E. coli* ขณะที่ *L. salivarius* KUB-I49 ยับยั้ง *E. coli* *L. salivarius* KUB-J61 และ *L. fermentum* KUB-D73 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* และ *St. aureus*



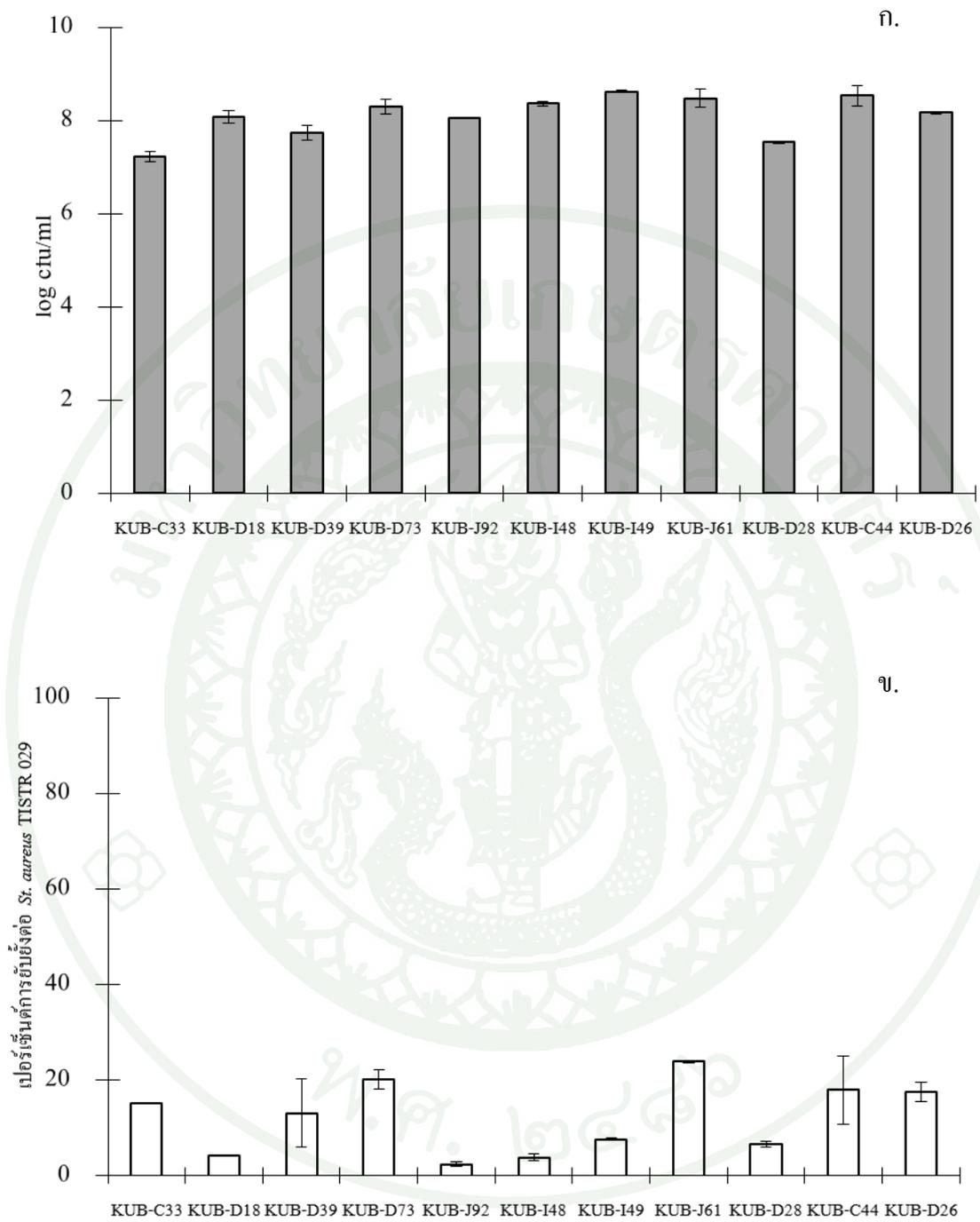
ภาพที่ 25 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *E. coli* O157:H7 ในสภาวะ clocca (พีเอช8.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง
 ข. เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *E. coli* O157:H7



ภาพที่ 26 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *S. Enteritidis* DMST 17368 ในสภาวะ clocca (พีเอช8.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368



ภาพที่ 27 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสและ *Sh. dysenteriae* DMST 1511 ในสภาวะ clocca (พีเอช8.0) ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 1511



ภาพที่ 28 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียคลอสทริเดียมและ *St. aureus* TISTR 029 ในสภาวะ clocca (พีเอช 8.0) ก. ปริมาณแบคทีเรียคลอสทริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ (log cfu/ml) ที่เวลา 18 ชั่วโมง ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแบคทีเรียคลอสทริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ ต่อ *St. aureus* TISTR 029

พิจารณาในแต่ละส่วนทางเดินอาหารพบว่าแลคโตบาซิลลัสทุกสายพันธุ์สามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้งได้ดีในส่วนต้นของทางเดินอาหาร ที่มี พีเอช ก่อนข้างเป็นกรด ได้แก่ crop และ duodenum ในส่วน jejunum ที่มีพีเอช 6.5 แลคโตบาซิลลัสส่วนใหญ่ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อจุลินทรีย์เป้าหมายมากกว่า 50% มีจำนวนน้อยลง กว่าทางเดินอาหารส่วนต้น ทางเดินอาหารส่วนถัดไปคือ ileum และ clocca ในทางเดินอาหารส่วนท้ายนี้แลคโตบาซิลลัสที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งมากกว่า 50% มีจำนวนลดน้อยลงมาก ขณะที่สังเกตว่า *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49 และ KUB-J61 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ดีสภาวะ ileum และ clocca เปรียบเทียบกับแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์อื่น

การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Millette *et al.* (2007) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเวลาที่ใช้การเพิ่มจำนวน (generation time) ของ *St. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. acidophilus* และ *L. casei* ในถังหมักที่ควบคุม พีเอช ที่ 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 →C โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นนมขาดมันเนย พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่มีแลคโตบาซิลลัสอยู่ด้วย *St. aureus* ใช้เวลาในการเพิ่มแบ่งตัวเพิ่มขึ้นจาก 40.5 นาที เป็น 84.8 นาที ซึ่งแตกต่างจาก *E. coli* O157:H7 EDL933 ที่เวลาในการแบ่งตัวลดลงจาก 93.1 นาที เป็น 56.4 นาที

3.2 ผลของเชื้อแลคโตบาซิลลัสผสมต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายผสม

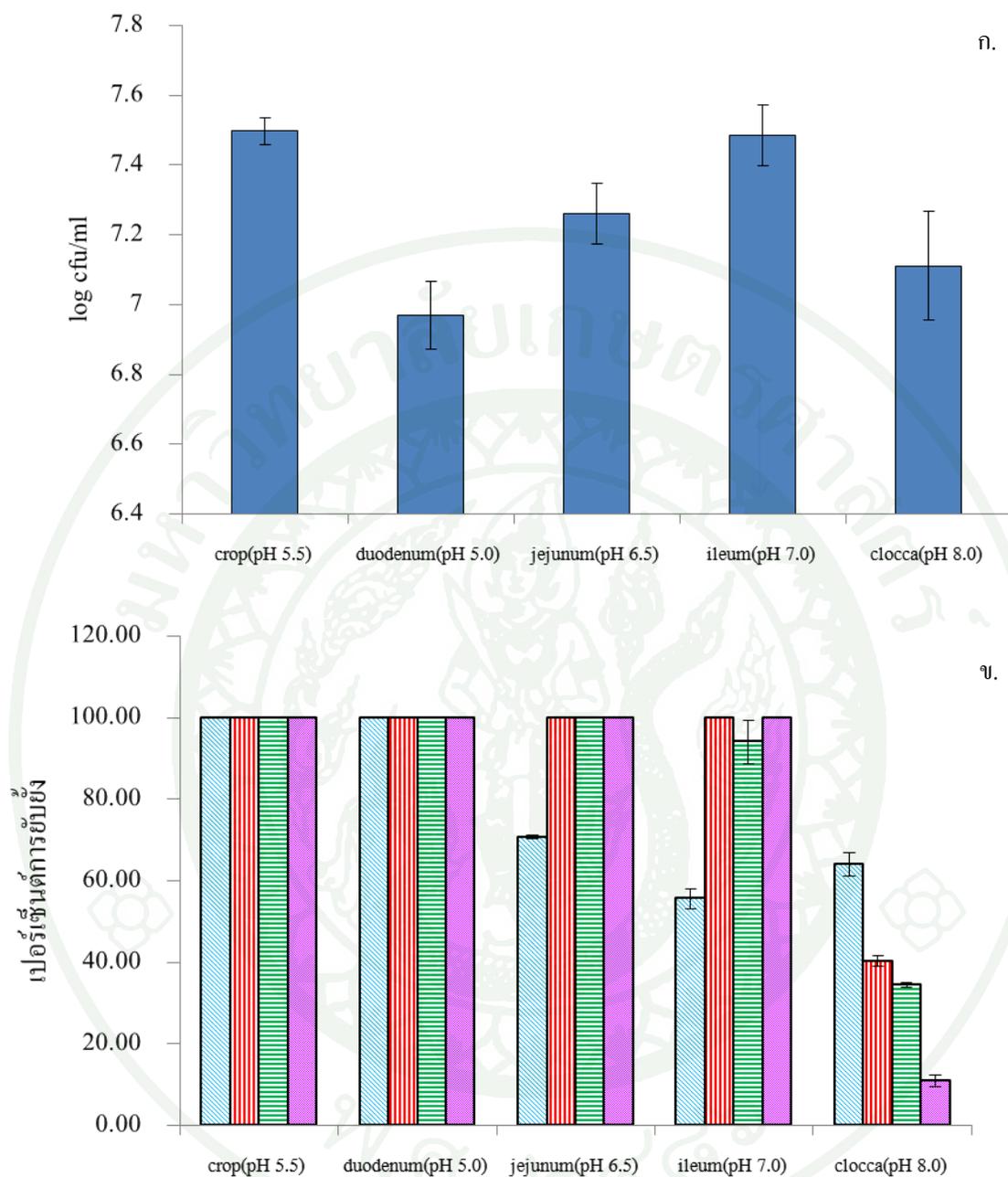
จากการศึกษาผลของแลคโตบาซิลลัสต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะพืเอชทางเดินอาหาร พบว่า *E. coli* ถูกยับยั้งได้สูงสุดโดย *L. reuteri* KUB-D28 76.53% ที่ crop (พืเอช 5.5) *S. Enteritidis* DMST 17368 ถูกยับยั้ง 100% ที่ crop และ duodenum (พืเอช 5.0) โดย *L. fermentum* KUB-D73 *Sh. dysenteriae* DMST 15111 ถูกยับยั้ง 100% ที่ crop, duodenum, jejunum (พืเอช 6.5) และ Ileum (พืเอช 7.0) โดย *L. salivarius* KUB-J61 โดยพบว่าแลคโตบาซิลลัสส่วนใหญ่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้น้อยลงในสภาวะ jejunum ileum และ clocca ในขณะที่ *L. reuteri* KUB-I48 และ KUB-I49 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายส่วนใหญ่ทุกสภาวะพืเอชทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะ ileum และ clocca

การดั่งนั้นจึงคัดเลือกใช้แลคโตบาซิลลัสในรูปแบบเชื้อผสม *L. fermentum* KUB-D73, *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61, *L. reuteri* KUB-D28 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายผสม ประกอบด้วย *E. coli*, *S. Enteritidis*, *Sh. dysenteriae*, *St. aureus* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 cfu/ml ในสภาวะพืเอชทางเดินอาหาร โดยผลการทดลองดังภาพที่ 29

การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสม ต่อจุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสม ในสภาวะพืเอชของ crop และ duodenum ผลการทดลองพบปริมาณแลคโตบาซิลลัสที่รอดชีวิตมีค่า 7.50 และ 6.98 log(cfu/ml) ตามลำดับ มีค่าพืเอช 4.14 และ 3.73 ตามลำดับ โดยยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายทุกชนิดได้ 100%

ถ้าได้เล็กส่วนถัดมา (jejunum) พบว่าแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมมีปริมาณ 7.27 log(cfu/ml) มีค่าพืเอช 4.10 สามารถยับยั้ง *S. Enteritidis*, *Sh. dysenteriae*, *St. aureus* ได้ 100% ขณะที่ยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ 71.12%

ถ้าได้ใหญ่ส่วนปลาย (ileum) แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมมีปริมาณ 7.49 log(cfu/ml) มีค่าพืเอช 3.98 สามารถยับยั้ง *S. Enteritidis*, *St. aureus* ได้สูงถึง 100% ขณะที่ยับยั้ง *E. coli* และ *Sh. dysenteriae* ได้ 55.58% และ 94.04% ตามลำดับ



ภาพที่ 29 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมและจุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสมในสภาวะ ฟือซ ทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ก. ปริมาณแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสม (log cfu/ml) ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมต่อจุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสม *E. coli* O157:H7  *S. Enteritidis* DMST 17368  *Sh. dysenteriae* DMST 15111  *St. aureus* TISTR 029 

ทางเดินอาหารส่วนสุดท้ายทวารรวม (clocca) แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมมีปริมาณ 7.20 log(cfu/ml) มีค่า พีเอช 4.24 สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้สูงสุด 64.04% รองลงมาคือ *S. Enteritidis*, *Sh. dysenteriae* และ *St. aureus* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 40.27, 34.40 และ 10.98

เปรียบเทียบข้อมูลการทดลองเมื่อเชื้อแลคโตบาซิลลัสแบบเชื้อเดี่ยว พบว่า เมื่อใช้เชื้อผสมในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะ พีเอช ทางเดินอาหาร crop สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *St. aureus* ได้เพิ่มขึ้นจาก 76.53 และ 56.79% เป็น 100% สภาวะ duodenum ยับยั้ง *E. coli* และ *St. aureus* ได้เพิ่มขึ้นจาก 68.69% และ 61.80% ตามลำดับ เป็น 100% สภาวะ jejunum ยับยั้ง *E. coli*, *S. Enteritidis* และ *St. aureus* ได้เพิ่มขึ้นจาก 60.50%, 64.10% และ 59.71 ได้เป็น 70.73%, 100% และ 100% ตามลำดับ สภาวะ ileum ยับยั้ง *E. coli*, *S. Enteritidis* และ *St. aureus* ได้เพิ่มขึ้นจาก 38.38%, 38.85% และ 29.21% เป็น 55.58%, 100% และ 100% ตามลำดับ ขณะที่การยับยั้งต่อ *Sh. dysenteriae* ลดลงจาก 100% เหลือ 94.04% สภาวะ clocca การยับยั้งต่อ *E. coli*, และ *S. Enteritidis* ได้เพิ่มขึ้นจาก 19.72% และ 36.12% เป็น 64.04% และ 40.27% ตามลำดับ ขณะที่การยับยั้งต่อ *Sh. dysenteriae* และ *St. aureus* ลดลงจาก และ 100% 23.60% เหลือ 34.40% และ 10.98% จะเห็นว่าการใช้แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวใน *E. coli*, *S. Enteritidis* ในทุกส่วนทางเดินอาหาร ขณะที่ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Sh. dysenteriae* และ *St. aureus* ลดลงในทางเดินอาหารส่วน ileum และ clocca

มีรายงานว่ามีการใช้เชื้อที่แยกได้จากลำไส้ไปใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์ทดลองโดย Weinack *et al.* (1997) ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่โตที่มีสุขภาพดี นำไปให้ลูกไก่ที่ฟักใหม่กิน เพื่อให้เกิดระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร ซึ่งวิธีการนี้มีประสิทธิภาพในไก่ที่อายุน้อยโดย สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Yersinia enterocolitica* (Soerjaid-Liem *et al.*, 1984) *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (Stern, 1994), *Salmonella typhimurium* (Mead, 2000), *Salmonella kedougou* (Ferreira *et al.*, 2003), *Salmonella infantis* (Goren *et al.*, 1984), *Escherichia coli* (Snoeyenbos *et al.*, 1982) และ *Listeria monocytogenes* (Hume *et al.*, 1998) ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทางการค้า ได้แก่ Broilact™ (Orion Cooperation) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยไม่มีการจำแนกว่าประกอบด้วยเชื้อใดบ้าง มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella*, *Campylobacter* ได้ดี (Nurmi *et al.*, 1987; Hakken and Schneitz, 1999) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ PREMPT™ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกัน *S. Enteritidis* (Nava *et al.*, 2005)

จากการทดลองพบว่าการใช้เชื้อผสมในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในสภาวะ พิเศษ จำลองของระบบทางเดินอาหาร สามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้ทั้งหมด (100%) ในทางเดินอาหาร ช่วงต้น คือ crop และ duodenum และเชื้อผสมก็ยังสามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้งได้ในทางเดินอาหารส่วนต่อมา โดยสามารถยับยั้ง *S. Enteritidis* DMST 17368 และ *St. aureus* TISTR 029 ได้ดีที่สุด ในตลอดทั้งทางเดินอาหาร รองลงมาเป็น *Sh. dysenteriae* DMST 15111 และ *E. coli* O157:H7 ได้ตามลำดับ ซึ่งการที่แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมสามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ทั้งหมดตั้งแต่ทางเดินอาหารส่วนต้นทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายที่อาจหลุดรอดมายังทางเดินอาหารส่วนถัดไปมีจำนวนน้อยลง แลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมที่แม้จะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้ลดลงในทางเดินอาหารส่วนท้ายยังคงทำงานได้ดี ดังนั้นอาจมีการประยุกต์นำแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมนี้ไปใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดโรคในไก่ต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย ของสารยับยั้งจากแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์ ที่มีแหล่งที่มาจากลำไส้ไก่ ซึ่งประกอบไปด้วย *L. fermentum* KUB-C33, KUB-D18, KUB-D39, KUB-D73, KUB-J92, *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61, *L. reuteri* KUB-D28, undefined *Lactobacillus* sp. KUB-C44 และ KUB-D26 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในไก่และคน ทั้งแกรมลบและแกรมบวก ได้แก่ *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* DMST 17368, *Sh. dysenteriae* DMST 15111, *St. aureus* TISTR 029, *V. parahaemolyticus* ATCC 317802

ชนิดของสารยับยั้ง ได้แก่กรดอินทรีย์ที่พบในสารละลาย CFS ประกอบด้วย กรดแลคติก เป็นผลิตภัณฑ์หลักปริมาณ 0.101-0.191 M และกรดอะซิติกปริมาณ 0.055-0.098 M โดย *L. salivarius* KUB-I48 มีปริมาณกรดทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 0.28 M ไม่พบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแลคโตบาซิลลัสทั้ง 11 สายพันธุ์

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งด้วยวิธีทางเอ็นไซม์ พบว่า CFS ของแลคโตบาซิลลัส ในสปีชีส์เดียวกันผลิตสารออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์เป้าหมายต่างกัน โดยสามารถจำแนกสารที่ แลคโตบาซิลลัสผลิตขึ้นออกเป็น 7 กลุ่ม คือสารประกอบกลุ่ม C, L, P, P-C, L-P, L-C และ P-C-L ซึ่งสารยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสที่ศึกษานี้จัดเป็นสารกลุ่มคล้ายแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีโปรตีนเป็น องค์ประกอบ ได้แก่ P, P-C, L-P และ P-C-L และสารกลุ่มไม่ใช่แบคเทอริโอซิน ได้แก่ กลุ่ม C, L, L-C

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการยับยั้งในสภาวะ พิเศษ ในทางเดินอาหารไก่ส่วนต่าง ๆ พบว่า ทางเดินอาหารส่วนแรกคือกระเพาะพัก (crop) พิเศษ 5.5 พบว่าแลคโตบาซิลลัสยับยั้งจุลินทรีย์ เป้าหมาย *S. Enteritidis* DMST 17368 ได้ 100% ได้แก่ *L. fermentum* KUB-D73 แลคโตบาซิลลัสที่ สามารถยับยั้ง *Sh. dysenteriae* DMST 15111 ได้ 100% ได้แก่ *L. fermentum* KUB-J92, *L. salivarius* KUB-J61 และ *L. reuteri* KUB-D28 ลำไส้ส่วนต้น (duodenum) พิเศษ 5.0 *L. fermentum* KUB-D73 ยับยั้ง *S. Enteritidis* DMST 17368 ได้ 100% *L. salivarius* KUB-I49, KUB-

J61 และ *L. reuteri* KUB-D28 สามารถยับยั้ง *Sh. dysenteriae* DMST 15111 ได้ 100% ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) พีเอช 6.5 และ ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) พีเอช 7.0 ทั้งสองส่วนนี้พบว่า *L. salivarius* KUB-I48, KUB-J61 *Sh. dysenteriae* DMST 15111 100% ที่ ทวารรวม (clocca) พีเอช 8.0 *L. salivarius* KUB-I48 ยับยั้ง *Sh. dysenteriae* DMST 15111 ได้ 100%

ทำการคัดเลือกแลคโตบาซิลลัสที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายที่ พีเอช ทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ *L. fermentum* KUB-D73, *L. salivarius* KUB-I48, KUB-I49, KUB-J61 และ *L. reuteri* KUB-D28 มาผลิตเป็นเชื้อผสมเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย พบว่าสามารถยับยั้ง จุลินทรีย์เป้าหมายได้ในทุกสภาวะ พีเอช ในทางเดินอาหาร โดยแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสมยับยั้ง จุลินทรีย์เป้าหมายทุกชนิดได้ 100% ในทางเดินอาหารส่วน crop, duodenum ผลการศึกษา สนับสนุนว่าแลคโตบาซิลลัสที่เป็นโปรไบโอติกที่แยกจากลำไส้ไก่มีความสามารถในการยับยั้ง จุลินทรีย์เป้าหมายซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคนำไก่และคน ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการ ตัดสินใจในการนำไปใช้ในรูปสารยับยั้ง หรือตัวเซลล์ ซึ่งนี่เป็นอีกทางเลือกเพื่อลดการใช้สาร ปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการยับยั้งของแลคโตบาซิลลัสผสมที่คัดเลือกได้ในสัตว์ทดลอง เนื่องจากในการ ทดลองพบว่าแลคโตบาซิลลัสผสมที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายทุกตัวได้ดีใน สภาวะพีเอชจำของทางเดินอาหารส่วนต้นและส่วนกลาง (crop, duodenum) ซึ่งคาดว่าอาจสามารถ ลดปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารส่วนถัดไปได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จันทนา กุญชร ณ อยุธยา. 2529. โรคและการรักษาสัตว์ปีก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปรียดา ตันจักร. 2550. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิฑูรย์ โมพี. 2540. เอกสารประกอบการสอน โภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศูนย์วิจัยเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. 2550. เส้นทางอุตสาหกรรมไก่เนื้อไทยและสถานการณ์ไก่เนื้อโลก. วารสารสถาบันอาหาร ปีที่ 9 (ฉบับที่ 51): หน้า 35-41.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2553. มูลค่าสินค้าเกษตรส่งออกที่สำคัญ พ.ศ. 2552 – 2553. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th>, 9 สิงหาคม 2553.
- สาโรช คำเจริญ. 2542. อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สรายุทธ สรรพสุข. ม.ป.ป. โรคลำไส้ใหญ่อักเสบ มีเลือดออก. ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. แหล่งที่มา: <http://webdb.dmsc.moph.go.th>, 19 กุมภาพันธ์ 2553.
- Abdel-Bar, N., N.D. Harris and R.L. Rill. 1987. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Food.Sci.** 52:411-415.
- Acker, D. and M. Cunningham. 1991. **Animal science and industry**. 4th edition. Prentice Hall, Englewood cliffs, New Jersey.

- Adak, G.K., S. M. Meakins, H. Yip, B. A. Lopman and S. J. O'Brien. 2005. Disease risks from foods. England and Wales, 1996-2000. **Emerg. Infect. Disease** 11: 365-372
- Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, K. Mattila-Sandholm, I. M. Latva-Kala and M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:2001-2005.
- Amit-Romach, E., Sklan, D. and Z. Unil. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poult. sci.** 83: 1093-1098.
- Anonymous. 2004. **Informes de Salud Publica 1999-2004**. Departamento de Saldad, Gobierno Vasco. Available Source: <http://www.osasun.ejgv.euskadi.net>, March 3, 2010.
- Audisio M.C., Oliver G. and M. C. Apella. 1999. Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp. **J. Food Prot.** 62: 751-755.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : Classification and Physiology, pp. 1-72. In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **Lactic acid bacteria : Microbiology and Funtional Aspect**. Marcd Dekker, Inc., New York.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology, pp. 1-66. In S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwehand, eds. **Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects**. Marcd Dekker, Inc., New York.
- Balla, E., L. M. T. Dicks, M. Du Toit, M. J. Van Der Merwe and W. H. Holzapfel. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071a and enterocin 1071B, two anitmicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 1298-1304.

- Barnes, E.M., C.G. Mead and A.D. Barnum. 1972. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. **Brit. Poult. sci** 13: 617-622.
- Barnes, E. M., C. S. Impey and D. M. Cooper. 1980. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. **Am. J. Clin. Nutr.** 33 (11): 2426-2433.
- Barrow, P.A. 1992. Further observations on the serological response to experimental Salmonella typhimurium infection in chickens measured by ELISA. **Epidemiol. Infect.** 108:231-241.
- Bennik, H.M., A. Verheul, T. Abee, G. Naaktgrboren-Stoffels, L.G.M. Gorris and E.J. Smid. 1997. Interaction of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:3628-3636.
- Beukes, M., G. Bierbaum, H. G. Sahl and J. W. Hastings. 2000. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 23–28.
- Braun, V., H. PilsI. and P. Grob. 1994. Colocins: structures, mode of action, transfer through membranes and evolution. **Arch. Microbiol.** 161: 199-206
- Breukink, E., I. Wiedemann, C. Kraaij, O.P. Kuipers, H.G. Sahl and B. Kruijff . 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science** 286:2361–2364.
- Brotz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum and H.G. Sahl. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. **Mol. Microbiol.** 30:317–327.
- Boris S and C. Barbes. 2002. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes. Infect.** 2:543–546.

- Carina, A. M., G. Oliver and M. C. Apella. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. **J. Food Prot.** 63: 1333–1337.
- Casas, L.A. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reutei* confers broadspectrum protection against disease in human and animals. **Microb. Ecol. Health Dis.** 12: 247-285.
- Catherine, B.L., S. Stephen and J.M. Thomas. 1992. Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 143–149.
- Cheigh, C.I., H.J. Choi, H. Park, S.B. Kim, M.C. Kook, T.S. Kim, J.K. Hwang and Y.R. Pyun. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. **J. Biotech.** 95: 225-235.
- Choi, H.J., C.I. Cheng, S.B. Kim and Y.R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* sobsp. *Lactis* A164 isolated from Kimchi. **J. Appl. Microbiol.** 88: 563-571.
- Coloe, P. J., T. J. Bagust, and L. Ireland. 1984. Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. **J. Hyg. (Lond)** 92(1): 79-87.
- Conner, D.E. 1993. Naturally occurring compounds, pp. 441-468. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. **Antimicrobials in Food, 2nd edition.** Maecel Dekker Inc., New York.
- Cords, B.R. and G.R. Dychdala. 1993. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxide, pp. 469-537. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. **Antimicrobials in Foods, 2nd edition.** Marcel Dekker Inc., New York.

- Corrier, D. E., D. J. Nisbet, M. C. Scanlan, G. Tellez, B. M. Hargis and J. R. DeLoach. 1994. Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in Leghorn chicks by a defined culture of cecal bacteria and dietary lactose. **J. Food Prot.** 56: 337–381.
- Cotter P.D., C. Hill and R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat. Rev. Microbiol.** 3: 777-788.
- Dabard, J., A. Bridonneau, C. Phillipe, P. Anglade, D. Molle, M. Nardi, M. Ladire, H. Girardin, F. Marcille, A. Gomez and M. Fons. 2001. Ruminococci A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 4111–4118.
- Davidson, P.M. and D.G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-159. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York
- De Vuyst, L.D. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-130. In L. De Vuyst and E.J. VanDamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Dumonceaux, T.J., J.E. Hill, S.A. Briggs, K.K. Amoako, S.M. Hemmingsen and A.G. Van Kessel, 2006. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target. **J. Microbiol. Methods.** 64: 46.
- Earnshaw, R.G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation system, pp. 211-232. In B.J.B. Wood, ed. **The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. Elsevier Applied Sciences, London New York.

- Eklund, T. 1984. The effect of carbondioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterials membranes vesicles. **Int. J. Food Microbiol.** 1: 179-185.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class Iia bacteriocins: biosynthesis, Structure and activity. **FEMS Mibrob. Reviews.** 24: 85-106
- Ferreira, A. J., C. S. Ferreira, T. Knobl, A. M. Moreno, M. R. Bacarro, M. Chen, M. Robach and G. C. Mead. 2003. Comparison of three commercial competitive-exclusion productsfor controlling Salmonella colonization of broilers in Brazil. **J. Food Prot.** 66: 490-492.
- Folli, C., I. Ramazzina, P. Arcidiaco, M. Stoppini and R. Berni. 2003. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. **FEMS Microb.Letters.** 221: 143-149.
- Fortaine, E.A., E. Clajdon and D. Tayler-Robinson. 1996. Lactobacilli from women with/without bacteria vaginosis and observation on the significance of hydrogen peroxide. **Curr. Microbiol.** 60: 253-260.
- Franco, D.A. and C.E. Williams, 1994. *Campylobacter jejuni*, pp.71-96. In Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell and D.O. Cliver. **Foodborne Disease Handbook, volume1.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ganzle, M. G., C. Hertel, J. M. van der Vossen and W. P. Hammes. 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. **Int. J. Food Microbiol.** 48: 21–35.
- Gilliland, S.E. and M.L. Speck. 1997. Antagonistic action of lactobacillus acidophilus toward intestinal and food borne pathogens in associative culture. **J. Food Prot.** 40: 820-823.

- Gomez, S., C. Cosson and A. M. Deschamps. 1997. Evidence for a bacteriocins-like substance produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory to gram food-borne pathogens. **Res. Immunol.** 148: 757–766.
- Gong, J., R.J. Forster, H. Yu, J.R. Chambers, P.M. Sabour, R. Wheatcroft and S. Chen. 2001. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiol. Lett.** 208: 1-7.
- Gong, J., R.J. Forster, H. YU, J.R. Chambers, R. Wheatcroft, P.M. Sabour and S. Chen. 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. **FEMS Microbiol. Ecol.** 41: 171-179.
- Gong, J., W. Si, R.J. Forster, R. Huang, H. Yu, Y. Yin, C. Yang and Y. Han. 2006. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiol. Ecol.** 59: 147-157.
- Goren, E., W. A. De Jong, P. Doornenbal, J. P. Koopman and H. M. Kennis. 1984. Protection of chicks against *Salmonella infantis* infection induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. **Vet. Q.** 6: 22-26.
- Hamdan, I.Y. and E.M. Mikolajcik. 1974. acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Antibiot.** 27:631-636.
- Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K.L. Roy, J.C. Vederas and M.E. Stiles. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Bacteriol.** 173: 7491–7500
- Helm, J.D. 2004. Common disease of chicken, turkey & gamebirds. **Clemson Livestock-Poultry Health**, Columbia, S.C.

- Hechard, Y., B. Derijard, F. Letellier and Y. Cenatiempo. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Gen. Microbiol.** 138:2725–2731.
- Heu, S., J. Oh, Y. Kang, S. Ryu, S. K. Cho, V. Cho and M. Cho. 2001. gly gene cloning and expression and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Gen. Microbiol.** 138: 2725-2731.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross and C. Hill. 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. **Microbiol.** 149: 655–664.
- Hinton Jr, A., D. E. Corrier, R. L. Ziprin, G. E. Spates and J. R. DeLoach. 1991. Comparison of the efficacy of cultures of cecal anaerobes as inocula to reduce *Salmonella typhimurium* colonization in chicks with or without dietary lactose. **Poult. sci.** 70: 67–73.
- Hoover, D.G. and S.K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-39. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic press, Inc., London.
- Hsu S.T., E. Breukink, E. Tischenko, M.A. Lutters, B. de Kruijff, R. Kaptein, A.M. Bonvin and N.A. van Nuland. 2004. The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. **Nature Struct. Mol. Biol.** 11: 963–967.
- Hume, M. E., A. G. Hollister, D. J. Nisbet, D. E. Corrier and J. R. DeLoach. 1996. Effect of a characterized continuous-flow culture of cecal bacteria on *Salmonella typhimurium* crop colonization in broiler chicks. **Avian Dis.** 40: 391–397.
- Hume M. E., J. A. Byrd, L. H. Stanker and R. L. Ziprin. 1998. Reduction of caecal *Listeria monocytogenes* in Leghorn chicks following treatment with a competitive exclusion culture (PREEMPT). **Lett. Appl. Microbiol.** 26: 432-426.

- Hur, J. W., H. H. Hyun, Y. R. Pyun, T. S. Kim, I. H. Yeo and H.D. Paik. 2000. Identification and Partial characterization of Lacticin BH5, a bacteriocin produced by *Lactococcus Lactis* BH5 isolate from Kimchi. **J. Food. Protect.** 63:1707-1712.
- Hutt, P., J. Shchepetova, K. Lovienken, T. Kullisaar and M. Mikelsaae. 2006. Antagonistic activity of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria against entero- and uropathogens. **J. Appl. Microbiol.** 100: 1324-1332.
- Hyronimus, B., C. Le Marrec and M. C. Urdaci. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I. **J. Appl. Microbiol.** 83: 42-50.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525-532.
- _____. 2000. Antimicrobial component from lactic acid bacteria. **Modern Food Microbiology, 6th edition.** Gaithersburg, Md., Aspen.
- Jennes, W., L. M. Dicks and D. J. Verwoerd. 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **J. Appl. Microbiol.** 88: 349-357.
- Joerger, M. C. and T. R. Klaenhammer. 1990. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. **J. Bacteriol.** 172: 6339-6347.
- Johnsen, L., G. Fimland and J. Nissen-Meyer. 2005. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. **J. Biol. Chem.** 280: 9243-9250.

- Kabara, J. J. 1993. Medium chain fatty acid and esters, pp. 30-342. In P.M. Davidson and A.L. Branen, eds. **Antimicrobials in Food, 2nd edition**. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kawai Y., T. Saito, T. Toba, S.K. Samant, T. Itoh. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocins(gassericinA) from *Lactobacillus gasseri* LA39. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 58:1218-1221.
- Kelly, W. J., R. V. Asmundson and C. M. Huang. 1996. Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **J Appl Bacteriol.** 81: 655-662.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetic of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. **FEMS. Microbiol. Rev.** 12: 39-86.
- Klose, V., K. Bayer, R. Bruckbeck, G. Schatzmays. 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. **Vet. Microbiol.** Doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.025.
- Koga, T., T. Mizobe and K. Takumi. 1998. Antibacterial activity of *Lactobacillus* species against *Vibrio* species. **Microbiol. Res.** 153(3):271-275.
- Kong, S. and A.J. Davidson. 1980. The role of the interactions between O_2 , H_2 , OH^- , e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. **Arch. Biochem. Biophys.** 204:13-29.
- Kubena, L. F., R. H. Bailey, J. A. Byrd, C. R. Young, D. E. Corrier, L. H. Stanker and G. E. Rottinghaust. 2001a. Cecal volatile fatty acids and broiler chick susceptibility to *Salmonella typhimurium* colonization as affected by aflatoxins and T-2 toxin. **Poult. sci.** 80: 411-417.

- Kubena, L. F., J. A. Byrd, C. R. Young and D. E. Corrier. 2001b. Effects of tannic acid on cecal volatile fatty acids and susceptibility to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. **Poult. sci.** 80: 1293–1298.
- Kwon, H. J., T. E. Kim, S. H. Cho, J. G. Seol, B. J. Kim, J. W. Hyun, K. Y. Park, S. J. Kim and H.S. Yoo. 2002. Distribution and characterization of class I intergrons in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum biotype Gallinarum. **Vet. Microbiol.** 4:303-309.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch and E. Wollman. 1953. De finition de quelques terms relatifs a la lysogenie. **Annales de l'Institut Pasteur (Paris)**. 84: 222-224.
- Lan, P. T., H. Hayashi, M. Sakamoto and Y. Benno. 2002. Phylogenetic analysis of caecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. **Microbiol. Immun.** 46: 371-382.
- Lee, K. H., K. D. Jun, W. S. Kim and H. D. Paik. 2001. Partial characterization of polyfermentin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 146-151.
- Lindgren, S. E. and W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. **FEMS Microbiol Rev.** 87: 149-163.
- Lortie, L., R.E. Simard and M.C. Lavoie. 1993. Synergistic interaction between lactic and acetic acids partly responsible for the inhibitory effect of four *Lactobacillus acsei* strains. **Microbiol. Aliments Nutr.** 11:277-285.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J.J. Maurer and M.D. Lee. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 6816-6824.

- Maldonado, A., J. L. Ruiz-Barba, B. Floriano and R. Jimenez-Diaz. 2002. The locus responsible for production by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10, is widely distributed among wild-type *Lact. Plantarum* strains isolated from olive fermentation. **Int. J. Food. Microbiol.** 77:117-124.
- Mead, G.C. 2000. Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. **Vet. J.** 159: 111-123.
- Meyer, J.N., H. Holo, L.S. Havarstein, K. Sletten and I.F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. **J. Bacteriol.** 174: 5686-5692.
- Millette, M., M. Lacroix and F. M. Luquet. 2007. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. **Appl. Microb.** 44: 314-319.
- Motlagh, A. M., M. C. Johnson and B. Ray. 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. **J. Food Protect.** 54: 873-878.
- Murry, A.C., Jr. A. Hinton and H. Morrison. 2004. Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. **Int. J. Poultry Sci.** 3(9): 603-607.
- Nava, G.M., L.R. Bielke, T.R. Callaway and M.P. Castaneda. 2005. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infection: the poultry experience. **Anim. Health Res. Rev.** 6(1): 105-118.
- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek.** 70: 113-28.

- Netz, D. J., R. Pohl, A. G. Beck Sickinger, T. Selmer, A. J. Pierik, C. Bastos Mdo and H. G. Sahl. 2002. Biochemical characterization and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **J. Mol. Biol.** . 319: 745-756.
- Niku-Paavola, M.L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm and A. Haikara. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Microb.** 86: 29-35.
- Nilsen, T., I. F. Nes and H. Holo. 2003. Enterolysin A, a cell waldegrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 2975–2984.
- Nisbet, D. J., D. E. Corrier and J. R. DeLoach. 1993a. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. **Avian Dis.** 37: 528–535.
- Nisbet, D. J., D. E. Corrier, C. M. Scalan, A. G. Hollister, R. C. Beier and J. R. DeLoach. 1993b. Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. **Avian Dis.** 37: 1017–1025.
- Olivares. M., M. P. Di'az-Ropero, R. Martin, J. M. Rodrí'guez and J. Xaus. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast Milk. **J. Appl. Microbiol.** 101: 72–79.
- Oscariz, J. C. and A. G. Pisaborro. 2002. Characterization and mechanism of action of cerein7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **J. Appl. Microbiol.**. 89: 1-10.
- Ouwehand, A. C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 139-160. In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspect.** Marcel Dekker, Inc., New York.

- Pascual, M., M. Hugas, J.I. Badiola, J.M. Monfort and M. Garriga. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4981-4986.
- Piard, J.C., P.M. Murina, M.J. Desmazeaud and T.R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin production produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CNRZ481. **Appl. Env. Microb.** 58: 279-284.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters and K.H. Schleifer. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria, pp. 113-90. In L.D. Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Portrait, V., S. Gendron-Gaillard, G. Cotteceau and A. M. Pons. 1999. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. **Can. J. Microbiol.** 45: 988–994.
- Portrait, V., G. Cotteceau and A. M. Pons. 2000. A *Fusobacterium mortiferum* strain produces a bacteriocin-like substance(s) inhibiting *Salmonella enteritidis*. **Lett. Appl. Microbiol.** 31: 115–117.
- Quadri, L. E., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. **J. Biol. Chem.** 269:12204–12211.
- Reddy, G.V., K.M. Shahani, B.A. Friend and R.C. Chandan. 1983. Natural antibiotic activity of *L. acidophilus* and *bulgaricus*: III: production and partial purification of bulgarican from *Lactobacillus bulgaricus*. **Cult. Dairy Prod. J.** 18: 15-19.
- Rees, T. J. 1997. **The development of a novel Antifungal Silage Inoculant**. Dotoral research thesis, Cranfield University Biotechnology Center, UK.

- Roe, J.A., C. O'Byrne, D. McLaggan and I. R. Booth. 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. **Microbiology** 148: 2215-2222.
- Rorvik, L.M., B. Aase, T. Alvestad and D. A. Caugant. 2003. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **J. Appl. Microbiol.** 94: 633-640.
- Rubin, H.E. 1978. Toxicology model for a two-acid system. **Appl. Env. Microb.** 36: 623-624.
- Sarra, P.G., L. Morelli and V. Bottazzi. 1992. The lactic microflora of fowl, pp. 3-9. In B.J.B. Wood (ed). The lactic acid bacteria volume 1: The lactic acid bacteria in health and disease. **Elsevier applied science**. England.
- Sashi, T., H. Kimura, T. Higuchi, A. Adachi, H. Matsusaki, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64: 2420-2428.
- Savory, C.J. 1992. Enzyme supplementation, degradation and metabolism of three U-14C-labelled cell-wall substrates in the fowl. **Brit. J. Nutrition.** 67: 91-102.
- Scanlan, C. M. 1997. Current concepts of competitive exclusion cultures for the control of salmonellae in domestic poultry. **Adv. Exp. Med. Biol.** 412: 421-426.
- Schillinger, U., L. L. McKay and F. K. Lucke. 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **J Appl Bacteriol.** 70: 473-478.
- Schnürer, J. and J. Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **FoodSci. Tech.** 16: 70-78

- Silva, M., N.V. Jacobus, C. Deneke and S.L. Gorbach. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrob. Agents Chemother.** 31: 1231-1233.
- Simmonds, R. S., W. J. Simpson and J. R. Tagg. 1997. Cloning and sequence analysis of *zooA*, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. **Gene** 189:255–261.
- Simon, A. and V. Versteeg. 1989. The use of feed additives in the E.U. Regulations, problems and future 1999, pp. 126-139 In Vanbell, M., ed. **Eastern Nutrition Conference.** Animal Nutrition Association of Canada. Niagara Falls, Ontario.
- Smith, H.W. 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. **J. Pathol. Bacteriol.** 90: 495-513.
- Sobrinho, O. J., J. M. Rodriguez, W. L. Moreira, M. F. Fernandez, B. Sanz and P. E. Hernandez 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 13:1-10.
- Snoeyenbos, G.H., A. S. Soerjadi and O. M. Weinack. 1982. Gastrointestinal colonization by salmonellae and pathogenic *Escherichia coli* in monoxenic and holoxenic chicks and poults. **Avian Dis.** 26: 566-575.
- Spinler, K. J., M. L. C. Taweechotipatr, N. C. Ou, S. Tumwasorn, J. Varsalovic. 2008. Humanderived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe.** 14: 166–171.
- Stern, N. J. 1994. Mucosal competitive exclusion to diminish colonization of chickens by *Campylobacter jejuni*. **Poult. sci.** 73: 402-407.

- Strus, M., K. Pakosz, H. Gosciniak, A. Przondo-Mordarska, E. Rozynek, H. Pituch, F. Meisel-Mikolajczyk, and P.B. Heczko. 2001. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). **Med. Dosw. Mikrobiol.** 53(2):133-42.
- Suzuki, S. 1994. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **Int. J. of Food Microb.** 21: 89-105
- Tahara, T. and K. Kanatani. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J 1229. **J Appl Bacteriol.** 81: 669-677.
- Toure, R., E. Kheadr, C. Lacroix, O. Moroni and I. Fliss. 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Microbiol.** 95: 1058-1069.
- Uyttendaele, M., P. De Troy and J. Debevere. 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. **J. Food Prot.** 62: 735-740.
- van der Wielen, P. W. J. J., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B. A. P. Urlings, and F. van Knapen. 2000. Role of volatile fatty acids representative of ceca of broiler chicken during growth. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:2536-2540.
- van der Wielen, P. W., D. A. Keuzenkamp, L. J. Lipman, F. Van Knapen and S. Biesterveld. 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. **Microbial ecology** 44: 286-293.

- van Heusden, H. E., B. de Kruijff and E. Breukink. 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. **Biochemistry** 41: 12171–12178.
- Wagner, D.D. and P.O. Thomas. 1987. Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks. **Poult. sci** 57: 971-975.
- Walter, J., G.W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D.M. Loach, K. Munro and T. Alatosava. 2000. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 297-303.
- Wager, M.K. and L.J. Moberg. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. **Food Technol.** 1: 143-147.
- Weinack, O. M., G. H. Snoeyenbos and C. F. Smyser. 1997. A supplemental test system to measure competitive exclusion of *Salmonella* by native microflora in the chicken gut. **Avian Dis.** 23: 1019-1030.
- Wiedemann, I., E. Breukink, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff, H.G. Sahl.. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **J. Biol. Chem.** 276:1772–1779.
- Woolford, M. K. 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C₁-C₁₂) as potential silage additives. **J. Sci Food Agr.** 26: 219-228.
- Yang, Z. 2000. **Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties.** Ph.D. Thesis, University of Helsinki.
- Yeo, J. and K.I. Kim. 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or Yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. **Poult Sci.** 76: 381-385.

- Ziprin, R. L., D. E. Corrier, A. Hinton Jr, R. C. Beier, G. E. Spates, J. R. DeLoach and M. H. Elissalde. 1990. Intracloacal *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickens: reduction of colonization with anaerobic organisms and dietary lactose. **Avian Dis.** 34: 749–753.
- Ziprin, R. L., D. E. Corrier and J. R. DeLoach. 1993. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with in vivo-passaged anaerobes. **Avian Dis.** 37: 183–188.
- Ziprin, R. L. 1994. *Salmonella*, pp. 253-318. In Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell and D.O. Cliver. **Foodborne Disease Handbook, volume 1.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- Zhu, X.Y., T. Zhong, Y. Pandya and R.D. Joerger. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chicken. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 124-137.
- Zhu, X. Y. and R. D. Joerger. 2003. Composition of microbiota in content and mucus from caecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Poult. sci.** 82: 1242-1249.





ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. MRS (de Man Rogosa and Sharp)

Glucose	20.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Beef extract	8.0	กรัม
Sodium acetate	3.0	กรัม
Tri-ammoniumhydrogenphosphate	2.0	กรัม
Dipotassiumhydrogenphosphate	2.0	กรัม
20% mangesesulphate	1.0	มิลลิลิตร
5% magnesiumsulphateheptahydrate	1.0	มิลลิลิตร
sorbitanmonostearate	1.0	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 6.2 ± 0.05 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง MRS เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5 % และ CaCO_3 0.5% หรือ CaCO_3 0.1%

2. Brucella broth

Peptone	10.0	กรัม
Lab-Lemco powder	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช เท่ากับ 7.5 ± 0.2 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง Brucella Agar เตรียม โดยเติมผงวุ้น 1.5 %
อาหารแข็ง Brucella Soft Agar เตรียม โดยเติมผงวุ้น 0.8 %

3. NB (Nutrient broth)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช เท่ากับ 6.2 ± 0.2 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง NA เตรียม โดยเติมผงวุ้น 1.5%
อาหาร NA Soft Agar เตรียม โดยเติมผงวุ้น 0.8 %

4. TSB (Trypticase Soy Broth)

Peptone from casein	17.0	กรัม
Peptone from soymeal	3.0	กรัม
D (+) Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช เท่ากับ 7.3 ± 0.2 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง TSB เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5%
เติม NaCl 3% เพื่อใช้ในการเลี้ยง *Vibrio parahaemolyticus*

5. EMB Agar (Eosin Methylene Blue)

Peptic digest of animal tissue	10.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Eosin-Y	0.40	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช เท่ากับ 7.1 ± 0.2 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้น
รอให้ เย็นเพื่อให้ methylene เกิดการออกซิไดซ์

6. XLD Agar (Xylose-Lysine Deoxycholate)

Sodium thiosulphate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ พีเอช เท่ากับ 7.4 ± 0.2 ให้ความร้อน โดยกวนอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลาจนกระทั่งเดือด

7. MSA (Manitol Sale Agar)

Proteose peptone	10.00	กรัม
Beef extract	1.00	กรัม
Sodium chloride	75.00	กรัม
D-manitol	10.00	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15.00	กรัม

ปรับ พีเอช เท่ากับ 7.4 ± 0.2 ให้ความร้อน โดยกวนอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลาจนกระทั่งเดือด



การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายเอนไซม์ที่ใช้สำหรับทดสอบโครงสร้างของสาร์ยับยั้งจุลินทรีย์

ชั่งเอนไซม์ 0.1 กรัม ใส่ในหลอด microtube ที่มาเชื้อแล้ว เติม 50 mM Phosphate buffer พีเอช 6.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบมี 4 ชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ Proteinase K, Pepsin A เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ α -Amylase type X-A และเอนไซม์ย่อยไขมัน ได้แก่ Lipase

2. สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดด้วยวิธี HPLC

2.1 สารละลายกรดผสม ความเข้มข้น 1% (สารละลาย A)

ดูดสารละลายกรดแลคติก 1.18 มิลลิลิตร(85% W/W) กรดอะซิติก(100% W/W) 1 มิลลิลิตร กรดโพรพิโอนิก(100% W/W) 1 มิลลิลิตร และกรดบิวทีริก (99% W/W) 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากอ็อกโซน

2.2 สารละลายกรดทาร์ทาริก ความเข้มข้น 0.2 % (สารละลาย B)

ชั่งกรดทาร์ทาริก 0.2 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากอ็อกโซน ในขวดปรับปริมาตร

2.3 สารละลายกรดผสมที่ความเข้มข้น 0.1 - 0.5% (v/v)

เตรียมสารละลายกรดผสมความเข้มข้น 0.1 - 0.5 % (v/v) ทำการผสมสารละลาย A และ น้ำปราศจากอ็อกโซนในอัตราส่วนตามตาราง

สารละลายกรดผสม (% v/v)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	
	สารละลาย A	น้ำปราศจากอ็อกซิเจน
0.1	1	9
0.2	2	8
0.3	3	7
0.4	4	6
0.5	5	5

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง

นำสารละลายกรดผสมที่ความเข้มข้น 0.1%-0.5% ผสมกับกรดทาร์ทริกความเข้มข้น 0.2% (สารละลาย B) ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน หรือนำตัวอย่างมาผสมกับกรดทาร์ทริกความเข้มข้น 0.2% ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นสารละลายตัวอย่าง กรองผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 μm จากนั้นจึงนำไปใช้ในการวิเคราะห์

2.5 การทำกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแต่ละชนิด โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับ peak area (แกน Y) คำนวณค่าความชันของกราฟเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดในตัวอย่าง (ข้อ 2.6) สูตรที่ใช้ในการคำนวณหาค่า peak area ของสารละลายมาตรฐาน/ตัวอย่าง ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{peak area ของสลด.กรดมาตรฐาน/ตัวอย่าง} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสลด.กรดมาตรฐาน/ตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของกรดทาร์ทริก}}$$

2.6 สูตรในการคำนวณปริมาณกรดในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณกรดในตัวอย่าง (M)} = \frac{\text{peak area ของสลด.ตัวอย่าง} \times \text{ความหนาแน่นของกรด} \times 10}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{มวลโมเลกุลของกรด}}$$



ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ๑๑ ค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ลดลงของ CFS ของแลคโตบาซิลลัส 11 สายพันธุ์หลังย่อยด้วยเอนไซม์ catalase ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

แลคโตบาซิลลัส		กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย									
		<i>E. coli</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>Sh. dysenteriae</i>		<i>St. aureus</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>	
		ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	200	200	200	200	200	200	100	100	200	200
	KUB-D18	800	800	400	400	100	100	100	100	200	200
	KUB-D39	100	100	200	200	200	200	100	100	200	200
	KUB-D73	400	400	200	200	200	200	100	100	100	100
	KUB-J92	400	400	200	200	400	400	100	100	100	100
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	200	200	400	400	200	200	400	400	200	200
	KUB-I49	200	200	200	200	100	100	100	100	200	200
	KUB-J61	400	400	200	200	200	400	100	100	100	100
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	200	200	400	400	400	400	100	100	200	200
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	400	400	400	400	200	200	100	100	200	200
	KUB-D26	400	400	400	400	100	100	100	100	100	100

ตารางผนวกที่ ค2 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *E. coli* O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ crop (พีเอช5.5)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>E. coli</i> O157:H7			
			CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	4.95X10 ⁷	1.81X10 ⁷	5.06	1.46X10 ⁸	4.99	11.09	5.03
	KUB-D18	7.25X10 ⁷	2.81X10 ⁷	4.80	1.33X10 ⁷	4.86	-4.56	1.00
	KUB-D39	3.00X10 ⁸	1.73X10 ⁵	5.07	3.06X10 ⁸	4.99	38.28	1.83
	KUB-D73	1.40X10 ⁷	1.00X10 ⁵	4.17	1.61X10 ⁸	4.38	39.08	0.44
	KUB-J92	4.75X10 ⁷	1.10X10 ⁶	4.80	1.70X10 ⁶	4.94	3.03	1.89
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	3.00X10 ⁶	4.25X10 ⁴	4.14	4.10X10 ⁷	4.24	39.20	1.72
	KUB-I49	2.00X10 ⁶	1.95X10 ²	4.16	3.35X10 ⁴	4.80	49.39	1.07
	KUB-J61	5.50X10 ⁶	1.55X10 ⁵	4.14	4.10X10 ⁷	4.24	31.82	1.32
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	7.00X10 ⁷	2.00X10 ¹	4.80	3.50X10 ⁵	4.80	76.53	8.65
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	1.95X10 ⁸	2.77X10 ⁸	5.02	5.55X10 ⁸	4.89	3.46	2.73
	KUB-D26	4.80X10 ⁹	1.35X10 ⁶	4.89	5.46X10 ⁸	4.99	29.83	4.44

ตารางผนวกที่ ค3 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *S. Enteritidis* DMST 17368, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ crop (พีเอช5.5)

สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.	
	แลคโตบาซิลลัส	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368						
	CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช			
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	2.20X10 ⁸	3.58X10 ⁶	4.72	1.67X10 ⁸	4.73	20.29	3.99
	KUB-D18	1.14X10 ⁸	5.80X10 ⁴	4.70	6.35X10 ⁷	4.63	38.95	1.59
	KUB-D39	9.80X10 ⁷	4.05X10 ⁶	4.70	2.17X10 ⁸	4.73	20.73	4.25
	KUB-D73	8.00X10 ⁵	1.00X10 ⁰	4.13	8.00X10 ⁵	4.86	100.00	0.00
	KUB-J92	6.05X10 ⁷	9.41X10 ⁶	4.71	3.73X10 ⁷	4.56	7.90	5.98
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	9.00X10 ⁶	1.29X10 ⁵	4.19	2.45X10 ⁸	4.73	39.10	2.23
	KUB-I49	2.50X10 ⁶	2.50X10 ¹	4.15	2.04X10 ⁷	4.61	80.88	1.37
	KUB-J61	3.00X10 ⁶	1.10X10 ²	4.20	2.45X10 ⁸	4.65	75.67	0.92
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	4.30X10 ⁷	1.09X10 ⁵	4.67	1.40X10 ⁶	4.57	18.04	0.915
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	7.60X10 ⁷	8.60X10 ⁵	4.20	6.10X10 ⁸	4.55	32.45	3.25
	KUB-D26	5.50X10 ⁸	5.50X10 ⁵	4.75	2.35X10 ⁷	4.67	22.12	2.58

ตารางผนวกที่ ๓4 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *Sh. dysenteriae* DMST 1511, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *Sh. dysenteriae* DMST 1511 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน สภาวะ crop (พีเอช5.5)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.		
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	3.88X10 ⁷	2.50X10 ⁰	4.65	4.50X10 ⁷	5.15	92.13	5.56
	KUB-D18	2.75X10 ⁷	1.38X10 ³	4.63	9.50X10 ⁵	4.67	48.05	1.01
	KUB-D39	3.40X10 ⁷	1.50X10 ⁰	4.58	3.18X10 ⁷	5.15	95.96	2.86
	KUB-D73	1.19X10 ⁷	6.50X10 ¹	4.19	1.28X10 ⁷	5.15	74.29	0.27
	KUB-J92	3.50X10 ⁶	1.00X10 ⁰	4.55	5.10X10 ²	5.62	100.00	0.00
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	1.05X10 ⁶	5.70X10 ²	4.19	3.55X10 ⁷	5.15	62.74	1.17
	KUB-I49	1.40X10 ⁷	3.70X10 ³	4.14	2.04X10 ⁷	4.92	27.11	0.65
	KUB-J61	1.08X10 ⁷	1.00X10 ⁰	4.18	3.55X10 ⁷	5.15	100.00	0.00
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.20X10 ⁷	1.00X10 ⁰	4.61	2.80X10 ⁶	4.96	100.00	0.00
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	3.18X10 ⁷	8.90X10 ¹	4.59	4.60X10 ⁷	4.80	75.99	2.65
	KUB-D26	1.00X10 ⁶	2.09X10 ⁷	4.83	3.12X10 ⁷	5.57	2.69	0.94

ตารางผนวกที่ ค5 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *St. aureus* TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ , *St. aureus* TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ crop (พีเอช5.5)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>St. aureus</i> TISTR 029	<i>St. aureus</i> TISTR 029	พีเอช	พีเอช		
		CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	3.29X10 ⁷	2.22X10 ³	4.66	9.43X10 ⁷	4.94	59.02	4.47
	KUB-D18	3.55X10 ⁷	1.10X10 ⁵	4.60	1.02X10 ⁷	4.91	28.04	1.17
	KUB-D39	9.50X10 ⁷	4.13X10 ⁴	4.60	9.68X10 ⁶	4.94	34.05	2.68
	KUB-D73	6.00X10 ⁶	2.10X10 ⁴	4.09	1.17X10 ⁷	4.77	38.90	1.23
	KUB-J92	8.50X10 ⁶	1.60X10 ⁴	4.59	1.00X10 ⁵	5.67	15.93	0.77
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	1.00X10 ⁶	6.10X10 ⁵	4.39	8.50X10 ⁶	5.34	16.50	0.00
	KUB-I49	6.00X10 ⁶	9.40X10 ²	4.10	2.04X10 ⁷	4.75	56.79	0.78
	KUB-J61	4.50X10 ⁶	1.85X10 ⁴	4.39	8.50X10 ⁶	5.34	38.66	1.75
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	5.42X10 ⁷	2.40X10 ⁶	4.59	1.42X10 ⁷	5.43	10.79	0.31
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	1.93X10 ⁸	6.28X10 ⁵	4.50	8.68X10 ⁵	4.50	2.28	3.08
	KUB-D26	5.55X10 ⁷	1.45X10 ⁵	4.65	2.50X10 ⁵	5.56	4.20	2.69

ตารางผนวกที่ ๑๖ ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *E. coli* O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ duodenum (พีเอช5.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>E. coli</i> O157:H7			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	6.15X10 ⁸	4.93X10 ⁶	4.98	7.25X10 ⁷	4.91	58.21	2.81
	KUB-D18	6.50X10 ⁶	1.20X10 ⁴	4.52	9.50X10 ⁵	4.76	45.93	4.48
	KUB-D39	2.15X10 ⁸	1.62X10 ⁵	5.04	8.55X10 ⁷	4.91	64.06	2.38
	KUB-D73	4.50X10 ⁶	1.00X10 ⁰	4.00	3.01X10 ⁸	4.69	18.43	0.00
	KUB-J92	4.00X10 ⁷	1.10X10 ⁶	4.56	1.70X10 ⁶	4.80	16.71	5.96
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	1.00X10 ⁶	6.50X10 ⁹	3.99	3.55X10 ⁷	4.30	47.98	2.05
	KUB-I49	3.50X10 ⁶	2.90X10 ²	4.04	1.95X10 ⁵	4.62	52.55	1.46
	KUB-J61	1.50X10 ⁸	3.55X10 ²	4.00	3.55X10 ⁷	4.3	68.69	3.08
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	8.70X10 ⁷	6.25X10 ⁵	4.52	6.55X10 ⁶	4.81	17.45	3.66
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	9.20X10 ⁷	2.70X10 ⁶	4.57	2.80X10 ⁸	4.72	25.48	4.18
	KUB-D26	4.60X10 ⁹	5.00X10 ⁵	4.90	7.30X10 ⁷	4.91	36.46	8.66

ตารางผนวกที่ ๗ ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *S. Enteritidis* DMST 17368, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน
 สถานะ duodenum (พีเอช5.0)

สายพันธุ์	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368		<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	8.45X10 ⁷	1.25X10 ⁵	4.48	1.79X10 ⁸	4.75	35.36	3.74
	KUB-D18	3.90X10 ⁷	1.55X10 ⁷	4.48	3.30X10 ⁷	4.58	4.36	3.03
	KUB-D39	6.33X10 ⁷	5.84X10 ³	4.48	6.55X10 ⁸	4.75	57.28	1.65
	KUB-D73	1.00X10 ⁶	1.00X10 ⁰	3.98	2.05X10 ⁸	4.57	100.00	0.00
	KUB-J92	2.45X10 ⁷	5.75X10 ⁵	4.52	3.00X10 ⁵	4.44	-5.16	2.04
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	5.50X10 ⁶	5.40X10 ²	4.20	1.29X10 ⁸	4.73	66.35	0.07
	KUB-I49	2.00X10 ⁶	5.50X10 ¹	4.01	7.00X10 ⁵	4.16	72.86	3.39
	KUB-J61	2.50X10 ⁶	1.84X10 ³	4.06	1.29X10 ⁸	4.75	59.74	0.02
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	2.35X10 ⁷	2.94X10 ⁵	5.30	7.10X10 ⁷	4.83	30.79	0.65
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	5.10X10 ⁶	8.25X10 ⁴	4.04	1.95X10 ⁶	4.50	23.18	1.69
	KUB-D26	4.25X10 ⁷	6.00X10 ⁵	4.71	6.20X10 ⁷	4.70	27.06	1.61

ตารางผนวกที่ ๘ ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *Sh. dysenteriae* DMST 1511, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *Sh. dysenteriae* DMST 1511 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน
 สถานะ duodenum (พีเอช5.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.		
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	9.90X10 ⁶	7.55X10 ²	4.45	4.10X10 ⁶	5.15	56.48	1.64
	KUB-D18	1.30X10 ⁸	3.50X10 ⁵	4.41	1.14X10 ⁷	4.83	21.42	0.98
	KUB-D39	6.95X10 ⁷	2.50X10 ⁰	4.42	6.15X10 ⁶	5.15	94.14	6.16
	KUB-D73	2.65X10 ⁷	7.00X10 ¹	4.3	1.00X10 ⁷	5.10	73.64	1.66
	KUB-J92	1.05X10 ⁴	8.10X10 ²	3.96	4.80X10 ⁶	5.37	56.47	1.46
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	9.00X10 ⁵	1.00X10 ³	4.06	7.50X10 ⁴	5.15	38.46	6.01
	KUB-I49	1.85X10 ⁷	1.00X10 ⁰	4.01	1.50X10 ⁵	4.77	100.00	0.00
	KUB-J61	1.05X10 ⁴	1.00X10 ⁰	3.95	4.80X10 ⁶	5.37	100.00	0.00
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	2.24X10 ⁸	1.00X10 ⁰	4.38	1.00X10 ⁵	4.77	100.00	0.00
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	2.38X10 ⁷	1.54X10 ²	4.35	2.23X10 ²	4.69	8.74	6.18
	KUB-D26	6.00X10 ⁶	1.71X10 ³	4.56	4.50X10 ⁵	4.72	43.73	1.30

ตารางผนวกที่ ๑ ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *St. aureus* TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *St. aureus* TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ duodenum (พีเอช5.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>St. aureus</i> TISTR 029		<i>St. aureus</i> TISTR 029			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	6.53X10 ⁷	7.90X10 ²	4.65	8.58X10 ⁶	4.95	58.21	2.64
	KUB-D18	3.40X10 ⁷	1.27X10 ³	4.42	5.50X10 ⁵	4.43	45.93	1.21
	KUB-D39	8.28X10 ⁷	2.65X10 ²	4.58	5.53X10 ⁶	4.95	64.06	6.55
	KUB-D73	5.50X10 ⁶	1.82X10 ⁵	3.98	2.80X10 ⁶	4.00	18.43	1.54
	KUB-J92	5.50X10 ⁶	1.25X10 ⁴	4.41	8.30X10 ⁴	4.54	16.71	1.00
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	4.30X10 ⁶	1.40X10 ²	4.21	6.80X10 ⁵	5.63	63.20	1.82
	KUB-I49	9.00X10 ⁶	8.90X10 ²	3.97	4.50X10 ⁷	4.75	61.19	0.37
	KUB-J61	1.12X10 ⁶	4.25X10 ⁴	4.26	6.90X10 ⁵	5.63	20.73	0.00
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.95X10 ⁷	1.30X10 ³	5.20	1.50X10 ⁵	4.98	37.46	2.91
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	4.06X10 ⁷	1.80X10 ⁷	4.00	4.67X10 ⁶	4.00	5.10	10.11
	KUB-D26	3.40X10 ⁷	2.90X10 ⁴	4.56	4.90X10 ⁶	4.90	34.10	1.20

ตารางผนวกที่ 10 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *E. coli* O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ jejunum (พีเอช6.5)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>E. coli</i> O157:H7	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	2.10X10 ⁹	1.00X10 ⁸	5.66	4.10X10 ⁸	5.41	7.70	5.09
	KUB-D18	4.05X10 ⁸	2.66X10 ⁷	5.70	3.80X10 ⁶	5.40	-15.11	4.17
	KUB-D39	3.72X10 ⁸	1.14X10 ⁷	5.54	5.30X10 ⁸	5.41	15.19	0.46
	KUB-D73	4.15X10 ⁷	8.50X10 ⁵	4.72	9.75X10 ⁸	5.44	32.99	0.15
	KUB-J92	4.00X10 ⁷	2.45X10 ⁵	4.47	1.69X10 ⁸	5.34	34.40	1.00
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	2.30X10 ⁷	5.00X10 ⁵	4.44	1.06X10 ⁸	4.70	28.99	1.06
	KUB-I49	7.15X10 ⁷	1.50X10 ³	4.55	8.89X10 ⁶	5.41	60.50	2.39
	KUB-J61	1.20X10 ⁷	8.80X10 ⁶	4.42	1.11X10 ⁸	4.70	12.78	1.32
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.41X10 ⁸	3.85X10 ⁶	5.78	9.50X10 ⁵	5.45	-5.89	1.36
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	1.88X10 ⁸	1.85X10 ⁸	5.65	9.60X10 ⁸	5.41	10.51	2.81
	KUB-D26	3.25X10 ⁹	1.05X10 ⁷	5.47	4.10X10 ⁸	5.41	20.67	3.45

ตารางผนวกที่ ค11 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *S. Enteritidis* DMST 17368, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน สภาวะ jejunum (พีเอช6.5)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368		<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	1.60X10 ⁸	5.22X10 ⁷	5.24	2.65X10 ⁸	4.93	8.38	0.64
	KUB-D18	4.30X10 ⁸	1.00X10 ⁷	5.14	3.40X10 ⁷	4.80	7.06	0.00
	KUB-D39	3.20X10 ⁸	6.74X10 ⁵	5.14	4.13X10 ⁷	4.93	23.47	1.28
	KUB-D73	4.65X10 ⁷	5.50X10 ⁵	4.42	3.85X10 ⁸	4.97	33.14	0.59
	KUB-J92	4.50X10 ⁸	9.00X10 ²	5.28	1.25X10 ⁶	4.86	51.55	1.78
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	2.90X10 ⁷	1.02X10 ³	4.42	2.40X10 ⁸	4.93	64.10	2.16
	KUB-I49	1.55X10 ⁷	9.50X10 ³	4.41	7.08X10 ⁶	4.89	52.64	0.79
	KUB-J61	3.25X10 ⁷	4.00X10 ⁵	4.52	2.65X10 ⁸	4.93	36.74	3.55
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.45X10 ⁸	1.34X10 ⁷	5.22	6.30X10 ⁷	4.90	8.54	0.13
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	5.15X10 ⁷	1.44X10 ⁶	4.69	1.65X10 ⁸	4.92	24.95	0.10
	KUB-D26	1.24X10 ⁸	1.50X10 ⁵	4.42	4.00X10 ⁵	4.65	8.71	1.22

ตารางผนวกที่ 12 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *Sh. dysenteriae* DMST 1511, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Sh. dysenteriae* DMST 1511 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน สภาวะ jejunum (พีเอช6.5)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511		<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	6.35X10 ⁷	1.35X10 ⁷	5.24	9.15X10 ⁷	5.25	10.44	2.48
	KUB-D18	1.30X10 ⁸	1.14X10 ⁷	5.31	4.00X10 ⁵	4.98	-25.97	0.43
	KUB-D39	2.03X10 ⁸	4.94X10 ⁷	5.27	8.93X10 ⁷	5.20	3.23	2.71
	KUB-D73	2.30X10 ⁶	4.65X10 ⁴	4.35	2.75X10 ⁷	5.36	37.26	0.48
	KUB-J92	5.00X10 ⁷	1.95X10 ⁶	5.2	2.05X10 ⁶	4.93	0.34	0.96
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	1.50X10 ⁷	1.00X10 ⁰	4.45	9.40X10 ⁷	5.20	100.00	0.00
	KUB-I49	2.35X10 ⁷	4.20X10 ²	4.48	2.89X10 ⁶	5.30	60.64	1.90
	KUB-J61	1.27X10 ⁸	1.00X10 ⁰	4.50	9.15X10 ⁷	5.20	100.00	0.00
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	2.20X10 ⁸	1.26X10 ⁷	5.29	1.75X10 ⁶	5.05	-24.71	10.78
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	5.68X10 ⁷	6.35X10 ⁵	5.22	3.00X10 ⁶	4.93	9.46	1.71
	KUB-D26	2.40X10 ⁷	2.10X10 ⁸	5.33	1.25X10 ⁶	5.15	-35.80	0.90

ตารางผนวกที่ ค13 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *St. aureus* TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ , *St. aureus* TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ jejunum (พีเอช6.5)

สายพันธุ์	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม					เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>St. aureus</i> TISTR 029		<i>St. aureus</i> TISTR 029			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	8.15X10 ⁷	1.55X10 ⁶	5.22	4.50X10 ⁷	5.01	19.11	0.91
	KUB-D18	1.85X10 ⁸	1.42X10 ⁷	5.23	4.73X10 ⁷	4.90	6.81	1.69
	KUB-D39	1.38X10 ⁸	8.45X10 ⁵	5.19	3.85X10 ⁷	5.01	21.87	0.07
	KUB-D73	3.25X10 ⁷	2.75X10 ⁶	4.35	2.00X10 ⁷	4.73	11.80	1.02
	KUB-J92	1.15X10 ⁸	1.05X10 ⁶	4.88	6.50X10 ⁷	5.15	22.93	0.09
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	2.30X10 ⁷	2.72X10 ⁵	4.87	2.56X10 ⁷	5.67	26.64	0.47
	KUB-I49	4.20X10 ⁷	1.03X10 ³	4.4	2.95X10 ⁷	4.69	59.71	0.08
	KUB-J61	2.50X10 ⁷	1.55X10 ⁶	4.87	2.54X10 ⁷	5.67	13.88	5.06
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.80X10 ⁸	4.09X10 ⁵	4.41	6.69X10 ⁷	5.24	28.15	0.20
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	1.30X10 ⁹	4.01X10 ⁷	5.00	6.38X10 ⁸	5.00	21.22	5.14
	KUB-D26	2.10X10 ⁸	2.05X10 ⁶	5.26	2.75X10 ⁷	4.98	15.11	0.07

ตารางผนวกที่ ค14 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *E. coli* O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ ileum (พีเอช7.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>E. coli</i> O157:H7			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	2.85X10 ⁹	3.05X10 ⁸	5.94	6.95X10 ⁸	5.84	3.64	2.80
	KUB-D18	4.10X10 ⁸	1.12X10 ⁸	5.77	1.08X10 ⁸	5.85	17.81	1.62
	KUB-D39	1.47X10 ⁹	2.40X10 ⁸	5.93	8.58X10 ⁸	5.84	6.14	1.15
	KUB-D73	1.69X10 ⁸	4.75X10 ⁶	5.24	5.25X10 ⁸	5.49	3.28	0.78
	KUB-J92	4.90X10 ⁸	2.00X10 ⁸	5.87	4.50X10 ⁸	5.77	-1.89	8.27
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	7.50X10 ⁷	7.00X10 ⁷	4.66	1.17X10 ⁸	5.08	2.77	0.32
	KUB-I49	1.25X10 ⁷	2.34X10 ⁵	5.16	5.00X10 ⁸	5.83	38.38	0.14
	KUB-J61	1.10X10 ⁷	2.20X10 ⁷	4.67	1.15X10 ⁸	5.08	8.31	0.89
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	7.40X10 ⁸	2.17X10 ⁸	6.00	2.40X10 ⁸	5.97	-0.43	1.43
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	8.78X10 ⁷	1.30X10 ⁹	5.92	9.60X10 ⁸	5.82	-1.88	0.60
	KUB-D26	1.91X10 ⁸	2.20X10 ⁸	6.15	6.95X10 ⁸	5.84	5.46	0.27

ตารางผนวกที่ ค15 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *S. Enteritidis* DMST 17368, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน
 สภาวะ ileum (พีเอช7.0)

สายพันธุ์	หลอดทดลอง	ชุดทดลอง		ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.	
		แลคโตบาซิลลัส	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368				
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml			พีเอช
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	2.20X10 ⁸	1.70X10 ⁸	5.63	2.30X10 ⁸	5.32	1.57	2.21
	KUB-D18	3.35X10 ⁸	1.01X10 ⁸	5.36	1.05X10 ⁶	5.01	-32.94	0.94
	KUB-D39	3.75X10 ⁸	5.53X10 ⁷	5.40	1.71X10 ⁸	5.32	5.95	1.86
	KUB-D73	3.05X10 ⁷	1.95X10 ⁶	4.64	5.75X10 ⁸	5.22	28.19	0.13
	KUB-J92	3.85X10 ⁸	3.75X10 ⁷	5.07	4.40X10 ⁸	5.55	12.37	1.83
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	2.50X10 ⁷	1.00X10 ⁵	4.55	1.50X10 ⁸	5.32	38.85	1.61
	KUB-I49	5.50X10 ⁶	1.35X10 ⁶	4.70	7.65X10 ⁷	5.10	22.16	0.11
	KUB-J61	3.10X10 ⁷	3.50X10 ⁵	4.74	2.30X10 ⁸	5.32	31.48	2.84
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.90X10 ⁸	5.30X10 ⁷	5.69	1.54X10 ⁸	5.7	6.67	1.47
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	5.55X10 ⁷	2.85X10 ⁷	5.03	3.20X10 ⁸	5.15	9.21	3.00
	KUB-D26	5.50X10 ⁷	2.10X10 ⁸	5.56	3.45X10 ⁸	5.30	3.51	1.40

ตารางผนวกที่ 16 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *Sh. dysenteriae* DMST 1511, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *Sh. dysenteriae* DMST 1511 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน สภาวะ ileum (พีเอช7.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511		<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	1.20X10 ⁸	5.05X10 ⁷	5.72	4.50X10 ⁷	5.24	-0.65	0.94
	KUB-D18	2.95X10 ⁸	1.12X10 ⁷	5.47	6.00X10 ⁵	5.09	-22.00	2.10
	KUB-D39	7.13X10 ⁷	3.85X10 ⁷	5.48	5.70X10 ⁷	5.24	2.20	3.01
	KUB-D73	2.35X10 ⁷	3.50X10 ⁵	4.73	1.18X10 ⁸	5.29	31.32	0.63
	KUB-J92	3.70X10 ⁸	5.05X10 ⁶	5.40	1.14X10 ⁷	5.04	5.01	4.14
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	9.40X10 ⁷	1.00X10 ⁰	4.56	4.80X10 ⁷	5.24	100.00	0.00
	KUB-I49	2.75X10 ⁷	2.70X10 ³	4.84	6.50X10 ⁵	5.96	40.69	0.27
	KUB-J61	1.21X10 ⁸	1.00X10 ⁰	4.71	4.50X10 ⁷	5.24	100.00	0.00
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	8.30X10 ⁸	2.90X10 ⁸	5.45	1.80X10 ⁶	4.99	-37.36	2.44
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	5.85X10 ⁸	4.93X10 ⁶	5.30	6.65X10 ⁶	4.97	-1.00	5.68
	KUB-D26	7.80X10 ⁷	7.25X10 ⁷	5.63	1.65X10 ⁷	5.20	-9.87	1.58

ตารางผนวกที่ ๑17 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *St. aureus* TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *St. aureus* TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ ileum (พีเอช7.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>St. aureus</i> TISTR 029	<i>St. aureus</i> TISTR 029	<i>St. aureus</i> TISTR 029	พีเอช		
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช				
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	7.15X10 ⁷	1.10X10 ⁷	5.54	1.18X10 ⁸	5.16	12.77	1.06
	KUB-D18	4.08X10 ⁸	1.73X10 ⁸	5.71	1.08X10 ⁸	5.04	-2.53	1.09
	KUB-D39	4.08X10 ⁸	3.90X10 ⁷	5.55	1.23X10 ⁸	5.16	6.17	6.99
	KUB-D73	4.65X10 ⁷	2.50X10 ⁵	4.59	5.65X10 ⁷	4.94	30.37	2.14
	KUB-J92	3.25X10 ⁸	8.85X10 ⁶	5.47	2.60X10 ⁶	4.90	-8.29	1.43
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	9.20X10 ⁷	2.00X10 ⁷	4.86	1.25X10 ⁸	5.77	9.83	0.43
	KUB-I49	1.05X10 ⁸	7.50X10 ⁵	4.61	2.21X10 ⁸	4.96	29.21	0.55
	KUB-J61	3.70X10 ⁷	3.50X10 ⁷	4.86	1.42X10 ⁸	5.77	7.65	0.27
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	8.00X10 ⁷	8.65X10 ⁷	5.62	4.75X10 ⁷	5.03	-3.53	0.18
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	6.93X10 ⁸	4.40X10 ²	4.50	3.30X10 ⁶	4.00	55.35	10.00
	KUB-D26	1.60X10 ⁸	5.30X10 ⁷	5.63	1.06X10 ⁸	5.27	3.29	0.77

ตารางผนวกที่ ค18 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *E. coli* O157:H7, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *E. coli* O157:H7 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ clocca (พีเอช8.0)

สายพันธุ์	สายพันธุ์	ชุดทดลอง		ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.	
		แลคโตบาซิลลัส	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7				
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml			พีเอช
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	4.00X10 ⁸	1.00X10 ⁸	6.07	3.20X10 ⁸	6.10	4.12	1.51
	KUB-D18	8.25X10 ⁷	4.95X10 ⁶	6.04	1.59X10 ⁸	5.98	20.24	2.07
	KUB-D39	1.30X10 ⁹	1.95X10 ⁷	6.09	4.40X10 ⁸	6.10	13.36	2.12
	KUB-D73	4.60X10 ⁸	4.90X10 ⁸	5.85	9.90X10 ⁸	5.86	-0.97	1.15
	KUB-J92	1.18X10 ⁸	1.25X10 ⁸	6.33	8.30X10 ⁷	6.24	-2.57	4.62
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	2.10X10 ⁸	1.00X10 ⁷	4.98	3.80X10 ⁸	5.29	18.41	1.02
	KUB-I49	2.14X10 ⁸	4.00X10 ⁵	5.81	9.00X10 ⁶	5.97	19.72	0.40
	KUB-J61	4.95X10 ⁷	1.00X10 ⁷	5.33	3.25X10 ⁸	5.29	18.41	1.02
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.95X10 ⁸	1.28X10 ⁹	6.31	1.84X10 ⁸	6.13	-7.64	6.48
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	2.05X10 ⁸	3.00X10 ⁸	6.68	1.59X10 ⁹	6.10	10.56	3.25
	KUB-D26	7.80X10 ⁷	1.00X10 ⁷	6.21	3.20X10 ⁸	6.10	18.52	1.32

ตารางผนวกที่ ค19 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *S. Enteritidis* DMST 17368, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *S. Enteritidis* DMST 17368 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ clocca (พีเอช8.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368		<i>S. Enteritidis</i> DMST 17368			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	2.05X10 ⁸	1.30X10 ⁸	5.88	1.35X10 ⁸	5.61	0.20	0.89
	KUB-D18	2.25X10 ⁸	1.00X10 ⁸	5.69	5.30X10 ⁸	5.65	8.30	1.56
	KUB-D39	7.05X10 ⁸	5.98X10 ⁷	5.89	2.33X10 ⁸	5.61	7.05	2.05
	KUB-D73	6.40X10 ⁷	4.00X10 ⁷	5.29	5.05X10 ⁸	5.25	12.65	0.65
	KUB-J92	2.90X10 ⁸	1.00X10 ²	5.98	7.10X10 ⁸	5.57	77.40	0.07
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	4.70X10 ⁷	1.60X10 ⁵	4.99	1.40X10 ⁸	5.61	36.12	1.01
	KUB-I49	5.00X10 ⁶	1.28X10 ⁹	5.73	1.36X10 ⁹	5.82	2.22	2.57
	KUB-J61	3.85X10 ⁷	1.01X10 ⁷	5.30	1.35X10 ⁸	5.61	14.07	0.28
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	1.60X10 ⁷	1.90X10 ⁸	5.50	3.40X10 ⁸	5.57	-0.61	5.36
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	5.88X10 ⁷	2.75X10 ⁸	5.10	6.88X10 ⁸	5.42	1.70	3.73
	KUB-D26	4.75X10 ⁷	9.00X10 ⁷	5.56	3.80X10 ⁸	5.59	7.37	0.10

ตารางผนวกที่ ค20 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *Sh. dysenteriae* DMST 1511, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *Sh. dysenteriae* DMST 1511 เมื่อเลี้ยงร่วมกันใน
สภาวะ clocca (พีเอช8.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511	<i>Sh. dysenteriae</i> DMST 1511	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.		
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	1.74X10 ⁸	3.48X10 ⁷	5.66	9.40X10 ⁷	5.55	5.42	0.43
	KUB-D18	1.14X10 ⁸	1.32X10 ⁷	5.69	6.10X10 ⁷	5.57	8.54	3.57
	KUB-D39	1.14X10 ⁸	5.46X10 ⁷	5.53	1.40X10 ⁸	5.55	5.00	5.12
	KUB-D73	6.00X10 ⁷	1.34X10 ⁵	5.17	1.51X10 ⁷	5.66	28.58	0.63
	KUB-J92	2.02X10 ⁸	8.90X10 ⁶	5.56	1.95X10 ⁶	5.50	-10.48	1.50
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	8.00X10 ⁷	1.00X10 ⁰	4.80	9.40X10 ⁷	5.55	100.00	0.00
	KUB-I49	2.50X10 ⁷	3.00X10 ⁵	5.92	1.45X10 ⁷	6.04	20.66	3.21
	KUB-J61	3.50X10 ⁷	1.06X10 ⁵	5.24	9.40X10 ⁷	5.55	37.08	0.15
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	3.40X10 ⁷	4.20X10 ⁶	5.08	1.05X10 ⁷	5.51	7.20	2.43
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	2.03X10 ⁷	3.13X10 ⁷	5.50	6.51X10 ⁷	5.22	4.28	4.08
	KUB-D26	6.75X10 ⁷	3.00X10 ⁷	5.57	2.65X10 ⁷	5.46	-1.03	0.36

ตารางผนวกที่ ค21 ค่าพีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัส, *St. aureus* TISTR 029, เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ, *St. aureus* TISTR 029 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ clocca(พีเอช8.0)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส	<i>St. aureus</i> TISTR 029		<i>St. aureus</i> TISTR 029			
		CFU/ml	CFU/ml	พีเอช	CFU/ml	พีเอช		
<i>L. fermentum</i>	KUB-C33	1.70X10 ⁷	1.00x10 ⁷	5.52	1.76X10 ⁸	5.6	15.11	0.04
	KUB-D18	1.20X10 ⁸	1.00X10 ⁸	5.51	2.21X10 ⁸	5.55	4.13	0.13
	KUB-D39	5.40X10 ⁷	8.75X10 ⁶	5.94	9.66X10 ⁷	5.60	13.06	7.18
	KUB-D73	2.00X10 ⁸	6.50X10 ⁶	5.25	3.30X10 ⁸	5.31	20.02	2.04
	KUB-J92	1.10X10 ⁸	9.68X10 ⁷	5.61	1.51X10 ⁸	5.36	2.36	0.42
<i>L. salivarius</i>	KUB-I48	2.10X10 ⁸	7.20X10 ⁷	5.39	1.32X10 ⁸	6.11	3.24	0.77
	KUB-I49	4.20X10 ⁸	2.00X10 ⁸	5.20	9.60X10 ⁸	5.74	7.77	0.29
	KUB-J61	3.00X10 ⁸	1.55X10 ⁶	5.36	1.34X10 ⁸	6.11	23.60	0.31
<i>L. reuteri</i>	KUB-D28	3.40X10 ⁷	5.42X10 ⁷	5.77	1.89X10 ⁸	5.57	6.21	0.49
<i>Lactobacillus</i> sp.	KUB-C44	3.38X10 ⁸	5.55X10 ⁶	5.50	1.64X10 ⁸	5.50	27.97	7.16
	KUB-D26	1.47X10 ⁸	3.00X10 ⁷	5.62	1.18X10 ⁹	5.67	19.28	2.02

ตารางผนวกที่ ค22 ค่า พีเอช, ปริมาณแลคโตบาซิลลัสเชื้อผสม, จุลินทรีย์เป้าหมายเชื้อผสม, เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง , เมื่อเลี้ยงร่วมกันในสภาวะ พีเอช ทางเดินอาหาร

สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
	แลคโตบาซิลลัส	จุลินทรีย์เป้าหมาย	พีเอช	จุลินทรีย์เป้าหมาย	พีเอช		
	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml	cfu/ml		
crop	<i>E. coli</i>	0.00X10 ⁰		1.45X10 ⁷	4.65	100	0
	<i>S. Enteritidis</i>	3.15X10 ⁷	0.00X10 ⁰	8.70X10 ⁷		100	0
	<i>Sh. dysenteriae</i>		0.00X10 ⁰	2.70X10 ⁴	4.14	100	0
	<i>St. aureus</i>		0.00X10 ⁰	1.18X10 ⁸		100	0
duodenum	<i>E. coli</i>		0.00X10 ⁰		1.00X10 ⁵	3.71	100
	<i>S. Enteritidis</i>	9.50X10 ⁶	0.00X10 ⁰	1.00X10 ⁵	3.73	100	0
	<i>Sh. dysenteriae</i>		0.00X10 ⁰	3.35X10 ⁴		100	0
	<i>St. aureus</i>		0.00X10 ⁰	1.00X10 ⁵		100	0

ตารางผนวกที่ ค22 (ต่อ)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส cfu/ml	จุลินทรีย์เป้าหมาย cfu/ml	ฟิเox	จุลินทรีย์เป้าหมาย cfu/ml	ฟิเox		
jejunum	<i>E. coli</i>		2.10X10 ²		1.10X10 ⁸		70.73	0.33
	<i>S. Enteritidis</i>	1.85X10 ⁷	0.00X10 ⁰	4.1	1.05X10 ⁸	4.69	100	0
	<i>Sh. dysenteriae</i>		0.00X10 ⁰		2.20X10 ⁵		100	0
	<i>St. aureus</i>		0.00X10 ⁰		1.95X10 ⁷		100	0
ileum	<i>E. coli</i>	3.10X10 ⁷	9.70X10 ²	3.98	1.17X10 ⁵	4.5	55.58	2.55
	<i>S. Enteritidis</i>		0.00X10 ⁰		3.28X10 ⁶		100	0
	<i>Sh. dysenteriae</i>		5.00X10 ⁰		2.55X10 ⁵		94.04	5.27
	<i>St. aureus</i>		1.73X10 ⁵		0.00X10 ⁰		100	0

ตารางผนวกที่ ค22 (ต่อ)

	สายพันธุ์	ชุดทดลอง			ชุดควบคุม		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	S.D.
		แลคโตบาซิลลัส cfu/ml	จุลินทรีย์เป้าหมาย cfu/ml	พีเอช	จุลินทรีย์เป้าหมาย cfu/ml	พีเอช		
clocca	<i>E. coli</i>	1.60X10 ⁷	2.66X10 ³	4.24	4.90X10 ⁷	4.92	64.04	2.76
	<i>S. Enteritidis</i>		3.00X10 ⁴		2.25X10 ⁷		40.27	1.22
	<i>Sh. dysenteriae</i>		2.00X10 ⁴		4.00X10 ⁶		34.4	0.66
	<i>St. aureus</i>		8.30X10 ⁴		3.37X10 ⁵		10.98	1.4

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาวชลดา น้อยจันทิระ
เกิดวันที่	3 ตุลาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ส่วนตัว