



วิทยานิพนธ์

การผลิตโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกกับยีสต์
และการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

**Probiotics Production by Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria
and Yeast and Their Survivals Under Simulated Conditions of
Broiler Gastrointestinal Tract**

นางสาวรัชฎาภรณ์ ทองเหม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกกับยีสต์และ
การรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

Probiotics Production by Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria and Yeast and
Their Survivals Under Simulated Conditions of Broiler Gastrointestinal Tract

นามผู้วิจัย นางสาวรัชฎาภรณ์ ทองหม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปทุมพร จิมเอนก, Dr.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณา มาลาพันธ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกกับยีสต์และ
การรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

Probiotics Production by Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria and Yeast and
Their Survivals Under Simulated Conditions of Broiler Gastrointestinal Tract

โดย

นางสาวรัชฎาภรณ์ ทองเหม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2551

รัชฎาภรณ์ ทองเหม 2551: การผลิตโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรีย
กรดแลคติกกับยีสต์และการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปทุมพร จิมเอนก, Dr.Eng.
219 หน้า

ในการศึกษานี้เป็นการผลิตโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)
คือ *Enterococcus faecium* PR-2 และ/หรือ *Lactobacillus plantarum* IG-3 และ ยีสต์ที่ใช้
กรดแลคติกในการเจริญ เพื่อใช้ควบคุมพีเอชในน้ำหมักให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย
กรดแลคติก ยีสต์ที่คัดเลือกได้ คือ *Candida krusei* MB-1, *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2
ซึ่งแยกได้จากผักกาดดองและคิเฟอร์ จากการทดลองพบว่า MRS-sucrose medium เป็นอาหารที่
เหมาะสำหรับการหมักแบบเชื้อผสมและการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม *L. plantarum* IG-3 กับ *C. krusei*
MB-1 ในอัตราส่วนกล้าเชื้อ 3:2 (*L. plantarum* IG-3 : *C. krusei* MB-1) ผลิตโปรไบโอติกได้สูงสุด
ซึ่งคิดในรูปของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ($4.85 \log \text{CFU} / \text{ml}$ ภายในเวลา 18 ชั่วโมง) เมื่อ
เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อเดี่ยว เชื้อผสมในกลุ่มการทดลองอื่นและอัตราส่วน (LAB : yeast)
อัตราส่วนอื่นๆ (3:1 และ 3:2) จากนั้นนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทุกกลุ่มการทดลองไปทดสอบ
คุณสมบัติการรอดชีวิตและความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ในสภาวะ
จำลองทางเดินอาหารของไก่ ตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึง
สภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้มีอัตราการรอดชีวิต อยู่ในระดับ
ปานกลาง ถึงดีมาก และโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในอัตราส่วนกล้าเชื้อ 3:2 ทุกกลุ่มการทดลอง
สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ใช้ในการทดสอบได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ
Salmonella Typhimurium DMST 16809, *Sal.* Typhi, *Sal.* Enteritidis SOO3 และ *E. coli* ATCC
8739 ในขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3:1 มี
เพียงบางกลุ่มการทดลองเท่านั้นที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางสายพันธุ์ได้ เป็นที่น่า
สังเกตว่าไม่พบยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในเชื้อผสมหลังจากผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ แสดง
ให้เห็นว่ายีสต์ที่ใช้กรดแลคติกเหล่านี้ไม่มีผลต่อสภาวะกรดในทางเดินอาหารไก่อมากนัก

Ratchadaporn Thongheam 2008: Probiotics Production by Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria and Yeast and Their Survivals Under Simulated Conditions of Broiler Gastrointestinal Tract. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Patoomporn Chim-anage, Dr.Eng. 219 pages.

In this study probiotic production by mixed culture of Lactic acid bacteria (LAB), *Enterococcus faecium* PR-2 and/or *Lactobacillus plantarum* IG-3 and lactate assimilating yeast was carried out. The yeast was used as a means to maintain pH in culture broth suitable for the LAB growth. The selected yeast strains *i.e.* *Candida krusei* MB-1, *C. sphaerica* KN-1 and *C. kefir* KN-2 were isolated from fermented vegetable and kefir. Results showed that MRS-sucrose medium was suitable for mixed culture of this experiment. The highest probiotic production in terms of cell increment (4.85 log CFU / ml within 18 h) were obtained in mixed cultures of *L. plantarum* IG-3 and *C. krusei* MB-1 using inoculum ratio of 3:2 (*L. plantarum* IG-3 : *C. krusei* MB-1) compared to pure culture, other combinations (LAB and yeast strains) and / or ratios (3:1, 3:2) investigated. Viability and antagonistic effect of probiotic (LAB) produced by mixed culture and pure culture were determined after incubated in acid for 3 h followed by 36 h in bile under simulated conditions of broiler gastrointestinal (GI) tract. Probiotics of mixed culture showed their abilities to survive fairly to very well in GI tract . Moreover, the probiotic cells of all treatments of mixed culture using inoculum ratio of 3:2 were found to have antagonistic effect against all 4 target strains of food borne pathogen *i.e.* *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Sal.* Typhi, *Sal.* Enteritidis SOO3 and *E. coli* ATCC 8739. On the other hand, some treatments of probiotics produced by using inoculum ratio of 3:1 could inhibit the growth of only some pathogenic strains mentioned above. However, all yeast strains were not detected after passing through the simulated GI tract indicated that these lactate assimilating yeasts did not much affect the acidity of broiler's intestine.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ปทุมพร ฌิมเอนก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยและการศึกษาในระดับปริญญาโทโดยตลอดและกรุณาตรวจ แก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงลงได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.วรรณ มาลาพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. วรรณิ์ คุ้ยเต็มวงศ์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. เบญจกรณ์ ประภักดิ์ ผู้ทรงวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจ แก้ไข วิทยานิพนธ์ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้กับข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจวบจนปัจจุบัน

ขอขอบคุณ คุณอัญชลี ทองจับและคุณณัฐสุดา ปรีชาธรรมวงศ์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณน้องสาว ที่คอยให้กำลังใจและส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา ขอบคุณสำหรับมิตรภาพ กำลังใจและความช่วยเหลือทั้งหมดจากเพื่อน พี่ และน้อง ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยเป็นอย่างดี ทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รัชฎาภรณ์ ทองหม

พฤษภาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	54
อุปกรณ์	54
วิธีการ	58
ผลและวิจารณ์	69
สรุปและข้อเสนอแนะ	154
สรุป	154
ข้อเสนอแนะ	157
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	159
ภาคผนวก	181
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	182
ภาคผนวก ข การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์	194
ภาคผนวก ค ผลการทนกรดและน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลอง ทางเดินอาหารของไก่	196

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่	8
2 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของไก่	12
3 รายชื่อสายพันธุ์ของเชื้อ <i>Enterococcus</i> ที่ EU อนุญาตให้ใช้เติมลงในอาหารสัตว์	35
4 ส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติก	43
5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก	49
6 ตัวอย่างอาหารหมักดอง ผลไม้และกีเฟอร์ ที่ใช้ในการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้แลกเตต	55
7 อัตราส่วนเริ่มต้นระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แลกเตตในการเจริญเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรไบโอติก	64
8 อัตราส่วนเริ่มต้นระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida krusei</i> MB-1 ที่มีความสามารถในการใช้แลกเตตในการเจริญเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรไบโอติก	65
9 ตัวอย่างอาหารที่นำมาคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้แลกเตต	72
10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้แลกเตตของยีสต์ที่คัดเลือกในอาหารผิวเยียง LAC agar โดยเปรียบเทียบจากการเปลี่ยนสี brom cresol purple	75
11 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในอาหาร LAC broth	84
12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากน้ำผักกาดดองและกีเฟอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YM agar	86
13 การหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่างๆของยีสต์ไอโซเลตที่คัดเลือก	87
14 การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยชุดทดสอบทางการค้า API ID 32 C	88
15 อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวในอาหาร MRS-sucrose broth	97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมร่วมกับ <i>Candida krusei</i> MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของ กระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 18 ชั่วโมง	142
17 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมร่วมกับ <i>Candida krusei</i> MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของ กระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 24 ชั่วโมง	143
18 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมร่วมกับ <i>Candida krusei</i> MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของ กระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ อากาศ นาน 36 ชั่วโมง	144
19 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมร่วมกับ <i>Candida krusei</i> MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของ กระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 18 ชั่วโมง	145
20 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมร่วมกับ <i>Candida krusei</i> MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของ กระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 24 ชั่วโมง	146

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
21	ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ <i>Candida krusei</i> MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 36 ชั่วโมง	147
22	ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารเมื่อทดสอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชระดับต่างๆ ด้วยกรดแลคติก	148
ตารางผนวกที่		
ก 1	ส่วนประกอบของ ID 32 C strip	192
ค 1	เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมหรือไม่ร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	197
ค 2	เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	199
ค 3	เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	201
ค 4	เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	202
ค 5	เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	203

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค 6 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	205
ค 7 เซลล์รอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโพรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	207
ค 8 เซลล์รอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโพรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 ภายหลังบ่มในสถานะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่	209
ค 9 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 ภายหลังบ่มในสถานะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่	211
ค 10 เซลล์รอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโพรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	213
ค 11 เซลล์รอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโพรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	214
ค 12 เซลล์รอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโพรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	215

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค 13 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	216
ค 14 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	217
ค 15 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 ภายหลังจากบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่	218
ค 16 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 ภายหลังจากบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่	219

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ระบบการย่อยอาหารของสัตว์ปีก	9
2 ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของโปรไบโอติกตั้งแต่กระบวนการผลิตจนถึงระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน	13
3 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก	15
4 แบบจำลองการทำลายเซลล์เป้าหมายโดยการทำให้เกิดรูรั่วของแบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin pore)	22
5 วิถี Embden-Meyerhoff Pathway ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermentative	30
6 วิถี Phosphoketolase pathway ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative	31
7 ความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างเชื้อ <i>L. kefiranofaciens</i> และ <i>S. cerevisiae</i> ในการเพาะเลี้ยงแบบผสม	42
8 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ Lactate Ammonium sulfate agar ซึ่งใช้ในการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แลคเตตในการเจริญและใช้ brom cresol purple เป็นอินดิเคเตอร์	70
9 โคโลนีของเชื้อยีสต์ที่เจริญใน Lactate Ammonium sulfate agar รอบๆ โคโลนีของยีสต์ที่ใช้แลคเตตได้จะเปลี่ยนสี brom cresol purple จากสีเหลืองเป็นสีม่วง	70
10 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ไอโซเลต MB-1 บนอาหาร LAC agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน	76
11 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ MB-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า	77
12 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ไอโซเลต KN-1 บนอาหาร LAC agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน	77
13 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ KN-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า	78
14 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ไอโซเลต KN-2 บนอาหาร LAC agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน	78
15 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ KN-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า	79
16 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของยีสต์ OB-1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าในอาหาร LAC broth	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของยีสต์ MB-1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าในอาหาร LAC broth	81
18 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของยีสต์ KN-1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าในอาหาร LAC broth	82
19 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของยีสต์ KN-2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าในอาหาร LAC broth	83
20 ลักษณะของเซลล์ <i>Enterococcus faecium</i> PR-2 ภายใตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	92
21 ลักษณะของเซลล์ <i>Lactobacillus plantarum</i> IG-3 ภายใตกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	92
22 เปรียบเทียบการเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth	95
23 เปรียบเทียบการเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth	96
24 การเจริญของโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 และ <i>L. plantarum</i> IG-3 ในรูปของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทั้งการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ที่สามารถใช้แลคเตดในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง	99
25 การเปลี่ยนแปลงฟิโอสของ culture broth เมื่อเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 และ <i>L. plantarum</i> IG-3 ทั้งการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ที่สามารถใช้แลคเตดในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง	102
26 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับโปรไบโอติกในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง	105

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
27 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 และ <i>L. plantarum</i> IG-3 กับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้แลคเตดในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	106
28 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 และ <i>L. plantarum</i> IG-3 กับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้แลคเตดในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	107
29 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 และ <i>L. plantarum</i> IG-3 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมกันในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง	109
30 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง	110
31 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>L. plantarum</i> IG-3 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง	111
32 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของโปรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Ent. faecium</i> PR-2 และ <i>L. plantarum</i> IG-3 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ <i>C. krusei</i> MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง	112
33 ความสามารถในการทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
34 ความสามารถในการทนกรดของยีสต์ (ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติก) เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	119
35 ความสามารถในการทนกรดของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกและยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	121
36 ความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี เป็น เวลา 18 ชั่วโมง	124
37 ความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี เป็น เวลา 36 ชั่วโมง	126
38 ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida krusei</i> MB-1 บนอาหาร PDA (ก่อนนำเชื้อไปทดสอบในสภาวะจำลองความเป็นกรดในกระเพาะอาหารของไก่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ)	128
39 ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida krusei</i> MB-1 ที่รอดชีวิต บนอาหาร PDA (หลังจากนำเชื้อไปบ่มใน PBS พีเอช 2.5 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งจำลองมาจากสภาวะกรดในกระเพาะอาหารของไก่)	128
40 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระทั่งตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	130
41 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระทั่งตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	131

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
42 การทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี เป็นเวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมง	133
43 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระตังตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	135
44 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระตังตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	136
45 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระตังตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	137
46 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhimurium DMST 16809 เมื่อทดสอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกเท่ากับ 2.0 – 3.5	149
47 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhimurium DMST 16809 เมื่อทดสอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกเท่ากับ 4.0 – 5.5	150
48 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhimurium DMST 16809 เมื่อทดสอบด้วยโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 ภายหลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง	151

การผลิตโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกกับยีสต์และ การรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

Probiotics Production by Mixed Culture of Lactic Acid Bacteria and Yeast and Their Survivals Under Simulated Conditions of Broiler Gastrointestinal Tract

คำนำ

เนื้อไก่เป็นอาหารที่มีประโยชน์นิยมบริโภคกันทั่วไปและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นสินค้าที่ทำรายได้จากการส่งออกนำเงินเข้าประเทศเป็นจำนวนมากโดยผลิตภัณฑ์เนื้อไก่เป็นสินค้าปศุสัตว์ส่งออกที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย มีมูลค่าส่งออกคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าส่งออกสินค้าอาหารทั้งหมดของไทยและสามารถสร้างรายได้เข้าประเทศเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี (ศูนย์อภิจริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2550) แต่ในการเลี้ยงไก่มักประสบปัญหาเรื่องโรคติดเชื้ออยู่เสมอทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อผู้เลี้ยงไก่อย่างมาก เพราะนอกจากทำให้ไก่ตายแล้วยังทำให้ไก่ที่รอดชีวิตมีอัตราการเจริญลดลงส่งผลให้ผลผลิตโดยรวมตกต่ำ จึงมีความจำเป็นต้องให้สารปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่ โดยมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญ คือ การใช้เพื่อรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรีย (ธวัชชัยและคณะ, 2547) แต่การใช้สารปฏิชีวนะเป็นเวลานานทำให้เกิดผลเสียที่ตามมา คือ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคในฟาร์มเกิดการดื้อยา ทำให้การรักษาโรคน่ากังวลขึ้น หากไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนส่งออกจำหน่ายเป็นระยะเวลาที่เพียงพอจะทำให้มีสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อไก่ซึ่งอาจถ่ายทอดไปสู่ผู้บริโภคได้ นอกจากนี้การเลี้ยงไก่ด้วยสารปฏิชีวนะยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการกีดกันทางการค้าจากสหภาพยุโรปที่เข้มงวดในเรื่องมาตรฐานสุขอนามัย มีการห้ามใช้สารปฏิชีวนะในอาหาร

จากปัญหาดังกล่าว นักวิจัยจึงหาสิ่งทดแทนสารปฏิชีวนะ ทางเลือกหนึ่งคือ โปรไบโอติก (probiotic) ซึ่งได้มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพการใช้ในไก่แล้วพบว่า มีคุณสมบัติในการเพิ่มสมรรถนะการผลิตไข่ได้ ช่วยลดเชื้อก่อโรคและไม่ทำให้เกิดการตกค้างของสารอันตรายในเนื้อไกดังนั้นการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่จึงเป็นทางเลือกที่ช่วยบรรเทาปัญหาดังกล่าว (ธวัชชัยและคณะ, 2547) แต่ที่ผ่านมาโปรไบโอติกที่ใช้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศโดยแหล่งนำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น (ธนสิทธิ์, 2546) ประกอบกับสภาพแวดล้อมของไทยไม่เหมาะสมต่อ

จุลินทรีย์ที่นำเข้าจากประเทศอื่นจึงอาจทำให้เกิดความผันแปรของจุลินทรีย์ ดังนั้นการผลิตโปรไบโอติกในประเทศไทยจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจและน่าจะเป็นประโยชน์สูงสุด ทั้งในด้านการลดต้นทุนและประสิทธิภาพการนำไปใช้

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยจะมีการผสมเชื้อดังกล่าวกับเชื้อยีสต์ที่มีโปรตีนสูงลงในอาหารสัตว์ เมื่อนำไปเลี้ยงสัตว์จะส่งผลให้สัตว์มีความต้านทานต่อเชื้อโรคได้มากขึ้นและมีสุขภาพแข็งแรงอีกด้วย ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกให้ได้จำนวนมากนั้นจะต้องใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็นส่วนผสม โดยจุลินทรีย์จะนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและสร้างกรดแลคติกออกมาเป็นจำนวนมากจนถึงพีเอชระดับหนึ่งที่แบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถทนสภาพความเป็นกรดที่สูงมากในอาหารนั้นได้ เชื้อจะหยุดการเจริญและตายในที่สุด ส่งผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตได้ต่ำเกินไป โดยทั่วไปวิธีการที่ใช้ในการแก้ปัญหาการสะสมของกรดทำได้โดยการเติมสารละลายต่างลงไปในการอาหาร แต่บางครั้งการเติมต่างถึงแม้ว่าจะเป็นการช่วยปรับพีเอชแต่ก็อาจทำให้ผลผลิตของเซลล์ลดลงอันเนื่องมาจากความดันออสโมติก และเนื่องจากปัจจุบันมนุษย์สนใจเรื่องความปลอดภัยของสุขภาพมากขึ้น โดยจะเน้นใช้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำความสัมพันธ์เชิงระบบนิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตเข้ามาใช้ในการผลิตโปรไบโอติก โดยจะนำยีสต์ซึ่งสามารถเจริญในพีเอชระดับที่เป็นกรดได้ดีมาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยยีสต์นั้นต้องมีความสามารถในการใช้กรดแลคติกที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นได้ และเปลี่ยนเป็นสารประกอบอื่นทำให้พีเอชในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญต่อไปได้ และได้จำนวนเซลล์มีชีวิตที่จะใช้ผสมในอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้นแทนการใช้สารละลายต่างซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันทั่วไป

วัตถุประสงค์

1. คัดแยกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้กรดแลกติก (แลกเตต) และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ จากตัวอย่างอาหารหมักดองและผลไม้
2. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้กรดแลกติกในการเจริญ
3. ศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่
4. ทดสอบฤทธิ์ของโปรไบโอติกที่รอดชีวิตหลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

การตรวจเอกสาร

อุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่ของประเทศไทย

ปัจจุบันไก่กระทรงจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีประชากรทั่วโลกบริโภคเนื้อสูงเป็นอันดับสองรองจากเนื้อสุกร แต่ในอนาคตอีกไม่กี่สิบปีข้างหน้าคาดว่า การบริโภคเนื้อไก่จะขยับขึ้นมาเป็นอันดับหนึ่งเนื่องจากเนื้อไก่ไม่มีขีดข้อจำกัดทางด้านศาสนาเกี่ยวข้องกับเนื้อสุกรและให้ผลผลิตเร็วกว่าสุกร ประเทศไทยจัดเป็นประเทศอันดับต้นๆ ที่สามารถส่งเนื้อไก่ไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศโดยนำเงินรายได้จากการส่งออกเข้าประเทศเป็นจำนวนมาก สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อไก่เป็นสินค้าปศุสัตว์ส่งออกที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย มีมูลค่าส่งออกคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าส่งออกสินค้าอาหารทั้งหมดของไทยหรือ 5.25 เปอร์เซ็นต์ ของมูลค่าส่งออกสินค้าทั้งหมดและสามารถสร้างรายได้เข้าประเทศเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในแต่ละปี โดยเฉพาะในปี 2546 สร้างรายได้เข้าประเทศสูงถึง 40,691 ล้านบาท(ศูนย์วิจัยเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2550) ข้อมูลในปี 2548 ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกอันดับที่ 5 ของโลก ส่งออกได้ 265 พันตัน มูลค่า 30,484 ล้านบาท (สมาคมส่งเสริมการเลี้ยงไก่แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2549) ซึ่งส่งผลดีต่อการทำงานของก่อให้เกิดรายได้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการ โดยตรง ตลอดจนทำให้เกิดอุตสาหกรรมต้นน้ำ(upstream industries) และอุตสาหกรรมต่อเนื่อง (supporting industries) จำนวนมาก (จิระศักดิ์, 2549) โดยการส่งออกเนื้อไก่ของไทยมีตลาดหลักอยู่ที่ประเทศญี่ปุ่นและกลุ่มสหภาพยุโรปหรืออียู ตลาดรองได้แก่ เกาหลีใต้ สิงคโปร์และฮ่องกง (ศูนย์วิจัยเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2550)

จากข้อมูลดังกล่าวอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ถือว่าเป็นรายได้หลักของประเทศอย่างหนึ่ง ดังนั้นผู้ผลิตจึงได้มุ่งพัฒนาวิธีการเลี้ยงและการจัดการให้ดียิ่งขึ้น โดยปรับปรุงวิธีการเลี้ยงให้มีสูตรอาหารที่เพิ่มปริมาณและคุณค่า เพื่อให้ไก่เจริญเร็ว โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นลง ทำให้สัตว์ส่วนใหญ่มีความต้านทานโรคต่ำ ความแข็งแรงและความทนทานต่อความเครียดต่างๆลดลง ดังนั้นจึงมีการเสริมสารต่างๆลงในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะเพื่อช่วยเร่งการเจริญและป้องกันโรคซึ่งผลเสียที่ติดตามมานั้น คือ การตกค้างของสารต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของผู้บริโภค จึงมีบางประเทศในยุโรปห้ามใช้สารปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์ เช่น ประเทศอังกฤษห้ามใช้สารเตตราซัยคลินในอาหารสัตว์ ประเทศสหรัฐอเมริกามีการจำกัดการใช้สารเพนนิซิลินและเตตราซัยคลิน เสริมลงในอาหารสัตว์เนื่องจากเล็งเห็นถึงอันตรายดังกล่าว

นอกจากนี้การใช้สารปฏิชีวนะยังพบว่า สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคในฟาร์มนั้นเกิดการดื้อยา โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มซาลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) และ แคมไพโลแบคเตอร์ (*Campylobacter* spp.) มีการดื้อยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) (สุทธิศักดิ์และคณะ, 2549) จากปัญหาดังกล่าว นักวิจัยจึงได้มีการหาวิธีการลดการใช้สารปฏิชีวนะโดยหาสิ่งที่มาทดแทนให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์ชนิดนั้นๆ และช่วยส่งเสริมให้สัตว์มีการเจริญดีขึ้น จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์บางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยสร้างสารยับยั้งการเจริญและขับออกมานอกเซลล์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นลักษณะที่สำคัญของกลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติก ดังนั้นการนำโปรไบโอติกมาใช้เสริมลงในอาหารสัตว์จึงเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งมีผู้สนใจกันมากเนื่องจากเป็นลักษณะของการใช้สิ่งมีชีวิตเข้ามาควบคุมกันเอง (biological control) และไม่มีผลกระทบจากสารตกค้างที่ทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับโปรไบโอติกยังได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้เป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้อีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotics) นำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Metchnikoff แต่ความสนใจในการนำมาใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ (feed supplement) เกิดขึ้นอย่างจริงจังในปี ค.ศ. 1974 (Fuller, 1989) คำว่า โปรไบโอติก มาจากภาษากรีกแปลว่า “เพื่อชีวิต” มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ให้คำจำกัดความไว้โดย Lilley and Stillwell (1965) เป็นบุคคลแรกที่นำมาอธิบายสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและมีผลการกระตุ้นการเจริญของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง Parker (1974) ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์หรือสสารซึ่งสามารถปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร คำว่า สสาร ทำให้เกิดความคลุมเครือว่ารวมถึงสารปฏิชีวนะหรือไม่ (Havenaar and Huis In't Veld, 1992) แต่ในความหมายนี้ได้รวมถึงสารปฏิชีวนะด้วย (Salminen *et al.*, 1999; Reque *et al.*, 2000) ต่อมา Fuller (1989) ทบทวนคำจำกัดความและกล่าวว่า โปรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตเป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ โดยปรับปรุงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ให้สมดุล ซึ่งนิยามนี้เป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน (Reque *et al.*, 2000) และในปีเดียวกันนี้ องค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration; FDA) ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก เป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารที่ให้กินโดยตรงและจัดเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS)

ingredients ซึ่งเป็นอาหาร และสารที่เดิมในอาหารที่ปลอดภัยสามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้ โดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกร และนักพิษวิทยาแล้ว (Pollman, 1986) ต่อมา Males and Johnson (1990) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่าเป็นการสนับสนุนส่งเสริมสิ่งมีชีวิต พร้อมทั้งชี้ให้เห็นประโยชน์จากการใช้จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสัตว์ว่ามีจุดประสงค์ 3 ประการ คือ เพื่อถนอมอาหาร เพื่อปรับสภาพความสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสัตว์ที่เกิดความเครียด และเพื่อนำอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ Havenaar and Huis In't Veld (1992) ได้ขยายความหมายของโปรไบโอติกว่า ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอาจมีเพียงชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น โดยโปรไบโอติกนอกจากช่วยส่งเสริมการเจริญแล้วยังทำให้คนและสัตว์มีสุขภาพที่ดีขึ้นด้วยและโปรไบโอติกไม่ได้จำกัดที่จะใช้เฉพาะในส่วนของการทางเดินอาหารเท่านั้นแต่ยังอาจมีผลกับระบบอื่นๆด้วย เช่น ทางเดินหายใจส่วนต้น ระบบปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ ต่อมา Tannock (1999) ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่าเป็นอาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีประโยชน์ต่อสัตว์โดยช่วยปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และในปีเดียวกันนี้ Gatesoupe ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่า คือ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดๆ แล้วสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้านและมีชีวิตอยู่ได้และปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น

1. ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์

1.1 ใช้เป็นสารเร่งการเจริญแทนยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ซึ่งอาจพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสร้างวิตามินและสารที่ไม่ทราบชนิด(unidentified substance) ซึ่งไม่เพียงแต่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ยังช่วยส่งเสริมการเจริญด้วย และยังให้กรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ เช่น ไลซีน เมไทโอนีน เพื่อเป็นต้นกำเนิดในการสร้างโปรตีนและไขมัน (คณินิจ, 2540)

1.2 ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้น เนื่องจากอาหารสัตว์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยวัตถุดิบ ซึ่งต้องการเอนไซม์จำเพาะเจาะจงที่จะย่อยสารประกอบเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอินทรีย์ กรดอะมิโนซึ่งสัตว์และจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่สามารถนำไปใช้ต่อได้ จุลินทรีย์โปรไบโอติกอาจสร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส (cellulase) ไซลานาส (xylanase) ลิเพส (lipase) โปรทีเอส (protease) บีต้า-กลูคาเนส (beta-glucanase) อะไมเลส (amylase) ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์ที่ได้รับโปรไบโอติก (Sen and Chakrabarty, 1984)

1.3 ทำให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์สารปรุงแต่งรสชาติธรรมชาติและสารเคมีหอม ซึ่งสามารถกระตุ้นให้สัตว์เจริญอาหารมากขึ้น (คณิงนิจ, 2540)

1.4 ช่วยยับยั้งการติดเชื้อโดยการระงับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเนื่องจากเมื่อสัตว์บริโภคจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จุลินทรีย์เหล่านี้จะแพร่พันธุ์และก่อตัวที่ผนังหรือเยื่อทางเดินอาหารส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคซึ่งสัตว์ได้รับภายหลังเจริญและเกาะที่ผนังลำไส้ได้ยากขึ้น (Fuller and Broker, 1974; Barrow *et al.*, 1980) นอกจากนี้หากจุลินทรีย์โปรไบโอติกนั้นเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกก็จะสร้างกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลทำให้ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไปไม่เหมาะกับการเจริญและความคงตัวของเชื้อโรคดังกล่าว (Gilland and Speck, 1977)

1.5 เพิ่มผลผลิตน้ำนมโค และไข่ไก่ ตลอดจนคุณภาพไข่ไก่ (วิเชียร, 2541; ธนสิทธิ์, 2546; Nahashon *et al.*, 1996)

1.6 ช่วยให้อายุขัยของเจ้าบ้าน (host) แข็งแรงขึ้น โดยการทำให้ต้านทานต่อเชื้อโรคมากขึ้น หรือมีผลช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยไปเพิ่มระดับของภูมิคุ้มกัน (antibody) และเพิ่มกิจกรรมของแมคโครฟาจ (macrophage) โดยมีผลออกฤทธิ์ที่บริเวณลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ (ธนสิทธิ์, 2546)

1.7 ลดระดับคอเลสเตอรอล (Havenaar and Huis In't Veld, 1992)

2. เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

2.1 ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเป็นที่ยอมรับและมีความปลอดภัย (GRAS = Generally Recognize As Safe) ไม่ทำให้เกิดโรค ไม่เป็นพิษและต้องไม่เป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อให้เกิดโรคเมื่อร่างกายของสัตว์อ่อนแอ (Salminen *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006)

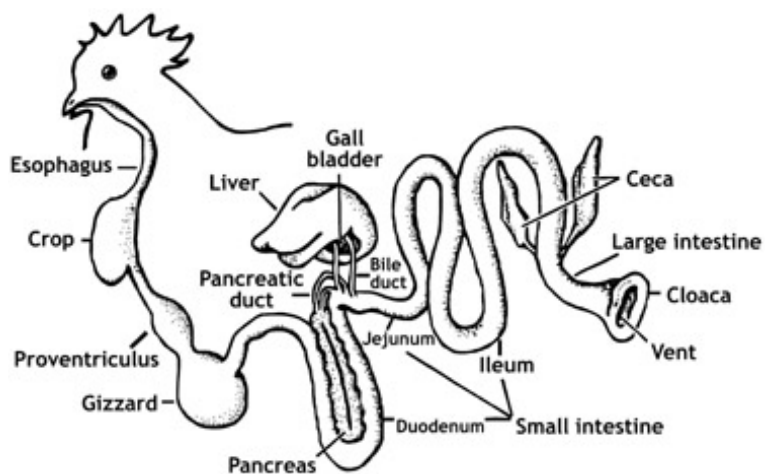
2.2 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญมากขึ้นและมีความต้านทานโรคดีขึ้น (คณิงนิจ, 2540)

2.3 สามารถทนสภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (gastric juice) (Yu and Tsen, 1993; Dunne *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้ ดังนั้นการคัดเลือกโปรไบโอติกในสัตว์ต่างๆ เช่น ไก่ ควรคำนึงถึงลักษณะทางกายภาพและค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นอยู่ในสภาพเป็นกรด (3.17 – 6.4) ลำไส้เล็กส่วนปลายเกือบจะเป็นกลาง ส่วนลำไส้ใหญ่ตรงไส้ติ่ง (caecum) และกระพุ้งก้น (cloaca) มีพีเอชเป็นกรดถึงด่าง (5.40 – 8.40) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทั่วไปทางเดินอาหารของไก่ จะสั้นกว่ามนุษย์และสัตว์จำพวกหมูและวัว (ภาพที่ 1) ระยะเวลาที่อาหารผ่านจึงสั้นกว่า คือ ประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที Jin *et al.* (1998) กล่าวว่า การทนกรดของแบคทีเรียในไก่อาจไม่สำคัญมากเท่ากับสัตว์อื่น ที่มีอัตราการผ่านของอาหารนานกว่า อย่างไรก็ตามพีเอชของน้ำย่อยในทางเดินอาหารของไก่ สามารถลดลงต่ำถึง 0.5 – 2.0 ได้ จึงมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ดังนั้นโปรไบโอติกที่ใช้สำหรับไก่ควรเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับค่าพีเอชของระบบทางเดินอาหารของไก่หรือใช้เทคนิคการเคลือบ เพื่อให้คงทนและแตกตัวในลำไส้เล็กส่วนปลายเพื่อหลีกเลี่ยงพีเอชต่ำ

ตารางที่ 1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่

Position	pH
Crop	4.00 – 6.30
Proventriculus	3.17 – 4.80
Gizzard	2.50 – 4.74
Duodenum	5.70 – 6.00
Jejunum	5.80 – 5.90
Ileum	6.30 – 6.40
Rectum or colon	6.30 – 6.70
Ceca	5.70 – 8.40
Cloaca	5.40 – 8.40

ที่มา: Sturkie (1976)



ภาพที่ 1 ระบบการย่อยอาหารของสัตว์ปีก

ที่มา: Parkhurst and Mountney (1988)

ปิยะนุชและคณะ (2549) ทดสอบความสามารถในการทนกรดที่พีเอช 3.0 ในระดับหลอดทดลองของแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากมูลไก่จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus thermotolerans* โดยทำการเพาะเลี้ยงทั้ง 5 สายพันธุ์ในสภาวะต่าง ๆ กันดังนี้คือ อาหาร MRS broth ในสภาวะปกติซึ่งใช้เป็นหลอดควบคุมและอาหาร MRS broth พีเอช 3.0 บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ พบว่า *L. thermotolerans* ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถทนกรด โดยทุกสายพันธุ์มีการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม และพบว่าสายพันธุ์ JCM11427 มีการเจริญได้ดีที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสายพันธุ์

Manner (1976) รายงานว่าพีเอชในกระเพาะอาหารหรือน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของสัตว์จะมีความผันแปร ตามอายุของสัตว์และเวลา ก่อนหรือหลังรับประทานอาหาร เช่น พีเอชก่อนรับประทานอาหารจะมีค่า 2.0 หรือหลังรับประทานอาหาร 30 นาที จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 -4.0

Jin *et al.* (1996) รายงานว่า *Lactobacillus* 12 สายพันธุ์ที่แยกได้จากไส้ติ่ง (caecum) ของไก่ มีความสามารถในการทนกรดได้มากกว่าลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) โดยทั่วไปเชื้อมีชีวิตรอดน้อยมากที่พีเอช 1.0 และ 2.0 มีชีวิตรอดปานกลางที่พีเอช 3.0 ในขณะที่ *Lactobacillus* ซึ่งแยกได้จากไส้ติ่งมีชีวิตรอดได้ที่พีเอช 1.0 เป็นเวลามากกว่า 2 ชั่วโมงและสามารถเจริญได้ปานกลางที่พีเอช 2.0 และเจริญได้ดีที่พีเอช 3.0 และ 4.0

Lin *et al.* (2006) ศึกษาความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทางการค้า 5 ชนิด คือ A, B, C, D และ E ที่บ่มในสารละลาย PBS พีเอช 2.0 พบว่า กรดมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมีนัยสำคัญ จำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์ A, B และ E ลดจำนวนลง 2.23-3.45 log CFU/ml ขณะที่ผลิตภัณฑ์ C และ D มีจำนวนลดลง 1.10 – 1.52 log CFU/ml

2.4. สามารถทนน้ำดี (bile tolerance) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการดำรงชีวิตภายในลำไส้เล็ก เนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมันทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี (Jin *et al.*, 1998; Erkkila and Petaja, 2000; Mattila-Sandholm *et al.*, 2000; Reque *et al.*, 2000; Dunne *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006)

วรารักษ์ (2550) ทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ent. faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *L. plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 ซึ่งแยกได้จากແໝ ລຳໄສປ່າและລຳໄສຂອງໄກ່ກະທຽງ ในอาหาร MRS broth ที่เติมน้ำดีที่แยกได้จากไก่ ความเข้มข้น 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากบ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Ent. faecium* PR-2 และ Rumen bacterium MG-2 สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องในน้ำดีที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนลง สำหรับสายพันธุ์ *L. plantarum* IFS-1 และ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญได้ช้ากว่า และมีปริมาณเซลล์สูงสุด เมื่อบ่มในอาหาร MRS broth ที่มีน้ำดี 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงลดปริมาณลงและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง(48 ชั่วโมง) พบว่า ในอาหาร MRS broth ที่มีน้ำดีความเข้มข้น 1 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ยังคงมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลอง(0 ชั่วโมง) แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำดี 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองเล็กน้อย

Yu and Tsen (1993) ทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีของ lactobacilli ที่มาจากแหล่งต่างๆ โดยบ่มเชื้อในอาหาร MRS broth ที่เติม ox gall ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า *L. acidophilus*, *L. casei* ซึ่งแยกได้จากนมและ *L. fermentum* ที่แยกได้จากกระด้างและสัตว์ปีกทนน้ำดีได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *L. acidophilus*, *L. casei* ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์นมทนน้ำดี 60 เปอร์เซ็นต์ *L. acidophilus* S6 และ *L. fermentum* S8 ซึ่งแยกได้จากสุกรถูกยับยั้งการเจริญ 50-55 เปอร์เซ็นต์

Tsai *et al.* (2005) ทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีของ *Lactobacillus acidophilus* LAP5 และ *Lactobacillus fermentum* LF33 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของสุกรและลำไส้ส่วน caecum ของสัตว์ปีก โดยถ่ายเชื้อทั้งสองที่รอดชีวิตหลังบ่มใน PBS พีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS broth ที่เติม ox gall ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า LAP5 ทนต่อเกลือน้ำดีได้ดี ขณะที่ LF33 มีจำนวนลดลงจาก 9.2 เหลือ $6.93 \log \text{CFU/ml}$

2.5 สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะที่บริเวณเยื่อเมือกทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน(host)ได้ (Dunne *et al.*, 2001; Bouzaine *et al.*, 2005; Anadon *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006) จากการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่ปากผ่านลำไส้เล็กจนกระทั่งลำไส้ใหญ่ตลอดจนมูลที่ขับถ่ายออกมา พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มเด่นที่ยึดเกาะพื้นที่ส่วนใหญ่ในทางเดินอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของแบคทีเรียในทางเดินอาหารของไก่พบว่า จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่ไก่ฟักเป็นตัวจนกระทั่งมีอายุหลายสัปดาห์ โดยวันแรกของการมีชีวิตจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะพักจะประกอบด้วยแบคทีเรีย 2-3 ชนิด ได้แก่ faecal cocci, enterobacteria และ lactobacilli หลังจากนั้น lactobacilli จะยึดเกาะพื้นที่บริเวณเยื่อเมือกกระเพาะพักตลอดชีวิตของไก่ (Sarra *et al.*, 1992) จากนั้น lactobacilli จะสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติกทำให้กระเพาะพักของไก่ที่มีสุขภาพดีมีพีเอช 4-5 ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ทนกรดได้น้อยไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (Barrow, 1992) เมื่อไก่มีอายุ 2 สัปดาห์จุลินทรีย์บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ซึ่งประกอบด้วย Clostridia, Streptococci และ Enterobacteria จะถูกแทนที่ด้วย Lactobacilli ขณะที่ในลำไส้เล็กประกอบด้วย Lactobacilli แต่บางครั้งก็พบ Streptococci, Enterobacteria และแบคทีเรียที่จับกลุ่มกันเป็นสี่เซลล์ที่เรียกว่า sarcina (Sarra *et al.*, 1992) ดังนั้น

แบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ป้องกันอันตรายและรักษาสมดุลของร่างกายสัตว์ปกติ

ตารางที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของไก่

Microorganism	Log ₁₀ median (of 5-7 birds) viable count in contents of							
	group	Crop	Gizzard	small intestinal			Caeca	Faeces
				Section	Section	Section	Section	
				1	2	3	4	
<i>E.coli</i>		1.7	-	2.0	1.7	1.7	2.7	5.6 6.1
<i>Clostridia</i>		-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	9.0 2.0
<i>Enterococci</i>		4.0	3.7	4.0	4.0	3.7	4.2	6.7 6.5
<i>Lactobacilli</i>		8.7	7.3	8.0	8.2	8.2	8.6	8.7 8.5
Yeasts		2.7	-	1.7	-	1.7	-	2.0 1.7
Non-sporing		-	-	-	-	-	-	10.0 9.0
obligate anaerobes								
Anaerobic streptococci		-	-	-	-	-	-	10.0 8.7

หมายเหตุ - = log < 1.0

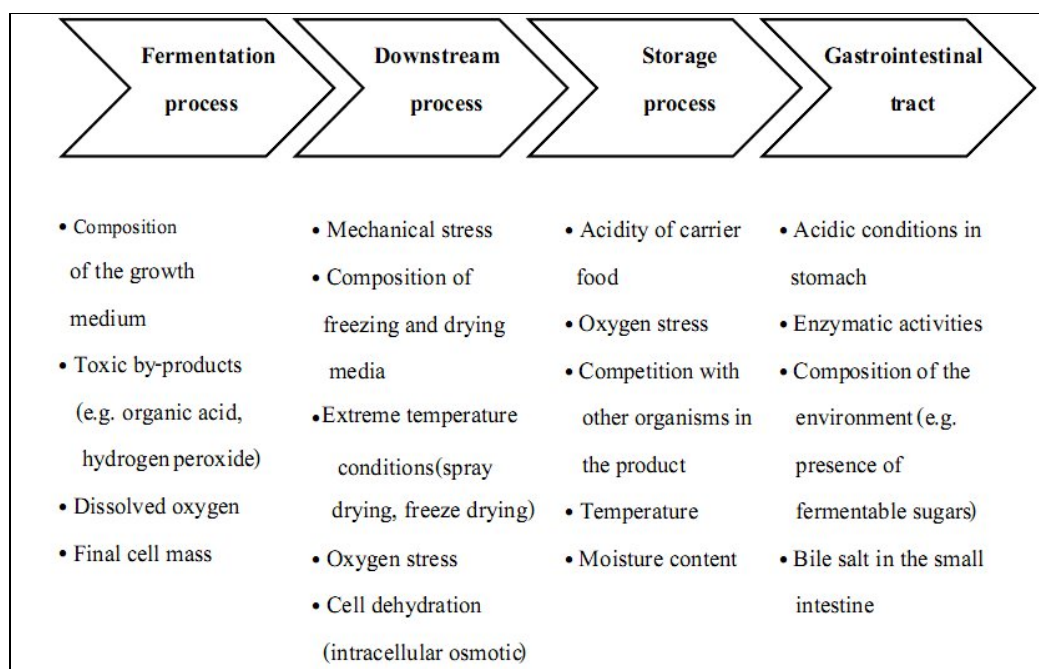
(-) = may or may not be present

ที่มา: Barrow (1992)

2.6 มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก แบคทีเรียโอซิน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มเอนเทอริกแบคทีเรีย (enteric bacteria) เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. หรือจุลินทรีย์ที่บุกรุก (invasion) แล้วก่อให้เกิดโรคในลำไส้ของสัตว์ได้ (Reque *et al.*, 2000 ; Dunne *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005; Angelis *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006)

2.7 ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถช่วยส่งเสริมภาวะทุพโภชนาการของสัตว์ได้ คือ มีการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นและนำมาใช้ประโยชน์ได้ (วิเชียร, 2542ข; รุจา, 2544)

2.8 เพาะเลี้ยงได้ง่าย เพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว สามารถขยายการผลิตสู่ระดับการค้าได้ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บเกี่ยวผลผลิต (down stream) ดังภาพที่ 2 นอกจากนี้โปรไบโอติกต้องมีชีวิตรอดอยู่ได้นาน ทั้งสถานะที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ การเก็บรักษา (Dunne *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2006; Lacroix and Yildirim, 2007) ตลอดจนเมื่อนำไปผสมลงในอาหารสัตว์ต้องมีปริมาณโปรไบโอติกต้องสูงกว่า 10^6 โคโลนีต่อกรัม (วิเชียร, 2542ก) ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการผลิตอาหารสัตว์บางชนิด ต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อน แร่ธาตุเพื่อการอัดเม็ด และสภาพเป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation เช่น วัตถุดิบในอาหารสัตว์บางชนิด ซึ่งช่วยในการถนอมคุณภาพอาหารสัตว์และควรมีสมบัติทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์ (คณินิจ, 2540)



ภาพที่ 2 ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของโปรไบโอติกตั้งแต่กระบวนการผลิตจนถึงระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน

ที่มา: Lacroix and Yildirim (2007)

Gatesoupe (1999) ได้ทำการรวบรวมข้อมูลถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกว่า ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหาร หรือผลิตสารเพื่อฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ควรมีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อลำไส้ได้เพื่อให้มีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ไม่เช่นนั้นจะถูกบีบรัดและขับออกไปตามการบีบของลำไส้ ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะเด่นเฉพาะจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติก หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่งทำให้เจ้าบ้านมีความแข็งแรงต้านทานโรคได้ และเมื่อเจ้าบ้านหรือสัตว์ได้รับจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกจะไปเพิ่มจำนวนและก่อตัวเกาะที่เยื่อของทางเดินอาหาร เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่เจ้าบ้านหรือตัวสัตว์ได้รับเข้าไปในภายหลังจะเจริญและเกาะผนังลำไส้ได้ยากมากขึ้น

จุดประสงค์ของการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์มีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด เช่น ไก่เนื้อเพิ่มน้ำหนัก ลดอัตราการตายของลูกไก่ ไก่ไข่เพิ่มเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่และให้มีขนาดใหญ่ขึ้น การเพิ่มน้ำหนักดีขึ้น ลูกสุกลดอาการท้องร่วง อัตราการแลกเนื้อ การเพิ่มน้ำหนักและความต้านทานโรคดีขึ้น เพิ่มปริมาณน้ำนมโค เพิ่มปริมาณไขมันนม การใช้โปรไบโอติกในสัตว์ต่างๆ ควรคำนึงถึงลักษณะทางกายภาพและค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เพื่อให้แน่ใจว่าโปรไบโอติกที่ใช้ได้ผลตามวัตถุประสงค์

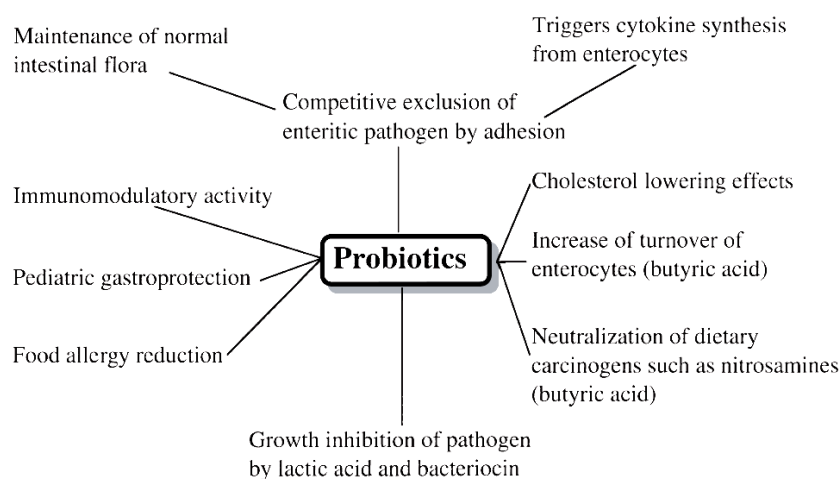
3. รูปแบบของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

โปรไบโอติกสามารถทำได้หลายรูปแบบขึ้นกับแนวทางการนำไปใช้ เช่น แคปซูล แบบคล้ายแป้งเปียก (paste) เป็นผงหรืออัดเม็ด ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้โดยตรงในสัตว์หรือเติมในอาหาร (Fuller, 1989) หรือน้ำ อาจมีการใช้ในรูปแบบผงรอบๆ คอกสัตว์เลี้ยง โดยเฉพาะไก่ (วิเชียร, 2541) การเตรียมอาจทำได้ในรูปเชื้อเดี่ยวหรือรวมเชื้อหลายสายพันธุ์เข้าด้วยกัน ข้อดีของการผสมเชื้อหลายชนิดรวมเข้าด้วยกัน คือ สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะการป้องกันได้กว้างกว่าการมีเชื้อเพียงชนิดเดียวและยังใช้ได้กับสัตว์หลายชนิด Fuller (1992) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus* sp. (thermobacterium), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Ent. faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bif. thermophilum*, *Bif. pseudolongum* และ *Pediococcus pentosaceus*

Lactobacillus, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium* เป็นกลุ่มที่นิยมใช้กันทั่วไปในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก *Lactobacillus* เป็นสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมมากในการนำมาใช้ เนื่องจากมีการพัฒนาไปเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น คือ เมื่อสัตว์ได้รับ *Lactobacillus* จำนวนของ *Lactobacillus* จะเพิ่มขึ้นในลำไส้และจะทำให้จุลินทรีย์อื่นๆลดลง

4. กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกส่งผลที่เป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้านดังแสดงในภาพที่ 3 โดยอาจเป็นสื่อกลางในการป้องกันกลุ่มจุลินทรีย์ที่จำเพาะได้โดยตรง เป็นผลให้จำนวนจุลินทรีย์เหล่านี้ลดลงหรือไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์หรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต่อต้านเชื้อโรค โดยผลิตสารต้านจุลชีพและสารต้านแบคทีเรีย เช่น ไซโตไคน์ (cytokines) และกรดบิวทีริก (butyric acid) ลดพิษของลำไส้โดยกระตุ้นการผลิตกรดแลคติกของจุลินทรีย์ประจำถิ่น แข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการแย่งพื้นที่เกาะผนังลำไส้ ปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันและกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน แข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการแย่งสารอาหารและปัจจัยในการส่งเสริมการเจริญหรือผลิตเอนไซม์แลคเตสในการช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส (ศศิมา, 2550) ซึ่งมีกลไกโดยละเอียดดังนี้



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

ที่มา: Saito (2004)

4.1 การยึดเกาะที่เยื่อผิวเซลล์

การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. โดยกลไกการยึดเกาะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกรดแลคติกเกาะติดกับผนังลำไส้แล้วก่อตัวเพิ่มจำนวนและเพาะตัวในส่วน luminal contents ของสัตว์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาตัวอย่างกระเพาะอาหารของหมู ในกระเพาะพักและไส้ติ่งของไก่ ต่อมาแบคทีเรียกรดแลคติกจะยึดเกาะบริเวณ receptor ที่ผิวหน้าทำให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอันตรายหรือก่อโรคถูกกำจัดออกไปจากลำไส้ (Barrow *et al.*, 1980; Gusils *et al.*, 2002) แบคทีเรียกรดแลคติกจะมีผิวเซลล์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากับเซลล์เยื่อผนังลำไส้ โดยกระบวนการในการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วย passive van der Waals' attractive forces, electrostatic interaction, hydrophobic, steric forces, lipoteichoic acid และมีโครงสร้างเฉพาะที่ผิวเซลล์ เช่น external appendages (lectins) และ(หรือ) extracellular polymers (polysaccharides) (Gusils *et al.*, 2002)

แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค เช่น *E. coli* ยึดเกาะเซลล์เป้าหมายด้วย proteinaceous projections (pili) ส่วน Lactobacilli จะยึดเกาะผนังของระบบทางเดินอาหารด้วย extracellular substances ซึ่งประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ไขมันและกรดไลโปไทโคอิก (lipoteichoic acid) สำหรับกรดไลโปไทโคอิกเป็นโพลิเมอร์ของไรบิทอล (ribitol) หรือกลีเซอรอลฟอสเฟต (glycerolphosphate) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก เชื่อมต่อกับไกลโคลิพิด (glycolipid) ซึ่งมีทั้งบริเวณที่เป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Gusils *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การก่อตัวของจุลินทรีย์ไบโอฟิล์มก่อให้เกิดลักษณะเป็นฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ซึ่งจะช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคให้แก่สิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตได้ (Bibiloni *et al.*, 1999)

Jin *et al.* (1996) ทดสอบความสามารถของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ ในการยึดเกาะที่เซลล์เยื่อของลำไส้เล็กส่วน ileum จากทั้งหมด 26 สายพันธุ์ พบว่า *L. acidophilus* I26 เพียงสายพันธุ์เดียวที่มีความสามารถในการยึดเกาะได้ดีที่สุด และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย ปรากฏว่าทั้งสองปัจจัยไม่มี

ผลต่อความสามารถในการยึดเกาะที่เซลล์เยื่อส่วนนี้ของไก่ นอกจากนี้พบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ส่วนต่างๆ คือ ileum, jejunum และ caecum มีความสามารถในการยึดเกาะต่างกัน เนื่องจากแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อตำแหน่งของลำไส้

Tsai *et al.* (2005) ทดสอบความสามารถในการยึดเกาะเยื่อลำไส้ของ *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LAP5 และ LF33 ซึ่งแยกได้จากลำไส้สุกรและสัตว์ปีกตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองสายพันธุ์สามารถยึดเกาะกับ cell line ของลำไส้มนุษย์ คือ Int-407 และ Caco-2 cells ได้ นอกจากนี้พบว่ายังสามารถยึดเกาะเซลล์เยื่อลำไส้ที่แยกได้จากสุกร ไก่ และหนูสายพันธุ์ BALB/c ได้อีกด้วย

4.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันมีการกล่าวถึงศักยภาพของโปรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านมีการค้นพบว่า สัตว์ที่มีจุลินทรีย์ในลำไส้สมบูรณ์ทุกประการมีกิจกรรมฟาโกไซติก (phagocytic activity) และระดับอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (Baalmear *et al.*, 1984) และมีข้อมูลพบว่า *Lactobacillus casei* สามารถออกฤทธิ์ในการกระตุ้นกิจกรรมฟาโกไซติกเมื่อเจริญในลำไส้หนู (Perdigon *et al.*, 1986) อนึ่งแบคทีเรียที่มีสารในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จะต้องเป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่จากลำไส้ไปสู่อวัยวะที่สร้างระบบภูมิคุ้มกันและ Fuller (1989) พบว่า *Lactobacilli* มีความสามารถในการเคลื่อนที่และมีชีวิตอยู่ในม้าม ตับและปอด Aattouri *et al.* (2001) รายงานว่าการให้หนูกินแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยกระจายตัวของเม็ดเลือดขาวและการผลิตอินเทอร์เฟอรอน (interferon) เขาเสนอว่าสิ่งที่เกิดขึ้นอาจทำให้เพิ่มความต้านทานการติดเชื้อ การศึกษาในหนูแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเข้าครอบครองและเพิ่มจำนวน ทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocytes), CD4⁺ เซลล์ และเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดี (antibody-secreting cells) รวมกันในเมือกของลำไส้ (intestinal mucosa) และเพิ่มการกระจายตัวของลิมโฟไซต์ กิจกรรมของ natural killer cell activity, IL-1, YNF และการผลิต TFN- γ การผลิตแอนติบอดี (ประกอบด้วยสารหลัก IgA) กิจกรรมฟาโกไซติกและแมโครฟาจ (macrophage) และ DTH response ซึ่งไม่ใช่แบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ที่ให้ผลเช่นนี้ (Naidu *et al.*, 1999)

4.3 การผลิตสารต้านจุลชีพโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

4.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

ในการหมักน้ำตาลเฮกโซสของจุลินทรีย์แบบ homofermentation จะได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ส่วนการหมักแบบ heterofermentation จะได้กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกสามารถยับยั้งได้ดีกว่ากรดแลคติก และมีช่วงการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย ค่า pKa ของกรดอะซิติกสูงกว่ากรดแลคติก (4.75 และ 3.08 ตามลำดับ) การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity (Rubin, 1978) เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ กรดอินทรีย์มีผลยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ โดยการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวจุลินทรีย์นั้นๆ (Fuller, 1989) Jin *et al.* (1996) ได้ศึกษา *Lactobacillus* 12 สายพันธุ์ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis 935/37, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Blokley* และ *S. Enteritidis* 9/448 และ *E. coli* 3 serotype ได้แก่ *E. coli* 01:K1, *E. coli* 02:K1 และ *E. coli* 078:K80 โดย *Lactobacillus* เหล่านี้จะผลิตกรดอินทรีย์ ข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งคือ กรดอินทรีย์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เพราะสามารถละลายได้ในไขมัน (Bearson *et al.*, 1997) การสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเบสในช่วงแรกของการเจริญลดลง และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด นอกจากนี้ได้มีนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ให้ข้อเสนอแนะว่าไม่ใช่เป็นเพราะการเคลื่อนย้ายโปรตอนแต่เป็นการสะสมของประจุลบทำให้ลดอัตราการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ และมีผลกระทบต่อ การเคลื่อนย้ายสารบริเวณเหนือเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลให้ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้

4.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ สามารถพบได้ในแบคทีเรีย

กรดแลกติกเนื่องจากไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยในสภาพที่มีอากาศแบคทีเรียกรดแลกติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้จาก flavoprotein-containing oxidase ได้แก่ NADH-oxidase และ superoxide dismutase ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสทำลายฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิด superoxide radicals (O_2^-) และ hydroxyl radicals ($OH^\cdot$) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จะผลิตเอนไซม์ flavoprotein peroxidase ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ dioxygen ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเมื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกสะสมเป็นจำนวนมาก ก็จะมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์อื่นๆ ตลอดจนแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มรูปร่างกลม และรูปท่อนอีกด้วย(ภักดี, 2548) มีรายงานว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas* spp. ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถทนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆหลายชนิด (Adam and Nicolaidis, 1997) Price and Lee (1978) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas* spp. (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) คือ 2 - 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ MIC ที่ใช้ในการยับยั้ง *S. aureus* มีค่า 5 - 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ MIC ในการยับยั้ง *Lactococcus lactis* มีค่า 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Dahiya and Speck, 1968) สำหรับกลไกในการยับยั้งการเจริญคือ ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลกติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงและมีผลต่อแบคทีเรีย โดยหมู่ sulfhydryl ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และไนไมนที่เยื่อหุ้มเซลล์สามารถออกซิไดซ์ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไป จนไม่อาจทำหน้าที่ได้ตามปกติ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

4.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)

โดยทั่วไปก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลกติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้ในวิถีเมแทบอลิซึมอื่นๆก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นสาเหตุทำให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป (Lindgren and Dobrogosz, 1990) คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงสามารถป้องกันการเจริญ

ของจุลินทรีย์บางชนิดได้ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีความไวต่อคาร์บอนไดออกไซด์แตกต่างกันโดยแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุด ขณะที่ *Lactobacilli* และยีสต์บางสายพันธุ์ทนคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูง (Adam and Nicolaides, 1997)

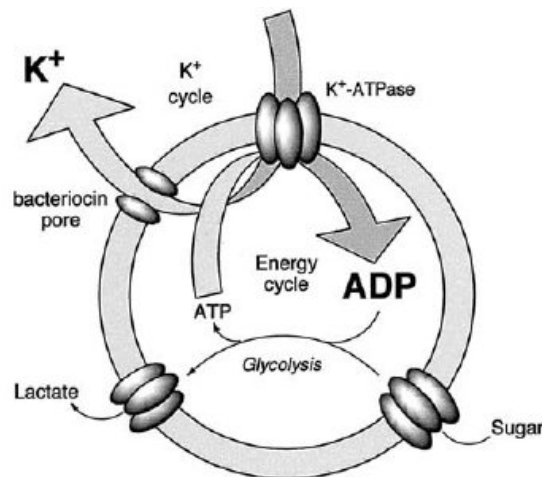
4.3.4 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิล (2,3-butanedione) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวต ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างไดอะซีทิลได้ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างไดอะซีทิลได้จะต้องสามารถเฟอร์เมนส์ซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซีทิลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียเช่น *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *Y. enterocolitica* (Adam and Nicolaides, 1997) ไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และเราได้ศึกษาว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีรายงานว่า ปริมาณไดอะซีทิล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ และปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่กลุ่มของแบคทีเรียแลกติกได้ สำหรับกลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เกิดจากไดอะซีทิลไปรบกวนการใช้อาร์จินีน (arginine) ภายในเซลล์ โดยไดอะซีทิลจะทำปฏิกิริยากับ arginine binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ (Jay, 1982)

4.3.5 แบคทีริโอซิน (Bacteriocins)

แบคทีริโอซินเป็นสารต้านจุลชีพประเภทโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยส่วนใหญ่มีกิจกรรมในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีริโอซินนั้นๆ แบคทีริโอซินที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นเป็นสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ (Messens and Vuyst, 2002) เช่น *B. cereus*, *Cl. botulinum*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* (Lejeune et al., 1998), *Aeromonas hydrophila* และ *Micrococcus luteus* กลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีริโอซิน ได้แก่ *Carnobacterium*, *Enterococcus*,

Lactococcus, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* และ *Weissella* (Halami *et al.*, 1999) ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นได้แก่ carnobacteriocin A1, A2, A3, carnocin, carnocinU149, curvacin A, diplococcin, helveticin J, lactacin F, lactacin 481, lactocin S, lactococcin A, lactococcin I, lactostrepcin, leucocinA, mesenteriocin 5, nisin, pediocin AcH, Pediocin PA-1, plantaricin A, plantaricin B และ sakacin A คุณสมบัติของแบคทีเรียโอซิน จะพิจารณาจากขนาด(molecular mass) มวลโมเลกุล การทนความร้อน (thermostability) การไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (enzyme sensitivity) การดัดแปลงกรดอะมิโน หลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัส (post-translation modification) และกลไกในการทำงาน (mode of action) แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่พีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง และถูกทำลายเมื่อเก็บไว้ที่ พีเอชสูงกว่า 10 (Ozlem, 2003) กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน โดยทั่วไปแบคทีเรียโอซินจะทำให้เกิดรู (ช่องเปิด) ใน cytoplasmic membrane ของเซลล์ เป็นเหตุให้เกิดการรั่วของสารต่างๆภายในเซลล์ และสูญเสียแรงขับเคลื่อนของโปรตอน(proton motive force) แบคทีเรียโอซินเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวกโดยมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ(hydrophobic) ทำปฏิกิริยากับกลุ่มฟอสเฟต(phosphate groups) บนเมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะแทรกเข้าไปในเมมเบรนทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องเปิด จากนั้นจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเป้าหมาย เช่น DNA RNA เอนไซม์ และตำแหน่งอื่นๆ เพื่อฆ่าเซลล์เป้าหมาย (วราภรณ์, 2550) นอกจากนี้มีรายงานว่าเกิดการเกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลทำให้โปแตสเซียมไอออน(K^+) ไหลออกจากเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งการดูดซึมของกรดอะมิโน ในที่สุดอาจส่งผลให้เซลล์ตายเนื่องจากวัฏจักรการขับเคลื่อนโปรตอนสูญเสียไป นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินยังเป็นสารตัวกลางที่ปลดปล่อยโปแตสเซียมเพื่อทำปฏิกิริยาร่วมกับ ATPase ในการสลาย ATP ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แบบจำลองการทำลายเซลล์เป้าหมายโดยการทำให้เกิดรูรั่วของแบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin pore)

ที่มา: Garneau *et al.* (2002)

5. ชนิดจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติก

ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกอาจเป็นแบคทีเรีย ยีสต์หรือรา ซึ่งคุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์จะแตกต่างกัน โปรไบโอติกบางชนิดยังไม่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด แต่คาดว่าลักษณะการทำงานโดยทั่วไปไม่แตกต่างกันมากนัก คือ ผลิตสารที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์เอง และมีผลในการส่งเสริมการเจริญของสัตว์ที่เป็น host แต่กระทบต่อจุลินทรีย์ก่อโรค

จุลินทรีย์ที่สหภาพยุโรป(European Union)ให้ใช้ในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus* (*B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*), *Enterococcus* (*Ent. faecium*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*) และ *Streptococcus* (*Strep. infantarius*) นอกจากแบคทีเรียแล้วยีสต์บางสายพันธุ์ที่ให้ใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Kluyveromyces* ปัจจุบันสกุลแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก คือ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Enterococcus* โดยปริมาณของ *Lactobacillus* และ *Enterococcus* ที่แนะนำให้ใช้คือ 10^7 หรือ 10^8 และ 10^5 หรือ 10^6 ซีเอฟยู (colony forming units; CFU) ต่อกรัม ตามลำดับ(Reque *et al.*, 2000; Anadon *et al.*, 2006) สำหรับกฎหมายประเทศไทย

กำหนดไว้ว่า โปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ และเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 1×10^5 ซีเอฟยูต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ตามประกาศกระทรวงของเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดชื่อ ประเภทชนิดหรือคุณลักษณะของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ให้อใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อขาย ตลอดจนอัตราส่วนหรือปริมาณที่ให้อใช้หรือห้ามมิให้อใช้วัตถุนั้นเกินกำหนด พ.ศ. 2539 ซึ่งออกตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ดังนี้

ก. แบคทีเรีย

Bacillus coagulans , *B. lentus*, *B. licheniformis* , *B. pumilus* , *B. subtilis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารปฏิชีวนะ), *B. subtilis* strain BN, *B. toyoi*, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides capilliosus*, *Bacteroides ruminicola*, *Bacteroides suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bif. animalis*, *Bif. bifidum*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *Bif. thermophilum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. reuterii*, *L. mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilacticii*, *Ped. cerevisiae*, *Ped. pentosaceus*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Streptococcus cremoris*, *Strep. diacetylactis*, *Strep. faecium* cermelle 68, *Strep. intermedius*, *Strep. lactis* และ *Strep. thermophilus*

ข. ยีสต์

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

ค. รา

Aspergillus niger และ *A. oryzae*

6. การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่

รุจา (2544) ทดลองเลี้ยงไก่กระทงด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสด 3 ชนิด ได้แก่ *L. plantarum* CO1 และ *Ent. faecium* KUPB20 และเชื้อผสมของทั้งสองสายพันธุ์ (1:1) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า การให้เชื้อเสริมแก่ไก่ทั้ง 3 การทดลองไม่มีผลต่อน้ำหนักเฉลี่ยของไก่ อย่างไรก็ตามในช่วงระยะเวลาการเลี้ยง 3 และ 5 สัปดาห์ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นการให้โปรไบโอติกในลักษณะเซลล์ผสม มีแนวโน้มช่วยเพิ่มน้ำหนักไก่อายุ 21 วันได้

จิรศักดิ์และเกรียงศักดิ์ (2545) รายงานว่า การให้โปรไบโอติกละลายน้ำให้ไก่กินในอัตรา 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 1 ลิตรทุกวัน ทำให้ไก่เนื้อมีน้ำหนักตัวที่เฉลี่ยเพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily gain) และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไก่เนื้อกลุ่มที่ไม่ให้กินโปรไบโอติก ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อไก่เนื้อมีระยะที่ใกล้จับขาย

ศักดิ์ดาและคณะ (2545) รายงานว่า การให้โปรไบโอติกซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ *Ent. faecium*, *B. subtilis*, *Lactobacillus* และ *Saccharomyces* รวมกันให้ไก่กินโปรไบโอติก 5 ครั้งๆ ละ 3 วัน พบว่าน้ำหนักไก่เฉลี่ยต่อตัว ปริมาณอาหารที่กิน อัตราการเพิ่มน้ำหนักต่อตัวต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และดัชนีผลผลิตในกลุ่มที่กินโปรไบโอติกดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้กินโปรไบโอติกแต่ไม่เด่นชัดนัก

อรพินและบุญเรียง (2546) นำจุลินทรีย์โปรไบโอติก 4 สายพันธุ์ ที่แยกได้ในประเทศไทย คือ *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus* KUL2, *Saccharomyces cerevisiae* Y77 และ *Bacillus subtilis* B31 ไปทดลองเลี้ยงไก่กระทงในฟาร์มระดับอุตสาหกรรมจำนวน 924 ตัว โดยการทดลองได้แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม โดยการให้แบบเชื้อเดี่ยว 4 กลุ่ม, เชื้อผสม 1 กลุ่ม (*Pediococcus* KUL2 + *S. cerevisiae* Y77 + *B. subtilis* B31) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้โปรไบโอติก ใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 40 วัน พบว่า การเจริญของไก่ช่วงอายุ 1 ถึง 21 วัน ทั้งน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น, ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ของทั้ง 6 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ส่วนการเจริญที่อายุ 22 ถึง 40 วัน และ 1 ถึง 40 วัน พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ขณะที่ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และพลาสมาโปรตีน ที่อายุ 40 วันในไก่กระทงทุกกลุ่มการ

ทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่พบว่า ไก่กระทงกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม กล่าวคือ กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *B. subtilis* B31, *S. cerevisiae* Y77, *L. acidophilus*, เชื้อผสม, *Pediococcus* KUL2 และกลุ่ม ควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 98.70, 98.05, 96.76, 96.76, 95.45 และ 91.57 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าโปรไบโอติกมีผลทำให้เชื้อ *E. coli* ใน ลำไส้ไก่มีปริมาณลดลงอีกด้วย

วรารักษ์ (2550) นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Enterococcus faecium* PR-2, Rumen bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IG-3 และ *L. plantarum* IFS-1 ไปเสริมในอาหารไก่กระทง แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนไอลีียม(ileum) และซีกัม(cecum) ของไก่ ผลการทดลองพบว่า โปรไบโอติกที่ใช้มีอิทธิพลต่อจำนวนประชากร *Escherichia coli* และแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ของไก่กระทง โดยในไก่ที่เสริมด้วยโปรไบโอติกทั้งโปรไบโอติกทางการค้า โปรไบโอติกในรูปเชื้อสดแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม มีแนวโน้มประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ส่วนไอลีียมสูงกว่า ($P<0.01$) และประชากร *E. coli* ในลำไส้ส่วนซีกัมต่ำกว่า ($P<0.01$) กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่า *E. coli* ทั้งในส่วนไอลีียมและซีกัมของไก่

วรการและคณะ (2550 ก) ศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อจำนวนประชากรเชื้อ *E. coli* และการสร้างภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนโรคนิวคาสเซิล (Newcastle) โดยทำการเสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสดในน้ำดื่มของไก่กระทง ใช้ไก่กระทงเพศผู้ จำนวน 880 ตัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ไม่เสริมสารปฏิชีวนะและโปรไบโอติกในอาหาร (T1) กลุ่มที่ 2 อาหารควบคุมที่เสริมด้วยสารปฏิชีวนะ (avilamycin) (T2) กลุ่มที่ 3 อาหารควบคุมที่เสริมโปรไบโอติกทางการค้า (T3) กลุ่มที่ 4 ถึง 11 ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมที่เสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสด ได้แก่ *Bacillus* sp. (T4), *Clostridium acetobutyricum* (T5), *Ent. faecium* PR-2 (T6), Rumen bacterium MG-2 (T7), *L. plantarum* IFS-1 (T8), *L. plantarum* IG-3 (T9), ยีสต์ (T10) และเสริมเชื้อผสม (mixed culture) (T11) ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ที่อายุ 21 วัน กลุ่มที่ได้รับเชื้อ *L. plantarum* IG-3 และยีสต์ มีจำนวนเชื้อ *E. coli* ในลำไส้เล็กส่วนไอลีียมต่ำที่สุด ($p<0.01$) แต่ที่อายุ 42 วันในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *Ent. faecium* PR-2 มีจำนวนเชื้อ *E. coli* ในลำไส้เล็กส่วนไอลีียมต่ำที่สุด ($p<0.01$) ในขณะที่โปรไบโอติกทางการค้า *Clostridium acetobutyricum*, Rumen bacterium MG-2, *L. plantarum* IFS-1, *L. plantarum* IG-3 ยีสต์และเสริมเชื้อผสม สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ส่วนซีกัมที่อายุ 35 และ 42 วัน เมื่อ

เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) ส่วนผลด้านภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิลให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ วรรณการและคณะ (2550 ข) ศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติกต่อคุณลักษณะการเจริญและคุณภาพซากในไก่กระตังมีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะพบว่าจากการทดลองไม่พบความแตกต่างของปริมาณอาหารที่กิน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการเลี้ยงรอดและส่วนประกอบของซาก ($p > 0.05$) แต่พบว่ากลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกทางการค้า Rumen bacterium MG-2, *L. plantarum* IFS-1 และเชื้อผสมมีระดับไขมันรวมในเนื้อไก่อต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และกลุ่มที่เสริมเชื้อ Rumen bacterium MG-2 ในน้ำดื่มมีแนวโน้มทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในเนื้อต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ

Cameron and Carter (1992) ทำการทดลองใช้โปรไบโอติกที่เตรียมจากไส้ตันของไก่ปกติในการป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* Enteritidis PT4 (nal^r) โดยพ่นโปรไบโอติกเป็นละออง (spray) ให้ไก่พันธุ์มาแชล (Marshall) อายุ 1 วัน ณ โรงฟักเป็นเวลา 10 วินาที และทำการเลี้ยงไก่เหล่านี้ร่วมกับไก่ที่ได้รับการป้อนเชื้อ *Sal. Enteritidis* PT4 (nal^r) ขนาด 10^4 CFU ตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* จากไส้ตัน ที่อายุ 8, 29 และ 41 วัน พบว่า จำนวนไก่ที่ตรวจพบเชื้อในกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก เมื่อทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ *Salmonella* พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $10^4 - 10^7$ CFU/g ส่วนกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด

Corrier *et al.* (1994) ให้โปรไบโอติกที่เตรียมจากไส้ตันของไก่เนื้ออายุ 10 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัว แล้วนำมาป้อนให้ไก่พันธุ์เลกฮอร์น (Leghorn) เพศผู้ อายุ 1 วัน ด้วยวิธีการต่างๆ คือ ป้อนทางปากโดยตรง ผสมในน้ำที่ไม่มีคลอรีน และพ่นเป็นละออง จากนั้นป้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis แล้วทำการฆ่าไก่ที่อายุ 10 วัน ตรวจสอบ *Salmonella* จากไส้ตัน พบว่า ในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกพบน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Nahashon *et al.* (1996) พบว่า การผสมโปรไบโอติกที่ประกอบด้วย *Lactobacillus* ในอาหารไก่ไข่ทำให้ไก่ไข่ช่วงอายุ 20-59 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้นและให้ไข่ที่มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Jin *et al.* (1998) ศึกษาผลของการใช้ *L. acidophilus* I26 โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมของ *Lactobacillus* 12 สายพันธุ์ ในการเพิ่มน้ำหนักอวัยวะ เพิ่มจุลินทรีย์ในลำไส้และกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid: VFA) ของไก่กระทอง โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบสุ่มแบ่งไก่เป็น 60 ตัว ต่อกลุ่มทดลอง โดยให้อาหารเป็น 3 แบบ คือ (1) basal diet (กลุ่มควบคุม) (2) basal diet + 1 กรัมต่อกิโลกรัมของ *L. acidophilus* I26 (3) basal diet + 1 กรัมต่อกิโลกรัมของ *Lactobacillus* รวมกัน 12 สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม *L. acidophilus* I26 หรือ *Lactobacillus* รวมกัน 12 สายพันธุ์ ในอาหาร basal diet จะทำให้น้ำหนักตัวและ feed : gain ratio ของไก่กระทองที่มีอายุ 0-6 สัปดาห์ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการเติม *Lactobacillus* เชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมในอาหารไก่ พบว่า จำนวน coliforms ในไส้ติ่งของไก่ที่มีอายุ 10 และ 20 วัน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนี้พบว่า total VFA ในลำไส้เล็กส่วนปลายและไส้ติ่งจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และพีเอชในไส้ติ่งลดลง อย่างไรก็ตามการเติม *Lactobacillus* ในอาหารไก่ไม่เพิ่มจำนวน *Lactobacillus* ในลำไส้เล็กส่วนปลายและไส้ติ่งของไก่กระทองอย่างมีนัยสำคัญ และในการทดลองนี้ยังพบว่า น้ำหนักของตับ ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น กลางและปลาย แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ

Jin *et al.* (2000) รายงานว่า การเสริมจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* แบบชนิดเดียว คือ *L. acidophilus* และแบบผสม 12 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์ *L. fermentum* 3 สายพันธุ์ *L. crispatum* 1 สายพันธุ์และ *L. brevis* 6 สายพันธุ์ทำให้ไก่เนื้อมีน้ำหนักตัวเมื่อมีอายุ 14 วัน มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Regue *et al.* (2000) ทำการแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับเลี้ยงไก่ โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกประกอบด้วย ความปลอดภัยทางชีวภาพ การมีชีวิตรอดในสถานะของการเก็บรักษา การทนพีเอชต่ำ หรือการทนน้ำย่อยและน้ำดีในระบบทางเดินอาหารและกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยคัดแยกแบคทีเรียดังกล่าวจากกระเพาะพัก (crop) กระเพาะสำหรับบด (gizzard) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และไส้ติ่ง (caecum) ของไก่จัดจำแนกโดยอ้างอิงตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การย้อมติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส คุณสมบัติการหมักคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าเป็น *Lactobacillus fermentum* LPS และนำไปทดสอบการเป็นโปรไบโอติกเพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงไก่ โดยนำแบคทีเรียดังกล่าวไปเป็นอาหารเสริมสำหรับ

สัตว์ปีก ผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะพบว่า *Lactobacillus fermentum* LPS มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของไก่เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ

Kacaniova *et al.* (2006) ทำการศึกษาลักษณะทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีในไส้ติ่งของไก่และไก่วงว ที่ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Ent. faecium* เสริมลงในอาหารและน้ำดื่มโดย แปรผันความเข้มข้นต่างๆหรือให้ในรูปของการฟ่นเป็นละอองอากาศตามร่างกาย และเปลือกไข่ ผลการศึกษาจำนวนของ *E. coli*, faecal Enterococci, Lactobacilli และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า *E. coli* จะลดลง ในขณะที่จำนวนของ faecal Enterococci, Lactobacilli และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้คล้ายกันทั้งในไก่และไก่วงว

Murrey *et al.* (2006) ทำการศึกษาผลการทดสอบการให้โปรไบโอติกทางการค้า (Feed Free™) ซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus* โดยดูผลการเจริญของไก่กระทงที่มีอายุ 1-42 วัน และทำการฆ่าไก่กระทงในวันที่ 56 โดยฆ่าไก่ 5 ตัวต่อคอก เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียในไส้ติ่ง, กระพุ้งก้น และน้ำล้างซากไก่ โดยในการทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (1) กลุ่มควบคุมจะให้อาหาร basal diet ที่เติมยาป้องกันบิด (coccidiostat) และยาปฏิชีวนะ (2) basal diet ที่ไม่เติมยาป้องกันบิดและยาปฏิชีวนะ (negative control) และ (3) basal diet ที่เติม โปรไบโอติก 0.10 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า น้ำหนักตัวและน้ำหนักเฉลี่ยของ weight gain ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มของไก่กระทงที่ให้โปรไบโอติก 0.10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน Lactobacilli ที่พบในกระพุ้งก้นมีค่าสูงกว่า ($P<0.002$) และจำนวน *Clostridium perfringens* ที่พบในกระพุ้งก้นมีค่าต่ำกว่า ($P<0.002$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่าไก่กระทงที่ให้อาหารเสริมโปรไบโอติก 0.10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน *C. jejuni* ที่พบในน้ำล้างซากไก่อมีค่าต่ำกว่า ($P<0.11$) เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีการเติมโปรไบโอติกที่มีเชื้อ *Lactobacillus* จะช่วยส่งเสริมการเจริญของไก่กระทงได้ใกล้เคียงกับ basal diet ที่มียาปฏิชีวนะและยาป้องกันบิด นอกจากนี้พบว่า โปรไบโอติกจะช่วยลด *C. perfringens* และ *C. jejuni* ในไก่กระทงที่มีอายุอยู่ในช่วงของการขาย

แบคทีเรียกรดแลกติก

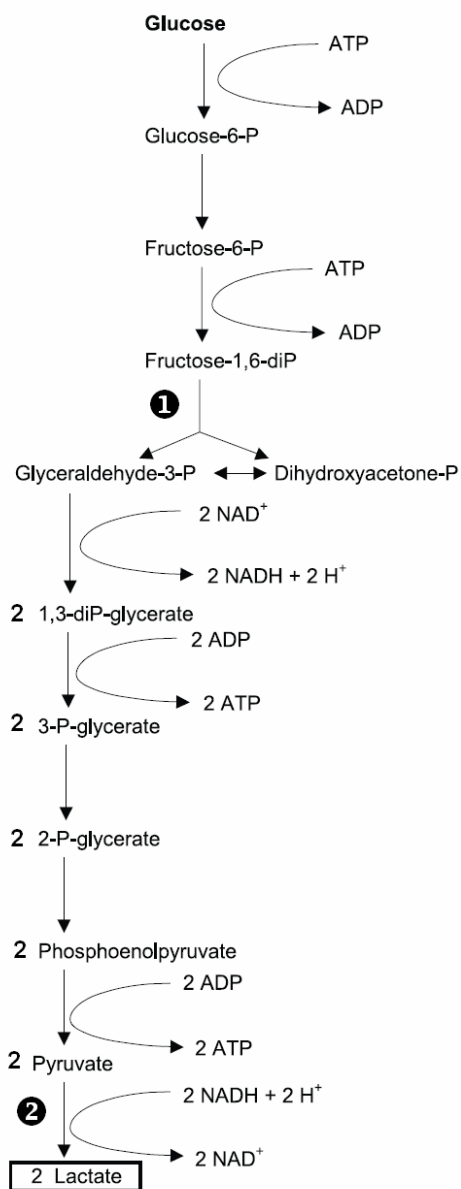
แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีไซโทโครม มีปริมาณของเบส G+C น้อยกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (mol%) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะตาเลส (catalase) แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์อะตาเลสได้ (pseudocatalase) โดยเฉพาะเมื่อเจริญในที่ที่มีน้ำตาลน้อย สามารถทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำกว่า 5 อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนที่มีความซับซ้อนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับการเจริญและการสร้างกรดอินทรีย์ (Ringo and Gatesoupe, 1998) แบคทีเรียกรดแลกติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ในการเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน จึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีปัจจัยในการเจริญ (growth factor) และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส (สุรรัตน์, 2545) สามารถพบแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ในสภาพธรรมชาติที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ เช่น ในน้ำนม เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์ยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์

เมื่อใช้ความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่างๆ มาพิจารณาสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Axelsson, 1993) ดังนี้

1. กลุ่มที่ใช้น้ำตาลผ่านวิถี Glycolysis (Emden-Meyerhof-Parnas Pathway) ในการหมัก และได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีเมแทบอลิซึมแบบ homofermentation ได้แก่ *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Tetragenococcus* ดังภาพที่ 5

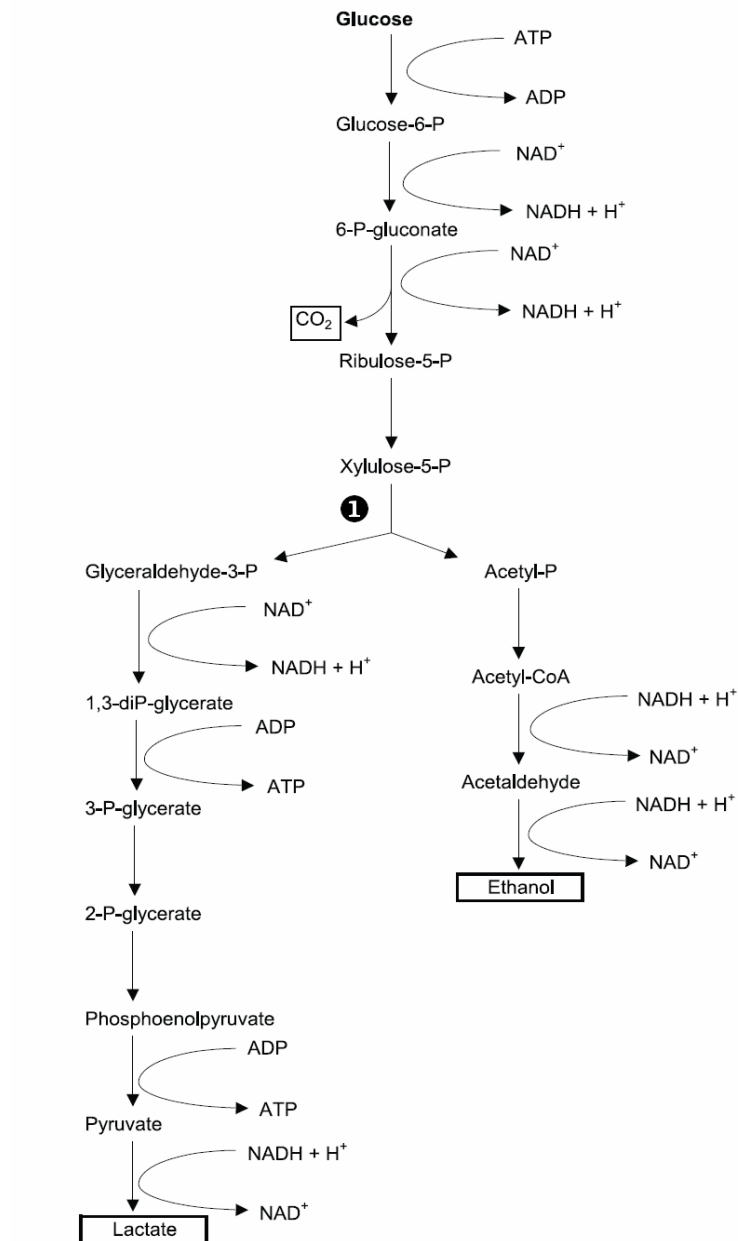
2. กลุ่มที่ใช้น้ำตาลผ่านวิถี 6-phosphogluconate/phosphoketolase จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น เอทานอล อะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์และกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียกรดแลกติก

กลุ่มที่มีเมแทบอลิซึมแบบ heterofermentative ได้แก่ *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 5 วิธี Embden-Meyerhoff Pathway ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Homofermentative
 ❶ แสดงเอนไซม์ fructose-1,6-diP aldolase; ❷ แสดงเอนไซม์ lactate dehydrogenase

ที่มา: Weymarn (2002)



ภาพที่ 6 วิธี Phosphoketolase pathway ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative
 ① แสดงเอนไซม์ phosphoketolase

ที่มา: Weymarn (2002)

การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งได้เป็น 10 สกุล คือ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* และ *Vagococcus* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การหมักคาร์โบไฮเดรต อุณหภูมิในการเจริญ ผลผลิตสุดท้าย ความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นเกลือสูงและการทนต่อกรดหรือด่าง (Axelsson, 1993) การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติกในปัจจุบันอาศัยลักษณะสัณฐาน ลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล เพื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์ และลักษณะทางพันธุกรรม โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิกซึ่งใช้ในการจัดจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ (species) และซับสปีชีส์ (subspecies) โดยใช้เทคนิคขั้นสูงทางพันธุศาสตร์ เช่น การพิจารณาความเหมือนกันของ DNA (DNA-DNA homology) การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA ในไรโบโซม (rRNA) โดยเฉพาะในส่วน of well conserved region และ less conserved region และในปัจจุบันได้นำเทคนิค PCR มาใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Axelsson, 2004) เช่น การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ 23S rRNA ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์นี้เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) โดยตรง (Woese, 1987) การจัดจำแนกในระดับสกุล (genera) ของแบคทีเรียกรดแลคติกอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เช่น การเรียงตัวของเซลล์ การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) จากน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) และชนิดของกรดแลคติกซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดเพียง 2 สกุล คือ

Lactobacillus

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียที่มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ ชีวเคมีและสรีรเนื่องจากมีรูปร่างแท่งหรือทรงรี (coccobacilli) มีความแตกต่างของ mol% G+C ระหว่าง 33-55 เปอร์เซ็นต์ (Collins *et al.*, 1991; Hammes and Vogel, 1995) ทนกรดและต้องการสารอาหารหลายชนิด (เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ เอสเทอร์ของกรดไขมัน เกลือ กรดนิวคลีอิกและวิตามิน) ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งจะสามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในทุกๆสภาวะ เช่น เยื่อ

อวัยวะภายในของมนุษย์และสัตว์ (ช่องปาก ลำไส้และช่องคลอด) พืช ปุ๋ย น้ำทิ้งและอาหารที่เกิดการหมักหรือเน่าเสีย (Hammes and Vogel, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbruekii* subsp. *lactis* และ *L. reuteri* ซึ่งสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เชื่อว่ามีประโยชน์ต่อระบบดังกล่าว ด้วยเหตุนี้เซลล์แบคทีเรียเหล่านี้จึงถูกเติมในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ในรูปแบบของโปรไบโอติก (ภักดี, 2548)

Lactobacillus สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยกระบวนการหมักดังนี้ (Stiles and Holzapfel, 1997; Klein *et al.*, 1998)

1. Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโตสมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ให้เป็นกรดแลกติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) สามารถผลิตเอนไซม์ 1,6-biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิต phosphoketolase จึงไม่หมักผ่านกลูโคเนสและน้ำตาลเพนโตส ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

2. Facultative heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติก โดยผ่าน EMP สามารถผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโตสได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

3. Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตสผ่านวิถี phosphogluconate ได้ผลผลิตเป็นแลกเตต เอทานอล (กรดอะซีติก) และคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์

Lactobacillus plantarum เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนตรง ปลายเซลล์มน มีขนาด 0.9-1.2 x 3.0-8.0 ไมโครเมตร การเรียงตัวพบแบบเซลล์เดี่ยว คู่หรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ บางสายพันธุ์พบว่าสามารถรีดิวซ์ไนเตรต อาจพบการสร้าง pseudocatalase เมื่อเจริญในสภาวะที่ขาดแคลนกลูโคส ต้องการ calcium pantothenate และไนอะซิน (niacin) ในการเจริญ แต่ไม่ต้องการไทอะมิน (thiamine) ไพริดอกซาล (pyridoxal) หรือไพริดอกซามีน (pyridoxamine) กรดโฟลิก (folic acid) วิตามินบี 12 ไธมิดีน (thymidine) หรือดีออกซีไรโบไซด์ (deoxyriboside) ในการเจริญ สามารถพบ

แบคทีเรียชนิดนี้ได้พบในผลิตภัณฑ์นม สิ่งแวดล้อม หนุ่หมัก กะหล่ำปลีคอง ผักคอง ขนมหึงเปรี้ยว มูลโค ช่องปากของมนุษย์ ทางเดินลำไส้ อุจจาระและของเสียต่างๆ

Enterococcus

Enterococcus เปลี่ยนชื่อมาจาก *Streptococcus* กลุ่ม D เดิม มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 35 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10 ถึง 45 องศาเซลเซียส ยกเว้นสายพันธุ์ *Ent. dispar* , *Ent. sulfureus*, *Ent. malodoratus* และ *Ent. moraviensis* ไม่สามารถเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส *Ent. cecorum* และ *Ent. columbae* ไม่เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเจริญได้ที่ระดับความเป็นด่างที่พีเอช 9.6 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 6.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ มีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Carnobacterium* และ *Vagobacterium* มากกว่า *Streptococcus* และ *Lactococcus* มี mol % G+C 37-40 ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ (Devriese and Pot, 1995; Moreno *et al.*, 2006)

Enterococcus faecium เชลล์มีรูปร่างกลมมีการเรียงตัวเป็นคู่หรือ สายสั้นๆหรือต่อกันเป็นสายยาว โคโลนี เรียบ กลม ขอบเกลี้ยงไม่มีรอยหักเว้า (entire) ไม่สร้างรงควัตถุ สามารถพบเชื้อสายพันธุ์นี้ได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก วัว ควาย สุกร และอาจพบในสุนัข แมว สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน เนื่องจาก *Ent. faecium* หลายสายพันธุ์เป็นเชื้อที่สหภาพยุโรป (EU) อนุญาตให้สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 จึงทำให้มีการเติมเชลล์ *Ent. faecium* ลงไปผสมอาหารสัตว์ในรูปของโปรไบโอติก เพื่อปรับปรุงอัตราการเจริญของสัตว์ ช่วยป้องกันหรือรักษาโรคในสัตว์ แทนการใช้สารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์

ตารางที่ 3 รายชื่อสายพันธุ์ของเชื้อ *Enterococcus* ที่ EU อนุญาตให้ใช้เติมลงในอาหารสัตว์

EC Number	สายพันธุ์	ประเภทของสัตว์
8	<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 53519)	ไก่ขุน
	<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 55593) ในอัตราส่วน 1:1	
10	<i>Enterococcus faecium</i> (NCIMB 10415)	ไก่ขุน สุกรขุน โคขุน ลูกสุกร ลูกโค
11	<i>Enterococcus faecium</i> (DSM 5464)	ลูกสุกร ไก่ขุน ลูกโค
13	<i>Enterococcus faecium</i> (DSM 10663)	ลูกสุกร ลูกโค ไก่ขุน
15	<i>Enterococcus faecium</i> (NICMB 11181)	ลูกโค ลูกสุกร
16	<i>Enterococcus faecium</i> (DSM 7134)	ลูกโค ลูกสุกร
17	<i>Enterococcus faecium</i> (NICMB 30098)	ลูกโค
18	<i>Enterococcus faecium</i> (CECT 4515)	ลูกสุกร ลูกโค
21	<i>Enterococcus faecium</i> (DSM 3530)	ลูกโค

หมายเหตุ EC = หมายเลขผลิตภัณฑ์ที่ได้รับอนุญาตจากสหภาพยุโรป

ที่มา: ดัดแปลงจาก Becquet (2003)

ยีสต์

ยีสต์ ตามความหมายดั้งเดิมในภาษากรีกมีความหมายสัมพันธ์กับความสามารถในการหมัก เช่น คำในภาษาอังกฤษว่า “yeast” และในภาษาดัตช์ “gist” มาจากภาษากรีกว่า *zestos* ซึ่งหมายถึง ต้มเนื่องจากลักษณะที่มีฟองปุดขึ้นมา เพราะการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คำในภาษาเยอรมัน “hefe” และภาษาฝรั่งเศสว่า “levere” ทั้งสองคำเป็นคำกริยาที่มีความหมายว่าขึ้นฟู ซึ่งเป็นเพราะลักษณะมีฟองปุดขึ้นมาเช่นกัน

1. ลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์และแหล่งที่พบ

ยีสต์เป็นรากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ส่วนมากเกิดโดยการแตกหน่อ (budding) และส่วนน้อยที่เกิดโดยการแบ่งเซลล์ (fission) ยีสต์โดยทั่วไปมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนจากเชื้อราอื่นในแง่ของสัณฐานวิทยาของโคโลนี (colony morphology) ด้วยเช่นกัน โคโลนีของยีสต์บนอาหาร วัุ้นจะมีลักษณะคล้ายแบคทีเรียแต่ทึบแสงกว่า ยีสต์ส่วนใหญ่เป็น heterotroph ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มีทั้งพวกที่เป็น saprophyte และ parasite พบได้โดยทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น พบอาศัยอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืช ตามดอก ผล ใบ และลำต้นแม้กระทั่งยางไม้ พบในดิน น้ำจืด น้ำทะเล และน้ำทิ้ง อาจพบอยู่กับแมลง และกระเพาะของสัตว์บางชนิด เช่น กระต่าย แต่แท้จริงแล้วแหล่งที่พบยีสต์อยู่เป็นประจำนั้น คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้งและผลไม้ที่มีรสหวาน โดยยีสต์บางชนิดก่อโรคหรือไม่ก่อก็ได้

ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวีสกี แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง ยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการทำขนมปังและโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) สำหรับประเทศไทยการศึกษาค้นคว้าทางด้านยีสต์ยังทำกันไม่มากนัก แต่คนไทยรู้จักการใช้ประโยชน์พอสมควร เช่น ใช้ในการทำอาหารหมักบางชนิด เช่น ข้าวหมาก และปลาเจ้า เครื่องคองของเมาหลายชนิด เช่น อุ สาโท และกระแช่ (สาวตรี, 2540) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์โดยช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตน้ำนมและปริมาณไขมันนม เพิ่มน้ำหนักเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร เพิ่มการกินอาหาร ตลอดจนเพิ่มคุณภาพไข่และขนาดไข่อีกด้วย (คณินิจ, 2540)

2. ยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์

เนื่องจากยีสต์มีความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภทจึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาค้นคว้าอย่างกว้างขวางทุกด้าน แต่นอกจากประโยชน์แล้วยีสต์ที่ให้โทษก็มีอยู่หลายชนิด บางพวกทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร เช่น ฟิล์มยีสต์ (film yeast) ในสกุล *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida* และ *Trichosporon* ซึ่งเจริญบนผิวหน้าอาหารที่มีความเป็นกรด เช่น แดงกวาดองและผักกาดดอง ยีสต์เหล่านี้จะออกซิโดซ์กรดอินทรีย์ทำให้มีปริมาณกรดลดลง เป็นผลให้จุลินทรีย์ชนิด

อื่นที่ทนกรดได้น้อยกว่าสามารถเจริญและทำให้อาหารหมักดองเหล่านั้นเน่าเสีย(สาวิตรี, 2540) โดยยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญและทำให้เกิดฝ้าบนผิวหน้าของอาหารได้แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือในอาหารแต่ละชนิด เช่น *C. mycoderma* และ *P. membranefaciens* จะทำให้เกิดฝ้าบนผิวหน้าผักกาดดองที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในขณะที่ *D. hansenii* เป็นพวกที่ทนเกลือและเจริญในสารละลายที่มีเกลือ 15-20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (วิลาวณย์, 2537)

ดำรงเดชและคณะ (2543) ทำการแยกยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง จิงดอง กระเทียมดอง หน่อไม้ดองและมะนาวดองจำนวน 105 ตัวอย่างพบว่า สายพันธุ์หลัก คือ *Issatchenkia orientalis* สายพันธุ์รอง คือ *Candida humilis* คล้ายกับผลการศึกษาของการพิสูจน์เชื้อยีสต์ทนเค็มที่แยกในประเทศไทย สายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือ *I. orientalis* ที่แยกได้จากตัวอย่างหน่อไม้ดอง หอยดอง มิโซ ข้าวหมาก มะม่วงดองและองุ่นดอง เป็นต้น ขณะที่ Savard *et al.* (2002) ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในผักดอง พบว่า สายพันธุ์หลักของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย คือ *Saccharomyces bayanus* และ *S. unisporus* รองลงมา คือ *Hansenula anomala* และ *Debarymyces* sp.

นอกจากนี้มีรายงานว่า *Kluyveromyces marxianus* สามารถใช้กรดแลคติกในน้ำกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) ได้อย่างรวดเร็ว (Hang *et al.*, 2003) และในผลไม้แช่อิ่มที่เริ่มมีการหมักพบยีสต์หลายชนิด เช่น *Hanseniaspora uvarum* , *Kloeckera apiculata* และ *Pichia kluyveri* ส่วนสัมนำพบ *Kluyveromyces apiculata* , *P. fermentans* , *P. kluyveri* และ *Torulaspora stellata* (สาวิตรี , 2540)

นอกจากยีสต์จะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารหมักดองจำพวกผักและผลไม้แล้ว ยังเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์หมักเกิดการเน่าเสียอีกด้วย โดยพบว่ายีสต์สายพันธุ์ที่ใช้แลกโตสและDL-lactate ในการเจริญเติบโต เช่น *Candida famata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* เป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของโยเกิร์ต (Green and Ibe , 1987 ; Jakobsen and Narvhus, 1996) โดยการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์นมจะเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณยีสต์จำนวน $10^5 - 10^6$ CFU/กรัม (Fleet, 1990 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Deak and Beuchat , 1996) และยังพบว่ายีสต์ที่เจริญในชีสสามารถใช้แลกโตส กาแลกโตส กรดซัคซินิก อะซิติกและซิตริกในการเจริญได้ โดยยีสต์ที่พบนั้นอาจปนเปื้อนมาจาก นมดิบ อากาศและภาชนะที่ใส่น้ำเกลือ (Wyder and Puhon , 1999)

Kotzekidou (1997) รายงานว่ายีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในการหมักมะกอกแดงตามธรรมชาติเป็น *Torulaspora delbruekii*, *Debaryomyces hansenii* และ *Cryptococcus laurentii* โดยยีสต์เหล่านี้จะช่วยลดความเข้มข้นของเกลือและกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์

Kuhle and Jespersen (1998) คัดแยกยีสต์ป่า (wild yeast) จำนวน 41 ไอโซเลตจากตัวอย่างยีสต์ในโรงต้มเหล้า(breweries) 101 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการที่แตกต่างกัน 6 วิธี เมื่อนำยีสต์ดังกล่าวมาจัดจำแนกโดยใช้ชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32 C พบว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* 57 เปอร์เซ็นต์ *Pichia* spp. 28 เปอร์เซ็นต์ และ *Candida* spp. 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ทุกไอโซเลตสามารถใช้แลกเตตได้ คิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อทั้งหมดที่คัดเลือกได้

Gadaga and Mutukumira (2001) ทำการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่าง amasi ซึ่งเป็นนมหมักพื้นเมืองของชาวซิมบับเว 30 ตัวอย่างโดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์ม บ้านเรือนและจัดจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้โดยใช้ชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32 C พบว่า *S. cerevisiae* จำนวน 7 ไอโซเลต และ *C. kefir* ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการใช้ DL-lactate

Cosentino *et al.* (2001) แยกยีสต์จากชีส Pecorino 32 ตัวอย่าง Caciotta 32 ตัวอย่าง Feta 40 ตัวอย่างและ Ricotta 56 ตัวอย่าง พบว่า ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Debaryomyces hansenii* คิดเป็น 28.8 เปอร์เซ็นต์ ของไอโซเลตทั้งหมด ส่วนสปีชีส์อื่นที่พบได้แก่ *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Pichia*, *Candida*, *Dekkera*, *Yarrowia* และ *Rhodotorula* เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า มีเพียง *K. lactis*, *K. marxianus* และ *Dek. anomala* เท่านั้นที่ใช้และหมักแลกโตสได้ สำหรับสปีชีส์อื่นๆพบว่า ส่วนใหญ่สามารถใช้กรดแลกติกได้

Hang *et al.* (2003) ผลิต *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 610 ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยใช้ corn silage juice เป็นสับสเตรท พบว่า มีผลได้ (yield) ของเซลล์แห้งมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่แล้วเขย่าเพื่อให้อากาศพบว่า สามารถผลิตเซลล์ยีสต์แห้งได้มากกว่า 13 กรัม ต่อ corn silage juice 1 ลิตรและสามารถใช้สารอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ (กรดแลกติก, กรดอะซิติกและเอทานอล) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 610 ที่ยังมีชีวิตเพื่อกำจัดกรดแลกติกและสารประกอบอื่นๆออกจาก corn silage juice อย่างมีประสิทธิภาพ

Fadda *et al.* (2004) แยกเชื้อยีสต์จากชีส artisanal Fiore Sardo ได้เชื้อ *Debarymyces hansenii* , *Kluyveromyces lactis* , *Geotrichum candidum* , *Candida zeylanoides* และ *C. lambica* โดยพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ยกเว้น *C. zeylanoides* สามารถใช้แลคเตดได้

Gardini *et al.* (2006) จัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของยีสต์ที่แยกได้ในระหว่างการบ่มชีส Pecorino Crotonese ซึ่งเป็นชีสพื้นเมืองทางตอนใต้ของประเทศอิตาลี พบว่า *Yarrowia lipolytica* ที่คัดเลือกได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถใช้ซิเตรทและแลคเตดได้

3. การอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์และการนำมาประยุกต์

แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มักพบอยู่ร่วมกันในธรรมชาติ เนื่องจากจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้ชอบและทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้คล้ายกัน นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมเกื้อหนุนซึ่งกันและกัน เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตกรดทำให้มีระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ในขณะที่ยีสต์สามารถย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของเซลล์ยีสต์ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ดี การหมักอาหารที่ทำกันมาตั้งแต่โบราณนั้นอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ดังนั้นอาหารหมักหลายชนิดจึงเกิดขึ้นจากกิจกรรมร่วมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเท่ากับเป็นการจำลองระบบนิเวศน์จากธรรมชาตินั่นเอง (นภา, 2535)

ตัวอย่างอาหารหมักที่พบการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด เช่น คีเฟอร์เกรน (kefir grains) ซึ่งเป็นก้อนเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ที่ฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส เรียกคีเฟอร์แรน (kefir) เชื้อผสมนี้มีลักษณะเป็นก้อนเมือกตะปุ่มตะป่ำ คล้ายดอกกะหล่ำ มีสีขาวขนาดตั้งแต่ 5-20 มิลลิเมตร เมื่ออยู่ในน้ำนมคีเฟอร์เกรนสามารถเพิ่มขนาดและจำนวนได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีขนาดเท่ากับเมล็ดถั่ว ในขณะที่เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน จะมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ไปด้วย ดังนั้นคีเฟอร์เกรนจึงเป็นเสมือนเชื้อผสมที่ตรึงตัวเองอยู่บนก้อนสารเมือก ทำให้สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อได้อย่างต่อเนื่องไม่สิ้นสุดโดยเชื้อยังคงประสิทธิภาพที่เลี้ยงในน้ำนม การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ใน คีเฟอร์เกรนมีความสมดุลโดยธรรมชาติ ถึงแม้ว่าการหมักคีเฟอร์และการผลิตคีเฟอร์เกรนไม่ได้ใช้เทคนิคในการทำให้ปลอดเชื้อ แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออื่น จุลินทรีย์เหล่านี้จะอาศัยซึ่งกันและกัน เนื่องจากยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในนมได้ จึงต้องอาศัยสารอาหารที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียแลคติก ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกต้องพึ่ง

สารเสริมการเจริญ (growth factor) ที่สลายจากเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว โดยมีหลักฐานการทดลองสนับสนุนในเรื่องนี้ กล่าวคือ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากคีเฟอร์เกรนจะเจริญได้ดีในน้ำนมก็ต่อเมื่อเติมสารสกัดที่มาจากเซลล์ยีสต์ (นภา, 2535) ชนิดของเชื้อและรูปแบบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อยีสต์ในกล้าเชื้อคีเฟอร์เกรน พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อออกเป็น 4 ชนิดใหญ่ คือ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) เชื้อยีสต์ที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้และไม่ได้ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิด สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมได้เป็นกลูโคสและกาแลคโตส ทำให้เชื้อยีสต์ที่ย่อยน้ำตาลแลคโตสไม่ได้ สามารถใช้น้ำตาลกาแลคโตสเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญของตัวเองได้ และในขณะเดียวกันสารอาหารที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของเชื้อยีสต์จะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ และนอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เชื้อยีสต์ผลิต ยังช่วยให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถคงอยู่ในสภาวะที่ไร้อากาศได้อีกด้วย (Cheirsilp *et al.* , 2003b)

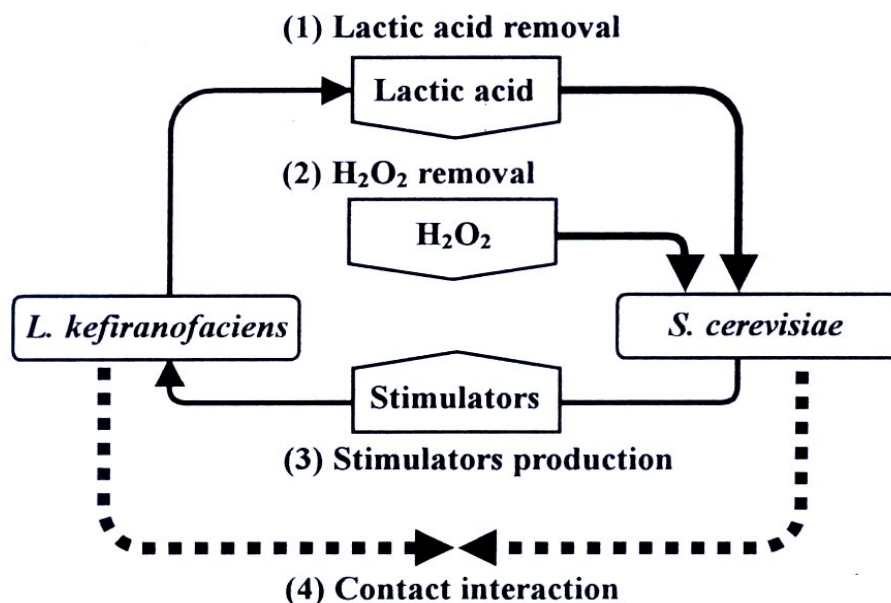
นอกจากคีเฟอร์เกรนแล้วในผักดองมีก็การอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ โดยในระยะแรกของการหมักโดยธรรมชาตินั้นจะพบจุลินทรีย์จำพวก *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* ราและยีสต์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นพวกที่ไม่ต้องการ ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการจะพบน้อยกว่า แต่แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการลดจำนวนและอาจหายไปเมื่อปริมาณกรดเพิ่มขึ้น หลังจากการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกเสร็จสิ้นอาจมีพวกยีสต์เจริญต่อไป ซึ่งยีสต์ที่พบมีทั้งสองกลุ่มคือ ฟิล์มยีสต์ซึ่งจะเจริญเติบโตที่ผิวหน้าของน้ำเกลือและใช้กรดแลคติกที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นโดยการออกซิเดชันทำให้ปริมาณกรดลดลง ฟิล์มยีสต์ที่พบได้แก่ *Debaryomyces*, *Endomycopsis* และ *Candida* ส่วนยีสต์อีกพวกคือ เฟอร์เมนเททีฟ ได้แก่ *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula* และ *Kloeckera* ซึ่งจะเจริญในน้ำเกลือ โดยจะหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ (วิลาวัณย์, 2536)

จากความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ดังกล่าวข้างต้นจึงมีนักวิจัยหลายท่านนำความสัมพันธ์นี้มาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น

Shimizu *et al.* (1999) ทำการศึกษาการควบคุมฟิเอช ในระหว่างการผลิตไนซิน (nisin) โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC 11454) เพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมกับยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* ซึ่งแยกได้จากกีเฟอร์เกรน โดยอาศัยความสัมพันธ์ในการใช้ประโยชน์ร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้มาผลิตสารไนซินให้อยู่ในระดับที่สูงได้ โดยเชื้อ *K. marxianus* จะเป็นเชื้อที่ใช้แลกเตตที่เกิดขึ้นจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC 11454) ทำให้ระดับความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ซึ่งการใช้แลกเตตนี้จะแปรผันโดยตรงกับอัตราการเจริญของยีสต์ ดังนั้นการควบคุมอัตราการเจริญของยีสต์ทำโดยควบคุมค่าความเข้มข้นของ dissolved oxygen (DO) ก็จะควบคุมการใช้แลกเตตหรือฟิเอชของน้ำหมัก (culture broth) ได้จากผลการทดลองพบว่าสามารถรักษาระดับฟิเอชให้คงที่และสร้างไนซินออกมามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุมฟิเอชด้วยวิธีอื่นๆ เช่นการเติมสารละลายต่างลงไปเพื่อควบคุมระดับฟิเอช

Mitsue *et al.* (1999) ศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตคีเฟอแรนโดยทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตคีเฟอแรน *L. kefirifaciens* KF-75 ร่วมกับยีสต์หลายสายพันธุ์ และพบว่า *Torulaspora delbrueckii* IFO1626 ให้อัตราการผลิตคีเฟอแรนสูงถึง 3740 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเพียงสายพันธุ์เดียวในการผลิต (2380 มิลลิกรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเดียวกันแบบไร้อากาศ

Cheirsilp *et al.* (2003a) ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตคีเฟอแรน *Lactobacillus kefirifaciens* ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* IFO0216 ซึ่งคัดแยกได้จากกีเฟอร์เกรนและสามารถใช้กรดแลคติกในการเจริญเพื่อผลิตคีเฟอแรน ผลการศึกษาพบว่าอัตราการผลิตคีเฟอแรนในสภาวะไร้อากาศโดยเชื้อทั้งสองเท่ากับ 36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตของเชื้อบริสุทธิ์ (24 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และอัตราการผลิตคีเฟอแรนในสภาวะที่มีอากาศ เชื้อทั้งสองสามารถเจริญร่วมกันได้ดีและสามารถผลิตคีเฟอแรนได้สูงสุดถึง 44 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต่อมา Cheirsilp *et al.*, (2003b) สรุปความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างเชื้อ *L. kefirifaciens* และ *S. cerevisiae* ในการเพาะเลี้ยงแบบผสมที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเชื้อผสมได้ผลผลิตคีเฟอแรนสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้ระหว่างเชื้อ *L. kefiranofaciens* และ *S. cerevisiae* ในการเพาะเลี้ยงแบบผสม (1) *S. cerevisiae* ช่วยกำจัดกรดแลคติกในระหว่างการหมัก (2) *S. cerevisiae* ผลิตเอนไซม์อะมิลเลสที่ช่วยกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (3) *S. cerevisiae* ผลิตสารกระตุ้นการเจริญของ *L. kefiranofaciens* (4) *S. cerevisiae* มีปฏิสัมพันธ์ในทางกายภาพที่ช่วยกระตุ้นการผลิตคีเฟอร์

ที่มา: Cheirsilp *et al.* (2003b)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกและผลิตภัณฑ์

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งมีความต้องการสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ (complex medium) แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิด ซึ่งความต้องการสารอาหารเหล่านี้จะแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ (นภา, 2535) โดยทั่วไปแล้วสูตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติก ประกอบด้วยด้วยสูตรอาหารพื้นฐานที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ โดยสิ่งสำคัญในการพิจารณาเลือกใช้สูตรอาหารใดก็ตาม สิ่งที่ต้องพิจารณาอันดับแรก คือ ราคา ปริมาณของแหล่งอาหารนั้นๆ สามารถผลิตเซลล์ได้ในปริมาณสูง ผลกระทบต่อวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงอัตราเร็วในการเกิดผลผลิตและมีสารที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นน้อยที่สุด

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติก

Carbon source	Nitrogen source	Vitamin and Minerals	Antioxidant	Neutralizers
Lactose	Milk protein	Yeast extract	Ascorbic acid	Carbonate
Maltose	Whey protein		FeSO ₄	Phosphate
Sucrose	Corn Steep			Hydroxide
Glucose				

ที่มา: สุพรรณิการ์ (2544)

Chan *et al.* (2002) หาค่าที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดย *Lactococcus lactis* ซึ่งจะคัดเลือกองค์ประกอบ 6 ชนิดในอาหาร CM medium คือ sucrose, soy peptone, yeast extract, KH₂PO₄, NaCl และ MgSO₄·7H₂O โดย sucrose, soy peptone, yeast extract, และ KH₂PO₄ มีผลต่อการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามเฉพาะ soy peptone และ KH₂PO₄ เท่านั้นที่แสดงให้เห็นว่ามีผลบวกและผลลบต่อการสร้างแบคทีเรียโอซินตามลำดับ CM medium จะมีประโยชน์ต่อการเจริญของเซลล์มากกว่าการผลิตแบคทีเรียโอซิน นอกจากนี้ยังพบว่า peptone ช่วยในการเจริญของเซลล์มากกว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินเมื่อเติมสารนี้ใน CM medium

Heenan *et al.* (2002) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* spp. และ *Bifidobacterium lactis* โดยใช้อาหาร MRS, RCM, SYP1 ซึ่งประกอบด้วย soy peptone, glucose monohydrate และ yeast extract อย่างละ 10 กรัมต่อลิตร, SPY2 ซึ่งประกอบด้วย soy peptone, glucose monohydrate และ yeast extract อย่างละ 25 กรัมต่อลิตร, SPY3 ประกอบด้วย soy peptone 25 กรัมต่อลิตร

glucose monohydrate 50 กรัมต่อลิตร yeast extract 25 กรัมต่อลิตร, SPY4 เหมือนกับสูตร SPY2 แต่เติม KH_2PO_4 15.1 กรัมต่อลิตร และ Na_2HPO_4 3.4 กรัมต่อลิตร, SPY5 เหมือนกับสูตร SPY2 แต่เติม อินูลิน 25 กรัมต่อลิตรแทนกลูโคส พบว่า โปรไบโอติกเจริญในอาหารสูตร SPY2, SPY3, SPY4 เท่ากับหรือเจริญได้ดีกว่าใน MRS โดยเฉพาะในสูตร SPY2 จะเจริญได้ดีที่สุด ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SPY3 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสมาก และ SPY4 ที่เติมบัพเฟอร์จะไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์

Avonts *et al.* (2004) ศึกษาการเจริญ กระบวนการเมแทบอลิซึม การผลิตแบคทีเรียโอซินจาก *Lactobacillus* 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. acidophilus* ACC, *L. acidophilus* IBB801, *L. casei* Imunitas, *L. casei* YII9029, *L. gasseri* K7, *L. johnsonii* La1 และ *L. rhamnosus* GG โดยทำการหมักในอาหาร MRS broth และ milk medium ที่มีค่าพีเอชคงที่ 6.5 ผลการศึกษาพบว่าในอาหาร MRS broth *L. casei* complex strains (*L. casei* Imunitas และ *L. casei* YII9029) มีการเจริญและผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากกว่า *L. acidophilus* complex strains (*L. acidophilus* ACC และ *L. acidophilus* IBB801) สำหรับ *L. johnsonii* La1 และ *L. gasseri* K7 จะเจริญได้ใน milk medium เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ใน milk medium จะทำให้การเจริญของเชื้อทั้งสองและการสร้างแบคทีเรียโอซินของทุกสายพันธุ์ดีขึ้น การผลิตแบคทีเรียโอซินของ *L. acidophilus* IBB801, *L. johnsonii* La1 และ *L. gasseri* K7 จะดีขึ้นเมื่อเติมสารสกัดยีสต์ลงใน milk medium และจากการทดลองพบว่า *L. acidophilus* IBB801 เป็นสายพันธุ์ที่มาจากนมจึงเจริญได้ดีที่สุด ($10.5 \log \text{CFU/ml}$) และผลิตแบคทีเรียโอซินได้ 3200 AU/ml

Lee (2005) เปรียบเทียบความสามารถในการหมักกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacilli* แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมโดยใช้การหมักแบบครั้งคราว (batch fermentation) ใช้แบคทีเรียกรดแลคติก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 12315), *L. casei* (NRRL-B1445), *L. delbrueckii* (NRRL-B445), *L. helveticus* (NRRL-B1937) และ *L. casei* (NRRL-B1922) โดยใช้อาหาร MRS broth ศึกษาพารามิเตอร์หลัก คือ การเจริญของเซลล์ การใช้น้ำตาลกลูโคส การสังเคราะห์กรดแลคติก การผลิตกรดอะมิโนอิสระ จากผลการศึกษาพบว่า B1445 มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้ดี จากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในน้ำแช่ข้าวโพดโดยใช้ B1445 และ *Lactobacillus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลศึกษาพบว่า แม้ว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนใน mixed culture จะต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว แต่ความหนาแน่นของเซลล์ การผลิต

กรดแลกติกใน mixed culture ให้ผลดีกว่าเชื้อเดี่ยวๆ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า mixed culture ของ lactobacilli ให้ผลการผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าเชื้อแบบเดี่ยว

4.1.1 แหล่งคาร์บอน

สารประกอบคาร์บอน จัดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ความต้องการคาร์บอนของจุลินทรีย์จะอยู่ในรูปต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์กลุ่มที่สังเคราะห์อาหารเองได้ (autotroph) จะใช้กระบวนการสังเคราะห์แสงโดยการนำเอาคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ ส่วนกลุ่มที่สังเคราะห์เองไม่ได้ (heterotroph) จะได้คาร์บอนจากสารอินทรีย์ ในจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนอย่างเต็มที่พบว่า ต้องการคาร์บอนในการเจริญประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งนำมาใช้เป็น 2 ส่วน คือ 50 เปอร์เซ็นต์ แรกนำมาใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบของเซลล์และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงาน ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน ต้องการคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น โดยทั่วไปกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการเจริญของจุลินทรีย์ (อมรศรี, 2547) แหล่งคาร์บอนที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ คือ ซูโครสและกลูโคส รวมทั้งวัตถุดิบที่มีน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาล sulphite liquor และของเสียจากอุตสาหกรรม เช่น เวีย ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น แลคโตส ซูโครส มอลโตส และเวีย (สุพรรณิการ, 2544)

Yokoi and Watanabe (1992) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* sp. KPB- 67B สำหรับผลิตลิเฟอแรน ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลแลคโตส ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและผลิตลิเฟอแรน

Cheirsilp *et al.* (2001) ศึกษารูปแบบที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L.kefiranofaciens* เพื่อผลิตน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ลิเฟอแรน โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ และอัตราการใช้น้ำตาลแลคโตสจำเพาะของเซลล์ พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสมากกว่า 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ค่าการเจริญจำเพาะของเซลล์ลดลง สำหรับอัตราการใช้น้ำตาลแลคโตสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเกิน 60 กรัมต่อลิตร

Carina *et al.* (2001) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างแบคทีเรียโอซิน เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก โดยใช้เชื้อ *Ent. faecium* ที่แยกได้จากกระเพาะพัก (crop) ของไก่ พบว่า *Ent. faecium* สามารถผลิตสารยับยั้งภายใต้สภาวะที่กำหนดและเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี complex carbohydrate และสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคของไก่ได้ เช่น *Ent. hirae*, *Salmonella Pullorum* และ *Listeria monocytogenes*

4.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์ โดยน้ำหนักแห้งของเซลล์ 100 กรัม มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 10-14 กรัม ซึ่งอยู่ในรูปของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ทั่วไปมี 2 แบบ คือ อนินทรีย์และอินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ในโตรเจน เช่น แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น แหล่งอินทรีย์ในโตรเจน เช่น ยีสต์สกัด เปปโตน เป็นต้น (อมรศรี, 2547) การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนนั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดไหนได้ดี โดยพิจารณาควบคู่กับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย (สมใจ, 2547) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้กันมาก ได้แก่ ยีสต์สกัด โปรตีนนม น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เป็นต้น ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มาก เนื่องจากยีสต์เป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ อีกด้วย แต่การนำยีสต์สกัดมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในระดับอุตสาหกรรมไม่เหมาะสมเนื่องจากราคาแพง (สุพรรณิการ์, 2544)

4.1.3 แหล่งวิตามิน

วิตามินเป็นสารประกอบที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณน้อย แต่มีความสำคัญในการดำรงชีวิตและการเจริญ โดยวิตามินทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ ถ้าขาดวิตามินจะทำให้เกิดความผิดปกติต่างๆ (นงลักษณ์และปรีชา, 2539) เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนหรือวิตามินบางอย่างเองได้ จึงต้องมีการเติมลงไปเพื่อเพิ่มผลผลิตที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิตามินและกรดอะมิโนที่เติม เช่น ไลซีน เมไทโอนีน วิตามินบีรวม กรดโฟลิกและไบโอติน เป็นต้น

4.1.4 แหล่งเกลือแร่

จุลินทรีย์บางชนิดต้องการเกลือแร่ในปริมาณเล็กน้อย แต่ถ้าในอาหารนั้นไม่มีเกลือแร่จะเกิดผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์ได้เป็นอย่างมาก เพราะเกลือแร่บางชนิดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีและเป็นส่วนประกอบของตัวเซลล์และเอนไซม์ เกลือแร่ที่จำเป็นมากที่จะต้องมียู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ฟอสเฟต และแมกนีเซียม เพราะเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายพลังงานในจุลินทรีย์ โดยทั่วไปอินทรีย์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.3-300 มิลลิโมล เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (สายใจ, 2542)

4.2 พีเอช

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีพีเอชค่อนข้างกว้าง คือ 4.0 - 7.5 แต่พีเอชที่เหมาะสมโดยทั่วไปจะอยู่ในช่วงประมาณ 6.0-6.5 และเนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติก ทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จึงต้องมีการควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม (นภา, 2535) ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตขึ้นจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของเซลล์ กรดอินทรีย์เมื่อเข้าสู่เซลล์ ทำให้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เกิดสภาวะที่เป็นกรด กลไกแรกในการรักษาสมดุลพีเอชของจุลินทรีย์ คือ การขับโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึมโดย H^+ - ATPase ต้องใช้ ATP ในการเกิดปฏิกิริยา การที่มีกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณสูง เป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาสมดุลของพีเอชภายในเซลล์ ในขณะที่การขนส่งอาหารเข้าสู่เซลล์ถูกยับยั้ง เนื่องจากกรดอินทรีย์ทำให้ระบบการเคลื่อนที่ของโปรตอนล้มเหลว การควบคุมค่าพีเอชจะช่วยลดความเสียหายของเซลล์ ที่เกิดจากค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0 (สุพรรณิการ์, 2544)

Peebles *et al.* (1969) ทำการศึกษา *Streptococcus cremoris* ในอาหารที่ประกอบด้วย ทริปโตน 2 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลแลคโตส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าพีเอชของอาหารที่ 5.5, 6.0 หรือ 6.5 เมื่อใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับพีเอชของอาหารพบว่า ให้ผลดีต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าซึ่งมากกว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์

Yokoi and Watanabe (1992) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* เพื่อผลิตน้ำตาลโมเลกุลใหญ่คือเฟอราน พบว่า เมื่อเซลล์มีการเจริญ ค่าพีเอชของน้ำหมักจะลดลง เนื่องจากเซลล์มีการผลิตกรดแลกติกออกมาสะสมในน้ำหมัก ถ้าปล่อยให้หมักดำเนินต่อไปกรดแลกติกที่เพิ่มมากขึ้นจะยับยั้งการเจริญและการผลิตฟีเฟอรานของแบคทีเรียกรดแลกติกเอง

Cheirsilp *et al.* (2001) ศึกษาผลของพีเอชต่ออัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตฟีเฟอรานจำเพาะของเชื้อ *L. kefiranofaciens* โดยควบคุมพีเอชของสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 4.0, 4.5, 5, 5.5, 6.0 จากผลการทดลองพบว่า ที่พีเอช 4.0 จะให้อัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะต่ำสุด โดยที่พีเอช 5.0 จะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และที่พีเอช 4.5 จะให้อัตราการผลิตจำเพาะสูงสุด

4.3 ออกซิเจน

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มไมโครแอโรไฟล์ (microaerophile) ซึ่งจะเมตาบอลิซึมสารอาหารด้วยกระบวนการเฟอร์เมนเตชันในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจึงไม่ต้องพ่นอากาศ แต่เพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงจำเป็นต้องมีการกวนทำให้อากาศละลายในอาหารได้ดีและทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ในสภาวะเช่นนี้เชื้อจะเจริญช้าลง ซึ่งการแก้ปัญหาอาจทำได้โดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสหรือสารรีดิวส์อื่นๆ เช่น ไพรูเวตหรือเฟอร์รัสซัลเฟต นอกจากการเติมสารต่างๆ ดังกล่าวแล้ว การพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปจนถึงเลี้ยงเชื้อ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยกำจัดปัญหาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (นภา, 2535) การควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการเพาะเลี้ยงอาจทำได้โดยเติมก๊าซไนโตรเจนในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ หรืออาจใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการหมัก สามารถลดพิษที่เกิดจากออกซิเจน และยังช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ในบางสายพันธุ์ (Oner and Erickson, 1986)

Cheirsilp *et al.* (2003a) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. kefiranofaciens* ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตฟีเฟอรานได้ ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง MRSL เพื่อผลิตฟีเฟอรานทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบว่าอัตราการผลิตฟีเฟอรานในสภาวะไร้อากาศโดยเชื้อทั้งสองเท่ากับ 36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตของเชื้อบริสุทธิ์ (24 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และอัตราการ

ผลิตคีเฟอร์ในสภาวะที่มีอากาศ เชื้อทั้งสองตัวจะสามารถเจริญร่วมกันได้ดีและสามารถผลิตคีเฟอร์ได้สูงสุดถึง 44 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคีเฟอร์ และพ่นก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจนเข้าสู่ถังหมัก เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศ โดยใช้เชื้อ *L. kefiranofaciens* ผลการศึกษาพบว่า ผลของก๊าซทั้ง 2 ชนิดต่อการผลิตคีเฟอร์ไม่แตกต่างกันและการให้อากาศจะทำให้การเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ทำให้ปริมาณคีเฟอร์ที่ผลิตได้ลดลง

4.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับแบคทีเรียกรดแลกติก อุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก

สกุล	อุณหภูมิ (°C)
<i>Lactobacillus</i> spp.	
thermobacterium	37 - 45
streptobacterium	28 - 32
betabacterium	28 - 40
<i>Pediococcus</i> spp.	25 - 33
<i>Streptococcus</i> spp.	29 - 37
<i>Leuconostoc</i> spp.	20 - 25

ที่มา: นภา (2535)

Cogan *et al.* (1971) ทดลองหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก Streptococci 3 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus lactis* C6, C10 และ *S. cremoris* พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous) จะต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า 27 องศาเซลเซียส

Yokoi and Watanabe (1992) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตคีเฟอร์แรนของเชื้อ *L. kefiranofaciens* ในอาหาร MRS broth ที่เติมน้ำตาลแลคโตสแทนกลูโคส (MRSL) ที่พีเอช 5.0 โดยนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสามารถผลิตคีเฟอร์แรนได้สูงสุด โดยความสามารถในการผลิตคีเฟอร์แรนลดลงเหลือ 87 และ 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

5. กระบวนการหมัก

เทคโนโลยีการหมักเป็นกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการใช้เซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์จุลินทรีย์ เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ หรือการใช้ส่วนประกอบของเซลล์ เช่น เอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ Scragg (1988) แบ่งประเภทของการหมักเป็น 3 รูปแบบ คือ

5.1 การหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch fermentation) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบปิด คือมีการเติมวัตถุดิบ สารอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลงเป็นศูนย์เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อหมดลงหรือเมื่อมีการสะสมของเสียที่เป็นพิษเกิดขึ้นหรือทั้งสองสาเหตุ ด้วยเหตุนี้กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระบบนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา การหมักแบบเบ็ดเสร็จมีข้อเสียเปรียบกว่าการหมักแบบต่อเนื่องเนื่องจากจุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งเกิดจากการใช้สารอาหารในถังหมักและการสะสมของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนี้การเจริญแบบ exponential phase ไม่สามารถควบคุมให้เกิดขึ้นได้ตลอดไป ซึ่งต่างจากการหมักแบบต่อเนื่องที่มีวิธีการหลายวิธีในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง และมีประโยชน์ต้องงานวิจัยและอุตสาหกรรม

5.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบระบบเปิด เนื่องจากการไหลเข้าออกของสารอาหารภายในถังหมักตลอดเวลา การหมักแบบนี้มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เดียวกันมีการแยกเอาอาหารเหลวซึ่งมีผลิตภัณฑ์ละลายอยู่ออกมาตลอดเวลา โดยมีการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารเข้าและการนำอาหารเหลวออกจากถังหมักให้เท่ากัน

5.2.1 ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง คือ

ก. ถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็กกว่าถังหมักที่ใช้แบบเบ็ดเสร็จ นอกจากนี้การใช้งานอย่างต่อเนื่องช่วยลดเวลาในการทำความสะดวกอุปกรณ์และค่าใช้จ่าย

ข. การเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในอัตราที่คงที่ในสภาพแวดล้อมที่คงที่ และการหมักแบบนี้สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้สะดวก เช่น การควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณออกซิเจน ให้อยู่ในระดับที่ต้องการได้

ค. ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องบางชนิด อัตราการเจริญของจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงและควบคุมได้ ซึ่งมีผลต่อการศึกษาด้านอิทธิพลของอัตราการเจริญที่มีต่อขนาดและองค์ประกอบของเซลล์

5.2.2 ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง คือ ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการหมักแบบนี้จะนานกว่าการหมักแบบเบ็ดเสร็จ จึงมีโอกาที่จะเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้มากกว่า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมกระบวนการหมักให้ปลอดเชื้อมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอากาศที่เข้าถังหมักจะต้องปราศจากเชื้อ นอกจากนี้อาจเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการหมักเป็นระยะเวลานานๆ อีกด้วย

5.3 การหมักแบบครั้งคราว (fed-batch fermentation) การหมักแบบนี้ดัดแปลงมาจากการหมักแบบเบ็ดเสร็จเป็นการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปจนถึงหมักเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมัก การหมักแบบนี้ยังคงเป็นระบบปิดเช่นเดียวกับการหมักแบบเบ็ดเสร็จ เนื่องจากไม่มีการไหลออกของอาหารอย่างต่อเนื่อง ผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบนี้จะดีกว่าการหมักแบบเบ็ดเสร็จ

5.3.1 ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบครั้งคราว คือ

ก. สารอาหาร Limiting substrate จะมีเชื้อจุลินทรีย์ใช้ตลอดระยะเวลาของการหมักในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่

ข. ไม่มี by-product ที่เกิดจากการเติมอาหารหรือมี Limiting substrate เหลือค้าง
อยู่มาก

ค. ทำให้ประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดเกิดประโยชน์สูงสุด

ง. ช่วยป้องกัน catabolite repression เนื่องจากสามารถเติมสารอาหารในปริมาณ
น้อยอย่างต่อเนื่อง ทำให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารได้

จ. ช่วยให้การหมักทำได้นานขึ้น ได้ปริมาณเซลล์มากขึ้น

ฉ. ช่วยป้องกันการระเหยของน้ำขณะหมัก

ช. ลดความหนืดในอาหารเหลว

ซ. ช่วยเพิ่มความคงตัวของพลาสมิด (plasmid) ที่มี antibiotic marker โดยการ
ควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักให้มีสารปฏิชีวนะชนิดนั้นตลอดเวลา

ณ. ไม่ต้องเพิ่มอุปกรณ์หรือเครื่องมือในการหมักมากมาย สามารถใช้อุปกรณ์ของ
การหมักแบบเบ็ดเสร็จก็เกือบเพียงพอแล้ว

5.3.2 ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว คือ ต้องมีการศึกษาธรรมชาติของเชื้อ
นั้นอย่างดี เช่น ต้องการสารอาหารชนิดไหน ปริมาณเท่าไร หรือสิ่งแวดล้อมอื่นๆ นอกจากนี้ยัง
ต้องการผู้ทดลองที่มีความชำนาญและความสามารถในการหมัก หรือปรับปรุงกระบวนการหมัก
(ปทุมพร, 2548)

Oner and Erickson (1986) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และ
S. thermophilus ในนมผงพร่องมันเนย 3% โดยใช้วิธีการหมักแบบครั้งคราวทำให้อัตราการผลิต
กรดแลคติกและชีวมวลเพิ่มขึ้น

Paik and Glatz (1997) ทำการศึกษาการหมักเชื้อ *Propionibacterium theoenii* P127 โดยใช้วิธีการหมักแบบครั้งคราว โดยทำการเติมโซเดียมแลคเตตในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มและเติมทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่งสิ้นสุดเวลาการหมัก ผลการศึกษาพบว่า *P. theoenii* P127 ที่เพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว มีจำนวนเซลล์ 2.1×10^9 CFU/ml ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบเบ็ดเสร็จ ซึ่งมี 3.7×10^8 CFU/ml สำหรับการผลิตแบคเทอรีโอซิน พบว่า การหมักแบบครั้งคราวจะมีมากกว่าการหมักแบบเบ็ดเสร็จ คือมี 8.0 และ 184 AU/ml ตามลำดับ

Desmons *et al.* (2001) เปรียบเทียบการผลิตชีวมวลของ *Lactobacillus brevis* โดยวิธีการหมักแบบต่อเนื่องและแบบครั้งคราว ผลการศึกษาพบว่าอัตราการผลิตเซลล์ใน corn steep liquor (CSL) broth โดยวิธีการหมักแบบครั้งคราว มีค่า 2.8×10^{10} CFU/ml ขณะที่การหมักแบบต่อเนื่องมีค่า 1.5×10^{10} CFU/ml นอกจากนี้ยังพบว่า การหมักแบบครั้งคราวในอาหาร MRS broth จะมีความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายมากกว่าการหมักแบบครั้งคราวใน CSL broth (8.2×10^{10} CFU/ml กับ 2.8×10^{10} CFU/ml ตามลำดับ)

Cheirsilp *et al.* (2003a) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. kefiranoferiens* ที่สามารถผลิตคีเฟอเรนได้ ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง MRSL โดยเพาะเลี้ยงเชื้อผสมด้วยการหมักแบบครั้งคราวที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า ได้ความเข้มข้นของคีเฟอเรนสุดท้ายเท่ากับ 5.41 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมัก 87 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 62 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ *Lactobacillus plantarum* IG-3 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก แยกได้จากนมและลำไส้ของไก่ตามลำดับ โดยคุณวราภรณ์ หิรัญวงษ์ เก็บรักษาอยู่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหาร MRS broth ที่เติมกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดย ผศ.ดร.ปทุมพร นิมนเอนก

1.2 แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Sal.* Typhi, *Sal.* Enteritidis SOO3 และ *Escherichia coli* ATCC 8739 สำหรับ *Sal.* Enteritidis SOO3 และ *Sal.* Typhi ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตามลำดับ

1.3 เชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แลคเตตในการเจริญ

คัดเลือกจากผักดอง ผลไม้ดอง ผลไม้และคีเฟอร์

2. ตัวอย่างอาหารหมักดองผลไม้และคีเฟอร์

ตัวอย่างอาหารหมักดองผลไม้และคีเฟอร์ ที่ใช้ในการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้แลคเตตในการเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตัวอย่างอาหารหมักดอง ผลไม้และคีเฟอร์ ที่ใช้ในการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มี
ความสามารถในการใช้แลกเตต

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา
ผักกาดดอง	ตลาดสดทำนายนนทบุรี
ผักกาดดอง	ตลาดสดทำนายนนทบุรี
กะหล่ำปลีดอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ
กะหล่ำปลีดอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ
กะหล่ำปลีดอง	ตลาดสะพาน 3
กะหล่ำปลีดอง	ตลาดสะพาน 3
กะหล่ำปลีดอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ
กะหล่ำปลีดอง	ตลาดบ้านใหม่
กะหล่ำปลีดอง	ตลาดบ้านใหม่
กะหล่ำปลีดอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ
กะหล่ำปลีดอง	ตลาดสะพาน 3
ผักเสี้ยนดอง	ตลาดอมรพันธุ์
ผักดองรวม	ตลาดอมรพันธุ์
ผักดองรวม	ตลาดอมรพันธุ์
ผักดองรวม	ตลาดอมรพันธุ์
แตงโม	ตลาดรุ่งเรือง สาธุประดิษฐ์
ส้ม	ตลาดรุ่งเรือง สาธุประดิษฐ์
ส้ม	ตลาดรุ่งเรือง สาธุประดิษฐ์
ผักกาดดอง	ตลาดในเขตภาษีเจริญ
ผักกาดดอง	ตลาดในเขตภาษีเจริญ
มะม่วงดอง	ตลาดสดทำนายนนทบุรี
คีเฟอร์	แหล่งจำหน่ายในจังหวัดนครราชสีมา

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

4. สารเคมีทั่วไป

- 4.1 Di-potassium hydrogen phosphate (Merck)
- 4.2 Potassium dihydrogen phosphate (Merck)
- 4.3 Tween 80 (บริษัท lab centre 1992 จำกัด)
- 4.4 Magnesium sulfate (Merck)
- 4.5 Manganese phosphate (SPS Finechem)
- 4.6 Ammonium citrate (Merck)
- 4.7 Sodium acetate (AJAX Finechem)
- 4.8 Sodium chloride (AJAX Finechem)
- 4.9 Potassium chloride (AJAX Finechem)
- 4.10 Di-sodium hydrogen phosphate (AJAX Finechem)
- 4.11 Yeast extract (Bio Basic)
- 4.12 Peptone (Merck)
- 4.13 Beef extract (Merck)
- 4.14 D-glucose (Merck)
- 4.15 Lactose (Merck)
- 4.16 Maltose (Merck)
- 4.17 D-Sucrose (Fisher Scientific)
- 4.18 Ox bile (Merck)
- 4.19 Anaerocult (Merck)
- 4.20 Microbiology Anaerotest (Merck)
- 4.21 Sodium lactate (Merck)
- 4.22 Lactic acid (Sigma)
- 4.23 Ammonium sulfate (Merck)
- 4.24 Sulfuric acid (CARLO ERBA reagent)
- 4.25 Sodium hydroxide (AJAX Finechem)
- 4.26 Brom cresol purple (CARLO ERBA reagent)
- 4.27 Calcium carbonate (Scharlau)
- 4.28 API ID 32 C Test kit (bioMerieux, France)

5. เครื่องมือ

- 5.1 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (ACCULAB)
- 5.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Issco laminar flow)
- 5.3 เครื่องผสมสาร (Vortex-2 Genie)
- 5.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (SANYO)
- 5.5 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert)
- 5.6 เครื่องเขย่า (Gallen kamp)
- 5.7 เครื่องเซนตริฟิวส์ (Labnet และ Sigma-202-M- Cen)
- 5.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Consort C830)
- 5.9 เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง (RAY LEIGH)
- 5.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert)
- 5.11 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- 5.12 เตาไมโครเวฟ (SAMSUNG)
- 5.13 ไมโครปิเปต (SOCOREX)
- 5.14 ตู้อบลมร้อน (Memmert)
- 5.15 โถไร้อากาศ (Merck)

วิธีการ

1. การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้กรดแลกติก (แลคเตต)

1.1 การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แลคเตตจากอาหารหมักดอง ผลไม้และกีเฟอร์

1.1.1 นำตัวอย่างผักดอง ผลไม้ดอง ผลไม้ และกีเฟอร์ที่ซื้อมาจากตลาดต่างๆ รวมถึงกะหล่ำปลีดองที่ทำการหมักเองในห้องปฏิบัติการมาทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แลคเตตในการเจริญ โดยนำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการ enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อยีสต์ในตัวอย่างด้วยอาหาร Lactate Ammonium sulfate broth (LAC broth) ที่ปรับพีเอชให้เป็น 4.5 ด้วยกรดแลกติก (ภาคผนวก ก) ซึ่งดัดแปลงมาจากอาหารเหลวชนิด B ของ Shimizu *et al.* (1999) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าบน rotary shaker เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.1.2 นำตัวอย่างจากข้อ 1.1.1 มาทำการ Cross-streak ลงในจานอาหาร LAC agar พีเอช 4.5 ที่เติมสียบรอม ครีซอล เพอร์เพิล (brom cresol purple) 0.004 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบความสามารถในการใช้แลคเตตของเชื้อยีสต์ คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารรอบๆ โคโลนีจากสีเหลืองเป็นสีม่วงได้ โดยเปรียบเทียบกับจานอาหารควบคุม

1.1.3 ทำซ้ำตามข้อ 1.1.2 เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

1.1.4 เก็บเชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LAC ผิวยืด (slant agar) และเก็บรักษา stock culture ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหาร LAC broth ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

1.1.5 การเตรียม preculture ของยีสต์

ถ่ายเชื้อยีสต์จาก stock culture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LAC broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าบน rotary shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.1.6 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter) ของยีสต์

ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LAC broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าบน rotary shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อให้เจือจางความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการใช้แลคเตตในอาหารฟิวเอียง Lactate Ammonium sulfate agar

นำกล้าเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้จากข้อ 1.1.6 มา streak บนอาหารเฉียงเชื้อ LAC ฟิวเอียง (slant agar) ตรวจสอบการเจริญและประสิทธิภาพในการใช้แลคเตตโดยดูการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (indicator) ทุก 2 , 5 และ 7 วัน บันทึกผลการทดลอง ดังต่อไปนี้

- (-) คือ มีการเจริญแต่ไม่เปลี่ยนสีอาหารเฉียงเชื้อ
- (+) คือ มีการเจริญเปลี่ยนสีอาหารเฉียงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีม่วงอ่อน
- (++) คือ มีการเจริญเปลี่ยนสีอาหารเฉียงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีม่วง
- (+++) คือ มีการเจริญเปลี่ยนสีอาหารเฉียงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเข้ม

1.3 การทดสอบปริมาณการให้อากาศต่อการเจริญและการใช้แลกเตคของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

นำ preculture เชื้อยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้แลกเตคดีที่สุด ซึ่งเพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 1.1.6 จำนวน 2 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหาร LAC broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ทั้งแบบที่นำไปเขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ตั้งไว้โดยไม่เขย่า ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน เพื่อเป็นตัวแทนของการให้อากาศมากและอากาศน้อย ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมงเพื่อตรวจวัดการเจริญของยีสต์ โดยการนับโคโลนีบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ปรับพีเอช 3.5 ซึ่งจะแสดงเป็น CFU/ml และตรวจสอบการใช้กรดแลกติกของยีสต์โดยวัดค่าความเป็นกรดค้างของ culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

1.4 การจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือก (ดัดแปลงจาก Larone, 1993; Barnett *et al.*, 1990; Kurtzman and Fell, 1998)

1.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งโดยสังเกตสี ลักษณะโคโลนีและศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว รวมทั้งสังเกตรูปร่าง การเรียงตัวและการแตกหน่อของยีสต์ โดยนำเชื้อยีสต์มาเจือจางลงบนผิวหน้าอาหาร Yeast extract-Malt extract agar (YM) (ภาคผนวก ก) และถ่ายเชื้อลงอาหาร YM broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4.2 การศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์

ทำการศึกษาการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ลงบนอาหาร Fowell's acetate agar, Gorod kowa agar, 5% malt extract agar และ McClary acetate agar (ภาคผนวก ก) โดยเจือเชื้อบริเวณผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 วัน จากนั้นทำการศึกษารูปร่างและลักษณะการสร้างแอสโคสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 7 วัน

1.4.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

การหมักสารประกอบคาร์บอน นำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อ 1 ลูกปลงในอาหาร fermentation medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 6 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส อยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสีบรอมไทมอลบลู (bromthymol blue) เป็นอินดิเคเตอร์และมีหลอดดักก๊าซ (Durham's tube) อยู่ด้วย บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของบรอมไทมอลบลู จากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลือง เนื่องจากการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน นอกจากความสามารถในการหมักกลูโคสแล้ว ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลอื่นๆ ได้แก่ ซูโครส มอลโตส และ แลคโตส

1.4.4 จัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้

จัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ด้วยชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูปของ API ID 32 C (bioMerieux, France) (ภาคผนวก ข)

2. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการผลิตโปรไบโอติก

2.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในอาหารเหลวดัดแปลง

2.1.1 การเตรียม preculture ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (*Enterococcus faecium* PR-2 หรือ *Lactobacillus plantarum* IG-3) จาก stock culture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ถ่ายเชื้อจากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อให้พิจารณาความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

2.1.3 การเพาะเลี้ยง preculture และกล้าเชื้อของเชื้อยีสต์ ทำตามวิธีในข้อ 1.1.5 และ 1.16

2.1.4 ถ่ายกล้าเชื้อ *Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3 หรือยีสต์ที่ใช้แลคเตค ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีการเติมน้ำตาลมอลโตสหรือแลคโตสหรือซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบความขุ่นของ culture broth แต่ละหลอด

2.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์แบบเชื้อเดี่ยวในอาหาร MRS-sucrose broth

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ถ่าย preculture (ข้อ 2.1.1) ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth ที่เติมน้ำตาลซูโครสแทนกลูโคส (MRS-sucrose; ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อให้พิจารณาความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

2.2.2 การเตรียม preculture และกล้าเชื้อของเชื้อยีสต์ ตามวิธีในข้อ 1.1.5 และ 1.16

2.2.3 การตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีค่า OD เท่ากับ 0.3 จำนวน 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหาร MRS-sucrose broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3, 6, 9, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการเจริญโดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่างของ culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

2.2.4 การตรวจสอบการเจริญของยีสต์

ถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ที่มีค่า OD เท่ากับ 0.3 จำนวน 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหาร MRS-sucrose broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3, 6, 9, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการเจริญโดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหาร PDA (พีเอช 3.5) ซึ่งจะให้เป็น CFU/ml นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่างของ culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. การผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมร่วมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในอาหาร MRS-sucrose broth

3.1 การเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1

ถ่ายกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.3 จำนวน 3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ (ดังตารางที่ 7) ลงในอาหาร MRS-sucrose broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ 7 อัตราส่วนเริ่มต้นระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ที่มีความสามารถใช้แลกเตดในการเจริญเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรไบโอติก

กลุ่มทดลอง	เชื้อจุลินทรีย์	เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนเริ่มต้นของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ (ml/ml)
T 1	<i>Ent. faecium</i> PR-2	3 : 0
T 2	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>Candida krusei</i> MB-1	3 : 1
T 3	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>C. sphaerica</i> KN-1	3 : 1
T 4	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>C. kefir</i> KN-2	3 : 1
T 5	<i>L. plantarum</i> IG-3	3 : 0
T 6	<i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. krusei</i> MB-1	3 : 1
T 7	<i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. sphaerica</i> KN-1	3 : 1
T 8	<i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. kefir</i> KN-2	3 : 1
T 9	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>L. plantarum</i> IG-3	1.5 : 1.5 : 0
T 10	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. krusei</i> MB-1	1.5 : 1.5 : 1
T 11	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. sphaerica</i> KN-1	1.5 : 1.5 : 1
T 12	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. kefir</i> KN-2	1.5 : 1.5 : 1

นำเชื้อ T 1- T 12 ไปเขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการเจริญของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกโดยวิธีการนับโคโลนิบนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และวัดการเจริญของยีสต์บนอาหาร PDA ซึ่งจะเป็นโคโลนีต่อมิลลิเมตร สำหรับจานอาหาร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างของ culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช

3.2 การเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกโดยใช้เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2

ถ่ายกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (*Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3) และยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.3 จำนวน 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ (ดังตารางที่ 8) ลงในอาหาร MRS-sucrose broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ 8 อัตราส่วนเริ่มต้นระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 ที่มีความสามารถใช้สังเกตในการเจริญเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรไบโอติก

กลุ่มทดลอง	เชื้อจุลินทรีย์	เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนเริ่มต้นของกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ (ml/ml)
T 13	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>L. plantarum</i> IG-3	1.5 : 1.5
T 14	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>C. krusei</i> MB-1	3 : 2
T 15	<i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. krusei</i> MB-1	3 : 2
T 16	<i>Ent. faecium</i> PR-2 : <i>L. plantarum</i> IG-3 : <i>C. krusei</i> MB-1	1.5 : 1.5 : 2

นำเชื้อ T13 - T16 ไปเขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 54 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36 และ 54 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญ ตรวจสอบความเป็นกรดต่างของ culture broth ตามวิธีการในข้อ 3.1

4. การทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

4.1 การทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งจากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1

4.1.1 การทดสอบการทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Tsai *et al.*, 2005)

ถ่ายเชื้อโปรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากข้อ 3.1 ทั้ง 12 กลุ่มการทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 2.5 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และ PBS ที่ปรับพีเอช 7.2 (กลุ่มควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อเป็นการจำลองสภาวะกรดในกระเพาะอาหารของไก่ กระทั่ง หลังจากครบกำหนดการบ่มเชื้อ ทำ serial dilution ด้วย PBS (พีเอช 7.2) แล้ววัดค่าการเจริญของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีการนับโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และวัดการเจริญของยีสต์บนอาหาร PDA ซึ่งจะเป็น CFU/ml สำหรับจานอาหาร MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และจานอาหาร PDA (พีเอช 3.5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการทนกรดของโปรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลคติก) และยีสต์ ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่รวมหรือไม่รวมกับยีสต์ โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5 กับจำนวนเซลล์ที่เจริญในกลุ่มควบคุม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การทนกรด ดังนี้

$$\% \text{ การทนกรด} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5}}{\text{จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 7.2}} \times 100$$

4.1.2 การทดสอบการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Tsai *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006)

นำโปรไบโอติกทั้ง 12 กลุ่มการทดลองที่บ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (จากข้อ 4.1.1) มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างด้วย PBS

พีเอช 7.2 ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปบ่มในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทั้งที่เติมและไม่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 18 และ 36 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดการบ่มเชื้อ ทำ serial dilution ด้วย PBS พีเอช 7.2 แล้ววัดค่าการเจริญของโปรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลคติก) และยีสต์เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 ตรวจสอบความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกและยีสต์ โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ที่เติมและไม่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 % (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การทนน้ำดีดังนี้

$$\% \text{ การทนน้ำดี} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile}}{\text{จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile}} \times 100$$

4.1.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารจากโปรไบโอติกที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Bevilacqua *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2005)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis SOO3 และ *Escherichia coli* ATCC 8739 ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเจือจางให้เป็น 10^7 CFU/ml ด้วย PBS พีเอช 7.2 ถ่ายเชื้อดังกล่าวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหาร TSA (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อทิ้งไว้ให้แข็ง จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะหลุม (well) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ของโปรไบโอติก ทั้ง 12 กลุ่มการทดลองที่บ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติมและไม่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 และ 36 ชั่วโมง จากข้อ 4.1.2 ซึ่งผ่านการ centrifuge ที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 100 μ l มาหยดใน well บนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากบริเวณใสๆ (clear zone) รอบๆ well

4.2 การทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งจากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2

4.2.1 การทดสอบการทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทำตามวิธีการในข้อ 4.1.1

4.2.2 การทดสอบการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Tsai *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006)

นำโปรไบโอติกทั้ง 4 กลุ่มการทดลองที่บ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (จากข้อ 4.2.1) มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างด้วย PBS พีเอช 7.2 ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทั้งที่เดิมและไม่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญของโปรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลกติก) และยีสต์ ตรวจสอบความสามารถในการทนน้ำดี เช่นเดียวกับข้อ 4.1.2

4.2.3. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตได้เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 4.1.3

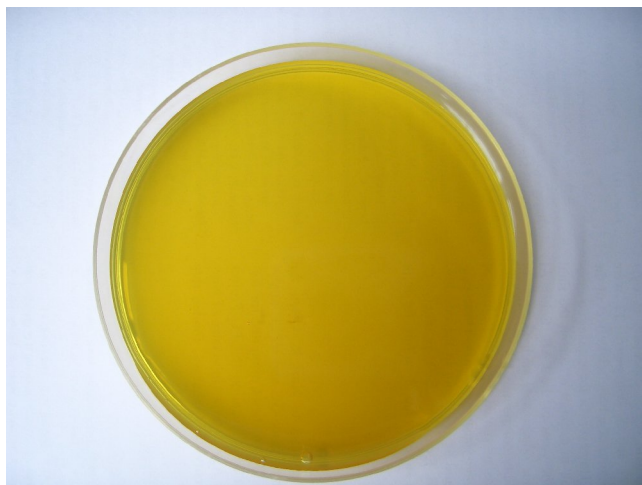
ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้กรดแลกติก (แลคเตต)

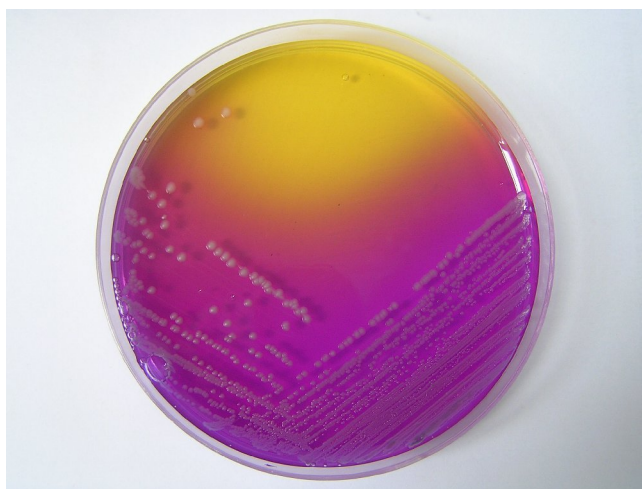
1.1 การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถใช้แลคเตตจากอาหารหมักดอง ผลไม้และกีเฟอร์

ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง ยีสต์ขนมปัง (bakers's yeast) และ โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) จึงมีผู้สนใจค้นคว้ากันอย่างกว้างขวางในทุกๆ ด้าน แต่นอกจากยีสต์จะมีประโยชน์แล้วยังมียีสต์หลายชนิดที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร เช่น ฟิล์มยีสต์ (film yeast) ในสกุล *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida* และ *Trichosporon* ซึ่งเจริญบนผิวหน้าของอาหารที่มีความเป็นกรด เช่น แดงกวาดองและผักกาดดอง ยีสต์เหล่านี้จะออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ทำให้อาหารมีความเป็นกรดลดลง จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทนกรดได้น้อยกว่าจะสามารถเจริญและทำให้เกิดการเน่าเสียต่อไป (สาวิตรี , 2540)

จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง ผลไม้และกีเฟอร์ จำนวน 22 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ 8 แหล่ง เพื่อนำมาคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้แลคเตตโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ Lactate Ammonium sulfate (LAC) ซึ่งดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ชนิด B ของ Shimizu *et al.* (1999) เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการและเติมสี brom cresol purple เพื่อแยกโคโลนียีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการออกจากโคโลนียีสต์อื่นๆ ที่มีการเจริญในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยโคโลนียีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แลคเตตทำให้อาหารรอบๆ โคโลนีมีความเป็นกรดลดลงแล้วเปลี่ยนสี brom cresol purple รอบๆ โคโลนีจากสีเหลืองเป็นสีม่วงดังภาพที่ 8 และ 9



ภาพที่ 8 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ Lactate Ammonium sulfate agar ซึ่งใช้ในการคัดเลือกยีสต์ที่มี
ความสามารถในการใช้แลกเตตในการเจริญและใช้ brom cresol purple เป็นอินดิเคเตอร์



ภาพที่ 9 โคโลนีของเชื้อยีสต์ที่เจริญใน Lactate Ammonium sulfate agar รอบๆโคโลนีของยีสต์ที่
ใช้แลกเตตได้จะเปลี่ยนสี brom cresol purple จากสีเหลืองเป็นสีม่วง

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดังกล่าวไม่เติมเปปโตน(peptone) เนื่องจากพบว่า เปปโตนจัดเป็นสารที่มีความเป็นเบสและเชื้อสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญได้ หากเชื้อมีการใช้เปปโตนจะปล่อยหมู่เบสออกมาทำให้ความเป็นกรดในอาหารลดลงและอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีม่วงอาจทำให้ผลที่ได้เกิดความผิดพลาดจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน นอกจากนี้ยังลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์(yeast extract)ให้ต่ำกว่าสูตรอาหารเดิมเพื่อให้มั่นใจว่ายีสต์สายพันธุ์ที่ทำการคัดเลือกล้วนใช้แลกเตตได้จริง

ผลการคัดแยกเชื้อในตัวอย่างผักดอง ผลไม้ดอง ผลไม้ และกีเฟอร์ จากแหล่งต่างๆ 22 ตัวอย่าง พบเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แลกเตตในการเจริญจำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 68.18 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด และแยกยีสต์ที่ใช้แลกเตตได้ 18 ไอโซเลต โดยแยกมาจากผักกาดดองและกะหล่ำปลีดองอย่างละ 4 ไอโซเลต (MN-1, MN-2, MB-1, MB-2 และ SL-1, SL-2, SL-3, SL-4 ตามลำดับ) ผักเสี้ยนดอง 2 ไอโซเลต (SB-1และSB-2) ผักดองรวม 3 ไอโซเลต (CB-1, CB-2 และ CB-3) แดงโม 1 ไอโซเลต (WB-1) ส้ม 2 ไอโซเลต (OB-1 และ OB-2) และกีเฟอร์ 2 ไอโซเลต (KN-1 และKN-2) โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ตัวอย่างอาหารที่นำมาคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถใช้แลกเตต

ชนิดตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่พบ	รหัสไอโซเลต
ผักกาดคอง	ตลาดสดทำนายนนทบุรี	1	MN-1
ผักกาดคอง	ตลาดสดทำนายนนทบุรี	1	MN-2
กะหล่ำปลีคอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ	1	SL-1
กะหล่ำปลีคอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ	1	SL-2
กะหล่ำปลีคอง	ตลาดสะพาน 3	ND	-
กะหล่ำปลีคอง	ตลาดสะพาน 3	ND	-
กะหล่ำปลีคอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ	1	SL-3
กะหล่ำปลีคอง	ตลาดบ้านใหม่	ND	-
กะหล่ำปลีคอง	ตลาดบ้านใหม่	ND	-
กะหล่ำปลีคอง	ทำการหมักในห้องปฏิบัติการ	1	SL-4
กะหล่ำปลีคอง	ตลาดสะพาน 3	ND	-
ผักเสี้ยนคอง	ตลาดอมรพันธุ์	2	SB-1 , SB-2
ผักคองรวม	ตลาดอมรพันธุ์	1	CB-1
ผักคองรวม	ตลาดอมรพันธุ์	2	CB-2 , CB-3

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่พบ	รหัสไอโซเลต
ผักดองรวม	ตลาดอมรพันธุ์	ND	-
แตงโม	ตลาดรุ่งเรือง สาขุประดิษฐ์	1	WB -1
ส้ม	ตลาดรุ่งเรือง สาขุประดิษฐ์	1	OB-1
ส้ม	ตลาดรุ่งเรือง สาขุประดิษฐ์	1	OB-2
ผักกาดดอง	ตลาดในเขตภาษีเจริญ	1	MB-1
ผักกาดดอง	ตลาดในเขตภาษีเจริญ	1	MB-2
มะม่วงดอง	ตลาดสดทำนุอินทบุรี	ND	-
กีเฟอร์	แหล่งจำหน่ายในจังหวัดนครราชสีมา	2	KN-1 , KN-2
รวม 22 ตัวอย่าง		18 ไอโซเลต	

หมายเหตุ ND = Non Detection

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับดำรงเดชและคณะ (2543) พบยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ แลคเตดในการเจริญ 13 ไอโซเลต จาก 30 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำผักกาดทอง จึงคง ผักกาดทอง กระเทียมดอง หน่อไม้ดองและมะนาวดอง วิลาวัณย์ (2536) รายงานว่า ผักกาดทอง เป็นอาหารที่มีความเป็นกรดและมีความเค็มสูง ดังนั้นจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถเจริญได้ในน้ำผักกาดทอง นอกเหนือจากแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังพบว่า ฟิล์มยีสต์สามารถเติบโตที่ผิวหน้าของน้ำเกลือ และใช้กรดแลคติกที่เกิดขึ้นโดยการออกซิเดชันจึงทำให้ผิวหน้าของผักกาดทองมีลักษณะเป็นฟิล์ม หรือแผ่นบางๆ ซึ่งยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญและทำให้เกิดฝ้าบนผิวหน้าของอาหารได้ แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือในอาหารแต่ละชนิด เช่น *Candida mycoderma* และ *Pichia membranefaciens* ทำให้เกิดฝ้าบนผิวหน้าผักกาดทองที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้ Hang *et al.* (2003) รายงานว่า *Kluyveromyces marxianus* ใช้กรดแลคติกในกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) ได้อย่างรวดเร็วและ Kotzekidou (1997) รายงานว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในการหมักมะกอกดองตามธรรมชาติ เป็น *Torulaspora delbrueckii* , *Debaryomyces hansenii* และ *Cryptococcus laurentii* โดยยีสต์เหล่านี้จะช่วยลดความเข้มข้นของ เกลือและกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพการใช้แลคเตดในอาหารผิวเอียง Lactate Ammonium sulfate agar

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพการใช้แลคเตดในอาหารผิวเอียง LAC agar โดยตรวจสอบประสิทธิภาพในการใช้แลคเตดด้วยการเปรียบเทียบการ เปลี่ยนสีของ brom cresol purple ซึ่งมีช่วงพีเอชของการเปลี่ยนสี คือ 5.2 – 6.8 (สีเหลืองถึงม่วง) โดยทดสอบหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 , 5 และ 7 วันตามลำดับ เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มี ประสิทธิภาพดีที่สุดนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อต่อไป จากผลการทดสอบพบว่า เชื้อยีสต์ ไอโซเลต OB-1, OB-2 , MB-1, KN-1และ KN-2 มีประสิทธิภาพในการใช้แลคเตดในอาหารเอียง เชื้อดีที่สุด ถึงแม้ว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลต OB-1 และ OB-2 ยังไม่มีการใช้แลคเตดในระยะสองวันแรก ของการหมักซึ่งอาจยังอยู่ในช่วงของการปรับตัว แต่หลังจากนั้นในวันที่ 5 และ 7 พบว่ามีการใช้ แลคเตดได้ดีเท่ากับเชื้อยีสต์ไอโซเลต MB-1 , KN-1 และ KN-2 ซึ่งมีความสามารถในการใช้สาร ดังกล่าวได้ภายใน 2 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้แลคเตคของยีสต์ที่คัดเลือกในอาหารผิวเอียง
LAC agar โดยเปรียบเทียบจากการเปลี่ยนสี brom cresol purple

ไอโซเลต	การเจริญของเชื้อยีสต์ (วัน)		
	2	5	7
MN-1	-	+	++
MN-2	-	+	+
SL-1	-	+	++
SL-2	-	+	+
SL - 3	-	+	+
SL-4	-	+	+
SB-1	-	+	+
SB-2	-	+	++
CB-1	-	+	++
CB-2	-	+	+
CB-3	-	+	++
WB-1	-	+	+
OB-1	-	++	+++
OB-2	-	++	+++
MB-1	+++	+++	+++
MB-2	-	+	++
KN-1	+++	+++	+++
KN-2	++	+++	+++

หมายเหตุ (-) คือ มีการเจริญแต่ไม่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ

(+) คือ มีการเจริญเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีม่วงอ่อน

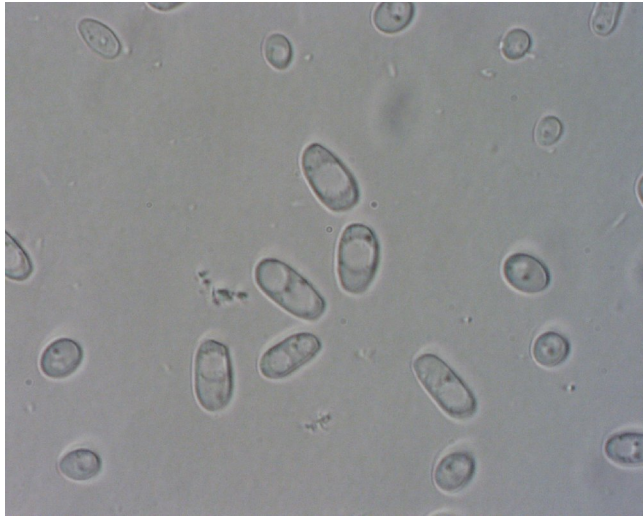
(++) คือ มีการเจริญเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีม่วง

(+++) คือ มีการเจริญเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเข้ม

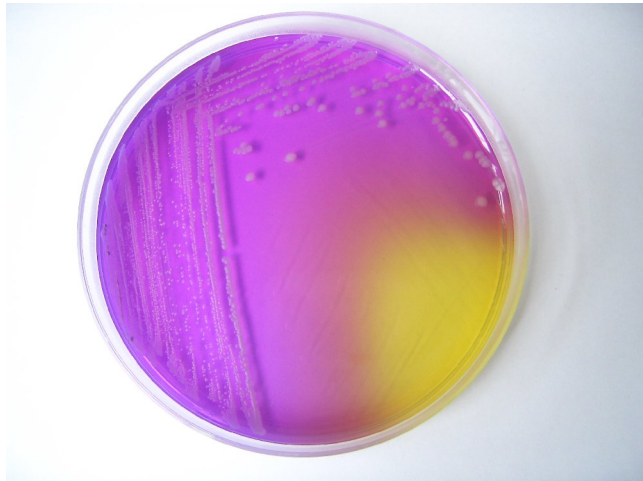
ดังนั้นจากผลการทดลองจึงคัดเลือกยีสต์ 5 ไอโซเลต คือ OB-1, OB-2, MB-1, KN-1 และ KN-2 มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร LAC agar และศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างละเอียด พบว่า โคโลนีของไอโซเลต OB-1 บนอาหารดังกล่าว มีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์อื่นๆและมีการเจริญที่ค่อนข้างช้าทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีม่วงได้ช้า ส่วนไอโซเลต OB-2 พบว่า เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะมีโคโลนีสีขาวคล้ายเชื้อราและเจริญช้า ในขณะที่ไอโซเลต MB-1 เจริญเร็วที่สุดและสังเกตเห็น โคโลนีบนอาหารแข็งได้ชัดเจนเนื่องจากโคโลนีมีลักษณะแผ่กระจาย ขนาดใหญ่ ดังภาพที่ 10 และ 11 ใช้เวลาในการเจริญและเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในเวลา 2 วัน สำหรับยีสต์ไอโซเลต KN-1 ก็เจริญเร็วเช่นกัน โคโลนีมีลักษณะกลมและค่อนข้างนูน ดังภาพที่ 12 และ 13 สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อได้ภายในเวลา 2 วัน ในขณะที่โคโลนีของยีสต์ไอโซเลต KN-2 มีลักษณะกลม นูน มันวาว มีการเจริญเร็วแต่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้อยกว่า MB-1 และ KN-1 เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกันคือ 2 วัน ดังภาพที่ 14 และ 15



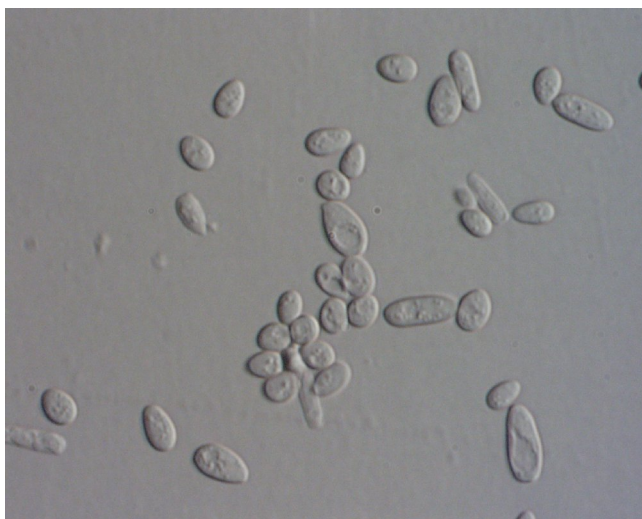
ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ไอโซเลต MB-1 บนอาหาร LAC agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน



ภาพที่ 11 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ MB-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า



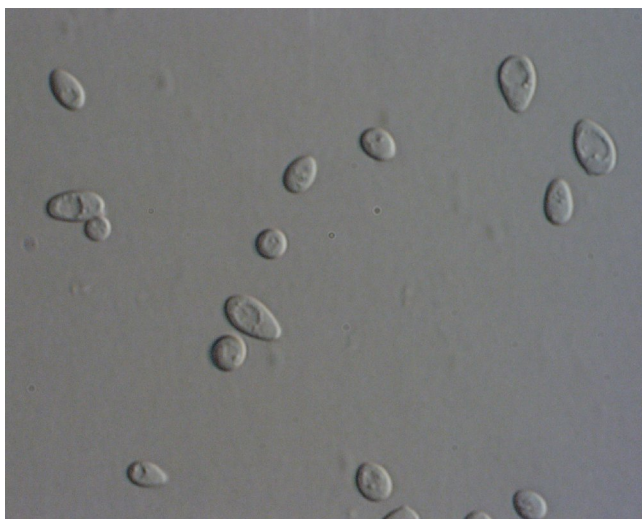
ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ไอโซเลต KN-1 บนอาหาร LAC agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน



ภาพที่ 13 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ KN-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 14 ลักษณะ โคโลนีของยีสต์ไอโซเลต KN-2 บนอาหาร LAC agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

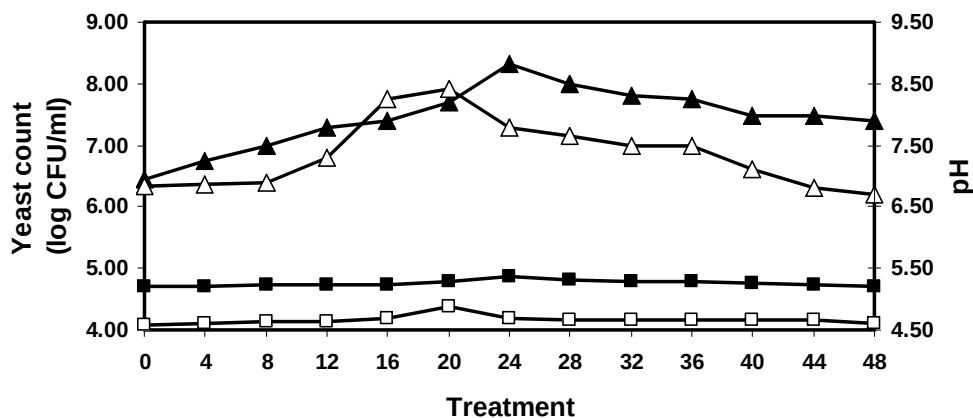


ภาพที่ 15 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ KN-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า

1.3 การทดสอบปริมาณการให้อากาศต่อการเจริญและการใช้แลกเตตของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการแลกเตตในอาหารผิวเอียง LAC agar พบว่า เชื้อยีสต์ไอโซเลต OB-1, OB-2, MB-1, KN-1 และ KN-2 มีประสิทธิภาพในการแลกเตตได้ดี จึงนำเชื้อดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร LAC broth ที่ไม่มีการเติมอินดิเคเตอร์และมีโซเดียมแลกเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบการบ่มแบบเขย่าและไม่เขย่า เพื่อเป็นตัวแทนของการให้อากาศมากและอากาศน้อยตามลำดับ ในการศึกษาการเจริญและใช้แลกเตต ยกเว้นไอโซเลต OB-2 เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้มีลักษณะโคโลนีเป็นเส้นคล้ายเชือก เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่ใช้ในการศึกษา ทำให้ไม่สามารถนับจำนวนได้

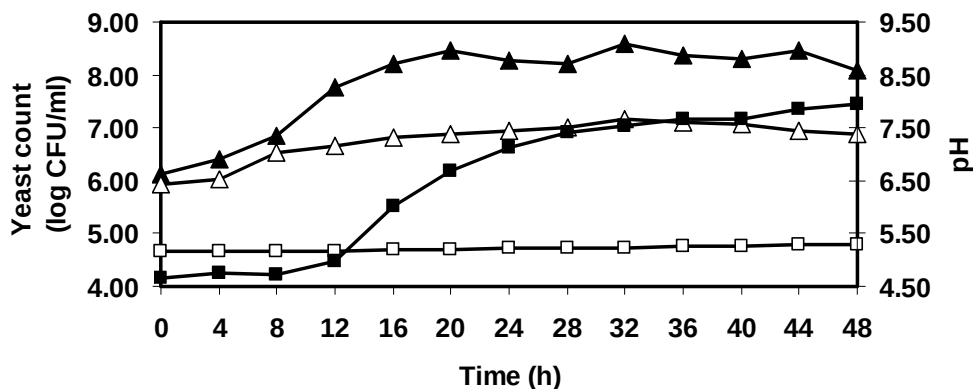
ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลต OB-1 ใน LAC broth โดยการเขย่าให้อากาศ พบว่า OB-1 เพิ่มจำนวนขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังภาพที่ 16 โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ $8.31 \log \text{CFU/ml}$ ในชั่วโมงที่ 24



ภาพที่ 16 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโชนของยีสต์ OB-1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า ในอาหาร LAC broth (แบบเขย่า : viable cell count ▲, pH ■; แบบไม่เขย่า : viable cell count △, pH □)

ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแบบไม่เขย่าพบว่า เชื้อใช้เวลาปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง (lag phase) หลังจากนั้นเชื้อจึงเข้าสู่ระยะ log phase ดังภาพที่ 16 โดยในชั่วโมงที่ 20 มีปริมาณเชื้อสูงสุด คือ 7.90 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักพบว่า มีค่าฟิโชนที่ไม่แตกต่างกันโดยมีค่าเท่ากับ 4.72 และ 4.62 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าและไม่เขย่า ตามลำดับ

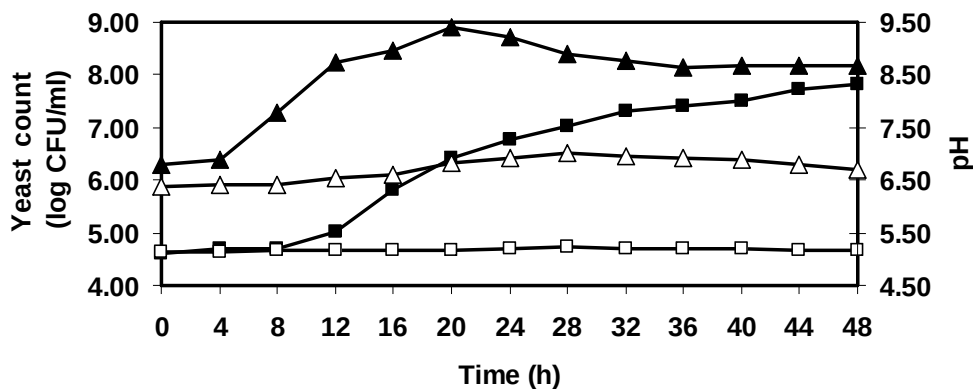
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลต MB-1 ในอาหาร LAC broth แบบเขย่าพบว่า เชื้อยีสต์ไอโซเลต MB-1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 – 16 ดังภาพที่ 17 และเชื้อเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 20 แต่มีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 32 โดยมีเชื้อที่เจริญได้เท่ากับ 8.60 log CFU/ml แต่เมื่อเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าพบว่า เชื้อดังกล่าวใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อการเจริญเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆเจริญและเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างรวดเร็ว ดังภาพที่ 17 โดยมีเชื้อที่เจริญได้สูงสุดเท่ากับ 7.15 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 32 เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงพบว่า ฟิโชนของ culture broth แบบเขย่าเท่ากับ 7.94 ซึ่งสูงกว่าไม่เขย่า (4.79)



ภาพที่ 17 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของยีสต์ MB-1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า ในอาหาร LAC broth (แบบเขย่า: viable cell count ▲ , pH ■; แบบไม่เขย่า: viable cell count △ , pH □)

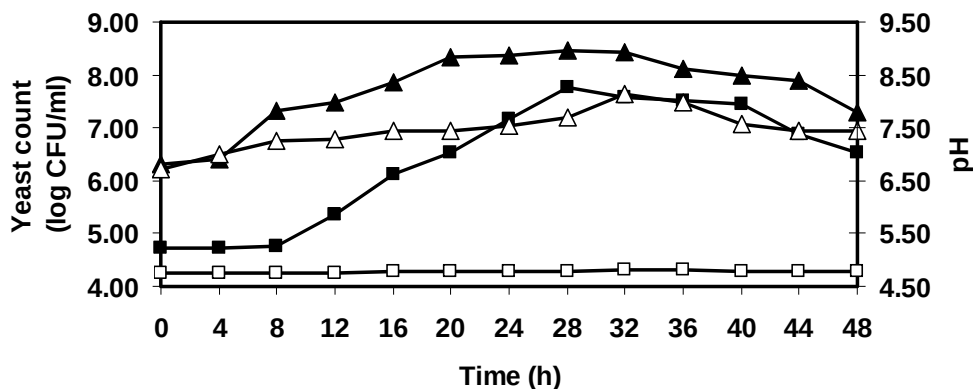
นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลต MB-1 แบบเขย่าทำให้เกิดฝ้าบางๆ ของยีสต์ (ฟิล์ม) ลอยขึ้นมาบนผิวหน้าอาหารเหลวและสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศโดยตรงต่างจากการบ่มแบบไม่เขย่าที่มีการซึมผ่านของออกซิเจนลงในอาหารได้น้อยกว่าจึงไม่เกิดฟิล์มบนผิวหน้าอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยง

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลต KN-1 โดยใช้อาหาร LAC broth แบบเขย่าพบว่า เชื้อใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อการเจริญเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase อย่างรวดเร็ว ดังภาพที่ 18 โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุด 8.90 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 20 ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าเชื้อยีสต์ไอโซเลต KN-1 ใช้เวลาในการปรับตัวนานถึงประมาณ 16 ชั่วโมง เซลล์จึงค่อยๆ เจริญอย่างช้าๆ โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุด 7.02 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 28 และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่า พีเอชของ culture broth แบบเขย่าเท่ากับ 7.82 ซึ่งสูงกว่าไม่เขย่า (4.66)



ภาพที่ 18 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงฟิโอสของยีสต์ KN-1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า ในอาหาร LAC broth (แบบเขย่า : viable cell count ▲ , pH ■ ; แบบไม่เขย่า : viable cell count △ , pH □)

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ไอโซเลต KN-2 โดยใช้อาหาร LAC broth แบบเขย่าพบว่า เชื้อใช้เวลาในการปรับตัวเพียง 4 ชั่วโมง แล้วค่อยๆเจริญอย่างรวดเร็ว ดังภาพที่ 19 โดยเชื้อมีการเจริญสูงสุดได้เท่ากับ 8.45 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 28 ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าพบว่า เชื้อค่อยๆมีการเจริญอย่างช้าๆ โดยเชื้อมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 7.65 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 32 และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่า ฟิโอสของ culture broth แบบเขย่าเท่ากับ 6.52 ซึ่งสูงกว่าไม่เขย่า (4.79) เช่นเดียวกับเชื้อไอโซเลต MB-1 และ KN-1 ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่ามีผลทำให้ฟิโอสของน้ำหมักมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่ามาก



ภาพที่ 19 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของยีสต์ KN-2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า ในอาหาร LAC broth (แบบเขย่า : viable cell count ▲ , pH ■ ; แบบไม่เขย่า : viable cell count △ , pH □)

จากผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลตในอาหาร LAC broth แบบเขย่า พบว่า เชื้อยีสต์มีการเจริญได้เร็วในช่วงแรกทั้งนี้อาจเนื่องจากในช่วงแรกอาจมีสารอาหารต่างๆอุดมสมบูรณ์ทำให้เชื้อยีสต์เจริญได้เร็ว แต่ระยะต่อมาอาจจะเหลือแต่แลกเตตเป็นส่วนใหญ่ทำให้อัตราการเจริญช้าลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าเชื้อจะมีอัตราการเจริญสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่า ยกเว้นไอโซเลต OB-1 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าผลของอากาศและชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าและไม่เขย่าพบว่า มีความแตกต่างกัน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่า ไอโซเลต MB -1 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือ 0.537 ต่อชั่วโมง รองลงมาคือ KN-1, KN-2 และ OB-1 ตามลำดับ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในอาหาร LAC broth

ไอโซเลต	อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) , μ (h ⁻¹)	
	บ่มแบบเขย่า	บ่มแบบไม่เขย่า
OB-1	0.162	0.389
MB-1	0.537	0.301
KN-1	0.527	0.091
KN-2	0.243	0.151

ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า พบว่า ไอโซเลต OB-1 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด คือ 0.389 ต่อชั่วโมง รองลงมาคือ MB-1 , KN-2 และ KN-1 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

จากผลการศึกษาสังเกตได้ว่า การเพิ่มจำนวนของเซลล์จะเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกับการเพิ่มพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเกิดจากยีสต์ใช้แลกเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และยังพบว่า MB-1, KN-1 และ KN-2 ต่างก็ต้องการอากาศในการเจริญ ซึ่งตรงข้ามกับ OB-1 ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ น้อย จากคุณสมบัติดังกล่าวยีสต์ไอโซเลต OB-1 ไม่เหมาะสมกับงานวิจัยนี้ เพราะเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ จะนำไปผสมในอาหารไก่ ถ้ายีสต์เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (ถ้าใส่ไก่) ก็จะไปใช้แลกเตตที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น *Salmonella* spp. ลดน้อยลง หรืออาจไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกเชื้อยีสต์ไอโซเลต MB-1 KN-1 และ KN-2 ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศมาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกก็จะลดปัญหาการเจริญของยีสต์ในระบบทางเดินอาหารของไก่และสามารถควบคุมการเจริญของยีสต์ในระหว่างการผลิตโปรไบโอติกได้

1.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือก

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ไอโซเลต MB-1, KN-1 และ KN-2 บนอาหาร Yeast extract-Malt extract (YM) agar MB-1 มีโคโลนีสีขาวครีม หนูน (raised) ผิวหน้าด้าน (dull) ขอบโคโลนีเป็นคลื่น (undulating) ส่วนยีสต์ไอโซเลต KN-1 และ KN-2 พบว่ามีลักษณะ

คล้ายกัน คือ โคลนีสีขาวครีม กลม หนุน ผิวหน้าเรียบ (smooth) และมันวาว (glistening) โดย โคลนิกของ KN-2 มีขนาดใหญ่และหนากว่า KN-1 ซึ่งลักษณะที่พบในยีสต์ทั้งสามไอโซเลตเป็น ลักษณะของยีสต์โดยทั่วไปและเมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ายีสต์มี ลักษณะเซลล์เดี่ยวและเป็นกลุ่ม มีรูปร่างทั้งแบบกลม รีและยาว ดังแสดงในตารางที่ 12

การสร้างแอสโคสปอร์เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์แบบหนึ่งซึ่งรูปร่าง และจำนวนของแอสโคสปอร์เป็นลักษณะจำเพาะของยีสต์ จากตารางที่ 12 ยังไม่พบการสร้าง แอสโคสปอร์ของยีสต์ทั้งสามไอโซเลตบนอาหาร Powell's acetate agar, Gorodkova agar, 5% malt extract agar และ Mc Clary acetate agar สำหรับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YM agar เพื่อดูการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์มีการแตกหน่อแบบหลายทิศทาง (multilateral budding)

การที่ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลได้ หมายถึงยีสต์นั้นสามารถใช้น้ำตาลโดยผ่าน กระบวนการหมัก (fermentation) จะได้แอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรด สำหรับผล การหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตสและแลคโตส ดังตารางที่ 13 พบว่ายีสต์มีความสามารถ ในการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกัน โดยยีสต์ทุกไอโซเลตสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ยีสต์ KN-1 และKN-2 สามารถหมักน้ำตาลซูโครสและแลคโตส ในขณะที่ไอโซเลต MB-1 ไม่สามารถหมัก น้ำตาลดังกล่าวและไม่มียีสต์ไอโซเลตใดที่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตสได้

ตารางที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากน้ำผักกาดทองและคิเฟอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YM agar

ไอโซเลต	ลักษณะ โคลนที่สังเกตได้						ลักษณะการแตกหน่อ	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การสร้างแอสโคสปอร์
	สี	ความมัน	ความนูน	ผิวหน้า	ขอบ	ขนาด			
MB-1	ขาวครีม	-	++	ขรุขระ	เป็นคลื่น	ใหญ่	หลายทิศทาง	กลม รี ทรงกระบอก	N
KN-1	ขาวครีม	++	++	เรียบ	เรียบ	ใหญ่	หลายทิศทาง	กลม รี	N
KN-2	ขาวครีม	+++	+++	เรียบ	เรียบ	ใหญ่	หลายทิศทาง	กลม รี	N

หมายเหตุ

- ลักษณะที่ไม่ปรากฏ + ลักษณะที่ปรากฏเล็กน้อย ++ ลักษณะที่ปรากฏปานกลาง +++ ลักษณะที่ปรากฏมาก
Y = สร้างแอสโคสปอร์ N = ไม่สร้างแอสโคสปอร์

ตารางที่ 13 การหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่างๆของยีสต์ไอโซเลตที่คัดเลือก

ไอโซเลต	ชนิดของน้ำตาลที่หมัก			
	กลูโคส	ซูโครส	มอลโตส	แลคโตส
MB-1	+	-	-	-
KN-1	+	+	-	+
KN-2	+	+	-	+

หมายเหตุ + สามารถหมักน้ำตาลได้
 - ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้

ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บางสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ชนิดอื่นๆ เช่น แมนโนส (mannose) และกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลเพนโตส (pentose) และไดแซคคาไรด์ (disaccharide) นั้นมีหลายชนิดที่ยีสต์บางสายพันธุ์ใช้ได้ ดังนั้นความสามารถในการใช้น้ำตาลจึงเป็นลักษณะหนึ่งที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกหมวดหมู่ของยีสต์ (สาวิตรี, 2540)

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่คัดเลือกได้ด้วยชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32 C ซึ่งเป็นชุดจัดจำแนกยีสต์ทางการค้าโดยทดสอบการใช้ (assimilation) สารอาหารคาร์โบไฮเดรต 31 ชนิด และนำมาประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป API LAB ซึ่งเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการจัดแนกสายพันธุ์ยีสต์ พบว่ายีสต์ไอโซเลต MB-1 ที่คัดแยกได้จากผักกาดทองเป็นฟิล์มยีสต์ที่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 4 ชนิด ได้แก่ N-Acetyl-Glucosamine กรดแลคติก กลีเซอรอล และกลูโคส เมื่อจัดจำแนกแล้วพบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Candida krusei* (Asexual state ของเชื้อ *Issatchenkia orientalis*) 97.8 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยชุดทดสอบทางการค้า API ID 32 C

คาร์โบไฮเดรตที่ทดสอบ	ยีสต์ไอโซเลต		
	MB-1	KN-1	KN-2
D-Galactose	-	+	+
Cycloheximide (ACT idione)	-	+	+
D-Saccharose (sucrose)	-	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	-	-
Lactic acid	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-
D-Celiobiose	-	+	-
D-Raffinose	-	+	+
D-Maltose	-	+	-
D-Trehalose	-	+	-
Potassium 2-Ketogluconate	-	+	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-	+	-
D-Sorbitol	-	+	+
D-Xylose	-	+	+
D-Ribose	-	-	-
Glycerol	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-
Palatinose	-	-	-
Erythritol	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-
Sodium Glucuronate	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-
Gluconato potasico	-	-	-
Acido Levulinico	-	-	-
D-Manitol	-	+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรตที่ทดสอบ	ยีสต์ไอโซเลต		
	MB-1	KN-1	KN-2
D-Lactose (bovine origin)	-	+	+
Inositol	-	-	-
D-Glucose	+	+	+
L-Sorbitol	-	+	-
Glucosamine	-	-	-
ID 32 C	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida sphaerica</i>	<i>Candida kefyr</i>
% Identification	97.8	99.9	99.6

หมายเหตุ + ใช้สารประกอบคาร์บอนที่ทดสอบได้

- ไม่ใช้สารประกอบคาร์บอนที่ทดสอบ

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับคำรงค์และคณะ (2543) ที่รายงานว่า เชื้อ *Candida krusei* เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งที่พบในน้ำหมักผักดอง ขณะที่ ดาวริน (2549) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์หลักที่แยกได้จากน้ำผักกาดดอง คือ *Issatchenkia orientalis* และศิริธ (2543) รายงานว่า *I. orientalis* เป็นยีสต์ที่พบมากที่สุดที่แยกได้จากอาหารหมักดองในประเทศไทย ในขณะที่วิลาวัณย์ (2537) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* ทำให้เกิดฝ้าขาวในแตงกวาดองและ Savard *et al.* (2002) พบว่า สายพันธุ์หลักของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในผักดอง คือ *Saccharomyces bayanus* และ *S. unisporus* รองลงมา คือ *Hansenula anomala* และ *Debaryomyces* sp.

ถึงแม้ *Candida krusei* MB-1 เป็นฟิล์มยีสต์ที่ก่อให้เกิดปัญหาในอาหารหมักดอง โดยทำให้น้ำหมักขุ่น ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค แต่ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวก็มีการนำมาใช้ประโยชน์ในงานหลายด้าน เช่น ใช้ในกระบวนการหมักซ็อกโกแลตในประเทศกานา ใช้เป็นกล้ำเชื้อในการหมักผลิตภัณฑ์นมของชาวเคนย่า การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ การผลิตกลีเซอรอลและทรีฮาโลส เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การแพทย์และอุตสาหกรรมเคมี รวมทั้งใช้ขจัดสีในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น (จารุวรรณ, 2550; Liu *et al.*,

2004; Liu *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *C. krusei* เป็นเชื้อที่สามารถนำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์ได้ เนื่องจากเชื้อมีความสามารถผลิตเอนไซม์ Phytase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยธาตุฟอสฟอรัสที่มีในธัญพืชและในอาหารสัตว์ได้ดีขึ้น (คณินิจ, 2540; Quan *et al.*, 2001) สำหรับรายงานการเกิดโรค พบว่า ยีสต์ที่พบส่วนใหญ่ในน้ำผักคองเป็นยีสต์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ยกเว้น *Trichosporon cutaneum* (ดำรงเดชและคณะ, 2543) สำหรับ *C. krusei* โดยทั่วไปแล้วเป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์และมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ (Hazen, 1995)

ส่วนยีสต์ KN-1 ที่แยกได้จากกีเฟอร์สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 16 ชนิด ได้แก่ D-Galactose, Cycloheximide, Sucrose, Lactic acid, D-Celiobiose, D-Raffinose, D-Maltose, D-Trehalose, Potassium 2-Ketogluconate, D-Sorbitol, D-Xylose, Glycerol, D-Manitol, D-Lactose, Glucose และ L-Sorbitol เมื่อจัดจำแนกแล้วพบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Candida sphaerica* (Asexual state ของเชื้อ *Kluyveromyces lactis*) 99.9 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับ Savova and Nikolova (2002) ที่พบ *C. sphaerica* เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งในผลิตภัณฑ์นมหมักของชาวบัลแกเรีย และ Romano *et al.* (2001) ที่รายงานการพบ *C. sphaerica* เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งที่พบใน Water Buffalo Mozzarella

จากรายงานของนักวิจัยหลายท่านพบว่า *C. sphaerica* เป็นเชื้อพบในผลิตภัณฑ์นมของประเทศสหรัฐอเมริกา พบในชีสของอิตาลี พบในไวน์ของแอฟริกาใต้ (Barnett, 1990) และพบว่า เป็นเชื้อที่ทำให้ผลิตภัณฑ์นมและชีสเกิดการเน่าเสียโดยการสร้างแก๊ส (Westall and Filtenborg, 1998; Savova and Nikolova, 2002) และจากการรวบรวมข้อมูล พบว่ายังไม่มีรายงานการก่อโรคของยีสต์สายพันธุ์นี้

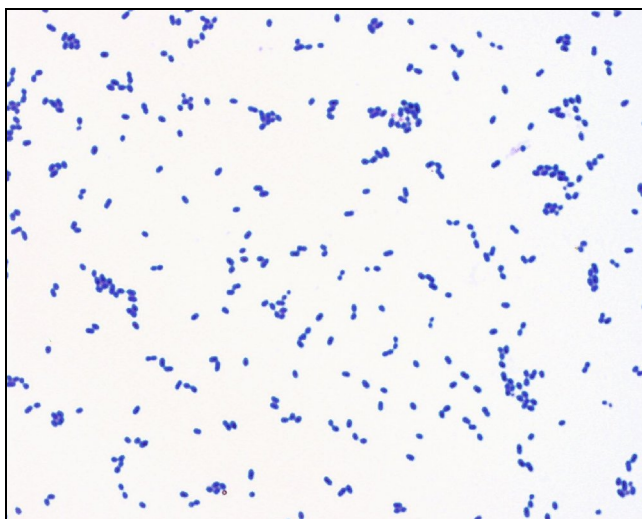
สำหรับไอโซเลต KN-2 เมื่อจัดจำแนกแล้วพบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Candida kefyr* (Asexual state ของเชื้อ *Kluyveromyces marxianus*) 99.6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสามารถใช้ (assimilate) คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ D-Galactose, Cycloheximide, Lactic acid, Sucrose, D-Raffinose, L-Sorbitol, D-Xylose, Glycerol, D-Manitol, D-Lactose และ Glucose ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Witthuhn *et al.* (2005) ที่รายงานว่า พบ *C. kefyr* ในกีเฟอร์ที่มี

อายุการหมัก 30 วัน และ Gadaga and Mutukumira. (2001) พบว่า *C. kefir* ที่คัดแยกจากตัวอย่าง amasi ซึ่งเป็นนมหมักพื้นเมืองของชาวซิมบับเว สามารถใช้ DL-lactate และน้ำตาลแลคโตสในการเจริญได้ ขณะที่ Cheirsilp *et al.* (2003b) พบว่า *C. kefir* IFO 10278, *C. tenuis* IFO 1303 และ *Saccharomyces unisporus* IFO0724 ที่แยกได้จากกลัเชื้อทีเฟอร์เกรน สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสและกรดแลคติกในการเจริญได้ Rodrigues *et al.* (2005) กล่าวว่า ในทีเฟอร์พบยีสต์สกุล *Candida*, *Torula*, *Kluyveromyces* และ *Saccharomyces* spp. โดยสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ *C. kefir* และ *S. cerevisiae* (Narvhus and Gadaga, 2003) เช่นเดียวกับ Fleet (1990) ที่รายงานว่า ในนมส่วนใหญ่ มักพบยีสต์สายพันธุ์ *C. kefir* โดยเชื้อสายพันธุ์นี้ทำให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสของนมหมักเปลี่ยนแปลงไป สำหรับรายงานการเกิดโรคพบว่า โดยทั่วไปไม่ก่อให้เกิดโรค แต่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด ม้ามและไต ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งได้ (Hazen, 1995)

2. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการผลิตโปรไบโอติก

2.1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในอาหารเหลวดัดแปลง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก *Enterococcus faecium* PR-2 (ภาพที่ 20) และ *Lactobacillus plantarum* IG-3 (ภาพที่ 21) ที่คัดแยกได้จากเนื้อมะเขือเทศและลำไส้ของไก่ตามลำดับ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 หรือ *C. sphaerica* KN-1 หรือ *C. kefir* KN-2 ที่คัดแยกได้ ทั้งนี้เพื่อให้ยีสต์ใช้แลกเตตที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นขณะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้พีเอชสูงขึ้น โดยในช่วงแรกของการหมักหากแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญแหล่งเดียวกัน ก็จะทำให้เกิดการแข่งขันในการใช้แหล่งคาร์บอนทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ช้าและมีอาหารในการเจริญน้อยลง ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการแย่งแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด จึงคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ใช้ได้แตกต่างกัน โดยในการศึกษานี้เลือกใช้น้ำตาล 3 ชนิด คือ น้ำตาลซูโครสซึ่งมาจากน้ำตาลทราย น้ำตาลมอลโตสซึ่งเป็นน้ำตาลที่มาจากแป้งและน้ำตาลแลคโตสซึ่งเป็นน้ำตาลที่มาจากนม มาใช้ในการเตรียมอาหาร MRS broth แทนน้ำตาลกลูโคสซึ่งราคาแพงและต่อไปนี้จะเรียกอาหารดังกล่าวว่า MRS-sucrose broth, MRS-maltose broth และ MRS-lactose broth



ภาพที่ 20 ลักษณะเซลล์ของ *Enterococcus faecium* PR-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 21 ลักษณะเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* IG-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว MRS คัดแปลงทุกชนิดที่ทดสอบ ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 ซึ่งคัดแยกมาจากผักกาดคอง *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 ซึ่งคัดแยกได้จากกีเฟอร์ สามารถเจริญได้ดีในอาหาร MRS-lactose และ MRS-maltose broth สำหรับผลการทดสอบการเจริญในอาหาร MRS-sucrose broth พบว่า *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 เจริญได้น้อย ในขณะที่ *C. krusei* MB-1 เจริญได้ปานกลาง

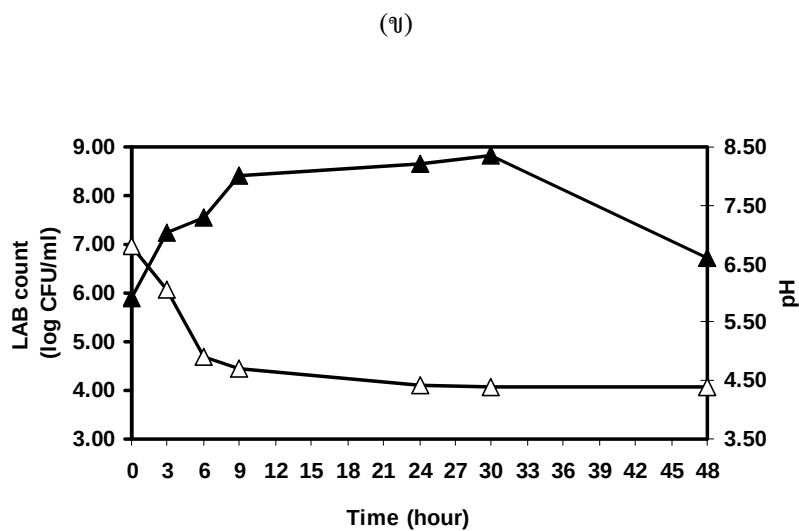
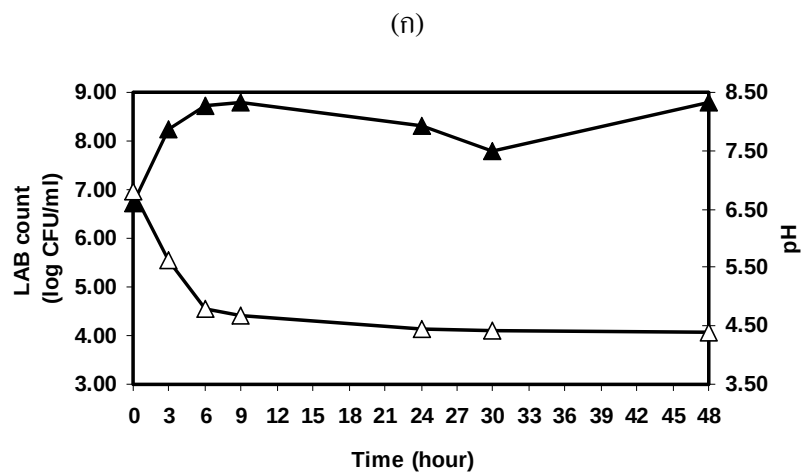
จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ในการเตรียมอาหาร MRS เนื่องจากต้องการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อยีสต์ ไม่ให้มีปริมาณมากเกินไป เพราะเชื้อยีสต์เจริญได้น้อยกว่าในน้ำตาลดังกล่าวจึงต้องรอสารเมแทบอลิท์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น คือ กลูโคส ฟรุคโตสและกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ

2.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์แบบเชื้อเดี่ยวในอาหาร MRS-sucrose broth

ผลการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Enterococcus faecium* PR-2 และ *Lactobacillus plantarum* IG-3 และยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ คือ *Candida krusei* MB-1, *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวในอาหารเหลวคัดแปลง MRS-sucrose พบว่า *Ent. faecium* PR-2 มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 โดยเชื้อเจริญเท่ากับ 8.79 log CFU/ml ดังภาพที่ 22 ก ขณะที่ *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 30 (8.82 log CFU/ml) ดังภาพที่ 22 ข และในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (0–9 ชั่วโมง) พบว่า *Ent. faecium* PR-2 มีอัตราการเจริญเร็วกว่า *L. plantarum* IG-3 แต่หลังจากนั้น *Ent. faecium* PR-2 ลดอัตราการเจริญลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ *L. plantarum* IG-3 ยังคงมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นได้จนถึงชั่วโมงที่ 36 สำหรับสาเหตุที่การเจริญของ *Ent. faecium* PR-2 ลดลงอาจเป็นผลเนื่องมาจาก *Ent. faecium* PR-2 สามารถใช้ซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนเพื่อการเจริญได้เร็วกว่า *L. plantarum* IG-3 จึงสร้างกรดแลคติกออกมาเป็นจำนวนมากจนถึงพีเอชระดับหนึ่ง (4.69) ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

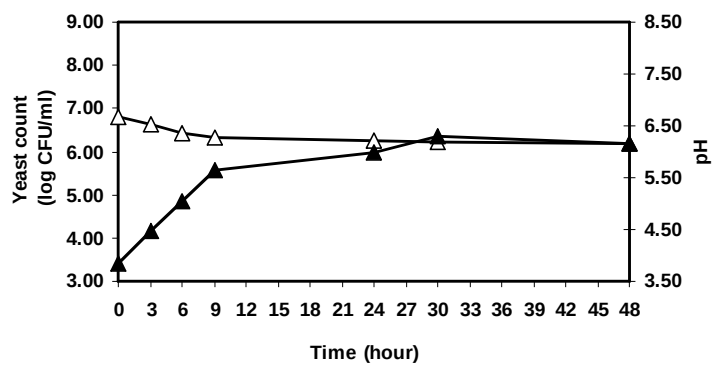
ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์พบว่า ในระยะเวลา 9 ชั่วโมงแรก *C. krusei* MB-1 มีการเจริญสูงกว่า *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 เพียงเล็กน้อย ดังภาพที่ 23 ก แต่หลังจากชั่วโมงที่ 9 ของการทดลองพบว่าทั้ง *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วและไม่แตกต่างกัน โดยมีจำนวนเซลล์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 30 (7.99 และ 8.00 log CFU/ml ตามลำดับ) ดังภาพที่ 23 ข และ 23 ค ในขณะที่ *C. krusei* MB-1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและเชื้อเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 เช่นเดียวกัน แต่มีจำนวนเชื้อที่เจริญเพียง 6.30 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ฟีเอชใน culture broth ของเชื้อ *C. krusei* MB-1 มีค่าใกล้เคียงกับเชื้อ *C. sphaerica* KN-1 (6.18 และ 6.16) แต่สูงกว่า culture broth ของเชื้อ *C. kefir* KN-2 ซึ่งมีค่าฟีเอชเท่ากับ 5.43

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวคัดแปลง MRS-sucrose เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อที่มีอัตราการเจริญจำเพาะเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ *Ent. faecium* PR-2 , *L. plantarum* IG-3, *C. sphaerica* KN-1, *C. kefir* KN-2 และ *C. krusei* MB-1 ดังแสดงในตารางที่ 15

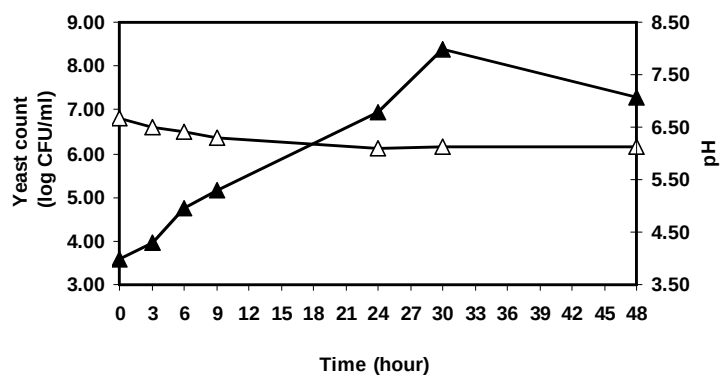


ภาพที่ 22 เปรียบเทียบการเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อเพาะเลี้ยง
 ในอาหาร MRS-sucrose broth (▲) จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก
 (△) พีเอชของ culture broth (ก) *Ent. faecium* PR-2 (ข) *L. plantarum* IG-3

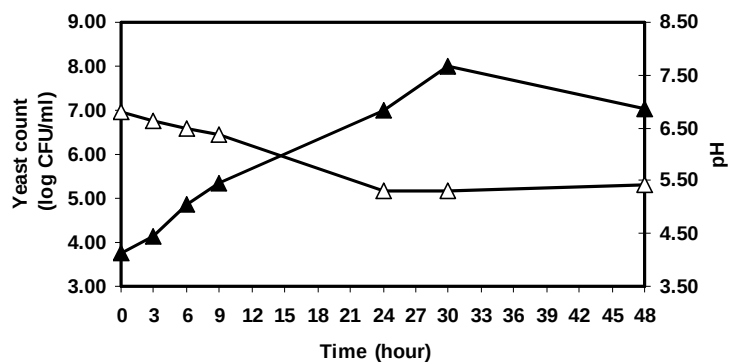
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพที่ 23 เปรียบเทียบการเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth (▲) จำนวนเซลล์เชื้อของยีสต์ (△) พีเอชของ culture broth
(ก) *C. krusei* MB-1 (ข) *C. sphaerica* KN-1 (ค) *C. kefyr* KN-2

ตารางที่ 15 อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว
ในอาหาร MRS-sucrose broth

จุลินทรีย์	อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) , μ (h^{-1})
<i>Enterococcus faecium</i> PR-2	0.780
<i>Lactobacillus plantarum</i> IG-3	0.644
<i>Candida krusei</i> MB-1	0.206
<i>Candida sphaerica</i> KN-1	0.314
<i>Candida kefyr</i> KN-2	0.313

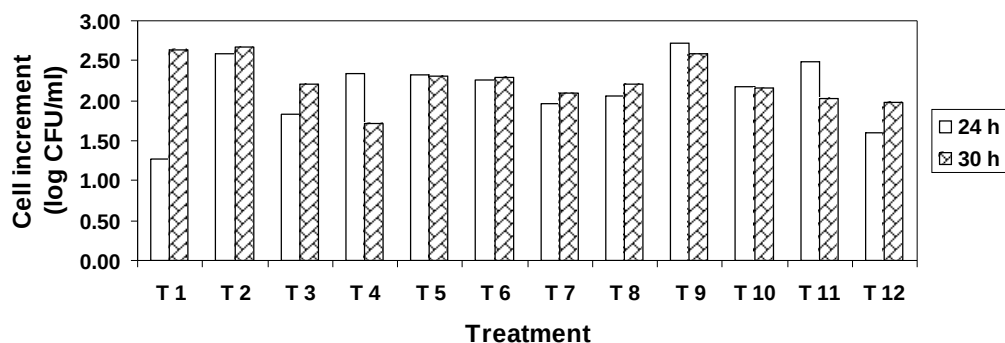
จากการทดลองจะเห็นได้ว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์มีอัตราการเจริญจำเพาะน้อยกว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งสองสายพันธุ์ ดังนั้นอาหารเหลวดัดแปลง MRS-sucrose มีแนวโน้มที่จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมร่วมระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ที่สามารถใช้แยกเตดเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรไบโอติกต่อไป

3. การผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมร่วมระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ในอาหาร MRS-sucrose broth

แบคทีเรียกรดแลกติกโดยทั่วไปจัดเป็น fastidious organism ซึ่งต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ เช่น กรดอะมิโน และวิตามินชนิดต่างๆ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก คือ MRS ซึ่งอาหารดังกล่าวมีกลูโคสเป็นส่วนผสม โดยเชื่อจะนำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน เพื่อการเจริญและสร้างกรดแลกติกออกมาเป็นจำนวนมาก จนถึงพีเอชระดับหนึ่งที่แบคทีเรียกรดแลกติกไม่สามารถทนได้ เชื่อจะหยุดการเจริญและตายในที่สุด ส่งผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตได้ต่ำเกินไป เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวจึงทดลองใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แลกเตด เพื่อเพิ่มผลผลิตของเซลล์โปรไบโอติก โดยเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง MRS-sucrose broth เพื่อป้องกันการแข่งขันการใช้น้ำตาลกลูโคสของยีสต์จากแบคทีเรียกรดแลกติกดังที่ได้กล่าวแล้วซึ่งการทดลองนี้แบ่งเป็น 12 กลุ่มการทดลอง โดยมีการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อเดี่ยว (pure culture) กับการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อผสมกับ

ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (mixed culture) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 (ในที่นี้ใช้ 3 เพอร์เซ็นต์ ต่อ 1 เพอร์เซ็นต์ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไป นิยมเติมกลูต้าเชื้อ 2 – 5 เพอร์เซ็นต์ และเนื่องจากไม่ต้องการให้เชื้อยีสต์มีปริมาณมากเกินไปจนไปแย่งอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติก) บ่มเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์คือ 25 – 30 องศาเซลเซียสก็ตาม ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการใช้น้ำหล่อเย็น เมื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม อีกทั้ง *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 ก็สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส (วารสาร, 2550)

จากผลการศึกษาเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3 (ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่าโปรไบโอติก) ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและแบบผสมร่วมกับเชื้อยีสต์จำนวน 12 กลุ่มการทดลอง ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง โดยเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า จำนวนโปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นสามอันดับแรก ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมระหว่างโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T 9) มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 2.72 log CFU/ml รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *Candida krusei* MB-1 (T2) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T11) โดยมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น 2.58 และ 2.49 log CFU/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 24 และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า จำนวนโปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นสามอันดับแรก ได้แก่ การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 ร่วมกับ *C. krusei* MB-1 (T2) โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 2.67 log CFU/ml รองลงมา คือ การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (T1) และการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ผสมกัน (T9) โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 2.64 และ 2.58 log CFU/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 การเจริญของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 ในรูปของการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แลคเตดในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 30 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

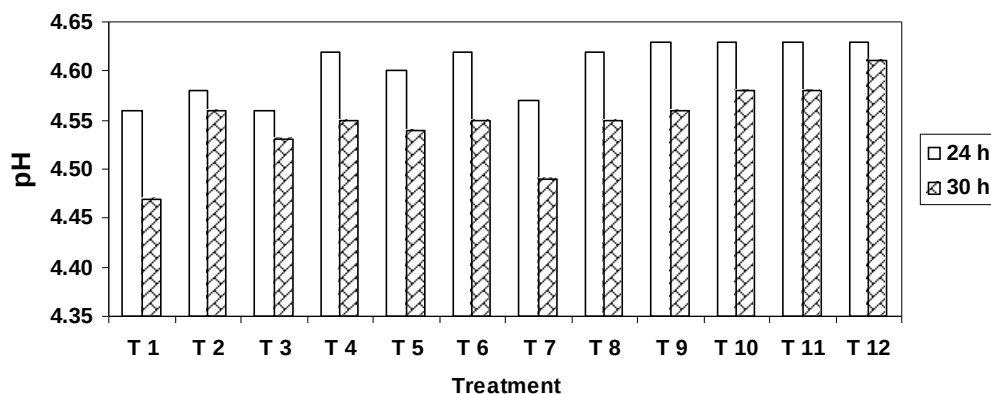
จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อโดยพิจารณาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ของโปรไบโอติก ซึ่งแสดงในภาพที่ 24 จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Ent. faecium* PR-2 ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆจะเจริญได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T2) มีการเพิ่มของโปรไบโอติกมากที่สุด โดยจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.58 log CFU/ml รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefyr* KN-2 (T4) และ *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1 (T3) ตามลำดับ โดยมีจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้น 2.34 และ 1.83 log CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (T1) มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น 1.27 log CFU/ml จากผลการทดลองยังพบว่า การเพิ่มจำนวนโปรไบโอติกเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T2) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกสูงกว่าการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (T1) ถึง 2 เท่า ดังภาพที่ 24 ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ช่วยกำจัดกรดแลกติกที่ *Ent. faecium* PR-2 ผลิตขึ้นในระหว่างการหมัก โดยเชื้อยีสต์นำกรดแลกติกไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ นอกจากนี้เชื้อยีสต์อาจผลิตเอนไซม์อะมิลเลสที่ช่วยกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเชื้อยีสต์อาจผลิตสารต่างๆที่เป็นปัจจัยในการเจริญของ *Ent. faecium* PR-2 (Cheirsilp *et al.*, 2003b) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 30 ชั่วโมง พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T2) ยังเป็นกลุ่มการทดลองเดียวที่มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกเพิ่มขึ้นสูงกว่าการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (T1) ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. sphaerica* KN-1 (T3) และ *C. kefyr* KN-2 (T4) จำนวนโปรไบโอติกเพิ่มขึ้นน้อยกว่าการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* IG-3 ที่เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง พบว่า การเพาะเลี้ยง *L. plantarum* IG-3 เพียงชนิดเดียว (T5) ผลิตเซลล์โปรไบโอติกหรือเจริญได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม *L. plantarum* IG-3+ *C. krusei* MB-1 (T6), *L. plantarum* IG-3+ *C. sphaerica* KN-1 (T7) และ *L. plantarum* IG-3+ *C. kefyr* KN-2 (T8) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกเพิ่มขึ้น 2.26, 1.96 และ 2.06 log CFU/ml ตามลำดับ ขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* IG-3 แบบเชื้อเดี่ยว (T5) มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 2.33 log CFU/ml และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า การเพาะเลี้ยง *L. plantarum* IG-3 เพียงชนิดเดียว (T5) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกเพิ่มขึ้น 2.31 log CFU/ml ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม

L. plantarum IG-3+ *C. krusei* MB-1 (T6), *L. plantarum* IG-3+ *C. sphaerica* KN-1(T7) และ *L. plantarum* IG-3+ *C. kefir* KN-2 (T8) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกเพิ่มขึ้น 2.29, 2.09 และ 2.21 log CFU/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 24

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) กับโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ผสมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้นในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่า T9 ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อผสมเฉพาะโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ดังภาพที่ 24 โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 2.58 log CFU/ml รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) , *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1(T11) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2 (T12) โดยมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.16, 2.03 และ 1.60 log CFU/ml ดังภาพที่ 24 และเมื่อเพาะเลี้ยงโปรไบโอติก เป็นเวลา 30 ชั่วโมง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) , *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T11) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2 (T12) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกเพิ่มขึ้น 2.58, 2.16, 2.03 และ 1.97 ตามลำดับ

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบฟิเอร์ของ culture broth ที่ใช้ในการผลิตโปรไบโอติกทั้งจากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมร่วมกับเชื้อยีสต์ พบว่า ฟิเอร์ใน culture broth ของการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกแบบเชื้อผสมร่วมกับเชื้อยีสต์มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวเพียงเล็กน้อย ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของ culture broth เมื่อเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้แลกเตดในการเจริญในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

จากผลการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง culture broth มีค่าพีเอชสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (T1) ยกเว้นการเพาะเลี้ยงแบบผสมกับ *C. sphaerica* KN-1 (T3) ที่ culture broth มีค่าพีเอชเท่ากันกับการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (4.56) สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบผสมกับ *C. kefir* KN-2 (T4) พบว่า culture broth มีค่าพีเอชสูงสุดที่สุด คือ 4.62 รองลงมา คือการเพาะเลี้ยงแบบผสมกับ *C. krusei* MB-1 (T2) โดย culture broth มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.58 และเมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ก็ยังพบว่า การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ culture broth มีค่าพีเอชสูงกว่าการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว โดยการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (T2-T4) culture broth มีค่าเท่ากับ 4.53-4.56 ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 แบบเชื้อเดี่ยว (T1) culture broth มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.47

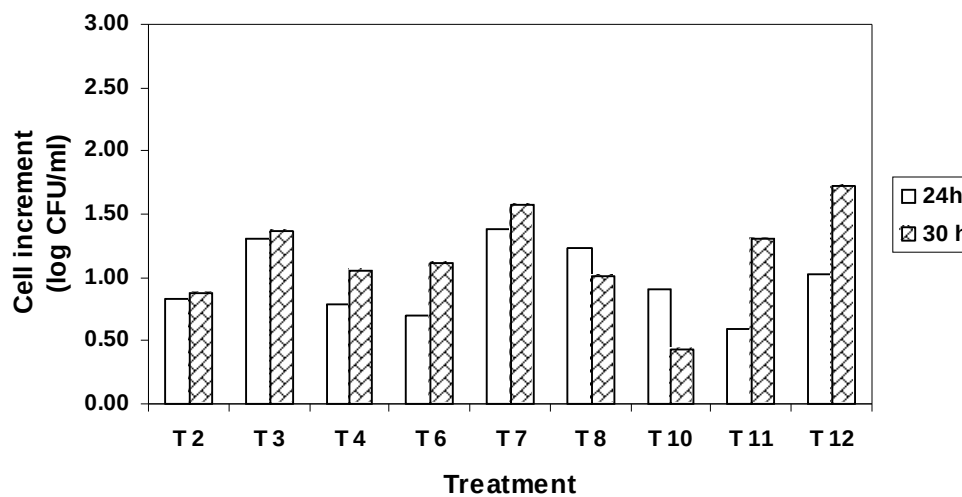
ผลการศึกษาค่าพีเอชของ culture broth ในการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* IG-3 แบบเชื้อเดี่ยว (T5) กับการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ คือ *C. krusei* MB-1 (T6), *C. sphaerica* KN-1 (T7) และ *C. kefir* KN-2 (T8) ที่เวลา 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่า ค่าพีเอชใน culture broth ของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 และ *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2 มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวเพียงเล็กน้อย

นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง culture broth ของ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) และเชื้อผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (T10-T12) นั้นมีค่าพีเอชเท่ากัน คือ 4.63 แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า พีเอชของ culture broth ของ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T11) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) มีค่าไม่แตกต่างกัน (4.56-4.58) ในขณะที่กลุ่มการทดลองที่ T12 (*Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2) culture broth มีค่าพีเอชสูงกว่ากลุ่มเชื้อผสมแบบไม่ร่วมกับยีสต์เพียงเล็กน้อย โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.61

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง โปรไบโอติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมากนัก แต่ก็มีบางกลุ่มการทดลองที่มีการ

เจริญของเซลล์โปรไบโอติกลดลง ได้แก่ กลุ่มเชื้อแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2 (T4), *L. plantarum* IG-3 (T5), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T11) และเมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชของ culture broth พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง culture broth มีค่าพีเอชต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงทุกกลุ่มการทดลอง ดังภาพที่ 25 ซึ่งพีเอชอาจเป็นสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งที่ยับยั้งการเจริญของโปรไบโอติก ทำให้แทบจะไม่มี的增加จำนวนของเซลล์เมื่อหมักนาน 30 ชั่วโมง (Hutkins and Nannen, 1992) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกแบบผสมร่วมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ควรใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพียง 24 ชั่วโมง ก็เพียงพอแล้ว

เมื่อพิจารณาการเจริญของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมกับโปรไบโอติกในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า จำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นมากกว่าที่ 24 ชั่วโมง ยกเว้นกลุ่มการทดลองที่ 8 (T8; *C. kefir* KN-2 ผสมกับ *L. plantarum* IG-3) และ T10 (*C. krusei* MB-1 ผสมกับ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3) ที่จำนวนเซลล์ยีสต์ลดลง ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับโปรไบโอติกในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

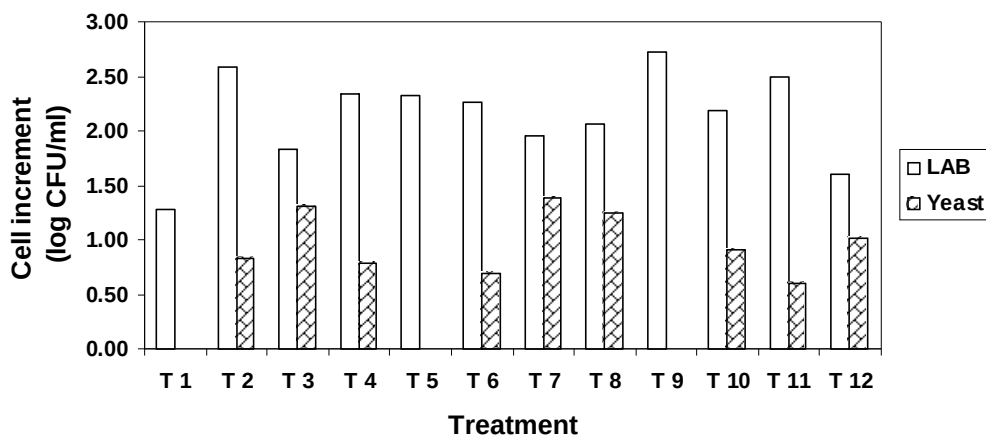
T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของโปรไบโอติกกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์พบว่า โปรไบโอติกมีการเจริญมากกว่าเชื้อยีสต์ทุกกลุ่มการทดลองทั้งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง โดยในชั่วโมงที่ 24 พบว่า โปรไบโอติกมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น 1.27 – 2.72 log CFU/ml ในขณะที่ยีสต์มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 0.60 – 1.38 log CFU/ml ดังภาพที่ 27 และในชั่วโมงที่ 30

พบว่า โปรไบโอติกมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น $1.72 - 2.67 \log \text{CFU/ml}$ ในขณะที่ยีสต์มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น $0.43 - 1.73 \log \text{CFU/ml}$ ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 27 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 กับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้แลคเตดในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

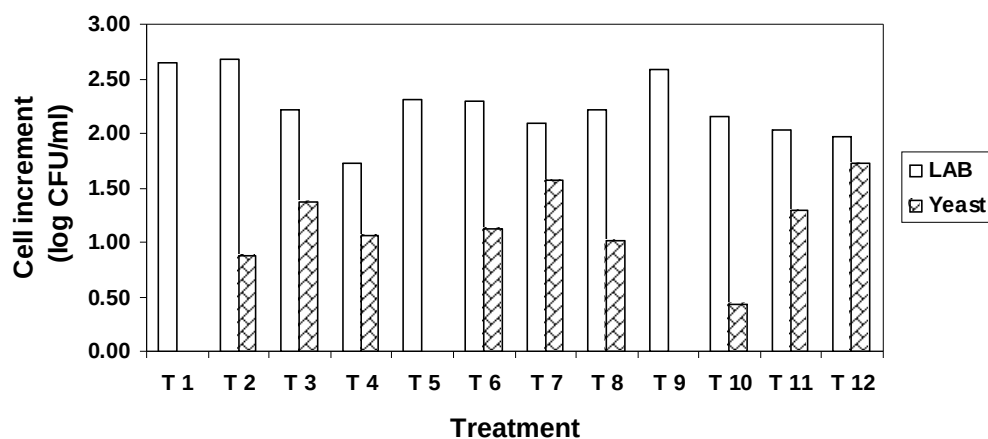
T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 กับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้แลคเตตในการเจริญ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

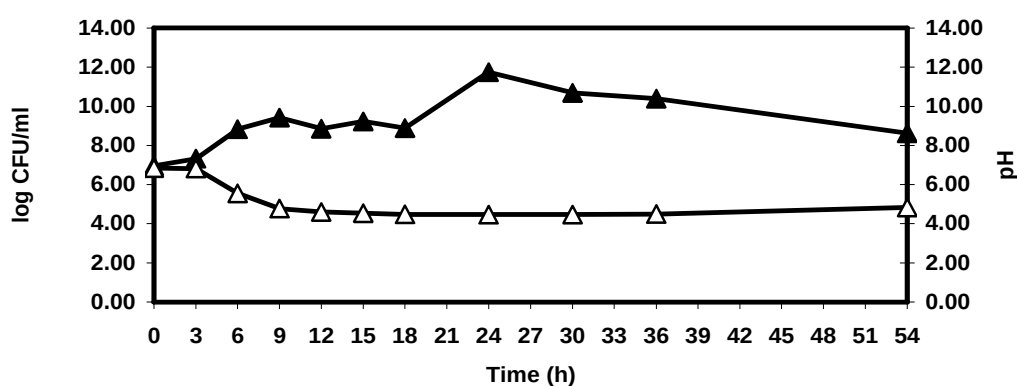
T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

เมื่อพิจารณาการเจริญของยีสต์พบว่า ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น ซึ่งอาจทำให้ยีสต์ใช้แลกเตตที่โปรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลกติก) ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักได้ไม่ทัน ทำให้ยังคงมีแลกเตตสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงส่งผลทำให้พีเอชของ culture broth ยังคงมีค่าต่ำ (พีเอชน้อยกว่า 5) และอาจทำให้ยับยั้งการเจริญของโปรไบโอติก หลังจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมโดยใช้โปรไบโอติกร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 อาจจะไม่เหมาะสม ประกอบกับกลุ่มการทดลองที่ใช้ยีสต์ *C. krusei* ร่วมกับโปรไบโอติกผสม (แบคทีเรียกรดแลกติกสองสายพันธุ์) ส่วนใหญ่ทำให้ปริมาณโปรไบโอติกที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. sphaerica* KN-1 หรือ *C. kefir* KN-2 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3 ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 และเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและยีสต์เป็น 3 ต่อ 2 ทั้งนี้เพื่อให้ยีสต์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้นและสามารถใช้แลกเตตที่โปรไบโอติกผลิตขึ้นได้ทัน โดยมีกลุ่มการทดลองครั้งนี้ คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13), *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14), *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) เพาะเลี้ยงทุกกลุ่มการทดลองในอาหาร MRS-sucrose broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 54 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของโปรไบโอติกทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง พบว่า T13 (*Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3), T15 (*L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1) และ T16 (*Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1) มีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากัน คือ 11.74 log CFU/ml แต่ T15 ใช้เวลาสั้นกว่า คือเพียง 18 ชั่วโมง ในขณะที่ T13 และ T16 ใช้เวลา 24 ชั่วโมง ส่วน T14 (*Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1) มีจำนวนเซลล์ต่ำกว่าและใช้เวลานานกว่ากลุ่มการทดลองอื่นเล็กน้อย โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 10.69 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 30 แม้ว่า T13, T15 และ T16 จะผลิตเซลล์ได้สูงสุดเท่ากัน แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น พบว่า T15 (*L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1) มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 4.85 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 18 รองลงมา คือ T16, T13 และ T14 โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.79, 4.78 และ 3.97 log CFU/ml ตามลำดับ

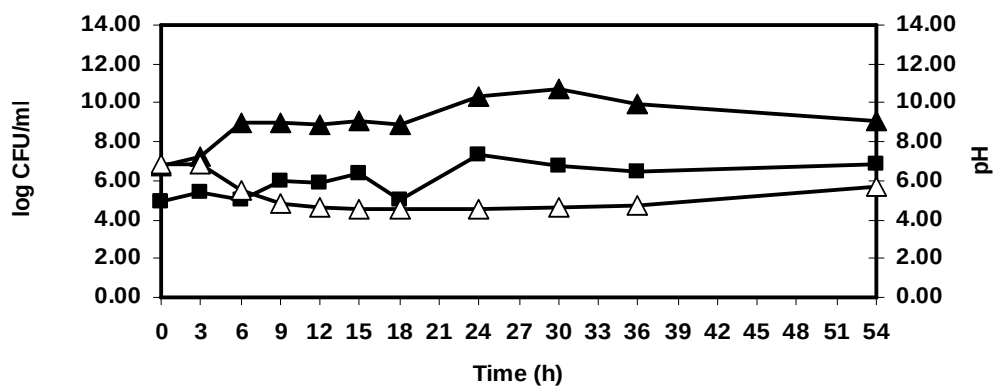
จากผลการศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) พบว่า เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 9 หลังจากนั้นการเจริญค่อยๆ ลดลงเล็กน้อยจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 เซลล์มีการเจริญสูงสุด โดยมีเซลล์ที่เจริญเท่ากับ 11.74 log CFU/ml ดังภาพที่ 29 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ culture broth มีค่าพีเอช เท่ากับ 4.83 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองที่เพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับ *C. krusei* MB-1 (T14-T16) พบว่า มีค่าต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด



ภาพที่ 29 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมกันในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง : (▲) จำนวนเซลล์โปรไบโอติก (△) พีเอชของ culture broth

ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 ผสมกับ *C. krusei* MB-1 (T14) พบว่า *Ent. faecium* PR-2 มีการเจริญอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 15 (จาก 6.72 – 9.07 log CFU/ml) และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 18 พบว่า จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 8.92 log CFU/ml ทั้งนี้ในชั่วโมงดังกล่าว culture broth มีค่าพีเอชลดลงต่ำถึง 4.50 อันอาจเนื่องมาจากกรดแลคติกที่โปรไบโอติกสร้างขึ้นจากการเมแทบอลิซึมน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อและยับยั้งการเจริญของโปรไบโอติกเองและในชั่วโมงดังกล่าวจำนวนเซลล์ของ *C. krusei* MB-1 ก็ลดลงด้วยเช่นกัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่า โปรไบโอติกค่อยๆ มีการเจริญเพิ่มขึ้นอีกครั้ง และมีเซลล์สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง คือ มีค่าเท่ากับ 10.69 log CFU/ml สำหรับสาเหตุที่ *Ent. faecium* PR-2 มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งอาจเนื่องจากที่ชั่วโมงที่ 24 พีเอชของ culture broth ค่อยๆ สูงขึ้นอีกครั้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก

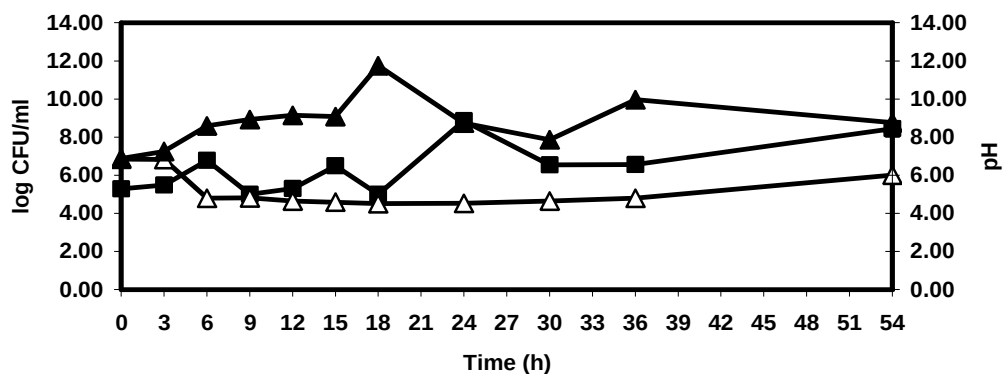
ในช่วงเวลาดังกล่าว *C. krusei* MB-1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอีกครั้งซึ่งเชื้อยีสต์สายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติในการใช้แลกเตตในการเจริญจึงทำให้ความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โปรไบโอติกจึงค่อยๆ กลับมาเจริญขึ้นได้อีกครั้ง ดังภาพที่ 30 และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (54 ชั่วโมง) culture broth ก็ยังมีค่าสูงขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 5.73



ภาพที่ 30 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง : (▲) จำนวนเซลล์โปรไบโอติก (■) จำนวนเซลล์ยีสต์ (△) พีเอชของ culture broth

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 ผสมกับ *C. krusei* MB-1 (T15) พบว่า *L. plantarum* IG-3 มีการเจริญเร็วกว่ากลุ่มการทดลองอื่น โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 11.74 log CFU/ml ในช่วงเวลาที่ 18 ขณะที่กลุ่มการทดลองอื่น (T13 และ T16) ใช้เวลา 24 ชั่วโมง และในช่วงเวลาที่ 18 นั้น ยังพบว่า การเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงเวลาที่ 15 และเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเวลาที่ 24 ดังภาพที่ 31 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการที่โปรไบโอติกเจริญเพิ่มสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากโปรไบโอติกใช้ยีสต์ที่ตายเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจนถึง 24 ชั่วโมง เชื้อยีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ส่งผลให้พีเอชของ culture broth ค่อยๆ เพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาของการหมัก (54 ชั่วโมง) พบว่า กลุ่มการทดลองนี้มีค่าพีเอชของ culture broth สูงที่สุด คือ 6.00 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ สำหรับที่สาเหตุที่การเจริญของยีสต์ลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้งนั้น อาจเกิดจากน้ำตาล

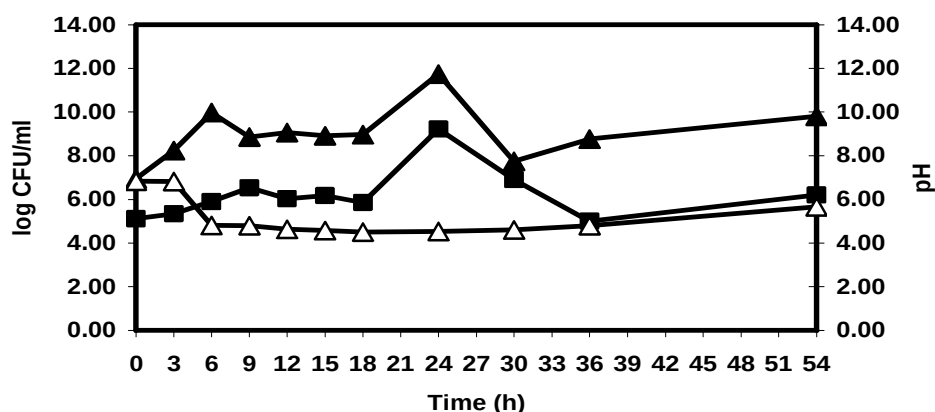
จุลินทรีย์น้อยลงและโปรไบโอติกใช้จุลินทรีย์ได้ดีกว่า ยีสต์จึงขาดแหล่งคาร์บอนและต้องเปลี่ยนมาใช้กรดแลกติกแทนซึ่งต้องใช้เวลาในการปรับตัว ซึ่งการเจริญแบบนี้เรียกว่า diauxic growth (Aiba *et al.*, 1973)



ภาพที่ 31 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง : (▲) จำนวนเซลล์โปรไบโอติก (■) จำนวนเซลล์ยีสต์ (△) พีเอชของ culture broth

ในขณะที่การเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 ผสมกับ *C. krusei* MB-1 (T16) พบว่า มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่เจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเซลล์เท่ากับ 11.74 log CFU/ml ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าว *C. krusei* MB-1 ก็มีจำนวนเซลล์สูงสุดเช่นกัน การที่โปรไบโอติกมีจำนวนเซลล์สูงที่สุดนั้นอาจเกิดเนื่องจาก *C. krusei* MB-1 เป็นยีสต์ที่สามารถใช้แลกเตดในการเจริญได้จึงช่วยกำจัดกรดแลกติก ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้พีเอชของ culture broth สูงขึ้น และไม่เพียงแต่ยีสต์จะช่วยลดกรดแลกติก แต่อาจจะเกิดเนื่องจากปัจจัยอื่นๆด้วย ปัจจัยหนึ่งที่น่าจะนำมาอธิบายได้ คือ โปรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลกติก) ที่เจริญอยู่ในช่วง exponential growth phase เซลล์จะไวต่อสารต่างๆที่ยีสต์หลั่งออกมา หรือ การเจริญของยีสต์กับโปรไบโอติกสามารถสังเคราะห์และหลังปัจจัยในการเจริญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกภายใต้สภาวะการหมักที่ไม่เอื้ออำนวยได้ (Cheirsilp *et al.*, 2003b) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไปที่เวลา 30 ชั่วโมง พบว่า จำนวนเซลล์โปรไบโอติกมีจำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยมี

จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 7.75 log CFU/ml ในขณะที่การเจริญของเชื้อ *C. krusei* MB-1 ก็มีจำนวนลดลงเช่นกัน ซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่เหลือเพียง 6.90 log CFU/ml และพีเอชของ culture broth เท่ากับ 4.54 และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไปที่เวลา 36 ชั่วโมงและ 54 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของโปรไบโอติกและ culture broth เพิ่มขึ้นอีกครั้ง ดังภาพที่ 32 โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง โปรไบโอติกมีเซลล์เจริญเท่ากับ 8.76 log CFU/ml ยีสต์มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.00 log CFU/ml culture broth มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.79 ตลอดจนเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาของการหมัก (54 ชั่วโมง) พบว่าโปรไบโอติกมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.81 log CFU/ml ขณะที่ยีสต์มีเซลล์เท่ากับ 6.20 log CFU/ml และ culture broth มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.67



ภาพที่ 32 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมง : (▲) จำนวนเซลล์โปรไบโอติก (■) จำนวนเซลล์ยีสต์ (△) พีเอชของ culture broth

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการทดลอง คือ 54 ชั่วโมง จำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับ *C. krusei* MB-1 (T14 - T16) มีจำนวนเซลล์ที่ผลิตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบผสมโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ (T13) โดยการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.81 log CFU/ml รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) และ *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.07 และ 8.76 ตามลำดับ ในขณะที่การ

เพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.62 log CFU/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชของ culture broth เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมกับ *C. krusei* MB-1 ทุกกลุ่มการทดลอง culture broth มีค่าพีเอชสูงกว่า การเพาะเลี้ยง แบบผสมเฉพาะโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Shimizu *et al.* (1999) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ผสมกับยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* เพื่อควบคุมพีเอชในระหว่างการผลิตในจีนใน สภาวะไร้อากาศ พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบผสมให้เซลล์น้ำหนักแห้ง (dry weight cell) ของ *L. lactis* มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยว โดยการเพาะเลี้ยงแบบผสมเซลล์น้ำหนักแห้ง มีค่าเท่ากับ 3.4 กรัม ต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวเซลล์น้ำหนักแห้งมีค่าเท่ากับ 2.6 กรัมต่อลิตรและ Cheirsilp *et al.* (2003a) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus kefiranofaciens* ผสมกับยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตคีเฟอแรน โดยเพาะเลี้ยง เชื้อแบบเปิดเสร็จพบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสม อัตราการเจริญของเซลล์ อัตราการผลิต คีเฟอแรนและอัตราการใช้กรดแลคติก มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* เพียง สายพันธุ์เดียวอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตโปรไบโอติกในกลุ่มการทดลองที่ใช้โปรไบโอติกสองสายพันธุ์ (*Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3) มาเพาะเลี้ยงผสมกับร่วมกับยีสต์ (*C. krusei* MB-1 หรือ *C. sphaerica* KN-1 หรือ *C. kefir* KN-2) โดยใช้อัตราส่วน โปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 และ 3 ต่อ 2 พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองที่ใช้อัตราส่วน 3 ต่อ 2 สามารถผลิตโปรไบโอติกได้ดีกว่า หรือ โปรไบโอติกเจริญได้ดีกว่า โดยพิจารณาจากการเพิ่มของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ เริ่มต้น กล่าวคือ การเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกผสมกับ *C. krusei* MB-1 ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 มีจำนวน เซลล์โปรไบโอติกเพิ่มขึ้น 3.97 – 4.85 log CFU/ml ในขณะที่กลุ่มที่ใช้อัตราส่วน 3 ต่อ 1 มีจำนวน เซลล์โปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้น 1.60 – 2.72 log CFU/ml สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากยีสต์เพิ่ม จำนวนได้มากขึ้นและสามารถใช้แลกเตดที่โปรไบโอติกผลิตขึ้นได้ทัน ส่งผลให้พีเอชในอาหาร เลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้นในระดับที่โปรไบโอติกสามารถเจริญต่อไปได้

สำหรับผลการทดลองการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกผสมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อ ยีสต์ (3 ต่อ 2) เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกเพื่อผลิตในระดับการค้า จาก ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า หากจะนำโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ

หรือ *Lactobacillus plantarum* IG-3 ผสมกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 สามารถผลิตเซลล์โปรไบโอติกได้สูงถึง 11 log CFU/ml โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 18 - 24 ชั่วโมง หรือมีเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 4 - 5 log CFU/ml ซึ่งนับว่าเร็วมากและสูงกว่ากลุ่มที่ใช้อัตราส่วน 3 ต่อ 1 อย่างชัดเจน แต่ในขณะเดียวกันพีเอชใน culture broth ก็ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งการใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 ในการเติม inoculum นับว่าช่วยให้ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วขึ้นระดับหนึ่ง ทำให้สามารถใช้แลคเตดที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น จนพีเอชเพิ่มขึ้นประมาณ 5.5 -6.0 ซึ่งสูงพอที่จะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ ดังนั้นถ้ามีการปรับสภาวะการหมักและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม ก็อาจจะทำให้การผลิตโปรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีประสิทธิภาพดีกว่านี้ โดยเฉพาะการใช้ fed-batch culture แม้ว่าขณะนี้ปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนาน 54 ชั่วโมง จะมีค่าต่ำกว่าที่ 18-24 ชั่วโมง (มีเซลล์ที่เจริญประมาณ 9-10 log CFU/ml) ก็ตาม ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการขาดแหล่งคาร์บอนและสิ่งที่จำเป็นอื่นๆ เพราะการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้วิธี batch culture สำหรับสาเหตุที่พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกผสมกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ที่สามารถใช้แลคเตดในการเจริญ มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่ผลิตได้และค่าพีเอชของ culture broth สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบผสมรวมหรือไม่ร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 นั้นอาจเกิดเนื่องจาก *C. krusei* MB-1 ช่วยกำจัดกรดแลคติกในระหว่างการหมัก หรือ *C. krusei* MB-1 ทำให้เกิดกิจกรรมอะซิโตนที่ช่วยกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสารดังกล่าวก็เป็นสารหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของโปรไบโอติกได้ หรือยีสต์อาจจะผลิตวิตามิน กรดอะมิโนและปัจจัยในการเจริญอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของโปรไบโอติก (Cheirsilp *et al.*, 2003b)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2 และ/หรือ *Lactobacillus plantarum* IG-3 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกกับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้แลคเตดในการเจริญ เพื่อผลิตโปรไบโอติกเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะหมักไม่ให้ต่ำเกินไป ส่งผลทำให้โปรไบโอติกสามารถเจริญต่อไปได้ และได้จำนวนเซลล์มีชีวิตที่จะใช้ผสมในอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบผสมรวมกับเชื้อยีสต์นี้สามารถแก้ปัญหาการสะสมของกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เช่นเดียวกับการเติมสารละลายด่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันทั่วไป แต่บางครั้งการเติมด่างถึงแม้ว่าจะเป็นการช่วยปรับพีเอชแต่ก็อาจทำให้ผลผลิตของเซลล์ลดลง อันเนื่องมาจากความดันออสโมติก ประกอบกับปัจจุบันมนุษย์สนใจเรื่องความปลอดภัยของสุขภาพ

มากขึ้นโดยจะเน้นใช้ผลิตภัณฑ์ต่างๆที่มาจากธรรมชาติ ดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมนี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้แทนสารละลายต่าง เนื่องจากเป็นลักษณะการใช้สิ่งมีชีวิตเข้าควบคุมกันเอง (biological control) และไม่มีผลกระทบจากสารตกค้างเมื่อนำไปผสมในอาหารสัตว์ นอกจากนี้เชื้อยีสต์ดังกล่าวยังอาจช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์ได้เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีโปรตีนสูง เป็นแหล่งวิตามินและปัจจัยการเจริญที่ไม่ทราบชนิด (unknown growth factor) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสิ่งที่เป็ประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์อีกด้วย (คณิงนิจ, 2540)

4. การทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

แบคทีเรียกรดแลคติกหรือโปรไบโอติกที่ผลิตในการทดลองนี้มีทั้งโปรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกตั้งแต่หนึ่งและสองสายพันธุ์ผสมกัน หรือเชื้อผสมชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกผสมกับยีสต์ ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 และ 3 ต่อ 2 และเพื่อให้แน่ใจว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ได้จริง โดยไม่ต้องกังวลว่ายีสต์ที่ปะปนอยู่ในขั้นตอนการผลิตจะไปใช้กรดที่โปรไบโอติกสร้างขึ้น ขณะที่อยู่ในทางเดินอาหารของไก่ จนปริมาณกรดที่ผลิตได้น้อยเกินกว่าจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารซึ่งเป็นเป้าหมายหลักที่ต้องการใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารไก่ ดังนั้นการทดลองต่อไปนี้ต้องการทดลองนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในแบบเชื้อผสมและเชื้อเดี่ยว จากข้อ 3 มาศึกษาความสามารถในการทนกรดและทนน้ำดีของไก่ โดยใช้สภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่แทนการเลี้ยงไก่กระทองจริงและตรวจสอบการรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ปะปนอยู่ ดังต่อไปนี้

4.1 การทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้

จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่จะนำไปใช้เสริมในอาหารไก่กระทองควรมีชีวิตรอดได้ในกระเพาะอาหารของไก่ที่มีค่าพีเอชต่ำอันเนื่องจากกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) ที่มีความเข้มข้นสูงในน้ำย่อยที่หลั่งออกมา (Charalampopoulos *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นสิ่งที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประเภทแรกในระบบทางเดินอาหาร (รุจา, 2544) โดยในระบบทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่กระเพาะพัก กระเพาะแท้ จนถึงกระเพาะบด อยู่ในสภาพเป็นกรด มีช่วงพีเอช 2.6 – 4.5 (วิโรจน์, 2538 ; Lin *et. al.*, 2007) ดังนั้นโปรไบโอติกจึงควรทนกรดได้ดี โดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้

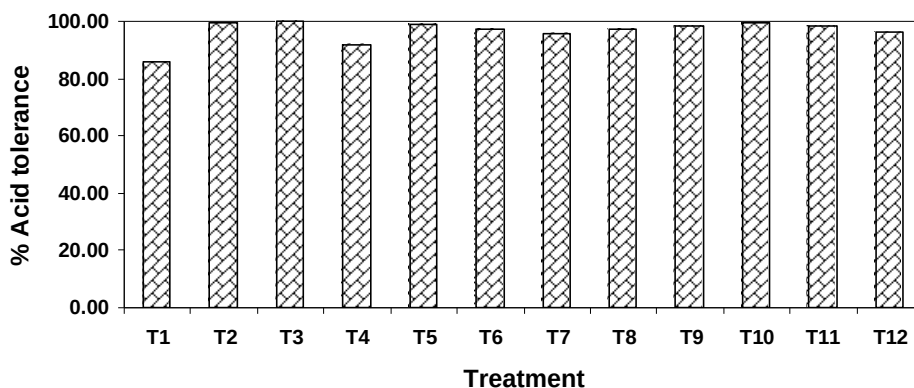
ที่พีเอช 3.0 หรือต่ำกว่าได้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหาร (O'Sullivan *et al.*, 2002) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรดของโปรไบโอติกทั้ง 12 กลุ่มการทดลอง ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถใช้แลคเตคในการเจริญ หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยการจำลองสภาวะกรดในกระเพาะอาหารของไก่ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ที่ปรับพีเอช 2.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิของไก่ (Hen's body) (ปฐม, 2540) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

4.1.1 การทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1

ผลการศึกษาความสามารถในการทนกรดในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารของไก่ โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกหลังจากบ่มในสารละลาย PBS พีเอช 2.5 และ พีเอช 7.2 (กลุ่มควบคุม) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ พบว่าโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อเดียวกับเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ทั้ง 12 กลุ่มการทดลอง (T1 – T12) มีความสามารถในการทนกรดได้ดี โดยทนได้ ตั้งแต่ 85.92 – 99.76 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดดังตารางผนวกที่ ค 1 และภาพที่ 33 โดยกลุ่มการทดลอง 5 อันดับแรกที่มีความสามารถในการทนกรดได้ดีที่สุด ได้แก่ *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1 (T3) , *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T2) , *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) , *L. plantarum* IG-3 (T5) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) ตามลำดับ โดยทนกรดได้ 99.76, 99.28, 99.20, 98.74 และ 98.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการศึกษายังพบว่า โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (T2 – T4) ทำให้โปรไบโอติกมีความสามารถในการทนกรดได้ดีกว่าโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยว โดยโปรไบโอติกกลุ่มเชื้อผสมสามารถทนกรดอยู่ในช่วง 91.86 – 99.76 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Ent. faecium* PR-2 เพียงสายพันธุ์เดียว (T1) ทนกรดได้เพียง 85.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 ที่ผลิตโดยใช้เชื้อ

ผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (T6 – T8) พบว่า ทนกรดได้น้อยกว่าโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยวเพียงเล็กน้อย โดยกลุ่มที่ผลิตโดยใช้ *L. plantarum* IG-3 แบบเชื้อเดี่ยว (T5) ทนกรดได้ 98.74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยเชื้อผสมทนกรดอยู่ในช่วง 95.40–97.24 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T11) ทนกรดได้ 98.26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) ที่ทนกรดได้ 98.61 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรไบโอติกชนิดเชื้อผสมระหว่าง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) สามารถทนกรดได้สูงกว่าโดยทนกรดได้ 99.20 เปอร์เซ็นต์ แต่เชื้อผสมระหว่าง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefyr* KN-2 (T12) ทนกรดลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) โดยทนกรดได้ 96.40 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 33 ความสามารถในการทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

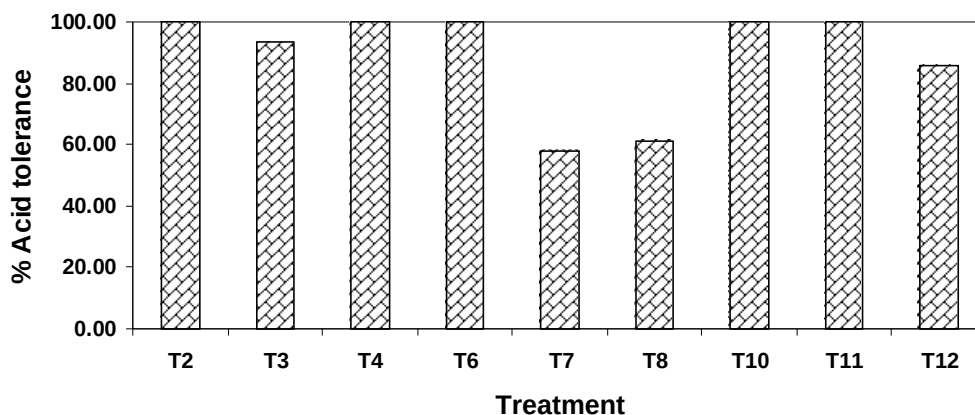
T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่ พบว่ายีสต์สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารของไก่ได้ ตั้งแต่ระดับปานกลางจนถึงดี โดยทนกรดได้ตั้งแต่ 58.06 – 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 34 และตารางผนวกที่ ค 2



ภาพที่ 34 ความสามารถในการทนกรดของยีสต์ (ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติก) เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

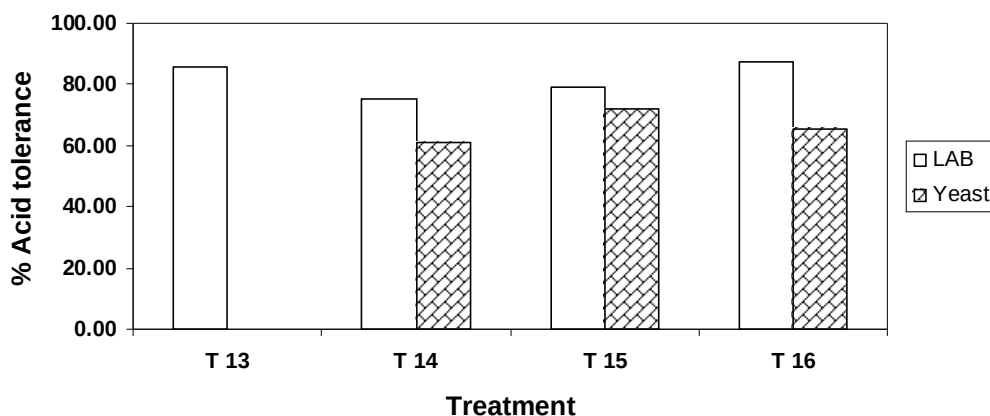
T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

4.1.2 การทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมแบบไม่รวมหรือรวมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2

ผลการศึกษาความสามารถในการทนกรดของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 ภายหลังจากบ่มในสถานะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกแบบผสมรวมกับยีสต์มีเพียงกลุ่มการทดลองเดียวเท่านั้น คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) ที่สามารถทนกรดได้ดีกว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการผสมโปรไบโอติกสองสายพันธุ์รวมกัน (T13) คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 โดยทนกรดได้ 87.12 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) ทนกรดได้ 85.59 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) และ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) ทนกรดได้ 78.99 และ 75.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 35 และตารางผนวกที่ ค 3

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนกรดของยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ที่ผสมอยู่ในโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3 หรือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 ในสถานะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิต *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) ทนกรดได้ดีที่สุดคิดเป็น 72.18 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิต *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T16) และ *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิต *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) ทนกรดได้ 65.15 และ 60.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 35 และตารางผนวกที่ ค 4



ภาพที่ 35 ความสามารถในการทนกรดของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง

โปรไบโอติกและยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 เมื่อบ่มในสภาวะจำลองกรด
ในกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 13 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 14 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 15 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 16 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

เมื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้หลังบ่มในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่ โดยเปรียบเทียบระหว่าง โปรไบโอติกที่ผลิตได้แบบเชื้อเดี่ยว และแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ในอัตราส่วนระหว่าง 3 ต่อ 1 และ 3 ต่อ 2 พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกผสมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงถึง 88.55 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ ค 1) ในขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกผสมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตสูงเช่นกัน คือ 77.17 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ ค 3) นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการรอดชีวิตจากสภาวะกรดในกระเพาะอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์ส่วนใหญ่ ทำให้โปรไบโอติกที่ผลิตได้รอดชีวิตได้มากกว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้แบบเชื้อเดี่ยว เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากโปรไบโอติกใช้เซลล์ยีสต์ที่ตายเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญ นอกจากนี้ยังมี

รายงานว่ อัตราการอยู่รอดของโปรไบโอติกในกระเพาะอาหารอาจจะเพิ่มขึ้นได้เนื่องจากมีอาหารอยู่จำนวนมากในกระเพาะอาหารซึ่งส่งผลต่อค่าพีเอชและอาจช่วยป้องกันโปรไบโอติกจากเปปซินและกรดในกระเพาะอาหาร (Berrada, 1991 ; Conway *et al.*, 1987) ซึ่งในการทดลองนี้ยีสต์อาจจะทำหน้าที่คล้ายกับอาหารที่อยู่ในกระเพาะของเจ้าบ้าน (host) กล่าวคือ ยีสต์อาจช่วยป้องกันการถูกทำลายของโปรไบโอติกจากกรดไฮโดรคลอริกให้มีความรุนแรงน้อยลง

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งแบบเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ทั้งสองอัตราส่วน ยังคงมีรอดชีวิตได้ในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่ ซึ่งเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งที่สำคัญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ทั้งนี้เนื่องจากน้ำย่อยกระเพาะอาหาร (gastric juice) ของไก่เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีสภาพเป็นกรดโดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำ ส่วนที่เหลือเป็นกรดไฮโดรคลอริก(กรดเกลือ) เกลือบางชนิด น้ำย่อยเปปซิน (pepsin) และมิวซิน (mucin) โดยไก่จะหลั่งไฮโดรคลอริกออกมาถ้ากินน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ได้มากกว่ามนุษย์และสัตว์ทดลองอื่นๆหลายชนิด โดยสัตว์ปีกนั้นเปปซิน (pepsin) และกรดไฮโดรคลอริกจะถูกผลิตจากเซลล์เดียวกัน คือ Oxynticopeptic cell ซึ่งหน้าที่ของเปปซิน คือ ย่อยโปรตีนให้เป็นเปปโตน (peptones) รวมทั้งโพลีเปปไทด์ (polypeptide) และทำงานได้ดีเมื่อพีเอชของกระเพาะอาหารเท่ากับ 1.5-2.0 ถ้าพีเอชเท่ากับ 4.5 จะทำงานได้ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดไฮโดรคลอริกมีหน้าที่ช่วยเปลี่ยนเปปซิโนเจน (pepsinogen) ให้กลายเป็นเปปซินและเปลี่ยนโปรเรนนิน (prorennin) ให้เป็นเรนนิน (rennin) ช่วยในการปรับระดับความกรด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเปปซินและเรนนิน นอกจากนี้ยังช่วยทำลายเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะอาหาร (วิโรจน์, 2538) สำหรับการยับยั้งที่เกิดจากกรดนี้ เกิดจากในสภาวะที่เป็นกรดพีเอชภายในเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกควบคุมโดยกลไกต่าง ๆ ที่สำคัญคือ การขับโปรตอนออกจากเซลล์ โดยใช้พลังงาน ATP จากการทำงานของเอนไซม์ ATPase การขับโปรตอนออกจากเซลล์นี้ทำให้แบคทีเรียสูญเสียพลังงานที่ใช้สำหรับการเจริญไปเป็นจำนวนมาก และเมื่อเกิดการสะสมของกรดจนถึงจุดหนึ่งจะเกิดกลไกการควบคุมทางชีวภาพ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีไกลโคไลซิส ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญ (Charalampopoulos *et al.*, 2003)

4.2 การทนนํ้าดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้

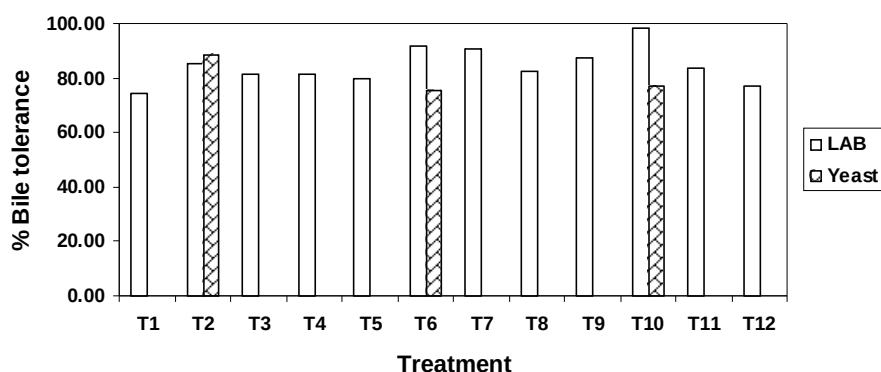
การรอดชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในระหว่างการเดินทางผ่านเข้าไปในทางเดินอาหาร นอกจากจะขึ้นอยู่กับความเป็นกรดดังแล้ว นํ้าดีก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยนํ้าดีมีลักษณะเป็นเมือกสีเขียวปนเหลือง มีสภาพเป็นด่างเล็กน้อยมีรสขม ประกอบด้วยเกลือ (bile salts) รังควัตถุ (bile pigment) คอลเลสเตอรอล (cholesterol) และไขมันอื่นๆ โดยนํ้าดีถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตับและส่งไปเก็บไว้ที่ถุงนํ้าดี ปกติ นํ้าดีของไก่จากถุงนํ้าดีจะมีค่า พีเอช 5.9-6.8 ขึ้นกับพันธุ์ไก่นั้นๆ เมื่อมีอาหารเข้าสู่ลำไส้เล็กถุงนํ้าดีจึงจะส่งนํ้าดีไปเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) สำหรับหน้าที่ของนํ้าดีช่วยทำให้ไขมันแตกตัวเล็กลงให้อยู่ในรูป emulsion โดยการลดความตึงผิว (surface tension) ของอนุภาคไขมัน นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสภาพเป็นด่างในลำไส้ (วิโรจน์, 2538; Hofman and Mysels, 1992) นํ้าดีเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์เนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมันทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยนํ้าดี (Erkkila and Petaja, 2000) ดังนั้นความสามารถในการทนนํ้าดีในลำไส้ของไก่จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการอยู่รอดของโปรไบโอติก ซึ่งความเข้มข้นของนํ้าดีที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนนํ้าดี คือ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (กำหนดโดย Gilliland *et al.*, 1984)

4.2.1 การทนนํ้าดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1

เมื่อนำโปรไบโอติกทั้ง 12 กลุ่มทดลอง (T1-T12) ที่รอดชีวิตหลังจากบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ซึ่งเป็นสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารของไก่) มาทดสอบความสามารถในการทนนํ้าดีต่อ โดยนำเชื้อดังกล่าวมาบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติมและไม่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (นํ้าหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 18 และ 36 ชั่วโมง เพื่อเป็นการจำลองสภาวะนํ้าดีในลำไส้ของไก่

เมื่อพิจารณาผลการทนนํ้าดีของโปรไบโอติก โดยการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ลดลงระหว่างการบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ กับไม่เติม ox bile และบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ทั้ง 12 กลุ่มการทดลอง ทนนํ้าดีได้ดี

คิดเป็น 74.10 – 98.24 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 36 และตารางผนวกที่ ค 5 โดยกลุ่มการทดลอง 5 อันดับแรกที่สามารถทนน้ำดีได้มากที่สุด คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10), *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T6), *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1(T7), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) และ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T2) โดยสามารถทนน้ำดีได้ 98.24, 91.86, 90.74, 87.35 และ 85.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 36 ความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี เป็น เวลา 18 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

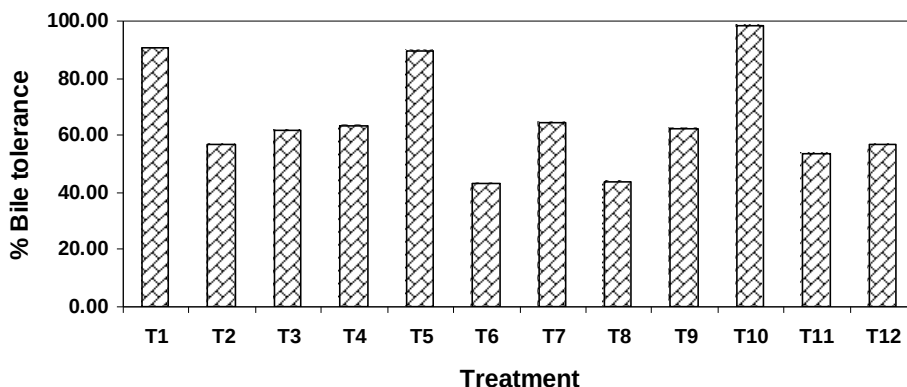
T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาความสามารถในการทนน้ำคืของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 (T1), *L. plantarum* IG-3 (T5) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) เปรียบเทียบกับโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อผสมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ คือ *C. krusei* MB-1, *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 พบว่า การผลิตโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 โดยใช้เชื้อผสมกับยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ (T2-T4) ทำให้เชื้อ *Ent. faecium* PR-2 ทนน้ำคืหลังจากบ่มไว้ 18 ชั่วโมง ได้ดีกว่าการผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยว (T1) โดย *Ent. faecium* PR-2 ที่ผลิตโดยใช้ผสมกับยีสต์ (T2 - T4) ทนน้ำคืได้ 81.24 -85.43 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Ent. faecium* PR-2 (T1) ที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว ซึ่งทนน้ำคืได้ 74.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการผลิต *L. plantarum* IG-3 โดยใช้เชื้อผสมร่วมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (T6-T8) ทำให้ *L. plantarum* IG-3 ทนน้ำคืได้ดีกว่า *L. plantarum* IG-3 ที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว (T5) โดย *L. plantarum* IG-3 ที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวทนน้ำคืได้ 79.53 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อผสมร่วมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (T6 – T8) ทนน้ำคืได้ 82.46 – 91.86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อผสมสองสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) ทนน้ำคืได้ดีกว่าโปรไบโอติกแบบผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. sphaerica* KN-1 (T11) และ *C. kefir* KN-2 (T12) ยกเว้นแบบผสมร่วมกับ *C. krusei* MB-1(T10) ซึ่งทนน้ำคืได้ 98.24 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรไบโอติกแบบเชื้อผสมสองสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) ทนน้ำคืได้ 87.35 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดดังตารางผนวกที่ ค 5

เมื่อพิจารณาผลการทนน้ำคืของยีสต์ที่ผสมอยู่กับโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3 หรือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 พบว่ามีเพียง *C. krusei* MB-1 สายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่สามารถทนน้ำคืได้ ในขณะที่สายพันธุ์อื่นๆตาย โดยเมื่อบ่มในสภาวะน้ำคืเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทนน้ำคืได้ 75.20 - 88.35 เปอร์เซ็นต์ (ดังภาพที่ 36 และตารางผนวกที่ ค 6)

ผลการศึกษาการทนน้ำคืโดยการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ลดลงระหว่างการบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ กับไม่เติม ox bile บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ทั้ง 12 กลุ่มการทดลอง (T1 – T12) ทนน้ำคืได้ ในระดับปานกลางจนถึงดี คิดเป็น 42.96-98.25 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 37 โดยกลุ่มการทดลอง 5 อันดับแรกที่สามารถ

ทนน้ำดีได้มากที่สุด คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10), *Ent. faecium* PR-2 (T1), *L. plantarum* IG-3 (T5), *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T7) และ *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2 (T4) คิดเป็น 98.25, 90.76, 89.42, 64.60 และ 63.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 37 ความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี เป็น เวลา 36 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

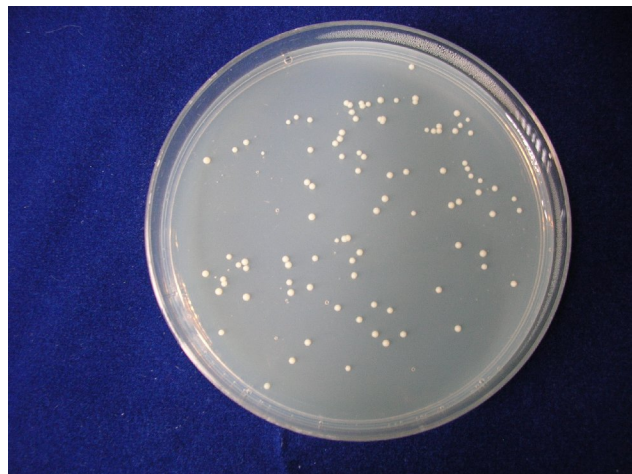
T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

จากผลการศึกษาเมื่อพิจารณาความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้แบบเชื้อเดี่ยวแต่ละสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 (T1), *L. plantarum* IG-3 (T5) และเชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) เปรียบเทียบโปรไบโอติกที่ผลิตได้แบบเชื้อผสมร่วมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ คือ *C. krusei* MB-1, *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 เมื่อบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวทนน้ำดีได้มากกว่าแบบผสมกับร่วมกับเชื้อยีสต์ โดยเชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 ร่วมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (T2-T4) ทนน้ำดี 56.93 - 63.52 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Ent. faecium* PR-2 ที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว (T1) ทนน้ำดีได้ ถึง 90.76 เปอร์เซ็นต์ และ *L. plantarum* IG-3 ที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยว (T5) ทนน้ำดีได้ 89.42 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อผลิตโดยใช้เชื้อผสมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (T6 - T7) พบว่า ความสามารถในการทนน้ำดีของโปรไบโอติกลดลงโดยทนน้ำดีได้ 42.96 - 64.60 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อผสมโปรไบโอติก *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) ทนน้ำดีได้ดีกว่าแบบผสมร่วมกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. sphaerica* KN-1 (T11) และ *C. kefir* KN-2 (T12) ยกเว้น โปรไบโอติกที่ผลิตแบบผสมกับ *C. krusei* MB-1 (T10) ซึ่งทนน้ำดีเท่ากับ 98.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) ทนน้ำดีได้ 62.08 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางผนวกที่ ๗

เมื่อศึกษาการทนน้ำดีของยีสต์ที่ผสมอยู่ในโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 หรือ *L. plantarum* IG-3 หรือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 พบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ไม่สามารถทนน้ำดีได้ที่เวลา 36 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการนำเซลล์ของจุลินทรีย์มาทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่อย่างต่อเนื่อง กล่าวคือ นำเชื้อยีสต์ที่รอดชีวิตจากการทดสอบในสภาวะจำลองกรดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาบ่มต่อในอาหาร MRS broth ที่เติมน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 และ 36 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์ยีสต์ดังกล่าวถึงแม้ว่าจะมีชีวิตรอดจากกรด แต่อาจมีเซลล์บางส่วนเป็นเซลล์บาดเจ็บหรือเซลล์อาจจะลักษณะเปลี่ยนแปลงไปซึ่งจากผลการศึกษาการทดสอบคุณสมบัติของยีสต์ในสภาวะกรดที่ผ่านมาข้างต้นถึงแม้ว่ายีสต์จะมีเซลล์ที่รอดชีวิตในจำนวนที่ค่อนข้างสูง แต่พบว่า ก่อนทดสอบในสภาวะจำลองกรดโคโลนีของเชื้อยีสต์มีลักษณะกลมและขนาดใหญ่ ดังภาพที่ 38 แต่ภายหลังการบ่มเชื้อยีสต์ในสภาวะกรดพบว่า โคโลนีของเชื้อมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด ดังภาพที่ 39 ดังนั้นเมื่อนำเชื้อยีสต์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในสภาวะน้ำดีต่อซึ่งสภาวะดังกล่าวอาจทำให้เกิดความเครียดอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ยีสต์เจริญได้น้อยประกอบกับการบ่มในสภาวะไร้อากาศจึงส่งผลให้ยีสต์ตาย

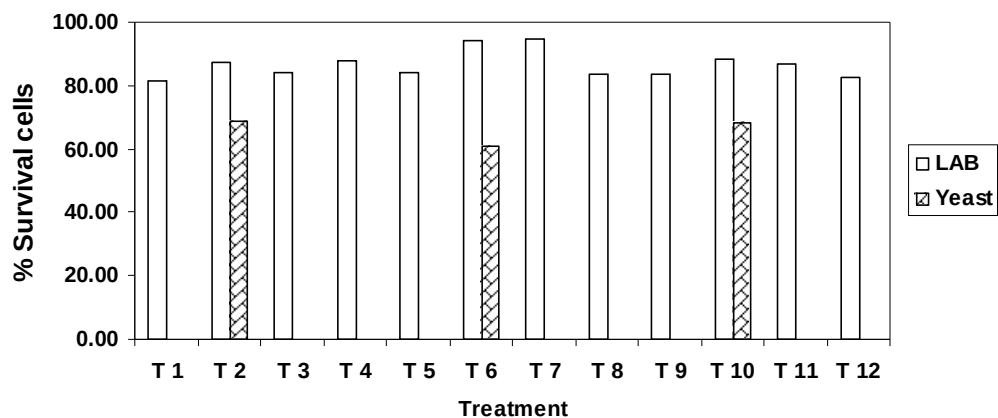


ภาพที่ 38 ลักษณะ โคลนิจของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 บนอาหาร PDA (ก่อนนำเชื้อไปทดสอบในสภาวะจำลองความเป็นกรดในกระเพาะอาหารของไก่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ)



ภาพที่ 39 ลักษณะ โคลนิจของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* MB-1 ที่รอดชีวิต บนอาหาร PDA (หลังจากนำเชื้อไปบ่มใน PBS พีเอช 2.5 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งจำลองมาจากสภาวะกรดในกระเพาะอาหารของไก่)

เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งจากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและแบบผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับเชื้อยีสต์ที่ใช้แยกเตตในการเจริญ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ตลอดจนผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่กรดในกระเพาะอาหาร (3 ชั่วโมง) จนถึงสภาวะน้ำดี (18 ชั่วโมง) พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในระดับคิดเป็น $81.74 - 94.55$ เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 40 และตารางผนวกที่ ค 8 โดยโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าแบบเชื้อเดี่ยว แต่เมื่อบ่มในสภาวะน้ำดีจนถึง 36 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในระดับปานกลางถึงดีมากคิดเป็น $44.40 - 100$ เปอร์เซ็นต์ โดยโปรไบโอติกที่ผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยว (T1 และ T5) และแบบผสมโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ (T9) มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าโปรไบโอติกที่ผลิตแบบผสมร่วมกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ยกเว้นการเพาะเลี้ยงแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) ที่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) แต่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 (T1) และ *L. plantarum* IG-3 (T5) โดยการเพาะเลี้ยงแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T10) มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 (T1) และ *L. plantarum* IG-3 (T5) มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน ดังภาพที่ 41 และตารางผนวกที่ ค 8 นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการจำลองสภาวะทางเดินอาหารของไก่ ยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์เดียว ที่สามารถมีชีวิตรอดหลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี 18 ชั่วโมง ($60.83 - 68.59$ เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบการเจริญเมื่อบ่มในสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ตารางผนวกที่ ค 9)



ภาพที่ 40 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระทงตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

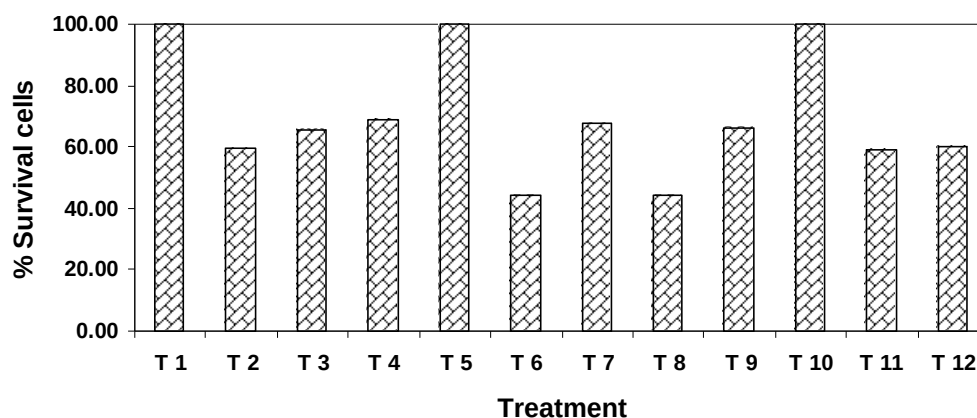
T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2



ภาพที่ 41 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมที่ไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 หลังผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระทงตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 1 = *Ent. faecium* PR-2

T 2 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 3 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. sphaerica* KN-1

T 4 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. kefir* KN-2

T 5 = *L. plantarum* IG-3

T 6 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 7 = *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 8 = *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

T 9 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 10 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

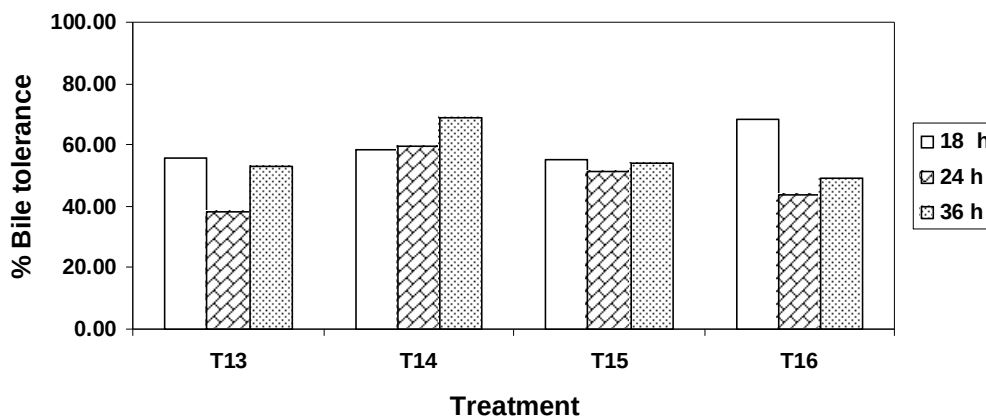
T 11 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1

T 12 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2

ผลการศึกษาที่ได้จะเห็นได้ว่าโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ คือ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 มีความสามารถในการทนน้ำดีในสภาวะจำลองที่ทดสอบได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Jin *et al.* (1998) ที่รายงานว่า *Lactobacillus* ทั้ง 12 สายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ทนน้ำดีได้ จากการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro* ในอาหาร MRS broth ที่เติมน้ำดีไก่สกัดความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Yu and Tsen (1993) รายงานว่า *L. fermentum* ที่แยกได้จาก กระต่ายและสัตว์ปีกมีความสามารถในการทนน้ำดีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และ Tsai *et al.* (2005) รายงานว่า *L. acidophilus* LAP5 และ *L. fermentum* LF33 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของสุกรและลำไส้ของสัตว์ปีกสามารถทนน้ำดีได้เมื่อบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox gall ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ได้ ถึงแม้ว่ากลไกการทนน้ำดีของ *Lactobacillus* จะไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่คาดว่าเกิดจากผนังเซลล์ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันน้ำดี (Charteris *et al.*, 1998) จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายน้ำดีได้โดยอาศัยเอนไซม์ไบล์ซอลต์ไฮโดรเลส (bile salt hydrolase; BSH) ซึ่งช่วยลดความสามารถในการละลายของน้ำดีและทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของน้ำดีลดลง (Erkkila and Petaja, 2000) และมีรายงานว่า แบคทีเรียหลายสายพันธุ์รวมถึง *Lactobacillus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ BSH (Gilliland and Speck, 1977)

4.2.2 การทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมแบบไม่รวมหรือร่วมกับเชื้อยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2

ผลการศึกษาการทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 ในสภาวะจำลองน้ำดีที่เวลาต่างๆ คือ 18, 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 18 ชั่วโมง โปรไบโอติกแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 ร่วมกับ *C. krusei* MB-1 (T16) ทนน้ำดีได้มากที่สุด คือ 68.10 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) และ *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) คิดเป็น 58.24, 55.93 และ 55.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 42 และตารางผนวกที่ ค 10



ภาพที่ 42 การทนน้ำดีของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่ร่วมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี เป็นเวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 13 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 14 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 15 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 16 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

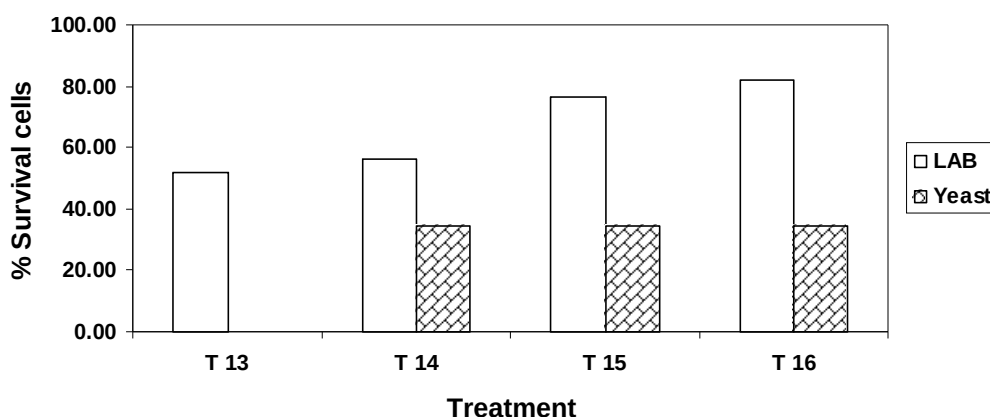
เนื่องจากผลการทดสอบการทนน้ำดีของ *Candida krusei* MB-1 ที่ผสมอยู่ในโปรไบโอติกซึ่งผลิตโดยการเพาะเลี้ยงแบบผสมกับโปรไบโอติกในอัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 พบว่า เมื่อบ่มเชื้อในสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ยีสต์ตายหมดเมื่อบ่มนาน 36 ชั่วโมง ดังนั้นไม่ทราบว่ายีสต์ตายเมื่อไร ในระหว่างการบ่มนาน 18 – 36 ชั่วโมง ดังนั้นการทดลองนี้เมื่อใช้อัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 จึงได้ทดสอบการทนน้ำดีของโปรไบโอติกและยีสต์เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพิ่มเติม ผลการศึกษาพบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตแบบใช้เชื้อผสมร่วมกับยีสต์ทุกกลุ่มการทดลอง (T14 – T16) ทนน้ำดีได้มากกว่าโปรไบโอติกแบบไม่ผสมร่วมกับยีสต์ (T13) โดยโปรไบโอติกแบบผสม *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) ทนน้ำดีได้มากที่สุด คิดเป็น 59.38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) ทนน้ำดีได้ 51.36,

43.88 และ 38.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังภาพที่ 42 และตารางผนวกที่ ค 11 และเมื่อบ่มในสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกแบบเชื้อผสม *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1(T14) ทนน้ำดีได้มากที่สุด คิดเป็น 68.96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) ซึ่งทนน้ำดีเท่ากับ 53.98, 52.77 และ 49.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 42 และตารางผนวกที่ ค 12 สำหรับสาเหตุที่โปรไบโอติกที่บ่มนาน 36 ชั่วโมง ทนน้ำดีได้สูงกว่าที่บ่มไว้ 24 ชั่วโมง นั้นอาจเกิดจากโปรไบโอติกสามารถปรับตัวได้ดีขึ้นและอาจใช้เซลล์โปรไบโอติกและยีสต์ที่ตายเป็นแหล่งอาหารจึงทำให้โปรไบโอติกบางส่วนสามารถเพิ่มจำนวนได้บ้าง ดังภาพที่ 42

เมื่อพิจารณาความสามารถในการทนน้ำดีของยีสต์ที่เวลา 18 ชั่วโมง พบว่า *C. krusei* MB-1 ที่ผสมอยู่ในโปรไบโอติกทุกกลุ่มการทดลอง (T14 – T16) ทนน้ำดีได้ในระดับปานกลาง คิดเป็น 63.33 – 68.00 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางผนวกที่ ค 13 และเมื่อบ่มในสภาวะจำลองน้ำดีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *C. krusei* MB-1 ที่ผสมอยู่กับโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 (T14) ไม่สามารถทนน้ำดีในระยะเวลาที่ทดสอบได้ส่งผลให้เซลล์ตาย ดังตารางผนวกที่ ค 14 ในขณะที่ *C. krusei* MB-1 ที่ผสมอยู่กับ *L. plantarum* IG-3 (T15) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T16) ยังคงสามารถทนน้ำดีได้ คิดเป็น 33.33 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มเชื้อดังกล่าวต่อจนถึงชั่วโมงที่ 36 พบว่า *C. krusei* MB-1 ไม่สามารถทนน้ำดีได้จึงส่งผลให้เซลล์ยีสต์ตายหมด

จากผลการศึกษาการผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 ผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS sucrose broth เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ตลอดจนนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้มาทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตจากการผ่านสภาวะความเครียดในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหาร (3 ชั่วโมง) จนถึงสภาวะน้ำดี 18 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์ (T14 – T16) มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยว (T13) โดยการเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตมากที่สุด คิดเป็น 81.93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15),

Ent. faecium PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) รอดชีวิต 76.24, 56.55 และ 51.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 43 และ ตารางผนวกที่ ค 15 และมีจำนวนเซลล์ *C. krusei* MB-1 รอดชีวิต 34.30 - 34.58 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ ค 16)



ภาพที่ 43 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังจากผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ กระทั่งตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 13 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

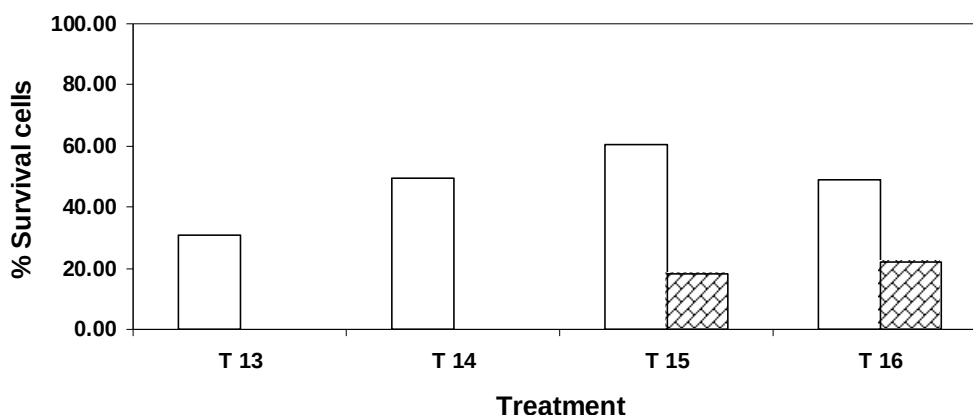
T 14 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 15 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 16 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

เมื่อบ่มโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองน้ำดีนานขึ้นเป็น 24 ชั่วโมงนั้นพบว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้แบบเชื้อผสมร่วมกับยีสต์ (T14 – T16) มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตมากกว่าโปรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยวเช่นเดียวกัน โดยเชื้อผสม *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตมากที่สุด คิดเป็น 60.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) ซึ่งรอดชีวิต 49.33, 48.89 และ 30.99 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ในขณะที่ *C. krusei* MB-1 รอดชีวิต 18.05 – 22.03 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 44 และตารางผนวกที่ ค 15 และ ค 16



ภาพที่ 44 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังจากผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่กระทงตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 13 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

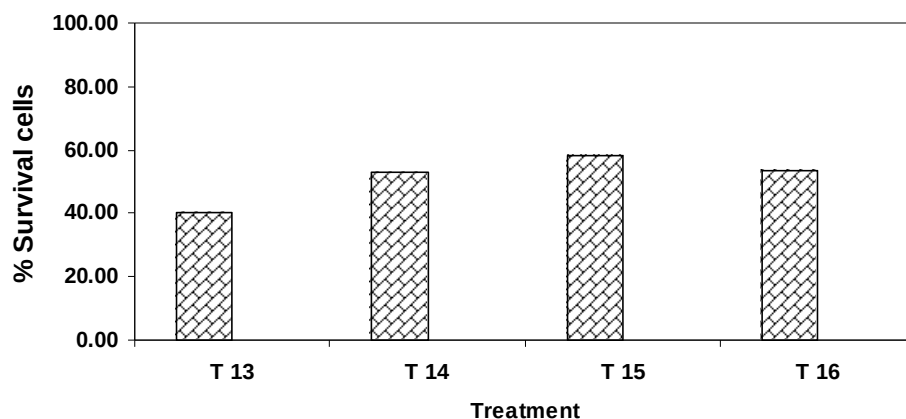
T 14 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 15 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 16 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

หากบ่มโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก็ยังพบว่าโปรไบโอติกแบบเชื้อผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าโปรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยว โดยเชื้อผสม *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) มีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกรอดชีวิตมากที่สุด คิดเป็น 58.31 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16), *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) ซึ่งรอดชีวิตได้ 53.33, 52.73 และ 40.29 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ไม่พบการเจริญ ดังภาพที่ 45 และตารางผนวกที่ ค 15 และ ค 16



ภาพที่ 45 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกและยีสต์ที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 หลังจากผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ กระทั่งตั้งแต่สภาวะกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึงสภาวะน้ำดี เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 13 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 14 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 15 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 16 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

จากผลการศึกษาคูณสมบัติการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ โดยการทดสอบในระบบจำลองสภาวะทางเดินอาหารของไก่นั้นตั้งแต่สภาวะกรดของกระเพาะอาหารจนถึงสภาวะน้ำดีในลำไส้ พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในระดับปานกลางจนถึงดี แต่ส่วนใหญ่อยู่ในระดับปานกลาง ทั้งนี้เนื่องจากถึงแม้ว่า การทดลองนี้เป็นการศึกษาในระดับหลอดทดลอง แต่ก็เป็นการจำลองสภาวะทางเดินอาหารของไก่ให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริง กล่าวคือ มีการนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ไปบ่มในสภาวะกรดซึ่งมีค่าพีเอช 2.5 หลังจากนั้นนำเซลล์ที่รอดชีวิตไปบ่มต่อในสภาวะน้ำดี ตลอดจนการทดลองได้ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ใน

สภาวะไร้อากาศ จึงอาจทำให้โปรไบโอติกที่ผลิตได้เกิดความเครียดอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ความเครียดจากกรดในกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นสิ่งที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประการแรกในระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้เซลล์บางส่วนที่ไม่สามารถทนสภาวะความเป็นกรดได้ตายและเซลล์บางส่วนที่รอดชีวิตได้รับบาดเจ็บ เมื่อนำเซลล์ที่รอดชีวิตเหล่านี้มาบ่มต่อในสภาวะจำลองน้ำดีซึ่งเป็นสภาวะต่อไปในระบบทางเดินอาหารที่มีผลต่อการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บและตายอย่างต่อเนื่อง แต่การทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของไก่ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารได้ แต่จากรายงานของนักวิจัยหลายท่านพบว่า *Lactobacillus plantarum* และ *Ent. faecium* เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ (Jin *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2004; Strompfova *et al.*, 2004; Maragkoudakis *et al.*, 2006; Bujalance *et al.*, 2007 and Ortu *et al.*, 2007) ประกอบกับในกระเพาะอาหารมีอาหารอยู่ด้วยจึงอาจช่วยให้เซลล์สัมผัสกับกรดโดยตรงน้อยลง จึงอาจทำให้หากนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ไปใช้กับสัตว์ทดลองจริง โปรไบโอติกอาจมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าการทดลองนี้ ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการทำนายอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ก่อนนำไปใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อเลี้ยงไก่ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองจริงได้ หากพบว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้มีจำนวนอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำเกินไป ก็อาจจะไม่ต้องนำไปใช้ในการนำไปเสริมในอาหารเพื่อเลี้ยงไก่ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองจริง ซึ่งทำให้เป็นการช่วยลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่ายต่างๆที่จะต้องสูญเสียเป็นจำนวนมากหากนำไปใช้ในสัตว์ทดลองจริง

4.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารจากโปรไบโอติกที่ผลิตได้

คุณสมบัติของโปรไบโอติกที่สำคัญอีกประการหนึ่ง นอกเหนือจากต้องมีชีวิตรอดหลังผ่านสภาวะที่รุนแรงในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ซึ่งได้แก่ การทนสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และการทนสภาวะน้ำดีในลำไส้แล้ว จุลินทรีย์โปรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มเอนเทอริกแบคทีเรีย (enteric bacteria) เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. หรือจุลินทรีย์ที่บุกรุก (invasion) แล้วก่อให้เกิดโรคในลำไส้ของสัตว์ได้ (Reque *et al.*, 2000 ; Dunne *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005; Angelis *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006) แบคทีเรียก่อโรคที่มักเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของไก่ส่วนใหญ่ ได้แก่ *Campylobacter*,

Escherichia coli และ *Salmonella* spp. การแบ่งตัวและแพร่จำนวนของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้จะไปขัดขวางกลไกการทำงานของเนื้อเยื่อภายในร่างกายสัตว์ แย่งดูดซึมสารอาหารจากสัตว์ และสร้างสารพิษที่สามารถทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์ ส่งผลเสียต่อการเจริญของสัตว์ และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรค (Garriga *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดอุปสรรคในการส่งออกเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ไปแข่งขันในตลาดโลก (Chansiripornchai *et al.*, 2000) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก จึงควรมีสมาธิยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกร่วมกับเชื้อยีสต์ที่ใช้แตกต่างกันในการเจริญแทนการใช้สารละลายต่าง ดังนั้นเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าหากนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ไปผสมในอาหารไก่ ยีสต์จะไม่ใช้กรดแลกติกที่แบคทีเรียกรดแลกติกหรือโปรไบโอติกผลิตขึ้นส่งผลให้พีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่อังคงต่ำอยู่ในระดับที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในไก่ได้ จึงได้นำส่วนใส (spent culture supernatant) ของโปรไบโอติกทั้งที่ผลิตได้แบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ (3 ต่อ 1) และ (3 ต่อ 2) ภายหลังการบ่มในสภาวะกรดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในสภาวะจำลองน้ำดีในระบบทางเดินอาหารของไก่ที่ระยะเวลาต่างๆ มาตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในไก่ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Salmonella* Enteritidis SOO3, *Salmonella* Typhi และ *Escherichia coli* ATCC 8739 ด้วยวิธี Agar well diffusion (Bevilacqua *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2005) และตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวโดยสังเกตจากความกว้างเฉลี่ยของบริเวณใสรอบๆ agar well ที่เกิดขึ้น

ผลการศึกษา โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 (T1 – T12) พบว่า ภายหลังการบ่มโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองน้ำดีเป็นเวลา 18 และ 36 ชั่วโมง โปรไบโอติกสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Sal.* Typhimurium DMST 16809 และ *Sal.* Typhi แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sal.* Enteritidis SOO3 และ *E. coli* ATCC 8739 โดยเมื่อบ่มโปรไบโอติกในสภาวะจำลองน้ำดี เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มี *Ent. faecium* PR-2 (T1) ซึ่งเป็นเชื้อเดี่ยวเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sal.* Typhimurium DMST 16809 และ *Sal.* Typhi ได้ โดยให้ความกว้างเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส 1.8 และ 0.9 เซนติเมตรตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบโปรไบโอติกที่บ่มในสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โปรไบโอติกชนิด

เชื้อผสม *L. plantarum* IG-3 (T2) , *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T6), *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T7), *L. plantarum* IG-3 + *C. kefir* KN-2 (T8) สามารถยับยั้ง *Sal. Typhimurium* DMST 16809 โดยให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส 1.5 – 1.6 เซนติเมตร ในขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Ent. faecium* PR-2 ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและผสมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (T1-T4) และ *L. plantarum* IG-3 (T2) และ *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T7) สามารถยับยั้งเชื้อ *Sal. Typhi* ได้ โดยโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 ทั้งที่ผลิตได้แบบเชื้อเดี่ยวและผสมร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (T1-T4) ยับยั้ง *Sal. Typhi* ได้ดีกว่า โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสส่วนใหญ่เท่ากับ 1.5 - 1.6 เซนติเมตร ในขณะที่โปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* IG-3 (T2) และ *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T7) มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเพียง 0.9 เซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ระหว่างโปรไบโอติกที่มีชีวิตรอดหลังจากการบ่มในสภาวะกรด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสภาวะน้ำดื่ยที่ระยะเวลาต่างๆ (18 และ 36 ชั่วโมง) เปรียบเทียบกับโปรไบโอติกที่รอดชีวิตจากการบ่มในสภาวะกรด แต่ไม่ได้บ่มในสภาวะน้ำดื่ย พบว่า กลุ่มที่ไม่ได้บ่มในสภาวะน้ำดื่ยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสอยู่ในช่วง 1.2 – 2.0 เซนติเมตร

ผลการศึกษากิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 (T 13 – T 16) หลังการบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสภาวะจำลองน้ำดื่ย เป็นเวลา 18 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์(ที่ใช้แอลกอฮอล์ในการเจริญ) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* DMST 16809, *Sal. Typhi*, *Sal. Enteritidis* SOO3 และ *E. coli* ATCC 8739 ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบได้ เช่นเดียวกับโปรไบโอติกที่บ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารนาน 3 ชั่วโมง แต่ไม่ได้บ่มในสภาวะจำลองน้ำดื่ย (กลุ่มควบคุม) โดยแต่ละกลุ่มการทดลองมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสหรือ inhibition zone ไม่แตกต่างกันมาก ดังตารางที่ 16 - 21 และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรไบโอติกที่ไม่ได้บ่มในสภาวะจำลองน้ำดื่ย (กลุ่มควบคุม) พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มควบคุม culture broth ที่ได้จากบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile มีค่าพีเอช 4.4 – 4.6 ในขณะที่ culture broth ที่ได้จากบ่มโปรไบโอติกในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile มีพีเอชประมาณ 5.5

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ วราภรณ์ (2550) ซึ่งตรวจสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* PR-2 และ *L. plantarum* IG-3 ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* O157:H7 DMST 12743, *Salmonella* sp.2, *Sal. Enteritidis* SOO3, *Sal. Typhimurium* DMST 16809 และ *Enterococcus faecalis* TISTR 379 ได้ ในขณะที่รุจา (2544) พบว่า *L. plantarum* CO-1 และ *L. plantarum* KO1 ซึ่งคัดแยกจากผักเสี้ยนคองและผักกูดคอง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* E002 และ *Sal. spp.* SOO3 ได้ ส่วน *Ent. faecium* KUPB 20 ที่แยกได้จากฟาร์มโคนมยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* E002 ได้ แต่ไม่ยับยั้ง *Sal. sp.* SOO3 และ Cosby *et al.* (1997) พบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากกระเพาะบดและไส้ติ่งของไก่ สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Salmonella Typhimurium* ได้ ในขณะที่ Murry *et al.* (2004) พบว่า *L. plantarum* และ *Ent. faecium* ที่คัดแยกได้จากโปรไบโอติกทางการค้าสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *Sal. Typhimurium* และ *Clostridium perfringens* ได้

เนื่องจาก Fuller and Brooker (1974) รายงานว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถรอดชีวิตในสารละลายที่มีพีเอชต่ำกว่า 4.5 เช่นเดียวกับ Barrow *et al.* (1980) ที่รายงานว่า กลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มถูกยับยั้งการเจริญเมื่อพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.5 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารกับอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติก 8 ระดับ ดังตารางที่ 22 ผลการศึกษาพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติก ตั้งแต่ 2.0 – 4.5 (C1-C6) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยพบว่าพีเอชของอาหาร MRS broth ที่ต่ำที่สุดจะยับยั้งการเจริญเชื้อได้มากที่สุด ดังภาพที่ 46

ตารางแสดงที่ 16 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ *Candida krusei* MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 18 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	พีเอชของอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile 0.3 %	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone) (cm)			
		<i>Sal.</i> Typhimurium DMST 16809	<i>Sal.</i> Typhi	<i>Sal.</i> Enteritidis SOO3	<i>E. coli</i> ATCC 8739
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 (T13)	5.50	1.20	1.30	1.10	1.05
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T14)	5.52	1.25	1.40	1.15	1.05
<i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T15)	5.52	1.30	1.30	1.10	1.15
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T16)	5.50	1.15	1.60	1.15	1.00

ตารางแสดงที่ 17 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ *Candida krusei* MB-1
 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3
 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 24 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	พีเอชของอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile 0.3 %	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone) (cm)			
		<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>E. coli</i>
		Typhimurium	Typhi	Enteritidis	ATCC 8739
		DMST 16809		SOO3	
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 (T13)	5.50	1.20	1.00	1.35	0.70
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T14)	5.50	1.10	1.10	1.30	1.10
<i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T15)	5.52	1.40	1.10	1.25	1.10
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T16)	5.51	1.25	1.10	1.20	1.10

ตารางแสดงที่ 18 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ *Candida krusei* MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 36 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	พีเอชของอาหาร MRS broth ที่เติม ox bile 0.3 %	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone)			
		(cm)			
		<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>E. coli</i>
		Typhimurium DMST 16809	Typhi	Enteritidis SOO3	ATCC 8739
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 (T13)	5.54	1.45	1.10	1.20	1.05
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T14)	5.54	1.25	1.10	1.15	1.20
<i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T15)	5.54	1.30	1.20	1.20	1.25
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T16)	5.56	1.20	1.30	1.20	1.10

ตารางแสดงที่ 19 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ *Candida krusei* MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 18 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	พีเอชของอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile 0.3 %	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone) (cm)			
		<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>E. coli</i>
		Typhimurium	Typhi	Enteritidis	ATCC 8739
		DMST 16809		SOO3	
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 (T13)	4.56	1.60	1.80	1.35	1.35
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T14)	4.58	1.40	1.60	1.45	1.50
<i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T15)	4.56	1.65	1.70	1.35	1.40
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T16)	4.62	1.50	1.60	1.45	1.55

ตารางแสดงที่ 20 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ *Candida krusei* MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 24 ชั่วโมง

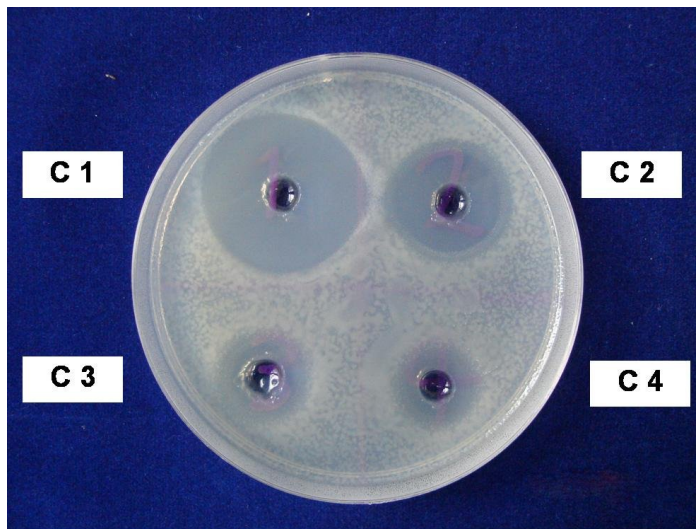
จุลินทรีย์	ฟีเอชของอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile 0.3 %	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง(inhibition zone) (cm)			
		<i>Sal.</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>Sal.</i>	<i>E. coli</i>
		Typhimurium		Enteritidis	ATCC 8739
		DMST 16809		SOO3	
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 (T13)	4.48	1.80	1.70	1.45	1.10
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T14)	4.52	1.70	1.70	1.45	1.40
<i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T15)	4.51	1.60	2.00	1.60	1.45
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T16)	4.52	1.65	1.50	1.55	1.25

ตารางแสดงที่ 21 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่ผลิตแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมร่วมกับ *Candida krusei* MB-1 หลังจากบ่มในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารของไก่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ นาน 36 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	พีเอชของอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile 0.3 %	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone) (cm)			
		<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>Sal.</i>	<i>E. coli</i>
		Typhimurium	Typhi	Enteritidis	ATCC 8739
		DMST 16809		SOO3	
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 (T13)	4.45	1.65	1.85	1.45	1.10
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T14)	4.44	1.70	1.70	1.50	1.40
<i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T15)	4.53	1.65	1.65	1.50	1.45
<i>Ent. faecium</i> PR-2 + <i>L. plantarum</i> IG-3 + <i>C. krusei</i> MB-1 (T16)	4.48	1.75	1.65	1.35	1.25

ตารางที่ 22 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารเมื่อทดสอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชระดับต่างๆ ด้วยกรดแลคติก

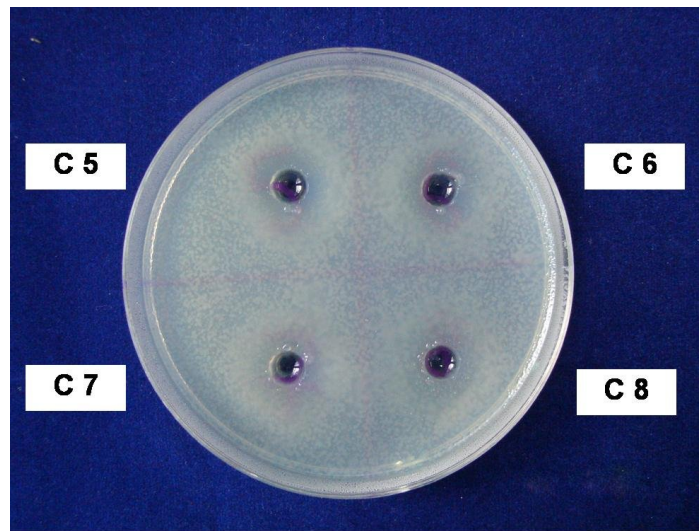
กลุ่มควบคุม	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone)			
	(cm)			
	<i>Sal. Typhimurium</i> DMST 16809	<i>Sal. Typhi</i>	<i>Sal. Enteritidis</i> SOO3	<i>E. coli</i> ATCC 8739
อาหาร MRS broth พีเอช 2.0 (C1)	3.70	3.20	3.70	3.70
อาหาร MRS broth พีเอช 2.5 (C2)	3.00	2.50	2.55	3.00
อาหาร MRS broth พีเอช 3.0 (C3)	2.25	1.70	1.75	2.20
อาหาร MRS broth พีเอช 3.5 (C4)	1.95	1.50	1.65	2.00
อาหาร MRS broth พีเอช 4.0 (C5)	1.55	1.30	1.45	1.70
อาหาร MRS broth พีเอช 4.5 (C6)	1.00	1.10	1.15	1.50
อาหาร MRS broth พีเอช 5.0 (C7)	-	-	-	-
อาหาร MRS broth พีเอช 5.5 (C8)	-	-	-	-



ภาพที่ 46 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809
เมื่อทดสอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกเท่ากับ 2.0 – 3.5

หมายเหตุ C1 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 2.0 ด้วยกรดแลคติก
C2 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 2.5 ด้วยกรดแลคติก
C3 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3.0 ด้วยกรดแลคติก
C4 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3.5 ด้วยกรดแลคติก

และเมื่อพีเอชของอาหาร MRS broth เพิ่มสูงขึ้นการยับยั้งเจริญของเชื้อจะลดน้อยลง ดังตารางที่ 22 และเมื่อพีเอชในอาหาร MRS broth มีค่า 5.0 และ 5.5 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังภาพที่ 47 ในขณะที่โปรไบโอติกที่มีชีวิตรอดจากสถานะจำลองทางเดินอาหารของไก่ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ ถึงแม้ว่าส่วนใสนำมาใช้ในการทดสอบได้มาจาก culture broth ที่ใช้ในการบ่มแบคทีเรียกรดแลคติกหรือโปรไบโอติก ในสถานะจำลองน้ำดีที่ระยะเวลาต่างๆ ซึ่งมีค่าพีเอชประมาณ 5.5 ดังภาพที่ 48



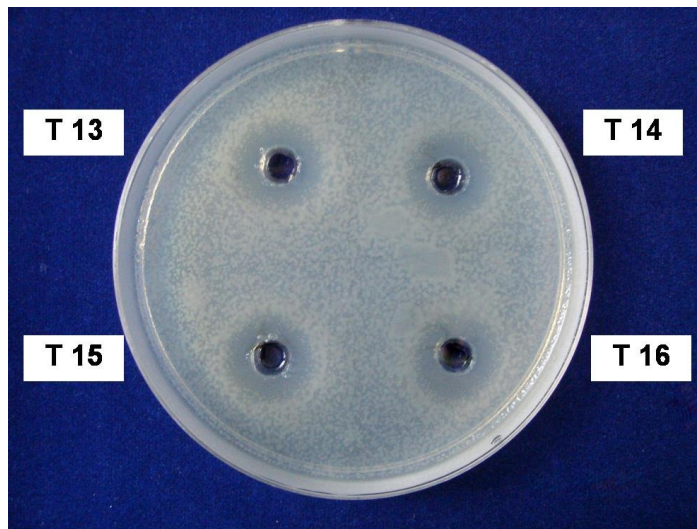
ภาพที่ 47 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809
เมื่อทดสอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกเท่ากับ 4.0 – 5.5

หมายเหตุ C5 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.0 ด้วยกรดแลคติก

C6 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดแลคติก

C7 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 ด้วยกรดแลคติก

C8 = อาหาร MRS broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 5.5 ด้วยกรดแลคติก



ภาพที่ 48 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809 เมื่อทดสอบด้วย โปรไบโอติกที่ผลิตได้ทั้งแบบเชื้อผสมที่ไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนแบคทีเรีย กรดแลคติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 2 ภายหลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

หมายเหตุ T 13 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3

T 14 = *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1

T 15 = *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

T 16 = *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1

สำหรับกลไกในการยับยั้ง *Salmonella* spp. และ *E. coli* ของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม ox bile สันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากกรดอินทรีย์เนื่องจากใน culture broth ที่นำมาใช้เป็นส่วนสับมีค่าพีเอช 4.4 – 4.6 ซึ่งกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นผลมาจากกรดอินทรีย์จะแตกตัวแล้วเข้าไปในเซลล์ของ *Salmonella* ในรูปของประจุบวกและลบ โดยประจุบวกเพิ่มความเป็นกรดในเซลล์ ทำให้เซลล์ต้องเสียพลังงานเพื่อรักษาความเป็นกรดค้างให้อยู่ในสภาพที่สมดุลส่วนประจุลบขัดขวางการสร้าง DNA ส่งผลให้เชื้อ *Salmonella* ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้จากผลกระทบดังกล่าวข้างต้นทำให้เชื้อไม่สามารถแบ่งตัวได้ รวมทั้งกลไกการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์หยุดลงและเชื้อแบคทีเรียถูกทำลายในที่สุด (นิวัตรและคณะ, 2546) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับ Fuller and Brooker (1974) ที่รายงานว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถรอดชีวิตในสารละลายที่มีพีเอชต่ำกว่า 4.5 เช่นเดียวกับ Barrow *et al.* (1980) ที่รายงานว่า กลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มถูกยับยั้ง

การเจริญเมื่อฟิเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.5 แต่เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกที่ผลิตได้หลังการบ่มในสภาวะจำลองน้ำดี ที่ระยะเวลาต่างๆ ที่ทดสอบซึ่ง culture broth ที่นำมาใช้เป็นส่วนสโม่ค่าฟิเอชประมาณ 5.5 ก็ยังคงสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. และ *E. coli* ได้จึงสันนิษฐานว่า ไม่น่าจะเกิดจากกรดแลคติกและไม่น่าจะเกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (สุริรัตน์, 2545) ซึ่งตลอดระยะเวลาในการทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ ตลอดจนการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้ทำการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกในสภาวะไร้อากาศตลอดการทดลอง ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่า ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบนั้น อาจเกิดจากการที่โปรไบโอติกสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แบคเทอริโอซินหรือสารที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน และ biosurfactants (Fernandez *et al.*, 2003) หรืออาจเกิดจากการที่ยีสต์มีการผลิตสารบางชนิดในระหว่างการเจริญขณะที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโปรไบโอติกหรือในระหว่างการบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่ จึงอาจจะต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบกลไกที่แน่ชัด

จากผลการศึกษาการที่โปรไบโอติกที่ผลิตได้ยังสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มักเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของไก่ ทำให้ส่งผลดีต่อการลดอัตราความเสี่ยงในการติดเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจาก *E. coli* จัดเป็นเชื้อหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ เพราะนอกจากจะก่อให้เกิดโรคและทำให้ไก่ตายแล้ว ยังมีผลเสียต่อการเจริญของลูกไก่และมีผลเสียต่อคุณภาพของซากไก่อีกด้วย (วรการและคณะ 2550ก) ทั้งนี้เกรียงศักดิ์ (2533) รายงานว่า ไก่กระตุมมีอัตราการเป็นโรคติดเชื้อจาก *E. coli* มากถึง 81 เปอร์เซ็นต์ในช่วงอายุ 25-32 วัน สำหรับ *Salmonella* spp. พบว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาในการส่งออกเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ไปแข่งขันในตลาดโลก เนื่องจากประเทศคู่ค้าจะไม่รับสินค้าที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ทั้งนี้เนื่องจากไก่และไข่ถูกจัดว่าเป็นแหล่งของเชื้อ *Salmonella* ที่สำคัญที่สุดแหล่งหนึ่ง เพราะไก่มีความชุก (prevalence) ในการติดเชื้อมากกว่าสูง กรอบกับการเลี้ยงจำนวนมากเพื่อการบริโภคทั่วโลก โดยโรคในไก่ที่เกิดจาก *Salmonella* spp. แบ่งออกเป็น 3 โรค ได้แก่ โรคไข้ขาว (pullorum disease) โรคไทฟอยด์ (fowl typhoid) และโรคพาราไทฟอยด์ (paratyphoid) ซึ่งเชื่อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคพาราไทฟอยด์ คือ *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium และเชื่อกลุ่มดังกล่าวยังส่งผลต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ โดยอาจ

ก่อให้เกิดอาการป่วยที่รุนแรงและอาจทำให้ผู้บริโภคละเลยชีวิตได้ (กัลยาและคณะ, 2549; Hirsh, 1999; Chansiripornchai *et al.*, 2000; Murry *et al.*, 2004) ดังนั้นการนำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ไปเสริมในอาหารไก่กระทงจึงอาจช่วยลดความเสี่ยงจากอัตราการติดเชื้อและอัตราการตายของไก่ที่เกิดจาก *Salmonella* spp. และ *E. coli* อีกทั้งยังช่วยให้ประเทศลดอัตราการสูญเสียมูลค่าการส่งออกเนื้อไก่ไปต่างประเทศได้ นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมสมรรถนะในการผลิตไก่ได้โดยไม่ทำให้เกิดการตกค้างของสารอันตรายในเนื้อไก่ที่ใช้เป็นอาหารมนุษย์ซึ่งจะสร้างความปลอดภัยด้านอาหาร (food safety) ให้แก่ผู้บริโภคอีกด้วย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถใช้แลกเตดในการเจริญจากตัวอย่างผักดอง ผลไม้และกีเฟอร์ บนอาหาร Lactate Ammonium sulfate agar พบยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถใช้แลกเตดได้ 18 ไอโซเลต จากนั้นทำการคัดเลือกยีสต์ 5 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการใช้แลกเตดมากที่สุด ได้แก่ OB-1, OB-2, MB-1, KN-1 และ KN-2 มาทดสอบความต้องการอากาศในการเจริญและการใช้แลกเตดของยีสต์ดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ 3 ไอโซเลต คือ MB-1, KN-1 และ KN-2 มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการควบคุมพีเอช เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงแบบผสมกับแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตโปรไบโอติกเนื่องจากเชื่อดังกล่าวเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ

2. เมื่อนำยีสต์ทั้งสามไอโซเลต คือ MB-1, KN-1 และ KN-2 มาจัดจำแนกด้วยชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32 C พบว่ายีสต์ไอโซเลต MB-1, KN-1 และ KN-2 เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Candida krusei*, *C. sphaerica* และ *C. kefir* ตามลำดับ โดยมีความคล้ายคลึงกับยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวเท่ากับ 97.8, 99.99 และ 99.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3. ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* PR-2, *Lactobacillus plantarum* IG-3 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกและยีสต์สามสายพันธุ์ คือ *Candida krusei* MB-1, *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth, MRS-lactose broth และ MRS-maltose broth พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกร่วมกับยีสต์เพื่อผลิตโปรไบโอติก คืออาหาร MRS-sucrose broth เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดี เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. sphaerica* KN-1 และ *C. kefir* KN-2 เจริญได้น้อย และ *C. krusei* MB-1 เจริญได้ปานกลาง ในขณะที่อาหาร MRS-lactose broth และ MRS-maltose broth เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีในอาหารเหลวดังกล่าว

4. ผลศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ ในอาหาร MRS-sucrose broth อย่างละเอียด โดยการเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการ

เจริญจำเพาะมากกว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ โดยเชื้อที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ *Ent. faecium* PR-2 , *L. plantarum* IG-3 , *C. sphaerica* KN-1, *C. kefyr* KN-2 และ *C. krusei* MB-1 โดยมีค่าเท่ากับ 0.780, 0.664, 0.314 , 0.313 และ 0.206 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อาหาร MRS-sucrose broth สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่สามารถใช้แลคเตดเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรไบโอติกต่อไป

5. ผลการศึกษาการผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมงโดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อยีสต์ 3 ต่อ 1 จำนวน 12 กลุ่มการทดลอง (T1 – T12) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า จำนวนโปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นสามอันดับแรก ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมระหว่าง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T9) มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 2.72 log CFU/ml รองลงมา คือ *Ent. faecium* PR-2 + *Candida krusei* MB-1 (T2) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. sphaerica* KN-1 (T11) โดยมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น 2.58 และ 2.49 log CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง โปรไบโอติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงที่เวลา 24 ชั่วโมงมากนัก แต่ก็มีบางกลุ่มการทดลองที่มีการเจริญของโปรไบโอติกลดลง และเมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชของ culture broth ที่เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า มีค่าพีเอชต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง ทุกกลุ่มการทดลอง

6. ผลการศึกษาการผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับ *C. krusei* MB-1 ในอาหาร MRS-sucrose broth เป็นเวลา 54 ชั่วโมงโดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อ *C. krusei* MB-1 (3 ต่อ 2) เพื่อให้ยีสต์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้นและสามารถใช้แลคเตดที่โปรไบโอติกผลิตขึ้นได้ทัน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์สูงสุดของโปรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง (T13 – T16) พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบผสม *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T15) มีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 4.85 log CFU/ml ใช้เวลาในการเจริญ 18 ชั่วโมง รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยง *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16), *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) และ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) โดยมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.79, 4.78 และ 3.97 log CFU/ml ตามลำดับ โดย *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 + *C. krusei* MB-1 (T16), *Ent. faecium*

PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) ใช้เวลาในการเจริญ 24 ชั่วโมง ขณะที่ *Ent. faecium* PR-2 + *C. krusei* MB-1 (T14) ใช้เวลาในการเจริญ 30 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 54 ชั่วโมง พบว่า culture broth ของเชื้อผสมโปรไบโอติกกับยีสต์ทั้งสามกลุ่มการทดลอง (T14 – T16) มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.67 – 6.00 ซึ่งสูงกว่า การเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยว (T13) ที่มีค่าพีเอชเพียง 4.83

7. ผลการศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ จากการเพาะเลี้ยงแบบผสม โปรไบโอติกกับยีสต์ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อยีสต์ (3 ต่อ 1) หลังผ่านการทดสอบ ในสถานะจำลองทางเดินอาหารของไก่ ตั้งแต่กรดในกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสถานะ น้ำดี เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูง คิดเป็น 81.74 - 94.55 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกแบบผสมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์นั้น มีผล ทำให้โปรไบโอติกมีชีวิตรอดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยวทุกกลุ่มการทดลอง ยกเว้นการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* IG-3+ *C. kefir* KN-2 (T8) และ *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3+ *C. kefir* KN-2 (T12) ที่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตต่ำกว่าเล็กน้อย ในขณะที่ พบว่า มีเพียงยีสต์สายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่รอดชีวิต คือ *C. krusei* MB-1 โดยรอดชีวิตคิดเป็น 60.83 – 68.59 เปอร์เซ็นต์ แต่หากบ่มในสถานะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โปรไบโอติกที่ผลิตได้มี จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในระดับปานกลางถึงดีมากคิดเป็น 44.04 - 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ยีสต์ทุกสายพันธุ์ไม่สามารถรอดชีวิตได้

8. ผลการศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม โปรไบโอติกแบบไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกต่อยีสต์ (3 ต่อ 2) หลังผ่านการทดสอบในสถานะจำลองทางเดินอาหารของไก่ ตั้งแต่กรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มในสถานะน้ำดี เป็นเวลา 18, 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมร่วมกับยีสต์ (T14 – T16) มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบผสมเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) โดยมีจำนวน เซลล์ที่รอดชีวิตคิดเป็น 56.55 – 81.93, 48.89 – 60.50 และ 52.73 – 58.31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การ เพาะเลี้ยงเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก *Ent. faecium* PR-2 + *L. plantarum* IG-3 (T13) มีจำนวน เซลล์ที่รอดชีวิต 51.65, 30.99 และ 40.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มในสถานะน้ำดีเป็นเวลา 18, 24 และ 36

ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *C. krusei* MB-1 ไม่สามารถรอดชีวิตได้เมื่อบ่มในสภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

9. ผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของโปรไบโอติกที่รอดชีวิตหลังบ่มในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ พบว่า โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการใช้เชื้อผสมร่วมกับยีสต์ในอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์เท่ากับ 3 ต่อ 1 มีเพียงบางกลุ่มการทดลองเท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *Sal. Typhimurium* DMST 16809 และ *Sal. Typhi* ในขณะที่โปรไบโอติกที่ผลิตได้จากการใช้เชื้อแบบผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ในอัตราส่วนเท่ากับ 3 ต่อ 2 ทุกกลุ่มการทดลองสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Salmonella Typhimurium* DMST 16809, *Sal. Typhi*, *Sal. Enteritidis* SOO3 และ *E. coli* ATCC 8739

10. จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า การผลิตโปรไบโอติกโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแบบผสมกับยีสต์ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 เพื่อเสริมในอาหารไก่กระพวงมีความเหมาะสมกว่าการเพาะเลี้ยงในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 และการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์โปรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลคติก) ได้มากกว่าซึ่งอาจเกิดจากยีสต์ไปใช้แลกเตดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นทำให้พีเอชของอาหาร MRS-sucrose broth ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้นจึงไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก และเมื่อนำไปเสริมในอาหารไก่ ซึ่งการทดลองนี้ทดสอบโดยให้ผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ก็ยังพบว่า โปรไบโอติกที่รอดชีวิตยังคงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในไก่ได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาหาสภาวะและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตโปรไบโอติกแบบใช้เชื้อผสมร่วมกับยีสต์ นอกเหนือจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS sucrose broth
2. ควรมีการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกเพิ่มเติมจากการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch fermentation) โดยอาจใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) หรือแบบครั้งคราว (fed batch fermentation) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรไบโอติกให้ได้จำนวนเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น

3. ควรมีการตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกที่ผลิตได้หลังจากผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่ ว่าเกิดจากสารต่อต้านจุลชีพชนิดใด เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำโปรไบโอติกไปเสริมไปในอาหารไก่กระตัง

4. การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้นำโปรไบโอติกที่ผลิตได้ไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองจริง (ไก่กระตัง) เนื่องจากมีระยะเวลาที่จำกัด ดังนั้นหากเป็นไปได้ควรมีการศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของไก่กระตังและศึกษาถึงผลของการเสริมโปรไบโอติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบผสมกับยีสต์ต่อการเจริญและผลต่อการป้องกันโรคในไก่กระตัง เพื่อให้แน่ใจว่าโปรไบโอติกที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพจริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัลยา เจือจันทร์, จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และ นันทวัน บุญยะประภัศร. 2549. ผลของสารสกัดเปลือกทับทิมต่อการเกาะกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ในลูกไก่เนื้อ. **สัตวแพทยศาสตร์ มข.** 16 (2): 1-7.
- เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2533. โรคติดเชื้อ อีเชอร์ริเชีย โคลิ ในระบบหายใจของไก่กระທး: ตอนที่ 1 ความชุกของโรค. **เวชสารสัตวแพทย์.** 20 (1): 313-330.
- คณินิจ ก่อธรรมฤทธิ์. 2540. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิตการใช้และความต้องการ Probiotics ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. **เอกสารทางวิชาการ.** กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์, กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ.
- จารุวรรณ มณีศรี. 2550. เปิดหน่อไม้ดองพบฟิล์มยีสต์. **รัฐมะลิแล.** 28 (1): 1-3.
- จิระศักดิ์ ศรีเมฆารัตน์ และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2545. ผลของโปรไบโอติก (Biolac) ต่อการเพิ่มผลผลิตไก่กระທး. น. 31-35. ใน **ประมวลรายงานการสัมมนาทางวิชาการ “เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาเกษตรกรรมไทย”**, 23-24 พฤษภาคม 2545, ณ โรงแรมริมปาว จ. กาฬสินธุ์.
- จิระศักดิ์ คำสุริย์. 2549. บทสรุปสำหรับผู้บริหารแนวโน้มการส่งออกไก่เนื้อของไทยไปยังญี่ปุ่น ปี 2549. **สถาบันอาหาร.** 8 (46): 28-32.
- ดาวริน สุขเกษม. 2549. ผลร่วมระหว่างสารสกัดพืชสมุนไพร พืเษและความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดองและน้ำส้มคั้น. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.**
- ดำรงเดช มณีวัฒนา, ฐิติพร รพีศักดิ์ และ วรพจน์ สุนทรสุข. 2543. การคัดแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในน้ำหมักผักดอง. **วิจัยและพัฒนา มจร.** 23 (3): 47-62.

- ธนสิทธิ์ เหล่าประเสริฐ. 2546. โพรไบโอติกหนึ่งผลงานเพื่อเกษตรกรเลี้ยงไก่เนื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ฯ. เทคโนโลยีชาวบ้าน. 15 (303): 66-67.
- ธวัชชัย โพธิ์เสียง, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และ กัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพของการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. สัตวแพทยศาสตร์ มข. 14 (2): 52-61.
- นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ฟีนีฟับลิชชิง, กรุงเทพฯ.
- นิวัตร จันทรศิริพรชัย, จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และ ธวัช เล็กดำรงศักดิ์. 2546. การควบคุมเชื้อซัลโมเนลล่าในไก่เนื้อโดยการใช้กรดอินทรีย์ละลายน้ำให้กิน. สัตวแพทยศาสตร์ มข. 13 (2): 1-8.
- บุญเรียง ถ้ายัญมิ. 2544. การคัดเลือกและผลิตเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะเพื่อใช้ในการเลี้ยงไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปฐม เลาหะเกษตร. 2540. การเลี้ยงสัตว์ปีก. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์รวีเขียว, นนทบุรี.
- ปทุมพร ฉิมอเนก. 2548. เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมขั้นสูง. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปิยะนุช บุญคุ้มเกล้า, ปาริชาติ กองทอง และ อภิญา อ้วนนิก. 2549. การทนกรดและน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์ใหม่ *Lactobacillus thermotolerans* ที่แยกได้จากมูลไก่. น. 404-409. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภักดี สุขพันธุ์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคทีเรียโอซินและเจริญได้ดีในสาร
โพลิแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุจา มาลัยพวง. 2544. การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลคติกของไทย.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรการ ชิตานนท์, สุภาพร อัสริโยดม, ปราโมทย์ ศิริโรจน์, ปทุมพร ฉิมเอนก, วรณา มาลาพันธุ์,
บุษยา ขงสมิทธิ, ชนินทร์ ศิริวัฒนวานิช, วราภรณ์ หิรัญวงษ์ และ ปกรณ์ ตาลสุข.
2550 ก. ผลของการเสริมโปรไบโอติกส์ ต่อจำนวนประชากรเชื้อ *E. coli* ในลำไส้และการ
สร้างภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนโรคนิวคาสเซิลในไก่กระທ. น. 43-50. ใน รายงานการประชุม
ทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาสัตว)
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____ และ _____. 2550ข. ผลของการเสริม
โปรไบโอติกส์ต่อคุณลักษณะทางการเจริญเติบโต ส่วนประกอบของซากกับโคเลสเตอรอล
และไขมันรวมในไก่กระທ. น. 51 – 58. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาสัตว). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ หิรัญวงษ์. 2550. คุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลง
ของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่กระທ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

_____. 2537. การเน่าเสียของอาหารและการป้องกัน. คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. โปรวไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์. ตอนที่ 1.
วารสารจารย์พา. 41: 50-53.

_____. 2542 ก. โปรวไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์. ตอนที่ 8.
วารสารจารย์พา. 48: 26-27.

_____. 2542 ข. โปรวไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์. ตอนที่ 9.
วารสารจารย์พา. 48: 31-35.

วิโรจน์ จันทรรัตน์. 2538. เอกสารประกอบการสอนวิชา กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก.
ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่.

ศศิธร จินตามรกฏ. 2543. การพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุเชื้อ การเก็บรักษา และการผลิต
สารประกอบโพลีออลของยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิมา วรหาญ. 2550. การคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกแบคทีเรียต่อการยับยั้ง
แบคทีเรียก่อโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศักดิ์ดา เทพปรัชากุล วราภรณ์ ศุกลพงศ์ กัลยา เจือจันทร์ และ ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร.
2545. แบคทีเรียในการปรับปรุงคุณภาพการเลี้ยงไก่กระต. น. 53-55. ใน ประมวล
รายงานการสัมมนาทางวิชาการ “เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาเกษตรกรรมไทย”,
23-24 พฤษภาคม 2545 ณ โรงแรมริมปาว จ. กาฬสินธุ์.

ศูนย์วิจัยเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. 2550. เส้นทางอุตสาหกรรมไก่เนื้อไทยและสถานการณ์ไก่
เนื้อโลก. สถาบันอาหาร. 9 (51): 34-46.

สมาคมส่งเสริมการเลี้ยงไก่แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. อุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่
ของไทยปี 2549. ฐานไก่. 54 (5): 46-51.

สมใจ สิริโกก. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

สายใจ แก้วอ่อน. 2542. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาวตรี ลิ้มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุทธศักดิ์ นพวิญวงษ์, สมบูรณ์ แสงมณีเดช, สุธิดา จันทร์สุน, พิทยา ภาภิรมย์, ขวัญเกษ กนิษฐานนท์ และ ประจักษ์ พัวเพิ่มพูนศิริ. 2549. การประยุกต์ใช้กรดฟอร์มิกและกรดโปรปิโอนิกในการป้องกันโรคบิดไส้ตันในไก่เนื้อ. แพทยศาสตร์ มข. 16 (1): 12-17.

สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง. 2544. การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในการหมักไข่แดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุริย์รัตน์ เงินดวง. 2545. การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรศรี ลีวระปกรณ. 2547. การผลิตชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวณะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพิน ภูมิภมร และ บุญเรือง ลำชัยภูมิ. 2546. การผลิตจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวณะเพื่อใช้ในการเลี้ยงไก่. น. 277-285. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่41 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Aattouri, N., M. Bouras, D. Tome, A. Marcos and D. Lemonnier. 2001. Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- γ production. **Br. J. Nutri.** 87: 367-373.
- Adams, M.R. and L. Nicolaides. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne Pathogens to fermentation. **Food control.** 8: 227-239.
- Aiba, S., A.E. Humphrey and N.F. Millis. 1973. Biochemical engineering. 2nd ed. University of Tokyo Press, Japan.
- Anadon, A., M.R.M. Larranaga and M.A. Martinez. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union Regulation and Safety assessment. **Regul. Toxicol. Pharm.** 45: 91-95.
- Angelis, M.D., S. Siragusa, M. Berloco, L. Caputo, L. Settanni, G. Alfonsi, M Amerio, A. Grandi, A. Ragni and M. Gobbetti. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. **Res. Microbiol.** 157: 792-801.
- Avonts, L., E.V. Uytven and L.D. Vuyst. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **Int. dairy J.** 14: 947-955.
- Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology, pp. 1-63. In S., Salminen and A. Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcell Dekker, Inc., New York.
- _____. 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**. Marcell Dekker, Inc., New York.

- Baalmear, P.M., O.A. Holtermann and E.A. Mirand. 1984. Influence of the microflora on the immune response 1: General characteristics of germ-free animal in biochemical research. eds. Coates, M.E. and B.E. Gustafsson, pp. 335-346. Lond. Lab. Anim. Ltd.
- Cited* Oyetayo, V.O. and F.L. Oyetayo. 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. **Afr. J. Biotechnol.** 4: 123-127.
- Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 1990. **Yeasts: Characteristics and identification.** Cambridge University, Cambridge.
- Barrow, P.A. 1992. Probiotics for chickens, pp. 225-257. *In* R. Fuller, ed. Probiotics: **The scientific basis.** Chapman & Hall, London.
- _____, B.E. Brolleker, R. Fuller and M.J. Newport. 1980. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of intestine. **J. Appl. Bacteriol.** 48: 147-154.
- Bearson, S., B. Bearson and J.W. Foster. 1997. Acid stress response in enterobacteria. **FEMS. Microbiol. Lett.** 147: 173-180.
- Becquet, P. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. **Int. J. Food. Microbiol.** 88: 247-254.
- Berrada, N. 1991. Bifidobacterium from fermented milks: Survival gastric Transit. **J. Dairy Sci.** 74: 409-413.
- Bevilacqua, L., M. Ovidi, E.D. Mattia, L.D. Trovelli and F. Canganella. 2003. Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human feces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. **J. Microbiol. Res.** 158: 179-185.

- Bibiloni, R., P.F. Perez and G.L.D. Antoni. 1999. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia?. **Anaerobe**. 5: 519-524.
- Bouzaine, T., R.D. Dauphin, Ph. Thonart, M.C. Urdaci and M. Hamdi. 2005. Adherence and colonization properties of *Lactobacillus rhamnosus* TB1, a broiler chicken isolate. **Lett. Appl. Microbiol.** 40: 391-396.
- Brashears, M.M., S. E. Gilliland and L. M. Buck. 1998. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. **J. Dairy Sci.** 81: 2103–2110.
- Bujalance, C., E. Moreno, M. J. Valera and A. R. Bravo. 2007. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte response in immunologically intact and immunocompromised mice. **Int. J. Food Microbiol.** 113: 28-34.
- Cameron, D.M. and J.N. Carter. 1992. Evaluation of the efficacy of Broilact[®] in preventing infection of broiler chicks with *Salmonella enteritidis* PT 4. **Int. J. Food Microbiol.** 15: 319-326.
- Carina, M., G. Oliver and M. C. Apella. 2001. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin syntesis of *Enterococcus faecium*. **Int. J. Food Microbiol.** 63: 345-351.
- Chan, L., B. Jinghua, C. Zhaoling and O. Fan. 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **J. Biotechnol.** 93: 27-34.

- Chansiripornchai, N., P. Ramasoota, A. Bangtrakulnonth, J. Sasipreeyajan and S.B. Svenson. 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 29 (3): 221–225.
- Charalampopoulos, D., S.S. Pandiella and C. Webb. 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potential probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **Int. J. Food Microbiol.** 82: 133-141.
- Charteris, W.P., K. Phillip, M. Lorenzo and C. J. Kevin. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J. Food Prot.** 61(8): 1636-1643.
- Cheirsilp, B. , H. Shimizu and S. Shioya. 2001. Modelling and optimization of environmental conditions for kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. **Appl. Biotechnol.** 57: 639-646.
- _____, _____ and _____. 2003 a. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.** 100: 43-53.
- _____, H. Shoji, H. Shimizu and S. Shioya. 2003 b. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Culture for Kefir Production. **J. Biosci. Bioeng.** 96(3): 279-284.
- Cogan, T.M., D.J. Buckley and S. Condon. 1971. Optimum growth parameters of lactic streptococci used for the production of concentrated cheese starter cultures. **J. Appl. Bacteriol.** 34 (2): 403-409.

- Collins, M. D., U. M. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams and S. Walkbanks. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16s rRNA, pp. 46-47. Cited L. De Vust and E. J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional.
- Conway, P.L., S.L. Gorbach and B.R. Goldin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.** 70: 1-12.
- Corrier, D.E., A.G. Hollister, D.J. Nisbet, C.M. Scanlan, R.C. Beier and J.R. DeLoach. 1994. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in Leghorn chicks: comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. **Avian Dis.** 38: 297-303.
- Cosby, D.E., S.E. Craven, M.A. Harrison, and N.A. Cox. 1997. Bacterial isolates from a chicken gizzard and ceca with *in vitro* inhibitory activity against *Salmonella typhimurium*. **J. Food Prot.** 60 (20): 120-124.
- Cosentino, S. , M.E. Fadda, M. Deplano, A.F. Mulargia and F. Palmas. 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. **Int. J. Food Microbiol.** 69: 53-58.
- Dahiya, R.S. and M.L. Speck. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Sci.** 51(10): 1568-1572.
- Deak, T. and L.R. Beuchat. 1996. **Handbook of food spoilage yeasts**. CRC Press, USA.
- Desmons, C. , C. Stanton, G. F. Fitzgerald, K. Collin and R.P. Ross. 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli toward improvement of performance during spray drying. **Int. Dairy J.** 11: 801-808.

- Devriese, L.A. and B. Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, pp. 327–367. In B.J.B., Wood and W.H. Holzapfel, Eds. **The Lactic Acid Bacteria, Vol. 2.** Blackie Academic, London.
- Dunne, C. , L. Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. Halloran, M. Feeney, Sarah Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. Sullivan, F. Shanahan and J. Collins. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation *in vivo* findings. **Am. J. Clin Nutri.** 73: 386-392.
- Erkkila, S. and E. Petaja. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Sci.** 55: 297-300.
- Fadda, M.E., V. Mossa, M.B. Pisano, M. Deplano and S. Cosentino. 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **Int. J. Food Microbiol.** 95: 51-59.
- Fernandez, M. F., S. Boris and C. Barbes. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **J. Appl. Microbiol.** 94: 449-455.
- Fleet, G.H. 1990. Yeast in dairy products. **J. Appl. Bacteriol.** 68: 199-221.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365-378.
- _____. 1992. The effect of probiotics on the gut Micro-ecology of farm animals, pp. 171-192. In B. J. B. Wood, ed. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 1.** The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Science Publishers, London.
- _____ and B.E. Brooker. 1974. *Lactobacillus* which attach to the crop epithelium of the fowl. **Am. J. Clin. Nutr.** 27: 1305-1312.

- Gadaga, T.H. and A.N. Mutukumira. 2001. Growth characteristics of *Candida kefyr* and two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. **Int. J. Food Microbiol.** 70: 11-19.
- Gardini, F. , R. Tofalo, N. Belletti, L. Iucci, G. Suzzi, S. Torriani, M.E. Guerzoni and R. Lanciotii. 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. **Food Microbiol.** 23: 641-648.
- Garneau, S. , N.I. Martin and J.C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie.** 84: 577-592.
- Garriga, M. , M. Pascual, J. M. Monfort and M. Hugas. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. **J. Appl. Microbiol.** 84: 125-132.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture.** 180: 147-165.
- Gilliland, S.E. and M. Speck. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.** 33: 15-18.
- _____, T. E. Staley and L. J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **J. Dairy Sci.** 67: 3045-3051.
- Green, M. D. and S.N. Ibe. 1987. Yeasts as primary contaminants in yoghurts produced commercially in Lagos, Nigeria. **J. Food Prot.** 50: 193-198.
- Gusils, C. , S. Cuozzo, F. Sesma and S. Gonzalez. 2002. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. **Can. J. Microbiol.** 48: 34-42.

- Halami, P.M. , A. Chandrasheker and R. Joshep. 1999. Characterization of bacteriocinogenic strain of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. **Food Biotechnol.** 13: 121-136.
- Hammes, W.P. and R.F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. In B. J. B. Wood and W.H. Hozapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Hang, Y. D. , E.E. Woodams and L.E. Hang. 2003. Utilization of corn silage juice by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol.** 86: 305-307.
- Havenaar, R. and J.H.J. Huis In't Veld. 1992. Probiotics: A General View, pp. 151-170. In B. J. B. Wood, ed. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 1.** The Lactic Acid Bacteria in health and disease. Elsevier Science Publishers, London.
- Hazen, K.C. 1995. New and Emerging Yeast Pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** 8(4): 462-478.
- Heenan, C.N., M.C. Adams. , R.W. Hosken and G.H. Fleet. 2002. Growth Medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian Food Products. **Lebensm- Wiss. u-Technol.** 35: 171-176.
- Hirsh, D.C. 1999. *Salmonella*. in veterinary microbiology, pp. 75-79. D.C. Hirsh and Y.C. Zee, eds. Blackwell Science. Massachusetts.
- Hofman, A.K. and K. Mysels. 1992. Bile salt solubility and precipitation in *vivo*: the role of conjugation pH and Ca²⁺ ions. **J. Lipid Res.** 33 (102): 617-626.
- Hutkins, R.W. and N.L. Nannen. 1992. pH homeostasis in Lactic Acid Bacteria. **J. Dairy Sci.** 76: 2354-2365.

- Jakobsen, M. and J. Narvhus. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **Int. Dairy J.** 6: 755-768.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525-530.
- Jin, L. Z., R.R. Marquardt and X. Zhao. 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) Inhibits adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4200-4204.
- _____, Y. W. Ho, M. A. Ali, N. Abdullah and S. Jalaludin. 1996. Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on *in vitro* adherence of Salmonellae to the intestinal epithelial cells of chicken. **J. Appl. Bacteriol.** 81: 201-206.
- _____, _____, N. Abdullah, M.A. Ali and S. Jalaludin. 1998. Effect of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organ and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. **Anim. Feed Sci. Tech.** 70: 197-209.
- Kacaniova, M., V. Kmet and J. Cubon. 2006. Effect of *Enterococcus faecium* on the digestive tract of poultry as a probiotic. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 30: 291-298.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 41: 103-125.
- Kotzekidou, P. 1997. Identification of yeasts from black olives in rapid system micro titre plates. **Food Microbiol.** 14: 609-616.
- Kuhle, A.A. and L. Jespersen. 1998. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. **Int. J. Food Microbiol.** 43: 205-213.

- Kurtzman, C.P. and J.W. Fell. 1998. **The yeast: A Taxonomic study**. 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam.
- Lacroix, C. and S. Yildirim. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. **Curr. Opin. Biotechnol.** 18: 176-183.
- Larone, D.H. 1993. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. 2nd ed. , American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Lee, K.B. 2005. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. **Process Biochem.** 40: 1559-1564.
- Lejeune, R., R. Callewaert, K. Crabbe and L. De Vuyst. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. **J. Appl. Microbiol.** 84 (2): 159–168.
- Lilley, D. M. and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.** 147: 747-748.
- Lin, W. H. , B. Yu, S. H. Jang and H. Y. Tsen. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. **Anaerobe.** 13: 107-113.
- _____, C. F. Hwang, L. W. Chen and H. Y. Tsen. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiol.** 23: 74-81.
- Lindgren, S.E. and W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation, pp. 135-164. *In* S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria.** Marce Dekker, Inc., New York.

- Liu, H.J., D.H. Liu and J.J. Zhong. 2004. Oxygen limitation improves glycerol production by *Candida krusei* in a bioreactor. **Process Biochem.** 39: 1899-1902.
- _____, Q. Li and D.H. Liu. 2006. Impact of hyperosmotic condition on cell physiology and metabolic flux distribution of *Candida krusei*. **Biochem. Eng. J.** 28: 92-98.
- Males, R.J. and B. Johnson. 1990. Probiotics-What are they? What they do?. **J. Anim. Sci.** 68: 505-508.
- Manners, M. J. 1976. The development of digestive function in the pig. **Proceedings Nutrition Society.** 35: 49-55. Cited Yu, B. and H. Y. Tsen. 1993. *Lactobacillus* cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. **J. Appl. Bacteriol.** 75: 269-275.
- Maragkoudakis, P.A., G. Zoumpoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot and E. Tsakalidou. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **Int. Dairy J.** 16: 189-199.
- Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar, and J. H. J. Huis In't Veld. 1997. Survival of Lactic Acid Bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **J. Dairy Sci.** 80: 1031-1037.
- Mattila-Sandholm, T. , P. Myllarinen, R. Crittenden, G. Mogensen, R. Fonden and M. Saarela. 2000. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.** 12: 173-182.
- Messens, W. and L. D. Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs. **Int. J. Food Microbiol.** 72: 31-43.

- Mitsue, T., Tachibana, K. and Y. Fujio. 1999. Efficient kefir production by a mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* KF-75 and yeast strains. **Seibutsukougakukaishi** . 77: 90 – 103. Cited Cheirsilp, B., H. Shimizu and S. Shioya. 2003a. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.** 100: 43-53.
- Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou and L. D. Vuyst. 2006. The role and application of enterococci in food and health. **Int. J. Food Microbiol.** 106: 1-24.
- Murry, A.C., 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. Poul. Sci.** 9: 603-607.
- _____, _____ and R. J. Buhr. 2006. Effect of botanical probiotic containing Lactobacilli on growth performance and populations of bacteria in caca, cloaca and carcass rinse of broiler chickens. **Int. J. Poul. Sci.** 5(4): 344-350.
- Nahashon, S. N., H. S. Nakaue and L. W. Mirosh. 1996. Nutrient retention and production parameters of Single Comb White Leghorn layers fed diets with varying crude protein levels and supplemented with direct-fed microbials. **Anim. Feed Sci. Tech.** 61: 17-26.
- Naidu, A.S. , W.R. Bildlack and R.A. Chemens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Crit. Rev. Food Sci. Nutri.** 39: 1-26.
- Narvhus, J.A. and T.H. Gadaga. 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. **Int. J. Food Microbiol.** 86: 51-60.

Oner, M.D. and L.E. Erickson. 1986. Anaerobic fermentation of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on 3% non fat dry milk with pure and mixed culture.

Biotechnol. Bioeng. 28: 883-894.

Ortu, S., G.E. Felis, M. Marzotto, A. Deriu, P. Mollicotti, L.A. Sechi, F. Dellaglio and S. Zanetti.

2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. **Int. Dairy. J.** 17: 1312-1320.

O'Sullivan, L. , R. P. Ross and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie.** 84: 593-604.

Ozlem, O. 2003. Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum packaged sucuk. **Turk J. Vet Anim Sci.** 27: 471-480.

Paik, H. and B. A. Glatz. 1997. Enhanced bacteriocin production by *Propionibacterium thoenii* in fed-batch fermentation. **J. Food Prot.** 60 (12): 1529-1533.

Parker, R. B. 1974. Probiotic, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutri. Health.** 29: 4-9.

Parkhurst, C.R. , and G. J. Mountney. 1988. **Poultry Meat and Egg Production.** Chapman & Hall, New York.

Peebles, M.M. , S.E. Gilland and M.L. Speck. 1969. Preparation of concentrated lactic streptococcus starter. **Appl. Microbiol.** 17: 805-810.

Perdigon, G. , M.E.N. Macais, S. Alvarez, G. Oliver and A.P. P. De Ruiz-Holgado. 1986. Effect of preorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infect. Immune.** 53: 404-410.

- Pollman, D. S. 1986. Non-nutritive feed additives-what are they, p. 352. **Proceeding.** 22nd ed. **Annual Guelph Nutrition Conference**, University of Guelph, Ontario.
- Price, R.T. and J. S. Lee. 1978. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **J. Milk Food Technol.** 33: 13-18.
- Quan, C., L. Zhang, Y. Wang and Y. Ohta. 2001. Production of Phytase in a low Phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **J. Biosci. and Bioeng.** 92(2): 154-160.
- Reque, E.D., A. Pandey, S. G. Franco and C.R. Soccol. 2000. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. **Braz. J. Microbiol.** 31: 303-307.
- Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture.** 160: 177-203.
- Rodrigues, K.L., L. R.G. Caputo, J.C.T. Carvalho, J. Evangelista and J. M. Schneedorf. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 25: 404-408.
- Rohm, H. , F. Eliskases-Lechner and M. Brauer. 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products. **J. Appl. Microbiol.** 72 (5): 370–376.
- Romano, R. , A. Ricciardi, G. Salzano and G. Suzzi. 2001. Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. **Int. J. Food Microbiol.** 69 : 45–51.
- Rubin, H. E. 1978. Toxicology model for a two-acid system. **Appl. Environ. Microbiol.** 36: 623-624.

- Saito, T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the group and their applications to functional foods. **Anim. Sci. J.** 75: 1–13.
- Salminen, S. , A. Ouwehand, Y. Benno and Y. K. Lee. 1999. Probiotics: how should they be defined?. **Trends Food Sci. Tech.** 10: 107–110.
- Sarra, P. G. , L. Morelli and V. Bottazzi. 1992. The lactic microflora of fowl, pp. 3-20. In B. J. B. Wood, ed. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 1.** The Lactic Acid Bacteria in health and disease. Elsevier Science Publishers, London.
- Savard, T. , C. Beaulieu, N. J. Gardner and C. P. Champagne. 2002. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and Inhibition by lactic, acetic and propionic acids. **Food Microbiol.** 19: 363-373.
- Savova, I. and M. Nikolova. 2002. Isolation and taxonomic study of yeast strains from Bulgarian dairy products. **J. Culture Collections.** 3: 59-65.
- Scargg, A. H. 1988. Glossary, pp. 379-384. In **Biotechnology for Engineers: Biological System in Technological Process.** Ellis Horwood Limited, Chichester, England.
- Sen, S. and S. L. Chakrabarty. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. **J. Ferment. Tech.** 62: 407-413.
- Shimizu, H. , T. Mizuguchi, E. Tanaka and S. Shioya. 1999. Nisin production by a mixed culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3134-3141.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36: 1-29.

- Strompfova, V., A. Laukova and A. C. Ouwehand. 2004. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. **Vet. Microbiol.** 100: 107-114.
- Sturkie, P.D. 1976. **Avian Physiology**. Springer-Verlag, Berlin.
- Tannock, G. W. 1999. **Probiotics a critical review**. Horizon Scientific Press, Wymondham. U.K.
- Tsai, C.C., H.Y. Hsieh, H.H. Chiu, Y. Y. Lai, J. H. Liu, B. Yu and H. Y. Tsen. 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **Int. J. Food Microbiol.** 102: 185-194.
- _____, M.H. Chen, T.H. Liu, C. G. Chau, L. T. Chang, C. C. Tsai and H. Y. Tsen. 2004. Evaluation of the toxicity of *Lactobacillus acidophilus* LAP5 in a 28-day feeding study in wistar rats. **J. Food Safety.** 24: 268-280.
- _____, T.H. Liu, M.H. Chen, C.C. Tasi and H.Y. Tsen. 2004. Toxicity evaluation for an *Enterococcus faecium* strain TM 39 *in vitro* and *in vivo*. **Food Chem. Toxicol.** 42: 1601-1609.
- Westall, S. and O. Filtenborg. 1998. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. **Food Microbiol.** 15: 243-249.
- Weymarn, N. V. 2002. **Process development for manitol production by lactic acid bacteria**. Helsinki University of Technology. Finland.
- Witthuhn, R.C., T. Schoeman and T.J. Britz. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **Int. Dairy J.** 15: 383-385.

- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Cite by* L. Axelsson. 1988. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, p. 3. *In* S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wyder, M. T. and Z. Puhon. 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. **Int. Dairy J.** 9: 117-124.
- Yokoi, H. and T. Watanabe. 1992. Optimum culture conditions for production of kefir by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains. **J. Ferment. Bioeng.** 74: 327-329.
- Yu, B. and H.Y. Tsen. 1993. *Lactobacillus* cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. **J. Appl. Bacteriol.** 75: 269-275.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. De Man Rogosa and Sharpe (MRS)

Dextrose	20.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Beef extract	8.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Tri Ammonium citrate	2.0	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Manganese sulphate	0.04	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ อาหารวุ้น MRS เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์
อาหารกึ่งแข็ง MRS เตรียมโดยเติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

2. Modified De Man Rogosa and Sharpe sucrose (MRS-sucrose)

Sucrose	20.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Beef extract	8.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Manganese sulphate	0.04	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. De Man Rogosa and Sharpe Ox bile (MRS - Ox bile)

Dextrose	20.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Beef extract	8.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Manganese sulphate	0.04	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ox bile	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Lactate Ammonium sulfate (LAC)

L- lactate	10.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Di potassium hydrogen phosphate	7.0	กรัม
Potassium di hydrogen phosphate	3.0	กรัม
Diammonium sulfate	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร
0.05% Brom cresol purple	1.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5 ด้วยกรดแลคติก

หมายเหตุ อาหารวุ้น Lactate medium เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ B (Shimizu *et al.*, 1999)

L-lactate	10.0	กรัม
Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม

ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0

6. Tryptic soy broth (TSB)

ใช้อาหารสำเร็จของ Merck ซึ่งประกอบด้วย

Tryptone	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จ TSB ปริมาณ 30 กรัม ต่อลิตร แล้วนำมาเชื่อมด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ อาหารวุ้น TSA เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

7. Potato Dextrose Agar (PDA)

ใช้อาหารสำเร็จของ Merck ซึ่งประกอบด้วย

Potato infusion	4.0	กรัม
D(+) Glucose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จ PDA ปริมาณ 39 กรัม ต่อลิตร แล้วนำมาเชื่อมด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Yeast extract-Malt extract agar (YM)

Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช เป็น 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการอาหารวุ้นแข็งเติมผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

9. Fermentative carbohydrate

Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Bromthymol blue solution	4.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ต้มให้ละลายดูดใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหลอดดักก๊าซ (Durham's tube) หลอดละ 7 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สำหรับการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลอื่นๆ ได้แก่ ซูโครส มอลโตส และ แลคโตส ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันแต่เติมน้ำตาลชนิดนั้นๆ แทนน้ำตาลกลูโคส

10. Fowell's acetate agar

ละลาย sodium acetate trihydrate 5.0 กรัม ในน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5-7.0 เติมน้ำกลั่น 20.0 กรัม ต้มจนผงละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ 3.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปลอ่ยให้แข็งในสภาพเอียง

11. Gorodkova agar

Glucose	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ต้มจนผงละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ 3.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปลอ่ยให้แข็งในสภาพเอียง

12. 5% malt extract agar

Malt extract	50.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ต้มจนผงละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ 3.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปลอ่ยให้แข็งในสภาพเอียง

13. Mc Clary acetate agar

Glucose	1.0	กรัม
KCl	1.8	กรัม
Sodium acetate trihydrate	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ต้มจนผงวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ 3.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปลอ่ยให้แข็งในสภาพเอียง

14. Phosphate Buffer Saline (PBS)

KH_2PO_4	0.2	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaCl	8.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 2.0, 2.5 และ 3.2 ด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

15. API ID 32 C Medium_ใช้ในการจัดจำแนกโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป

ส่วนประกอบของ ID 32 C strip ที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ ก ส่วนประกอบของ ID 32 C strip

Cupules	Tests	Substrates	QTY(mg/cup.)
1.0	GAL	D-GALactose	0.70
1.1	ACT	Cycloheximide (ACTidione)	0.014
1.2	SAC	D-SACcharose (sucrose)	0.66
1.3	NAG	N-Acetyl-Glucosamine	0.64
1.4	LAT	LacTic acid	0.64
1.5	ARA	L-ARAbinose	0.70
1.6	CEL	D-CELlobiose	0.66
1.7	RAF	D-RAFfinose	2.34
1.8	MAL	D-MALtose	0.70
1.9	TRE	D-TREhalose	0.66
1.A	2KG	Potassium 2-ketoGluconate	1.09
1.B	MDG	Methyl- α D-Glucopyranoside	1.92
1.C	MAN	D-MANnitrol	0.68
1.D	LAC	D-LACtose (bovine origin)	0.70
1.E	INO	INOsitol	0.70
1.F	0	No substrate	-
0.0	SOR	D-SORbitol	2.72
0.1	XYL	D-XYLose	0.70
0.2	RIB	D-RIBose	0.7
0.3	GLY	GLYcerol	0.82
0.4	RHA	L-RHAMnose	0.68
0.5	PLE	PalatinosE	0.66

ตารางผนวกที่ ก (ต่อ)

Cupules	Tests	Substrates	QTY(mg/cup.)
0.6	ERY	ERYthritol	1.44
0.7	MEL	D-MELibiose	0.66
0.8	GRT	Sodium GlucuRonaTe	0.76
0.9	MLZ	D-MeleZitose	0.66
0.A	GNT	Potassium GlucoNate	0.92
0.B	LVT	Levulinic acid (LeVulina TE)	0.48
0.C	GLU	D-GLUcose	0.78
0.D	SBE	L-SorBosE	0.70
0.E	GLN	GLucosamiNe	0.68
0.F	ESC	ESCulin	0.28
		ferric citrate	0.069

Medium API C Medium ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

Ammonium sulfate	5.00	กรัม
Monopotassium phosphate	0.31	กรัม
Dipotassium phosphate	0.45	กรัม
Disodium phosphate	0.92	กรัม
Sodium choride	0.10	กรัม
Calcium chloride	0.05	กรัม
Magnesium sulfate	0.20	กรัม
L-Histidine	0.005	กรัม
L-Tryptophan	0.02	กรัม

16. API ID 32 C Medium ใช้ในการจัดจำแนกโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป (ต่อ)

Medium API C Medium ปริมาตร 7 มิลลิลิตร (ต่อ)

L-Methionine	0.02	กรัม
Gelling agent	0.50	กรัม
Vitamin solution	1.0	มิลลิลิตร
Trace elements	10.0	มิลลิลิตร
Demineralized water ปรับให้เป็น 1,000.0 มิลลิลิตร		

ปรับพีเอชให้มีค่า 6.4-6.8 เก็บที่ 20-25 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
การจัดจำแนกสายพันธุ์สัตว์

การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้

จัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ด้วยชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูปของ API ID 32 C (bioMerieux, France)

1. นำ single colony ของเชื้อที่ผ่านการทดสอบแล้วที่มีความบริสุทธิ์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ทำ cross streak แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 จำนวน 1 โคโลนีหรือมากกว่า มาทำ suspension ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำสารละลายดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับความขุ่นให้มีค่าเท่ากับ 2 McFarland
3. ถ่ายเชื้อจาก suspension ในข้อ 7.2 ไปใส่ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในอาหาร API C Medium ผสมให้เข้ากัน
4. เตรียมภาชนะทดสอบสำเร็จรูป
5. ใช้ไมโครปิเปตดูด suspension จากข้อ 1.3 ปริมาตร 135 ไมโครลิตร ไปหยอดลงในแต่ละช่องของชุดทดสอบจำนวน 32 ช่อง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปิดฝาภาชนะทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง
6. นำผลที่ตรวจสอบได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม API WEB ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์สำหรับใช้ในการแปลผลทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์

ภาคผนวก ค
ผลการทบทวน น้ำดี และ การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้
ในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่

ตารางผนวกที่ ค 1 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมรวมหรือไม่ร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์โปรไบโอติก		เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มใน PBS		การทนกรด (%)	การรอดชีวิต (%)
			ที่ผลิตได้ใน ชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)	พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)			
					pH 2.5	pH 7.2		
PR-2	T 1	9.82	9.82	8.82	7.81	9.09	85.92	88.55
PR-2 + MB-1	T 2	9.93	9.93	8.93	8.32	8.38	99.28	93.17
PR-2 + KN-1	T 3	9.83	9.83	8.83	8.45	8.47	99.76	95.70
PR-2 + KN-2	T 4	10.13	9.51	8.51	8.01	8.72	91.86	94.12
IG-3	T 5	9.79	9.77	8.77	8.61	8.72	98.74	98.17
IG-3 + MB-1	T 6	10.00	10.00	9.00	8.48	8.72	97.25	94.22
IG-3 + KN-1	T 7	9.81	9.81	8.81	8.50	8.91	95.40	96.48
IG-3 + KN-2	T 8	10.01	10.01	9.01	8.47	8.71	97.24	94.01

ตารางผนวกที่ ค 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์โปรไบโอติก	เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มใน		การทนกรด (%)	การรอดชีวิต (%)
			ที่ผลิตได้ใน ชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)		PBS พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)			
					pH 2.5 pH 7.2			
PR-2 + IG-3	T 9	9.88	9.74	8.74	8.49	8.61	98.61	97.14
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	9.87	9.85	8.85	8.68	8.75	99.20	98.08
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	9.91	9.45	8.45	8.45	8.60	98.26	100.00
PR-2 + IG-3 + KN-2	T12	9.83	9.83	8.83	8.56	8.88	96.40	96.94

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefyr*

% การทนกรด = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 7.2) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์เริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ 2 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตเบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนเบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ยีสต์ที่ ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์ยีสต์ที่ผลิต ได้ในชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มใน PBS		การทนกรด (%)	การรอดชีวิต (%)
					พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)			
					pH 2.5	pH 7.2		
PR-2 + MB-1	T 2	7.08	7.08	6.08	6.40	6.15	100.00	100.00
PR-2 + KN-1	T 3	7.25	7.25	6.25	6.18	6.62	93.35	98.88
PR-2 + KN-2	T 4	7.28	7.28	6.28	7.00	6.38	100.00	100.00
IG-3 + MB-1	T 6	7.28	7.28	6.28	7.05	5.68	100.00	100.00
IG-3 + KN-1	T 7	7.41	7.41	6.41	4.00	6.89	58.06	62.40
IG-3 + KN-2	T 8	7.41	7.18	6.18	4.30	7.05	60.99	69.58

ตารางผนวกที่ ค 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ยีสต์ที่ ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์ยีสต์ที่ผลิต ได้ในชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มใน PBS		การทนกรด (%)	การรอดชีวิต (%)
					พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)			
					pH 2.5	pH 7.2		
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	7.11	6.63	5.63	6.52	5.87	100.00	100.00
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	7.66	7.66	6.66	7.20	7.05	100.00	100.00
PR-2 + IG-3 + KN-2	T12	8.05	8.05	7.05	6.00	6.99	85.84	85.11

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefyr*

% การทนกรด = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 7.2) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์เริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ ค 3 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้ใน ชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)		เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มใน PBS พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)		การทนกรด (%)	การรอดชีวิต (%)
				เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)				
					pH 2.5	pH 7.2		
PR-2 + IG-3	T 13	11.74	10.68	9.68	6.89	8.05	85.59	71.17
PR-2 + MB-1	T 14	10.69	10.69	9.69	6.95	9.23	75.30	71.72
IG-3 + MB-1	T 15	11.74	7.86	6.86	7.03	8.90	78.99	100.00
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	11.74	7.75	6.75	7.17	8.23	87.12	100.00

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนกรด = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 7.2) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์เริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ ค 4 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังจากบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ยีสต์ที่ ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์ยีสต์ที่ผลิต ได้ในชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มใน PBS		การทนกรด (%)	การรอดชีวิต (%)
					พีเอชต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)			
					pH 2.5	pH 7.2		
PR-2 + MB-1	T 14	7.29	6.79	5.79	3.11	5.12	60.74	53.71
IG-3 + MB-1	T 15	8.86	6.54	5.54	3.45	4.78	72.18	62.27
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	9.22	6.90	5.90	3.16	4.85	65.15	53.56

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนกรด = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 7.2) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์เริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ ค 5 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่มการทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
		การบ่มในPBS	จากการบ่มในPBS	MRS broth (log CFU/ml)			
		ที่พีเอช 2.5	ที่พีเอช 2.5	เติม ox bile	ไม่เติม ox bile		
		(log CFU/ml)	(log CFU/ml)**	0.3 %	0.3 %		
PR-2	T 1	7.81	6.81	7.21	9.73	74.10	100.00
PR-2 + MB-1	T 2	8.32	7.32	7.80	9.13	85.43	100.00
PR-2 + KN-1	T 3	8.45	7.45	7.45	9.17	81.24	100.00
PR-2 + KN-2	T 4	8.01	7.01	7.47	9.16	81.55	100.00
IG-3	T 5	8.61	7.61	7.38	9.28	79.53	96.98
IG-3 + MB-1	T 6	8.48	7.48	8.46	9.21	91.86	100.00
IG-3 + KN-1	T 7	8.50	7.50	8.33	9.18	90.74	100.00
IG-3 + KN-2	T 8	8.47	7.47	7.52	9.12	82.46	100.00

ตารางผนวกที่ ค 5 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
		การบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	จากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	MRS broth (log CFU/ml)			
				เต็ม ox bile 0.3 %	ไม่เต็ม ox bile 0.3 %		
PR-2 + IG-3	T 9	8.49	7.49	7.32	8.38	87.35	97.73
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	8.68	7.68	7.80	7.94	98.24	100.00
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	8.45	7.45	7.31	8.75	83.54	98.12
PR-2 + IG-3 + KN-2	T 12	8.56	7.56	7.27	9.44	77.01	96.16

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefir*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เต็ม ox bile / จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เต็ม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เต็ม ox bile / จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ 6 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเบคที่เรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนเบคที่เรียกรดแลคติกต่อยีสต์เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และ ไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
		การบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	จากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	MRS broth (log CFU/ml)			
				เติม ox bile 0.3 %	ไม่เติม ox bile 0.3 %		
PR-2 + MB-1	T 2	6.40	5.40	4.17	4.72	88.35	77.22
PR-2 + KN-1	T 3	6.18	5.18	ND	6.39	ND	ND
PR-2 + KN-2	T 4	7.00	6.00	ND	6.44	ND	ND
IG-3 + MB-1	T 6	7.05	6.05	3.82	5.08	75.20	63.14
IG-3 + KN-1	T 7	4.00	3.00	ND	6.78	ND	ND
IG-3 + KN-2	T 8	4.30	3.30	ND	4.00	ND	ND

ตารางผนวกที่ ค 6 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
		การบ่มในPBS	จากการบ่มในPBS	MRS broth (log CFU/ml)			
		ที่พีเอช 2.5	ที่พีเอช 2.5	เต็ม ox bile	ไม่เต็ม ox bile		
		(log CFU/ml)	(log CFU/ml)**	0.3 %	0.3 %		
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	6.52	5.52	3.84	5.00	76.80	69.57
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	7.20	6.20	ND	ND	ND	ND
PR-2 + IG-3 + KN-2	T 12	6.00	5.00	ND	6.02	ND	ND

หมายเหตุ ND = Non Detected due to cell died

PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefir*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เต็ม ox bile / จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เต็ม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เต็ม ox bile / จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค 7 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์เท่ากับ 3 ต่อ 1 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
		การบ่มในPBS	จากการบ่มในPBS	MRS broth (log CFU/ml)			
		ที่พีเอช 2.5	ที่พีเอช 2.5	เติม ox bile	ไม่เติม ox bile		
		(log CFU/ml)	(log CFU/ml)**	0.3 %	0.3 %		
PR-2	T 1	7.81	6.81	9.53	10.50	90.76	100.00
PR-2 + MB-1	T 2	8.32	7.32	5.30	9.31	56.93	72.40
PR-2 + KN-1	T 3	8.45	7.45	5.78	9.39	61.55	77.58
PR-2 + KN-2	T 4	8.01	7.01	5.85	9.21	63.52	83.45
IG-3	T 5	8.61	7.61	9.21	10.30	89.42	100.00
IG-3 + MB-1	T 6	8.48	7.48	4.00	9.31	42.96	53.47
IG-3 + KN-1	T 7	8.50	7.50	5.95	9.21	64.60	79.33
IG-3 + KN-2	T 8	8.47	7.47	4.00	9.10	43.96	53.55

ตารางผนวกที่ ค 7 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิต	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
		จากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	จากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	MRS broth (log CFU/ml)			
				เติม ox bile 0.3 %	ไม่เติม ox bile 0.3 %		
PR-2 + IG-3	T 9	8.49	7.49	5.78	9.31	62.08	77.17
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	8.68	7.68	9.55	9.72	98.25	100.00
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	8.45	7.45	5.00	9.32	53.65	67.11
PR-2 + IG-3 + KN-2	T 12	8.56	7.56	5.30	9.30	56.99	70.11

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefir*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile /จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.50 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ 8 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่รวมหรือร่วมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 ภายหลังบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้ในชั่วโมง ที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้น* (log CFU/ml)	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะจำลอง ทางเดินอาหารของไก่		
					สภาวะกรด	สภาวะน้ำดี	สภาวะน้ำดี
					เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (%)	เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (%)	เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (%)
PR-2	T 1	9.82	9.82	8.82	88.55	81.74	100.00
PR-2 + MB-1	T 2	9.93	9.93	8.93	93.17	87.35	59.35
PR-2 + KN-1	T 3	9.83	9.83	8.83	95.70	84.37	65.46
PR-2 + KN-2	T 4	10.13	9.51	8.51	94.12	87.78	68.74
IG-3	T 5	9.79	9.77	8.77	98.17	84.15	100.00
IG-3 + MB-1	T 6	10.00	10.00	9.00	94.22	94.00	44.44
IG-3 + KN-1	T 7	9.81	9.81	8.81	96.48	94.55	67.54
IG-3 + KN-2	T 8	10.01	10.01	9.01	94.01	83.46	44.04

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์โปรไบโอติก ที่ผลิตได้ในชั่วโมง ที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์ เริ่มต้น* (log CFU/ml)	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะ จำลองทางเดินอาหารของไก่		
					สภาวะกรด	สภาวะน้ำดี	สภาวะน้ำดี
					เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (%)	เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (%)	เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (%)
PR-2 + IG-3	T 9	9.88	9.74	8.74	97.14	83.75	66.13
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	9.87	9.85	8.85	98.08	88.14	100.00
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	9.91	9.45	8.45	100.00	86.51	59.17
PR-2 + IG-3 + KN-2	T 12	9.83	9.83	8.83	96.94	82.33	60.02

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefir*

% การรอดชีวิตในสภาวะกรด = (จำนวนโปรไบโอติกที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนโปรไบโอติกเริ่มต้น) x 100

% การรอดชีวิตในสภาวะจำลองน้ำดี = (จำนวนโปรไบโอติกที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนโปรไบโอติกเริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ ค 9 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเบกที่เรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนเบกที่เรียกรดแลคติก
ต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 1 ภายหลังบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ยีสต์ ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์ยีสต์ ที่ผลิตได้ในชั่วโมง ที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์ เริ่มต้น (log CFU/ml)*	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะจำลอง ทางเดินอาหารของไก่		
					สภาวะกรด	สภาวะน้ำดี	สภาวะน้ำดี เป็น
					เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (%)	เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (%)	เวลา 36 ชั่วโมง (%)
PR-2 + MB-1	T 2	7.08	7.08	6.08	100.00	68.59	ND
PR-2 + KN-1	T 3	7.25	7.25	6.25	98.88	ND	ND
PR-2 + KN-2	T 4	7.28	7.28	6.28	100.00	ND	ND
IG-3 + MB-1	T 6	7.28	7.28	6.28	100.00	60.83	ND
IG-3 + KN-1	T 7	7.41	7.41	6.41	62.40	ND	ND
IG-3 + KN-2	T 8	7.41	7.18	6.18	69.58	ND	ND

ตารางผนวกที่ ค 9 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กลุ่มการทดลอง	เซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์ยีสต์เริ่มต้น (log CFU/ml)*	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่		
					เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะ		
					จำลองระบบทางเดินอาหารของไก่		
					สภาวะกรดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (%)	สภาวะน้ำดีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (%)	สภาวะน้ำดีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (%)
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 10	7.11	6.63	5.63	100.00	68.21	ND
PR-2 + IG-3 + KN-1	T 11	7.66	7.66	6.66	100.00	ND	ND
PR-2 + IG-3 + KN-2	T 12	8.05	8.05	7.05	85.11	ND	ND

หมายเหตุ ND = Non Detected due to cell died

PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei* KN-1 = *C. sphaerica* KN-2 = *C. kefir*

% การรอดชีวิตในสภาวะกรด = (จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้น) x 100

% การรอดชีวิตในสภาวะจำลองน้ำดี = (จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ ค 10 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่มการทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร MRS broth (log CFU/ml)		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
				เติม ox bile 0.3 %	ไม่เติม ox bile 0.3 %		
PR-2 + IG-3	T 13	6.89	5.89	5.00	8.94	55.93	84.89
PR-2 + MB-1	T 14	6.95	5.95	5.48	9.41	58.24	92.10
IG-3 + MB-1	T 15	7.03	6.03	5.23	9.44	55.40	100.00
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	7.17	6.17	5.53	8.12	68.10	100.00

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile /จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.50 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค 11 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก การบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต จากการบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่ม ในอาหาร MRS broth		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
				(log CFU/ml)			
				เติม ox bile	ไม่เติมox bile		
				0.3 %	0.3 %		
PR-2 + IG-3	T 13	6.89	5.89	3.00	7.86	38.17	50.93
PR-2 + MB-1	T 14	6.95	5.95	4.78	8.05	59.38	80.34
IG-3 + MB-1	T 15	7.03	6.03	4.15	8.08	51.36	68.82
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	7.17	6.17	3.30	7.52	43.88	53.48

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile / จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile / จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.50 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค 12 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การ ทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตจาก การบ่มในPBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต จากการบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่ม ในอาหาร MRS broth (log CFU/ml)		การทนน้ำดี (%)	การรอดชีวิต (%)
				เติม ox bile	ไม่เติม ox bile		
				0.3 %	0.3 %		
PR-2 + IG-3	T 13	6.89	5.89	3.90	7.39	52.77	66.21
PR-2 + MB-1	T 14	6.95	5.95	5.11	7.41	68.96	85.88
IG-3 + MB-1	T 15	7.03	6.03	4.00	7.41	53.98	66.33
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	7.17	6.17	3.60	7.33	49.11	58.35

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile / จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile / จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค 13 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิต	เซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิต	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่ม		การทนน้ำดี	การรอดชีวิต
		จากการบ่มในPBS	จากการบ่มในPBS	ในอาหาร MRS broth			
		ที่พีเอช 2.5	ที่พีเอช 2.5	(log CFU/ml)			
		(log CFU/ml)	(log CFU/ml)**	เติม ox bile	ไม่เติม ox bile		
				0.3 %	0.3 %		
PR-2 + MB-1	T 14	3.11	2.11	2.00	3.00	66.67	94.79
IG-3 + MB-1	T 15	3.45	2.45	1.90	3.00	63.33	77.55
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	3.16	2.16	2.04	3.00	68.00	94.44

หมายเหตุ ND = Non Detected due to cell died PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile /จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค 14 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 หลังบ่มในกรด 3 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร MRS broth ทั้งที่เติม ox bile และไม่เติม ox bile 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุลินทรีย์	กลุ่ม การทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิต	เซลล์เริ่มต้นที่รอด	เซลล์ที่เจริญเมื่อบ่มในอาหาร		การทนน้ำดี	การรอดชีวิต
		จากการบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)	ชีวิตจากการบ่มใน PBS ที่พีเอช 2.5 (log CFU/ml)**	MRS broth (log CFU/ml)			
				เติม ox bile	ไม่เติม ox bile		
				0.3 %	0.3 %		
						(%)	(%)
PR-2 + MB-1	T 14	3.11	2.11	ND	3.00	ND	ND
IG-3 + MB-1	T 15	3.45	2.45	1.00	3.00	33.33	40.82
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	3.16	2.16	1.30	3.00	43.33	60.19

หมายเหตุ ND = Non Detected due to cell died PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การทนน้ำดี = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile /จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth ไม่เติม ox bile) x 100

% การรอดชีวิต = (จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่รอดชีวิตจากการบ่มใน PBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) x 100

** เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่รอดชีวิตจากการบ่มในPBS พีเอช 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค 15 เซลล์รอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผลิตได้โดยใช้เชื้อผสมไม่รวมหรือรวมกับยีสต์ ในอัตราส่วนโปรไบโอติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 ภายหลังบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่

จุลินทรีย์	กลุ่มทดลอง	เซลล์โปรไบโอติกที่ผลิตได้สูงสุด (log CFU/ml)	เซลล์โปรไบโอติกที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30 (log CFU/ml)	เซลล์เริ่มต้น (log CFU/ml)*	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหารของไก่			
					ทางเดินอาหารของไก่			
					สภาวะกรด	สภาวะจำลอง	สภาวะจำลอง	สภาวะจำลอง
					เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (%)	น้ำดี เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (%)	น้ำดี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (%)	น้ำดี เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (%)
PR-2 + IG-3	T 13	11.74	10.68	9.68	71.17	51.65	30.99	40.29
PR-2 + MB-1	T 14	10.69	10.69	9.69	71.72	56.55	49.33	52.73
IG-3 + MB-1	T 15	11.74	7.86	6.86	100.00	76.24	60.50	58.31
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	11.74	7.75	6.75	100.00	81.93	48.89	53.33

หมายเหตุ PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การรอดชีวิตในสภาวะกรด = (จำนวนโปรไบโอติกที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนโปรไบโอติกเริ่มต้น) x 100

% การรอดชีวิตในสภาวะจำลองน้ำดี = (จำนวนโปรไบโอติกที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม ox bile/จำนวนโปรไบโอติกเริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากโปรไบโอติกที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30

ตารางผนวกที่ ค 16 เซลล์รอดชีวิตของยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MB-1 ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม ในอัตราส่วนแบคทีเรีย
กรดแลคติกต่อยีสต์ เท่ากับ 3 ต่อ 2 ภายหลังบ่มในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่

จุลินทรีย์	กลุ่มทดลอง	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของไก่						
		เซลล์ยีสต์ ที่ผลิตได้	เซลล์ยีสต์ ที่ผลิตได้ใน	เซลล์ยีสต์ เริ่มต้น (log CFU/ml)*	ระบบทางเดินอาหารของไก่			
		สูงสุด	ชั่วโมงที่ 30		สภาวะกรด	สภาวะจำลอง	สภาวะจำลอง	สภาวะจำลอง
		(log CFU/ml)	(log CFU/ml)		เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (%)	น้ำดี เป็นเวลา18 ชั่วโมง (%)	น้ำดี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (%)	น้ำดี เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (%)
PR-2 + MB-1	T 14	7.29	6.79	5.79	53.71	34.54	ND	ND
IG-3 + MB-1	T 15	8.86	6.54	5.54	62.27	34.30	18.05	ND
PR-2 + IG-3 + MB-1	T 16	9.22	6.90	5.90	53.56	34.58	22.03	ND

หมายเหตุ ND = Non Detected due to cell died

PR-2 = *Ent. faecium* IG-3 = *L. plantarum* MB-1 = *C. krusei*

% การรอดชีวิตในสภาวะกรด = (จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เจริญใน PBS พีเอช 2.5/จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้น) x 100

% การรอดชีวิตในสภาวะจำลองน้ำดี = (จำนวนเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหาร MRS broth เดิม ox bile/จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้น) x 100

* เซลล์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า จากยีสต์ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 30