



วิทยานิพนธ์

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก

SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA HAVING
PROBIOTIC PROPERTIES

นางสาวปรีดา ตันจักร⁺

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก

Selection of Lactic Acid Bacteria Having Probiotic Properties

นามผู้วิจัย นางสาวปรีดา ตันจักร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐชนก อมรเทวภัทร, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วรัญญ์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 6 เดือน 5 ค. พ.ศ. 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก

Selection of Lactic Acid Bacteria Having Probiotic Properties

โดย

นางสาวปรีดา ตันจักร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2550

ปริยดา ตันจกร 2550: การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ,
D.Sc. 164 หน้า

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเบื้องต้น ที่แยกจากลำไส้ไก่ จำนวน 194 ไอโซเลท จาก
ความสามารถในการทนต่อกรด 3% พบเชื้อประสิทธิภาพ 11 ไอโซเลท ได้แก่ D1-8, D2-6, D2-8,
D3-9, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อในขั้นสุดท้าย จากสมบัติ
ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคที่พบในไก่ ความสามารถในการทนต่อพีเอช
ช่วงกว้าง 2-8 ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง 60-80°C กิจกรรมเอนไซม์ bile salt
hydrolase และ ประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ พบว่าทุกไอโซเลทมีกิจกรรมการยับยั้ง
เป็น 1.00-11.00, 1.75-2.42, 2.08-3.25, 0.20-0.27, 2.50-3.33 และ 1.83-3.00 ต่อเชื้อ
Campylobacter jejuni ATCC 33291, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Enteritidis DSMT
17368, *S. Typhimurium*, *Shigella dysenteriae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ตามลำดับ เชื้อไอ
โซเลท D2-6 มีกิจกรรมการยับยั้งกว้าง พร้อมทั้งแสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อ *C. jejuni*
ATCC 33291 เชื้อไอโซเลท D1-8, D3-9, D7-3, J9-2 และ C3-3 ทนต่อ pH ในช่วงกว้าง ขณะที่ไอ
โซเลท D3-9 และ D1-8 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่พีเอช 2 และ 3 ตามลำดับ การศึกษา
ความสามารถในการอุณหภูมิ 80°C เวลา 20-120 วินาที ไอโซเลท D1-8 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด
สูงสุดคือ 51.21-74.05 % เชื้อไอโซเลท D1-8 และ C3-3 ผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase สูงสุด
เป็น 3.538 และ 3.019 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่เชื้อไอโซเลท D1-8, D2-6 และ D2-8 มี
ประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้สูงสุดเป็น 74.72, 79.05 และ 76.14 % ตามลำดับ ได้ทำ
การจำแนกเชื้อจากสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ชีวเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S
rDNA พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลท J6-1, I4-8 และ I4-
9 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท D1-8, D3-9, D7-3, J9-2 และ C3-3 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ไอ
โซเลท D2-8 และ กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยไอโซเลท D2-6 และ C4-4 จัดเป็น *Lactobacillus*
salivarius, *L. fermentum*, *L. reuteri* และ *Lactobacillus* sp. ตามลำดับ

ปริญดา ตันจกร

ผู้เขียน

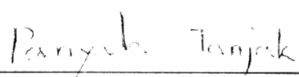
ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

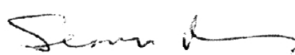
21 มี.ค. 50

Pariyada Tanjak 2007: Selection of Lactic Acid Bacteria Having Probiotic Properties.
Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of
Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sunee Nitisinprasert, Ph.D. 164
pages.

One hundred ninety four lactic acid bacteria (LAB) isolated from chicken intestines were primary screened according to 3% bile salt toleration resulting in 11 active LAB isolates of D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 and C4-4 obtained. These 11 isolates were secondary screened by the ability of antimicrobial substance production against pathogenic bacterial strains found in chicken, toleration to various pH range of 2-8, toleration to high temperature of 60-80^o C, bile salt hydrolase activity and adhesion efficiency. All isolates exhibited antimicrobial activity (AMA) of 1.00-11.00, 1.75-2.42, 2.08-3.25, 0.20-0.27, 2.50-3.33 and 1.83-3.00 against *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Enteritidis DSMT 17368, *S. Typhimurium*, *Shigella dysenteriae* and *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. The isolate D2-6 displayed wide inhibition spectrum with the highest activity against *C. jejuni*. The isolates D1-8, D3-9, D7-3, J9-2 and C3-3 tolerated to wide pH range of 2-8 while the highest % survival at pH 2 and 3 were shown by the isolate D3-9 and D1-8, respectively. When cell survival of 11 isolates at 80^o C for 20-120 second were studied, the isolate D1-8 did show the high % survival of 51.21-74.05. Both the isolate D1-8 and C3-3 produced high bile salt hydrolase activities of 3.538 and 3.019 units/ml, respectively. While the isolate D1-8, D2-6 and D2-8 displayed high adhesion efficiency of 74.72, 79.05 and 76.14%, respectively. Based on the properties of morphology, physiology, biochemistry and 16SrDNA sequence, eleven isolates were categorized into 4 groups. The group I of J6-1, I4-8 and I4-9, group II of D1-8, D3-9, D7-3, J9-2 and C3-3, group III of D2-8 and group IV of D2-6 and C4-4 belonged to *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri* and *Lactobacillus* sp., respectively.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

27  07

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก Kasetsart University Research and Development Institute มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมทั้งได้รับกำลังใจ กำลังกาย กำลังเงินและกำลังความคิดจาก บุคคลมากมาย

ข้าพเจ้าขอขอบคุณอย่างสูงต่อ รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐชนก อมรเทวภัทร กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์รวิทย์ ลิธิพลวัฒน์ กรรมการวิชาการ และ รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคุณพ่อสนิท ต้นจักร คุณแม่สุวารี ต้นจักร ครอบครัวจันทระ และครอบครัวรัตนภาณุ ที่ได้ส่งเสริมและให้การสนับสนุนด้านการเงินและกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์และเบิกสารเคมีเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำแห้งเยื่อผนังลำไส้

ขอขอบคุณบริษัทเบทาโกรที่ให้ความอนุเคราะห์เยื่อลำไส้ไก่มาใช้ในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณพี่คมแข พิลาสมบัติ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อมาทำการทดลอง รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้ให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำการทดลอง

ปริญดา ต้นจักร

กรกฎาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	37
สรุป	88
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	91
ภาคผนวก	107
ภาคผนวก ก	108
ภาคผนวก ข	113
ภาคผนวก ค	119
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	164

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่พบว่ามีการใช้เป็นโพรไบโอติก	6
2	คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียกรดแลกติก	21
3	ค่าความเป็นกรดเบสแลค่าเฉลี่ยระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอาหารภายใน ส่วนต่างๆของระบบทางเดินอาหารของไก่ หลังจากที่ได้รับอาหารตลอด (ad libitum) เป็นเวลา 6 สัปดาห์	22
4	อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์	24
5	ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	35
6	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดี (Bile salt hydrolase, BSH) ในแบคทีเรียกรด แลกติก 11 ไอโซเลท	61
7	ประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	63
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียกรด แลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 11 ไอโซเลท	66
9	ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือก ได้ 11 ไอโซเลท โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL	67
10	การเปรียบเทียบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D7- 3, J6-1, I4-8 และ I4-9 กับ <i>Lactobacillus salivarius</i>	71
11	การเปรียบเทียบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, J9-2 และ C3-3 กับ <i>Lactobacillus fermentum</i>	72
12	การเปรียบเทียบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท C4-4 กับ <i>Lactobacillus crispatus</i>	74
13	การคำนวณความเข้มข้นและบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และ 260 ต่อ 230	76
14	การเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D1-8, D3-9, C3-3, J9-2 และ C4-4	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	การเปรียบเทียบการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท C4-4 กับ <i>Lactobacillus crispatus</i> และ <i>Lactobacillus fermentum</i>	82
16	การเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-6, D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9	84
17	การเปรียบเทียบการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D2-6 กับ <i>Lactobacillus fermentum</i> และ <i>Lactobacillus salivarius</i>	85
18	การเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8	86
19	การเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D2-6 กับ <i>Lactobacillus reuteri</i> และ <i>Lactobacillus fermentum</i>	87
ตารางผนวกที่		
ค1	ผลการทดสอบความสามารถทนต่อ 3 % น้ำดี ของแบคทีเรียกรดแลกติก	120
ค2	ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ <i>Samonella</i> Enterititis DMST 17368 ของแบคทีเรียกรดแลกติก	129
ค3	ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ <i>Shigella dysentiriae</i> ของแบคทีเรียกรดแลกติก	130
ค4	ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ของแบคทีเรียกรดแลกติก	131
ค5	ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ของแบคทีเรียกรดแลกติก	132
ค6	ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhimurium ของแบคทีเรียกรดแลกติก	133
ค7	ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ <i>Campyrobacter jejuni</i> ATTC 33291 ของแบคทีเรียกรดแลกติก	134

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค8	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 2 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	135
ค9	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 3 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	135
ค10	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 4 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	136
ค11	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 5 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	136
ค12	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 6 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	137
ค13	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 7 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	137
ค14	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 8 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง	138
ค15	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที(Log CFU/ml)	138
ค16	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที(Log CFU/ml)	139
ค17	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที(Log CFU/ml)	139
ค18	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก	140
ค19	ผลการทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก	141

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ช่วงเปอร์เซ็นต์ G+C ของแบคทีเรียประจำถิ่นชนิดต่างๆในลำไส้ไก่ ตาราง สี่เหลี่ยมคือช่วงที่สะสมของสายพันธุ์ต่างๆในแต่ละสกุล เส้นตรงในตาราง สี่เหลี่ยมคือค่ามัธยฐานของสกุลนั้นๆ และค่าที่อยู่ในวงเล็บแสดงจำนวนของ สายพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบ	5
2	การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยโพรไบโอติก	13
3	ระบบทางเดินอาหารของไก่	20
4	กิจกรรมการทนต่อน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 3% ของแบคทีเรียกรดแลกติก 194 ไอโซเลท	39
5	กิจกรรมการยับยั้ง <i>Sal. Enteritidis</i> DMST 17368 ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	41
6	กิจกรรมการยับยั้ง <i>Sal. Typhimurium</i> ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	42
7	กิจกรรมการยับยั้ง <i>Shigella dysenteriae</i> ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	43
8	กิจกรรมการยับยั้ง <i>V. parahaemolyticus</i> ขงแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	43
9	กิจกรรมการยับยั้ง <i>E. coli</i> 0157 :H7 ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	44
10	กิจกรรมการยับยั้ง <i>Campyrobacter jejuni</i> ATTC 33291 ของแบคทีเรีย กรด แลกติก 11 ไอโซเลท	45
11	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท	46
12	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท I4-8 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	48
13	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท I4-9 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	49
14	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท C4-4 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	49
15	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D1-8 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D3-9 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	51
17	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D7-3 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	51
18	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท J9-2 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	52
19	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท C3-3 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	53
20	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D2-6 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	54
21	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D2-8 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	54
22	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท J6-1 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8	55
23	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 20 วินาที (ก) เวลา 40 วินาที (ข)	58
24	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 80 วินาที (ก) เวลา 120 วินาที (ข)	59
25	ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากไอโซเลท I4-8, I4-9, J6-1, J9-2, D3-9, D2-8, D2-6, D1-8, D7-3, C4-4 และ C3-3 เลนที่ 2-12 ตามลำดับ, เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> + <i>Hind III</i>	75
26	การเพิ่มขยายดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 16S rRNA โดยเทคนิค PCR เลนที่ 1,15: 1 Kb DNA ladder; เลนที่ 2 : negative control; เลนที่ 3 : positive control; เลนที่ 4-14 : ไอโซเลท I4-8, I4-9, C3-3, C4-4, J6-1, J9-2, D7-3, D2-8, D1-8, D2-6 และ D3-9 ตามลำดับ	77
27	ลักษณะพลาสมิโดถูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoR I</i> ของไอโซเลท C3-3, C4-4, J9-2, I4-8, I4-9, D1-8, D2-8, D3-9, J6-1, D2-6 และ D7-3 เลนที่ 2-12 ตามลำดับ, เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder,	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค1 การยับยั้งเชื้อ <i>Samonella</i> Enterititis DMST 17368 ของ กลุ่มควบคุม (ก) บน D3-9 ล่าง C3-3 (ข) บน D1-8 ล่าง C4-4 (ค) บน D3-9 ล่าง J6-1 (ง) บน D2-8 ล่าง D1-8 (จ) บน-ล่าง J9-2 (ฉ) บน C4-4 ล่าง I4-8 (ช) บน D7-3 ล่าง I4-9 (ซ) บน C3-3 ล่าง D2-6 (ด)	129
ค2 การยับยั้งเชื้อ <i>Shigella dysentiriae</i> ของกลุ่มควบคุม (ก) บน D4-4 ล่าง I4-8 (ข) บน J6-1 ล่าง J9-2 (ค) บน D7-3 ล่าง I4-9 (ง) บน D2-6 ล่าง C3-3 (จ) บน D3-9 ล่าง J6-1 (ฉ) บน D2-8 ล่าง D1-8 (ช)	130
ค3 การยับยั้งเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ของ กลุ่มควบคุม (ก) บน C4-4 ล่าง I4-8 (ข) บน C3-3 ล่าง I4-9 (ค) บน D2-6 ล่าง J6-1 (ง) บน D2-8 ล่าง D1-8 (จ) บน D3-9 ล่าง D7-3 (ฉ) บน-ล่าง J9-2 (ช)	131
ค4 การยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ของ บนกลุ่มควบคุม ล่าง C3-3 (ก) บน C4-4 ล่าง D1-8 (ข) บน D3-9 ล่าง D7-3 (ค) บน I4-9 ล่าง I4-8 (ง) บน D2-8 ล่าง D2-6 (จ) บน J9-2 ล่าง J6-1 (ฉ)	132
ค5 การยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhimurium ของกลุ่มควบคุม (ก) บน D2-8 ล่าง D1-8 (ข) บน C3-3 ล่าง D2-6 (ค) บน D3-9 ล่าง J6-1 (ง) บน D7-3 ล่าง I4-9 (จ) J9-2 (ฉ) บน C4-4 ล่าง I4-8 (ช)	133
ค6 การยับยั้งเชื้อ <i>Campyrobacter jejuni</i> ATTC 33291 ของกลุ่มควบคุม (ก) J6-1 (ข) C3-3 (ค) บน D2-8 ล่าง D3-9 (ง) บน I4-9 ล่าง I4-9 (จ) J9-2 (ฉ) บน D2-6 ล่าง C4-4 (ช) บน D1-8 ล่าง D7-3 (ซ)	134
ค7 กราฟมาตรฐานของ taurine	140
ค8 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต D1-8 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซนต์	142

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค9 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D3-9 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	144
ค10 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C3-3 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	146
ค11 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท J9-2 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	148
ค12 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C4-4 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	150
ค13 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-6 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i> JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์	152
ค14 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D7-3 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i> JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	154

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค15 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท J6-1 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i> JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	156
ค16 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท I4-8 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i> JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	158
ค17 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท I4-9 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i> JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	160
ค18 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016 T (Accession No X76328.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์	162

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก

Selection of Lactic Acid Bacteria Having Probiotic Properties

คำนำ

อุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยได้อย่างมหาศาล โดยเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศที่สำคัญ ทั้งไก่ดิบ ไก่สดแช่เย็น และเนื้อไก่แปรรูป ถึงแม้ว่าอัตราการส่งออกในปี พ.ศ.2547 จะลดลง เนื่องจากการระบาดของโรคไข้หวัดนกทั้งในประเทศไทย และประเทศในแถบเอเชีย ยกตัวอย่างเช่น พ.ศ.2547 ไก่สดแช่เย็นและแช่แข็งมีมูลค่าการส่งออกประมาณ 1731.7 ล้านบาท และอัตราการขยายตัว ร้อยละ 91.49 โดยประมาณ ลดลง จากปี พ.ศ.2546 ซึ่งมีมูลค่าการส่งออก 20346.5 ล้านบาท และอัตราการขยายตัวร้อยละ 7.88 แต่ก็ยังมีมูลค่าการส่งออกและอัตราการขยายตัวของไก่แปรรูปที่เพิ่มขึ้น ในปี พ.ศ.2547 (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร, 2547) ดังนั้นจึงได้มีการเร่งพัฒนาและหาวิธีการกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของไก่ให้เพิ่มขึ้น เพื่อสนองให้ทันต่อความต้องการบริโภคเนื้อไก่ทั้งในและต่างประเทศ ปัจจุบันได้มีการออกกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ ดังนั้นผู้ผลิตไก่เนื้อจึงหาวิธีการใหม่ที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของไกดังนั้นการใช้โพรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกใหม่อีกทางเลือกหนึ่ง

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติกที่มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เพื่อส่งเสริมให้คนและสัตว์มีสุขภาพดี ในปัจจุบันโพรไบโอติกสำหรับไก่มีวางจำหน่ายเพื่อการค้าแล้ว อย่างไรก็ตาม โพรไบโอติกที่มีการนำมาใช้กับสัตว์นั้นยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร สาเหตุหนึ่งเนื่องจากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติก ดังนั้นจึงมีการศึกษา คัดเลือกและ พัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียให้สามารถผลิตเป็นโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพให้เหมาะสมกับสัตว์ชนิดนั้นๆอย่างต่อเนื่อง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบบที่เรียกรวดเลกติกที่แยกจากลำไส้ไก่ ซึ่งมีคุณสมบัติของโพรไบโอติก
2. เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแบบที่เรียกรวดเลกติกที่คัดเลือกได้

การตรวจเอกสาร

1. ความหมายและคำจำกัดความของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นคำที่มีรากศัพท์มาจากภาษา กรีก-ลาติน หมายถึง เพื่อชีวิต ในปี ค.ศ.1955 ได้เริ่มมีการนำเอาคำว่าโพรไบโอติกมาใช้เป็นครั้งแรกแต่ยังไม่มีใครให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้อย่างชัดเจน ต่อมา Lilly and Stillwell (1965) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้เป็นคนแรกว่าโพรไบโอติก คือสารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และสารนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ จากนั้นได้มีผู้ให้ความหมาย และคำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้อย่างมากมาย

คำจำกัดความของโพรไบโอติกที่ถูกนำมาใช้มากที่สุดเป็นของ Fuller (1989) ซึ่งได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โพรไบโอติก คือ อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิต ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่จุลินทรีย์นั้นเข้าไปอาศัยอยู่ โดยอาหารเสริมช่วยเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารของสัตว์

Havenaar *et al.* (1992) ได้เพิ่มเติมคำจำกัดความของ Fuller (1989) คือโพรไบโอติกสามารถใช้ในรูปของอาหารและที่ไม่ใช่อาหารได้ โดยโพรไบโอติกสามารถผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวหรือเชื้อหลายสายพันธุ์ผสมกันได้

กลุ่มผู้เชี่ยวชาญทางด้านโพรไบโอติกในยุโรปได้เสนอให้เพิ่มเติมคำจำกัดความของโพรไบโอติกจาก Fuller (1989) ว่า โพรไบโอติกสามารถก่อให้เกิดกลไกการเปลี่ยนแปลงต่างๆในร่างกาย นอกเหนือจากกลไกที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นในร่างกาย (Salminen *et al.*, 1998)

ปัจจุบันคำว่าโพรไบโอติกมีคำจำกัดความที่ใช้กันโดยทั่วไปดังนี้คือ โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต สามารถส่งเสริม หรือสนับสนุน ความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้น (Holzapfel *et al.*, 2001)

2. จุลินทรีย์ประจำถิ่นและระบบนิเวศน์วิทยาในระบบทางเดินอาหารของไก่

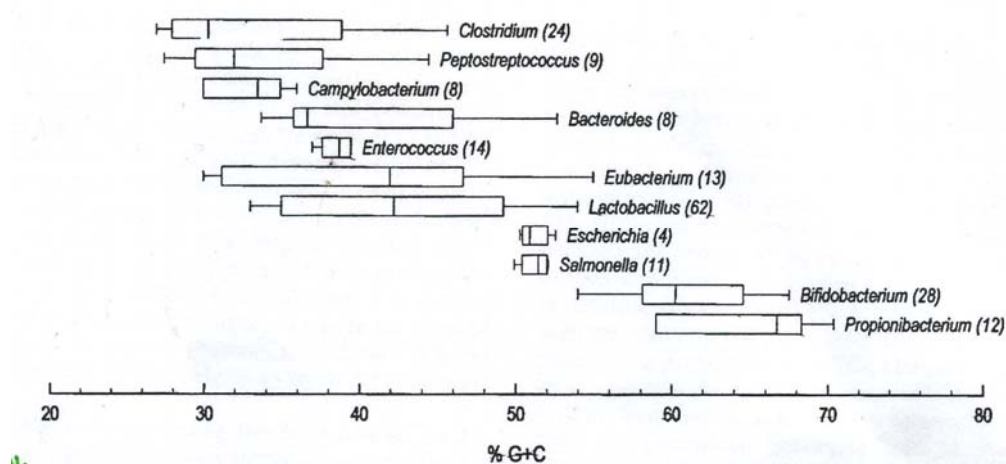
การเกิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของไก่จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่ลูกไก่ฟักออกมาจากไข่ และต่อเนื่องไปอีกหลายสัปดาห์ของการเจริญเติบโต (Ochi et al., 1964 ; Smith, 1965) โดยกระเพาะปัสสาวะของลูกไก่ที่มีอายุ 1 วัน จะประกอบด้วยจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ faecal cocci, enterobacteria และ lactobacilli แต่ต่อมาพบว่าแบคทีเรีย lactobacilli จะยึดติดกับเยื่อเมือกของกระเพาะปัสสาวะไปจนตลอดชีวิตของไก่

แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารของไก่จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่ลูกไก่ฟักออกจากไข่ และระหว่างการย่อยอาหาร (Smith, 1965 ; Barn et al., 1972 ; Mead and Adams, 1975) สายพันธุ์หลักๆ ที่พบได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. fermentum* และ *L. reuteri* (Morishita et al., 1971 ; Salanitro et al., 1978)

นอกจากแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ไก่ ซึ่งเมื่อเป็นแบคทีเรียที่ต่างสายพันธุ์ก็ย่อมจะมีความต้องการอาหารเพื่อทำกิจกรรมแตกต่างกัน นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมภายในลำไส้ของสัตว์นั้นยังมีผลทำให้แบคทีเรียต่างๆ มีความสามารถในการทนต่อน้ำย่อย เอนไซม์ และการดูดซึมภายในลำไส้ได้แตกต่างกันอีกด้วย ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของไก่มีความต้องการอาหาร การเจริญเติบโตต่างกัน จึงได้เกิดระบบนิเวศน์ขึ้นภายในทางเดินอาหารของสัตว์ (Wagner and Thomas, 1987 ; Savory, 1992)

Campyrobacter, *Salmonella*, *Shigella* และ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของไก่ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และท้องเสียอย่างรุนแรง (Sackey et al., 2001) นอกจากนี้แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไเก่ยังมีอีกหลายชนิด เช่น *Clostridia* และ *Vibrio* (Murry, et al., 2004) โดยแบคทีเรียที่กล่าวมาทั้งหมดนี้สามารถอยู่ในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้เนื่องจากการปนเปื้อนของอาหารและน้ำ (Sackey et al., 2001) หรือเกิดจากสภาพแวดล้อม เช่น การจัดการฟาร์ม การกำจัดสิ่งปฏิกูลภายในฟาร์ม หรืออุปนิสัยการกินของสัตว์เอง (Apajalahti et al., 2004)

เมื่อทำการศึกษาระบบนิเวศน์วิทยาในระบบทางเดินอาหารของไก่กระทองโดยใช้วิธีการทางดีเอ็นเอ และแยกชนิดของแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยอาศัยเปอร์เซ็นต์เบส G+C (Apajalahti *et al.*, 1998) จะสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ช่วงเปอร์เซ็นต์ G+C ของแบคทีเรียประจำถิ่นชนิดต่างๆในลำไส้ไก่ ตารางสี่เหลี่ยมคือช่วงที่สะสมของสายพันธุ์ต่างๆในแต่ละสกุล เส้นตรงในตารางสี่เหลี่ยมคือค่ามัธยฐานของสกุลนั้นๆ และค่าที่อยู่ในวงเล็บแสดงจำนวนของสายพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบ

ที่มา : Apajalahti *et al.* (1998)

Apajalahti *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาลักษณะแบคทีเรียในระบบนิเวศน์ทางเดินอาหารของไก่ด้วยวิธีการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เบส G+C จากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างลำไส้ไก่ พบว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้ไก่ 90 เปอร์เซ็นต์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทราบสายพันธุ์ (species) ซึ่งแบคทีเรียภายในระบบทางเดินอาหารสามารถทนต่อน้ำย่อยและทนต่อการดูดซึมของสัตว์เจ้าถิ่นได้สูง มีหน้าที่ในระบบนิเวศน์ทางเดินอาหารแตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียสามารถผลิตวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นให้แก่แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในระบบนิเวศน์ยังมีความต้องการอาหารแตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถที่จะเปลี่ยนระบบนิเวศน์ที่อันตรายต่อสัตว์เจ้าถิ่นเป็นระบบนิเวศน์ที่ไม่มีอันตรายได้โดย การเพิ่มแบคทีเรียด้วยโพรไบโอติก หรือ อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ส่งเสริมแบคทีเรียมีประโยชน์ (พรีไบโอติก) (Cresci *et al.*, 1999 ; Garriga *et al.*, 1998 ; Gusils *et al.*, 1999 ; Hock *et al.*, 1997 ; Izat *et al.*, 1990 ; Jin *et al.*, 1998) ซึ่งอาหารดังกล่าว จะทำหน้าที่ส่งเสริมแบคทีเรียมีประโยชน์และระงับการเจริญของของแบคทีเรียก่อโรค

3. จุลินทรีย์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่จำเป็นว่าจะต้องเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ (Fuller *et al.*, 1989 ; Havenaar *et al.*, 1992 ; Salminen *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก โปไฟโดแบคทีเรีย (Park *et al.*, 1999) และยีสต์ (Fuller, 1992) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกมากที่สุด (Murry *et al.*, 2004)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารและส่งผลให้เกิดประโยชน์ในระบบนิเวศน์วิทยาของสัตว์ ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก (Wilhelm *et al.*, 2002) ดังเช่นที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่พบว่ามีการใช้เป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species	Other LAB	“Non-lactics” ^a
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i> ^b	<i>Bacillus cereus</i> (toyoi) ^b
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle,
(<i>L. casei</i>)	<i>B. bifidum</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	1917
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>inlinus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. gallinarum</i> ^b	<i>B. infantis</i>		<i>freudenreichii</i> ^b
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i> ^c		<i>Saccharomyces</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		<i>cerevisiae</i> (boulardii)
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

^a ใช้ในการเตรียมยา, ^b ใช้กับสัตว์, ^c Synonymous กับ *B. animalis*

ที่มา: Holzapfel *et al.* (1998)

4. คุณสมบัติโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่จะนำมาผลิตเป็นโพรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติดังนี้ (Salminen *et al.*, 1998a)

4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกต้องผ่านการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย (GRAS = Generally Recognized As Safe) ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ปลอดภัยต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Salminen *et al.*, 2000)

4.1.1 แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องเป็นแหล่งที่มีความปลอดภัย เมื่อตรวจสอบสกุล (genus) และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในเบื้องต้นต้องพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย

4.1.2 เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ

4.1.3 มีการยึดติดของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร

4.1.4 จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่จะเป็นโพรไบโอติกต้องมีความสัมพันธ์กับเชื้อจุลินทรีย์หรือสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์เจ้าบ้าน

4.2 สามารถทนต่อกรดและความเป็นกรดภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน รวมทั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องเดินทางผ่านและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่บริโภคโพรไบโอติก สภาวะแวดล้อมแรกที่ได้รับผลกระทบต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกคือสภาวะแวดล้อมในกระเพาะอาหาร ที่มีความเป็นกรดเบสต่ำ (Lankaputhra and Shah, 1995) และการหลั่งน้ำดีในลำไส้เล็กสามารถทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไลปิด และกรดไขมัน (Gilliland, 1987 ; 1984) ดังนั้นโพรไบโอติกจึงต้องสามารถที่จะทนต่อกรดและความเป็นกรดในทางเดินอาหารของสัตว์ได้ (Reuter, 2001) ความสามารถทนต่อกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ

การศึกษาของ Suskova *et al.* (2000) พบว่า เมื่อรูปร่างโคโลนีและโครงสร้างของ *Lactobacillus acidophilus* M92 เป็นแบบเรียบ (smooth, S) จะสามารถทนต่อน้ำดีได้สูงกว่าแบบหยาบ (rough, R) เพราะโคโลนีแบบหยาบจะมีช่องว่างของผนังเซลล์มาก ทำให้น้ำดีสามารถเข้าไปทำอันตรายต่อตัวเซลล์ได้มากกว่าแบบเรียบ นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นเกลือน้ำดีโซเดียมทอโรโคเลต (sodium taurocholate) มาก *L. acidophilus* M92 จะผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase, BSH) มาก จึงสามารถทนต่อน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงได้

เอนไซม์ย่อยน้ำดี หรือ BSH เป็นเอนไซม์ที่ย่อย เกลือน้ำดีชนิดไกลซีน หรือ ทอรีน ได้กรดน้ำดี และ กรดอะมิโนชนิดไกลซีน หรือ ทอรีน จากการศึกษาพบว่าเกลือน้ำดีที่ถูกย่อยโดยแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดของคนที่มีระดับคลอเรสเตอรอลสูง และช่วยป้องกันภาวะการมีระดับคลอเรสเตอรอลสูงในคนปกติ (Smet *et al.*, 1994)

กิจกรรมเอนไซม์ย่อยน้ำดี ของแบคทีเรียกรดแลกติกในปัจจุบัน ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการเผาผลาญคลอเรสเตอรอลในคนและปศุสัตว์ (Tanaka *et al.*, 1999) ซึ่งกระบวนการเมตาบอลิซึม ของคลอเรสเตอรอลพบว่า ผลสุดท้ายที่ได้คือ น้ำดี ที่ใช้เป็น อิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) เพื่อช่วยในการแตกตัวของไขมันในลำไส้ ทำให้น้ำย่อย ไลเปส สามารถย่อยไขมันได้ และเพิ่มการดูดซึมไขมันในลำไส้ (Bateup *et al.*, 1995) เอนไซม์ BSH สลายพันธะเอไมด์ของน้ำดีได้เป็น bile acid และ กรดอะมิโน ส่งผลให้ปริมาณและคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ของน้ำดีลดลง ทำให้กระบวนการเผาผลาญคลอเรสเตอรอลสูงขึ้น เพื่อเพิ่มการผลิตน้ำดี (Cole and Fuller, 1984; Hill, 1995)

การสลายพันธะเอไมด์ของเกลือน้ำดีเป็นการทำงานของเอนไซม์ย่อยน้ำดีของแบคทีเรียที่อยู่ภายในลำไส้ใหญ่ ซึ่งความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดีเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของแบคทีเรียแต่ละชนิด (Knarreborg *et al.*, 2002) และจากการศึกษา ของ Tanaka *et al.* (1999) พบว่าแบคทีเรียไบฟิโดทุกสายพันธุ์มีเอนไซม์ย่อยน้ำดี ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีเอนไซม์ย่อยน้ำดี

4.3 สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้าน และแข่งขันการยึดติดกับจุลินทรีย์ก่อโรค

การยึดติดของจุลินทรีย์กับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านเป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือก จุลินทรีย์โพรไบโอติก นอกเหนือจากคุณสมบัติการทนต่อกรดและน้ำดี การต่อต้าน จุลินทรีย์ก่อโรค (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999) เนื่องจากการยึดติดกับลำไส้ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในระบบทางเดินอาหาร (Beachey, 1981) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เจ้าบ้าน (Ouwehand *et al.*, 1999 ; Blum *et al.*, 2002) ช่วยในการซ่อมแซมผนังทางเดินอาหาร (Elliott *et al.*, 1998) และต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (Reid *et al.*, 2002)

การศึกษาแบบจำลองการยึดติดผนังลำไส้ของโพรไบโอติกในสัตว์เจ้าบ้านมีวิธีการศึกษาหลายวิธี แต่ที่นิยม คือ ศึกษาเกี่ยวกับชั้นของเยื่อผนังลำไส้ เนื่องจากการยึดติดของโพรไบโอติกจะเกิดขึ้นที่บริเวณชั้นของเยื่อผนังลำไส้ (Ouwehand *et al.*, 1999) เยื่อผนังลำไส้ที่นำมาทำการศึกษาสามารถได้จากแหล่งต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เซลล์ไลน์ Caco-2 และ HT-29 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ไขมัน แต่สามารถหลั่งเยื่อ (mucus) ผนังลำไส้ได้ (Lesuffleur *et al.*, 1990) เนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ (Ouwehand *et al.*, 2001) หรือ อูจาระ (Kirjavainen *et al.*, 1998) เป็นต้น

การแข่งขันการยึดติดบนเยื่อทางเดินอาหารของแบคทีเรีย โพรไบโอติก สามารถยึดติดกับลำไส้แบบเฉพาะเจาะจงและแบบไม่เฉพาะเจาะจง การยึดติดแบบเฉพาะเจาะจงจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อแบคทีเรียเกาะยึดกับบริเวณจำเพาะ (receptor) ของเยื่อผนังลำไส้เท่านั้น ส่วนการยึดติดแบบไม่จำเพาะจะเป็นการยึดติดโดยอาศัยลักษณะการมีขั้ว (hydrophobic) หรือ โดยแรงไฟฟ้าสถิตย์ (Jonson and Conway, 1992)

Vesterlund *et al.*, (2004) ศึกษาการแข่งขันการยึดติดผนังลำไส้ของมนุษย์ ระหว่าง *Lactobacillus rhamnosus* GG กับ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 พบว่า *L. rhamnosus* และ *S. enterica* serovar Typhimurium มีบริเวณเกาะยึดกับผนังลำไส้แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม *L. rhamnosus* สามารถลดการยึดติดของ *S. enterica* serovar Typhimurium ได้ การยับยั้งการยึดติดของแบคทีเรียก่อโรคนี้อาจจะเป็นผลมาจากค่าความเป็นกรดเบสที่ลดลงภายในลำไส้ มากกว่าเกิดจากตัวเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยตรง (Lehto and salminen, 1997) และ

จากการศึกษาของ Rinkinen *et al.*, (2003) พบว่าการยีสติดักกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าถิ่นกับแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อมากกว่า เนื่องจากความจำเพาะของเชื้อต่อสัตว์เจ้าถิ่น

4.4 ความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้มาก โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อย

4.5 ผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร

4.5.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

Murry *et al.* (2004) ทำการศึกษา *L. salivarius* และ *L. plantarum* ที่เป็นโพรไบโอติกทางการค้า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* และ *Clostridia perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไก่ได้ โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากแบคทีเรีย *L. salivarius* และ *L. plantarum* มีการหมักสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ผลิตกรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก และกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรดเบสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไก่ลดลง ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเจริญ

4.5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ในสถานะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ มีผลทำให้โปรตีนในชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรน และโปรตีนภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไป จนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

Ander (1970) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.12 มิลลิโมล/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม lactococci ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมล/ลิตร จะทำให้เซลล์ตาย

4.5.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ คาร์บอนไดออกไซด์ เกิดจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เข้าไปแทนที่ก๊าซออกซิเจน ทำให้ความเป็นกรดเบสทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนไม่สามารถเจริญเติบโตและตายในที่สุด (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

4.5.4 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์จากไพรูเวท (pyruvate) ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ โดยแบคทีเรียกรดแลกติกจะหมักซิเตรท ได้พลังงานและไพรูเวทจำนวนมาก ไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นไดอะซีทิลและอะซิโตนิน (acitoin)

ไดอะซีทิลสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยไปขัดขวางการใช้กรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) ในแบคทีเรียแกรมลบ (Ouweland, 1998)

4.5.5 สารต่อต้านจุลินทรีย์น้ำหนักริมเลกุลต่ำ

จากการศึกษาของ Ouweland (1998) พบว่า สารต่อต้านจุลินทรีย์น้ำหนักริมเลกุลต่ำ สามารถจำแนกออกมาได้เป็น 2 สาร คือ Reuterin และ 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (PCA) Reuterin เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์น้ำหนักริมเลกุลต่ำที่สร้างโดย *L. reuteri* มีคุณสมบัติในการยับยั้ง แบคทีเรียชนิดต่างๆ รา โปรโตซัว และไวรัส ส่วน PCA สร้างโดย *Lactobacillus casei* สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* และ *Pseudomonas putida* ได้

4.5.6 อะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

เกิดระหว่างการย่อยคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิด Heterofermentative โดยจะแปรสภาพไปเป็นเอธานอลด้วยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียกรดแลกติกขาดเอนไซม์นี้ หรือเอนไซม์ถูกขัดขวาง จะทำให้มีปริมาณของ อะซีตัลดีไฮด์

มาก เกิดกลิ่นเฉพาะตัว เช่น กลิ่นในโยเกิร์ต ซึ่งถ้ามีปริมาณ ของอะซิตาลดีไฮด์ 10-100 ppm. จะสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ (Yoshimura, 2000)

4.5.7 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน หมายถึง สารที่มีลักษณะเป็นโมเลกุลโปรตีน มีฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน Ross (2002) พบว่า แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ (broad spectrum) โดยทำลายประจุบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย หรือยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์

Franz *et al.* (1998) พบว่า *L. plantarum* BFE 905 สามารถผลิต แบคเทอริโอซิน ที่เรียกว่า Plantaricin D มีฤทธิ์ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และมีความคงตัวในช่วงความเป็นกรดเบส 2-10

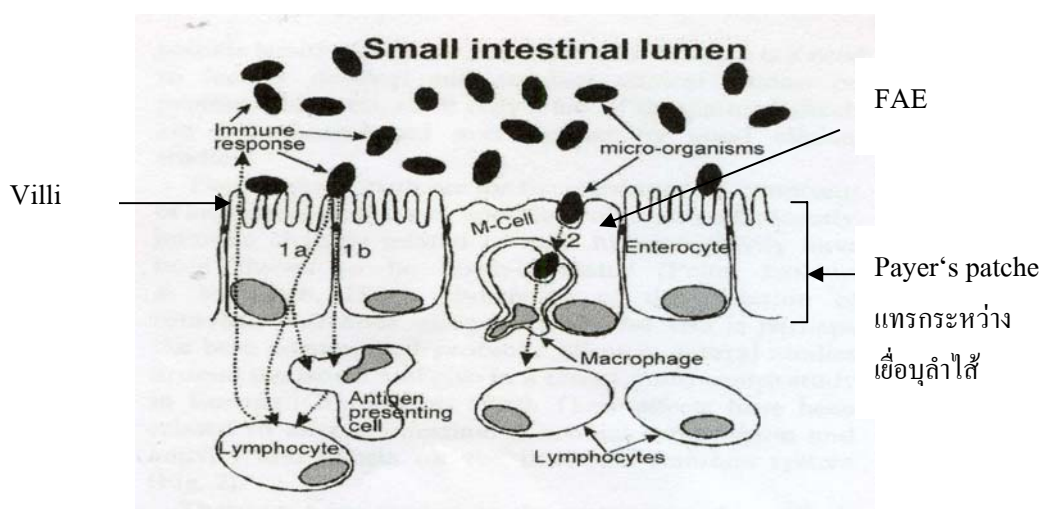
4.6 การป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรค และช่วยเพิ่มระดับของภูมิคุ้มกัน

4.6.1 การยีสิตัดผนังลำไส้

การบริโภคแบคทีเรียที่สามารถยีสิตัดกับผนังลำไส้ เช่น *L. johnsonii* Lj1 และ *B. lactis* Bb12 ทำให้เพิ่มความสามารถในการกำจัด *E. coli* ด้วยขบวนการฟาโกไซโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Schiffrin *et al.*, 1994)

การยีสิตัดผนังลำไส้สัตว์เจ้าถิ่นของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ โดยเนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และถัดมาจนเกือบถึงชั้นของกล้ามเนื้อ (Mardara, 1997) โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้โดยตัวโพรไบโอติก หรือชิ้นส่วนโพรไบโอติก หรือสารเมตาบอไลต์ที่โพรไบโอติกผลิตขึ้น เรียกสิ่งเหล่านี้ว่า เอนติเจน เมื่อเอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิว เป็น M-cells เรียกว่า follicle associated epithelium (FAE) ที่ต่อมน้ำเหลืองภายในลำไส้หรือ Payer 's patches (Laissue *et al.*, 1993) M-cells สามารถรับเอนติเจนได้ดังภาพที่ 2. (ทางที่ 2) หรือเซลล์เยื่อ

บุผิวรับแอนติเจนเข้ามาโดยตรง (ทางที่1a) หรือ แอนติเจนผ่านเข้ามาทางที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว (tight junctions) (ทางที่1b)



ภาพที่ 2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยโพรไบโอติก

ที่มา : Madara *et al.* (1999)

จากภาพที่ 2. การยึดติดของโพรไบโอติกที่มีความแข็งแรงส่งผลให้ เซลล์เยื่อบุนำโพรไบโอติกผ่านเข้ามาในเนื้อเยื่อเหง้าเหลืองได้ดี โพรไบโอติกจึงสามารถการชักนำให้เกิด เซลล์ที่มีหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells) และ ลิมโฟไซต์ชนิด ทีเซลล์ได้มากขึ้น (Strober *et al.*, 1998)

4.6.2 ไม่เกี่ยวข้องกับการยึดติดผนังลำไส้

แบคทีเรียที่ไม่ยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าถิ่นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้โดยตรง เช่น เพิ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์ กระตุ้นการดูดซึมแอนติเจนของสัตว์ และผลิตสารช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน เช่น อินเตอร์เฟอรอน (interferon) เป็นต้น (Ouwehand *et al.*, 1999) โดยการบริโภค แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถเพิ่มการหมุนเวียนของแอนติบอดีในร่างกาย เพิ่มกิจกรรมของมาโครฟาจ (macrophage) และเพิ่มจำนวน natural killer cells (NK-cells) (Fuller and Perdigon, 2000)

4.7 มีความคงตัวสูง โดยเมื่อผ่านกระบวนการผลิตโพรไบโอติกแล้วต้องสามารถที่จะมีชีวิตอยู่และเก็บรักษาได้นาน

นอกจากคุณสมบัติที่กล่าวมาแล้วยังมีประโยชน์ทางด้านโภชนะที่คาดว่าจะได้รับจากจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Holzapfel *et al.*, 1998) คือ

4.8 ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสารอาหารบางชนิดได้ เช่น β -galactosidase

เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ กาแลคโตซิเดส (galactosidase) ในคน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์กาแลคโตซิเดสในการช่วยย่อยน้ำตาลกาแลคโตสในน้ำนม (Marteau *et al.*, 1997)

ลดการทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น กลูคูโรนิเดส (-glucuronidase) และอะโซรีดักเทส (azoreductase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นสารก่อมะเร็ง (Rowland, 1992)

4.9 ช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอล

จากการศึกษาของ Liong and Shah (2004) พบว่า ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจะมีระดับคลอเรสเตอรอลต่ำ เนื่องจากการผลิตน้ำดีในตับของคนและ สัตว์ใช้คลอเรสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โพรไบโอติกที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (BSH) ทำให้เกิด free bile salt และ cholic acid ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมีการดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ต่ำ ส่งผลให้มีการใช้คลอเรสเตอรอลเพื่อสร้าง free bile salt และ cholic acid เพิ่มมากขึ้นในตับ ทำให้ระดับคลอเรสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง

4.10 ทนต่ออุณหภูมิสูง

การผลิตโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการ Spray-dried ผสมกับอาหาร และส่วนประกอบต่างๆ เนื่องจากสะดวกในการเก็บรักษา และขนส่ง (Ross *et al.*, 2005) แต่ในขั้นตอนของการผลิตโพรไบโอติก ซึ่งใช้ความร้อนสูง ส่งผลให้เซลล์เกิดการสูญเสีย

และ ตาย ประสิทธิภาพลดลง (Teixeira *et al.*, 1995) ดังนั้นคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียจึงเป็นคุณสมบัติโพรไบโอติก (Desmond *et al.*, 2001)

5. แบคทีเรียกรดแลกติก

5.1 กระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย

แบคทีเรียกรดแลกติกมีความสามารถในการหมักน้ำตาลเฮกโตสแตกต่างกันโดยแบ่งกระบวนการออกเป็น 2 รูปแบบคือ

5.1.1 Homofermentative

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติกลักษณะนี้เกิดขึ้นโดยผ่านวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสแล้วได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก ในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยามีการใช้พลังงานจาก ATP 2 โมเลกุล เพื่อเปลี่ยนกลูโคสไปเป็น glucose-6-phosphate และ fructose-1,6-diphosphate ตามลำดับ จากนั้น fructose-1,6-diphosphate เปลี่ยนเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม ได้แก่ glyceraldehyde-3-phosphate และ acetone phosphate ต่อมา glyceraldehyde-3-phosphate เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันควบคู่กับการรีดิวซ์ NAD และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของอนุมูลฟอสเฟตกลายเป็น 1,3-diphosphoglyceric acid จากนั้นอนุมูลฟอสเฟตจะถ่ายทอดจาก ไปยัง ADP เพื่อสังเคราะห์ ATP และเกิด 3-phosphoglyceric acid จากนั้น 3-phosphoglyceric acid จะเปลี่ยนรูปเป็น 2-phosphoglyceric acid และ phosphoenolpyruvic acid ตามลำดับ ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกพร้อมกับการถ่ายเทอนุมูลฟอสเฟต กรดไพรูวิกที่เกิดขึ้นนั้นจะเข้าสู่กระบวนการหมักซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของสภาวะออกซิเดชันและรีดักชันในเซลล์ โดย NADH ที่เกิดขึ้นจะออกซิไดซ์เพื่อเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติกโดยตรง จากกระบวนการดังกล่าวนี้จะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุล ต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Kandler, 1983)

5.1.2 Heterofermentative

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มนี้ดำเนินตามวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการหมักคือกรดแลกติก ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล หรือกรดอะซิติก กระบวนการหมักเริ่มต้นจากกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate จากนั้น glucose-6-phosphate จะเปลี่ยนไปเป็น 6-phosphogluconic acid และ ribose-5-phosphate โดยการทำงานของ dehydrogenase และ 6-phosphogluconate dehydrogenase ตามลำดับ ต่อมา ribose-5-phosphate เปลี่ยนเป็น xylulose-5-phosphate โดยเอนไซม์ pentose phosphate isomerase จากนั้น xylulose-5-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyl phosphate และ glyceraldehyde-3-phosphate ต่อมา glyceraldehyde-3-phosphate จะเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกและกรดแลกติกตามลำดับ ส่วน acetyl phosphate จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล หรือกรดอะซิติกขึ้นอยู่กับความสมดุลของสภาวะออกซิเดชันและรีดักชัน สำหรับผลผลิตสุทธิจะได้พลังงาน ATP 1 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Kandler, 1983)

5.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก

โดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะพื้นฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาในระดับโมเลกุล เช่น อัตราส่วนของเบสดีเอ็นเอ (G+C content) การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ ลำดับเบสบน rRNA (Stiles and Holzapfel, 1997) ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างของแบคทีเรียแต่ละสกุล ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลกติกถูกจำแนกเป็น 12 สกุล ได้แก่

5.2.1 *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เนื่องจากมีความแตกต่างในอัตราส่วนของเบสดีเอ็นเอ (G+C content) ภายในสกุลสูงถึง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ จึงทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อน หรือทรงรี (coccobacilli) มีความต้องการสารอาหารในการเจริญสูงบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 56 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย (Hammes and Vogel, 1995) คือ

ก. กลุ่ม obligately homofermentative lactobacilli ประกอบด้วย 17 สปีชีส์ หมักน้ำตาลเฮกโตส ผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลกติกมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอนไซม์ fructose-1,6-bisphosphate-aldolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ phosphoketolase จึงไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโตสและกลูโคเนทได้

ข. กลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli ประกอบด้วย 18 สปีชีส์ หมักน้ำตาลเฮกโตสเป็นกรดแลกติกผ่านวิถี EMP สามารถสร้างเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ได้ จึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโตส เพนโตส และกลูโคเนทได้ โดยในสถานะที่มีกลูโคสจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ในวิถีฟอสโฟกลูโคเนท

ค. กลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli ประกอบด้วย 22 สปีชีส์ หมักน้ำตาลเฮกโตสและเพนโตส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทได้ผลิตภัณฑ์เป็นแลกเตท กรดอะซิติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

5.2.2 *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน มักจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตรกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้น จากการหมักกลูโคส (homofermentative) เจริญที่อุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ ประกอบด้วย 39 สายพันธุ์ ที่เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ มีปริมาณเบส G+C ระหว่าง 34-46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Hardie and Whiley, 1995)

5.2.3 *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ แต่ไม่ทุกสายพันธุ์ ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ *V. fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Streptococcus* กลุ่ม N แยกได้จากอุจจาระของไก่ และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel, 1997)

5.2.4 *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน สามารถแบ่งตัวได้ใน 2 ลักษณะ ทิศทางบนระนาบเดียวโดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ในสถานะไม่มีอากาศผลิตรกรดแลกติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 25-40 องศา

เซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์อะตาเลสเทียม (pseudocatalase) และบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์

5.2.5 *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* สายพันธุ์เดิม คือ *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Stiles and Holzapfel, 1997)

5.2.6 *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ *A. viridans* และ *A. urinae* สายพันธุ์เดิมคือ *P. homari* และ *P. urine-equi* ตามลำดับ นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีสภาวะเป็นเบสสูงและสามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต มีปริมาณเบส G+C ระหว่าง 39.6-39.7 โมลเปอร์เซ็นต์ *A. viridans* ก่อให้เกิดโรคในกุ้งล็อบสเตอร์และเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stiles and Holzapfel, 1997)

5.2.7 *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) จากการหมักแลคโตส มักใช้เป็นก้านเชื้อในผลิตภัณฑ์นมสามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Teuber, 1995)

5.2.8 *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว คู่ หรือเป็นสายโซ่ สั้นๆ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคสสามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ อะตาเลสเทียม (pseudocatalase) และบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรค แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มนี้ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ คือ *Ent. faecalis*, *Ent. avium*, *Ent. gallinarum* และ *Ent. cecorum* มีปริมาณเบส G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dervriese and Pot, 1995)

5.2.9 *Leuconostoc* ลักษณะของเซลล์ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดอกออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่เมื่อเจริญในน้ำนม เซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตรกรดแลกติกชนิด D(-) เอรานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และไดอะซิติล จากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง จัดเป็น heterofermentative การเจริญต้องการอาหารสูง ประกอบด้วย 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. lactis*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. citreum*, *Leuc. argentum* และ *Leuc. fallax* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dellagio et al., 1995)

5.2.10 *Oenococcus* ประกอบด้วยสายพันธุ์เดียวคือ *O. oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leu. oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนกรดและเออรานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอด้วยการศึกษาดีเอ็นเอไฮบริดซ์เซชัน และลำดับเบสของ 16S rRNA ต่างจากสายพันธุ์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellagio et al., 1995)

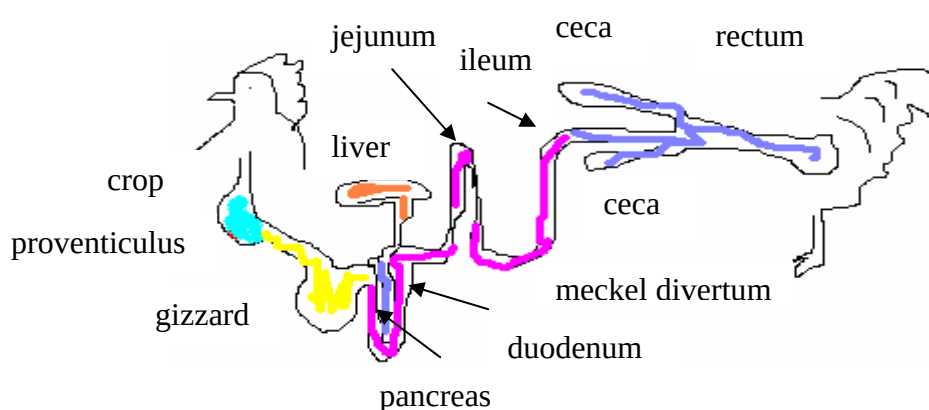
5.2.11 *Weissella* เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งและกลมลักษณะคล้ายกับ *Leuconostoc* (*Leuconostoc*-like bacteria) ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 7 สายพันธุ์ คือ *W. paramesenteroides* (*Leuc. paramesenteroides*), *W. confuses* (*Lactobacillus confuses*), *W. halotolerans* (*Lb. halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. kandleri*), *W. minor* (*Lb. minor*), *W. viridescens* (*Lb. viridescens*) และสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1995)

5.2.12 *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว (slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตรกรดแลกติกชนิด L(+) อะซิเตท เอรานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักน้ำตาลเฮกโตส อาจพบการผลิตอะมิโน และกรดฟอร์มิก ในสภาวะการให้อากาศ ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. fundium* และ *C. alterfunditum* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 31.6-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ (Schillinger and Holzapfel, 1995)

สกุลของแบคทีเรียกรดแลกติกตามการจัดจำแนกในปัจจุบันและลักษณะที่สำคัญ
สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

6. กายวิภาคในระบบทางเดินอาหารของไก่

การศึกษากายวิภาค ในระบบทางเดินอาหารของไก่ไข่ (Simon and Versteeg, 1989) ดัง
แสดงในภาพที่ 3 ทำให้ทราบความเป็นกรดเบสในระบบทางเดินอาหารของไก่ ดังแสดงในตารางที่
3



ภาพที่ 3 ระบบทางเดินอาหารของไก่

ที่มา : Simon and Versteeg (1989)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

ลักษณะ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc</i>	<i>Lactococ.</i>	<i>Leucon.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella.</i>
					<i>Vagoc.</i>	<i>Oenoc.</i>				
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์ ^ก	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO ₂ จากกลูโคส ^ข	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10 °ซ ^ก	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45° ซ	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่ 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่ 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่ pH 4.5	ND	+	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
ชนิดของกรดแลกติก	L	D,L,DL	L	L	L	D	L,DL	L	L	D,DL

หมายเหตุ ^ก + เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์, - เซลล์ไม่ต่อกันเป็น 4 เซลล์ ^ข + ผลิต CO₂, - ไม่ผลิต CO₂, ± ขึ้นกับชนิดของเชื้อ

^ก + เจริญ, - ไม่เจริญ, ± ขึ้นกับชนิดของเชื้อ, ND ไม่ระบุ

ที่มา : Axelsson (1998)

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบสและค่าเฉลี่ยระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอาหารภายในส่วนต่างๆของระบบทางเดินอาหารของไก่ หลังจากที่ได้รับอาหารตลอด (ad libitum) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ส่วนต่างๆของระบบทางเดินอาหาร	ช่วงระยะเวลาที่อาหารผ่าน (นาทีก)	pH
Crop	50	5.5
Proventriculus and gizzard	90	2.5-3.5
Duodenum	5-8	5-6
Jejunum	20-30	6.5-7
Ileum	50-70	7-7.5
Rectum	25	8

ที่มา : Simon and Versteeg (1989)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์และสภาวะการเจริญ

1.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกแยกจากลำไส้ไก่ ของไก่จำนวน 20 ตัว (คมแข และคณะ, 2542) แบ่งออกเป็นลำไส้ส่วนต่างๆ ได้แก่ ส่วนดูโอดินัม (duodenum) เจจูนัม (jejunum) อีเลียม (ileum) และ ซีกัม (cecum) ให้เป็นรหัส D, J, I และ C ตามลำดับ รวม 194 ไอโซเลท เก็บเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว MRS ที่มี กลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ผู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ใช้อาหารเหลว MRS และอาหารแข็ง MRS (1.5% agar) ในการเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2 แบคทีเรียก่อโรค

เชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ซึ่งเป็นเชื้อเป้าหมายในการศึกษา ได้แก่ *Shigella dysenteriae*., *Salmonella Enteritidis* DMST 17368, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 และ *Vibrio parahaemolyticus* สภาวะการเจริญของเชื้อก่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนวิธีการเตรียม และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดูที่ภาคผนวก ก

ตารางที่ 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	อาหาร	สภาวะ
<i>Salmonella</i> Enteritidis DMST 17368	Nutrient broth ,NB และ Nutrient agar,NA (1.5%agar)	มีออกซิเจนแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
<i>Salmonella</i> Typhimurium	NB และ NA	มีออกซิเจนแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
<i>Shigella dysenteriae</i>	NB และ NA	มีออกซิเจนแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NB และ NA	มีออกซิเจนแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
<i>Campyrobacter jejuni</i> ATTC 33291	Bruceela broth และ Columbia blood agar ที่มี เลือด 5 %	มีออกซิเจนเล็กน้อย (5% ของ อากาศ) ที่อุณหภูมิ 42 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NB และ NA ที่มี 15 % โซเดียมคลอไรด์	อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการ

1. การทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก

วิธีการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถทนต่อน้ำดี ดัดแปลงจากวิธีของ Jin *et al.* (1998) โดยถ่ายเชื้อ 1 loop ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือปนอาหารแข็ง MRS บ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร ที่มี น้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีน้ำดี 5 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม บ่มทั้ง 2 ชุด ทดลองที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธีการ spread plate นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี

$$\begin{aligned} & \text{ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี} \\ & = \frac{\text{ปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดี} - \text{ปริมาณเชื้อในชุดทดลองควบคุม} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อในชุดทดลองควบคุม}} \end{aligned}$$

2. การทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค

2.1 การทดสอบด้วยวิธี Agar-well-diffusion

ใช้ทดสอบกับ *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Schillenger and Lucke (1989) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสามารถทำวิธีการตามตารางที่ 3

2.1.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถในการทนต่อน้ำดีเข้มข้น 3 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำตัวอย่าง

ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออกจากนั้นนำส่วนใสไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง

2.1.2 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Agar-well-diffusion

ถ้าเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Shigella dysenteriae.*, *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 และ *Vibrio parahaemolyticus* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน อาหารแข็ง NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทบนจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ รอจนอาหารแข็งและ ผิวอาหารแห้ง ใช้ cork borer เบอร์ 3 (6 มิลลิเมตร) เจาะอาหารให้เป็นหลุม จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งเป็นกิจกรรมการยับยั้ง (inhibition activity)

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม 6 มิลลิเมตร}}$$

2.2 การทดสอบด้วยวิธีการ Direct method

ใช้ทดสอบกับ *Campyrobacter jejuni* ATTC 3329 โดยดัดแปลงวิธีการจากวิธีของ Coventry *et al.* (1997) ซึ่งการเตรียมเชื้อดังแสดงในตารางที่ 3

2.2.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถในการทนต่อน้ำดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเชื้อ 1 โคโลนี จูกลงใน MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง โดยวิธี Direct method

ถ่ายเชื้อ *Campyrobacter jejuni* ATTC 3329 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia blood agar ที่มีเลือด 5% ในขณะที่อาหารยังหลอมอยู่ จากนั้นเททับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก บ่มในสภาวะมี ออกซิเจน 5% โดยใช้แผ่นสังเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Anaerocult® C, Merck, Thailand) อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งเป็นกิจกรรมการยับยั้ง (inhibition activity)

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรียกรดแลกติก (มิลลิเมตร)}}$$

3. การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส

วิธีการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถทนต่อกรดและเบส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jin *et al.* (1998) โดยถ่ายเชื้อ 1 loop จาก stock culture ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือปนอาหารแข็ง MRS บ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ 1 โคโลนีในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ค่าต่างๆ คือ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ sodium hydroxide ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในการปรับ MRS ให้เป็นเบส และ hydrochloric acid ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในการปรับ MRS ให้เป็นกรด วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่ม 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง โดยวิธีการ spread plate แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดซึ่งสามารถคำนวณโดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง (Log CFU/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง (Log CFU/ml)}}$$

4. การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

เตรียมการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ดังวิธีการข้อ 3 จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 1 % ลงอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มใน water bath อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที วัดปริมาณของเชื้อ โดยการ pour plate แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดซึ่งสามารถคำนวณได้โดย

$$\begin{aligned} & \text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} \\ &= \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที (Log CFU/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 วินาที (Log CFU/ml)}} \end{aligned}$$

5. การวิเคราะห์กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ย่อยน้ำดี (Bile salt hydrolase, BSH)

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ BSH ใช้วิธีการของ Liong and Shah (2005)

5.1 การเตรียมเอนไซม์จากแบคทีเรียกรดแลกติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 1 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แยกเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH7 จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยใช้ phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์ในชุดทดลองให้เท่ากันโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นของแสง 600 นาโนเมตร เป็น 0.9 นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้ glass beads ที่มีขนาด 0.1 มิลลิเมตร จำนวน 0.3 กรัม ด้วยเครื่อง Bead beater (Minibead beater, Biospec) เป็นเวลา 180 วินาที แยกเศษเซลล์ออกโดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

5.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

เตรียม taurodeoxycholic acid ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท และ sodium phosphate buffer (pH6) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นใส่ส่วนเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 5.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex โดยชุดควบคุมใช้น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใส่สารละลาย trichloroacetic acid (15% w/v) 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที แยกเอาส่วนใส 0.2 มิลลิลิตร เติมด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และ สารละลาย ninhydrin (แสดงวิธีเตรียมในภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำมาต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 14 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง รอจนกระทั่งเย็น จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (Unit) คือปริมาณเอนไซม์ ที่สามารถย่อยสับสเตรท ให้กรดอะมิโนอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที เมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใต้สภาวะทดสอบ

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดี สามารถคำนวณ โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Unit/ml} = \frac{(\text{ODs}-\text{ODc}) \times \text{Dilution} \times \text{Vt}}{\text{Vs} \times \text{mw} \times \text{Slope} \times \text{time}}$$

ODs	=	ค่าการดูดกลืนแสงของชุดตัวอย่าง
ODc	=	ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม
Vt	=	ปริมาตรของสารก่อนปฏิกิริยาการเกิดสี
Vs	=	ปริมาตรของสารละลายใส
Dilution	=	ค่าการเจือจางชุดตัวอย่าง
Mw	=	มวลโมเลกุลของ taurine มีค่าเท่ากับ 125.15
Slope	=	ความชันของกราฟมาตรฐาน

5.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในข้อ 6.2 โดยใช้ taurine ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

6. การทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้

6.1 การเตรียมเยื่อผนังลำไส้

ใช้ spatula ขูดเยื่อผนังลำไส้ไก่เนื้ออายุ 45 วัน ใส่ลงใน phosphate buffer saline (pH 7.3) ที่เย็น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ *Roose et al.* (2000) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที และ 15000 รอบต่อนาที 15 นาที ทำแห้งสารละลายที่ได้ โดยวิธี freeze dry ด้วยเครื่อง Freeze dry LyoLab 3000 (Heto Holten, Denmark) และเก็บเยื่อผนังลำไส้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 1 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์และทำเป็นสารละลายเซลล์ ด้วย phosphate buffer saline (pH 7.3) ที่มี Tween 20 เข้มข้น 0.05 % (v/v) (PBST) นำสารละลายเซลล์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยกำหนดให้มีค่าเท่ากับ 0.5 ในทุกชุดการทดลอง

6.3 การทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้

การทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ ทำตามวิธีการของ *Nitisinprasert et al.* (2006) โดยละลายเยื่อผนังลำไส้ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม ใน disodium carbonate buffer (pH 9.7) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเคลือบสารละลายเยื่อผนังลำไส้ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ใน Eppendorf (E-tube) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ที่ได้จากข้อ 7.2 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด E-tube บ่มที่ 37 องศา

เซลล์เชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ล้าง E-tube ด้วย สารละลาย PBST 150 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง และเก็บน้ำล้าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ไม่ยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ ด้วยวิธีการ pour plate จากนั้น ใส่สารละลาย normal saline 1 มิลลิลิตร ลงใน E- tube บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที และผสมด้วย vortex ทุกๆ 30 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์เซลล์ที่มีการยึดติดกับเยื่อลำไส้ด้วยวิธีการ pour plate จำนวนประสิทธิภาพการยึดติด

$$\text{ประสิทธิภาพการยึดติด} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ที่มีการยึดติดกับเยื่อลำไส้ (logCFU/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเซลล์ทั้งหมด (logCFU/ml)}}$$

7. การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

7.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS บ่มเป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทดสอบดังนี้

7.1.1 การตรวจการติดสีแกรม (Beisheier, 1991)

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ พอทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสี แกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวให้กล้องจุลทรรศน์

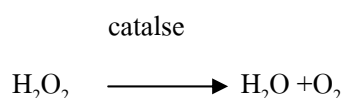
7.1.2 ทดสอบการเคลื่อนที่ (Johnson and case, 1989)

ใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีแทงลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีผงวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แท่งลึกประมาณ 2 ใน 3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน ตรวจสอบการเคลื่อนที่โดยสังเกตที่รอยแทง หากมีการกระจายของเชื้อ ออกจากรอยที่แทงไว้ แสดงว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้

7.1.3 ทดสอบกะตะเลส (Johnson and case, 1989)

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบน กระจกกรองปลอดเชื้อ จากนั้นเจียเชื้อบริสุทธิ์ลงบนกระจกกรอง ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อ สามารถสร้างเอนไซม์กะตะเลสได้ ดังสมการ



7.1.4 การตรวจสอบการสร้างก๊าซ (Johnson and Case, 1989)

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีหลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็น แบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

7.1.5 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (Siliker *et al.*, 1980)

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

7.1.6 ทดสอบความทนเกลือ (Siliker *et al.*, 1980)

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

7.1.7 ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดต่างๆ (Wistreich and Lechtman, 1980)

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ที่ปรับพีเอช เป็น 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

7.2 การศึกษาทางชีวเคมี

ศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France) โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเซลล์ให้ได้ปริมาณมากพอ ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารแขวนลอยเซลล์ด้วยปริมาตรที่แน่นอน (n) ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปวัดค่าแสงส่องผ่าน (% T) ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 48-53%T ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2McF ถ่ายเชื้อปริมาตร 2n จากสารแขวนลอยเซลล์ ใส่ใน API 50 CHL medium เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมชุดทดสอบ โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในหลุมที่ถาด เพื่อให้เกิดความชื้นในขณะที่บ่ม เรียงชุดทดสอบลงบนถาด ถ่าย API 50 CHL medium ที่มีเชื้ออยู่ลงไปทุกช่อง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและอย่าให้ปลายทูปสัมผัสกับอาหารในขณะที่อาหารจะเต็ม เททับด้วย mineral oil นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APILAB version 3.22 (BioMerieux, France) โดยอ่านผลบวกจากการเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 ผลบวกอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำ หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรืออ่านผลไม่ชัดเจน ให้ใส่เครื่องหมาย ?

7.3 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA

7.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป E-zi DNA KIT (Sunnolincorporation, Thailand) ตามคู่มือของชุดสกัดโดยแสดงในภาคผนวก ข จากนั้นวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sambrook and Russell, 2001) คำนวณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร มากกว่า 1.8 และแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร มากกว่า 1.5

7.3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอ 1500 base pair (bp) ของยีน 16S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากข้อ 7.3.1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 1 ยูนิต สารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ (1X) แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 1407B และ 8UA แสดงในตารางที่ 5 (Nitisinprasert *et al.*, 2000) ดีเอ็นเอต้นแบบ 200 นาโนกรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำดีไอออไนซ์ปลอดเชื้อ จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermalcycler PCR (Hybaid, UK) โดยตั้งโปรแกรมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย 3 ขั้นตอน ขั้นแรกประกอบด้วยช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 ประกอบด้วยช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ช่วง annealing 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ ช่วง extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้ายประกอบด้วยช่วง extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำบริสุทธิ์ PCR product ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Extract (MACHEREY-NAGEL, Germany) ตามคู่มือของชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก ข

ตารางที่ 5 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Primer	Type	Hits	Sequence (5'-3')	Reference
1407B	Reverse	At 3' end of 16S rRNA	GACGGGCGGTGTGTAC	Oyaizu, 1992
8UA	Forward	At 5' end of 16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Kawamura <i>et al.</i> , 1995

ที่มา : Nitisinprasert *et al.* (2000)

7.3.3 การเตรียม competent cell จากเชื้อ *E. coli* DH5 α

เตรียม competent cell จากเชื้อ *E. coli* DH5 α โดยวิธีการใช้ แคลเซียมคลอไรด์ (Cohen *et al.*, 1972) โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 α จนเซลล์เจริญถึงระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) สังเกตจากการดูกลั่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.3-0.4 จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 30 mM CaCl₂ ที่เย็น ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม เหย้าให้เซลล์กระจายทั่วแล้ววางทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่ง competent cell ลงในหลอด microtube ที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 210 ไมโครลิตร

7.3.4 การโคลน PCR product และการคัดเลือกโคลน

เชื่อมต่อ PCR product จากข้อ 7.3.2 เข้า pGEM T Easy vector (Promega, USA) ด้วยปฏิกิริยา ligation ดังแสดงในภาคผนวก ข แล้วทรานส์ฟอร์ม (transform) เข้าสู่ *E. coli* DH5 α ในสภาพ competent cell จากข้อ 7.3.3 โดยวิธีการ heat shock จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมโดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหาร LB ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG ตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกได้ด้วย Colony PCR reaction (Nitisinprasert *et al.*, 2000) โดยนำโคโลนีที่คัดเลือกมาละลายในน้ำปราศจากไอออนปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีจนกระทั่งเย็น นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ใช้สารละลายใส่ส่วนบนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR โดย

ใช้นิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์เป็น SP6 และ T7 (Promega, USA) ดังแสดงวิธีการในภาคผนวก ข จากนั้นยีนโคลนที่สามารถเพิ่มปริมาณ PCR product โดยนำมาสกัดพลาสมิด โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIA prep Spin Miniprep Kit 50 (QIAGEN) ตามคู่มือของชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก ข แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธีการอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

7.3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA

วิเคราะห์หาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ (Macrogen, Korea) แล้วยนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (% identity) กับฐานข้อมูล (Gene Bank database) ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> โดยใช้โดยโปรแกรม CAP3 sequence Assembly Program (Huang and Madan, 1999) และ BLASTN version 2.2.16 (Mar-25-2007)

ผลและวิจารณ์

1. การทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก จำนวน 194 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกในเบื้องต้นเป็นการคัดเลือกจาก ความสามารถในการทนต่อน้ำดีเนื่องจากน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ มีคุณสมบัติในการทำให้ไขมันแตกตัว (Eugene *et al.*, 1996) จึงสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียตายได้ (Jin *et al.*, 1998) ดังนั้น ความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกเชื้อที่จะนำไปผลิตโปรไบโอติก จากการทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก 194 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำดีใกล้เคียงกับ 3 เพอร์เซ็นต์ pH 6.4-6.8 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก 194 ไอโซเลทมีความสามารถทนต่อน้ำดีได้แตกต่างกัน พบไอโซเลท ที่สามารถเจริญในอาหาร เลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำดี 3 % มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0% ได้แก่ ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 โดยไอโซเลท C3-3 เป็นไอโซเลท ที่มีความสามารถในการทนต่อน้ำดีได้ดีที่สุดมีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีเป็น 55.92 % ดังแสดงใน ภาพที่ 4

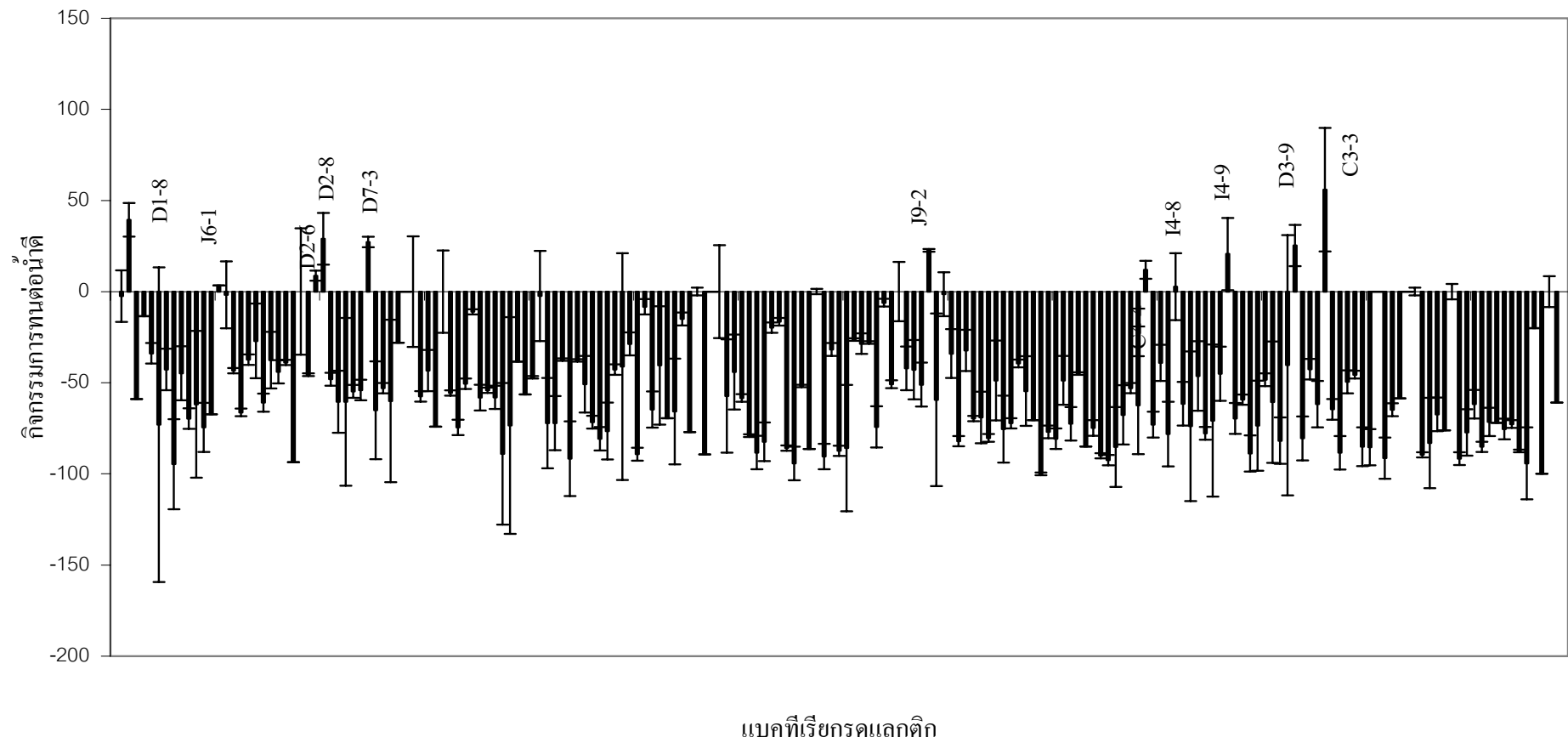
นอกจากนี้พบว่ากลุ่มของเชื้อ 194 ไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 เพอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งออกตามแหล่งที่แยกได้ คือ ส่วนของ คูโอคินัมมี 69 ไอโซเลท พบเชื้อที่มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 เพอร์เซ็นต์มีจำนวนมากที่สุด คือ ร้อยละ 7.24 ของเชื้อที่แยกจากคูโอคินัม ได้แก่ ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9 และ D7-3 ส่วนเจนนัมคิดเป็นร้อยละ 3.92 ของเชื้อที่แยกจากเจนนัมทั้งหมด 51 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท J6-1 และ J9-2 ส่วนของอิลิยม คิดเป็นร้อยละ 5.26 ของเชื้อที่แยกจากอิลิยมทั้งหมด 38 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท I4-8 และ I4-9 และ ส่วนของ ซีกัม คิดเป็นร้อยละ 5.55 ของเชื้อที่แยกจากซีกัมทั้งหมด 36 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท C3-3 และ C4-4 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลทจากลำไส้ส่วนคูโอคินัมมีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 เพอร์เซ็นต์มีจำนวนมากที่สุดคือ 5 ไอโซเลท หรือ 45.45 เพอร์เซ็นต์ของเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท

การที่พบเชื้อที่มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 เปอร์เซ็นต์มากบริเวณลำไส้ ส่วนดูโอเดนิม เนื่องจาก น้ำดีที่เก็บในถุงน้ำดี ถูกปล่อยออกมาในส่วนของลำไส้เล็กส่วน ดูโอเดนิม (Jin *et al.*, 1998) ดังนั้นในลำไส้ส่วนดูโอเดนิม จึงอาจมีแบคทีเรียที่สามารถทนต่อน้ำดีได้มาก

ไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 เปอร์เซ็นต์ในลำไส้ส่วนดูโอเดนิมคิดเป็นร้อยละ 7.24 ซึ่งมากกว่าลำไส้ส่วนซีกัม อีเลียม และเจจูนัม ที่มีร้อยละ 5.55, 5.26 และ 3.92 ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Jin *et al.* (1998) ที่พบแบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถทนต่อ 0.3 % น้ำดี บริเวณลำไส้ส่วน ซีกัม มากกว่าอีเลียม แต่การศึกษาของ Jin *et al.* (1998) และ Gilliland *et al.* (1994) พบว่า ไม่ทำการศึกษา แบคทีเรียที่แยกจากลำไส้ส่วนดูโอเดนิม

สำหรับระบบการย่อยอาหารในไก่ อาหารจะเดินทางผ่านระบบทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่ส่วนต้นมาจนถึงส่วนปลายจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง (วิโรจน์, 2538) ดังนั้นแบคทีเรียที่อยู่ภายในลำไส้จึงต้องสามารถที่จะทนน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงได้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และจากการศึกษาของ Gilliland *et al.* (1994) พบว่าความเข้มข้นของน้ำดีที่เพียงพอต่อการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีของแบคทีเรียคือ 0.3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นการใช้น้ำดีที่ระดับความเข้มข้นสูงคือ 3 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทนต่อน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงได้ ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกสูง

จากการศึกษาของ Stevens (1988) พบว่า สัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบของน้ำดีแตกต่างกัน เช่นในสัตว์ปีกมีเกลือน้ำดี (conjugate bile salt) Taurochenodeoxycholate (TCDC) เป็นองค์ประกอบหลัก (Knarreborg *et al.*, 2002) ส่วนในคน มี glycochenodeoxycholatem (GCDC) เป็นองค์ประกอบหลักโดยมีอัตราส่วนของglycine ต่อ taurine 3 : 1 (Harper *et al.*, 1977) ดังนั้นการทดสอบความสามารถการทนต่อน้ำดีเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่จะผลิตเป็นโพรไบโอติกในไก่ ควรใช้น้ำดีจากไก่มาทดสอบ



ภาพที่ 4 กิจกรรมการทนต่อน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 3 % ของแบบที่เรียกรวดแลกติก 194 ไอโซเลท

2. การทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค

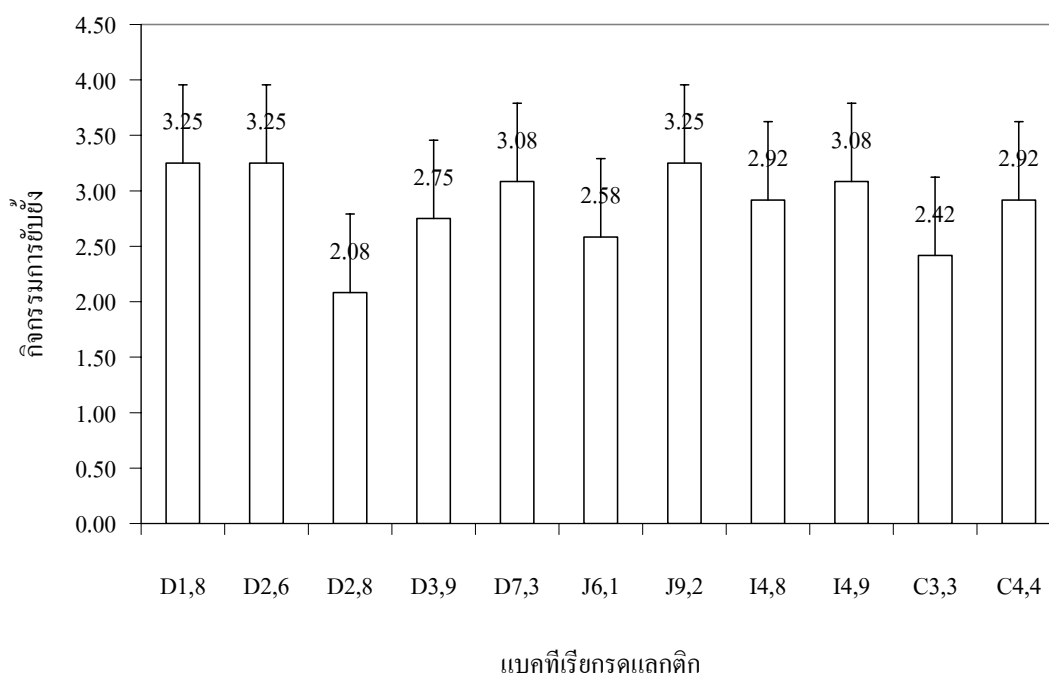
การศึกษาความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเนื่องจาก แบคทีเรียโพรไบโอติกต้องมีความสามารถในการส่งเสริมให้สัตว์เจ้าบ้านมีสุขภาพที่ดี การยับยั้งเชื้อก่อโรคจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 ความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1 การยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี Agar-well-diffusion

การทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก จะทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 % โดยมีทั้งหมด 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 โดยเมื่อนำสารละลายปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่าแบคทีเรีย 11 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ได้

การยับยั้ง *Sal.* Enteritidis DMST 17368 พบว่าไอโซเลต J9-2, D2-6 และ D1-8 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sal.* Enteritidis DMST 17368 ได้ดีที่สุดโดยมีกิจกรรมการยับยั้ง 3.25 ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต I4-9, D7-3, I4-8, C4-4, D3-9, J6-1 และ C3-3 มีกิจกรรมการยับยั้งอยู่ในช่วง 3.08-2.42 เรียงตามกิจกรรมการยับยั้งจากสูงไปต่ำ ส่วนไอโซเลต D2-8 มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำสุดคือ 2.08 ดังแสดงในภาพที่ 5



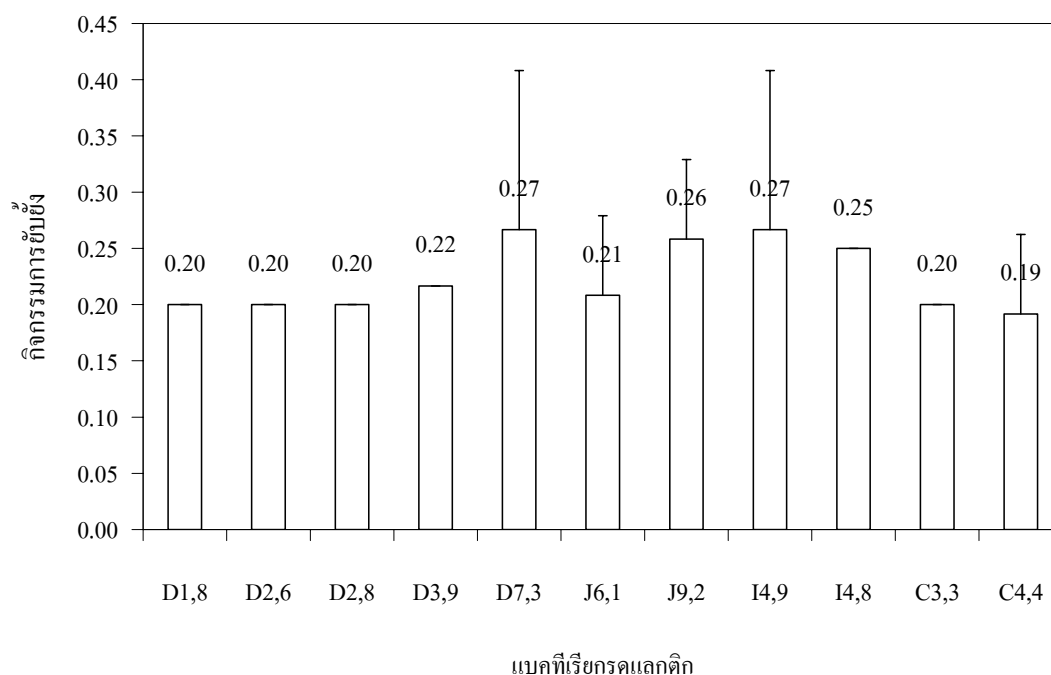
ภาพที่ 5 กักการยับยั้ง *Sal. Enteritidis* DMST 17368 ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลต

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่อาจจะอาศัยอยู่ในลำไส้ไก่ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ไก่ท้องเสียและส่งผลให้คนเสียชีวิต (Tauxe, 1991) จุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกจึงต้องมีความสามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค เพื่อให้สัตว์เจ้าบ้านมีสุขภาพที่ดี (Nurri et al., 1983 ; Chateau et al., 1993)

จากการศึกษาของ Oyarzabal and Conner (1995) พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถยับยั้ง *Salmonella* spp. ได้ 6 สายพันธุ์ และจากการศึกษาของ Ehrmann et al. (2002) พบว่า *Lactobacilli* ที่แยกจากกระเพาะปัสสาวะและลำไส้ของเป็ดสามารถยับยั้ง *E. coli* CTC 1028, *S. enteritidis* CTC 039 และ *S. typhimurium* CTC 1037 ได้

การยับยั้ง *Sal. Typhimurium* พบว่าไอโซเลต I4-9 และ D7-3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sal. Typhimurium* ได้ดีที่สุด โดยมีกักการยับยั้ง 0.27 ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต J9-2, I4-8, D3-9, J6-1, D2-8, D2-6, D1-8 และ C3-3 มีกักการยับยั้งอยู่ในช่วง

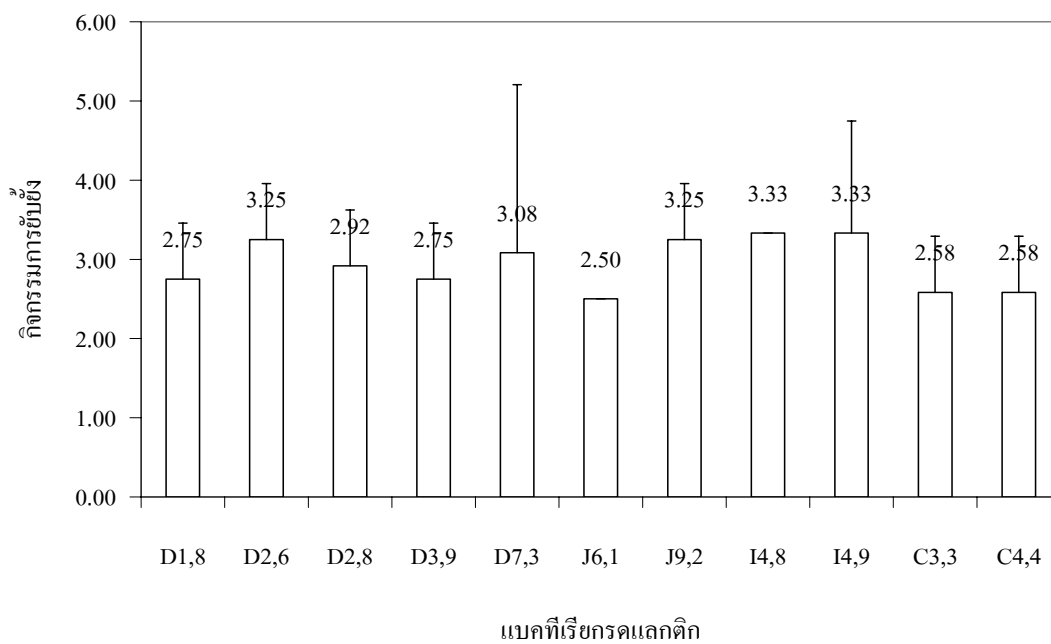
0.26-0.20 เรียงตามกิจกรรมการยับยั้งจากสูงไปต่ำ ส่วนไอโซเลท C4-4 มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำสุด คือ 0.19 ดังแสดงในภาพที่ 6



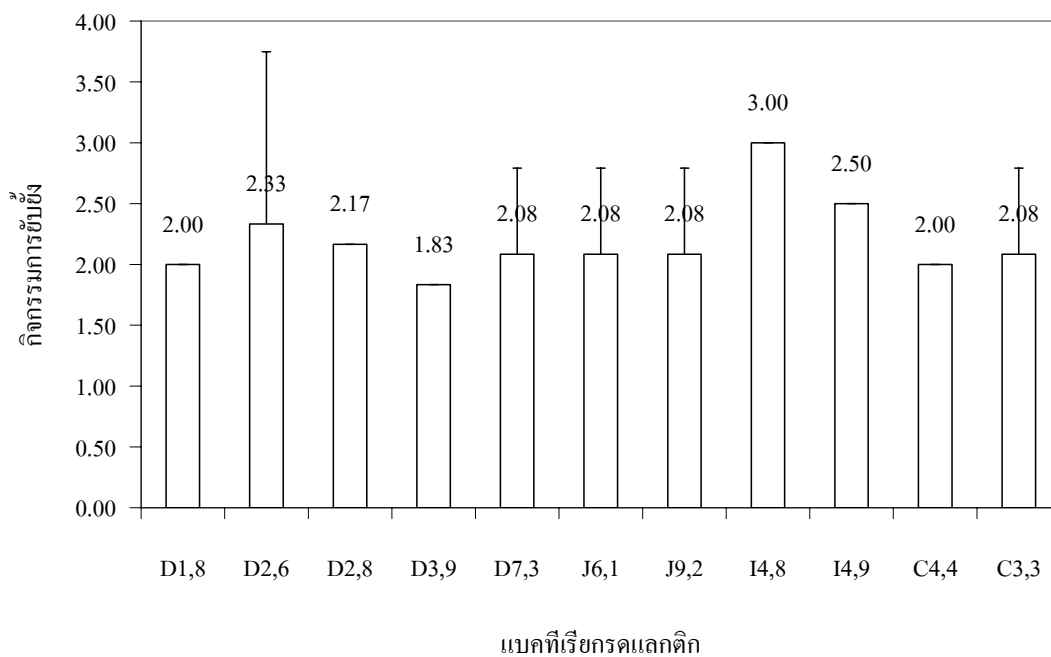
ภาพที่ 6 กิจกรรมการยับยั้ง *Sal. Typhimurium* ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท

การยับยั้ง *Shigella dysenteriae* พบว่าไอโซเลท I4-9 และ I4-8 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shigella dysenteriae* ได้ดีที่สุดโดยมีกิจกรรมการยับยั้ง เท่ากับ 3.33 ส่วนไอโซเลท J9-2, D2-6, D7-3, D2-8, D3-9, D1-8, C4-4 และ C3-3 มี กิจกรรมการยับยั้งอยู่ในช่วง 3.25-2.58 เรียงตามกิจกรรมการยับยั้งจากสูงไปต่ำ สุดท้ายพบว่าไอโซเลท J6-1 สามารถยับยั้ง *Shigella dysenteriae* ได้ต่ำสุด มีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 2.50 ดังแสดงในภาพที่ 7

การยับยั้ง *V. parahaemolyticus* พบว่าไอโซเลท I4-8 สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด มีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3.00 ส่วนไอโซเลท I4-9, D2-6, D2-8, J9-2, J6-1, D7-3, C3-3, C4-4 และ D1-8 มีกิจกรรมการยับยั้งอยู่ในช่วง 2.50-2.00 เรียงตามกิจกรรมการยับยั้งจากสูงไปต่ำ นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท D3-9 มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำที่สุดคือ 1.83 ดังแสดงในภาพที่ 8

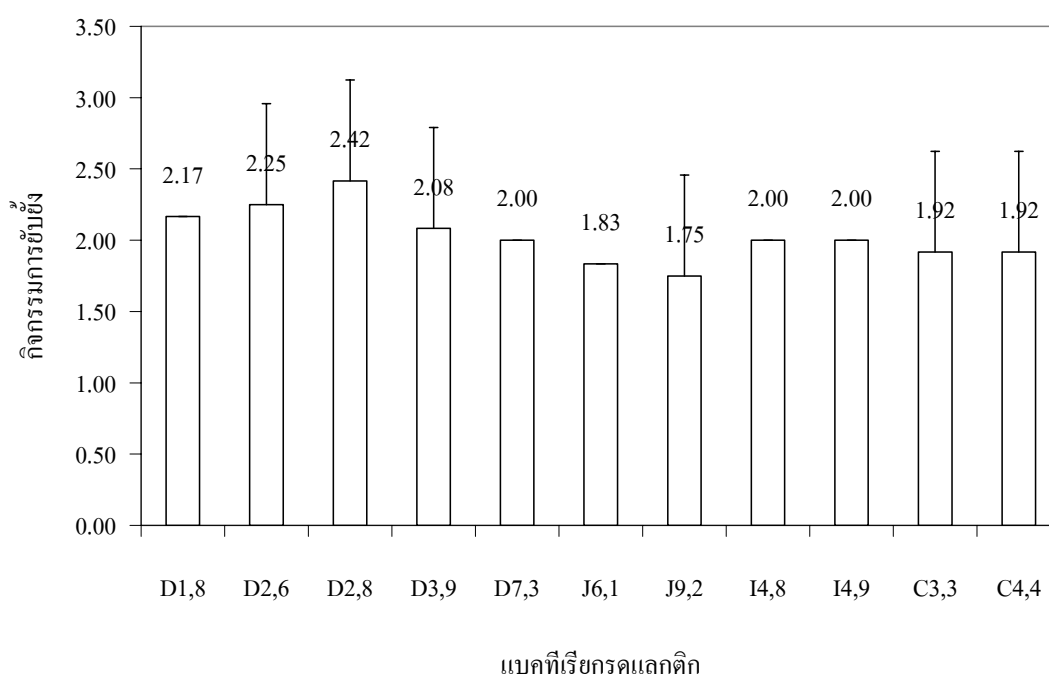


ภาพที่ 7 กิจกรรมการยับยั้ง *Shigella dysenteriae* ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลต



ภาพที่ 8 กิจกรรมการยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลต

การยับยั้ง *E. coli* 0157 :H7 พบว่าไอโซเลท D2-8 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* 0157 :H7 ได้ดีที่สุดมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 2.42 ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกที่เหลือได้แก่ ไอโซเลท D2-6, D1-8, D3-9, I4-9, I4-8, D7-3, C3-3, C4-4 และ J6-1 เรียงลำดับตามกิจกรรมการยับยั้งจากสูงไปต่ำ มีกิจกรรมการยับยั้งอยู่ในช่วง 2.25-1.83 ส่วนไอโซเลท J9-2 มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำที่สุดคือ 1.75 ดังแสดงในภาพที่ 9



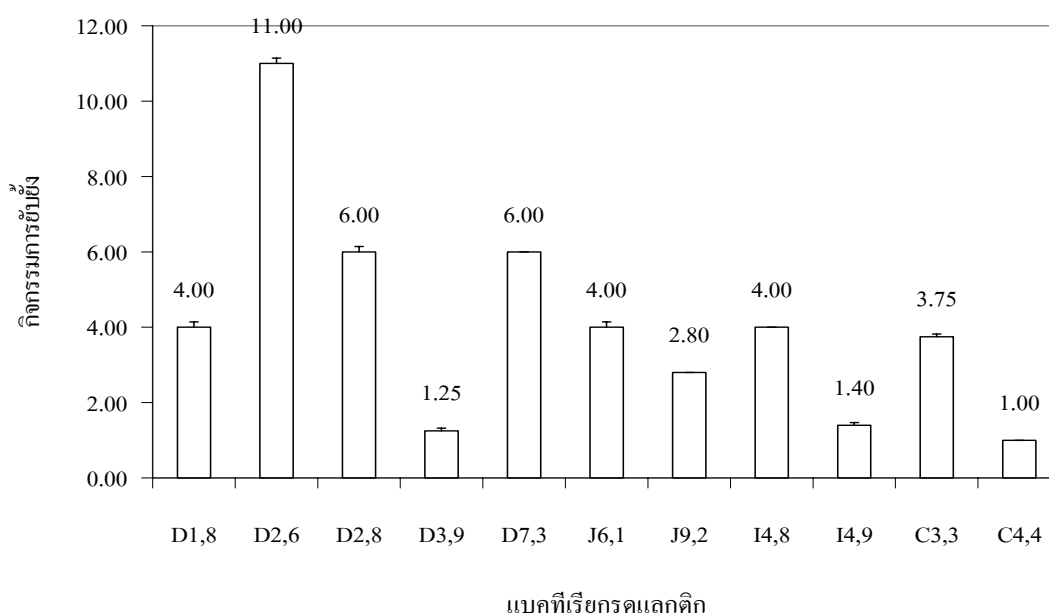
ภาพที่ 9 กิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* 0157 :H7 ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท

Jin *et al.* (1996) พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก ที่แยกจากลำไส้ไก่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *Salmonella spp.* ได้ นอกจากนี้ Itoh *et al.* (1995) พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน และยับยั้ง *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* และ *E. coli*

2.1.2 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 โดยวิธี Direct method

การทดสอบความสามารถยับยั้ง *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 ของแบคทีเรียกรดแลกติก ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลท J9-2, D2-8, D2-6, D3-9, C4-4, I4-9, I4-8, D1-8, J6-1, D7-3 และ C3-3 โดยเมื่อนำเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 11 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 พบว่าแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 ได้

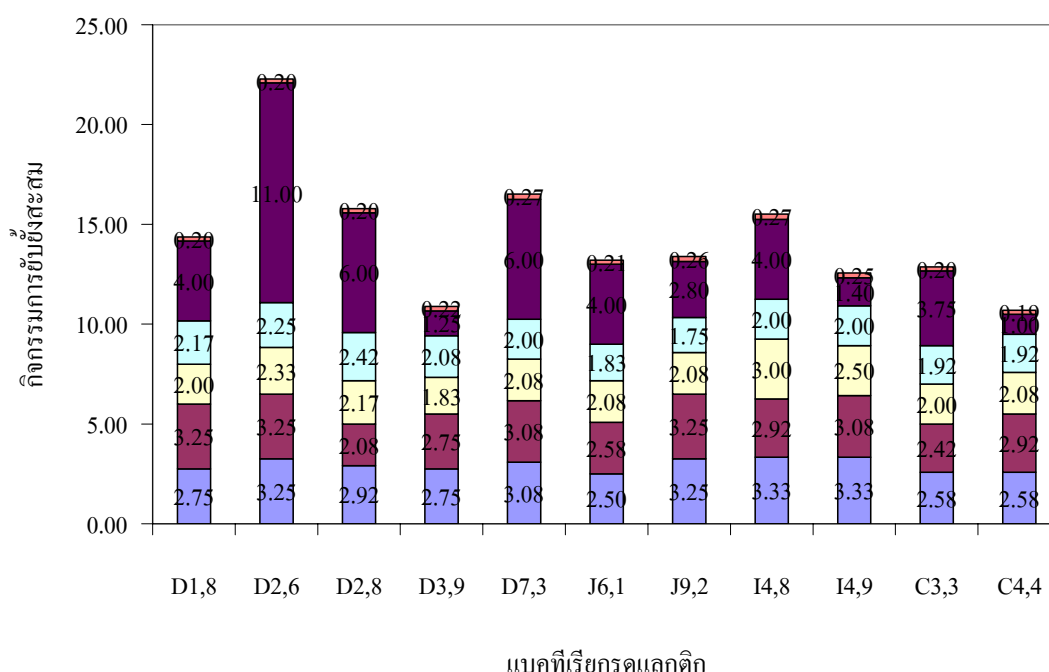
การยับยั้ง *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 พบว่าไอโซเลท D2-6 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 ได้ดีที่สุดโดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 11.00 ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกที่เหลือ ได้แก่ ไอโซเลท D2-8, D7-3, I4-8, J6-1, D1-8, C3-3, J9-2, I4-9 และ D3-9 เรียงลำดับตามกิจกรรมการยับยั้งจากสูงไปต่ำ มีกิจกรรมการยับยั้งอยู่ในช่วง 1.25-6.00 ส่วนไอโซเลท C4-4 มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำที่สุดคือ 1.00 ดังแสดงในภาพที่ 10



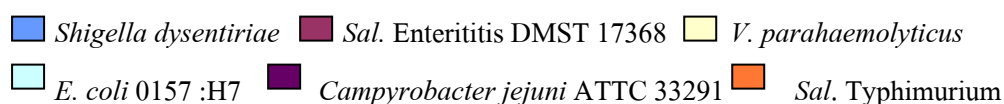
ภาพที่ 10 กิจกรรมการยับยั้ง *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 ของแบคทีเรีย กรดแลกติก 11 ไอโซเลท

2.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคนิตต่างๆ (Inhibition spectrum)

แบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคนิตต่างๆ แตกต่างกัน โดยดูจากค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่ากิจกรรมการยับยั้ง *Shigella dysenteriae.*, *Salmonella* Enterititis DMST 17368, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 และ *Vibrio parahaemolyticus* ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท วิเคราะห์รวมกัน ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนิตต่างๆของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท



พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกว้าง โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Shigella dysenteriae.*, *Salmonella* Enterititis DMST 17368, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ แต่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสะสมแตกต่างกัน ไอโซเลท D2-6 มีค่า

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคสะสมสูงสุด เท่ากับ 22.28 ดังแสดงในภาพที่ 11 นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลท D1-8, D2-8, D7-3 และ I4-8 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสะสม มากกว่า 14

จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Shigella dysenteriae.*, *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 และ *Vibrio parahaemolyticus* ดังนั้นถ้าแบคทีเรียกรดแลกติกจากแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท มาผลิตเป็นโพรไบโอติก จะมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์เจ้าถิ่นได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kingamkono *et al.* (1999) โดยพบว่า การบริโภคอาหารที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก สามารถลดปริมาณ *E.coli*, *Campyrobacter*, *Salmonella* และ *Shigella* ได้ในเด็กอายุ 5 ปี

3. การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส

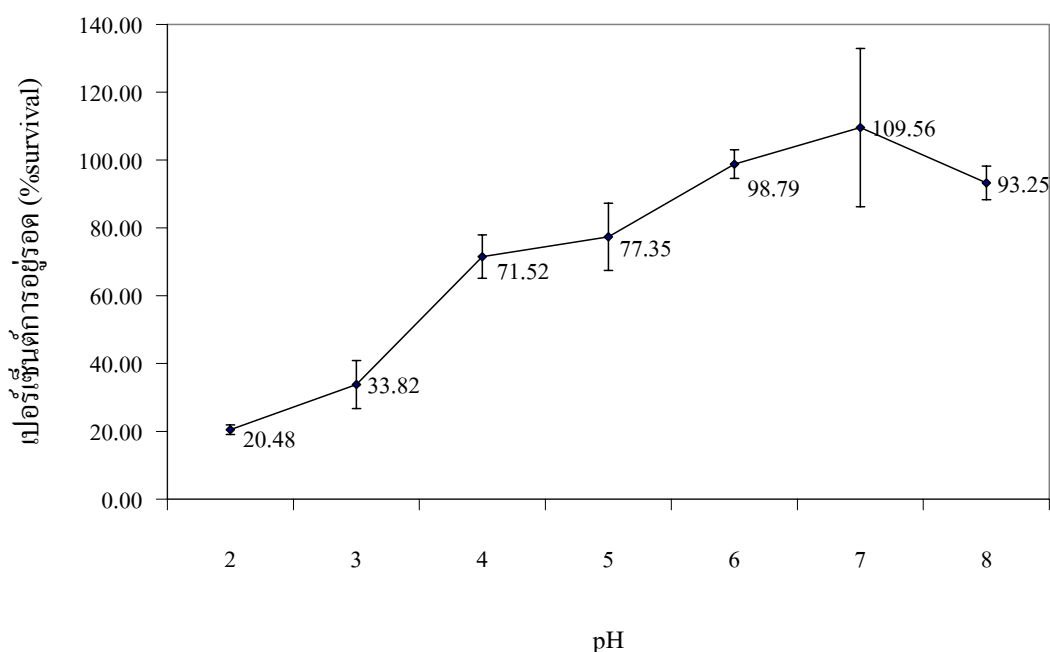
ความสามารถในการทนต่อกรดและเบสเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (Havenaar *et al.*, 1992) เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์บางชนิด เช่นสุกร และวัว เป็นต้น มีการหลั่งกรดเกลือทำให้ pH ในระบบทางเดินอาหารลดลงจนเท่ากับ 0.5-2.0 ส่งผลต่อแบคทีเรียส่วนใหญ่ทำให้ไม่สามารถทนและเจริญได้ (Jim *et al.*, 1998) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเป็นการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถทนต่อกรดและเบส เพื่อสามารถเจริญและอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าถิ่น และจากการทดลองพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกลุ่มตามความสามารถในการทนต่อกรดและเบสดังนี้

3.1 กลุ่มแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดลดลงเมื่อค่า pH ลดลงได้แก่ ไอโซเลท I4-8, I4-9 และ C4-4

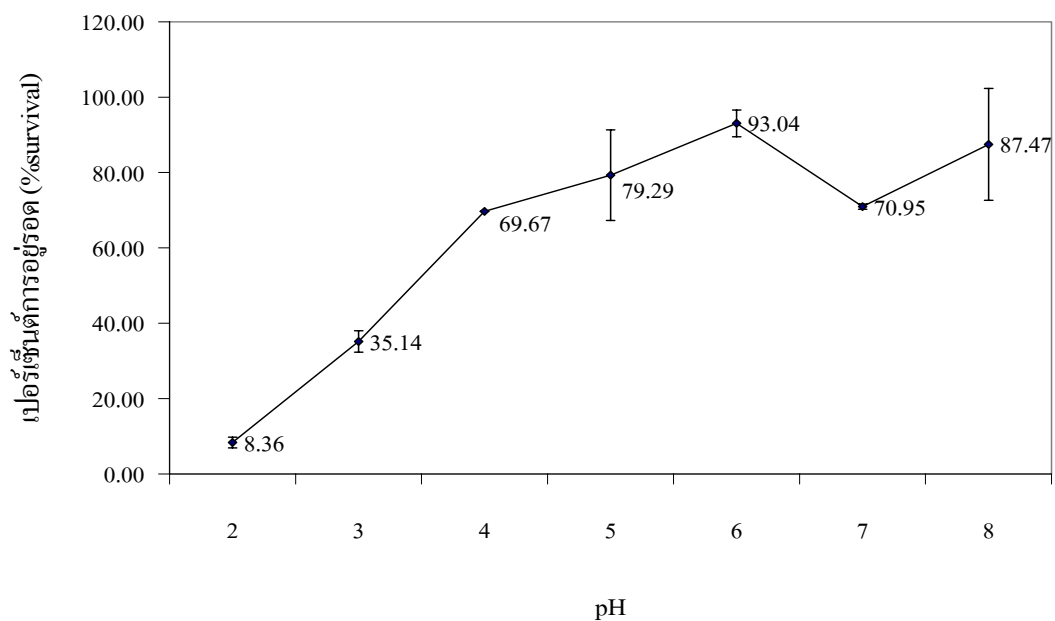
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท I4-8 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 20.48- 109.56 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 7 ดังแสดงในภาพที่ 12

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท I4-9 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 8.36-93.04 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 6 ดังแสดงในภาพที่ 13

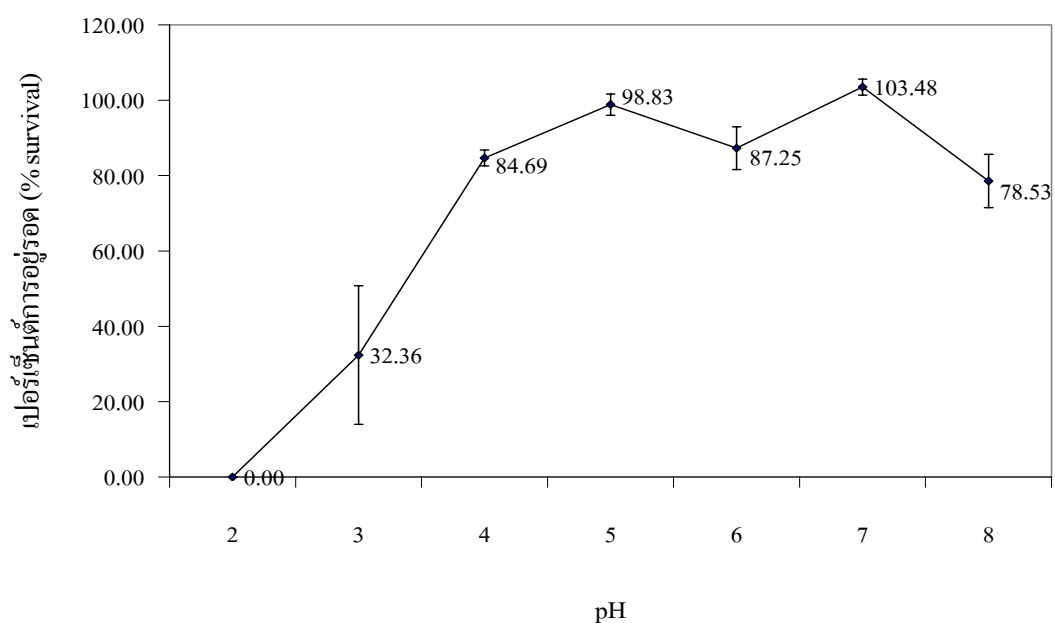
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท C4-4 พบว่า สามารถทนต่อ pH 3-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 32.36-103.48 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 7 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท C4-4 ไม่สามารถทนต่อ pH 2 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 0 ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท I4-8 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



ภาพที่ 13 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของไอโซเลต I4-9 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



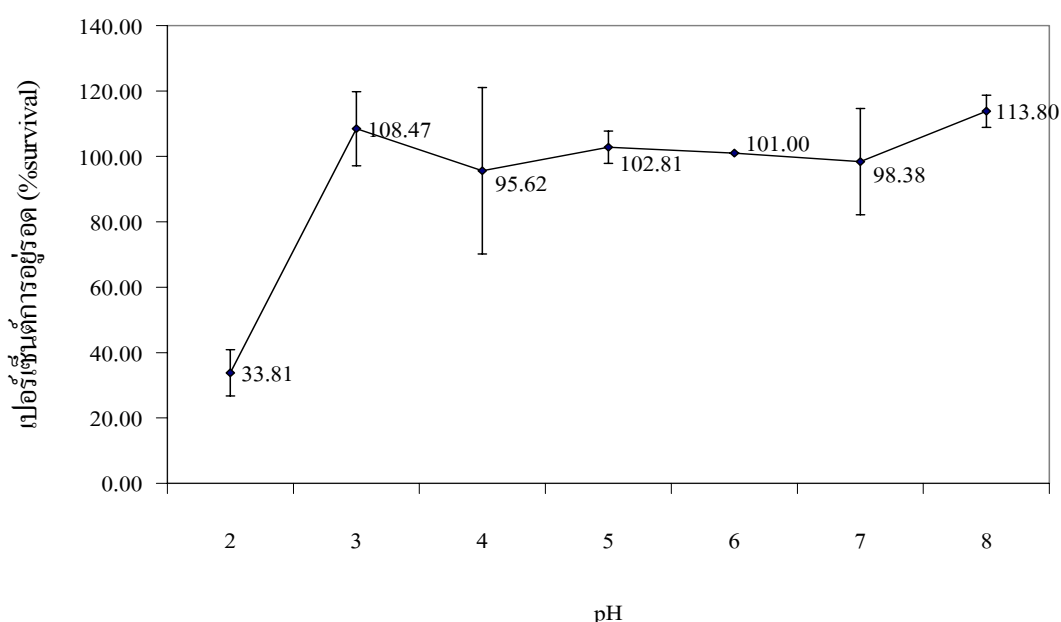
ภาพที่ 14 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของไอโซเลต C4-4 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

3.2 กลุ่มแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดคงที่เมื่อค่า pH ลดลง และมีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ pH 2 ไม่เท่ากับ 0 ได้แก่ ไอโซเลท D1-8, D3-9, D7-3, J9-2 และ C3-3

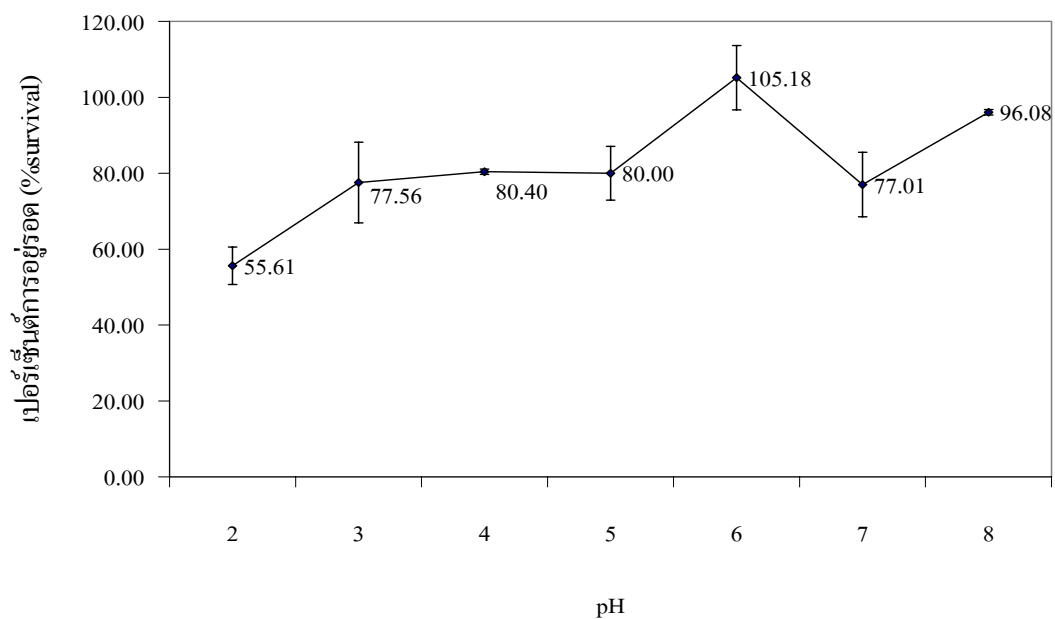
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท D1-8 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 33.81-113.80 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 8 ดังแสดงในภาพที่ 15

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท D3-9 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 55.61-105.18 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 6 ดังแสดงในภาพที่ 16

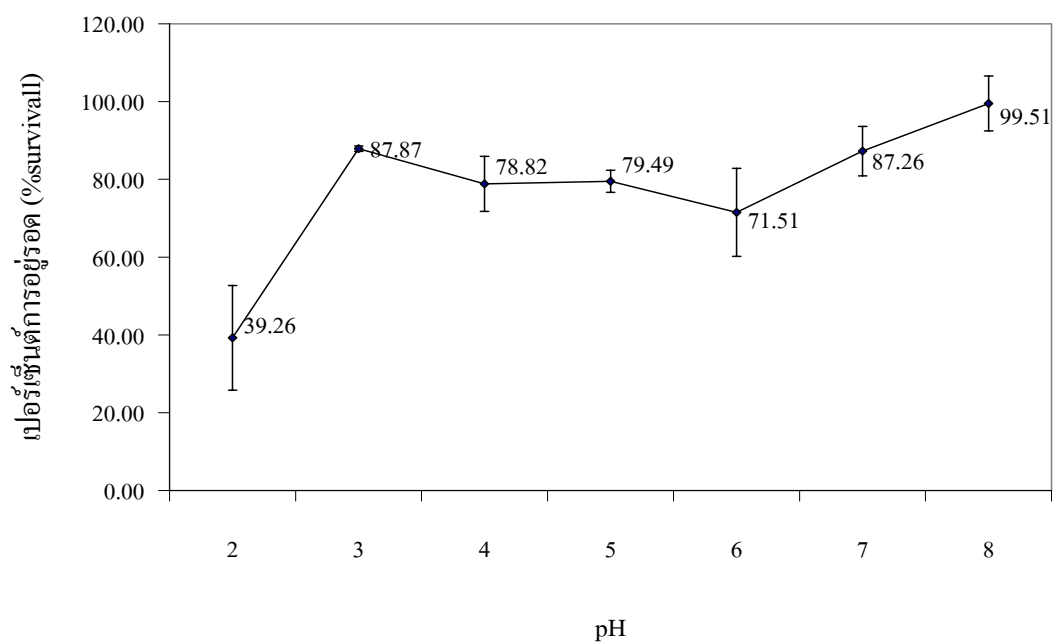
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท D7-3 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 39.26- 99.51 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 8 ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D1-8 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



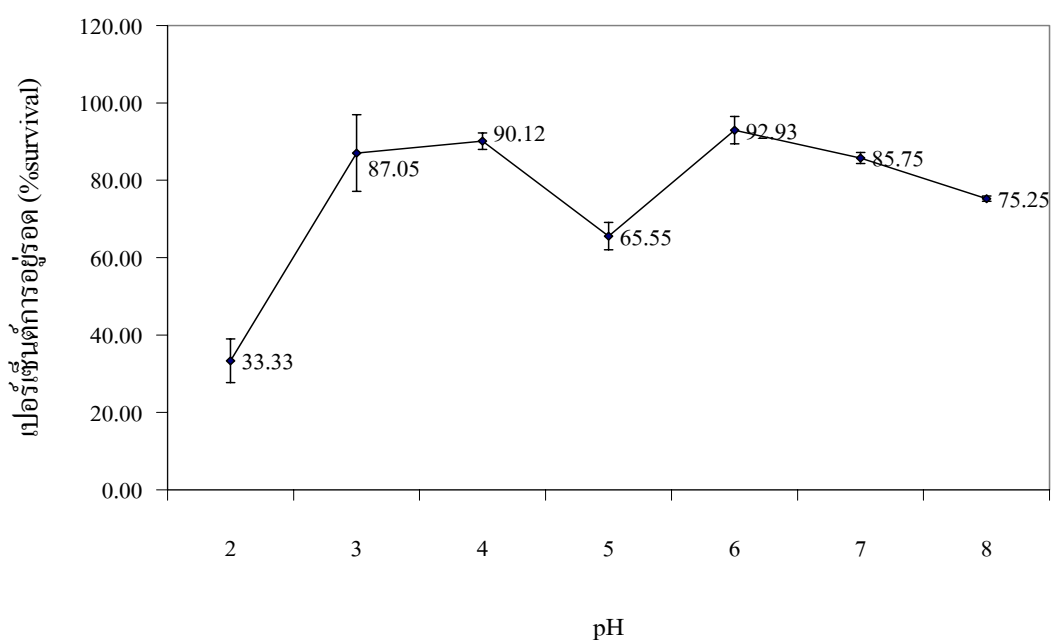
ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลต D3-9 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



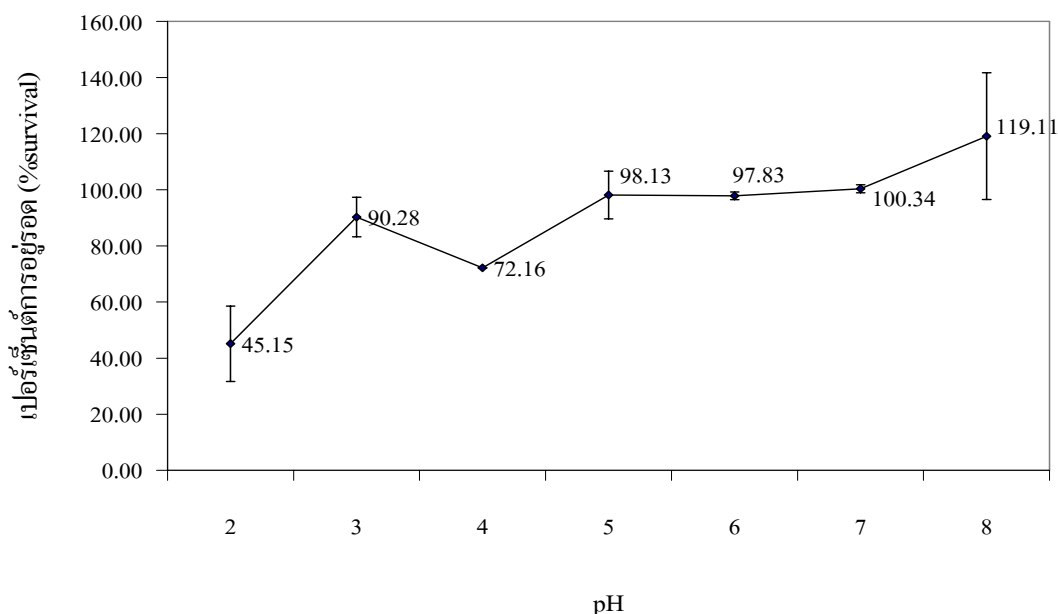
ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลต D7-3 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท J9-2 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 33.33 -92.93 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 6 ดังแสดงในภาพที่ 18

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท C3-3 พบว่า สามารถทนต่อ pH 2-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 2 อยู่ในช่วง 45.15 -119.11 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 8 ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท J9-2 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



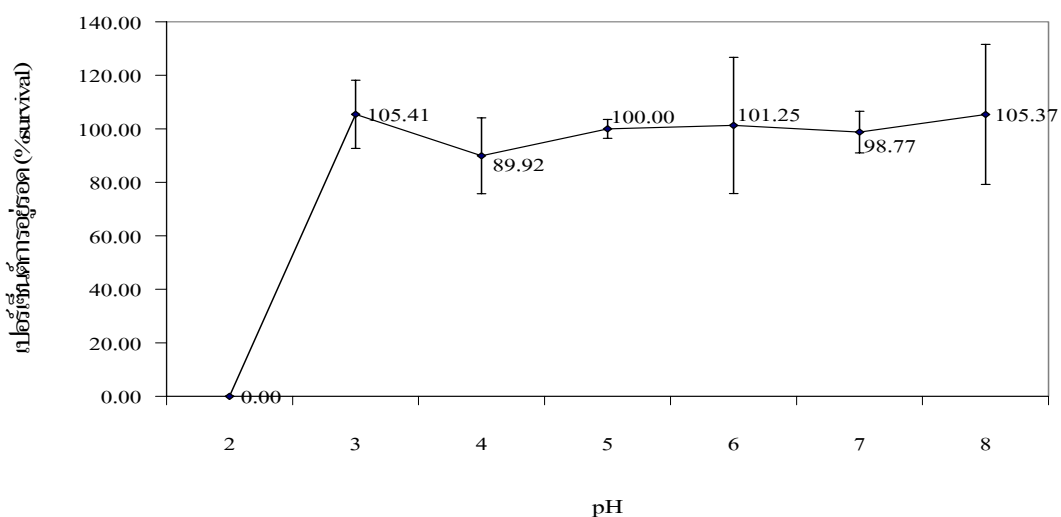
ภาพที่ 19 เปอร์เซนต์การอยู่รอดของไอโซเลท C3-3 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

3.3 กลุ่มแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดคงที่เมื่อค่า pH ลดลง และมีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ pH 2 เท่ากับ 0 ได้แก่ไอโซเลท D2-6, D2-8 และ J6-1

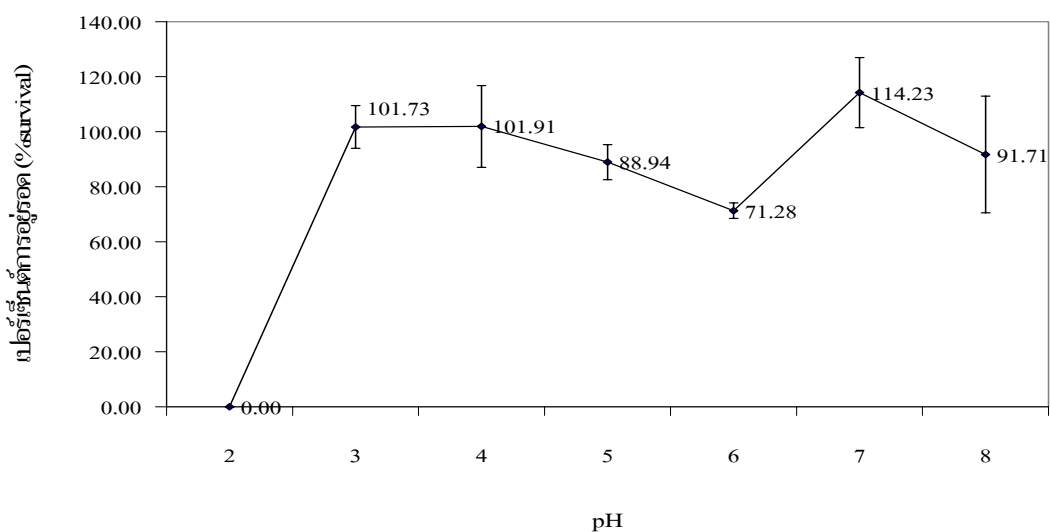
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท D2-6 พบว่า สามารถทนต่อ pH 3-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 89.92-105.41 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 3 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท D2-6 ไม่สามารถทนต่อ pH 2 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 0 ดังแสดงในภาพที่ 20

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท D2-8 พบว่า สามารถทนต่อ pH 3-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 71.28-114.23 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 7 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท D2-8 ไม่สามารถทนต่อ pH 2 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 0 ดังแสดงในภาพที่ 21

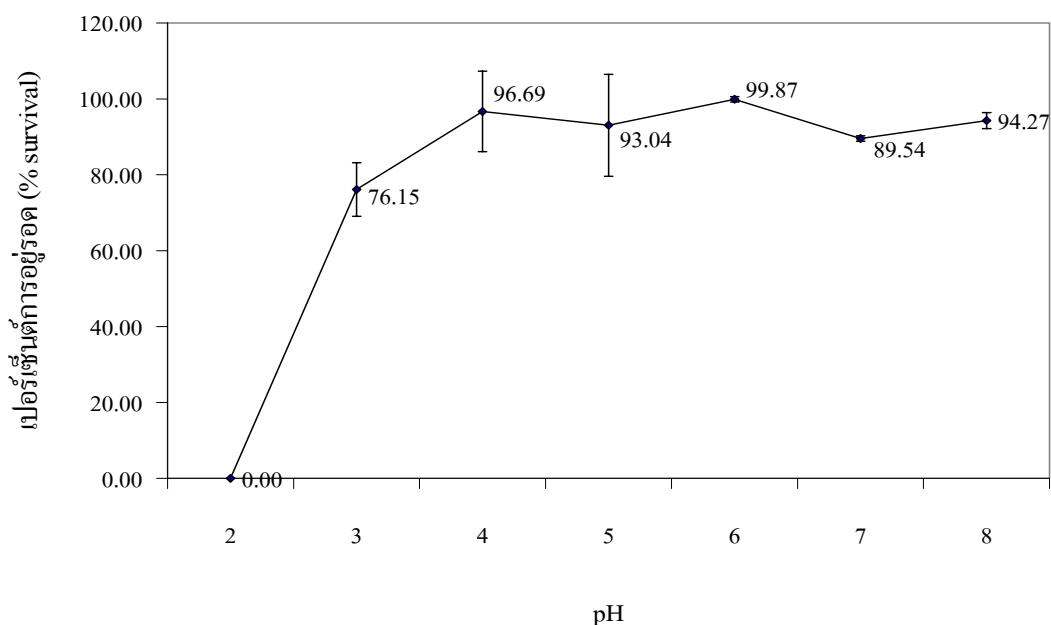
จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ของ ไอโซเลท J6-1 พบว่า สามารถทนต่อ pH 3-8 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด อยู่ในช่วง 76.15-99.87 โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH เท่ากับ 6 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท J6-1 ไม่สามารถทนต่อ pH 2 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เท่ากับ 0 ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D2-6 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท D2-8 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8



ภาพที่ 22 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไอโซเลท J6-1 ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

จากการศึกษาความสามารถในการทนต่อกรดและเบสของไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 โดยพิจารณา pH ภายในระบบทางเดินอาหารของไก่ พบว่าไอโซเลท D1-8, D3-9, D7-3, J9-2, I4-8, I4-9 และ C3-3 จะสามารถอยู่รอดได้ตลอดระบบทางเดินอาหารของไก่ที่มี pH อยู่ระหว่าง 2-8 (Simon and Versteg, 1989) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลทมีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ pH 2 ไม่เท่ากับ 0 ส่วนไอโซเลท D2-6, D2-8, J6-1 และ C4-4 จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดต่ำเมื่อผ่านส่วนของ proventriculus และ gizzard ของไก่ ซึ่งมีค่า pH อยู่ระหว่าง 2.5-3.5 (Simon and Versteg, 1989)

Jin *et al.* (1998) ทำการศึกษาความสามารถในการทนต่อกรด pH 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ของ *Lactobacillus* สามสปีชีส์ วัดปริมาณเซลล์ที่ 0, 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง พบว่า *Lactobacillus* ทั้ง 3 สปีชีส์ มีปริมาณเซลล์ (Log CFU/ml) ที่ pH 0.5-5 ประมาณ 7 ที่ 0 ชั่วโมง และเมื่อเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *L. acidophilus* I26 และ *L. fermentum* I24 ที่แยกได้จากลำไส้เล็กส่วนอิลีียมของไก่ มีปริมาณเซลล์ประมาณ 1 ที่ pH 0.5-2 ส่วน *L. brevis* C10 ที่แยกจากลำไส้ส่วนซีคัมของไก่ มีปริมาณเซลล์ประมาณ 5 ที่ pH 2 จึงสามารถสรุปได้ว่า *Lactobacillus* ที่แยกจากลำไส้ส่วนซีคัม สามารถทนต่อ

กรดได้สูงกว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ส่วนอืดซึม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง คือ ไอโซเลท C 3-3 ที่แยกได้จากลำไส้ส่วนซีกัม มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ pH 2 และ 3 สูงกว่า ไอโซเลท I4-8 และ I4-9 ที่แยกจากลำไส้ส่วนอืดซึม

4. การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

การผลิตโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมอาหารนั้น มีการใช้ความร้อน ในกระบวนการผลิต ส่งผลให้เกิดการตายของแบคทีเรียโพรไบโอติก ดังนั้นความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง จึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Gardiner *et al.*, 2000) จึงได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิสูง คือ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

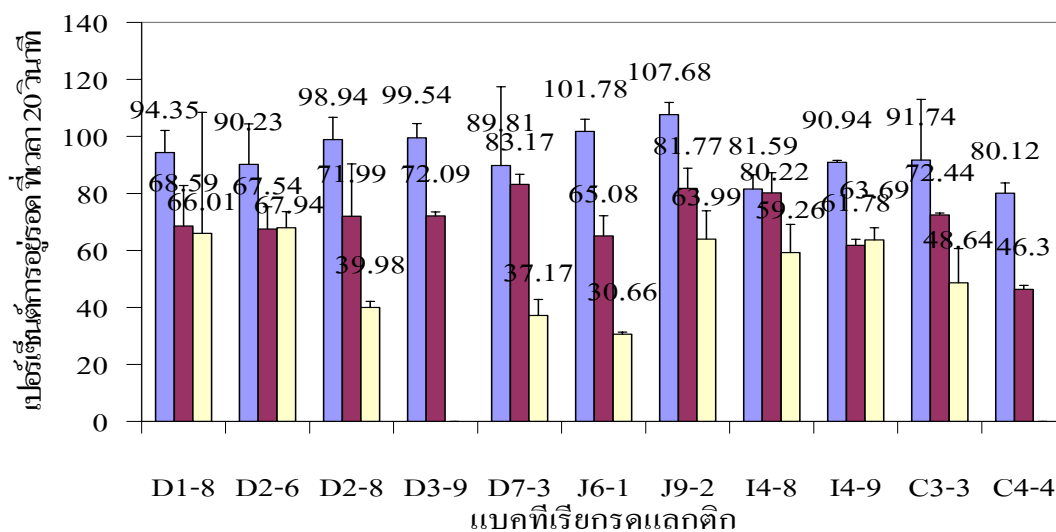
จากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 20 วินาที ของเชื้อ 11 ไอโซเลท พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไอโซเลท J9-2 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 107.68 ส่วน J6-1, D3-9, D2-8, D1-8, C3-3, I4-9, D2-6, D7-3, I4-8 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 101.78-80.12 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท D7-3 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 83.17 ส่วน J9-2, I4-8, C3-3, D3-9, D2-8, D1-8, D2-6, J6-1, I4-9 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 81.77-46.30 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท D2-6 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 67.94 ส่วน D1-8, J9-2, I4-9, I4-8, C3-3, D2-8, D7-3, J6-1, D3-9 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 66.01-0.00 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ดังแสดงในภาพที่ 23 (ก)

จากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 40 วินาที ของเชื้อ 11 ไอโซเลท พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไอโซเลท J6-1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 116.59 ส่วน J9-2, D1-8, D3-9, D2-8, D2-6, D7-3, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 97.89-75.24 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท D3-9 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 63.63 ส่วน D7-3, J9-2, I4-8, C3-3, D2-8, D1-8, D2-6, J6-1, I4-9 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 61.04-30.12 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท D1-8 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 74.05 ส่วน D2-6, I4-9, C3-3, J6-1, J9-2, I4-8, D7-3, D2-8, D3-9 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 57.82-0.00 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ดังแสดงในภาพที่ 23 (ข)

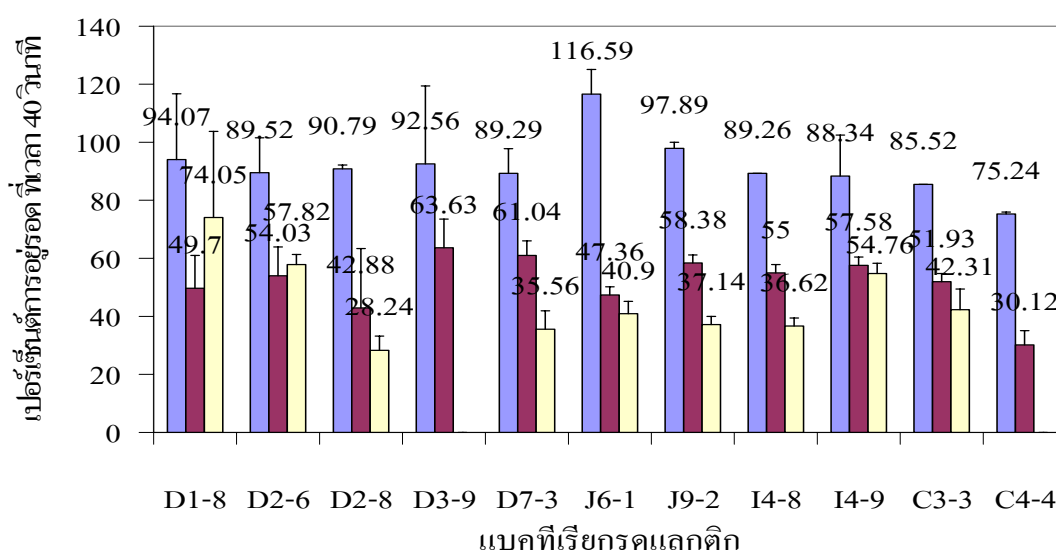
จากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 80 วินาที ของเชื้อ 11 ไอโซเลท พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไอโซเลท J6-1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 104.08 ส่วน J9-2, D3-9, D2-6, D2-8, D1-8, I4-9, I4-8, D7-3, C3-3 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 99.16-60.61 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท D7-3 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 57.82 ส่วน I4-9, J9-2, C3-3, D2-6, D2-8, D1-8, D3-9, J6-1, I4-8 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 56.63-0.00 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท D1-8 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 57.11 ส่วน D2-6, C3-3, J6-1, J9-2, I4-8, D2-8, I4-9, D7-3, D3-9 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 41.07-0.00 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ดังแสดงในภาพที่ 24 (ก)

จากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 วินาที ของเชื้อ 11 ไอโซเลท พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไอโซเลท J6-1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 105.68 ส่วน J9-2, D3-9, I4-9, D2-8, D2-6, I4-8, D7-3, C3-3, D1-8 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 96.03-50.89 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท I4-9 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 53.04 ส่วน C3-3, J9-2, D1-8, D2-6, J6-1, D2-8, D3-9, I4-8, D7-3 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 46.27-0.00 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท D1-8 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 51.21 ส่วน J6-1, D2-6, C3-3, J9-2, I4-8, D2-8, I4-9, D3-9, D7-3 และ C4-4 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 50.52-0.00 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ ดังแสดงในภาพที่ 24 (ข)

จากการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 20 วินาที ในภาพที่ 23 (ก) พบว่าไอโซเลท I4-9, J9-2, I4-8, D2-6 และ D1-8 มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มากกว่า 59.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ เวลา 40 วินาที ในภาพที่ 23 (ข) พบว่าไอโซเลท I4-9, D2-6 และ D1-8 มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มากกว่า 50.00 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ที่เวลา 80 วินาที ในภาพที่ 24 (ก) พบว่าไอโซเลท D2-6, C3-3 และ D1-8 มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มากกว่า 40.00 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 120 วินาที ในภาพที่ 24 (ข) พบว่าไอโซเลท D2-6 และ D1-8 มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มากกว่า 39.00 เปอร์เซ็นต์



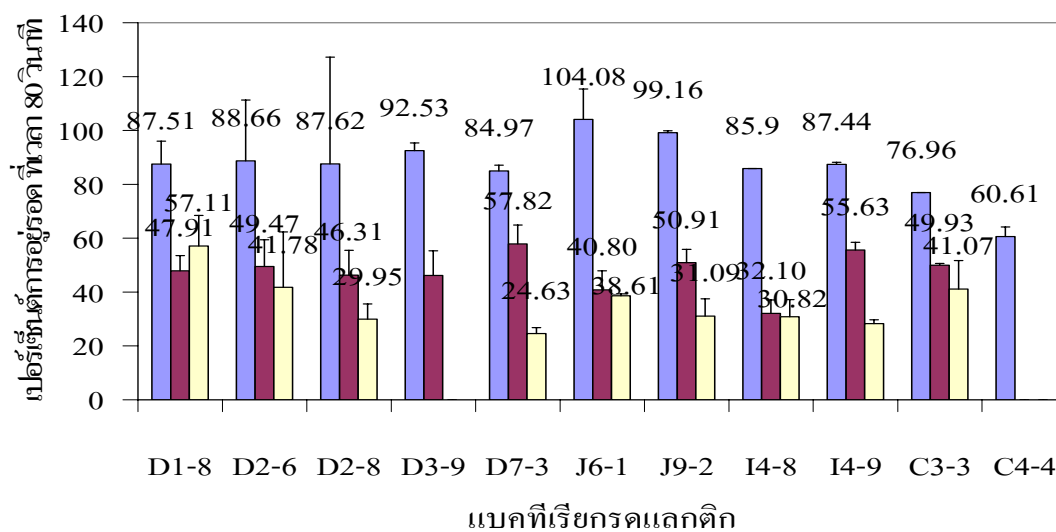
(ก)



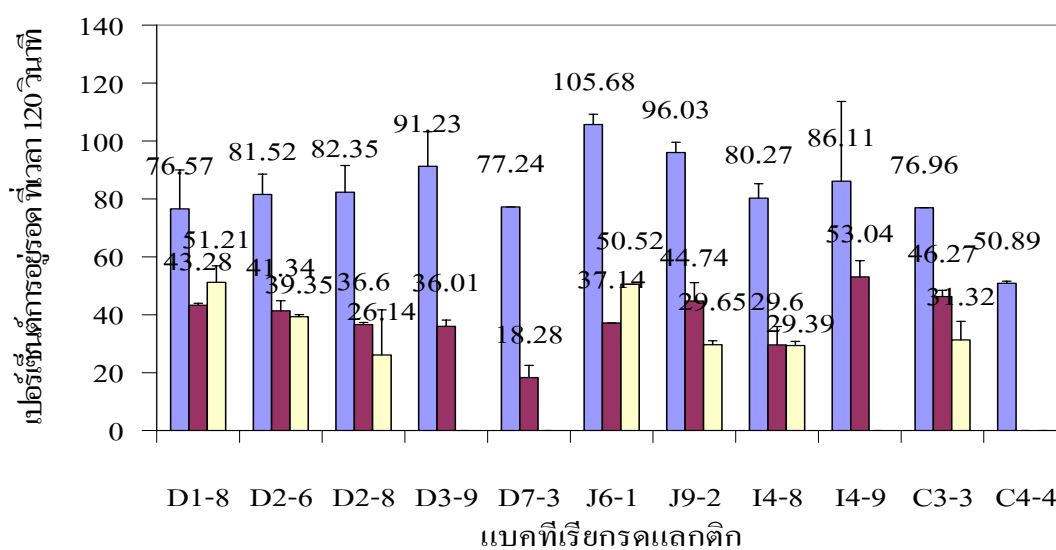
(ข)

ภาพที่ 23 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 20 วินาที (ก) เวลา 40 วินาที (ข)

■ 60 องศาเซลเซียส ■ 70 องศาเซลเซียส ■ 80 องศาเซลเซียส



(ก)



(ข)

ภาพที่ 24 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 80 วินาที (ก) เวลา 120 วินาที (ข)

■ 60 องศาเซลเซียส ■ 70 องศาเซลเซียส ■ 80 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาของ Steidinger *et al.* (2000) พบว่าช่วงอุณหภูมิที่ทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนแก๊สและอัตราการเจริญของสุกรที่บริโภคอาหารเม็ดไม่ลดลงในช่วงอายุขุน 0-28 วัน คืออยู่ในช่วง 60-77 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการอัดเม็ด 10 วินาที และการทดสอบความสามารถแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท ในการทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าแต่ละไอโซเลทมีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสแตกต่างกัน โดยทั้ง 11 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดไม่เท่ากับ 0 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-120 วินาที ส่วนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดไม่เท่ากับ 0 % ที่เวลา 20-40 วินาที ซึ่งเป็นเวลาการทดสอบที่มากกว่าเวลาที่ใช้ในการอัดอาหารเม็ดของสุกรขุน ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลทจะสามารถรอดชีวิตได้เมื่อผ่านกระบวนการอัดอาหารเม็ดของสุกรขุน

จากการศึกษาของ Campbell *et al.* (2006) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการอัดอาหารเม็ดของไก่เนื้อคือประมาณ 85 องศาเซลเซียส และสามารถเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นได้ตามวัตถุดิบที่นำมาอัดเม็ดจนถึง 149 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการอัดเม็ดคือ 15 วินาที และการศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก 9 ไอโซเลท ได้แก่ D1-8, D2-6, D2-8, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9 และ C3-3 สามารถรอดชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดไม่เท่ากับ 0% เป็นเวลา 20-80 วินาที ซึ่งเป็นเวลาการทดสอบที่มากกว่าเวลาที่ใช้ในการอัดอาหารเม็ดของไก่เนื้อ ดังนั้นเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติก 9 ไอโซเลท ผ่านกระบวนการอัดเม็ดเพื่อผลิตเป็นโปรไบโอติกสำหรับไก่เนื้อ แบคทีเรียกรดแลกติก 9 ไอโซเลทจะมีโอกาสในการรอดชีวิตสูง

5. การวิเคราะห์กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ย่อยน้ำดี (Bile salt hydrolase, BSH)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดี เนื่องจาก เอนไซม์ย่อยน้ำดีมีความสำคัญทางด้านโภชนะ คือช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลของสัตว์เจ้าถิ่น (Tanaka *et al.*, 1999) ทำให้สัตว์เจ้าถิ่นนั้นๆมีสุขภาพดี ลดการเป็นภาวะคอเลสเตอรอลสูง ดังนั้นจึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ เพื่อให้มีประโยชน์ทางด้านโภชนะต่อสัตว์เจ้าถิ่น

เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีในแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท ด้วยวิธีการใช้สารละลาย ninhydrin พบว่าไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีแตกต่างกันดังในตาราง ที่ 6

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดี (Bile salt hydrolase, BSH) ในแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท

แบคทีเรียกรดแลกติก	กิจกรรมของเอนไซม์ (Units/ml)	
D1-8	3.538	±0.016
D2-6	1.789	±0.017
D2-8	2.368	±0.041
D3-9	1.652	±0.009
D7-3	1.144	±0.022
J6-1	0.997	±0.013
J9-2	2.675	±0.034
I4-8	2.069	±0.018
I4-9	1.492	±0.021
C3-3	3.019	±0.022
C4-4	1.275	±0.008

ไอโซเลท D1-8 มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีสูงที่สุด คือ 3.538 Units/ml ส่วน C3-3, J9-2, D2-8, I4-8, D2-6, D3-9, I4-9, C4-4 และ D7-3 มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 3.019 -1.144 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท J6-1 มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำสุดคือ 0.997

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 3 % ของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลทโดยไอโซเลท C3-3 มีค่าการเพิ่มปริมาณสูงสุดเท่ากับ 55.92 % และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง คือ 3.019 ส่วนไอโซเลท D1-8 มีค่าการเพิ่มปริมาณสูงสุดรองลงมาเท่ากับ 39.34 % และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 3.538

เอนไซม์ย่อยน้ำดี หรือ BSH เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสันดาปคอเลสเตอรอล ของมนุษย์และสัตว์ (Tanaka *et al.*, 1999) โดยในคนที่มีการบริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกพบว่าจะมีระดับคอเลสเตอรอลต่ำ (Corzo and Gilliland, 1999) เอนไซม์ย่อยน้ำดีจะทำให้หน้าที่ในการสลายพันธะเอไมด์ของกรดอะมิโนกับกรดน้ำดี ทำให้เกิด กรดน้ำดีอิสระ เช่น deoxycholic acid และ lithocholic acid ซึ่งกรดน้ำดีเหล่านี้สามารถละลายน้ำได้น้อย จึงมีการดูดซึมในส่วนของลำไส้ใหญ่ต่ำ (Center, 1993)

จากการศึกษาของ Corzo and Gilliland (1999) พบว่าโดยส่วนใหญ่จะพบเอนไซม์ย่อยน้ำดีในแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีได้สูงในสภาพ pH ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ โดย จะพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดีมากกว่า 0 เปอร์เซ็นต์จะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในส่วนของลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมเป็นส่วนใหญ่ คือ ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9 และ D7-3 ซึ่งมีค่า pH ต่ำ อยู่ระหว่าง pH 5-6 ซึ่งต่ำกว่าในลำไส้ส่วนอื่นๆของไก่ และไอโซเลท D1-8 ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีสูงที่สุด

Liong and Shah (2005) ทำการศึกษาเอนไซม์ย่อยน้ำดีของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* โดยการนำเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ sonicated มาย่อยสับสเตรท คือ sodium taurocholate และ sodium glycocholate จากนั้นวัดปริมาณ taurine และ glycine ที่ได้โดยการทำปฏิกิริยากับ ninhydrin พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดี ทั้ง sodium taurocholate และ sodium glycocholate มีค่าอยู่ระหว่าง 0.45-1.47 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4

6. การทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้

ความสามารถยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติกทำให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวน และเจริญอยู่ได้ (Salminen *et al.*, 1999b) จึงสามารถมีชีวิตรอยู่ในระบบทางเดินอาหารของ สัตว์เจ้าถิ่น ดังนั้นจึงทำการทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อให้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถชีวิตรอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และจากการทดสอบพบว่า

เมื่อทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท กับ eppendorf ที่ผ่านกระบวนการเคลือบด้วยเยื่อผนังลำไส้ วัดปริมาณเซลล์ที่ยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ และเซลล์ที่ไม่ยึดติดกับผนังเยื่อลำไส้ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพการยึดติดแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท

แบคทีเรียกรดแลกติก	ประสิทธิภาพการยึดติด
D1-8	74.72 ±3.76
D2-6	79.05 ±10.14
D2-8	76.14 ±4.48
D3-9	61.22 ±8.24
D7-3	71.63 ±5.26
J6-1	69.25 ±19.98
J9-2	58.46 ±4.56
I4-8	58.86 ±10.19
I4-9	66.92 ±1.20
C3-3	62.45 ±4.00
C4-4	60.98 ±15.97

ไอโซเลท D2-6 มีประสิทธิภาพการยีสิตสูงสุด คือ 79.05 ส่วนไอโซเลท D2-8, D1-8, D7-3, J6-1, I4-9, C3-3, D3-9, C4-4 และ I4-8 มีประสิทธิภาพการยีสิตอยู่ในช่วง 76.14-58.86 เรียงลำดับจากสูงไปต่ำ สุดท้ายพบว่าไอโซเลท J9-2 มีประสิทธิภาพการยีสิตต่ำที่สุดคือ 58.46

Nitisinprasert *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการยีสิตกับเชื้อบุนนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* E010, *E. coli* ATCC8739, *Salmonella* sp. S003 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 พบว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีประสิทธิภาพการยีสิตดีที่สุดคือ 21.58 เปอร์เซ็นต์

Gusils *et al.* (2002) ทำการศึกษาโครงสร้างและสารที่ใช้ในการยีสิตของ *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus fermentum* ssp. *cellobiosus* ที่แยกจากลำไส้ไก่ โดยวิธีการ chromatography พบว่าโครงสร้างผิวหน้าของเซลล์ *Lactobacillus* ทั้ง 3 สปีชีส์ มีลักษณะความมีขรุขระและสารที่อยู่ในผนังเซลล์แตกต่างกัน ทำให้มีประสิทธิภาพการยีสิตแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองคือ แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพการยีสิตกับเชื้อบุนนังลำไส้แตกต่างกัน ดังนั้นสามารถนำแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการยีสิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาผลิตเป็นโพรไบโอติกได้

7. การศึกษานุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถทำได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี โดยนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางกายภาพ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลทติดสีแกรมบวก รูปร่างแบบท่อนสั้น ส่วนผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ โดยการศึกษาการผลิตราย้อนไดออกไซค์จากการหมักกลูโคส การเคลื่อนที่ ปฏิกริยาอะเซเตส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ pH ต่าง ๆ และความสามารถในการทนเกลือ แสดงในตารางที่ 8

จากตารางที่ 8 พบว่าไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแบบท่อนสั้น ปฏิกริยาอะคะเลสเป็นลบ จึงจัดอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* จากนั้นเมื่อทำการตรวจสอบการเจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* (Axelsson, 1998) และเมื่อทำการตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักกลูโคส พบว่าไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, J9-2 และ C3-3 สามารถสร้างก๊าซได้จึงจัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative ส่วนไอโซเลท D7-3, J6-1, I4-8, I4-9 และ C4-4 ไม่สามารถสร้างก๊าซได้จึงจัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative

7.2 การศึกษาทางชีวเคมี

การศึกษาทางชีวเคมีเป็นการตรวจสอบสมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ ทั้ง 11 ไอโซเลท

ลักษณะ	D1-8	D2-6	D2-8	D3-9	D7-3	J6-1	J9-2	I4-8	I4-9	C3-3	C4-4
การติดสีแกรม ^ก	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
รูปร่าง	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
เอนไซม์อะตะเลส ^ข	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การสร้างก๊าซ CO ₂ ^ก	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
การเจริญที่ 10 องศาเซลเซียส ^ค	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 50 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 6.5 % เกลือ	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
การเจริญที่ 18 % เกลือ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญที่ pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 9.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การเคลื่อนที่	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ^ก + แกรมบวก , - แกรมลบ

^ข + สร้างเอนไซม์อะตะเลส , - ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส

^ก + สร้างก๊าซ CO₂ , - ไม่สร้างก๊าซ CO₂

^ค + เจริญ , - ไม่เจริญ

ตารางที่ 9 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ 11 ไอโซเลท โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL

[illegible]

ตารางที่ 9 (ต่อ)

[illegible]

ตารางที่ 9 (ต่อ)

[illegible]

ตารางที่ 9 (ต่อ)

	คาร์โบไฮเดรต	D1-8	D2-6	D2-8	D3-9	D7-3	J6-1	J9-2	I4-8	I4-9	C3-3	C4-4
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Gluconate	?	?	?	?	-	-	?	-	-	?	-
48	2-keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	5-keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้, - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้, ? ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

จากตารางที่ 9 สามารถนำผลข้อมูลการผลิตรกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APILAB พบว่า D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 คือ *Lactobacillus salivarius* ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ข้อมูลของ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 กับ *Lactobacillus salivarius*

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	<i>Lactobacillus salivarius</i>	I4-8	I4-9	J6-1	D7-3
Galactose	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Mannose	-	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	+	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	0	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ 0 ไม่พบข้อมูลใน Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

จากตารางที่ 10 พบว่าไอโซเลท D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 สามารถผลิตรกรดโดยใช้ Mannose และ Sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* ส่วนใหญ่ (90 %) จาก Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่า

ไอโซเลท I4-8 มีความแตกต่างจาก D7-3, J6-1 และ I4-9 คือสามารถผลิตกรดจากการใช้ Maltose และ Trehalose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งเหมือนกับ *Lactobacillus salivarius* โดยส่วนใหญ่ (90 %)

ข้อมูลการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของไอโซเลท D2-8, D3-9, C3-3, D2-6, J9-2 และ D1-8 เมื่อนำมาวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม APILAB พบว่า ทั้ง 6 ไอโซเลท คือ *Lactobacillus fermentum* ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 92.8, 93.1, 99.4, 99.6, 99.6 และ 99.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ข้อมูลของ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986) ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, J9-2 และ C3-3 กับ *Lactobacillus fermentum*

ชนิดของ คาร์โบไฮเดรต	<i>Lactobacillus fermentum</i>	D1-8	D2-6	D2-8	D3-9	J9-2	C3-3
L-Arabinose	d	-	-	+	+	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	-	-	+	+
Mannose	+	+	+	-	-	+	+
Esculin	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	+	?	?	?	?	?	?

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ d 11-89 % ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ? ผลไม่ชัดเจน

จากตารางที่ 11 พบว่าไอโซเลท D2-8 และ D3-9 แตกต่างจากไอโซเลท D1-8, D2-6 C3-3 และ J9-2 คือ สามารถผลิตกรดจากการใช้ L-Arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ไอโซเลท D2-8 และ D3-9 ยังไม่สามารถผลิตกรดจากการใช้ Fructose และ Mannose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งแตกต่างจาก *Lactobacillus fermentum* ส่วนใหญ่ (90 %) ของข้อมูลใน Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

ข้อมูลการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของไอโซเลท C4-4 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APILAB พบว่า คือ *Lactobacillus crispatus* ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ข้อมูลของ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986) ดังแสดงในตารางที่ 12

จากตารางที่ 12 พบว่าไอโซเลท C4-4 สามารถผลิตกรดจากการใช้ Melibiose และ Raffinose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ซึ่งแตกต่างจาก *Lactobacillus crispatus* ส่วนใหญ่ (90 %) ใน Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986) ที่สามารถผลิตกรดจากการใช้ Melibiose และ Raffinose นอกจากนี้พบว่า C4-4 ยังสามารถใช้ Starch เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นในการเลี้ยงไอโซเลท C4-4 จึงสามารถลดต้นทุนในการเลี้ยงได้โดยใช้ Starch เป็นแหล่งคาร์บอนของไอโซเลท C4-4 ซึ่ง Starch เป็นวัตถุดิบซึ่งสามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท C4-4 กับ
Lactobacillus crispatus

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	<i>Lactobacillus crispatus</i>	C4-4
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	0	+
Amygdalin	+	+
Arbutin	0	+
Esculin	+	+
Salicin	+	+
Cellubiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	-	+
Sucrose	+	+
Raffinose	-	+
Starch	0	+
Glycogen	0	+
Gentiobiose	0	+

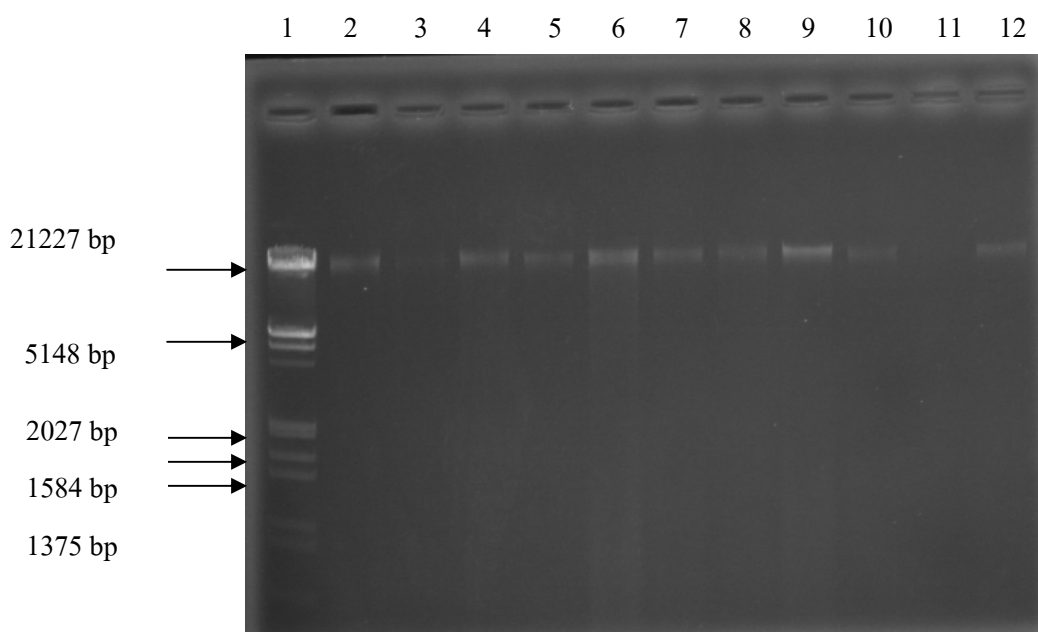
หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ 0 ไม่พบข้อมูลใน Bergey's
Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

7.3 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

ปัจจุบันการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตเป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาความสัมพันธ์ของอนุกรมวิธานและสายวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Towner and Cockayne, 1993)

7.3.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติก

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป EziDNA KIT จากนั้นนำมาวิเคราะห์คุณภาพโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท แสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบดังแสดงในภาพที่ 25



ภาพที่ 25 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากไอโซเลท I4-8, I4-9, J6-1, J9-2, D3-9, D2-8, D2-6, D1-8, D7-3, C4-4 และ C3-3 เลนที่ 2-12 ตามลำดับ, เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* + *Hind III*

การคำนวณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และ 260 ต่อ 230 นาโนเมตรพบว่า เมื่อคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Sambrook and Russell (2001) แบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 ความเข้มข้นดีเอ็นเอจะอยู่ในช่วง 360-470 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดัง แสดงในตารางที่ 13

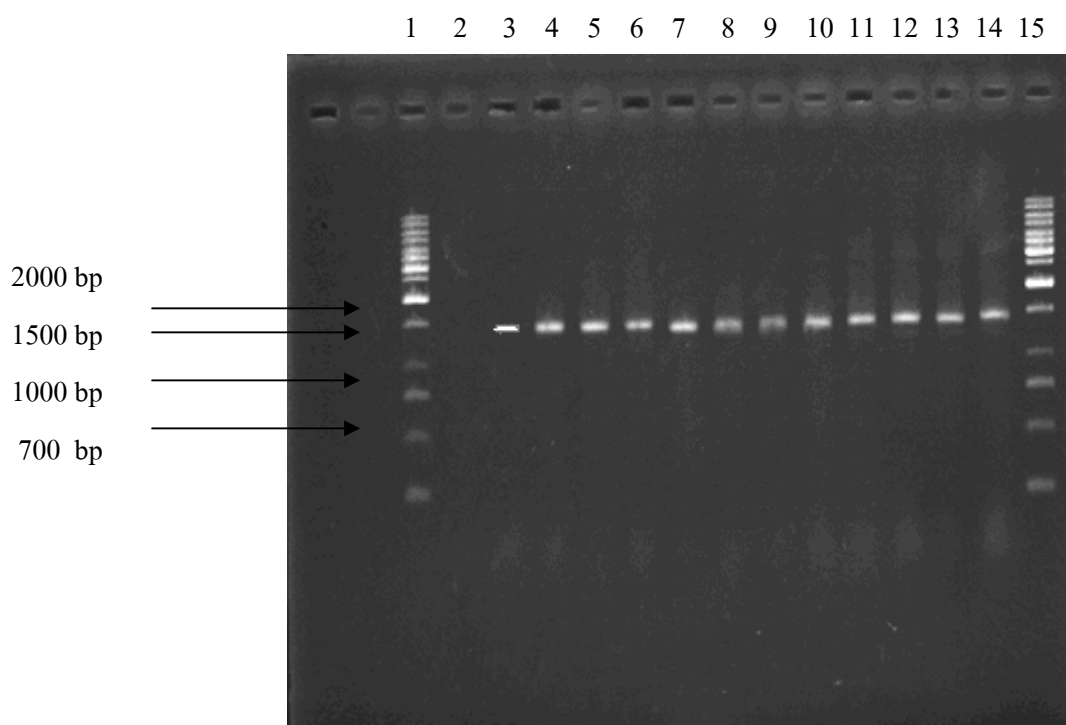
ตารางที่ 13 การคำนวณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และ 260 ต่อ 230

ไอโซเลท	A ₂₆₀	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ μg/μl	A ₂₈₀	A ₂₃₀	A _{260/280}	A _{260/230}
D1-8	0.045	450	0.024	0.018	1.875	2.500
D2-6	0.042	420	0.022	0.024	1.909	1.750
D2-8	0.047	470	0.028	0.016	1.678	2.937
D3-9	0.044	440	0.028	0.018	1.571	2.444
D7-3	0.047	470	0.025	0.034	1.880	1.382
J6-1	0.038	380	0.018	0.022	1.727	1.727
J9-2	0.042	420	0.020	0.015	2.100	2.100
I4-8	0.044	440	0.026	0.016	1.692	2.750
I4-9	0.046	460	0.022	0.020	2.090	2.090
C3-3	0.044	440	0.021	0.018	2.095	2.444
C4-4	0.036	360	0.018	0.014	2.000	2.571

จากการวิเคราะห์ ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในภาพที่ 25 แสดงแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความสมบูรณ์ และไม่แตกหัก และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และ 260 ต่อ 230 นาโนเมตร ของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 1.571-2.100 และ 1.382-2.937 ตามลำดับ จากอัตราส่วนดังกล่าวพบว่ามีค่าความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR

7.3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

หลังจากได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอแล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณยีนบางส่วนของ 16S rRNA โดยอาศัยเทคนิค PCR จากไพรเมอร์ 1407B และ 8UA ในปฏิกิริยาเพิ่มขยายของยีนโดยใช้น้ำไอออไนซ์ปลอดเชื้อแทนดีเอ็นเอต้นแบบในชุด negative control และใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อไอโซเลท KUB-AC5 แทนดีเอ็นเอต้นแบบในชุด positive control (Nitisinprasert *et al.*, 2000) จากผลการทดลองพบว่าเกิด PCR product 1 แถบ มีขนาดประมาณ 1500 bp ดังแสดงในภาพที่ 26 จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Extract (MACHEREY-NAGEL, Germany) เพื่อนำไปโคลนต่อไป

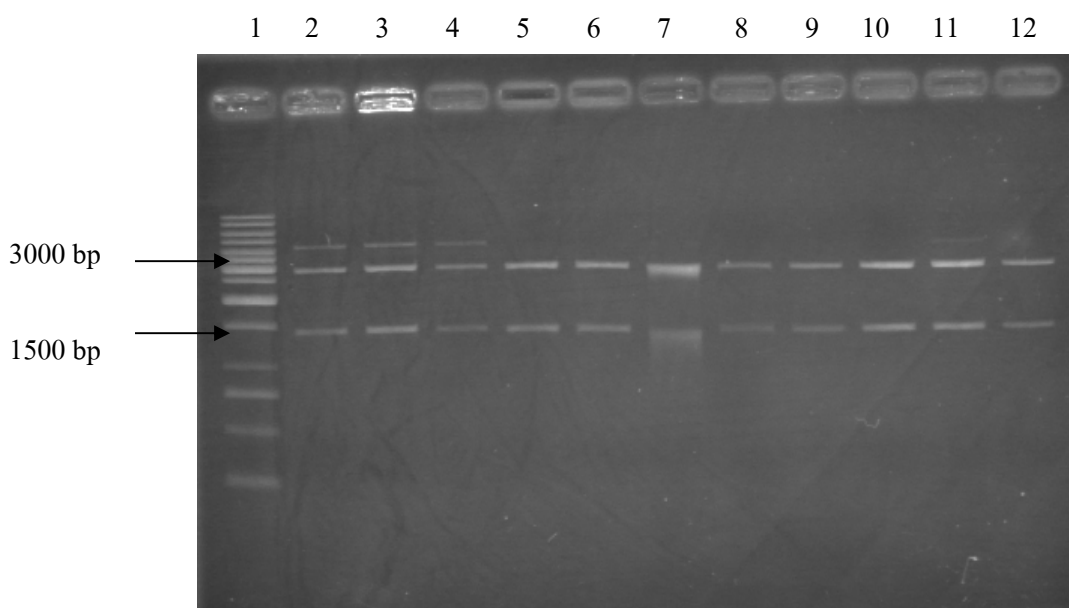


ภาพที่ 26 การเพิ่มขยายดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 16S rRNA โดยเทคนิค PCR เลนที่ 1,15: 1 Kb DNA ladder; เลนที่ 2 : negative control; เลนที่ 3 : positive control; เลนที่ 4-14 : ไอโซเลท I4-8, I4-9, C3-3, C4-4, J6-1, J9-2, D7-3, D2-8, D1-8, D2-6 และ D3-9 ตามลำดับ

7.3.3 การโคลนดีเอ็นเอเป้าหมาย

เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับพลาสมิด pGEM-T Easy ซึ่งใช้เป็นเวกเตอร์ เนื่องจากบริเวณปลายของเวกเตอร์ชนิดนี้มีเบส 3' ไหมนอยู่จึงสามารถเข้าคู่กับเบสอะดีนีนที่อยู่บริเวณปลายของ PCR product ได้ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและยีน *lacZ* ซึ่งแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้สามารถคัดเลือกโคลนได้ง่าย หลังจากได้พลาสมิดลูกผสมแล้วจึงทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ที่มีสภาพเป็น competent cell จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-Gal เพื่อคัดเลือกโคลน โดยเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะปรากฏเป็นโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารคัดเลือก ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจะเจริญเป็นโคโลนีสีฟ้า เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอจะสอดแทรกอยู่บริเวณยีน *lacZ* ทำให้เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถย่อย X-Gal ทำให้มีโคโลนีสีขาว (สุรินทร์, 2543)

จากนั้นตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกได้ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าสามารถเพิ่มขยายยีนที่ต้องการได้ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นจึงนำโคโลนีที่ได้รับการยืนยันมาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ผลการตัดด้วยเอนไซม์พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ แถบแรกมีขนาดประมาณ 3000 bp ซึ่งเท่ากับขนาดของเวกเตอร์ pGEM-T Easy และแถบที่สองมีขนาด 1500 bp ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายดังแสดงในภาพที่ 27 จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าโคลนที่คัดเลือกได้มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่จริง จึงส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโดยหน่วยบริการ Macrogen (Macrogen, Korea)



ภาพที่ 27 ลักษณะพลาสมิดลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I ของไอโซเลท C3-3, C4-4, J9-2, I4-8, I4-9, D1-8, D2-8, D3-9, J6-1, D2-6 และ D7-3 เลนที่ 2-12 ตามลำดับ, เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder

7.3.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ Macrogen, Korea พบว่าลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 มีความยาวอยู่ในช่วง 1495-1556 ดังแสดงในภาพผนวกที่ ค8-ค18 จากนั้นนำลำดับเบสดังกล่าวมาเปรียบเทียบความเหมือน (% identity) กับลำดับเบสของยีน 16S rDNA บนฐานข้อมูล (Gene Bank database) ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> โดยใช้โปรแกรม BLASTN version 2.2.16 (Mar-25-2007)

ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D1-8, D3-9, C3-3, J9-2 และ C4-4 มีความใกล้เคียงกับ ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus fermentum* 99 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์วันที่ 14 มิถุนายน 2550) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับความเหมือนใน 5 ลำดับแรกดังแสดงในตารางที่ 14 โดยไอโซเลท D1-8, D3-9, C3-3, J9-2 และ C4-4 มี

ความเหมือนกับยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus fermentum* MD-9 มากที่สุดมี % identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต D1-8, D3-9, C3-3, J9-2 และ C4-4

ไอโซเลต	สายพันธุ์	Accession No	% Identity
D1-8	<i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9	AY373589.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-6c	DQ486144.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-1	DQ399350.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-3	DQ399352.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain YB5	DQ208931.1	99
D3-9	<i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9	AY373589.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-6c	DQ486144.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-1	DQ399350.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-3	DQ399352.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain YB5	DQ208931.1	99
C3-3	<i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9	AY373589.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-6c	DQ486144.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-1	DQ399350.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-3	DQ399352.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain YB5	DQ208931.1	99
J9-2	<i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9	AY373589.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-6c	DQ486144.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-1	DQ399350.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-3	DQ399352.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain YB5	DQ208931.1	99

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No	% Identity
C4-4	<i>Lactobacillus fermentum</i> MD-9	AY373589.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-6c	DQ486144.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-1	DQ399350.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain SFCB2-3	DQ399352.1	99
	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain YB5	DQ208931.1	99

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา คุณลักษณะทางกายภาพ สมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรต และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D1-8, D3-9, C3-3 และ J9-2 พบว่ามีความสอดคล้องกันจึงสามารถระบุได้ว่าไอโซเลท D1-8, D3-9, C3-3 และ J9-2 อยู่ใน สปีชีส์ *Lactobacillus salivarius*

ส่วนผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C4-4 มีผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา และคุณลักษณะทางกายภาพ จึงสามารถบอกได้ว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* แต่เมื่อพิจารณารูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด พบว่าไอโซเลท C4-4 มีรูปแบบการหมักเหมือนกับ *Lactobacillus crispatus* ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบการหมักของ *Lactobacillus fermentum* โดยแสดงการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท C4-4 กับ *Lactobacillus crispatus* และ *Lactobacillus fermentum* ดังแสดงในตารางที่ 15 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

การทดสอบการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และการศึกษาชีวเคมี พบว่า ไอโซเลท C4-4 ไม่สามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้และจัดอยู่ในกลุ่มของ obligately homofermentative (Du toil et al., 2001) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต ด้วยโปรแกรม API พบว่าไอโซเลท C4-4 อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus crispatus* แต่ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA โดยพบว่า มีความใกล้เคียงกับยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus fermentum* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ heterofermentative ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ แต่สามารถบอกได้ว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp.

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท C4-4 กับ
Lactobacillus crispatus และ *Lactobacillus fermentum*

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	C4-4	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	0	0
Amygdalin	+	+	-
Arbutin	+	0	0
Esculin	+	+	-
Salicin	+	+	-
Cellubiose	+	+	d
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Melibiose	+	-	+
Sucrose	+	+	+
Raffinose	+	-	+
Starch	+	0	0
Glycogen	+	0	0
Gentiobiose	+	0	0

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ 0 ไม่พบข้อมูลใน Bergey's
Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986) d 11-89 % ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน
ได้

ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-6, D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 มีความใกล้เคียงกับ ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus salivarius* 99-100 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์วันที่ 4 มิถุนายน 2550) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับความเหมือนใน 5 ลำดับแรกดังแสดงในตารางที่ 16 โดยไอโซเลท D2-6, D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 มีความเหมือนกับยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* JCM1230 มากที่สุดโดยไอโซเลท D2-6 และ I4-8 มี % identity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท D7-3, J6-1 และ I4-9 มี % identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา คุณลักษณะทางกายภาพ สมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรต และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 พบว่ามีความสอดคล้องกันจึงสามารถระบุได้ว่าไอโซเลท D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9 อยู่ใน สปีชีส์ *Lactobacillus salivarius*

ส่วนผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-6 มีผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา และคุณลักษณะทางกายภาพ จึงสามารถบอกได้ว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* แต่เมื่อพิจารณารูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด พบว่าไอโซเลท D2-6 มีรูปแบบการหมักเหมือนกับ *Lactobacillus fermentum* ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบการหมักของ *Lactobacillus salivarius* โดยแสดงการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D2-6 กับ *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus salivarius* ดังแสดงในตารางที่ 17 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต D2-6, D7-3, J6-1, I4-8 และ I4-9

ไอโซเลต	สายพันธุ์	Accession No	% Identity
D2-6	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1230	AY137589.1	100
	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1047	AY137588.1	100
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA 2115	AY389803.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2116	AY389802.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2105	AY137586.1	99
D7-3	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1230	AY137589.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1047	AY137588.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA 2115	AY389803.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2116	AY389802.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2105	AY389804.1	99
J6-1	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1230	AY137589.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1047	AY137588.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA 2115	AY389803.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2116	AY389802.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2105	AY389804.1	99
I4-8	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1230	AY137589.1	100
	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1047	AY137588.1	100
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA 2115	AY389803.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2116	AY389802.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2105	AY389804.1	99
I4-9	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1230	AY137589.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. Salicinius JCM1047	AY137588.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA 2115	AY389803.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2116	AY389802.1	99
	<i>Lactobacillus salivarius</i> RA2105	AY389804.1	99

ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D2-6 กับ
Lactobacillus fermentum และ *Lactobacillus salivarius*

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	D2-6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
L-Arabinose	-	d	-
Ribose	+	+	-
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	-
Esculin	+	-	d
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Raffinose	+	+	+
Gluconate	?	+	-
Manitol	-	-	+

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ d 11-89 % ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ? ผลไม่ชัดเจน

การทดสอบการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และการศึกษาชีวเคมี พบว่า ไอโซเลท D2-6 สามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ และจัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยโปรแกรม API พบว่า D2-6 อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus fermentum* แต่ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA โดยพบว่ามีความใกล้เคียงกับชิ้น 16S rDNA ของ *Lactobacillus salivarius* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ homofermentative ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุปีชีส์ได้ สามารถบอกได้เพียงอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp.

ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8 มีความใกล้เคียงกับ ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus reuteri* 98 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์วันที่ 4 มิถุนายน 2550) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับความเหมือนใน 5 ลำดับแรกดังแสดงในตารางที่ 18 โดยไอโซเลท D2-8 มีความเหมือนกับยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 T มี % identity เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8

ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No	% Identity
D2-8	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016 T	X76328.1	98
	<i>Lactobacillus reuteri</i> C16	EF412977.1	98
	<i>Lactobacillus reuteri</i> OJUS	AY324629.1	98
	<i>Lactobacillus reuteri</i> ONK5	AY324628.1	98
	<i>Lactobacillus reuteri</i> C10	EF412976.1	98

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8 มีผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา และคุณลักษณะทางกายภาพ จึงสามารถบอกได้ว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* แต่เมื่อพิจารณารูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด พบว่าไอโซเลท D2-8 มีรูปแบบการหมักเหมือนกับ *Lactobacillus fermentum* ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบการหมักของ *Lactobacillus reuteri* โดยแสดงการเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D2-8 กับ *Lactobacillus reuteri* และ *Lactobacillus fermentum* ดังแสดงในตารางที่ 19 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath, 1986)

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลท D2-8 กับ *Lactobacillus reuteri* และ *Lactobacillus fermentum*

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	D2-8	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
L-Arabinose	+	+	d
Ribose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	-	+	+
Mannose	-	-	+
Esculin	+	0	-
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Sucrose	+	-	+
Raffinose	+	+	+
Gluconate	?	+	+

หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ - ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ d 11-89 % ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ? ผลไม่ชัดเจน

จากผลการผลการศึกษาทางชีวเคมีของของไอโซเลท D2-8 พบว่าไอโซเลท D2-8 อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus fermentum* ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 92.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ นอกจากนี้พบว่า *Lactobacillus fermentum* มีรูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรตใกล้เคียงกับ *Lactobacillus reuteri* (Sneath, 1986) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8 พบว่าอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus reuteri* โดย ไอโซเลท D2-8 มีรูปแบบการหมักแตกต่างกับรูปแบบการหมักของ *Lactobacillus reuteri* เพียง 2 รูปแบบ คือไม่สามารถใช้ Fructose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่สามารถใช้ Sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ จึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท D2-8 อยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus reuteri*

สรุป

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากลำไส้ไก่ ซึ่งมีคุณสมบัติของโพรไบโอติก

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกแยกจากลำไส้ไก่ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากลำไส้ไก่ 194 ไอโซเลท มี 11 ไอโซเลทที่สามารถทนต่อกรดที่ระดับความเข้มข้น 3 % ได้ สายพันธุ์ดังกล่าวได้แก่ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีการ agar well diffusion ของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae*., *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* Typhimurium และ *Campyrobacter jejuni* ATCC 33291 โดย ไอโซเลท I4-8 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Shigella dysenteriae*., *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้ดีที่สุด มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 3.05 ส่วนไอโซเลท D2-6 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Campyrobacter jejuni* โดยวิธีการ direct method ได้ดีที่สุด มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 11.00 นอกจากนี้ พบว่าไอโซเลท D2-6 ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคสะสมสูงสุด เท่ากับ 22.28

การศึกษาความสามารถในการทนต่อกรดและเบสในช่วงสภาวะ pH2 - pH8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท D3-9, I4-8, I4-9, C3-3, D7-3, D1-8 และ J9-2 สามารถทนต่อสภาวะ pH 2- pH8 ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 8.36-119.11 ส่วนไอโซเลท C4-4, J6-1, D2-6 และ D2-8 ไม่สามารถทนต่อสภาวะ pH 2 ได้ คือมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเป็น 0 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท D1-8 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุดที่ pH 3 คือ 108.47 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท D3-9 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด ที่ pH 2 คือ 55.61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท J9-2, C3-3, D7-3, D3-9 และ D1-8 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในช่วง pH กว้าง คือมีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดคงที่เมื่อ pH ลดลง

การศึกษาการทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที ของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท I4-8, I4-9, C3-3, D7-3, D1-8, J6-1, D2-6, J9-2 และ D2-8 สามารถทนต่ออุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 80.1-101.8, 61.8-83.2 และ 30.7-67.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ไอโซเลท D2-6 และ D1-8 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 วินาที เหลือ มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติกพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีอยู่ในช่วง 0.997-3.019 โดยไอโซเลท D1-8 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 3.019 Unit/ml และมีผลสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีไก่ ความเข้มข้น 3 % โดยไอโซเลท D1-8 สามารถทนต่อ 3 % น้ำดีไก่ได้สูง โดยมีค่าการเพิ่มปริมาณ 39.34 %

การทดสอบการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก กับ Eppendorf ที่ผ่านกระบวนการเคลือบเยื่อผนังลำไส้ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลท สามารถยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้ได้โดยมีประสิทธิภาพการยึดติดอยู่ในช่วง 58.46-79.05 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท D2-6 มีการยึดติดกับเยื่อผนังลำไส้สูงที่สุด คือมีประสิทธิภาพการยึดติดเท่ากับ 79.05

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก โดยอาศัยคุณสมบัติโพรไบโอติกเป็นตัวคัดเลือกดังกล่าว พบว่า ความสามารถของแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท มีความสามารถที่เด่น แตกต่างกันไป โดยเฉพาะไอโซเลท D2-6 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อก่อโรค ประสิทธิภาพการยึดติดและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิสูงได้สูง นอกจากนี้ไอโซเลท D1-8 มีกิจกรรมการทนต่อน้ำดี กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดี และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่อุณหภูมิสูงได้สูง ดังนั้นการนำมาใช้ผลิตเป็นโพรไบโอติก จึงสามารถนำมาใช้ได้ในรูปแบบของเชื้อผสม เพื่อให้ลักษณะเด่นของแต่ละไอโซเลท ร่วมกันแสดงออก เพื่อให้สัตว์เจ้าถิ่นมีสุขภาพที่ดี

2. เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก 11 ไอโซเลทได้แก่ไอโซเลท D1-8, D2-6, D2-8, D3-9, D7-3, J6-1, J9-2, I4-8, I4-9, C3-3 และ C4-4 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การศึกษารูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA สามารถจำแนกไอโซเลท J6-1, I4-9, I4-8 และ อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus salivarius* เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท D1-8, D3-9, D7-3, C3-3 และ J9-2 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus fermentum* ส่วน ไอโซเลท D2-8 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus reuteri* นอกจากนี้ ไอโซเลท D2-6 และ C4-4 ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ แต่สามารถบอกได้ว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp.

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คมแห พิลาสสมบัติ,, จุฑารัตน์ เสธกุล และ ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2542. การลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนเนื้อสุกรโดยใช้สารละลายกรดแลคติก, น. 32. ใน การประชุมวิชาการ 30 ปีเกษตร เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. มหาวิทยาลัยเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

บุญเรียง ลำชัยภูมิ. 2544. การคัดเลือกและผลิตเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวณะเพื่อใช้ในการเลี้ยงไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รฐา มาลัยพวง. 2542. การศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองของไทย. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____. 2544. การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลคติกของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรพร มีทรัพย์. 2544. การศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรดเป็นด่างและน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่. เทคนิควิจัยปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิโรจน์ จันทรัตน์. 2538. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก. เอกสารประกอบการสอนวิชา สป. 420. ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร และกรมสุลการ. 2547. สถิติการส่งออก. สภาผู้ส่งสินค้าทางเรือแห่งประเทศไทย. แหล่งที่มา : http://www.tnsc.com/html/il_gsc2.html. 18 ธันวาคม 2547.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 282 น.

อาภา สุเวชวัฒนกุล. 2545. การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และการแยกสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์บางส่วน. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ander, R.F. 1970. Formation of hydrogenperoxide by group N. Streptococci and its effect on their growth and metabolism. **J. Appl. Microbiol.** 19: 602-616.

Apajalanti, J, L.K. Sarkilahti, R.R. Maki, J.P. Heikkinen, P.H.Nurminen and W.E. Holben. 1998. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine-based analyses of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chicken. **Appl Envi. Microbiol.** 64: 631-639.

_____, A. Kettunen and H. Graham, 2004. Characteristics of gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World' s Poult. Sci. J.** 60: 223-232.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology, pp. 1-72 In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **Lactic acid bacteria: microbiology and Functional Aspect.** Marcel Dekker, Inc., Newyork

Barnes, E.M., C.G. Mead and A.D. Barnum. 1972. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. **Brit. Poultry Sci.** 13: 617-622.

Bateup, J.M., M.A. McConnell, H.F. Jenkinson and G.W. Tannock. 1995. Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1147-1149.

Beachey, E.H. 1981. Bacterial adherence : adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **J. Infectious Dis.** 143: 325-345.

Beisheir, L. 1991. **Microbiology in practice**. 5th ed. Harper Collins publisher, Inc. New York, 514 p.

Blum, S., D. Haller, A. Pfeifer and E.J. Schiffrin. 2002. Probiotics and immune response. **Clinical Rev. Allergy Immunol.** 22: 287-309.

Campbell, J.M., L.E. Russell, J.D. Crenshaw, K.C. Behnke and P.M. Clark. 2006. Growth response of broilers to spray-dried plasma in pelleted or expanded feed processed at high temperature. **J. Anim. Sci.** 84: 2501-2508.

Center, S.A. 1993. Serum bile acid in companion animal medicine. pp. 625-657. *In* Micheal, S.L.ed. **Gastroenterology: The 1990s**. Philadelphia: Saunders.

Chateau, N., I. Castellanos and A.M. Deschamps. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of commercial probiotic consortium. **J. Appl. Bacteriol.**

Cohen, S.N., A.C.Y. Chang and L.Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, pp. 2110-2114. *In* J. Sambrook and D.W. Russel, eds. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd ed., Cold Spring Harbor CSHL Press, New York.

Cole, C.B. and R. Fuller. 1984. Bile acid deconjugation and attachment of chicken gut bacteria : their possible role in growth depression. **Brit. Poultry Sci.** 25: 227-231.

Corzo, G. and S.E. Gilliland. 1999. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. **J. of Dairy Sci.** 82: 472-480.

Coventry, M.J., J.B. Gordon, A. Wilcock, K. Harmark, B.E. Davidson, M.W. Hickey, A.J. Hillier and J. Wan. 1997. **J. Appl. Microbiol.** 83: 248.

- Cresci, A., C. Orpianesi, S. Silvi, V. Mastrandrea and P. Dolara. 1999. The effect of sucrose or starch-based diet on short-chain fatty acids and faecal microflora in rats. **J. Appl. Microbiol.** 86: 245-250.
- Dellagio, F.L., M.T. Dicks and S. Torriani. 1995. The genus *Leuconostoc amylovorus* and evidence for stimulation of bacterocin production under unfavorable growth conditions. **Microbiol.** 142: 817-827.
- De Smet, I., L. Van Hoorde, N. De Saeyer, M. Vande Woestyne and W. Verstraete. 1994. *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. **Microb. Ecol. Health Dis.** 79: 292-301.
- Desmond, C., R.P. Ross, E. O'Callaghan, G. Fitzgerald and C. Stanton. 2002. Improve stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC338. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 5929-5936.
- Devriese, L.A. and B. Pot. 1995 The genera of *Enterococcus*, pp. 327-367. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol.2: The Genera of Lactic Acid bacteria.** Chapman & Hall, Glasgow, UK.
- Dodd, H.M. and M.J. Gasson. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria, pp. 211-251. In M.J. Gasson and W.M. de Vos, eds. **Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria.** Blackie academic and Professional, Glasgow.
- Du Toit, M., L.M.T. Dicks and W.H. Holzapfel. 2001. Taxonomy of obligately homofermentative and facultative heterofermentative. **Letters in Appl. Microbiol.** 32(3): 199-204.

Ehrmann M.A., P. Kurzak, J. Bauer and R.F. Vogel. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. **J. Appl. Microbiol.** 92: 966-975.

Elliott, S.N., A. Buret, W. McKnight, M.J. Miller and J.L. Wallace. 1998. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. **Amer. J. Physiol.** 275: 425-432.

Eugene, B.C., M.D. Sitrin and D.D. Black. 1996. **Gastrointestinal Hepatobiliary and Nutritional Physiology.** Lippincott-Raven Publishers, Pennsylvania.

Franz, C.M.A.P., D.M. Toit, N.A.Olasupo, U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BEF 905 from ready-to eat salad. **Lett. Appl. Microbiol.** 76: 231-235.

Freter, R., E. Stauffer, D. Cleven, L. V. Holdeman, and W. E. C. Moore. 1983. Continuous flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora. **Infect. Immunol.** 39: 666-675.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. **J. App. Bacteriol.** 66: 365-378.

_____. 1992. **Probiotics** : The scientetific basis. Chapman and Hall. London.

_____. and G. Perdigon. 2000. **Probiotics 3. Immunomodulation by the gut microflora and probiotics.** Kluwer academic publisher, Dordrecth.

Gardiner, G.E., E. O'Sullivan, J.Kelly, M.A.E. Auty, G.F. Fitzgerald, J.K. Collins, R.P. Ross and C. Stanton. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2605-2612.

- Garriga, M., M. Pascual, J.M. Monfort, and M. Hugas. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. **J. Appl. Microbiol.** 84: 125-132.
- Ghali, M.B., P.T. Scott and R.A.M. Al Jassim. 2004. Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer. **J. Appl. Microbiol.** 39: 341-346.
- Gilliland, S.E., T.E. Stanley and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **J. Dairy Sci.** 67: 3045-3051.
- Gusils, C., A.P. Chaia, S. Gonzalez and G. Oliver. 1999. Lactobacilli isolated from chicken intestines : potential use as probiotics. **J. Food Protection** 62: 252-256.
- Hammes, W.P., and R.F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. In B.J.B. Wood and W.H. Holzappel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol.2: The Genera of Lactic Acid bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, UK.
- Hardie, J.M. and R.A. Whaley. 1995. The genus *Streptococcus*, pp. 55-125. . In B.J.B. Wood and W.H. Holzappel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol.2: The Genera of Lactic Acid bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, UK.
- Harper, H.A., V.W. Rodwell and P.A. Mayes. 1977. **Review of physiological chemistry**. 16th ed. LANGE Medical publications, Los Altos, California.
- _____. 1987. Importance of bile tolerance in lactobacilli used as dietary adjunct, pp. 149-155. In Lyons, T.P., ed. **Biotechnology in the Feed Industry**. Alltech Feed Co., Lexington, KY.
- Havenaar, R., and J.H.J. Huis in't Veid. 1992. Probiotic : general view, pp. 151-170. In J.B.J. Wood, ed. **Lactic acid bacteria in health and disease**. Elsevier. London.

- _____. 1993. criteria in selection probiotic, pp. 193-206. In J.F. Jenson, M.H. Hinton and R.W.A.W. Mulder, eds. **Probiotic and Pathogenicity**, DLO spelderholt Centre for Poultry Research and Information Services
- Hill, M.J. 1995. Bacteria and fat digestion, pp. 131-142. In M.J. Hill, ed. **Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology**. Taalor and Francis Inc., London, U.K.
- Hock, E., I. Halle, S. Matthes and H. Jeroch. 1997. Investigations on the composition of the ileal and caecal microflora of broiler chicks in consideration to dietary enzyme preparation and zinc bacita\racin in wheat-based diet. **Agribiological Research-Zeitschrift fur Agrarbiologie Agrikulturchemie Okologie**. 50: 85-95.
- Holzapfel, W. H., P.Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. H. J. Huis in't Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.** 41: 85-101.
- _____, R. Geisen, J. Bjorkroth and U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Amer. J. Clinical Nutrition**. 73: 365S-373S.
- _____. and U. Schillinger. 2002. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int.** 35: 109-116.
- Huis in't Veld, J.H.J., R. Havenaar. 1993. Selection criteria for microorganisms for probiotic use, pp. 11-19. In J.F. Jenson, M.H. Hinton and R.W.A.W. Mulder, eds. **Probiotic and Pathogenicity**, DLO spelderholt Centre for Poultry Research and Information Services.
- Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.** 9: 868-877.

- Hyrominus, B., C.L. Marrec, A.H. Sassi and A. Deschamps. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 61: 193-197.
- Itoh, T., Y. fujimoto, Y. Kawai, T. toba, T. Saito. 1995. Inhibition of food borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. **Lett. Appl. Microbiol.** 23: 67-71.
- Izat, A.L., R.E. Hierholzer, J.M. KOPEK, m.h. Adams, M.A. Reiber and J.P. McGinnis. 1990. Effect of D-mannose on incidence and levels of salmonellae in ceca and carcass samples of market age broilers. **Poultry Sci.** 69: 2244-2247.
- Jin, L.Z., M.Y. Ho. N. Abdullah, A.M. Ali and S. Jalaludin. 1998. Acid and bile tolerance of lactobacillus isolated from chicken intestine. **Appl. Microbiol.** 27: 183-185.
- Jonsson, E. and P. Conway. 1992. Probiotic for pigs, pp. 260-316. In R. Fuller, eds. **Probiotics the scientific basis**. Chapman and Hall, London.
- Johnson, T.R. and C.L. case. 1989. **Laboratory experiment in microbiology brief**, 2nd ed. Benjamin cumming publisher company, Inc. Rewood City. 354p.
- Juha, H. A Apajalahti., S.K. laura, M.E.R. Brita, J.P. Heikkinen, P.H. Nurminen and W. E. Holben. 1998. Effective recovery of bacterial DNA and percent-Guanine-plus-Cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(10): 4084-4088.
- Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Regular, non-sporing gram –positive rods, pp. 1208-1234. In Sneath P.H.A., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2**. Williams and Wilkens, Baltimore, USA.

- Kawamura, Y., X.G. Hou, F. Sultana, H. Miura and T. Ezaki. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of genus *Streptococcus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 406-408.
- Kirjavainen, P.V., A.C. Ouwehand, E. Isolauri, S.J. salminen. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. **FEMS Microbiol. Lett.** 167: 185-189.
- Knarreborg, A., M. Ricarda, S.K. Jensen and B.B. Jensen. 2002. Quantitative determination of bile hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(12): 6425-6428.
- Laissue, J.A., B.B. Chappuis, C. Muller, J.C. Reubi and J.-O. Gebbers. 1993. The intestinal immune system and its relation to disease. **Digestive Dis.** 11: 298-312.
- Lehto, E.M. and S.J. Salminen. 1997. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by Lactobacillus strain GG spent culture supernate : Only a pH effect?. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 18: 125-132.
- Lesuffleur, T., A. Barbat, E. Dussaulx and A. Zweibaum. 1990. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. **Cancer Res.** 50: 6334-6343.
- Lilly, D. M., and R. H. Stillwell. 1965. Probiotic : growth promoting factors produced by microorganisms. **J. Sci.** 147: 747-748.
- Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 149-163.

- Liong, M.T. and N.P. Shah. 2005. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. **Int. Dairy J.** 15: 391-398.
- Madara, J.L. 1997. The chameleon within : improving antigen delivery. **J. Sci.** 277: 910-911.
- Marteau, P., T. Vesa and J.C. Rambaud. 1997. Lactose maldigestion, pp. 65-88. In R. Fuller, ed. **Probiotic 2 : Applications and Practical aspects**. Chapman and Hall, London.
- Mattila-Sandholm, T., J. Matto and M. saarela. 1999. Lactic acid bacteria with health claims- interactions and interference with gastrointestinal flora. **Int. Dairy J.** 9: 25-35.
- Mead, G.C. and B.W. Adam. 1975. Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life, **Brit. Poultry Sci.** 16: 169-176.
- Morishita, Y., T. Mitsuoka, C. Kaneuchi, S. Yamamoto And M. Ogata. 1971. Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. **Jap. J. Microbiol.** 15: 531-538.
- Murry, A.C., Jr. A. Hinton and H. Morrison. 2004. Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. **Int. J. Poultry Sci.** 3(9): 603-607.
- Nitisinprasert, S., N. Pungsungworn, P. Wanchitanawong, G. Loiseau and D. Montet. 2006. In vitro adhesion assay of lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. By microbiological and PCR methods. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 28: 99-106.
- _____, V. Nilphai, P. Bunyai, K. Doi and K. Sonomoto. 2000. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Resistant to antibiotics. **Kasetsart J.** 34: 387-400.

- Nurnni, E., C.E. Schneitz and P.H. Makela. 1983. **Process for the production of a bacterial preparation.** Canadian Pat. 1151066.
- Ochi, Y. and T. Mitsuoka. 1958. Studies on the intestinal flora of chickens I: cultural methods. **Jap. J. Vet. Sci.** 20: 7-12.
- Ouwehand, C.A. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 139-159. In S.Salminen and A. V. Wright ,eds. **Lactic acid bacteria.** 2 nd. Mercel Dekker Inc., New York.
- _____, S. Salminen, P.V. Kirjavainen and C. Shortt. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. **Int. Dairy J.** 9: 43-52.
- _____, E. M. Tuomola and Y.K. Lee. 2001. Microbial interactions to intestinal mucosal models. **Methods Enzymol.** 337: 200-212.
- Oyarzabal, A.O. and D.E. Conner. 1995. In vitro fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella spp.* by selected bacteria. **Poultry Sci.** 74: 1418-1425.
- Oyaizu, H. 1992. Identificayion of bacteria and analysis of 16S-rRNA sequences. pp. 51-60. *In* Microbal Ecology, ed. **Japanese Society of Microbial Ecology, Business Center for Academic Society of Japan.** Tokyo.
- Oyetayo, V.O. 2004. Phenotypic Characterisation and Assessment of The Inhibitory Potential of Lactobacillus Isolates from Different source. **African J. Biotechnol.** 3(7): 355-357.
- Park, S.Y., G.E. Je, Y.T. Ko, H.K. Jung, Z. Ustunol and J.J. Pestka. 1999. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cyyokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of Bifidobacterium. **Int. J. Food Microbiol.** 46: 231-241.

- Reid, G. and J. Burton. 2000. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes Infect.** 4: 319-324.
- Reuter, G. 2001. Probiotic-possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. **Berl. Munch. Tierarztl.** 114: 410-419.
- Rinkinen, M., E. Westermarck, S. Salminen and A.C. Ouwehand. 2003. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. **Vet. Microbiol.** 97: 55-61.
- Roose, S., F. Karner, L. Axelsson and H. Jonsson. 2000. *Lactobacillus mucosae* sp. Nov., a new species with *in vitro* mucus-binding activity isolated from pig intestine. **Intern. J. System. Evol. Micro.** 50: 251-258.
- Ross, R.P., S. Morgan and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation : past, present and future. **Int. J. Food Microbial.** 79: 3-16.
- Rowland, I.R. 1992. Metabolic interactions in the gut, pp. 29-54. In R. Fuller, eds. **Probiotics the scientific basis**, Chapman and Hall, London.
- Sackey, B. A., P. Mensah, E. Collison, E. Sakyi-Dawson. 2001. *Campyrobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan accra. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 21-28.
- Salanitro, J.P., I.G. Blake, P.A. Muirhead, M. Maglio and J.R. Goodman. 1978. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. **Appl. Environ. Microbiol.** 35: 782-790.

- Salminen, S., C. Bouley, M.-C. Boutron-Ruault, J.H. Cummings, A. Franck, G.R. Gibson, E. Isolauri, M.-C. Moreau, M. Roberfroid, and I. Rowand. 1998b. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Brit. J. Int.** 13: 293-313.
- _____, M.A. Deighton, Y. Benno and S.L. Gorbach. 1998a. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, pp. 211-253. In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects.** Marcel Dekker Inc , New York .
- _____, A. Von Wright, C.A. Ouwehand and H. W. Holzapfel. 2000. Safety assessment of starters and probiotics, pp. 239-251. In M Adams and R. Nout , eds. **Fermentation and food safety.** Aspen Publishers, Gathersburg.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 3rd ed., Cold Spring Harbor CSHL Press, New York. 147 p.
- Savory, C.J. 1992. Enzyme supplementation, degradation and metabolism of three U-14C-labelled cell-wall substrates in the fowl. **Brit. J. Nutrition.** 67: 91-102.
- Schiffrin, E.J., F. Rochat, H. Link-Amster, J.M. Aeschlimann and A. Donnet-Hughes. 1994. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **J. Dairy Sci.** 78: 491-497.
- Schillinger, U. and W.H. Holzapfel. 1995. The genus *Carnobacterium*, pp. 307-326. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol.2: The Genera of Lactic Acid bacteria.** Chapman & Hall, Glasgow, UK.
- _____ and F. Luck. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1906.

- Simon, A. and V. Versteeg. 1989 The use of feed additives in the E.U. Regulations, problems and future 1999, pp. 126-139 In Vanbell, M., ed. **Eastern Nutrition Conference**. Animal Nutrition Association of Canada. Niagara Falls, Ontario.
- Smith, H.W. 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. **J. Pathol. Bacteriol.** 90: 495-513.
- Sneath, P.H.A. 1986. **Bergey's Manual of Systemic Bacteriology Vol.2**. William & Wilkins, Baltimore. 573 p.
- Steidinger, M.U., R.D. Goodband, M.D. Tokach, S.S. Dritz, J.L. Nelson, L.J. McKinney, B.S. Borg and J.M. Campbell. 2000. Effect of pelleting and pellet conditioning temperatures on weanling pig performance. **J. Anim. Sci.** 78: 3014-3018.
- Stevens, C.E. 1988. **Comparative physiology of the vertebrate digestive system**. Cambridge University Press, Canada.
- Strober, W., B. Kelsall and T. Marth. 1998. Oral tolerance. **J. Clinical Immunol.** 18: 1-30.
- Suskovie, J., B. Kos, S. Matosic and V. Besendorfer. 2000. The effect of bile salt on survival and morphology of potential probiotic strain *Latobacillus acidophilus* M92. **World J. of Micobiol. and biotechnol.** 16: 673-678.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40: 722-756.
- Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki and I. Mierau. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. **J. Dairy Sci.** 82: 2530-2535.

- Tauxe, R.V. 1991. Forward: transmission of human bacterial pathogen through poultry (Banquet address). pp. XV-XXIII. In Tauxe, R.V., eds. **Colonisation Control of Human Bacterial Enteropathogens**. Blankenship, Academic Press, L.C. New York.
- Teixeira, P., H. Castro and R. Kirby. 1995. Spray drying as method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Food Sci.** 62: 576-578.
- Tiina M.-S., M. Jaana, and S. Maria. 1999. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. **Int. Dairy J.** 9: 25-35.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, pp. 173-174. . In B.J.B. Wood and W.H. Holzappel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol.2: The Genera of Lactic Acid bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, UK.
- Towner, K.T. and A. Cockayne. 1993. **Molecular methods for microbial identification and typing**. Chapman & Hall. Cambridge, UK. 202 p.
- Vesterlund, S., J. Palta, M. Karp and A.C. Ouwehand. 2004. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue : Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. **Res. Microbiol.** Article in press.
- Vuyst, D.L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. In Vuyst, D.L. and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Wagner, D.D. and P.O. Thomas. 1987. Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks. **Poultry Sci.** 57: 971-975.
- Wistreich, G.A. and M.D. Lechtman. 1980. **Laboratory exercise in microbiology**. 4th eds. Macmillan publishing Co., Inc., New York. 420 p.

Yoshimura, H., M. Ishimaru, Y.S. Endoh and A.Kojima. 2000. Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broiler and layer chickens. **Lett. Appl. Microbiol.** 31: 427-432.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. MRS (de Man Rogosa and Sharp) (De Man et al., 1960)

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

ปรับ pH เท่ากับ 6.2 ± 0.05 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง MSR เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5 %

อาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีไก่ 3 % เตรียมโดยใช้น้ำดีไก่สดซึ่งทำการหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นแล้วมาผสมในอาหารเหลว MRS

2. LB

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium Chloride	10.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง MSR เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5 %

อาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เตรียมโดย Stock solution ของแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร LB 1000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3. LB plate ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal

เตรียม Stock solution ของ IPTG (Isopropylthiogalactoside) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลาย IPTG 1.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม Stock solution ของ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย X-gal 100 มิลลิกรัม ใน N,N' – dimethyl- formamide 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่พ้นแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำ Stock solution ของแอมพิซิลิน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร IPTG 5 มิลลิลิตร และ X-gal 1.6 มิลลิตร เติมนลงในอาหาร LB (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) 1 ลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

4. Columbia blood agar

Special peptone	25.0	กรัม
Starch	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	10.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. Brucella broth

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

ปรับ pH เท่ากับ 7.5 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. NB (Nutrient broth)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 6.2 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ อาหารแข็ง NA เตรียมโดยเติมผงวุ้น 1.5%
อาหาร NA และ NB เติม NaCl 1.5 % สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

7. SOB medium

Tryptone	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. SOC medium

SOB 1 ลิตร (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) + กลูโคส ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)
ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

9. สารละลาย ninhydrin ที่ใช้ในการทดสอบเอนไซม์ย่อยน้ำดี

Ninhydrin	5.0	มิลลิกรัม
Glycerol	1.2	มิลลิลิตร
0.5M Sodium citrate buffer (pH 5.5)	0.7	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
วิธีการทดสอบ

1. การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป E-zi DNA KIT (Sunnolincorporation, Thailand)

นำแบคทีเรียกรดแลกติกมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของชุดสกัดสำเร็จรูป E-zi DNA KIT (Sunnolincorporation, Thailand) ดังนี้

1.1 นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะในอาหารเหลว MRS 1.5 มิลลิตรจนได้ช่วง early log phase ใส่ลงใน eppendroff ขนาด 1.5 มิลลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที 5 นาที ทิ้งสารละลายใส ระหว่างนี้ นำ DA และ DB ไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส

1.2 เติม DA ที่อุ่น 65 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร และ DB ที่อุ่น 65 องศาเซลเซียส 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่างแล้ว vortex นาน 10 วินาที

1.3 Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

1.4 เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร vortex นาน 10 วินาที แล้ว centrifuge ที่ 10000 rpm 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.5 เทสารละลายทิ้ง นำ pellet มาล้างด้วย 70 % Cold ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว centrifuge ที่ 10000 rpm 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.6 เทสารละลายทิ้ง นำ pellet ของ DNA ไปทำให้แห้ง แล้วละลายใน Distilled water

2. การทำบริสุทธิ์ PCR product ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Extract (MACHEREY-NAGEL, Germany)

2.1 นำตัวอย่าง 1 ปริมาตร ผสมกับบัฟเฟอร์ NT2 4 ปริมาตร ในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณน้อยกว่า 50 ไมโครลิตร ให้ปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตรด้วยบัฟเฟอร์ TE pH 7.5

2.2 นำคอลัมน์ NucleoSpin[®] Extract ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารผสมตัวอย่างจากข้อ 1.1 ลงในคอลัมน์แล้วนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ แล้วนำคอลัมน์กลับมาใส่หลอดเก็บตัวอย่างเดิมอีกครั้ง

2.3 เติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10000 xg เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ NT3

2.4 เติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10000 xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ NT3

2.5 หลังจากทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์แล้วจึงนำคอลัมน์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 นาที

2.6 ย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอด micotube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะ NE ปริมาตร 25-50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector

เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector ด้วยปฏิกิริยา ligation ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

2X Rapid Ligation buffer, T4 DNA ligase	5	ไมโครลิตร
pGEM-T Easy Vector (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
PCR product	X*	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	...	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	10	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

*การคำนวณปริมาตร PCR product จากสูตร

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert} \times \text{insert vector molar ratio}}{\text{kb size of vector}} = \text{ng insert}$$

4. การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Promega, USA)

ถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube หลอดใหม่ พร้อมกับนำหลอด microtube ที่ใส่ competent มาบ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เติม competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอด microtube ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วบ่มบนน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-50 วินาที (heat shock) แล้วนำมาบ่มบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เติม SOC medium ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 1000 xg เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย SOC medium ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

5. การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIA prep Spin Miniprep Kit 50 (QIAGEN)

5.1 นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะในอาหารเหลว MRS 1.5 มิลลิลิตรจนได้ช่วง early log phase ใส่ลงใน eppendroff ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที 5 นาที ทิ้งสารละลายใส

5.2 ละลาย pellet cell ด้วย buffer P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

5.3 ใส่ buffer P2 250 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง

5.4 ใส่ buffer N3 35 ไมโครลิตร ผสมด้วยการกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง

5.5 นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

5.6 ใส่ สารละลายใน spin column โดยใช้ปิเปต

5.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 rpm 30-60 วินาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์

5.8 ล้างคอลัมน์โดย buffer PE 750 ไมโครลิตร เหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 30-60 วินาที

5.9 ทิ้งสารละลาย และจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด buffer ส่วนที่เหลือ

5.10 นำคอลัมน์ใส่ลงใน microtube ใหม่ เติม buffer EB 50 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 13000 rpm 1 นาที

6. การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Promega, USA)

ปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด pGEM-T-Easy vector ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำปราศจากอีออนปลอดเชื้อ	16.3	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ (10X)	2.0	ไมโครลิตร
Acetylated BSA, 10 µg/µl	0.2	ไมโครลิตร
DNA, 1 µg/µl	1.0	ไมโครลิตร
<i>EcoRI</i> , 10 U/ µl	0.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	20	ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยา โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. การตรวจสอบโคลนด้วย Colony PCR product โดยใช้ นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ SP6 และ T7 (Promega, USA)

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 1 ยูนิต สารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ (1X) แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ SP6 และ T7 (Promega, USA) ดีเอ็นเอต้นแบบ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermalcycler PCR (Hybaid, UK) โดยตั้งโปรแกรมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย 3 ขั้นตอน ขั้นแรกประกอบด้วยช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 ประกอบด้วยช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ช่วง annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ ช่วง extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้ายประกอบด้วยช่วง extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 ผลการทดสอบความสามารถทนต่อ 3 % น้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
D1,4	138	140	139	149	122	135.5	-2.52
D1,8	51	71	61	95	75	85	39.34
J5,1	166	163	164.5	74	61	67.5	-58.97
J5,2	120	125	122.5	106	106	106	-13.47
J5,3	251	251	251	166	166	166	-33.86
J5,4	247	234	240.5	61	69	65	-72.97
J5,5	546	742	644	308	430	369	-42.70
J5,6	656	884	770	49	33	41	-94.68
J5,7	315	364	339.5	205	170	187.5	-44.77
J5,8	294	257	275.5	73	94	83.5	-69.69
J5,9	438	474	456	178	170	174	-61.84
J5,10	1200	880	1040	294	237	265.5	-74.47
C7,1	436	440	438	153	134	143.5	-67.24
J6,1	119	119	119	123	123	123	3.36
J6,9	163	163	163	160	160	160	-1.84
J6,10	257	290	273.5	168	142	155	-43.33
J17,1	160	202	181	62	60	61	-66.30
J17,2	240	202	221	140	137	138.5	-37.33
J17,3	39	46	42.5	29	33	31	-27.06
J17,4	115	128	121.5	33	62	47.5	-60.91
D5,10	354	330	342	217	210	213.5	-37.57
D5,9	207	250	228.5	117	139	128	-43.98
D5,2	147	146	146.5	85	94	89.5	-38.91

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
D5,5	28	3	15.5	0	2	1	-93.55
D5,6	0	0	0	0	0	0	0.00
D2,3	822	940	881	455	504	479.5	-45.57
D2,6	122	107	114.5	124	125	124.5	8.73
D2,8	73	65	69	87	91	89	28.99
D1,10	102	137	119.5	52	72	62	-48.12
D3,6	29	14	21.5	6	11	8.5	-60.47
D4,4	148	110	129	39	63	51	-60.47
D4,10	366	370	368	199	134	166.5	-54.76
D7,1	64	60	62	31	26	28.5	-54.03
D7,3	105	112	108.5	134	142	138	27.19
D8,5	160	178	169	61	57	59	-65.09
D8,8	110	175	142.5	86	48	67	-52.98
D12,1	3	7	5	4	0	2	-60.00
D13,1	329	273	301	185	248	216.5	-28.07
D13,3	0	0	0	0	0	0	0.00
D14,1	0	0	0	0	0	0	0.00
D8,6	278	322	300	106	149	127.5	-57.50
D1,6	196	217	206.5	115	119	117	-43.34
D1,3	54	77	65.5	25	9	17	-74.05
D2,2	0	0	0	0	0	0	0.00
D7,5	329	338	333.5	132	164	148	-55.62

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลข	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
D7,9	168	168	208	188	47	49	-48.00
D7,7	129	129	138	133.5	63	69	-66.00
D7,10	12	12	15	13.5	10	14	-12.00
D7,4	95	95	53	74	30	32	-31.00
D7,6	52	52	44	48	27	17	-22.00
D7,8	65	65	78	71.5	29	31	-30.00
C13,1	38	38	44	41	0	9	-4.5.00
D8,3	326	326	288	307	109	54	-81.50
C13,6	243	243	173	208	170	86	-128.00
C13,7	36	36	42	39	17	17	-17.00
C2,4	52	52	65	58.5	31	31	-31.00
C13,8	26	26	16	21	20	21	-20.50
C13,2	170	170	143	156.5	26	61	-43.50
C4,5	170	170	143	156.5	26	61	-43.50
C2,1	400	400	434	417	272	251	-261.50
D4,3	4	4	8	6	0	1	-0.50
D4,1	96	96	108	102	49	78	-63.50
D1,9	187	187	185	186	92	91	-91.50
C6,6	354	354	401	377.5	118	96	-107.00
C7,1	15	15	11	13	5	0	-2.50
D15,4	452	452	436	444	100	109	-104.50
D1,7	182	182	164	173	110	88	-99.00

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
C6,9	321	369	345	201	205	203	-41.16
C3,5	385	375	380	315	227	271	-28.68
C15,3	153	190	171.5	14	23	18.5	-89.21
D4,7	23	13	18	14	19	16.5	-8.33
C4,4	151	121	136	45	51	48	-64.71
C7,4	116	116	116	76	62	69	-40.52
D8,3	322	410	366	135	89	112	-69.40
J2,2	51	54	52.5	18	18	18	-65.71
J4,4	45	48	46.5	19	60	39.5	-15.05
J7,6	264	290	277	66	61	63.5	-77.08
J2,3	0	0	0	0	0	0	0.00
D4,9	63	59	61	8	5	6.5	-89.34
J2,7	0	0	0	0	0	0	0.00
J2,8	0	0	0	0	0	0	0.00
J1,8	118	121	119.5	33	69	51	-57.32
D8,9	167	105	136	98	54	76	-44.12
D13,2	141	145	143	74	45	59.5	-58.39
D4,8	39	23	31	8	5	6.5	-79.03
D4,3	21	39	30	4	3	3.5	-88.33
J7,4	54	31	42.5	1	14	7.5	-82.35
D9,10	113	125	119	88	103	95.5	-19.75
J4,3	50	53	51.5	45	41	43	-16.50

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
J7,7	66	82	74	12	9	10.5	-85.81
J7,9	17	18	17.5	2	0	1	-94.29
J7,3	37	48	42.5	14	27	20.5	-51.76
J7,8	11	11	11	1	2	1.5	-86.36
D13,8	0	0	0	0	0	0	0.00
D9,10	4	17	10.5	0	2	1	-90.48
D9,8	21	20	20.5	19	9	14	-31.71
J7,10	85	65	75	7	12	9.5	-87.33
J4,2	200	195	197.5	26	30	28	-85.82
J7,2	195	208	201.5	124	173	148.5	-26.30
J7,5	3	4	3.5	2	3	2.5	-28.57
D15,1	124	87	105.5	80	72	76	-27.96
J4,1	161	176	168.5	43	44	43.5	-74.18
D5,8	51	47	49	54	38	46	-6.12
D8,10	270	362	316	154	157	155.5	-50.79
J1,5	1	2	1.5	3	0	1.5	0.00
J12,4	91	80	85.5	61	38	49.5	-42.11
J12,5	410	400	405	223	240	231.5	-42.84
J1,2	207	240	223.5	98	121	109.5	-51.01
J9,2	183	157	170	200	217	208.5	22.65
J9,1	135	133	134	55	54	54.5	-59.33
J12,2	85	56	70.5	36	103	69.5	-1.42

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
J1,6	27	23	25	8	25	16.5	-34.00
J1,9	250	268	259	37	56	46.5	-82.05
J1,1	103	92	97.5	68	64	66	-32.31
I1,2	250	310	280	93	77	85	-69.64
I1,3	170	166	168	51	53	52	-69.05
I1,4	275	345	310	71	51	61	-80.32
J1,7	54	65	59.5	29	32	30.5	-48.74
I7,8	513	502	507.5	109	140	124.5	-75.47
I9,7	131	157	144	27	53	40	-72.22
D13,9	24	42	33	22	18	20	-39.39
I9,3	8	25	16.5	9	6	7.5	-54.55
I9,5	206	279	242.5	58	85	71.5	-70.52
D13,4	6	6	6	0	0	0	-100.00
I5,3	48	52	50	12	11	11.5	-77.00
I9,2	147	159	153	32	27	29.5	-80.72
I9,4	34	44	39	16	24	20	-48.72
I9,7	54	95	74.5	30	11	20.5	-72.48
I9,8	82	76	79	37	50	43.5	-44.94
D3,8	11	9	10	1	2	1.5	-85.00
I9,1	224	189	206.5	52	52	52	-74.82
D3,2	406	357	381.5	41	35	38	-90.04
D3,5	241	129	185	15	13	14	-92.43

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรม การทนต่อ น้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
D3,1	332	399	365.5	52	56	54	-85.23
I4,7	228	288	258	99	68	83.5	-67.64
I4,6	116	124	120	45	68	56.5	-52.92
C9,2	356	212	284	105	109	107	-62.32
C4,4	136	157	146.5	145	183	164	11.95
J3,2	276	312	294	76	83	79.5	-72.96
C6,7	72	79	75.5	41	51	46	-39.07
C6,10	387	392	389.5	92	78	85	-78.18
I4,8	104	156	130	121	146	133.5	2.69
C9,10	492	470	481	198	172	185	-61.54
I3,4	422	416	419	118	101	109.5	-73.87
C3,6	184	192	188	72	130	101	-46.28
C9,9	186	242	214	34	61	47.5	-77.80
C9,5	145	180	162.5	45	50	47.5	-70.77
I3,7	170	196	183	71	130	100.5	-45.08
I4,9	40	52	46	45	66	55.5	20.65
C9,4	238	216	227	55	83	69	-69.60
C3,2	406	380	393	166	154	160	-59.29
C7,8	340	336	338	40	36	38	-88.76
C9,6	146	240	193	58	44	51	-73.58
J3,4	242	228	235	104	139	121.5	-48.30

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
I4,5	169	164	166.5	63	68	65.5	-60.66
I5,2	400	452	426	54	101	77.5	-81.81
C4,3	159	173	166	108	90	99	-40.36
D3,9	205	182	193.5	192	293	242.5	25.32
C1,1	140	178	159	39	23	31	-80.50
C13,2	187	156	171.5	90	107	98.5	-42.57
I3,3	114	116	115	48	40	44	-61.74
C3,3	130	115	122.5	182	200	191	55.92
C9,3	194	145	169.5	84	36	60	-64.60
I3,5	306	297	301.5	31	39	35	-88.39
D7,2	396	378	387	202	189	195.5	-49.48
D7,4	104	111	107.5	63	54	58.5	-45.58
I3,6	144	131	137.5	22	19	20.5	-85.09
I3,1	169	207	188	20	35	27.5	-85.37
I4,10	32	18	25	32	18	25	0.00
C6,8	308	203	255.5	22	22	22	-91.39
I14,2	223	209	216	68	84	76	-64.81
I3,2	273	236	254.5	108	103	105.5	-58.55
J12,5	0	0	0	0	0	0	0.00
C7,9	0	0	0	0	0	0	0.00
C9,8	174	236	205	23	20	21.5	-89.51

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ชุดทดลองที่ไม่มีน้ำดี ($\times 10^5/\text{ml}$)			ชุดทดลอง($\times 10^5/\text{ml}$)			ค่ากิจกรรม การทนต่อ น้ำดี %
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	
I7,6	198	204	201	33	35	34	-83.08
J3,6	307	284	295.5	79	114	96.5	-67.34
I7,3	212	270	241	64	51	57.5	-76.14
D6,3	0	0	0	0	0	0	0.00
I7,5	52	44	48	1	7	4	-91.67
D12,4	66	44	55	10	15	12.5	-77.27
J3,7	292	278	285	118	100	109	-61.75
I7,9	390	372	381	62	51	56.5	-85.17
I7,1	205	251	228	63	67	65	-71.49
I4,1	116	116	116	38	27	32.5	-71.98
D7,9	113	131	122	30	30	30	-75.41
I7,7	103	168	135.5	41	33	37	-72.69
I7,2	107	107	107	12	15	13.5	-87.38
I7,4	27	25	26	1	2	1.5	-94.23
D12,5	15	20	17.5	0	28	14	-20.00
D6,5	19	12	15.5	0	0	0	-100.00
I5,3	0	0	0	0	0	0	0.00
D13,2	67	81	74	35	23	29	-60.81
D6,1	0	0	0	0	0	0	0.00

ตารางผนวกที่ ค2 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *Samonella* Enteritidis DMST 17368 ของ
แบคทีเรียกรดแลกติก

ไอโซเลท	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (1)	กิจกรรมการ ยับยั้ง (1)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง(2)	กิจกรรมการ ยับยั้ง(2)	กิจกรรมการยับยั้ง เฉลี่ย
J9-2	20.0	3.17	19.0	3.33	3.25
D2-8	13.0	3.17	12.0	3.33	3.25
D2-6	19.0	2.17	20.0	2.00	2.08
D3-9	17.0	2.83	16.0	2.67	2.75
C4-4	18.0	3.00	17.0	3.17	3.08
I4-9	18.0	2.67	19.0	2.50	2.58
I4-8	18.0	3.33	17.0	3.17	3.25
D1-8	19.0	3.00	20.0	2.83	2.92
J6-1	16.0	3.00	15.0	3.17	3.08
D7-3	18.0	2.50	19.0	2.33	2.42
C3-3	15.0	3.00	14.0	2.83	2.92



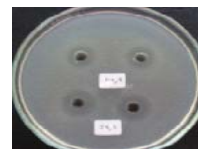
(ก)



(ข)



(ค)



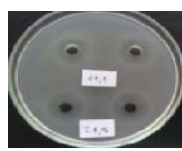
(ง)



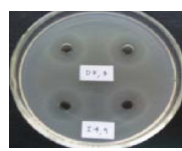
(จ)



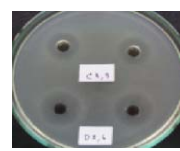
(ฉ)



(ช)



(ซ)



(ด)

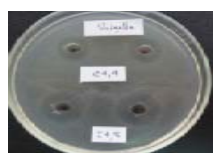
ภาพผนวกที่ ค1 การยับยั้งเชื้อ *Samonella* Enteritidis DMST 17368 ของ กลุ่มควบคุม (ก) บน D3-9
ล่าง C3-3 (ข) บน D1-8 ล่าง C4-4 (ค) บน D3-9 ล่าง J6-1(ง) บน D2-8ล่าง D1-8 (จ)
บน-ล่าง J9-2 (ฉ) บน C4-4 ล่าง I4-8 (ช) บน D7-3 ล่าง I4-9 (ซ) บน C3-3 ล่าง D2-6 (ด)

ตารางผนวกที่ ค3 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *Shigella dysenteriae* ของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง (1)	กิจกรรมการยับยั้ง (1)	เส้นผ่านศูนย์กลาง(2)	กิจกรรมการยับยั้ง(2)	กิจกรรมการยับยั้งเฉลี่ย
J9-2	17.0	2.83	16.0	2.67	2.75
D2-8	19.0	3.17	20.0	3.33	3.25
D2-6	17.0	2.83	18.0	3.00	2.92
D3-9	16.0	2.67	17.0	2.83	2.75
C4-4	20.0	3.33	17.0	2.83	3.08
I4-9	15.0	2.50	15.0	2.50	2.50
I4-8	20.0	3.33	19.0	3.17	3.25
D1-8	20.0	3.33	20.0	3.33	3.33
J6-1	19.0	3.17	21.0	3.50	3.33
D7-3	15.0	2.50	16.0	2.67	2.58
C3-3	16.0	2.67	15.0	2.50	2.58



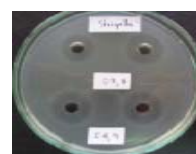
(ก)



(ข)



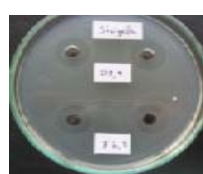
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)



(ช)

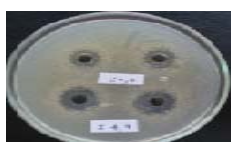
ภาพผนวกที่ ค2 การยับยั้งเชื้อ *Shigella dysenteriae* ของกลุ่มควบคุม (ก) บน D4-4 ล่าง I4-8 (ข) บน J6-1 ล่าง J9-2 (ค) บน D7-3 ล่าง I4-9 (ง) บน D2-6 ล่าง C3-3 (จ) บน D3-9 ล่าง J6-1 (ฉ) บน D2-8 ล่าง D1-8 (ช)

ตารางผนวกที่ ค4 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ของแบคทีเรีย
กรดแลกติก

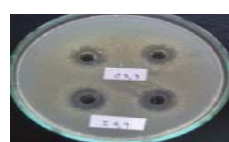
ไอโซเลท	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (1)	กิจกรรมการ ยับยั้ง (1)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง(2)	กิจกรรมการ ยับยั้ง(2)	กิจกรรมการยับยั้ง เฉลี่ย
J9-2	12.0	2.00	12.0	2.00	2.00
D2-8	15.0	2.50	13.0	2.17	2.33
D2-6	13.0	2.17	13.0	2.17	2.17
D3-9	11.0	1.83	11.0	1.83	1.83
C4-4	13.0	2.17	12.0	2.00	2.08
I4-9	13.0	2.17	12.0	2.00	2.08
I4-8	12.0	2.00	13.0	2.17	2.08
D1-8	18.0	3.00	18.0	3.00	3.00
J6-1	15.0	2.50	15.0	2.50	2.50
D7-3	12.0	2.00	12.0	2.00	2.00
C3-3	13.0	2.17	12.0	2.00	2.08



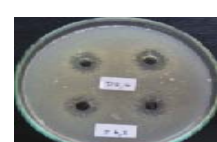
(ก)



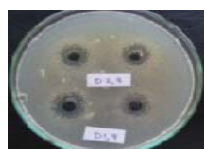
(ข)



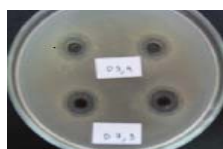
(ค)



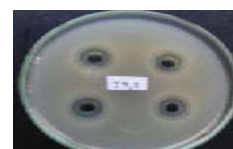
(ง)



(จ)



(ฉ)



(ช)

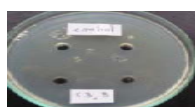
ภาพผนวกที่ ค3 การยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ของ กลุ่มควบคุม (ก) บน C4-4 ล่าง I4-8
(ข) บน C3-3 ล่าง I4-9 (ค) บน D2-6 ล่าง J6-1 (ง) บน D2-8 ล่าง D1-8 (จ) บน D3-9 ล่าง
D7-3 (ฉ) บน-ล่าง J9-2 (ช)

ตารางผนวกที่ ค6 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ของ
แบคทีเรียกรดแลกติก

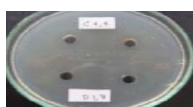
ไอโซเลต	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (1)	กิจกรรมการ ยับยั้ง (1)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง(2)	กิจกรรมการ ยับยั้ง(2)	กิจกรรมการยับยั้ง เฉลี่ย
J9-2	13.0	2.17	13.0	2.17	2.17
D2-8	13.0	2.17	14.0	2.33	2.25
D2-6	14.0	2.33	15.0	2.50	2.42
D3-9	12.0	2.00	13.0	2.17	2.08
C4-4	12.0	2.00	12.0	2.00	2.00
I4-9	11.0	1.83	11.0	1.83	1.83
I4-8	11.0	1.83	10.0	1.67	1.75
D1-8	12.0	2.00	12.0	2.00	2.00
J6-1	12.0	2.00	12.0	2.00	2.00
D7-3	11.0	1.83	12.0	2.00	1.92
C3-3	12.0	2.00	11.0	1.83	1.92

หมายเหตุ + ขอบเขตการยับยั้งชัดเจน

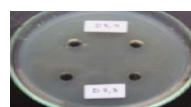
- ขอบเขตการยับยั้งไม่ชัดเจน



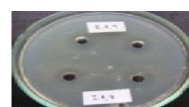
(ก)



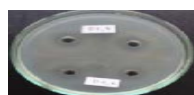
(ข)



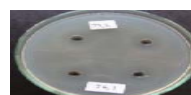
(ค)



(ง)



(จ)

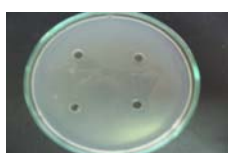


(ฉ)

ภาพผนวกที่ ค4 การยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ของ บณกลุ่มควบคุม ล้าง C3-3 (ก) บณ
C4-4 ล้าง D1-8 (ข) บณ D3-9 ล้าง D7-3 (ค) บณ I4-9 ล้าง I4-8 (ง) บณ D2-8 ล้าง D2-6 (จ)
บณ J9-2 ล้าง J6-1 (ฉ)

ตารางผนวกที่ ค6 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ของแบคทีเรีย
กรดแลกติก

ไอโซเลต	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (1)	กิจกรรมการ ยับยั้ง (1)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง(2)	กิจกรรมการ ยับยั้ง(2)	กิจกรรมการยับยั้ง เฉลี่ย
J9-2	1.20	0.20	1.20	0.20	0.20
D2-8	1.20	0.20	1.20	0.20	0.20
D2-6	1.20	0.20	1.20	0.20	0.20
D3-9	1.30	0.22	1.30	0.22	0.22
C4-4	1.70	0.28	1.50	0.25	0.27
I4-9	1.30	0.22	1.20	0.20	0.21
I4-8	1.50	0.25	1.60	0.27	0.26
D1-8	1.70	0.28	1.50	0.25	0.27
J6-1	1.50	0.25	1.50	0.25	0.25
D7-3	1.20	0.20	1.20	0.20	0.20
C3-3	1.10	0.18	1.20	0.20	0.19



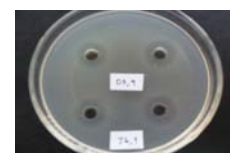
(ก)



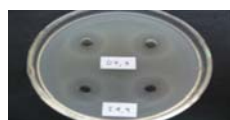
(ข)



(ค)



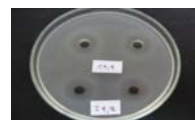
(ง)



(จ)



(ฉ)

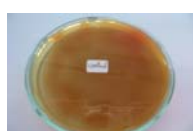


(ช)

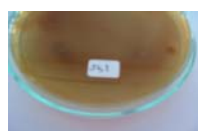
ภาพผนวกที่ ค5 การยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ของกลุ่มควบคุม (ก) บน D2-8 ล่าง D1-8
(ข) บน C3-3 ล่าง D2-6 (ค) บน D3-9 ล่าง J6-1 (ง) บน D7-3 ล่าง I4-9 (จ) J9-2 (ฉ)บน
C4-4 ล่าง I4-8 (ช)

ตารางผนวกที่ ค7 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 ของ
แบคทีเรียกรดแลกติก

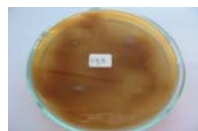
ไอ โซเลท	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (1)	ขนาด เซลล์ (1)	กิจกรรมการ ยับยั้ง (1)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง(2)	ขนาด เซลล์ (1)	กิจกรรมการ ยับยั้ง(2)	กิจกรรมการ ยับยั้งเฉลี่ย
J9-2	0.50	0.10	5.00	0.30	0.10	3.00	4.00
D2-8	1.00	0.10	10.00	1.20	0.10	12.00	11.00
D2-6	0.70	0.10	7.00	0.50	0.10	5.00	6.00
D3-9	0.20	0.20	1.00	0.30	0.20	1.50	1.25
C4-4	1.20	0.20	6.00	1.20	0.20	6.00	6.00
I4-9	0.50	0.15	3.33	0.70	0.15	4.67	4.00
I4-8	0.70	0.25	2.80	0.70	0.25	2.80	2.80
D1-8	1.20	0.30	4.00	1.20	0.30	4.00	4.00
J6-1	0.30	0.25	1.20	0.40	0.25	1.60	1.40
D7-3	0.70	0.20	3.50	0.80	0.20	4.00	3.75
C3-3	0.20	0.20	1.00	0.20	0.20	1.00	1.00



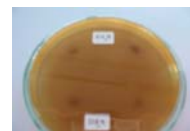
(ก)



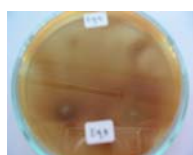
(ข)



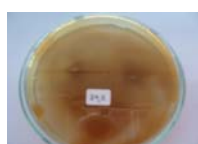
(ค)



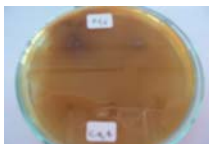
(ง)



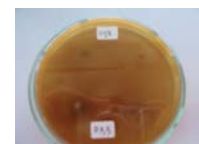
(จ)



(ฉ)



(ช)



(ซ)

ภาพผนวกที่ ค6 การยับยั้งเชื้อ *Campyrobacter jejuni* ATTC 33291 ของกลุ่มควบคุม (ก) J6-1 (ข)
C3-3 (ค) บน D2-8 ล่าง D3-9 (ง) บน I4-9 ล่าง I4-9 (จ) J9-2 (ฉ) บน D2-6 ล่าง C4-4 (ช)
บน D1-8 ล่าง D7-3 (ซ)

ตารางผนวกที่ ค8 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 2 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ผลการทดลองครั้งที่ 1 (log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			% เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	8.66	1.70	19.61	8.72	1.85	21.17	20.48
I4-9	7.79	1.30	16.71	7.76	0.00	0.00	8.36
J9-2	7.94	2.60	32.75	7.89	2.68	34.00	33.33
D2-6	8.14	0.00	0.00	8.14	0.00	0.00	0.00
D1-8	9.04	3.04	33.64	9.05	3.08	34.01	33.81
C3-3	9.20	4.11	44.67	9.15	4.17	45.60	45.15
D7-3	8.29	3.04	36.68	8.31	3.48	41.84	39.26
D3-9	8.04	4.47	55.57	8.00	4.46	55.72	55.61
D2-8	9.22	0.00	0.00	9.18	0.00	0.00	0.00
C4-4	4.67	0.00	0.00	4.73	0.00	0.00	0.00
J6-1	7.83	0.00	0.00	7.90	0.00	0.00	0.00

ตารางผนวกที่ ค9 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 3 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ผลการทดลองครั้งที่ 1(log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			% เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	9.58	3.25	33.94	9.59	3.23	33.63	33.82
I4-9	6.94	2.43	35.01	7.04	2.49	35.38	35.20
J9-2	8.81	7.72	87.65	8.79	7.59	86.41	87.05
D2-6	8.74	9.12	104.35	8.61	9.18	106.54	105.41
D1-8	9.56	10.38	108.66	9.57	10.35	108.21	108.47
C3-3	10.49	9.46	90.17	10.49	9.48	90.32	90.28
D7-3	8.05	7.08	87.91	8.10	7.11	87.82	87.87
D3-9	10.00	7.68	76.81	9.96	7.80	78.28	77.56
D2-8	8.66	8.76	101.16	8.64	8.84	102.26	101.73
C4-4	8.89	2.80	31.48	8.90	2.95	33.13	32.36
J6-1	8.58	6.40	74.57	8.41	6.54	77.77	76.15

ตารางผนวกที่ ค10 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 4 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอ โซเลข	ผลการทดลองครั้งที่ 1(log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			% เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	9.21	6.59	71.52	9.20	6.58	71.54	71.53
I4-9	8.00	5.49	68.64	7.71	5.49	71.25	69.94
J9-2	8.57	7.74	90.34	8.62	7.76	90.03	90.12
D2-6	8.74	7.89	90.29	8.90	7.99	89.76	89.92
D1-8	8.20	7.95	96.96	8.21	7.72	94.06	95.62
C3-3	9.90	7.18	72.46	9.99	7.18	71.86	72.16
D7-3	9.82	7.70	78.40	9.81	7.78	79.26	78.82
D3-9	8.04	6.48	80.55	8.08	6.49	80.35	80.40
D2-8	8.85	9.01	101.85	8.91	9.09	102.04	101.91
C4-4	7.59	6.45	84.93	7.68	6.49	84.51	84.69
J6-1	9.62	9.32	96.87	9.69	9.35	96.51	96.69

ตารางผนวกที่ ค11 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 5 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอ โซเลข	ผลการทดลองครั้งที่ 1(log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			% เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	8.85	6.88	77.73	8.81	6.79	76.99	77.35
I4-9	8.38	6.73	80.34	8.41	6.57	78.05	79.20
J9-2	8.89	6.00	67.52	9.04	5.70	63.03	65.55
D2-6	7.90	8.01	101.34	8.08	7.99	98.81	100.00
D1-8	8.61	8.89	103.18	8.60	8.81	102.45	102.81
C3-3	8.03	7.84	97.63	7.99	7.88	98.67	98.13
D7-3	8.66	7.00	80.81	8.70	6.78	77.92	79.49
D3-9	10.85	8.76	80.81	10.95	8.68	79.25	80.00
D2-8	10.23	9.10	89.01	10.22	9.07	88.79	88.94
C4-4	7.63	7.62	99.87	7.74	7.58	97.93	98.83
J6-1	8.74	8.18	93.64	8.81	8.13	92.29	93.04

ตารางผนวกที่ ค12 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 6 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอ โซเลข	ผลการทดลองครั้งที่ 1(log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			% เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	8.28	8.20	99.07	8.31	8.18	98.55	98.79
I4-9	8.16	7.59	93.05	8.22	7.64	92.96	93.00
J9-2	8.16	7.59	93.01	8.23	7.64	92.84	92.93
D2-6	8.01	8.18	102.09	8.03	8.06	100.34	101.25
D1-8	7.94	8.07	101.56	8.03	8.07	100.48	101.00
C3-3	8.79	8.57	97.45	8.70	8.54	98.22	97.83
D7-3	10.83	7.79	71.98	10.79	7.66	71.00	71.51
D3-9	9.66	10.17	105.28	9.65	10.14	105.01	105.18
D2-8	10.64	7.60	71.42	10.72	7.64	71.27	71.28
C4-4	8.60	7.48	86.92	8.65	7.58	87.60	87.25
J6-1	7.92	7.96	100.44	8.02	7.96	99.34	99.87

ตารางผนวกที่ ค13 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 7 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอ โซเลข	ผลการทดลองครั้งที่ 1(log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			% เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	9.09	10.04	110.42	9.10	9.89	108.60	109.56
I4-9	9.01	6.48	71.90	9.03	6.30	69.78	70.84
J9-2	8.24	7.00	84.92	8.18	7.08	86.55	85.75
D2-6	8.15	8.04	98.68	8.17	8.08	98.96	98.77
D1-8	8.02	7.85	97.86	8.05	7.97	98.95	98.38
C3-3	8.74	8.79	100.51	8.78	8.80	100.24	100.34
D7-3	8.79	7.62	86.70	8.79	7.71	87.73	87.26
D3-9	9.87	7.63	77.35	9.79	7.49	76.50	77.01
D2-8	8.04	9.25	115.04	8.11	9.20	113.44	114.23
C4-4	7.38	7.72	104.66	7.56	7.75	102.54	103.48
J6-1	7.83	7.00	89.44	7.85	7.04	89.76	89.54

ตารางผนวกที่ ค14 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่ pH 8 เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ผลการทดลองครั้งที่ 1(log CFU/ml)			ผลการทดลองครั้งที่ 2(log CFU/ml)			%เฉลี่ย
	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	0 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	%การอยู่รอด	
I4-8	8.30	7.76	93.55	8.30	7.71	92.85	93.25
I4-9	8.08	7.15	88.49	8.20	7.08	86.37	87.43
J9-2	8.04	6.05	75.27	8.04	6.06	75.32	75.25
D2-6	9.91	10.43	105.23	9.83	10.36	105.45	105.37
D1-8	9.05	10.32	114.07	9.07	10.31	113.67	113.80
C3-3	8.80	10.49	119.23	8.78	10.44	118.98	119.11
D7-3	8.11	8.08	99.57	8.16	8.11	99.42	99.51
D3-9	8.18	7.85	95.92	8.13	7.84	96.38	96.08
D2-8	9.90	9.01	91.06	9.88	9.12	92.34	91.71
C4-4	8.85	6.93	78.34	8.86	6.98	78.78	78.53
J6-1	8.05	7.56	93.92	8.02	7.59	94.64	94.27

ตารางผนวกที่ ค15 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที (Log CFU/ml)

เชื้อ	0 °C		20 °C		40 °C		80 °C		120 °C	
D1-8	12.08	12.11	11.40	11.42	11.41	11.35	10.58	10.59	9.28	9.24
D2-8	10.51	10.54	10.40	10.42	9.54	9.56	9.29	9.14	8.60	8.42
C3-3	12.60	12.60	11.54	11.58	10.78	10.78	9.69	9.69	9.69	9.69
C4-4	10.52	10.71	8.54	8.47	7.99	7.99	6.47	6.39	5.39	5.41
J6-1	8.63	8.64	8.77	8.81	10.04	10.09	8.95	9.02	9.06	9.08
D2-6	11.70	11.70	10.54	10.56	10.46	10.49	10.34	10.40	9.53	9.54
D7-3	11.13	11.15	10.08	9.90	9.91	9.97	9.46	9.46	8.60	8.60
D3-9	11.04	11.00	10.99	10.95	10.25	10.15	10.20	10.19	10.02	10.09
I4-8	11.25	11.15	9.15	9.13	10.00	10.00	9.62	9.62	9.00	8.97
I4-9	8.83	8.90	9.50	9.57	8.66	8.69	8.79	8.78	8.54	8.47
J9-2	11.52	11.51	10.47	10.47	10.20	10.14	10.07	10.07	9.79	10.01

ตารางผนวกที่ ค16 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที(Log CFU/ml)

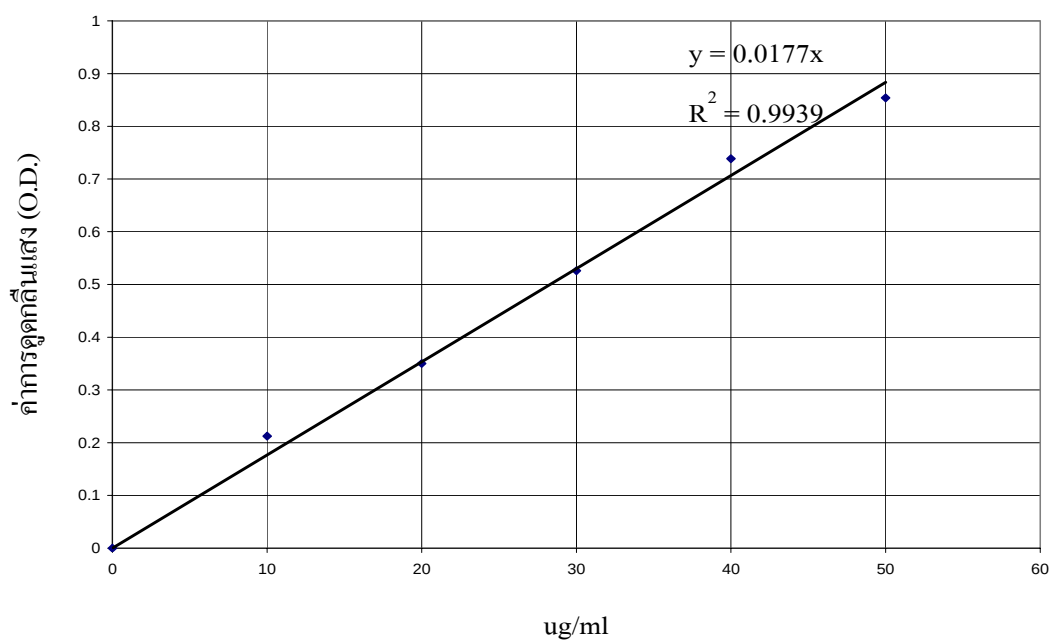
เชื้อ	0 °		20 °C		40 ° C		80 ° C		120 °	
D1-8	11.59	11.60	8.00	7.90	5.69	5.82	5.50	5.60	5.01	5.02
D2-8	11.78	11.78	8.46	8.49	4.99	5.10	5.72	4.60	4.30	4.32
C3-3	11.70	11.70	8.47	8.47	6.02	6.12	5.83	5.84	4.69	4.72
C4-4	8.60	8.67	4.30	0.00	2.47	2.69	0.00	0.00	0.00	0.00
J6-1	8.73	8.63	5.60	5.69	4.17	4.04	3.47	3.60	3.23	3.23
D2-6	11.67	11.69	7.85	7.91	6.32	6.29	5.72	5.82	4.84	4.81
D7-3	7.95	8.18	6.74	6.69	4.91	4.94	4.62	4.71	0.00	1.77
D3-9	10.28	10.82	7.65	7.67	6.81	6.70	4.93	4.86	3.23	3.14
I4-8	8.71	8.69	6.96	6.99	4.79	4.77	2.62	2.91	2.54	2.60
I4-9	8.60	8.57	7.00	7.04	5.02	5.00	4.30	4.43	3.81	3.86
J9-2	8.87	8.90	5.46	5.46	5.10	5.07	4.90	4.92	4.65	4.72

ตารางผนวกที่ ค17 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 0, 20, 40, 80 และ 120 วินาที(Log CFU/ml)

เชื้อ	0 ° C		20 ° C		40 ° C		80 ° C		120 ° C	
D1-8	12.08	12.11	11.40	11.42	11.40	11.35	10.58	10.59	9.28	9.24
D2-8	10.51	10.54	10.40	10.42	9.54	9.56	9.29	9.14	8.60	8.72
C3-3	12.60	12.60	11.54	11.58	10.77	10.78	9.69	9.69	9.69	9.69
C4-4	10.52	10.71	8.54	8.47	7.99	7.99	6.47	6.39	5.39	5.41
J6-1	8.63	8.64	8.77	8.81	10.04	10.09	8.95	9.02	9.06	9.08
D2-6	11.70	11.70	10.54	10.56	10.46	10.49	10.34	10.40	9.53	9.54
D7-3	11.15	11.13	10.08	9.90	9.91	9.97	9.46	9.46	8.60	8.60
D3-9	11.00	11.04	10.99	10.95	10.25	10.15	10.20	10.19	10.02	10.09
I4-8	11.15	11.25	9.15	9.13	10.00	10.00	9.62	9.62	9.00	8.97
I4-9	8.83	8.90	9.50	9.57	8.66	8.69	8.78	8.79	8.54	8.47
J9-2	11.52	11.51	10.47	10.47	10.20	10.14	10.07	10.07	9.79	10.01

ตารางผนวกที่ ค18 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก

ไอโซเลท	ค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)			
	1		2	
I4-8	0.269	0.262	0.302	0.267
D1-8	0.485	0.449	0.481	0.466
J6-1	0.140	0.142	0.134	0.114
C3-3	0.414	0.423	0.393	0.375
C4-4	0.163	0.180	0.163	0.172
D7-3	0.139	0.147	0.184	0.138
I4-9	0.178	0.227	0.194	0.194
J9-2	0.316	0.398	0.346	0.362
D2-6	0.217	0.252	0.232	0.250
C3-3	0.227	0.209	0.214	0.228
D2-8	0.279	0.289	0.322	0.369
D3-9	0.227	0.209	0.214	0.228



ภาพผนวกที่ ค7 กราฟมาตรฐานของ taurine

ตารางผนวกที่ ค19 ผลการทดสอบการยืดยึดกับเยื่อผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลกติก

ไอโซเลท	จำนวนเซลล์ที่ไม่ยืดยึดกับผนังลำไส้ (LogCFU/ml)						จำนวนเซลล์ที่ยืดยึดกับผนังลำไส้ (LogCFU/ml)					
	1		2		3		1		2		3	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
I4-8	5.18	5.11	5.63	5.49	5.06	5.06	2.85	2.00	3.60	3.54	3.60	3.00
C3-3	6.03	6.14	5.78	5.86	6.38	6.41	3.95	4.01	3.38	3.36	4.09	4.09
J6-1	5.48	5.52	6.23	6.20	6.08	6.08	2.78	2.30	5.09	5.05	4.86	4.86
C4-4	5.91	5.96	6.12	6.16	6.54	6.55	2.60	3.08	3.52	3.40	5.16	5.16
D7-3	5.65	5.76	6.23	6.26	6.05	6.05	3.72	3.76	4.60	4.78	4.48	4.49
D2-6	5.95	5.90	6.00	5.99	6.23	6.28	5.08	5.23	4.04	4.07	5.15	5.18
J9-2	6.38	6.36	5.91	5.67	6.16	6.17	3.56	3.51	3.04	3.48	3.92	3.93
I4-9	5.72	5.75	5.95	6.04	5.63	5.74	3.80	3.78	4.08	4.11	3.83	3.72
D1-8	6.47	6.46	6.41	6.45	6.59	6.60	4.62	4.48	4.88	4.98	5.10	5.08
D3-9	5.95	5.96	5.76	5.90	5.91	5.86	3.90	3.70	4.00	3.91	3.08	3.04
D2-8	5.84	5.87	6.38	6.34	6.09	6.17	4.74	4.78	4.63	4.77	4.65	4.32

Query	76	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC	135
Sbjct	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC	60
Query	136	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTTGACACCTGATTGATTTTGGTTGCCAACGAGTGG	195
Sbjct	61	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTTGACACCTGATTGATTTTGGTTGCCAACGAGTGG	120
Query	196	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAAACA	255
Sbjct	121	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAAACA	180
Query	256	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCG	315
Sbjct	181	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCG	240
Query	316	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	375
Sbjct	241	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	300
Query	376	GCGCATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	435
Sbjct	301	GCGCATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	360
Query	436	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	495
Sbjct	361	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	420
Query	496	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	555
Sbjct	421	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	480
Query	556	CGTATGAGAGTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTAC	615
Sbjct	481	CGTATGAGAGTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTAC	540
Query	616	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	675
Sbjct	541	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	600
Query	676	GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	735
Sbjct	601	GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	660
Query	736	ATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGG	795
Sbjct	661	ATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGG	720
Query	796	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	855
Sbjct	721	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	780
Query	856	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	915
Sbjct	781	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	840
Query	916	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	975
Sbjct	841	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	900

ภาพผนวกที่ ๑๘ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D1-8 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus fermentum* MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	976	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	1035
Sbjct	901	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACCCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	960
Query	1036	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1095
Sbjct	961	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1020
Query	1096	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1155
Sbjct	1021	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1080
Query	1156	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1215
Sbjct	1081	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1140
Query	1216	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1275
Sbjct	1141	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1200
Query	1276	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1335
Sbjct	1201	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1260
Query	1336	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1395
Sbjct	1261	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1320
Query	1396	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1455
Sbjct	1321	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1380
Query	1456	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1509
Sbjct	1381	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1434

ภาพผนวกที่ ค8 (ต่อ)

Query	76	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC	135
Sbjct	1		60
Query	136	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCCTGCACCTGATTGATTTGGTTGCCAACGAGTG	195
Sbjct	61		120
Query	196	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAACA	255
Sbjct	121		180
Query	256	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCG	315
Sbjct	181		240
Query	316	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	375
Sbjct	241		300
Query	376	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	435
Sbjct	301		360
Query	436	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	495
Sbjct	361		420
Query	496	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	555
Sbjct	421		480
Query	556	CGTATGAGAGTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC	615
Sbjct	481		540
Query	616	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	675
Sbjct	541		600
Query	676	GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	735
Sbjct	601		660
Query	736	ATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGG	795
Sbjct	661		720
Query	796	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	855
Sbjct	721		780
Query	856	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	915
Sbjct	781		840
Query	916	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	975
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ ๑๙ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต D3-9 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus fermentum* MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	976	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	1035
Sbjct	901	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACCCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	960
Query	1036	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1095
Sbjct	961	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1020
Query	1096	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1155
Sbjct	1021	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1080
Query	1156	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1215
Sbjct	1081	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1140
Query	1216	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1275
Sbjct	1141	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1200
Query	1276	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1335
Sbjct	1201	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1260
Query	1336	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGT	1395
Sbjct	1261	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGT	1320
Query	1396	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1455
Sbjct	1321	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1380
Query	1456	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1509
Sbjct	1381	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1434

ภาพผนวกที่ ๙ (ต่อ)

Query	50	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTCCTAATACATGCAAGTCGAAC	109
Sbjct	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTCCTAATACATGCAAGTCGAAC	60
Query	110	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTTGACCTGATTGATTTGGTTGCCAACGAGTGG	169
Sbjct	61	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTTGACCTGATTGATTTGGTTGCCAACGAGTGG	120
Query	170	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAAACA	229
Sbjct	121	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAAACA	180
Query	230	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTGCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCG	289
Sbjct	181	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTGCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCG	240
Query	290	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	349
Sbjct	241	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	300
Query	350	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	409
Sbjct	301	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	360
Query	410	CATACCCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	469
Sbjct	361	CACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	420
Query	470	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	529
Sbjct	421	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	480
Query	530	CGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAAGTCACGGCTAACTAC	589
Sbjct	481	CGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACAGAAAAGTCACGGCTAACTAC	540
Query	590	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAA	649
Sbjct	541	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAA	600
Query	650	GAGAGTGCAAGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	709
Sbjct	601	GAGAGTGCAAGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	660
Query	710	ATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGG	769
Sbjct	661	ATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGG	720
Query	770	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	829
Sbjct	721	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	780
Query	830	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	889
Sbjct	781	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	840
Query	890	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	949
Sbjct	841	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	900

ภาพผนวกที่ ค10 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C3-3 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus fermentum* MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	950	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	1009
Sbjct	901	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACCCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	960
Query	1010	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1069
Sbjct	961	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1020
Query	1070	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1129
Sbjct	1021	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1080
Query	1130	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1189
Sbjct	1081	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1140
Query	1190	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1249
Sbjct	1141	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1200
Query	1250	GAGGAAGGTGGGGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1309
Sbjct	1201	GAGGAAGGTGGGGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1260
Query	1310	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1369
Sbjct	1261	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1320
Query	1370	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1429
Sbjct	1321	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1380
Query	1430	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1483
Sbjct	1381	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1434

ภาพผนวกที่ ค10 (ต่อ)

Query	48	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC	107
Sbjct	1		60
Query	108	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTGCACCTGATTGATTTGGTTGCCAACGAGTG	167
Sbjct	61		120
Query	168	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAACA	227
Sbjct	121		180
Query	228	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCG	287
Sbjct	181		240
Query	288	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	347
Sbjct	241		300
Query	348	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	407
Sbjct	301		360
Query	408	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	467
Sbjct	361		420
Query	468	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	527
Sbjct	421		480
Query	528	CGTATGAGAGTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC	587
Sbjct	481		540
Query	588	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	647
Sbjct	541		600
Query	648	GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	707
Sbjct	601		660
Query	708	ATCGGAACTGGATAACTGGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGG	767
Sbjct	661		720
Query	768	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	827
Sbjct	721		780
Query	828	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	887
Sbjct	781		840
Query	888	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	947
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ ค11 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท J9-2(เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของยีน *Lactobacillus fermentum* MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	948	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	1007
Sbjct	901	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACCCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	960
Query	1008	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1067
Sbjct	961	CACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1020
Query	1068	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1127
Sbjct	1021	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1080
Query	1128	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1187
Sbjct	1081	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1140
Query	1188	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1247
Sbjct	1141	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1200
Query	1248	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1307
Sbjct	1201	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1260
Query	1308	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1367
Sbjct	1261	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1320
Query	1368	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1427
Sbjct	1321	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1380
Query	1428	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1481
Sbjct	1381	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA	1434

ภาพผนวกที่ ค11 (ต่อ)

Query	48	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC	107
Sbjct	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC	60
Query	108	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTTGCACCTGATTGATTTGGTTGCCAACGAGTG	167
Sbjct	61	GCGTTGGCCCAATTGATTGACGGTGCTTGCACCTGATTGATTTGGTTGCCAACGAGTG	120
Query	168	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAACA	227
Sbjct	121	CGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACATTTGGAACA	180
Query	228	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCG	287
Sbjct	181	GATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAGATGGCTTCTCG	240
Query	288	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	347
Sbjct	241	CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA	300
Query	348	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	407
Sbjct	301	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCC	360
Query	408	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	467
Sbjct	361	CACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	420
Query	468	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	527
Sbjct	421	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACA	480
Query	528	CGTATGAGAGTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC	587
Sbjct	481	CGTATGAGAGTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC	540
Query	588	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	647
Sbjct	541	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	600
Query	648	GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	707
Sbjct	601	GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGC	660
Query	708	ATCGGAACTGGATAACTGGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGG	767
Sbjct	661	ATCGGAACTGGATAACTGGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGG	720
Query	768	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	827
Sbjct	721	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGAC	780
Query	828	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	887
Sbjct	781	GCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	840
Query	888	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	947
Sbjct	841	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	900

ภาพผนวกที่ ๑๒ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C4-4 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus fermentum* MD-9 (Accession No AY373589.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	948	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	1007
Sbjct	901	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACCCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	960
Query	1008	CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1067
Sbjct	961	CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1020
Query	1068	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1127
Sbjct	1021	ACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG	1080
Query	1128	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1187
Sbjct	1081	CATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1140
Query	1188	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1247
Sbjct	1141	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1200
Query	1248	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1307
Sbjct	1201	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1260
Query	1308	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1367
Sbjct	1261	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAACCGT	1320
Query	1368	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1427
Sbjct	1321	TCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1380
Query	1428	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA	1481
Sbjct	1381	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA	1434

ภาพผนวกที่ ค12 (ต่อ)

Query	70	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAAT	129
Sbjct	1		60
Query	130	GCTTGCATTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC	189
Sbjct	61		120
Query	190	CTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGC	249
Sbjct	121		180
Query	250	ATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAA	309
Sbjct	181		240
Query	310	CTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT	369
Sbjct	241		300
Query	370	CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT	429
Sbjct	301		360
Query	430	TCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATC	489
Sbjct	361		420
Query	490	GTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAAGTTCATTTCGATGACGGTA	549
Sbjct	421		480
Query	550	TCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA	609
Sbjct	481		540
Query	610	GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA	669
Sbjct	541		600
Query	670	AAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAGACTTGAAGTGCAGAAGAGG	729
Sbjct	601		660
Query	730	AGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGCGC	789
Sbjct	661		720
Query	790	AAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGA	849
Sbjct	721		780
Query	850	TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC	909
Sbjct	781		840
Query	910	CCTTCAGTGCCGACGTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG	969
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ ค13 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-6 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

Query	970	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	1029
Sbjct	901	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	960
Query	1030	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1089
Sbjct	961	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1020
Query	1090	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGATGTT	1149
Sbjct	1021	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGATGTT	1080
Query	1150	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTGTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1209
Sbjct	1081	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTGTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1140
Query	1210	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1269
Sbjct	1141	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1200
Query	1270	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1329
Sbjct	1201	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1260
Query	1330	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1389
Sbjct	1261	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1320
Query	1390	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1449
Sbjct	1321	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1380
Query	1450	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1470
Sbjct	1381	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1401

ภาพผนวกที่ ค13 (ต่อ)

Query	69	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAAT	128
Sbjct	1		60
Query	129	GCTTGCAATTTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC	188
Sbjct	61		120
Query	189	CTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGC	248
Sbjct	121		180
Query	249	ATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAA	308
Sbjct	181		240
Query	309	CTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT	368
Sbjct	241		300
Query	369	CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT	428
Sbjct	301		360
Query	429	TCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATC	488
Sbjct	361		420
Query	489	GTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTA	548
Sbjct	421		480
Query	549	TCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA	608
Sbjct	481		540
Query	609	GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA	668
Sbjct	541		600
Query	669	AAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAGACTTGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGG	728
Sbjct	601		660
Query	729	AGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAAAACAGTGCGC	788
Sbjct	661		720
Query	789	AAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAAGTTTCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGA	848
Sbjct	721		780
Query	849	ATAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC	908
Sbjct	781		840
Query	909	CCTTCAGTGCCGCGAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG	968
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ ๑๑ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต D7-3 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของยีน *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	969	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	1028
Sbjct	901	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	960
Query	1029	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1088
Sbjct	961	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1020
Query	1089	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGATGTT	1148
Sbjct	1021	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGATGTT	1080
Query	1149	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTGTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1208
Sbjct	1081	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTGTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1140
Query	1209	TCTGGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1268
Sbjct	1141	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1200
Query	1269	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1328
Sbjct	1201	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1260
Query	1329	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1388
Sbjct	1261	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1320
Query	1389	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1448
Sbjct	1321	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1380
Query	1449	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1469
Sbjct	1381	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1401

ภาพผนวกที่ ค14 (ต่อ)

Query	71	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAAT	130
Sbjct	1		60
Query	131	GCTTGCAATTCATCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC	190
Sbjct	61		120
Query	191	CTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGC	250
Sbjct	121		180
Query	251	ATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAA	310
Sbjct	181		240
Query	311	CTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACGTAGAGGTTGAT	370
Sbjct	241		300
Query	371	CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT	430
Sbjct	301		360
Query	431	TCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATC	490
Sbjct	361		420
Query	491	GTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTA	550
Sbjct	421		480
Query	551	TCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA	610
Sbjct	481		540
Query	611	GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA	670
Sbjct	541		600
Query	671	AAGCCTTCGGCTTAACCAGAGTAGTGCATTGGAACCTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGG	730
Sbjct	601		660
Query	731	AGAGTGGAACCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGCGC	790
Sbjct	661		720
Query	791	AAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGTTTCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGA	850
Sbjct	721		780
Query	851	TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC	910
Sbjct	781		840
Query	911	CCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG	970
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ ค15 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต J6-1 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	971	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	1030
Sbjct	901	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	960
Query	1031	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1090
Sbjct	961	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1020
Query	1091	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGATGTT	1150
Sbjct	1021	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGATGTT	1080
Query	1151	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1210
Sbjct	1081	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1140
Query	1211	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1270
Sbjct	1141	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1200
Query	1271	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1330
Sbjct	1201	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1260
Query	1331	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1390
Sbjct	1261	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1320
Query	1391	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1450
Sbjct	1321	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1380
Query	1451	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1471
Sbjct	1381	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1401

ภาพผนวกที่ ค15 (ต่อ)

Query	95	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAAT	154
Sbjct	1		60
Query	155	GCTTGCAATTCACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC	214
Sbjct	61		120
Query	215	CTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGC	274
Sbjct	121		180
Query	275	ATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAA	334
Sbjct	181		240
Query	335	CTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT	394
Sbjct	241		300
Query	395	CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT	454
Sbjct	301		360
Query	455	TCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATC	514
Sbjct	361		420
Query	515	GTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTA	574
Sbjct	421		480
Query	575	TCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA	634
Sbjct	481		540
Query	635	GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA	694
Sbjct	541		600
Query	695	AAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAGCTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGG	754
Sbjct	601		660
Query	755	AGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGCGC	814
Sbjct	661		720
Query	815	AAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGA	874
Sbjct	721		780
Query	875	TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC	934
Sbjct	781		840
Query	935	CCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG	994
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท I4-8 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	995	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	1054
Sbjct	901	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG	960
Query	1055	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1114
Sbjct	961	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1020
Query	1115	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT	1174
Sbjct	1021	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT	1080
Query	1175	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTTGTCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1234
Sbjct	1081	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTTGTCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1140
Query	1235	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1294
Sbjct	1141	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1200
Query	1295	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1354
Sbjct	1201	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1260
Query	1355	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1414
Sbjct	1261	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1320
Query	1415	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1474
Sbjct	1321	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1380
Query	1475	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1495
Sbjct	1381	CCTTGTACACACCGCCCGTCA	1401

ภาพผนวกที่ ค16 (ต่อ)

Query	70	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAAT	129
Sbjct	1		60
Query	130	GCTTGCATTTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGC	189
Sbjct	61		120
Query	190	CTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGC	249
Sbjct	121		180
Query	250	ATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAA	309
Sbjct	181		240
Query	310	CTAGTTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT	369
Sbjct	241		300
Query	370	CTAGTTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT	429
Sbjct	301		360
Query	430	CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT	489
Sbjct	361		420
Query	490	TCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATC	549
Sbjct	421		480
Query	550	GTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTCGATGACGGTA	609
Sbjct	481		540
Query	610	TCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA	669
Sbjct	541		600
Query	670	GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGA	729
Sbjct	601		660
Query	730	AAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGG	789
Sbjct	661		720
Query	790	AGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCG	849
Sbjct	721		780
Query	850	AAAGCGGCTCTCTGCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGA	909
Sbjct	781		840
Query	910	TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC	969
Sbjct	841		900

ภาพผนวกที่ ค17 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท I4-9 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของยีน *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* JCM1230 (Accession No AY138579.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

Query	970	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG	1029
Sbjct	901	AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG	960
Query	1030	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1089
Sbjct	961	CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGCTTTC	1020
Query	1090	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGAGATGTT	1149
Sbjct	1021	CCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGAGATGTT	1080
Query	1150	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1209
Sbjct	1081	GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTGTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC	1140
Query	1210	TCTGGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1269
Sbjct	1141	TCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC	1200
Query	1270	CCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1329
Sbjct	1201	CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGC	1260
Query	1330	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1389
Sbjct	1261	GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA	1320
Query	1390	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1449
Sbjct	1321	CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG	1380
Query	1450	CCTTGACACACCGCCCGTCA	1470
Sbjct	1381	CCTTGACACACCGCCCGTCA	1401

ภาพผนวกที่ ค17 (ต่อ)

Query	49	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTAC	108
Sbjct	1	AGAGTTTGATNNTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTAC	60
Query	109	GCACTGGCCCACTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATTACCAAGTGAGTG	168
Sbjct	61	GCACTGGCCCACTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTG	120
Query	169	GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGGATAACATTGGAAAC	228
Sbjct	121	GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGGATAACATTGGAAAC	180
Query	229	AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCTGCATGGCTTTTGTGGTAAAGATGGCTTTGG	288
Sbjct	181	AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCGCATGGCTTTTGTGGTAAAGATGGCTTTGG	240
Query	289	CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA	348
Sbjct	241	CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA	300
Query	349	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAGACACGGTC	408
Sbjct	301	GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAGACACGGTC	360
Query	409	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	468
Sbjct	361	CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG	420
Query	469	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG	528
Sbjct	421	CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG	480
Query	529	TGCGTGAGAGTAAGTGTTCACGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTAC	588
Sbjct	481	TGCGTGAGAGTAAGTGTTCACGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTAC	540
Query	589	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	648
Sbjct	541	GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA	600
Query	649	GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC	708
Sbjct	601	GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC	660
Query	709	ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGG	768
Sbjct	661	ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGG	720
Query	769	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC	828
Sbjct	721	AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC	780
Query	829	GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	888
Sbjct	781	GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA	840
Query	889	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	948
Sbjct	841	AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA	900

ภาพผนวกที่ 18 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท D2-8 (เส้นบน) มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของยีน *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 T (Accession No X76328.1) (เส้นล่าง) เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

Query	949	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	1008
Sbjct	901	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG	960
Query	1009	CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1068
Sbjct	961	CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1026
Query	1069	ACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG	1128
Sbjct	1021	ACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG	1086
Query	1129	CATGGTCGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACC	1188
Sbjct	1081	CATGGTCGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACC	1146
Query	1189	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1248
Sbjct	1141	CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG	1206
Query	1249	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1308
Sbjct	1201	GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC	1266
Query	1309	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT	1368
Sbjct	1261	TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT	1326
Query	1369	TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1428
Sbjct	1321	TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1386
Query	1429	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA	1482
Sbjct	1381	GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA	1434

ภาพผนวกที่ ค18 (ต่อ)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปรีดา ตันจักร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดตาก
ประวัติการศึกษา	ระดับประถมศึกษา โรงเรียนเทศบาลวัดมณีไพโรสถณ์ จ.ตาก (ปี 2533-2535) ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนสรรพวิทยาคม จ.ตาก (ปี 2536-2541) ระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ (ปี 2542-2545) ระดับปริญญาโท วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ (ปี 2546-2550)
ผลงานทางวิชาการ	Tanjak, P., K. Pilasombat and S. Nitisinprasert. 2006. Selection of lactic acid bacteria from chicken intestine by probiotic characteristics. The 18th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology: Benefits & Bioethics. November 2-3, 2006. The Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand. 173p.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์