บทบาทของโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

วันดี ศิริโชคชัชวาล[1] ธงชัย เฉลิมชัยกิจ[1] และ ณุวีร์ ประภัสระกูล[1*]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330 ประเทศไทย

*ผู้รับผิดชอบบทความ; E-mail: Nuvee.P@chula.ac.th

Received 4 July 2012; received in revised form 13 September 2012; accepted 1 October 2012

บทคัดย่อ

ความนิยมของการใช้โปรไบโอติกเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพหรือเพื่อรักษาโรคบางชนิดในคน ทำให้เกิดการขยายขอบเขตของการใช้โปรไบโอติกมาถึงในสัตว์ปศุสัตว์ที่เลี้ยงในระบบอุตสาหกรรม ขนาดกลางและขนาดใหญ่เพื่อมุ่งหวังให้สามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโต การใช้โปรไบโอติกเสริมไปในอาหารของสัตว์เชื่อว่าสามารถส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและช่วยป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค โดยกล่าวว่าโปรไบโอติกมีความสามารถที่จะแย่งอาหาร และพื้นที่ยึดเกาะของเชื้อก่อโรคเหล่านั้น หรือความสามารถในการผลิตสารที่เป็นพิษต่อเชื้อก่อโรค และความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ที่รับโปรไบโอติก บทวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อจะแสดงให้เห็นถึงการทำงานของโปรไบโอติกในสัตว์ที่ได้รับ โดยเน้นการใช้โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นหลักและความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารเสริมเพื่อทดแทนสารยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

คำสำคัญ: โปรไบโอติก สุกร อาหารเสริม คุณลักษณะสุขภาพ

บทนำ

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของยาปฏิชีวนะ คือความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในปศุสัตว์ทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เลี้ยงในระบบอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดใหญ่ ซึ่งในภายหลังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับเชื้อดื้อยาที่พบในผลิตภัณฑ์จากสัตว์เพิ่มขึ้น และยังพบปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์เหล่านั้นอีกด้วยจนกระทั่งในปี พ.ศ.2549 สหพันธ์ยุโรปได้ถอนการอนุญาตใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น avoparcin virginiamycin bacitracin spiramycin และ tylsin ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ (Casewell *et al*., 2003; Castanon, 2007; Fuller, 1989) สำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรซึ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางในระบบการเลี้ยงมีจุดประสงค์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเพื่อลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อก่อโรคที่อาจเกิดขึ้นในวงจรการผลิต การถอนใบอนุญาตดังกล่าวจึงส่งผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนอัตราการตายของลูกสุกรหย่านมซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีความเสี่ยงต่อการตายสูง (Kenny *et al*., 2011) ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามในการหาสิ่งทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อจะช่วยลดอัตราการสูญเสียในสัตว์ และไม่ก่อให้เกิดผลเสียดังที่กล่าวมาข้างต้น โปรไบโอติก (probiotics) ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโต โดยที่การให้จุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือโปรไบโอติกในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้ที่ได้รับหรือโฮสต์ (host) (WHO and FAO, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า พรีไบโอติก (prebiotics) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารที่โฮสต์ไม่สามารถย่อยสลายได้แต่ส่งผลดีต่อโฮสต์ เนื่องจากพรีไบโอติกเลือกกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ (Gibbson and Roberfroid, 1995) และซินไบโอติก (synbiotics) เป็นการใช้โปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกในการส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์ ในปัจจุบันการเลือกใช้กลุ่มทางเลือกทดแทนยาปฏิชีวนะในการเร่งการเจริญเติบโตเริ่มได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย ซึ่งในบทความนี้ต้องการเสนอแง่มุมความเป็นไปได้ในการใช้โปรไบโอติกแทนสารปฏิชีวนะเร่งการเจริญเติบโตในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร โดยต้องการแสดงให้เห็นถึงความสามารถและประสิทธิผลของโปรไบโอติกต่อโฮสต์

ทางเลือกทดแทนสารปฏิชีวนะเร่งการเจริญเติบโต

โปรไบโอติก (Probiotic)

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารมีประโยชน์ต่อการรักษาความสมดุลย์ในระบบการทำงานของทางเดินอาหาร การย่อยอาหาร การขับถ่ายและส่งผลดีถึงสุขภาพโดยรวม ของโฮสต์คุณสมบัติโดยทั่วไปของโปรไบโอติกคือความสามารถทนกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีในลำไส้ ทั้งยังสามารถสารต่อต้านเชื้อก่อโรคได้จำนวนหนึ่ง (Kontula, 1998; Metchnikoff, 1907) ผลการศึกษาวิจัยโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรไบโอติกและพื้นผิวเซลล์ของโฮสต์และความสัมพันธ์ของโปรไบโอติกต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ชนิดต่างๆ จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ถูกนำมาศึกษาโดยพิจารณาจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์เพื่อนำไปเป็นโปรไบโอติกในอนาคต สำหรับรายชื่อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นโปรไบโอติกในปัจจุบันแสดงอยู่ในตารางที่1 ซึ่งประกอบด้วยทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด (Gaggia *et al*., 2010; Ouwehand *et al*., 2002; Senok *et al*., 2005) อย่างไรก็ตามความสามารถของโปรไบโอติกเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสเตรน (strain-specific) กล่าวคือ ความสามารถหรือคุณสมบัติต่างๆ ของแต่ละสเตรน (strain) มีความจำเพาะสูงในเชื้อสเตรนนั้นและอาจไม่มีในสเตรนอื่นๆ ถึงแม้ว่าทั้งสองสเตรนจะถูกจัดอยู่จีนัส (genus) เดียวกันก็ตาม (Ibnou-Zekri *et al*., 2003; Senok *et al*., 2005)

ตารางที่ 1 รายชื่อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นโปรไบโอติก (Gaggia *et al*., 2010; Ouwehand *et al*., 2002)

Genus	Species
Lactobacillus	*acidophilus*, amylovorus*, brevis*, casei*, crispatus*, farmicinis*, fermentum* murinus*, johnsonii, paracasei, plantarum*, reuteri*, rhamnosus*, salivarius**
Lactococcus	*lactis**
Leuconostoc	*citreum*, lactis*, mesenteroides**
Pediococcus	*acidilactici*, pentosaceus**
Bifidobacterium	*animalis*, breve, longum*, lactis*, pseudolongum*, thermophilum**
Enterococcus	*faecalis *, faecium**
Propionibacterium	*freudenreichii**
Bacillus	*subtilis*, cereus*, licheniformis**
Escherichia	*coli*
Enterococcus	*faecium*, faecalis **
Saccharomyces	*cerevisiae*, pastorianus**
Kluyveromyces	*fragilis*, marxianus**
Aspergyllus	*orizae*, niger**

*จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

สารทางเลือกอื่นๆ

ในปี พ.ศ.2538 Gibson และ Roberfroid ได้นิยามพรีไบโอติกว่าเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถย่อยสลายได้แต่ส่งผลดีต่อโฮสต์ ด้วยการเลือกกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ของโฮสต์ (Gibbson and Roberfroid, 1995) มาตรฐานการคัดเลือกพรีไบโอติกที่สำคัญมีอยู่สามประการด้วยกัน คือ 1) เป็นสารประกอบที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของโฮสต์นั้น 2) สารประกอบนั้นต้องไม่ถูกย่อย (hydrolyse) หรือถูกดูดซึมได้ในกระเพาะอาหารหรือในลำไส้เล็ก 3) สารประกอบนั้นควรกระตุ้นให้เกิดผลดีต่อโฮสต์ผ่านกระบวนการหมัก (Gibbson and Roberfroid, 1995; Manning and Gibson, 2004) สารประกอบที่จะนำมาใช้เป็นพรีไบโอติก ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตและโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ทรานส์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และ แลคตูโลส (Gaggia *et al*., 2010) ส่วนซินไบโอติกเป็นการใช้ประโยชน์ของการทำงานร่วมกันระหว่างโปรไบโอติกและพรีไบโอติกโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์ นอกจากนั้นพืชและสมุนไพรที่ได้รับความสนใจในการใช้เป็นตัวเลือกทดแทนของสารปฏิชีวนะ ตัวอย่างเช่น กระเทียม เปปเปอมิ้นต์ หรือใบสะระแหน่ เป็นต้น อย่างไรก็ตามพืชและสมุนไพรที่ได้รับการศึกษานี้ไม่สามารถทำให้เกิดผลดีอย่างต่อเนื่องพอที่จะนำมาใช้เป็นตัวเลือกทดแทนสารปฏิชีวนะ (Vondruskova *et al*., 2010)

กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

ปริมาณจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความต้องการการได้รับพลังงานของโฮสต์ เนื่องจากเมื่อจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้มีจำนวนมาก โฮสต์จะได้รับพลังงานจากสารอาหารน้อยลงซึ่งเป็นผลมาจากความต้องการของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่ต้องการพลังงานและดูดซึมสารอาหารจากโฮสต์ ดังนั้นหากมีเชื้อก่อโรคอยู่ในลำไส้ของโฮสต์ และเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างต่อเนื่องจะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารของโฮสต์ลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่ออัตราแลกเนื้อที่เกษตรกรจะได้รับซึ่งจะมีอัตราต่ำลงตามประสิทธิภาพการดูดซึมอาหารของโฮสต์ (Cho, 2011; Kenny *et al*., 2011) ดังนั้นในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ จึงเล็งเห็นความสำคัญของการใช้โปรไบโอติกเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ เนื่องจากโปรไบโอติกจะกลายเป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีประโยชน์ต่อโฮสต์ ทั้งนี้กลไกการทำงานในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคของโปรไบโอติกในโฮสต์มีดังต่อไปนี้

โปรไบโอติกและจุลินทรีย์ก่อโรค

โปรไบโอติกสามารถต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้โดยสร้างสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ของโฮสต์ เช่น การผลิตกรดน้ำส้ม (acetic acid) เพื่อลดค่า pH ในลำไส้โฮสต์ จากการศึกษาการติดเชื้อ *E.coli* 0157:H7 ในหนูทดลอง พบว่าหนูที่ได้รับโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. breve* จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น โดยที่ *B. breve* จะผลิตกรดน้ำส้มซึ่งส่งผลให้ค่า pH ในลำไส้เล็กของหนูทดลองต่ำลงร่วมกับการสร้างและหลั่งสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งส่งผลให้

เกิดการยับยั้งการผลิตสารพิษของเชื้อ *E.coli* 0157:H7 และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli* 0157:H7 (Asahara *et al*., 2004) ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ต่อการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในเยื่อบุกระเพาะอาหารในหนูทดลองพบว่าสารแบคเทอริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* บนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของโฮสต์หรือหนูทดลองได้ (Gotteland *et al*., 2006) นอกจากนั้นโปรไบโอติกบางชนิดสามารถกระตุ้นการผลิตดีเฟนซิน (defensin) ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ส่วนโปรไบโอติกจากเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ *Nissle* สามารถกระตุ้นการผลิตเบต้า-ดีเฟนซินชนิดที่ 2 ในคน (human beta-defensin) ได้ ซึ่งการผลิตมีมากในเซลล์เยื่อบุและมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Schröder JM, 1999; Wehkamp *et al*., 2004)

โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์เยื่อบุ เพื่อให้เกิดความแข็งแรงของเซลล์มากยิ่งขึ้น ในกรณีนี้โปรไบโอติกมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคที่มีความสามารถทำลายเซลล์ หรือยับยั้งการประสานระหว่างเซลล์ของโฮสต์ โดยที่โปรไบโอติกจะช่วยในการซ่อมแซมและป้องกันการทำลายการประสานระหว่างเซลล์ของโฮสต์ที่เกิดจากเชื้อก่อโรคเหล่านั้น (Meddings, 2008) การศึกษาซึ่งเซลล์เยื่อบุได้รับสารพิษจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าโปรตีนที่เชื่อมต่อระหว่างเซลล์เยื่อบุมีโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้เชื้อก่อโรคนั้นๆ สามารถผ่านเข้าไปก่ออันตรายต่อเซลล์ของโฮสต์ได้ แต่เมื่อได้ทำการทดลองโดยการเติมโปรไบโอติกลงไปในเซลล์เยื่อบุที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อก่อโรค พบว่าโปรไบโอติกสามารถป้องกันความเสียหายทางโครงสร้างในบริเวณที่มีโปรตีนเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ของโฮสต์ได้ ทำให้จำนวนเชื้อโรคที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ได้มีปริมาณลดลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโปรไบโอติกมีความสำคัญต่อการช่วยรักษาองค์ประกอบที่เป็นโครงร่างระหว่างเซลล์ในโฮสต์ (Otte and Podolsky, 2004)

โปรไบโอติกและการพัฒนาภูมิคุ้มกันของโฮสต์

โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในโฮสต์ได้หลายวิธี เช่นการเรียกกลุ่มเซลล์ชนิด enterocytes และ เซลล์ของภูมิคุ้มกันระบบเยื่อเมือก (mucosal immune cells) มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้าง anti-inflammatory cytokines และลดการสร้าง proinflammatory cytokines (O'Hara *et al*., 2006; Walsh *et al*., 2008; Wang *et al*., 2009) โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* มีความสามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage และเพิ่มระดับจำนวนแอนติบอดี อีกทั้งยังกระตุ้นการผลิต interferon และกระตุ้นการทำงานของ natural killer cells อย่างไรก็ตามโปรไบโอติกมีความแตกต่างกับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เพราะเป้าหมายของโปรไบโอติกไม่ใช่การกำจัดเชื้อก่อโรคโดยตรง แต่เป็นเพียงการดำรงชีวิตอย่างสมดุลย์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วยกันเอง และระหว่างโฮสต์กับเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ (Kato *et al*., 1984; Perdigon *et al*., 2003; Yasui *et al*., 1989)

ผลจากการใช้โปรไบโอติกในสุกร

การใช้โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรมีจุดประสงค์เพื่อลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและส่งเสริมการทำงานของลำไส้ การให้โปรไบโอติกเสริมร่วมกับอาหารของสุกรทำให้สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Davis *et al*., 2008) ผลของการใช้โปรไบโอติกจะเป็นอย่างไรขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ เช่น การให้โปรไบโอติกในสายพันธุ์ *Bacillus* เพิ่มเข้าไปกับอาหารของสุกรส่งผลดีต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันโดยเฉลี่ย (Average Daily Gain) อีกทั้งสามารถลดอัตราการตายในสุกร (Davis *et al*., 2008)ในขณะที่การให้โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* จะทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นทั้งในลูกสุกรดูดนม ลูกสุกรกำลังอย่านม สุกรรุ่น และสุกรขุน (Abe *et al*., 1995; Mathew *et al*., 1998) เนื่องจากความสามารถของโปรไบโอติกในการกระตุ้นการหมักและการย่อยอาหารส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นในสุกร ตัวอย่างเช่นโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacilli* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตกรดแลคติกและเอ็นไซม์ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เกิดการย่อยและดูดซึมอาหารที่ดีขึ้นในลำไส้ของโฮสต์ (Ouwehand *et al*., 2002; Yu *et al*., 2008) Meng และคณะพบว่าสุกรที่ได้รับโปรไบโอติกมีการย่อยของโปรตีนที่ดีกว่า และส่งผลให้ได้รับพลังงานที่สูงกว่าสุกรที่ไม่รับโปรไบโอติก (Meng *et al*., 2010) นอกจากนั้นโปรไบโอติกยังมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิต้านทานโรคในลูกสุกรหย่านมซึ่งเป็นอีกบทบาทหนึ่งที่สำคัญของโปรไบโอติก เนื่องจากอาการท้องเสียในลูกสุกรหย่านมเป็นสาเหตุสำคัญให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร มีการศึกษาจำนวนมากพบว่าการให้โปรไบโอติกเสริมในอาหารของลูกสุกรและลูกสุกรหย่านมสามารถลดอัตราการเกิดอาการท้องเสียและการตายในลูกสุกรทั้งสองช่วงอายุนี้ได้ ซึ่งเกิดจากการที่โปรไบโอติกมีส่วนช่วยในการทำการทำงานระหว่างเซลล์ของเยื่อบุในโฮสต์ทำงานได้ดีขึ้นจึงส่งผลให้การรุกล้ำเข้าไปในเซลล์ของโฮสต์โดยเชื้อก่อโรคนั้นลดลง และโปรไบโอติกบางสเตรนเช่น *B. cereus* var. *toyoi* สามารถกระตุ้น T cells ในการต่อสู้การรุกล้ำของเชื้อก่อโรคในโฮสต์ได้โดยการที่ dendritic cells แสดงชิ้นส่วนของโปรไบโอติกผ่านทาง MHC class II และกระตุ้นให้ naïve T cells พัฒนาเป็น adaptive T cells มาต่อต้านเชื้อก่อโรค (Kyriakis *et al*., 1999; L Bon *et al*., 2010; Simon *et al*., 2001; Zani *et al*., 1998)

การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมสุกร

อาหารหมักชนิดเหลว (Fermented liquid feeds)

โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacilli* สามารถนำมาผสมในอาหารสุกรในลักษณะของน้ำหมักซึ่งเรียกว่า fermented liquid feeds เนื่องจากโปรไบโอติกในสายพันธุ์ *Lactobacilli* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดน้ำส้มจึงมีคุณสมบัติทำให้เกิดการหมักของอาหารตามธรรมชาติจากการศึกษาพบว่าการใช้ fermented liquid feeds ในสุกรนั้นส่งผลให้เชื้อก่อโรคทั้งในอาหารและสิ่งแวดล้อมภายในคอกสุกรมีจำนวนลดลง และสามารถลดปริมาณเชื้อก่อโรคที่มีโอกาสถ่ายทอดสู่สุกรตัวอื่นเมื่อเปรียบเทียบกับสุกรที่ได้รับอาหารปกติ (Boesen *et al*., 2004; van der Wolf *et al*., 2001; van Winsen *et al*., 2002)

อย่างไรก็ตามวิธี fermented liquid feed มีข้อจำกัดในการเลือกใช้สายพันธุ์และสเตรนของโปรไบโอติกที่จะนำมาใช้เป็นตัวหมัก เนื่องจากโปรไบโอติกบางชนิดไม่สามารถทนต่อกระบวนการผลิตที่ใช้สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิด fermented liquid feed

การป้อนเชื้อโดยตรง (direct fed microbials)

การให้โปรไบโอติกที่มีชีวิตแก่สุกรโดยตรงเรียกว่าวิธี direct fed microbials จุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในวิธี direct fed microbials ควรเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ เนื่องจากสปอร์นั้นมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงและหลากหลาย ดังนั้นจึงนิยมนำจุลินทรีย์ *Bacillus* มาใช้ในวิธี direct fed microbials เช่น *B. subtilis* และ *B. cereus* var. *toyoi* เนื่องจาก *Bacillus* สามารถสร้างสปอร์เพื่อป้องกันตัวเองจากความร้อนและอุณหภูมิที่สูงระหว่างกระบวนการผลิตและทนต่อการกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหารของสัตว์ การให้โปรไบโอติกโดยวิธี direct fed microbials คือให้โปรไบโอติกคู่ไปกับอาหารของสุกรตามปกติ โดยผสมโปรไบโอติกในปริมาณประมาณ 1-2 x 10^8 colony forming unit (cfu) ต่อหนึ่งกรัมของอาหารสุกร โดยส่วนมากระยะเวลาที่เหมาะสมกับการใช้โปรไบโอติกคือ ตั้งแต่แรกเกิดจนถึงสี่สัปดาห์หลังจากหย่านม การให้โปรไบโอติกแก่สุกรด้วยวิธี direct fed microbials นั้นง่ายต่อการใช้ของเกษตรกร เนื่องจากไม่มีขั้นตอนการใช้ที่ซับซ้อนแต่อย่างใด แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่ผู้ผลิตต้องเลือกสายพันธุ์โปรไบโอติกที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารเสริมด้วยวิธี direct fed microbials และเหมาะสมกับต้นทุนการผลิต รวมทั้งโปรไบโอติกที่เลือกใช้ต้องมีความสามารถทนทานต่อกระบวนการผลิต (Huys *et al*., 2006; Marcobal *et al*., 2008) จากการศึกษาโดยให้ *B. cereus* var. *toyoi* แก่แม่สุกรโดยวิธี direct fed microbials พบว่าสามารถลดการส่งผ่านของเชื้อ *E.coli* ก่อโรคสู่ลูกสุกร และลดอาการท้องเสียในฝูงลูกสุกร อีกทั้งให้ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงขึ้นและมีอัตราแลกเนื้อที่ดีขึ้น (Scharek *et al*., 2007; Taras *et al*., 2005) ในการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะซึ่งทดลองในลูกสุกรประมาณ 20,000 ตัว พบว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารที่มีโปรไบโอติกและลูกสุกรที่รับอาหารที่มียาปฏิชีวนะให้ผลการทดลองที่เหมือนกันในทางสถิติ ทั้งทางด้านต้นทุนการผลิตต่อกิโลกรัมและปัจจัยอื่นๆ ทางด้านการผลิต ด้วยเหตุนี้จึงเชื่อว่าโปรไบโอติกสามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี (Kenny *et al*., 2011)

ตัวอย่างการใช้โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย

สำหรับการใช้โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยนั้นพบว่ามีการใช้มากในกลุ่มสัตว์น้ำและสัตว์ปีกผลการใช้โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นนิยมใช้ทั้งในการเลี้ยงปลาและกุ้ง การใช้โปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้นควรสามารถปรับสภาพสิ่งแวดล้อมภายในบ่อเพาะเลี้ยงให้ดีขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกนั้นมีความสามารถที่จะเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่สะสมในบ่อเพาะเลี้ยงเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และลดการสะสมของคาร์บอนจากสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างเช่น การใช้โปรไบโอติกในสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ในอุตสาหกรรม

การเลี้ยงสัตว์น้ำ สามารถปรับสภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงให้มีคุณภาพดีขึ้น (Balcazar *et al.*, 2006) จากการศึกษาของวิลาวัณย์และคณะ (2011) ในการให้ คิว.พี.โปรไบโอติกผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮเกร์ดในปลานิลพบว่าปลานิลมีการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักมีค่าความอุดมสมบูรณ์ที่เพิ่มขึ้นและลดอัตราการตาย สำหรับอุตสาหกรรมสัตว์ปีก เช่นการให้โปรไบโอติกในไก่มีบทบาทช่วยให้ไก่เลี้ยงมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ดีขึ้น สำหรับในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรนั้นมีการทดลองใช้โปรไบโอติกเช่นกัน แต่รายงานการใช้โปรไบโอติกนั้นมีน้อยมาก ตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกประเทศเกาหลีนั้นได้มีการนำมาใช้ศึกษาทดลองใช้โดยผสมในอาหารสุกรหลังหย่านมพบว่าสุกรมีการเจริญเติบโตและอัตราการแลกน้ำหนักดีกว่าในกลุ่มควบคุมและให้ผลใกล้เคียงกับในกลุ่มที่ให้สารปฏิชีวนะ ซึ่งข้อมูลส่วนใหญ่เป็นข้อมูลจากผู้ผลิตและผู้ค้า

บทสรุป

จุลินทรีย์มีประโยชน์ในลำไส้นั้นมีความสำคัญต่อระบบการทำงานของร่างกายเพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร สำหรับการใช้โปรไบโอติกเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรและเพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรคหรือบำรุงสุขภาพสุกรนั้นเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรพิจารณาเพื่อการแก้ปัญหาระยะยาวในด้านผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้ยา และการส่งผ่านเชื้อดื้อยาสู่ผู้บริโภค เนื่องจากโปรไบโอติคมีคุณสมบัติที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของสุกรด้วยการเพิ่มการดูดซึมสารอาหาร และลดความเสี่ยงจากโรคที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสีย อย่างไรก็ตามการใช้โปรไบโอติกให้ได้ผลดีที่สุดควรใช้ในช่วงเวลาที่สุกรแรกเริ่มได้รับเชื้อจุลินทรีย์กล่าวคือ ตั้งแต่แรกเกิดจนถึงประมาณสี่สัปดาห์หลังจากหย่านม (Cho, 2011; Le Bon *et al.*, 2010) หรือช่วงที่สุกรมีการเจ็บป่วย จากความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้หรือเมื่อสุกรแสดงอาการท้องเสียเป็นต้น

การใช้โปรไบโอติกมากกว่าหนึ่งชนิดในผลิตภัณฑ์อาหารของสุกรมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้โปรไบโอติกเพียงชนิดเดียว เนื่องจากคุณสมบัติจำเพาะที่มีอยู่ในโปรไบโอติกแต่ละสเตรนอย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกควรได้รับการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ โดยละเอียดก่อนนำมาใช้โดยเฉพาะผลการต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้งในตัวสัตว์และห้องปฏิบัติการและตัวเลขของการเพิ่มผลผลิต

เอกสารอ้างอิง

Abe F., Ishibashi N., Shimamura S., 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. Journal of Dairy Science 78: 2838-2846.

Asahara T., Shimizu K., Nomoto K., Hamabata T., Ozawa A., Takeda Y., 2004. Probiotic Bifidobacteria Protect Mice from Lethal Infection with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7. Infection and Immunity. 72: 2240-2247.

Balcazar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. 114: 173-186. Epub 2006 Feb 2021.

Boesen H.T., Jensen T.K., Schmidt A.S., Jensen B.B., Jensen S.M., Møller K., 2004. The influence of diet on Lawsonia intracellularis colonization in pigs upon experimental challenge. Veterinary Microbiology 103: 35-45.

Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P., Phillips I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52: 159-161.

Castanon J.I., 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. Poultry Science 86: 2466-2471.

Cho J.H., Zhao P.Y., Kim I.H., 2011. Probiotics as a dietary additive for pigs: A review. Journal of Animal and Veterinary Advances 16: 2127-2134.

Davis M.E., Parrott T., Brown D.C., de Rodas B.Z., Johnson Z.B., Maxwell C.V., Rehberger T., 2008. Effect of a Bacillus-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. Journal of Animal Science 86: 1459-1467.

Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.

Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology 141 Suppl 1: S15-28.

Gibbson G.R., Roberfroid M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition 125: 1401-1412.

Gotteland M., Brunser O., Cruchet S., 2006. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori?* Alimentary Pharmacology and Therapeutics 23: 1077-1086.

Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K., Vankerckhoven V., Goossens H., Swings J., 2006. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. Research in Microbiology 157: 803-810.

Ibnou-Zekri N., Blum S., Schiffrin E.J., von der Weid T., 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro. Infection and Immunity 71: 428-436.

Kato I., Yokokura T., Mutai M., 1984. Augmentation of mouse natural killer cell activity by Lactobacillus casei and its surface antigens. Microbiology and Immunology. 28: 209-217.

Kenny M., Smidt H., Mengheri E., Miller B., 2011. Probiotics - do they have a role in the pig industry? International Journal of Animal Bioscience 5: 462-470.

Kontula P., 1998. The colonization of simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product: effect on gastrointestinal microbiota. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 50: 246-252.

Kyriakis S.C., Tsiloyiannis V.K., Vlemmas J., Sarris K., Tsinas A.C., Alexopoulos C., Jansegers L., 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. Research in Veterinary Science 67: 223-228.

Le Bon M., Davies H.E., Glynn C., Thompson C., Madden M., Wiseman J., Dodd C.E.R., Hurdidge L., Payne G., Le Treut Y., Craigon J., Tötemeyer S., Mellits K.H., 2010. Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. Livestock Science 133: 179-181.

Manning T.S., Gibson G.R., 2004. Prebiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 18: 287-298.

Marcobal A., Underwood M.A., Mills D.A., 2008. Rapid determination of the bacterial composition of commercial probiotic products by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 46: 608-611.

Mathew A.G., Chattin S.E., Robbins C.M., Golden D.A., 1998. Effects of a Direct-Fed Yeast Culture on Enteric Microbial Populations, Fermentation Acids, and Performance of Weanling Pigs. Journal of Animal Science 76: 2138-2145.

Meddings J., 2008. The significance of the gut barrier in disease. Gut. 57: 438-440.

Meng Q.W., Yan L., Ao X., Zhou T.X., Wang J.P., Lee J.H., Kim I.H., 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. Journal of Animal Science 88: 3320-3326.

Metchnikoff E., 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction *In*: The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London. p. 161-183.

O'Hara A.M., O'Regan P., Fanning A., O'Mahony C., Macsharry J., Lyons A., Bienenstock J., O'Mahony L., Shanahan F., 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. Immunology. 118: 202-215.

Otte J.M., Podolsky D.K., 2004. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology 286: G613-626.

Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek 82: 279-289.

Perdigon G., Locascio M., Medici M., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G., 2003. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. Biocell. 27: 1-9.

Scharek L., Guth J., Filter M., Schmidt M.F., 2007. Impact of the probiotic bacteria Enterococcus faecium NCIMB 10415 (SF68) and Bacillus cereus var. toyoi NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. Archives of Animal Nutrition. 61: 223-234.

Schröder JM H.J., 1999. Human beta-defensin-2. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 31: 645-651.

Senok A.C., Ismaeel A.Y., Botta G.A., 2005. Probiotics: facts and myths. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 11: 958-966.

Simon O., Jadamus A., Vahjen W., 2001. Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. Journal of Animal and Feed Science 10: 51-67.

Taras D., Vahjen W., Macha M., Simon O., 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain Bacillus cereus var. toyoi to sows and piglets. Archives of Animal Nutrition. 59: 405-417.

van der Wolf P.J., Lo Fo Wong D.M., Wolbers W.B., Elbers A.R., van der Heijden, H.M., van Schie F.W., Hunneman W.A., Willeberg P., Tielen M.J., 2001. A longitudinal study of Salmonella enterica infections in high-and low-seroprevalence finishing swine herds in The Netherlands. Veterinary Quarterly. 23: 116-121.

van Winsen R.L., Keuzenkamp D., Urlings B.A.P., Lipman L.J.A., Snijders J.A.M., Verheijden J.H.M., van Knapen F., 2002. Effect of fermented feed on shedding of Enterobacteriaceae by fattening pigs. Veterinary Microbiology 87: 267-276.

Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I., 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. Veterinarni Medicina 55: 199-224.

Walsh M.C., Gardiner G.E., Hart O.M., Lawlor P.G., Daly M., Lynch B., Richert B.T., Radcliffe S., Giblin L., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross P., 2008. Predominance of a bacteriocin-producing Lactobacillus salivarius component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. FEMS Microbiology Ecology. 64: 317-327. Epub 2008 Mar 2027.

Wang Y., Cho J.H., Chen Y.J., Yoo J.S., Huang Y., Kim H.J., Kim I.H., 2009. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. Livestock Science 120: 35-42.

Wehkamp J., Harder J., Wehkamp K., Wehkamp-von Meissner B., Schlee M., Enders C., Sonnenborn U., Nuding S., Bengmark S., Fellermann K., Schröder J.M., Stange E.F., 2004. NF-kappaB-and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. Infection and Immunity 72: 5750-5758.

WHO., FAO., 2001. Health and Nutritional Propreties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.

Yasui H., Mike A., Ohwaki M., 1989. Immunogenicity of Bifidobacterium breve and Change in Antibody Production in Peyer's Patches After Oral Administration. Journal of Dairy Science 72: 30-35.

Yu H.F., Wang A.N., Li X.J., Qiao S.Y., 2008. Effect of viable Lactobacillus fermentum on the growth performance, nutrient digestibility and immunity of weaned pigs. Journal of Animal and Feed Science 17: 61-19.

Zani J.L., Cruz F.W., Freitas dos Santos A.F., Gil-Turnes C., 1998. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. Journal of Applied Microbiology 84: 68-71.

Probiotics: A chance as feed additive in pig industry

Wandee Sirichokchatchawan[1] Thongchai Chaleomchaikit[1] and Nuvee Prapasarakul[1*]

[1]Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

*Corresponding author: E-mail address: Nuvee.P@chula.ac.th

Received 4 July 2012; received in revised form 13 September 2012; accepted 1 October 2012

Abstract

The use of probiotics to create positive effects on human health has extended toward pig productions as an alternative mean or to replace antibiotic use to promote animal health. Probiotics in term of feedadditive is claimed to exert many beneficial effects on pig performances; for examples, abilities to compete with pathogenic bacteria and modulate nonspecific immune response. Therefore, this review aims to provide the insight on how probiotics work and function in host focusing on pig performance, and discuss on the applications of probiotic as a potential feed additive to replace the use of antibiotic growth promoters.

Keywords: probiotics, pig, feed additive, health performance

Incidence of ochratoxin A in red chili pepper in Thailand.

Saranya Poapolathep[1*] Amnart Poapolathep[1] Narumol Klangkaew[1] and Susumu Kumagai[2]

[1]Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine. Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

[2]Laboratory of Veterinary Public Health, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

*Corresponding author; Tel. 0-2579-7537, E-mail: fvetsys@ku.ac.th, aaey2000@yahoo.com

Received 18 March 2013; received in revised form 10 April 2013; accepted 1 May 2013

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is one of the most common and public health significant mycotoxins which mainly produced by two main genera of fungi, *Aspergillus* and *Penicillium*. Thus, the aim of this study was to determine its levels in red chili pepper being commercialized in Thailand, and to assess consumer health risk. One hundred red chili pepper samples randomly collected from different supermarkets and retail shops in Bangkok, Thailand during February 2012 to April 2012. They were analyzed using an immunoaffinity column and a high-performance liquid chromatography (HPLC) system. OTA was found in 75 % of samples at levels ranging from 0.34 to 13.65 μg/kg with mean concentration of 3.28 μg/kg. The OTA levels in all samples were far below the maximum limits established by the European Commission under EC regulation. The results indicated that the incidence of adverse health risk in Thai people exposed to OTA contamination in commercial red chili pepper was low.

Keywords: ochratoxin A, red chili pepper, immunoaffinity column, HPLC, Thailand

Introduction

Contamination of mycotoxins in agricultural commodities during pre- and post harvest process is a global problem which leads to serious risks to human and animal health. Environmental conditions especially high humidity and temperature favour fungal proliferation resulting in such contamination. The prevalence of mycotoxins occurrence is often increased by climatic conditions prevailing in tropical regions. The countries located in tropical areas such as Thailand; therefore, certainly encounter high risk of mycotoxin exposure. Among several mycotoxins presented in food and feedstuffs, ochratoxin A (OTA) is one of the most common and public health significant mycotoxins. It is mainly produced by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* in tropical regions and temperate regions, respectively (Bennett and Klich, 2003). Contamination of OTA has widely been observed in a variety of foods such as cereals, cereal products, coffee beans, dried fruits, wines, spices and cacao (Trucksess *et al.*, 2009; Thirumala-Devi *et al.*, 2001; Reddy and Bhoola, 2010). OTA exerts adverse effects in both human and animals in which kidney is the primary target organ. Related publications indicated that OTA is a nephrotoxic, genotoxic, teratogenic, immunotoxic and immunosuppressive substance in experimental animals (JECFA, 2001). Moreover, it was classified as a possible human carcinogen (group 2B) by the International Agency for Research of Cancer (IARC) (IARC, 1993). There has been consideration that OTA is involved in a human disease called endemic Balkan nephropathy which occurs in populations who live in the areas of Romania and Bulgaria (Hult *et al.*, 1982). In addition, OTA is associated with disease termed porcine nephropathy in swine and is also responsible for disease and death in poultry (Bennett and Klich, 2003). This toxin is a heat stable molecule that could not be completely destroyed by heat during cooking process (Galvano *et al.*, 2005). Thus, most of the toxin can remain in food and can induce harmful effects to consumers (Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Simon, 1996; Puntaric *et al.*, 2001; Scudamore *et al.*, 2003; Fuchs and Peraica, 2005; Walker and Larsen, 2005; Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007).

Red chili pepper, a kind of hot and spicy herb, is one of the most common ingredients used in Thai recipes as a favoring, seasoning and coloring agent. This spice is also reviewed as the most consumed spices in the world (Asmad and Ahmed, 1995). Unfortunately, spices including red chili pepper are sensitive to be contaminated with mycotoxins, especially aflatoxins and OTA (Vrabcheva, 2000). Improper conditions during drying, transport and storage processes can enhance fungal growth and mycotoxins production.

Up-to-date, the regulatory limit of OTA in spices establishing by Codex Alimentarius is not yet announced. However, the European Commission has set the limit for OTA in spices such as *Capsicum* ssp. and *Piper* ssp. at 30 µg/kg (European Commission, 2010). Although, the presence of OTA in *Capsicum* ssp. including red chili pepper at level above limit was described by some researchers (Aboul-Enein *et al.*, 2002; Fazekas *et al.*, 2005; Jørgensen K., 2005), reports literally on the situation of OTA contamination in Thai red chili pepper are still limited. Therefore, this study was conducted to determine the levels of OTA in red chili pepper being commercialized in Thailand for assessing consumer health risk.

Materials and Methods

Reagents and standards

OTA standard was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). The standard concentration was confirmed by the method recommended by AOAC International (Trucksess, 2003). All HPLC grade solvents and other analytical grade reagents were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). The immunoaffinity column (Ochraprep®) was purchased from R-BIO-PHARM RHÔNE Ltd. (Glasgow, Scotland).

Source of samples

A total of 100 samples of red chili pepper were randomly collected from February 2012 to April 2012, from different supermarkets and retail shops in Bangkok, Thailand. All samples were stored at -20°C until analysis.

Extraction and clean-up

Extraction and clean-up procedures were performed according to a published method (Sugita-Konishi *et al.*, 2006) with slight modification. In brief, ten grams of each sample was added with two grams of sodium chloride and then extracted with 40 ml of methanol:water solution (80:20, v/v) by shaking for 1 hour. The mixture was centrifuged at 3,500 rpm for 10 min.Ten millilitres of the supernatant was collected, and then 10 ml of 0.01 M phosphate buffer solution (PBS) was added. After thoroughly mixed, the extract was filtered through a Whatman 934AH glass microfibre filter. The filtrate was applied to an Ochraprep® column under gravity. The column was washed with 2 ml of PBS. OTA was then eluted by passing 1600 µl (2 × 800 µl) methanol/acetic acid (99:1, v/v) through the column at a flow rate of 2 ml min^{-1}.The eluate was collected, evaporated to dryness under nitrogen gas at 40°C. The dry residue was redissolved in 1.0 ml of acetonitrile: water: acetic acid (30:70:1, v/v/v), and then filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter and submitted to a HPLC system.

Fortification procedure

For evaluating recovery, 1 ml of OTA standard solution was added to ten gram of blank samples to obtain final OTA concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 µg/kg. The spiked samples were subjected to extraction and clean-up as described above. The recovery rate of OTA was 84.6 % and the limit of detection was 0.1 µg/kg.

Conditions of HPLC

The HPLC was performed using an analytical ODS column (4.5 x 250 mm, Senshu Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan) with a Jasco equipment system (Jasco, Tokyo, Japan). The column was thermostatically controlled in a column chamber at 45°C. The mobile phase employed was a mixture of acetonitrile, water, acetic acid (55:43:2) at a flow rate of 1 ml/min. The excitation and emission wavelengths of fluorescence detection were 365 and 440 nm, respectively.

Results and Discussion

The incidences of OTA have been determined in Thai red chili samples and are given in Table 1. Seventy-five of one hundred (75%) red chili samples contained OTA at a concentration ranging from 0.34 to 13.65 µg/kg with mean concentration of 3.28 ± 1.84 µg/kg. However, none of the samples tested contained OTA at levels above the recommended level by the European Commission (30 µg/kg). In our study, the overall mean level of OTA positive samples and the highest level of contamination were different from those reported previously from the survey of OTA contamination in spices (Aboul-Enein *et al.*, 2002; Fazekas *et al.*, 2005; Jørgensen K., 2005; Chung *et al.*, 2009). This difference may result from several factors such as temperature, humidity, processing, storage and geographic conditions.

Table 1 Incidences and ranges of OTA in red chili pepper samples

Range of OTA concentration (µg/kg)	No. of contaminated samples
ND	25
0.1-<1.0	14
1.0-<5.0	46
5.0-<10.0	9
10.0-15.0	6
Total	**100**

Note: ND = not detected

Conclusion

The low levels of OTA found suggested that the incidence of adverse health risk in Thai people exposed to OTA contamination in commercial red chili pepper is low. However, OTA surveillance should be done periodically to monitor its contamination in red chili peppers as well as other commodities to avoid toxicities resulting from the consumption of OTA contaminated foods.

References

Asmad I.F., Ahmed S.K., 1995. Contamination of red chili with aflatoxin B1 in Pakistan. Mycotoxin research. 11: 21-24.

Aboul-Enein H.Y., Kutluk O.B., Altiokka G., Tuncel M., 2002. A modified HPLC method for The determination of ochratoxin A by fluorescence detection. Biomedical Chromatography. 16: 470-474.

Bennett J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin.Microbiol.Rev.* 16: 497-516.

Bircan C., 2009. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in drie figs. Food and Chemical Toxicology 47: 1996-2001.

Chung S.W.C., Kwong K.P., Tang A.S.P., Yeung S.T.K., 2009. Ochratoxin A levels in foodstuffs marketed in Hong Kong. *J. Food Compost. Anal.*, 22: 756-761.

European Commission, 2010. Commission Regulation (EC) No.105/2010 of 5 Febuary 2010 amending Regulation (EC) N. 1881/2006 as setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A Off. J. Eur. Commun. Available at: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do? uri=OJ:L:2010:035:0007: 0008:EN:PDF.

Fazekas B., Tar A., Kovàcs M., 2005. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Addit. Contam.* 22: 856-863.

Food Standard Agency (FSA) of United Kingdom, 2005. Survey of Spices for Aflatoxins and Ochratoxin A. Food Survey Information Sheet. Available at: www.food.gov.uk/science/surveillance/fsisbranch2005/fsis7305.

Fuchs R., Peraica M., 2005. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Addit. Contam. Suppl.* pp. 6-9.

Galvano F., Ritieni A., Piva G., Pietri A., 2005. Mycotoxins in the human food chain. *In*: Duarate Diaz (Ed.), The Mycotoxin in Blue Book. Nottingham University Press, England. pp. 187-225.

Hult K., Piestina R., Habazin-Novak V., Radic B., Ceovic S., 1982. Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch. Toxicol.* 51: 313.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some naturally Occuring Substances: Some Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *In* IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC: Lyon, France. 1993; Volume 56.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74. Retrieved September 25, 2012 from: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm.

Jørgensen K., 2005. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – A review of EU occurrence data. *Food Addit. Contam.* pp. 26-30.

Kuiper-Goodman T., Scott P.M., 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.

Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcino genicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 61-99.

Puntaric D., Bosnir J., Smit Z., Baklaic Z., 2001. Ochratoxin A in corn and wheat: geographical as sociation with endemic nephropathy. Croatian Medical Journal. 42: 175-180.

Reddy L., Bhoola K., 2010. Ochratoxins-Food Contaminations: Impact on Human Health. 2: 771-779.

Scudamore K.A., Banks J., Macdonald S.J., 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. Food Addit Contam. 20: 1153-1163.

Simon P., 1996. Ochratoxin and kidney disease in the human. *Toxin Rev.* 15: 239-249.

Sugita-Konishi Y., Nakajima M., Tabata S., Ishikuro E., Tanaka T., Norizuki H., Ito Y., Aoyama K., Fujita K., Kai S., Kumagai S., 2006. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins in retailed foods in Japan. *J. Food Protect.* 69: 1365-1370.

Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Reddy G., Tangni E.K., Larondelle Y., Reddy D.V., 2001. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Addit. Contam.* 18: 830-835.

Trucksess M.W., 2003. *In*: W. Horwitz (Ed), Natural toxins, Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed., 2003, p. 56B, Chapter 49, Revision 2.

Trucksess M.W., Giler J., Young K., White K.D., Page S.W., 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee-1997. Journal of AOAC International. 82: 85-89.

Vrabcheva T.M., 2000. Mycotoxins in spices. *Vopr. Pitan.* 69: 40-43.

Walker R., Larsen J.C., 2005. Ochratoxin A: previous risk assessment and issues arising. *Food Addit. Contam.* 22: 53-57.