รหัสโครงการ SUT3-303-59-12-07

รายงานการวิจัย

การประเมินคุณสมบัติของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่ได้จากท่อทางเดินอาหารของไก่เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติคในอาหารไก่เนื้อ

(Evaluation of the efficacy of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from broiler gastrointestinal tract for use as probiotics in broiler diets)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-59-12-07

รายงานการวิจัย

การประเมินคุณสมบัติของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่ได้จากท่อทางเดินอาหารของไก่เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติคในอาหารไก่เนื้อ

(Evaluation of the efficacy of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from broiler gastrointestinal tract for use as probiotics in broiler diets)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิศา เข็มผะกา

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันต๊ะมา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิทธวัช โมฬี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559 ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เพื่อใช้ในงานทดลอง ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ คุณเมริษา ศิริโสภาพงษ์ และคุณสุภัตรา โอกระโทก ที่ได้ทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย และจัดทำรายงานฉบับนี้ด้วย

สุทิศา เข็มผะกา

2 มกราคม 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

จากมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารไก่เนื้อ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและควบคุมโรค โพรไบโอติคจึงเป็นสารเสริมอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ในอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพและสมรรถนะการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามโพรไบโอติคที่ใช้ในอุตสาหกรรมไก่เนื้อส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์เหล่านี้ควรได้มาจากสัตว์ที่เลี้ยงในสิ่งแวดล้อมและอาหารที่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้ได้โพรไบโอติคที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นหากประเทศไทยมีการผลิตโพรไบโอติคขึ้นใช้เองได้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมไก่เนื้อของประเทศ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและประเมินคุณสมบัติของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่ได้จากท่อทางเดินอาหารของไก่เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค โดยทำการสุ่มไก่สุขภาพดี ทำการสลบ และทำให้ตาย เพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของลำไส้เล็กส่วนปลายและส่วนของซีกัม จากนั้นนำไปคัดแยกและตรวจสอบหลังจากการย้อมสี และคัดแยกคุณสมบัติโพรไบโอติคเบื้องต้น นำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติคมาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* และทดสอบความสามารถในการทนทานต่อกรดและน้ำดี และความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 110 โคโลนี แยกออกได้เป็น 5 สปีชีส์ดังนี้ *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741(T), *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 (T), *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T), *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T), *Lactobacillus saerimneri* DSM 16049 (T) ทั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T) และ *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T) มีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งในด้านความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและภายใต้เกลือน้ำดี ทั้งยังสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดีอีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

The ban on subtherapeutic use of antibiotics as growth promoter in chicken diets for improvement in growth rate and disease prevention. Consequently, probiotics are increasingly used as alternative substance in animal diets to improve health and productivity. Unfortunately, the most probiotics used in broiler industry of Thailand are imported from abroad, which in general, these microbial should isolate and screen from the animals that receive the diets and raise under certain environmental conditions in Thailand. Therefore, this study aimed to isolate and investigate the properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from chicken gastrointestinal tract for use as probiotics. The healthy chickens were selected, anesthetized and sacrificed, the microorganism subsequent collected from the distal small intestine and cecum. Then the samples were isolated and screen after gram's staining for primary probiotic properties. The microbial that possessed the probiotic properties were then subjected to 16S rRNA sequencing using specific primers to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. Subsequently, the microbial species were tested on tolerance bile salt and acidic conditions, and adhesion capacity to the intestinal cell wall. The results showed that 110 isolates can be separated into 5 strains namely *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741(T), *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 (T), *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T), *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T) and *Lactobacillus saerimneri* DSM 16049 (T). It was found that *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T) and *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T) possessed the high efficiency tolerance to acidic and bile salt conditions and high adhesive capacity to intestinal Caco-2 cell wall.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย 2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 บทบาทของโพรไบโอติคในการเสริมสร้างสุขภาพลำไส้ 3
2.2 บทบาทของโพรไบโอติคในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค 3
2.3 บทบาทของโพรไบโอติคในการลดคอเลสเตอรอล 4
2.4 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร 4
2.5 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค 5
2.6 การเสริมโพรไบโอติคในอาหารต่อการผลิตสัตว์ปีก 6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อ (Sample collection) 14
3.2 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทำการคัดแยก 14
3.3 การทดสอบความสามารถในทนทานต่อกรดและน้ำดี 15
3.4 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ 15
3.5 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 16
3.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 16
3.7 การวัดความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์ 16
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลทดลอง
4.1 ความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี 17
4.2 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ 18
4.3 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ 19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค.....20
4.5 ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์.....20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย
สรุปผลการวิจัย.....22
บรรณานุกรม.....23
ประวัติผู้วิจัย.....26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ผลของโพรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ 7
ตารางที่ 2.2 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์..... 10
ตารางที่ 2.3 ผลของโพรไบโอติคต่อคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด..... 13
ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังจากบ่มภายใต้สภาวะที่เป็นกรด..... 18
ตารางที่ 4.2 อัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์หลังจากบ่มภายใต้เกลือน้ำดี..... 18
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของจุลินทรีย์บนผิวเซลล์ Caco-2..... 19
ตารางที่ 4.4 ความไวต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 19
ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion..... 20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 บทบาทของ gut-associated lymphoid tissues (GALT) ในระบบภูมิคุ้มกัน..... 4
ภาพที่ 2.2 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ..... 11
ภาพที่ 2.3 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ..... 11
ภาพที่ 2.4 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ..... 12
ภาพที่ 4.1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่กำลังขยาย 1000 เท่า 17
ภาพที่ 4.2 ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์ 21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารไก่เนื้อ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและควบคุมโรค จึงได้มีการศึกษาและทดสอบสารหลายชนิดเพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ เช่น อาหารเสริมชีวนะ (prebiotics) กรดอินทรีย์ (organic acids) สมุนไพร (herbs) และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงสารเสริมชีวนะ (probiotics) หรือโพรไบโอติคก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เสริมในอาหารไก่เนื้อ เนื่องจากโพรไบโอติคมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ โดยการแย่งที่เกาะหรือแย่งอาหารหรือทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เป็นการช่วยลดสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นผลิตขึ้น ผลิตเอนไซม์ที่มีผลในการทำลายสารพิษในอาหารหรือที่เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษผลิตขึ้น รวมถึงมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิต้านทานของสัตว์ด้วย ทั้งนี้จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และพบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก นอกจากจะมีบทบาทในป้องกันการติดเชื้อในทางเดินอาหาร กระตุ้นการเจริญเติบโตแล้วยังมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าจุลินทรีย์ *L. acidophilus, L. reuteri* และ *L. salivarius* สามารถเพิ่มการแสดงออกของ interleukin (IL)-1β ในเซลล์ม้าม และมีความสามารถในการกระตุ้น T helper (Th)-1 type cytokine expression โดยกลไกการสื่อสารกับเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในชั้นใต้เยื่อบุลำไส้ (gut-associated lymphocyte tissue, GALT) เกิดการสร้างสารป้องกันและกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Brisbin et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริม *Lactobacillus* ในอาหารสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดไก่ได้ (Panda et al., 2006, Ramasamy et al. 2010) อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่าการผลิตจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติคควรทำการคัดแยกมาจากทางเดินอาหารของสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสามารถคัดแยกจากท่อทางเดินอาหารและนำมาใช้ในสัตว์เดียวกันได้ จะช่วยลดปัญหาเรื่องความจำเพาะเจาะจงระหว่างตัวสัตว์และสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ได้มากกว่า (Morelli, 2000) ซึ่งในกระบวนการคัดเลือกจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารสัตว์ มีปัจจัยที่ควรพิจารณาหลายประการร่วมกัน ได้แก่ บริเวณที่ทำการคัดแยก รวมไปถึงคุณสมบัติที่สำคัญของโพรไบโอติคที่ต้องการ เช่น ความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมในทางเดินอาหาร ความสามารถในการยึดเกาะผนังทางเดินอาหาร ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การลดคอเลสเตอรอล เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้น การศึกษาและวิจัยเพื่อหาโพรไบโอติคที่มีประโยชน์ในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อน่าจะสามารถแก้ปัญหาจากมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามโพรไบโอติคที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์โดยส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งโพรไบโอติคที่มีประสิทธิภาพควรได้จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากสัตว์ที่เลี้ยงในสิ่งแวดล้อมและอาหารที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นหากประเทศไทยมีการผลิตโพรไบโอติคขึ้นใช้เองได้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงไก่เนื้อของประเทศ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและประเมินคุณสมบัติของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่ได้จากท่อทางเดินอาหารของไก่เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติคในไก่เนื้อ โดยประเมินจาก

คุณสมบัติของโพรไบโอติค คือ ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเป็นกรดและเกลือน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะกับผนังเซลล์ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ความไวต่อยาปฏิชีวนะ และความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติคจากท่อทางเดินอาหารของไก่เนื้อ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและคุณสมบัติในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่เนื้อ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะนำเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของไก่มาใช้ในรูปของโพรไบโอติคเพื่อเสริมในอาหารไก่เนื้อ โดยประเมินจากคุณสมบัติของโพรไบโอติค ได้แก่ ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเป็นกรดและเกลือน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะกับผนังเซลล์ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ความไวต่อยาปฏิชีวนะ และความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล โดยคาดหวังว่าความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อได้

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่น่าจะสามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติคในอาหารไก่เนื้อได้ โดยการใช้ในระดับที่เหมาะสมน่าจะส่งผลดีต่อสัตว์ในแง่ของการป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโต กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ปรับสมดุลประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ลดปริมาณคอเลสเตอรอล เพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น และลดการขับออกของแอมโมเนียได้

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้องค์ความรู้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ได้มาซึ่งโพรไบโอติคที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารเสริมในอาหารไก่เนื้อรวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์อื่น เพื่อเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตหรือการป้องกันโรคให้ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้ยังสามารถใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการวิจัย เพื่อพัฒนาในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะในระดับที่สูงขึ้นต่อไป
2. เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่มีทางเลือกในการใช้สารเสริม เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคของไก่เนื้อที่เป็นผลมาจากมาตรการยกเลิกการเสริมยาปฏิชีวนะในอาหาร ซึ่งโพรไบโอติคจะช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารส่งเสริมให้ไก่มีสุขภาพแข็งแรง นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มศักยภาพการผลิตของอุตสาหกรรมไก่เนื้อให้โดยอยู่บนพื้นฐานของการผลิตอาหารปลอดภัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โพรไบโอติค หรือสารเสริมชีวนะ คือ รูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต รูปแบบเซลล์ตาย และส่วนประกอบของจุลินทรีย์ซึ่งส่งผลต่อร่างกายสัตว์ที่ถูกอาศัย โดยการช่วยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Fuller, 1989) จุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารซึ่งพบว่ามีประโยชน์ต่อร่างกายของสัตว์ โดยการปรับสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และเสริมสร้างสุขภาพลำไส้ของสัตว์ ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยกลไกดังนี้

2.1 บทบาทของโพรไบโอติคในการเสริมสร้างสุขภาพลำไส้

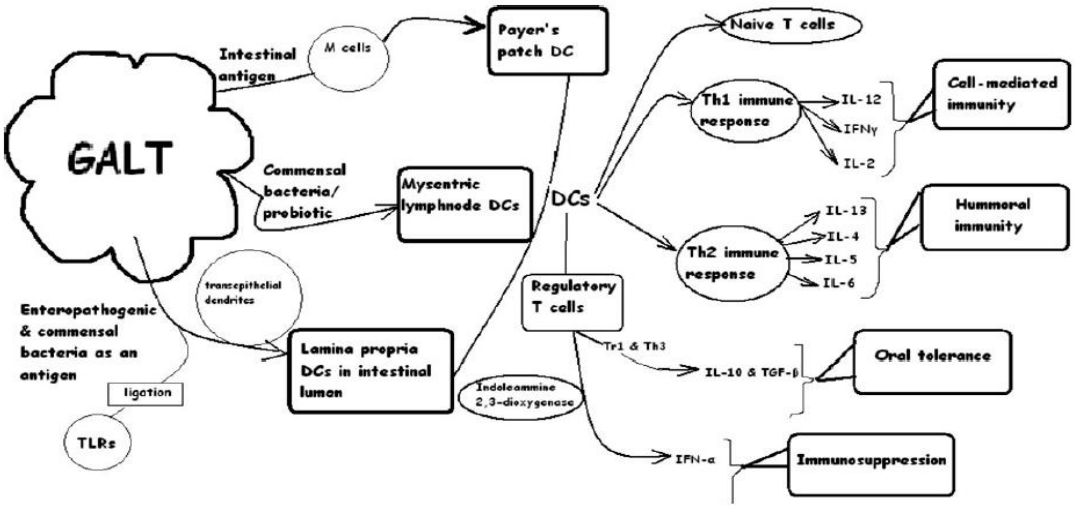
โพรไบโอติคสามารถปรับปรุงสมดุลประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ได้หลากหลายกลไก เช่น สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ โดยการแย่งพื้นที่ยึดเกาะ (competitive inhibition) บริเวณผนังลำไส้ของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic bacteria) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการยึดเกาะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของผนังเซลล์ (cell surface hydrophobicity) ของจุลินทรีย์โพรไบโอติค และความจำเพาะเจาะจงระหว่างโปรตีนบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์กับเยื่อบุผิวลำไส้ นอกจากนี้แล้วจุลินทรีย์โพรไบโอติคยังสามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น สารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) อีกทั้งจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มีการผลิตกรดแลคติค (lactic acid) และกรดไขมันสายสั้น เช่น กรดอะซิติก (acetate acid) กรดโพรพิโอนิก (propionate acid) และกรดบิวทิริก (butyrate acid) เป็นต้น กรดไขมันสายสั้นเหล่านี้จะถูกดูดซึมไปยังเยื่อบุเซลล์ (epithelial cells) ของลำไส้ ทำให้ pH ในลำไส้เล็กส่วนท้ายลดลง ซึ่งระดับ pH ที่ต่ำจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดบิวทิริคสามารถป้องกันการเข้ายึดเกาะและการตั้งถิ่นฐานของเชื้อโรค ช่วยลดโอกาสการติดเชื้อ และลดความรุนแรงของการติดเชื้อได้ อีกทั้งกรดไขมันสายสั้นเหล่านี้ยังช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ *Enterobacteriaceae* ในซีกัม (caecum) และเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในไก่เนื้อ (Fooks et al.,2002; Olnood et al., 2015)

2.2 บทบาทของโพรไบโอติคในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค

จุลินทรีย์โพรไบโอติค สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ได้ ทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันจำเพาะ (adaptive immunity) (ภาพที่ 2.1) โดยการสื่อสารกับเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในชั้นใต้เยื่อบุลำไส้ (gut- associated lymphocyte tissue, GALT) ซึ่งจุลินทรีย์จะจับกับตัวรับ toll-like receptors (TLRs) บริเวณเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ โดย DCs เซลล์บริเวณลำไส้จะมีความสามารถในการกระตุ้น naïve T และ helper T-cell ในการควบคุม Th1 หรือ Th2 โดยการตอบสนองภูมิคุ้มกัน Th1 ขึ้นอยู่กับความสามารถของ DCs ในการผลิต interleukin (IL) -12 ซึ่ง interferon (IFN) -γ และ IL-2 ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated ส่วน Th2 จะสามารถกระตุ้นการหลั่ง IL-4, IL-5, IL-6,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

IL-13 และกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral การเหนี่ยวนำของ TR1 Th3 เซลล์ regulatory T cells จะทำให้เกิดการหลั่ง IL-10 หรือ transforming growth factor (TGF)- β (Ashraf and Shah, 2014)



ภาพที่ 2.1 บทบาทของ gut-associated lymphoid tissues (GALT) ในระบบภูมิคุ้มกัน
ที่มา: Ashraf and Shah (2014)

2.3 บทบาทของโพรไบโอติคในการลดคอเลสเตอรอล

คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของโพรไบโอติคคือความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล ซึ่งสามารถลดคอเลสเตอรอลได้หลายวิธีการ วิธีการหนึ่งคือ โดยการผลิต bile salt hydrolase โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะเข้าไปย่อย glycin หรือ taurin-conjugated bile salts ให้เป็นกรดอะมิโนและน้ำดีอิสระ (free bile salts) ซึ่งจะมีความสามารถในการละลาย และประสิทธิภาพในการดูดกลับเข้าสู่ผนังลำไส้เล็กต่ำกว่าในรูป conjugated bile salt ส่งผลให้มีการขับทิ้งของน้ำดีออกไปกับมูลเพิ่มขึ้น ดังนั้นการ deconjugation ของน้ำดีโดยโพรไบโอติค ส่งผลให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง เนื่องจากการเพิ่มปริมาณความต้องการคอเลสเตอรอลในกระบวนการสังเคราะห์น้ำดี (De novo synthesis) เพื่อทดแทนน้ำดีที่ถูกขจัดออกไป (Miremadi et al.,2014) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติคยังสามารถขจัดคอเลสเตอรอลโดยการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ (cholesterol assimilation) เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม และจุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถในการยึดเกาะคอเลสเตอรอลบนผนังเซลล์ (incorporated into cell wall) (Kimoto et al., 2002) จากกลไกที่กล่าวมาข้างต้นความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลจึงน่าจะเป็นหลักในการคัดเลือกอีกข้อหนึ่งเพื่อใช้คัดเลือกโพรไบโอติคเพื่อนำมาใช้ในอาหารสัตว์ปีก

2.4 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่มีจำนวนประมาณ 900 สปีชีส์ ซึ่งนอกจากจะช่วยในการย่อยอาหารแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตและส่งเสริมสุขภาพสัตว์ ระบบทางเดินอาหารของไก่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนต้นประกอบด้วยกระเพาะพัก (crop) กระเพาะแท้ (proventriculus) และกระเพาะบด (gizzard) โดยในกระเพาะพักจะเป็นถุงที่เป็นส่วนหนึ่งของหลอดอาหาร

เป็นบริเวณที่มีการหมักได้เล็กน้อย และได้ผลิตภัณฑ์หลังการหมักเป็นกรดแลกติก (lactic acid) ส่วนบริเวณกระเพาะแท้จะมีการหลั่งเอนไซม์และกรดไฮโดรคลอริกเพื่อย่อยโปรตีน และมีการบดที่บริเวณกระเพาะบด ซึ่งในส่วนของกระเพาะพักนั้นมีสภาวะเป็นกรดจากกรดแลกติก ซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ *Lactobacillus* จึงทำให้บริเวณกระเพาะพักสามารถป้องกันเชื้อก่อโรคได้ ในส่วนของลำไส้เล็กนั้นเป็นบริเวณที่มีการย่อยและดูดซึมสารอาหาร โดยบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นบริเวณที่มีหลั่งเอนไซม์และน้ำดี ทำให้มีปริมาณของจุลินทรีย์อยู่น้อยมาก ในส่วนของลำไส้เล็กส่วนกลาง มี *Lactobacillus* และ *Streptococcus* จำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของลำไส้เล็กส่วนปลาย เป็นบริเวณที่พบความหลากหลายของ *Lactobacillus* มากที่สุด ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดบิวทีริก (butyrate producing bacteria) ซึ่งมีความสำคัญในการส่งเสริมการดูดซึมและการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ และสมรรถนะการเจริญเติบโต สำหรับในส่วนของซีกัมเป็นบริเวณที่มีความสำคัญในการดูดกลับน้ำ การหมักย่อยเยื่อใย และแป้ง พบการตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย โดยเฉพาะในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนเล็กน้อย (obligate anaerobe) เช่น *Bifidobacterium, Clostridium และ Bacteroidetes* (Deusch et al., 2015) จุลินทรีย์เหล่านี้มีการหมักย่อยอาหารและมีการผลิตกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดไขมันที่ระเหยได้ เช่น กรดแลคติค อะซีติค โพรพิโอนิค และบิวทีริค ซึ่งช่วยลด pH ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับการขยายตัวของเชื้อก่อโรค จากความหลากหลายของสภาพแวดล้อมและจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่นี้ หากต้องพิจารณาเลือกคัดแยกจุลินทรีย์แลกโตบาซิลัสและบิฟิโดแบคทีเรียมเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค จึงควรคัดแยกจากบริเวณลำไส้ส่วนท้าย เนื่องจากบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีการดูดซึมอาหาร การหมักย่อยเยื่อใย และแป้ง จุลินทรีย์ในบริเวณนี้จึงมีบทบาทต่อสุขภาพ และการเจริญเติบโตของตัวสัตว์มากกว่าบริเวณอื่น

2.5 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค

โพรไบโอติคส่วนใหญ่มักคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ซึ่งจะทำให้การนำไปใช้มีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับโพรไบโอติคที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ อย่างไรก็ตามการพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโพรไบโอติค ทั้งในด้านการทนทานต่อสภาวะแวดล้อมในทางเดินอาหาร ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้เป็นโพรไบโอติคในอาหารสัตว์ จึงจำเป็นจะต้องมีหลักการคัดเลือก ดังนี้

1) การประเมินความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดีของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร

ความสามารถในการทนกรดมีผลต่อคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติค เนื่องจากการนำจุลินทรีย์ไปใช้เพื่อเป็นโพรไบโอติค จุลินทรีย์จะต้องมีชีวิตรอดผ่านทางเดินอาหารส่วนต้นและขยายจำนวนประชากรที่ทางเดินอาหารส่วนท้าย ดังนั้นจุลินทรีย์จะต้องมีความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร (pH 2–3) และทนต่อเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็ก (pH = 5–7) จากการรวบรวมเอกสารพบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตรอดใน pH ที่เป็นกรดได้ โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณกระเพาะพักและลำไส้ส่วนท้ายมีความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมในทางเดินอาหารได้สูง (Taheri et al.,2009; Ehrmann et al.,

2002; Heravi et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนต้นมาได้จะต้องสามารถตั้งถิ่นฐานบริเวณลำไส้ส่วนท้ายได้

2) ความสามารถในการยึดเกาะผนังทางเดินอาหาร

ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของโพรไบโอติคเป็นกลไกกำจัดเชื้อก่อโรค โดยการแย่งพื้นที่ยึดเกาะจุลินทรีย์ก่อโรคบริเวณผนังลำไส้ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการยึดเกาะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติค (cell surface hydrophobicity) จากการรวบรวมเอกสารพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีผนังเซลล์ที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ส่งผลให้ความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้สูงขึ้นตามไปด้วย โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากบริเวณซีกัมมีความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้สูงที่สุด (Taheri et al., 2009; Ehrmann et al., 2002; Heravi et al., 2011)

3) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ที่สำคัญ เช่น *Clostridium* spp. *E. coli* และ *Salmonella* spp. เชื้อเหล่านี้หากมีปริมาณที่สูง จะทำให้ลำไส้เกิดภาวะเสียสมดุล ไก่โตช้า แคระแกรน ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ และมีอาการท้องเสียเรื้อรัง เชื้อโรคเหล่านี้มีกลไกทำให้ลำไส้เกิดการระคายเคืองและอักเสบโดยปกติร่างกายไก่มีกลไกการคัดหลั่งสารเพื่อกำจัดเชื้อโรค แต่มีผลทำให้ปริมาณของเหลวในลำไส้สูงขึ้น เกิดการถ่ายเหลว ทำให้วัสดุปูรองชื้นแฉะ เกิดก๊าซแอมโมเนียในโรงเรือนสูงขึ้น มีผลระคายเคืองต่อเยื่อบุตาและระบบทางเดินหายใจ เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่น ๆ ได้ง่าย และปริมาณก๊าซแอมโมเนียที่สูงอาจไหม้ฝ่าเท้าหรือหน้าอก ทำให้คุณซากคุณภาพลดลง นอกจากนี้วัสดุรองพื้นที่ชื้นแฉะ ยังเป็นแหล่งเพาะพันธุ์เชื้อโรค ตลอดจนเกิดการเพาะตัวของแมลงวัน ซึ่งเป็นพาหะแพร่เชื้อโรคที่สำคัญในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ควรต้องมีในจุลินทรีย์โพรไบโอติค จากการรวบรวมเอกสารพบว่า *L. salivarus* ที่แยกได้จากบริเวณกระเพาะพัก มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* และ *Salmonella* ได้สูงสุด โดยสามารถวัดได้จากบริเวณ radius of inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อก่อโรค (Heravi et al. , 2011) อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ยังสามารถวัดได้จากความสามารถในการรวมกับเชื้อก่อโรค เป็นกลไกของ bacteriocin กับเชื้อก่อโรคในการจำกัดเชื้อก่อโรค ซึ่งพบว่า *L. salivarius* TMW 1.992 และ L. *reuteri* TMW 1.974 ใช้เวลาในการเข้าจับเชื้อโรค *E. coli* และ *Salmonella enteritis* น้อยกว่า จุลินทรีย์ตัวอื่นซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีกว่า

2.6 การเสริมโพรไบโอติคในอาหารต่อการผลิตสัตว์ปีก

ผลของโพรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

ผลของการเสริมโพรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อแสดงไว้ในตารางที่ 2.1 โดย Jin et al. (1998) รายงานว่าการเสริม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 0.05–0.1% สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวและปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหาร Panda et al. (2006) พบว่าการเสริม *Lactobacillus sporogenes* ในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 100 mg/kg สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหาร นอกจากนี้การใช้ *Lactobacillus* spp. ผสมในน้ำดื่มไก่ก็พบว่าให้ผลต่อ

สมรรถนะการเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mountzouris et al. (2007) ที่ทำการศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติคที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus,* และ *Pediococcus* ในน้ำดื่มและอาหาร พบว่าน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารในกลุ่มที่ทำการเสริมโพรไบโอติคไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับ Mountzouris et al. (2010) และ Kim et al. (2012) ที่พบว่าการเสริมโพรไบโอติคที่ระดับ 10^7–10^9 cfu/kg นั้นสามารถเพิ่มน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และให้ผลที่ไม่แตกต่างจากไก่กลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะในอาหาร และสอดคล้องกับ Song et al. (2014) และ Shokryazdan et al. (2017) ที่พบว่าการเสริมโพรไบโอติคในอาหารนั้นสามารถเพิ่มน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตาม Olnood et al. (2015) พบว่าการเสริมโพรไบโอติคไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะในอาหารทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ที่นำมาใช้ทำการทดสอบจึงทำให้ผลที่ได้แตกต่างจากงานอื่น

ตารางที่ 2.1 ผลของโพรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

	Age (day)	BW (g)	FI (g)	FCR	References
Control	42	1,398^{b}	-	2.27^{a}	Panda et al.
100 mg probiotic/kg diet		1,508^{a}	-	1.97^{b}	(2006)
200 mg probiotic/kg diet		1,497^{a}	-	2.07^{ab}	
Control	42	2,215.5^{a}	4,012.3	1.81^{a}	Mountzouris
Probiotic in feed and water		2,275.9^{ab}	4,031.2	1.77^{ab}	et al. (2007)
Probiotic in feed		2,197.6^{a}	3,929.5	1.79^{ab}	
Antibiotic		2,314.0^{b}	4,001.4	1.73^{b}	
Control	42	2,195.1^{b}	-	1.96^{a}	Ramasamy
Lactobacillus cultures (LC)		2,295.4^{a}	-	1.78^{b}	et al. (2010)
Control	42	2,215^{b}	4,093	1.89^{a}	Mountzouris
10^7 cfu of probiotic/kg diet		2,343^{a}	4,114	1.80^{b}	et al. (2010)
10^8 cfu probiotic/kg diet		2,213^{b}	4,036	1.87^{a}	
10^9cfu probiotic/kg diet		2,217^{b}	4,161	1.92^{a}	
Antibiotic (2.5 mg avilamycin/kg)		2,280^{b}	4,022	1.80^{b}	

$^{a, b, c}$ Means within columns with different letters are significantly different ($p<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.1 ผลของโพรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (ต่อ)

	Age (day)	BW (g)	FI (g)	FCR	References
Control	35	1,641^{c}	2,948^{b}	1.8^{a}	Kim et al.
Antibiotic (20 mg avilamycin/kg diet)		1,801^{a}	3,090^{a}	1.72^{c}	(2012)
10^{7} cfu probiotic/kg diet /kg		1,721^{b}	3,045^{a}	1.77^{b}	
10^{8} cfu probiotic/kg diet		1,777^{a}	3,075^{a}	1.73^{c}	
10^{9}cfu/kgProbiotic		1,781^{a}	3,087^{a}	1.73^{c}	
Control	21-42		3,040	2.11^{a}	Song et al.
1.5 g probiotic/kg diet			3,080	2.02^{b}	(2014)
Control	35	2,334	4,038	1.73	Olnood et al.
Positive control		2,412	4,125	1.71	(2015)
Unidentified *Lactobacillus*		2,357	4,007	1.70	
L. salivarius		2,375	4,061	1.71	
L. cristapus		2,389	4,109	1.72	
L. jonhsonnii		2,358	4,079	1.73	
Control	42	2,017.3^{b}	3,818.9	1.96^{a}	Shokryazdan
L. salivarius 0.5 g/kg		2,164.3^{a}	3,654.1	1.72^{b}	et al. (2017)
L. salivarius 1 g/kg		2,274.5^{a}	3,705.6	1.67^{b}	

$^{a, b, c}$ Means within columns with different letters are significantly different ($p<0.05$)

ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์และกรดไขมันระเหยได้

ผลของการเสริมโพรไบโอติคในไก่เนื้อต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัม (ตารางที่ 2.2) พบว่าการเสริมโพรไบโอติคสามารถปรับปรุงประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารได้ โดยสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ จากการศึกษาของ Mountzouris et al. (2010) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 พบว่ากลุ่มที่มีการเสริมโพรไบโอติคในระดับ 10^{10}cfu/kg สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* และลดจำนวน coliform ในซีกัมได้เมื่อเทียบกับไก่กลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ (avilamycin 2.5 mg/kg) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mountzouris et al. (2007) ดังแสดงในภาพที่ 2.4 ซึ่งพบว่ากลุ่มที่มีการเสริมโพรไบโอติค สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus Bifidobacterium* และแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมในซีกัมได้เมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งสอดคล้องกับ Shokryazdan et al. (2017) (ภาพที่ 2.3) ที่พบว่าการเสริมโพรไบโอติคสามารถช่วยปรับปรุงประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารได้ โดยลดจำนวนเชื้อในกลุ่ม *E. coli* และเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากโพร

ไบโอติคในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* จะเข้าไปแย่งจับพื้นที่ผิวของผนังลำไส้ทำให้จุลินทรีย์ในกลุ่มก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ อีกทั้งจุลินทรีย์มีการผลิตกรดแลคติค (lactic acid) และกรดไขมันสายสั้น เช่น กรดอะซิติก (acetate acid) กรดโพรพิโอนิก (propionate acid) และกรดบิวทิริก (butyrate acid) เป็นต้น กรดไขมันสายสั้นเหล่านี้จะถูกดูดซึมไปยังเยื่อบุเซลล์ (epithelial cells) ของทางเดินอาหารทำให้ pH ในลำไส้ลดลง ส่งผลให้จุลินทรีย์ในกลุ่มก่อโรคเจริญเติบโตได้ (Mountzouris et al., 2007; Shokryazdan et al., 2017)

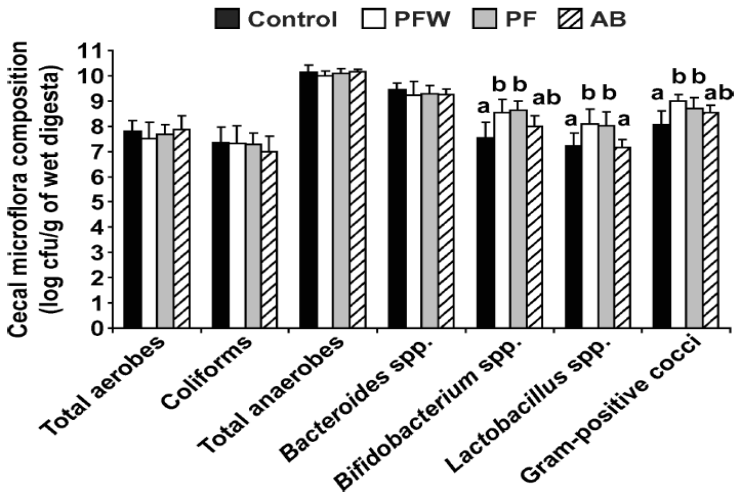
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.2 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์

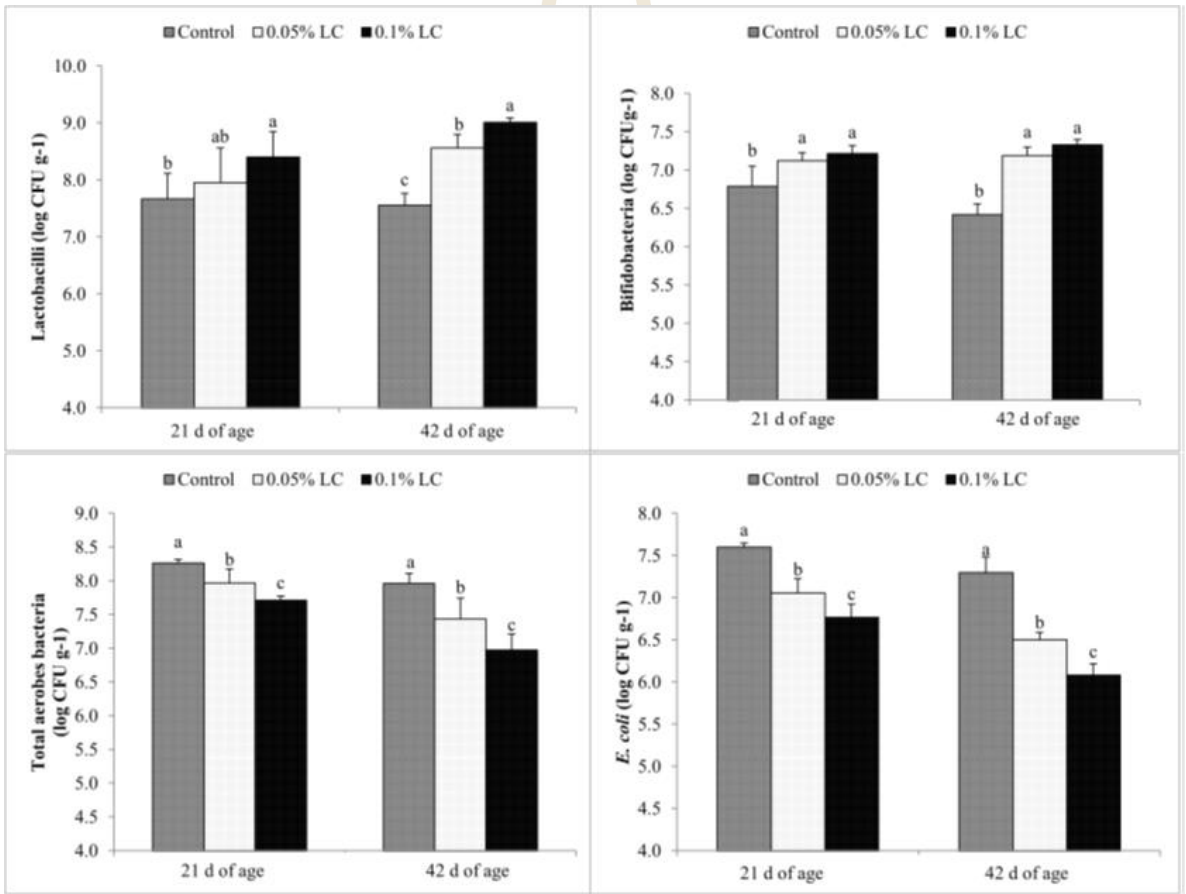
	Age (day)	Total anaerobic bacteria	*Lactobacillus* spp.	*Bifidobacterium* spp.	*Clostridium* spp.	Coliforms	References
Control	21	9.96	-	8.81	7.82[a]	1.8[a]	Kim et al. (2012)
Antibiotic (20 mg Avilamycin/kg)		9.88	-	8.8	7.28[c]	1.72[c]	
10^7 cfu probiotic/kg		9.94	-	8.9	7.51[b]	1.77[b]	
10^8 cfu probiotic/kg		9.93	-	9.89	7.45[bc]	1.73[c]	
10^9cfu probiotic/kg		9.94	-	8.83	7.51[bc]	1.73[c]	
Control	35	10.18	-	8.84	7.19[c]	7.36[c]	
Antibiotic (20 mg Avilamycin/kg)		10.09	-	8.91	7.93[a]	7.96[a]	
10^7 cfu probiotic/kg		10.14	-	8.94	7.56[b]	7.65[a]	
10^8 cfu probiotic/kg		10.18	-	8.89	7.48[b]	7.52[bc]	
10^9cfu probiotic/kg		10.21	-	8.92	7.44[b]	7.53[bc]	
Control	21-42	-	7.26[b]	6.51[b]	6.39[a]	5.38	Song et al. (2014)
1.5 g probiotic/kg		-	8.04[a]	7.00[a]	5.58[b]	4.92	

[a, b, c] Means within columns with different letters are significantly different ($p<0.05$)

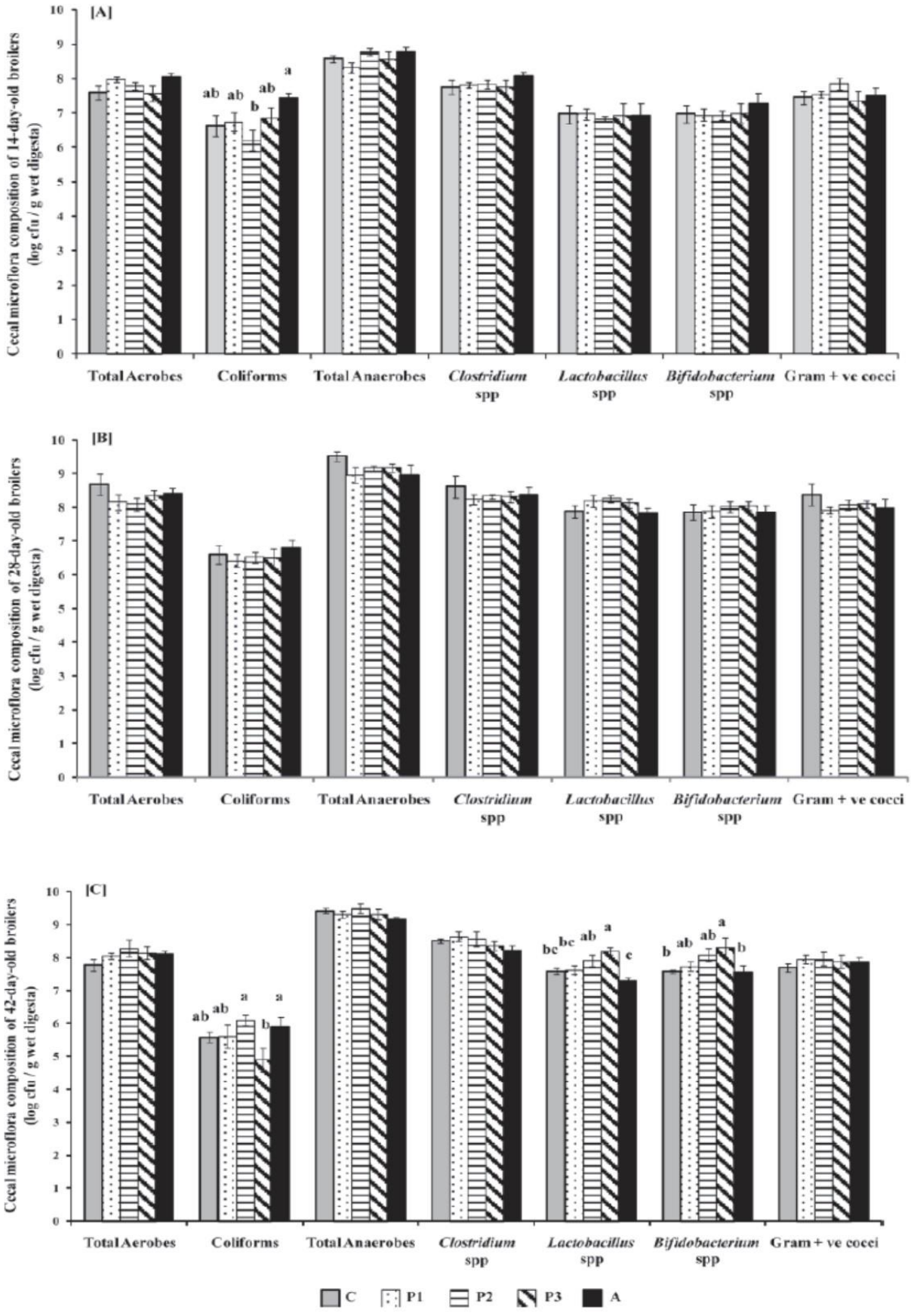
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.2 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ
ที่มา: Mountzouris et al. (2007)



ภาพที่ 2.3 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ
ที่มา: Shokryazdan et al. (2017)



ภาพที่ 2.4 ผลของโพรไบโอติคต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ

ที่มา: Mountzouris et al. (2010)

ผลของโพรไบโอติคต่อระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด

สำหรับผลของ *Lactobacillus* spp. ต่อการลดคอเลสเตอรอล (ตารางที่ 2.3) พบว่าการเสริม Lactobacillus ในอาหารที่ระดับ 0.05–0.2% สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอล (Jin et al., 1998) และ total cholesterol, LDL, VLDL และ triglycerides (Panda et al., 2006; Ramasamy et al. 2010; Shokryazdan et al., 2017) ในเลือดไก่ได้ เนื่องจาก Lactobacillus สามารถผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase เกิดการเปลี่ยนน้ำดีให้อยู่ในรูปของ deconjugation bile salt ทำให้น้ำดีในรูปแบบดังกล่าวมีความสามารถในการละลาย มีการดูดกลับ (reabsorbe) เข้าสู่ผนังลำไส้เล็กส่วนปลายต่ำกว่าน้ำดีในรูป conjugated bile salt น้ำดีดังกล่าวจึงถูกขับทิ้งพร้อมกับมูล ส่งผลให้ร่างกายต้องการคอเลสเตอรอลเพื่อสังเคราะห์น้ำดี (De novo synthesis) เพิ่มขึ้น อีกทั้งน้ำดีอิสระ (free bile acid) มีประสิทธิภาพในการละลายและดูดซึมไขมันในทางเดินอาหารต่ำลง จึงส่งผลให้ปริมาณ LDL, VLDL และ triglycerides ในเลือดลดต่ำลง เนื่องจาก LDL และ VLDL ทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลในเลือด นอกจากนี้แล้วยังพบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติคยังสามารถขจัดคอเลสเตอรอล โดยการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (cholesterol assimilation) และความสามารถในการเกาะของคอเลสเตอรอลบนผนังเซลล์ (incorporated into cell wall) (Kimoto et al., 2002; Miremadi et al., 2014)

ตารางที่ 2.3 ผลของโพรไบโอติคต่อคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด

	Age (day)	Total Cholesterol (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	References
Control	42	126.70[a]	74.27	39.46[a]	64.89[a]	Panda et al. (2006)
100 mg probiotic/kg diet		119.08[b]	72.24	35.02[b]	59.14[b]	
200 mg probiotic/kg diet		119.49[b]	72.20	35.49[b]	59.10[b]	
Control	42	143.10[a]	80.01	47.66[a]	77.19[a]	Ramasamy et al. (2010)
Lactobacillus cultures (LC)		132.52[b]	87.19	33.73[b]	58.03[b]	
Control	42	133.58[a]	66.78	56.97[a]	52.64[a]	Shokryazdan et al. (2017)
0.5 *L. Salivarius* g/kg diet		109.30[b]	68.05	41.79[b]	40.64[b]	
1 *L. salivarius* g/kg diet		107.06[b]	70.62	42.97[b]	39.73[b]	

[a, b] Means within columns with different letters are significantly different ($p<0.05$)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. จากลำไส้ไก่เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค โดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

3.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อ (Sample collection)

ทำการสุ่มเลือกไก่เนื้อและไก่ไข่ทางการค้าที่มีสุขภาพดี (จำนวน 20 ตัว) ทำการสลบและฆ่า เพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของลำไส้เล็กส่วนปลาย และส่วนของซีกัม โดยเก็บตัวอย่างไว้ในขวดปลอดเชื้อ (ขนาด 50 มิลลิลิตร) ที่มี phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 30 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในถังที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ และรีบนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.2 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทำการคัดแยก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างลำไส้ของไก่ ดัดแปลงตามวิธีการของ Kim et al. (2007); Taheri et al. (2009); Herravi et al. (2011) โดยทำการเจือจางตัวอย่างที่ระดับต่าง ๆ ตามความเหมาะสม โดยใช้ phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) และนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย Man Rogosa Sharps (MRS) และ Man Rogosa Sharps (MRS) ที่มี L-cysteine hydrochloride 0.05% หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยการย้อมสีแกรมคือ เตรียมสไลด์ที่สเมียร์ด้วยเชื้อแลกโตบาซิลัส ทิ้งให้แห้งแล้วจึงนำมาทำ heat fix หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา จากนั้นชะด้วย Gram's iodine และหยด Gram's iodine ให้ท่วมรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที เท Gram's iodine ทิ้ง และล้างด้วย decolorizer เป็นเวลา 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ จากนั้นหยดด้วยสี safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ซับบริเวณรอยสเมียร์วางทิ้งให้แห้ง ส่องดูลักษณะและการติดสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า จากคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก และมีรูปร่างท่อนที่มีลักษณะไม่แน่นอน เช่น *Lactobacillus* spp. ลักษณะแบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะเป็นรูปแท่ง ส่วน *Bifidobacterium* spp. จะมีรูปร่างเป็นกิ่งก้านสาขา แท่งสั้น เกาะกันเป็นกลุ่ม หรือแท่งยาวเรียวตรงปลายเป็นกระเปาะคล้ายกระบองหรือมีง่ามเป็นรูปตัว Y เชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวจะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อทำการเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80 °C ต่อไป เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติคจะนำมาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus*

3.3 การทดสอบความสามารถในทนทานต่อกรดและน้ำดี

เชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้จะนำมาศึกษาการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหาร โดยปรับ pH ที่ระดับต่าง ๆ ดังนี้ pH 2, 2.5, 3 และ 3.5 วัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการนับโคโลนีบนอาหารแข็ง เชื้อ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ที่มีชีวิตจำนวนมากกว่า log 2 cfu/ml เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (pH 6) จะนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป

สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ข้างต้นจะนำมาบ่มในอาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH ให้เป็นกรดและเป็นกลาง ในสภาวะที่ไม่มีและมีเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำมาทดสอบการการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเกลือน้ำดี

3.4 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะลำไส้

วิธีการทดสอบคุณสมบัติในการยึดเกาะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ชนิด Caco-2 ดัดแปลงตามวิธีการของ Pennacchia et al. (2006) และ Maragkoudakis et al. (2006) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) ที่มี heat-inactivated fetal bovine serum 10% (v/v) 10 mM non-essential amino acid solution 1% และ penicillin และ streptomycin (5000 IU/ไมโครลิตร และ 5000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) 1% ใน 6 well plate โดยใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 48 ชั่วโมง จนเซลล์โตและยึดเกาะทั่วพื้นผิวของจานอาหาร จากนั้นทำการล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Non-supplemented DMEM ลงไปหลุมละ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีก๊าซ CO_2 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ใน PBS ที่ pH 7.2 จำนวน 2 รอบ และละลายเซลล์ที่ได้ด้วยอาหาร Non-supplemented DMEM ให้มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์ Caco-2 ครบ 1 ชั่วโมง จึงดูดอาหารเก่าออก และเติมสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นลงใน 12 well plate หลุมละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มีก๊าซ CO_2 5% เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารในหลุมออก และล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะกับ Caco-2 ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติม 0.05% Trion X-100 ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะทำให้สารละลายเซลล์และแบคทีเรียหลุดออกจากการยึดเกาะกับจานอาหาร นำสารละลายที่ได้นี้เจือจางและเกลี่ยบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน อ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และคำนวณอัตราการยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียในรูปของเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะ

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ (\% adhesion capacity)} = \frac{\text{จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เกาะกับเซลล์} \times 100}{\text{จำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น}}$$

3.5 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคสามารถทำได้โดยวิธี agar-well diffusion assay โดยเชื้อก่อโรคที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบไปด้วย *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. ทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธี ความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบไปด้วย ampicillin, tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin โดยละลายยาปฏิชีวนะในน้ำที่ความเข้มข้น 1–512 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ยาปฏิชีวนะแต่ละความเข้มข้นลงใน 96 well plate หลุมละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบ 180 ไมโครลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ 160 ไมโครลิตร และเชื้อ 20 ไมโครลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความสามารถในการเจริญของเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm บันทึกผลและแปลความหมาย โดยถ้าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะจะบันทึกในรูปของ Sensitive (S) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลางบันทึกเป็น Intermediate (I) and และไม่ไวต่อยา

3.7 การวัดความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์

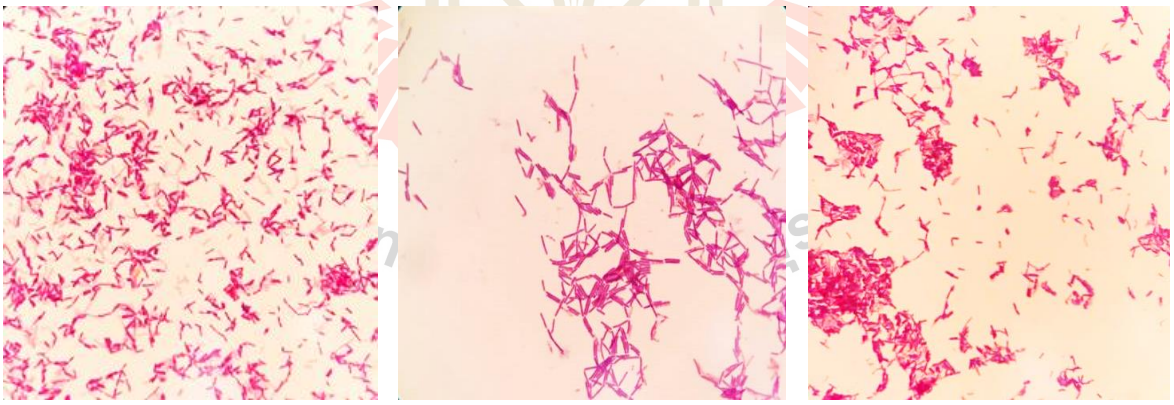
เตรียมคอเลสเตอรอล (stock solution of cholesterol) โดยใช้ water soluble cholesterol (polyoxyethanyl-cholesterol sebacate) (Sigma) จำนวน 30 มิลลิกรัม ละลายใน milli Q water 10 มิลลิลิตร กรองโดยใช้ filter-sterilized ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี bile salt oxgall (sigma) 0.30% และ stock solution of cholesterol 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร นำเชื้อที่ activated แล้วใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตัวอย่างจะถูกเก็บที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง 4000×g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ส่วนของคอเลสเตอรอลที่ต้องการวัดจะอยู่ในบริเวณของส่วนใส (supernatant) โดยปิเปตส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับ KOH (30% w/v) 1 มิลลิลิตร และเอทานอล 96% 2 มิลลิลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม milli Q water 2 มิลลิลิตร และ hexane 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่า (vortex) เป็นเวลา 1 นาที จะสังเกตเห็นการแยกชั้นของสารออกเป็น 2 ชั้น เก็บส่วนใสชั้นบนสุด นำไปทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน เติม o-phthalaldehyde reagent (OPA 50 มิลลิกรัมละลายใน glacial acetic acid100 มิลลิลิตร; Sigma) นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติมกรดซัลฟิวริก 0.5 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยใช้ UV-spectrophotometer คำนวนปริมาณความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลในตัวอย่างได้โดยการใช้ standard curve ค่าความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์สามารถคำนวนได้จากสูตร (Miremadi et al., 2014)

$$\% \text{ of cholesterol removed} = (100\text{-residue cholesterol})/100 \times 100$$

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มแลคโตบาซิลัสจากท่อทางเดินอาหารไก่เนื้ออายุ 42 วัน จำนวน 10 ตัว และไก่ไข่อายุ 38 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว โดยทำการสลบและฆ่า เพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากลำไส้เล็กส่วนไอเลียม และส่วนของซีกัมทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสังเกตเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีกลมสีเหลือง โดยเลือกมาจำนวน 10 โคโลนีต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถแยกได้ทั้งหมด 200 โคโลนี จากนั้นนำมาทดสอบการติดสีแกรมและลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีเชื้อที่ติดสีแกรมบวกและมีลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่งจากทางท่อเดินอาหารไก่เนื้อจำนวน 50 โคโลนี และจากท่อทางเดินอาหารไก่ไข่จำนวน 60 โคโลนี จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อทำการเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ จากการวิเคราะห์พบว่าจากทั้งหมด 110 โคโลนีแยกได้เป็น 5 สปีชีส์ ดังนี้

1. *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741(T)
2. *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 (T)
3. *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T)
4. *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T)
5. *Lactobacillus saerimneri* DSM 16049 (T)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1 ความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี

จากการทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *L. acidophilus* CIP 76.13 (T) มีความทนทานต่อสภาะแวดล้อมที่เป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ตามด้วย *L. ingluviei, L. reuteri*, *L. salivarius* และ *L. saerimneri* ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีพบว่า *L. acidophilus, L. ingluviei* และ *L. reuteri*

สามารถเจริญได้ดีเมื่อบ่มในเกลือน้ำดี (ตารางที่ 4.2) ทั้งนี้ความสามารถในการทนกรดมีผลต่อคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติค เนื่องจากการนำจุลินทรีย์ไปใช้เพื่อผลิตเป็นโพรไบโอติค จุลินทรีย์จะต้องมีชีวิตรอดผ่านท่อทางเดินอาหารส่วนต้น และขยายจำนวนในท่อทางเดินอาหารส่วนท้ายได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จะต้องมีความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร (pH 2–3) และทนต่อเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็ก (pH = 5–7) จากการทดสอบจึงสามารถเป็นตัวชี้วัดได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้น่าจะสามารถผ่านสภาวะในกระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วนดูโอดีนัม และไปมีผลยังลำไส้ส่วนท้ายได้

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์หลังจากบ่มภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

สายพันธุ์	pH 2	pH 2.5	pH 3	pH 3.5
L. salivarius	18.00	16.04	21.20	39.20
L. reuteri	22.56	33.75	57.14	67.70
L. acidophilus	45.50	59.00	78.40	89.45
L. ingluviei	34.00	45.70	68.50	78.54
L. saerimneri	0.25	5.78	17.09	30.45

ตารางที่ 4.2 อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังจากบ่มภายใต้เกลือน้ำดี

สายพันธุ์	0.30% bile salt	1% bile salt
L. salivarius	++	+
L. reuteri	+++	++
L. acidophilus	+++	++
L. ingluviei	+++	++
L. saerimneri	+	+

หมายเหตุ: +++ หมายถึง เจริญได้ดี, ++ หมายถึง เจริญได้ปานกลาง, + หมายถึง เจริญได้น้อย

4.2 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะลำไส้

จากการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้ โดย *L. ingluviei* มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์สูงสุด ตามด้วย *L. acidophilus, L. salivarius, L. reuteri,* และ *L. saerimneri* ทั้งนี้การยึดเกาะเยื่อบุในทางเดินอาหาร เป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ หากจุลินทรีย์ขาดหรือบกพร่องในคุณสมบัติด้านการยึดเกาะ จุลินทรีย์ชนิดที่สามารถก่อโรคได้จะเข้ามาเกาะแทนที่และลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดดี ซึ่งกลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลกติก สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบจำเพาะ (receptor-specific blind) แบบใช้แรงวาลเดอวาลล์ (Val der Waals force) แบบใช้ประจุ (charge) และการจับกันของเซลล์กับตัวรับโดยการมีปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ (hydroprobic interaction) ซึ่งโดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะมีลักษณะ cell surface hydrophobicity มีผลทำให้ผิวเซลล์ไม่

ชอบน้ำ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิดออกมาบนผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม extracellular matrix molecules เช่น collagen, fibronectin และ vitronectin โดยโปรตีนเหล่านี้จะยึดเกาะกับเยื่อเมือกบนผนังลำไส้ได้ (ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์, 2554)

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของจุลินทรีย์บนผิวเซลล์ Caco-2

สายพันธุ์	% adhesion capacity
L. salivarius	47.77
L. reuteri	36.00
L. acidophilus	48.78
L. ingluviei	56.80
L. saerimneri	34.55

4.3 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากคัดแยก ซึ่งวัดจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) ของจุลินทรีย์ที่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ โดยยึดตามค่า breakpoint ของ Eucast ซึ่งค่าความเข้มต่ำสุดสังเกตได้จากเชื้อไม่เจริญเมื่อมองด้วยตาเปล่า ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทุกชนิดมีความไวต่อยา chloramphenicol และ สามารถต้านยา ampicillin, erythromycin และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline ปานกลาง ซึ่งการศึกษาก่อนหน้าพบว่า *Lactobacillus* มักดื้อต่อยา ampicillin ซึ่งถ้าเชื้อดื้อยาเหล่านี้มีการดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายในและสามารถพิสูจน์ได้ว่าไม่มีการถ่ายทอดยีนดื้อยานั้น ก็ยังจะสามารถพิจารณาใช้เป็นโพรไบโอติคได้ แต่ถ้าดื้อยานั้นเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น การได้รับยีนดื้อยาหรือระบุการดื้อยาอื่น ๆ และสามารถถ่ายทอดได้ก็จะไม่สามารถนำแบคทีเรียเหล่านั้นมาใช้เป็นโพรไบโอติคเพราะอาจจะเป็นสาเหตุของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาสู่แบคทีเรียชนิดอื่นโดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรค

ตารางที่ 4.4 ความไวต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

Strain	Ampicillin	Erythromycin	Tetracycline	Chloramphenicol
L. saerimneri	R	R	I	S
L. salivarius	R	R	I	S
L. reuteri	R	R	I	S
L. ingluviei	R	R	I	S
L. acidophilus	R	R	I	S

Sensitive (S) หมายถึงมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ; Intermediate (I) หมายถึงมีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง; และ Resistant (R) หมายถึงไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะ

4.4 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

จากการทดสอบความสามารถเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. Coli* และ *Salmonella* spp. มีเพียง *L. saerimneri* และ *L. reuteri* ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium perfringens* ได้

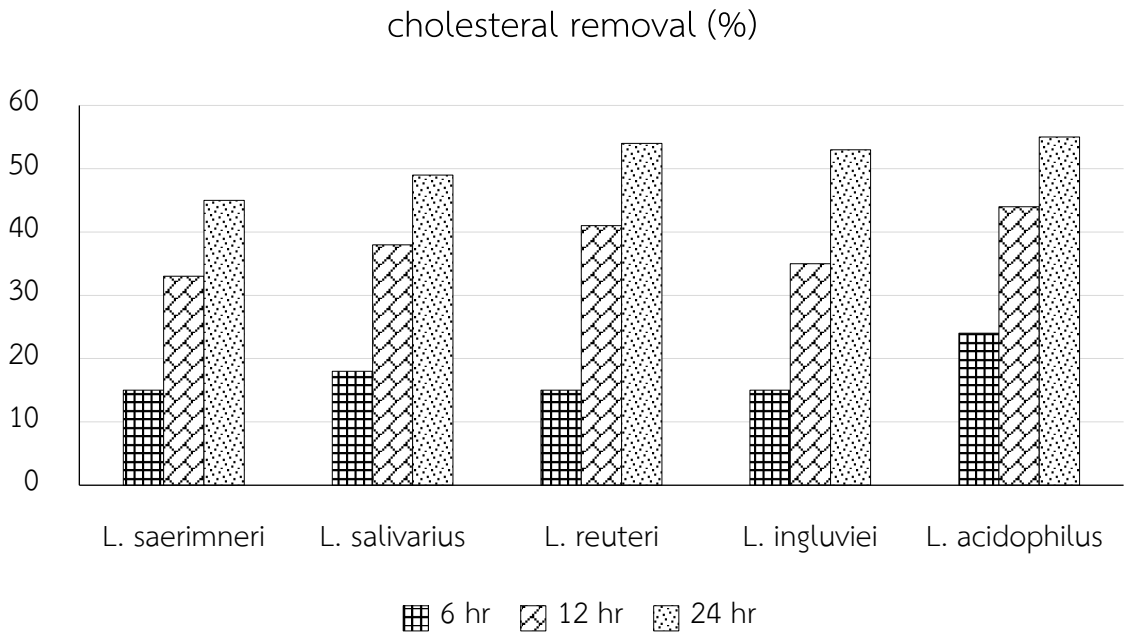
ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion

Strain	*E. Coli*	*Clostridium perfringens*	*Salmonella* spp.
L. saerimneri	+	-	+
L. salivarius	+	+	+
L. reuteri	+	-	+
L. ingluviei	+	+	+
L. acidophilus	+	+	+

-, no inhibition ; +, inhibition

4.5 ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์

การทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการลดคอเลสเตอรอล ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี oxgall 0.3% และวัดความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอล ดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าการดูดซึมคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วงระหว่าง 15–24%, 33–44% และ 45–63% ในระยะเวลาการบ่มที่ 6 , 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยพบว่า *L. acidophilus* มีความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอลสูงสุด รองลงมาคือ *L. reuteri* และ *L. ingluviei* ตามลำดับ ทั้งนี้ระดับคอเลสเตอรอลจะสัมพันธ์กับการเจริญของแบคทีเรีย คือเมื่อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นระดับคอเลสเตอรอลจะลดลง อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ทรีย์สามารถดูดซึมคอเลสเตอรอลมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้คอเลสเตอรอลจะเข้ามาจับกับพื้นผิวของเซลล์จุลินทรีย์บริเวณ peptidoglycan ซึ่งส่วนนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สามารถจับกับคอเลสเตอรอลได้ (Lye et al., 2010) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง



ภาพที่ 4.2 ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลของจุลินทรีย์

จากโพรไบโอติคที่คัดแยกได้ข้างต้น มีทั้งกลุ่มที่ได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 เช่น *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 (T) และ *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T) รวมถึงกลุ่มที่ยังไม่ได้รับการยอมรับให้ใช้ตามข้อกำหนดของประเทศไทยแต่ก็มีการอนุญาตให้ใช้แล้วในบางประเทศ เช่น *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741(T) ซึ่งก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์จำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะในการขยายจำนวนของเชื้อ อัตราการมีชีวิตรอดเมื่อผ่านกระบวนการผลิตอาหารสัตว์และระหว่างการจัดเก็บอาหารสัตว์ และการออกฤทธิ์ในร่างกายสัตว์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกและประเมินคุณสมบัติของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่ได้จากท่อทางเดินอาหารของไก่ เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติคในไก่เนื้อ จากการวิเคราะห์พบว่าจากทั้งหมด 110 โคโลนี แยกได้เป็น 5 สปีชีส์ดังนี้

1. *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741(T)
2. *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 (T)
3. *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T)
4. *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T)
5. *Lactobacillus saerimneri* DSM 16049 (T)

โดยคัดเลือกจากความสามารถในการทนต่อสภาวะในท่อทางเดินอาหาร ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอล โดยพบว่าจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* CIP 76.13 (T) และ *Lactobacillus ingluviei* DSM 15946 (T) มีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งในด้านทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและภายใต้เกลือน้ำดี ทั้งยังสามารถยึดเกาะกับผนังสำไส้ได้ดีอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus ingluviei* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในระดับปานกลาง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์. 2554. การประเมินสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ashraf, R., and N. P. Shah. 2014. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 54: 938–956.

Brisbin, J. T., J. Gong, P. Parvizi, and S. Sharif. 2010. Effects of Lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. Clinical and Vaccine Immunology 17: 1337–1343.

Deusch, S., B. Tilocca, A. Camarinha-Silva, and J. Seifert. 2015. News in livestock research—use of omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. Computational and Structural Biotechnology Journal. 13: 55–63.

Ehrmann, M., P. Kurzak, J. Bauer, and R. Vogel. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. Journal of Applied Microbiology. 92: 966–975.

Fooks, L., and G. R. Gibson. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition. 88: 39–49.

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

Heravi, R., H. Kermanshahi, M. R. Nassiri, and A. Heravi Moussavi. 2011. Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. African Journal of Microbiology Research. 5: 1858–1868.

Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, M. A. Ali, and S. Jalaludin. 1998. Effects of adherent Lactobacillus cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acid in broiler. Animal Feed Science and Technology. 70: 197–209.

Kim, J., S. Ingale, Y. Kim, K. Kim, S. Sen, M. Ryu, J. Lohakare, I. Kwon, and B. Chae. 2012. Effect of supplementation of multimicrobe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 96: 618–626.

Kim, P. I., M. U. Jung, Y. H. Chang, S. Kim, S. J. Kim, and Y. H. Park. 2007. Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract. Applied Microbiology and Biotechnology. 74: 1103–1111.

Kimoto, H., S. Ohmomo, and T. Okamoto. 2002. Cholesterol removal from media by lactococci. Journal of Dairy Science. 85: 3182–3188.

Lye, H. S., G. R. Rahmat-Ali, and M. T. Liong. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal. 20(3): 169–175.

Maragkoudakis, P. A., G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot, and E. Tsakalidou. 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. International Dairy Journal. 16(3): 189–199.

Miremadi, F., M. Ayyash, F. Sherkat, and L. Stojanovska. 2014. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. Journal of Functional Foods. 9: 295–305.

Morelli, L. 2000. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Current Issues in Intestinal Microbiology. 1: 59–67.

Mountzouris, K, P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. Poultry Science. 86: 309–317.

Mountzouris, K, P. Tsirtsikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzma yr, and K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poultry Science. 89(1): 58–67.

Olnood, C. G., S. S. Beski, M. Choct, and P. A. Iji. 2015. Novel probiotics: their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. Animal Nutrition. 1: 184–191.

Panda, A. K., V. R. S. Rama, V. L. N. Raju Mantena, and A.S. Shrama. 2006. Dietary supplementation of Lactobacillus sporogenes on performance and serum biochemical lipid profile of broiler chickens. Poultry Science. 43: 235–240.

Pennacchia, C., E. Vaughan, and F. Villani. 2006. Potential probiotic Lactobacillus strains from fermented sausages: further investigations on their probiotic properties. Meat science. 73: 90–101.

Ramasamy, K., N. Abdullah, M. C. Wong, C. Karuthan, and Y. W. Ho. 2010. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by Lactobacillus strains used as probiotics in chickens. Journal of the Science of Food and Agriculture. 90(1): 65–69.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Shokryazdan, P., M. F. Jahromi, J. B. Liang, K. Ramasamy, C. C. Sieo, and Y. W. Ho. 2017. Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. PloS ONE 12(5): e0175959.

Song, J., K. Xiao, Y. Ke, L. Jiao, C. Hu, Q. Diao, B. Shi, and X. Zou. 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. Poultry Science. 93: 581–588.

Taheri, H., H. Moravej, F. Tabandeh, M. Zaghari, and M. Shivazad. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Journal of Poultry Science. 88: 1586–1593.

Tsitrsikos, P., I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition 1. Journal of Poultry Science. 89: 58–67.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ – สกุล: นางสาว สุทิศา เข็มผะกา

Miss Sutisa Khempaka

2. หมายเลขบัตรประชาชน: 3 3201 00126 85 7

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมเลขหมายโทรศัพท์ และ E- mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422-4572 โทรสาร 0-4422-4150
E- mail: khampaka@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	คณะ	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา/ปี	ประเทศ
ป. ตรี	วท.บ. วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1)	เกษตรศาสตร์	เกษตรศาสตร์	ม.อุบลราชธานี, 2541	ไทย
ป. โท	วท.ม. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เกษตรศาสตร์	สัตวศาสตร์	ม. ขอนแก่น, 2545	ไทย
ป. เอก	Ph.D. (Agricultural Science)	เกษตรศาสตร์	Animal Nutrition and Feed Science	Gifu University, 2006	Japan

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

6.1 โภชนศาสตร์สัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง (Non-ruminant Nutrition)

6.2 การผลิตสัตว์ปีก (Poultry production)

6.3 การผลิตสุกร (Swine Production)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : ดำเนินการวิจัยไปแล้ว 90%

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : ระดับพลังงาน โปรตีน และกรดอะมิโน ที่เหมาะสมสำหรับไก่ลูกผสมพื้นเมืองระดับสายเลือด 50%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : เรื่อง การใช้กากมันสำปะหลังร่วมกับส่าเหล้าเป็นวัตถุดิบอาหารสำหรับสุกร

7.3 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : ผลของการเสริมกรดอินทรีย์ต่อสุขภาพทางเดินอาหาร และสมรรถนะการผลิตของลูกสุกรหย่านม

7.4 หัวหน้าโครงการวิจัย : เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกสำหรับไก่ไข่

7.5 หัวหน้าโครงการวิจัย : เรื่อง การเพิ่มคุณภาพของกากมันสำปะหลังโดยการหมักด้วยเชื้อ *Aspergillus oryzae* เพื่อเป็นวัตถุดิบอาหารสำหรับไก่ไข่

7.6 หัวหน้าโครงการวิจัย : เรื่อง การใช้น้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ไทย (*Mentha cordifolia* Opiz.) เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารไก่เนื้อ

7.7 หัวหน้าโครงการวิจัย : เรื่อง การใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ในสูตรอาหารสำหรับไก่เนื้อ

7.8 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : การปรับปรุงคุณภาพของกากมันสำปะหลังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่สำหรับไก่เนื้อ

7.9 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : ผลของการเสริมกลูตามีนในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การพัฒนาของระบบทางเดินอาหาร และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ

7.10 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง : การใช้ไคตินจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (Peneaus monodon) เป็นสารเสริมชีวนะในอาหารไก่เนื้อ

7.11 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง : การทดสอบผลิตภัณฑ์การค้าของส่วนผสมสารสกัดหยาบจากพริกและสารฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสุกรขุน

7.12 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง : ผลของระดับน้ำมันปลาทะเลในอาหารและช่วงระยะเวลาการให้อาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 ในเนื้อไก่พื้นเมือง

7.13 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง : การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงฆ่าสุกร การขนส่งจากโรงฆ่าไปยังจุดจำหน่าย และแหล่งจำหน่ายเนื้อสุกร ในเขตจังหวัดนครราชสีมาและอุบลราชสีมา

7.14 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง : การสร้างสายพันธุ์ “ไก่เนื้อโคราช” เพื่อการผลิตเป็นอาชีพวิสาหกิจชุมชน

7.15 ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง : ผลของการเลี้ยงไก่พื้นเมืองแบบกึ่งปล่อยต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ปริมาณคอเลสเตอรอล และองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อ

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2006. Effect of shrimp meal on growth performance and digestibility in growing broilers. J. Poult. Sci. 43: 250–254.

Khempaka, S., M. Mochizuki, K. Koh, and Y. Karasawa. 2006. Effect of chitin in shrimp meal on growth performance and digestibility in growing broilers. J. Poult. Sci. 43: 339–343.

Khempaka, S., W. Molee, and M. Guillaume. 2009. Dried cassava pulp as an alternative feedstuffs for broilers: effect on growth performance, carcass traits, digestive organs and nutrient digestibility. J. Appl. Poult. Res. 18: 487–493.

Thongkratok, R., **S. Khempaka**, and W. Molee. 2010. Protein enrichment of cassava pulp using microorganisms fermentation techniques for use as an alternative animal feedstuff. J. Anim. Vet. Adv. 9(22): 2859–2862.

Khempaka, S., C. Chitsatchapong, and W. Molee. 2011. Evaluation of chitin and protein constituents in shrimp meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids and ammonia production in broilers. J. Appl. Poult. Res. 20: 1–11.

Pudpila, U., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Hormta. 2011. Comparison of distillation methods of *Mentha cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity for application use in animal feeds. J. Agri. Sci. and Tech A. 1: 1336–1340.

Khempaka, S., U. Pudpila and W. Molee. 2013. The effect of dried peppermint (*Mentha cordifolia*) on growth performance, nutrient digestibility, carcass traits, antioxidant properties and ammonia production in broilers. J. Appl. Poult. 22(4): 904–912.

Khempaka, S., R. Thongkratok, S. Okrathok and W. Molee. 2014. An evaluation of cassava pulp feedstuff fermented with *A. oryzae,* on growth performance, nutrient digestibility and carcass quality of broilers. J. Poult. Sci. 50: 71–79.

จรณี จิตสัจจพงศ์ วิทธวัช โมพี และ**สุทิศา เข็มผะกา**. 2552. ผลของการเสริมเปลือกกุ้งป่นในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก และการตอบสนองภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ. วารสารแก่นเกษตร. 37 (4): 331–338.

เอกพล พูนชัย **สุทิศา เข็มผะกา** วิทธวัช โมพี และจักร์ โนจากุล. 2553. บทบาทของกลูตามีนต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และการพัฒนาระบบทางเดินอาหารสุกรหย่านม. วารสารแก่นเกษตร. 38 (1): 39–46.

9. เสนอในการประชุมวิชาการต่างประเทศ

Khempaka, S., M. Mochizuki, K. Koh, and Y. Karasawa. 2005. Effects of shrimp meal on growth performance, digestibility, nitrogen retention and meat color in growing broilers. Japanese Poultry Science Association, Spring Meeting 2005. Tokyo, Japan.

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2005. Growth performance, digestibility and nitrogen retention in growing broiler given diets containing 4 to 16% of shrimp meal. Japanese Poultry Science Association, Autumn Meeting 2005. Kumamoto, Japan.

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2006. High calcium content in shrimp meal had little effect on growth performance in growing broilers. Japanese Poultry Science Association, Spring Meeting 2006. Fukuoka, Japan.

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2007. The *in vitro* measurement of dry matter and crude protein digestibilities of shrimp meal. First International Conference on Sustainable Animal Agriculture in Developing Countries, Kunming Yunnan, China.

Khempaka, S., W. Molee, R. Thongkratoke, C. Chitsatchapong, and E. Poonchai. 2008. Fermentation of cassava pulp with *Aspergillus oryzae* and *Candida utilis* for improved nutrients as an alternative feedstuff for animals. The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008. Hanoi, Vietnam.

Khempaka, S., and W. Molee. 2008. Effect of cassava pulp on growth performance and digestibility in broilers. The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008. Hanoi, Vietnam.

Khempaka, S., C. Chitsatchapong, and W. Molee. 2009. Measurement of chitin efficiencies on growth performance and ammonia production in broilers. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries, November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Chisatchapong, C., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Homta. 2009. Effect of chitin constituent in shrimp meal on nutrient digestibility, hematology and immune response in broilers. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries**.** November 8–11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Thongkratok, R., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Homta. 2009. Evaluation of fermented cassava pulp on growth performance and nutrient digestibility in broilers. 2009. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Poonchai, E., **S. Khempaka**, W. Molee, and J. Nojakul. 2009. Effect of glutamine supplementation on growth performance and intestinal microbial population of weaned pigs. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Khempaka, S., N. Chaiyasit, and W. Molee. 2010. Effect of dietary shrimp meal on microbial populations and ammonia production in broilers administered with *Lactobacillus* spp**.** and *Bacillus* spp**.** The 14th Animal Science Congress of the Asian-Australasian

Association of Animal Production Societies. August 23-27, 2010. Pingtung, Taiwan, Republic of China.

Molee, W., **S. Khempaka**, C. Chitsatchapong, and P. Puttaraksa. Effects of dietary Tuna Oil on growth performance and fatty acid composition of meat in Thai Native Chickens**.** The 14th Animal Science Congress of the Asian**-**Australasian Association of Animal Production Societies**.** August 23**-**27, 2010. Pingtung, Taiwan, Republic of China.

Pudpila, U., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Hormta. 2011. Comparison of distillation methods of *Mentha cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity for application use in animal feeds. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Suriyawong, T., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Hormta. 2011. The *In Vitro* evaluation of non-starch polysaccharide digestibility of cassava pulp using xylanase enzyme. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Khempaka, S., and K. Koh. 2011. Effect of covering with acidified sawdust on ammonia volatilization during composting of poultry manure. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Yingyuen, S., S. Wongsutthavas, C. Yuanklang, K. Vasupen, S. Bureenok, **S. Khempaka**. and A.C. Beynen. 2011. Effect of dried black cumin and tamarin supplementation on egg performance and lipids concentration in egg yolk of layer hens. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Chaokaur, A., **S. Khempaka**, T. Matsumoto, J. Takahashi. and T. Nishida. 2011. Effect of ruminal dosing of mechanical stimulating brush on methane emission from rumen in dry cows. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Khempaka, S., S. Okrathok, L. Hokking, B. Thuhanon, and W. Molee. 2011. Influence of supplemental glutamine on nutrient digestibility and utilization, small intestinal morphology and gastrointestinal tract and immune organ developments of broiler chickens. World Academy of Science, Engineering and Technology. August 24-26, 2011. Paris, France.

Khempaka, S. and W. Molee. 2012. An evaluation of glutamine feed supplementation on the immune response, intestinal morphology and growth performance of broilers, at various stages of development. ADSA®-AMPA-ASAS –CSAS-WSASAS Joint Annual Meeting. July 15-19, 2011, Phoenix, Arizona, USA.

Khempaka, S., E. Poonchai, and W. Molee. 2012. Efficacy of glutamine enriched diet on the growth performance, hematology and blood urea nitrogen of weaned pigs. In *APE 2012*: *International Conference on Animal Production and Environment*, 13-14 December 2012, Cantho, Vietnam.

Suriyawong, T., **S**. **Khempaka** and W. Molee 2012. The effects of xylanase enzyme supplementation in diets containing dried cassava pulp on nutrient digestibility and growth performance of broilers. In *APE 2012*: *International Conference on Animal Production and Environment*, 13-14 December 2012, Cantho, Vietnam.

Okrathok, S., **S. Khempaka,** and W. Molee. 2012. Effects on cassava pulp fermented with *A. oryzae* on nutrient digestibility and ammonia production of laying hens. In *APE 2012*: *International Conference on Animal Production and Environment*, 13-14 December 2012, Cantho, Vietnam.

Hokking, L., **S. Khempaka,** and W. Molee. 2012. An evaluation of the metabolizable energy and nutrient digestibility of dried cassava pulp in layers. In *APE 2012*: *International Conference on Animal Production and Environment*, 13-14 December 2012, Cantho, Vietnam.

Maliwan, P., C. Sripaoraya, P. Nuansritong, and **S. Khempaka.** 2012. Effect of pineapple bran on the growth performance and carcass quality of brolilers. In *APE 2012*: *International Conference on Animal Production and Environment*, 13-14 December 2012, Cantho, Vietnam.

Khempaka, S., S. Terapuntuwat, W. Wongsrikeao, and P. Pakdee. 2013. Responses of broiler chicks to methionine hydroxyl analog and DL-methionine using fish meal or full fat soybean meal as the sole source of protein. World Academy of Science, Engineering and Technology. January 14-15, 2013. Zurich, Switzerland.