

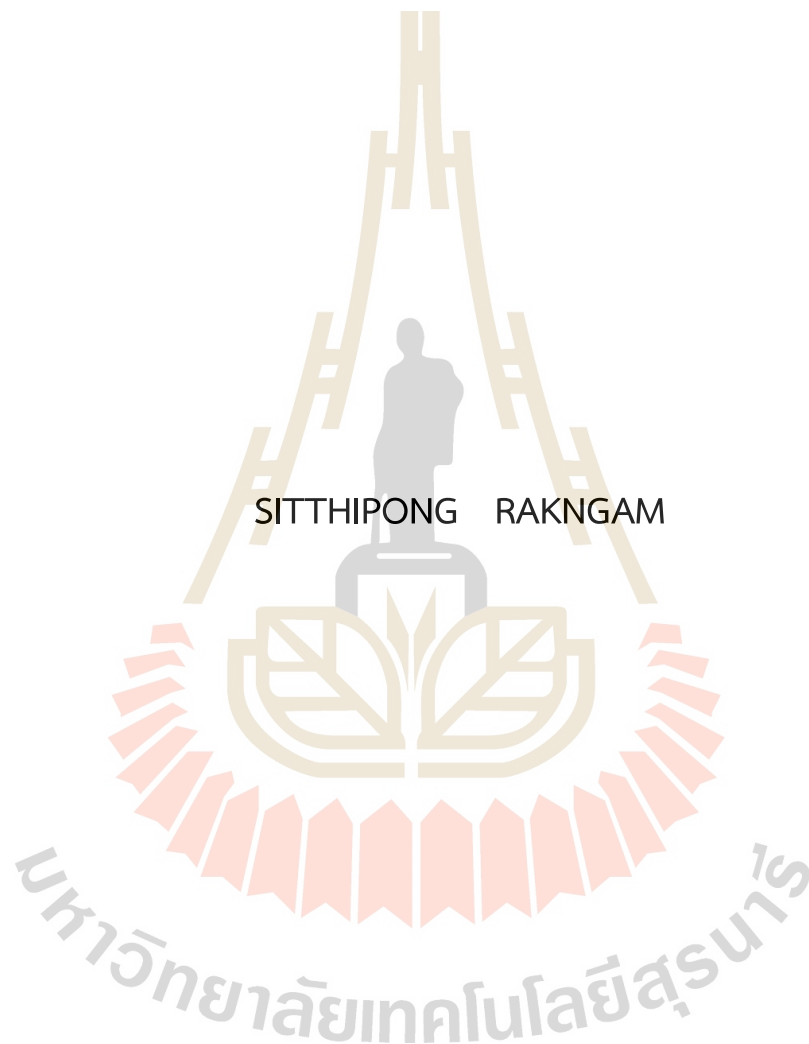
การประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ *Lactobacillus ingluviei* C37
รูปแบบเซลล์ตายในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน



นายสิทธิพงษ์ รักงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2565

ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF DEAD CELL *Lactobacillus*
ingluviei C37 IN BROILERS SUBJECTED TO HEAT-STRESS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2022

การประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ *Lactobacillus ingluviei* C37 รูปแบบ
เซลล์ตายในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. น.สพ. ดร. วรพล เองวานิช)

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. สุทิศา เข้มผะกา)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษา)

(รศ. ดร. อมรรัตน์ โมฬี)

กรรมการ

(ผศ. ดร. วิทวัส โมฬี)

กรรมการ

(ผศ. น.สพ. ดร. ภคินิจ คุปพิทยานันท์)

กรรมการ

(รศ. ดร. ฉัตรชัย โชติษฐียงกูร)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและประกันคุณภาพ

(ศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

สิทธิพงษ์ รังงาม : การประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ *Lactobacillus ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตายในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF DEAD CELL *Lactobacillus ingluviei* C37 IN BROILERS SUBJECTED TO HEAT-STRESS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. สุทิศา เข้มผะกา, 82 หน้า.

คำสำคัญ: ความเครียดจากความร้อน/โพลีโบไอติก/*L. ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตาย/สมรรถนะการเจริญเติบโต/ลักษณะซาก/คุณภาพเนื้อ/ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้/ประชากรจุลินทรีย์/การแสดงออกของยีน/ไซโตไคน์/โปรตีนฮีทช็อก/ไก่เนื้อ

ความเครียดจากความร้อนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตภูมิอากาศร้อนขึ้นดังเช่นประเทศไทย การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพลีโบไอติก *Lactobacillus ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตาย (DC-LIC37) ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโปรตีนฮีทช็อกของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน ใช้ไก่เนื้อเพศผู้สายพันธุ์รอส 308 อายุ 1 วัน จำนวน 360 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ซ้ำ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ดังนี้กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุมเลี้ยงภายใต้สภาวะที่อยู่อย่างสบาย อุณหภูมิ $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ และได้รับอาหารพื้นฐานที่ปราศจากสารเสริม (control) ขณะที่กลุ่ม 2-6 เลี้ยงภายใต้ภาวะที่ได้รับความเครียดจากความร้อนแบบเรื้อรัง อุณหภูมิ $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ วันละ 5 ชั่วโมง ตั้งแต่อายุ 15 วัน จนสิ้นสุดการทดลองและไก่ได้รับอาหารกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งจากทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 2 กลุ่มควบคุมลบได้รับอาหารพื้นฐานที่ปราศจากสารเสริม (NC) กลุ่ม 3 กลุ่มควบคุมบวกได้รับอาหารพื้นฐานและเสริมยาปฏิชีวนะ Zinc bacitracin ที่ระดับ 0.05 g/kg diet (PC) และกลุ่ม 4-6 กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารพื้นฐานและเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 1×10^8 และ 1×10^9 CFU/kg diet ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน มีสมรรถนะการเจริญเติบโต (น้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโตต่อวันและปริมาณการกินได้) ประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรป น้ำหนักซากเย็น หัวใจ ม้ามและเนื้อส่วนอก รวมถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อลดลง นอกจากนี้ภาวะความเครียดจากความร้อนยังมีผลให้การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (TNF- α) และ Transcription factor (NF-kB) เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามกลุ่มที่เสริม DC-LIC37 ในอาหาร สามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรป น้ำหนักซาก เนื้ออก หัวใจ ม้ามและตับของไก่เนื้อกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะอากาศร้อนได้ การเสริม DC-LIC37 ในไก่กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากความร้อน ยังช่วยลดผลกระทบจากการเกิดลิปิดออกซิเดชัน (TBARS) เพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ในเนื้อส่วนสะโพก ปรับปรุงลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาของลำไส้และปรับเปลี่ยนประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถลดการแสดงออกของ
 ยีนไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ (IL-6, IL-10) ของลำไส้เล็กส่วนกลางได้ รวมถึงลดการแสดงออกของ
 ยีนที่ควบคุมการถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (NF-kB) และโปรตีนฮีตช็อก (HSP70) ในตับ
 ของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน ผลการทดลองบ่งชี้ว่าการเสริมโพลีไบโอติก
 DC-LIC37 ระดับที่เหมาะสม 1×10^7 CFU/kg ในอาหาร มีศักยภาพภาพในการปรับปรุงสมรรถนะการ
 เจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ สุขภาพลำไส้และลดการอักเสบในไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะ
 อากาศร้อนได้



สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์
 ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

[Signature]
[Signature]

SITTHIPONG RAKNGAM : ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF DEAD CELL
Lactobacillus ingluviei C37 IN BROILERS SUBJECTED TO HEAT-STRESS. THESIS
ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTISA KHEMPAKA, Ph.D., 82 PP.

Keyword: Heat stress/Postbiotic/Dead cell *L. ingluviei* C37/Growth performance/
Carcass characteristics/Meat quality/Gut morphology/Microbial
population/Gene expression/Cytokine/Heat shock protein/Broilers

Heat stress (HS) is another factor affecting the worldwide poultry industry, particularly in hot and humid countries like as Thailand. The study aimed to evaluate the efficacy of postbiotic dead cell *L. ingluviei* C37 (DC-LIC37) on growth performance, carcass characteristics, meat quality, gut morphology, cecal microbial population, and mRNA expression levels relevant to inflammation and heat shock protein in broilers subjected to heat stress. Three hundred and sixty male broilers, Ross 308 (1-d-old), were allocated into 6 groups with 6 replications each in a completely randomized design (CRD) as follows 1) control group, raised under thermoneutral conditions at $21\pm1^{\circ}\text{C}$ (TNZ) and received basal diet without supplement (control). While the 2–6 groups were exposed to chronic HS at $32\pm1^{\circ}\text{C}$ for 5 h daily, this started on day 15 until the end of the experiment and the birds were provided one of the following 5 diets: 2) negative control, received basal diet without any supplementation (NC); 3) positive control, received basal diet+Zinc bacitracin 0.05 g/kg diet (PC); 4–6) treatment groups, received basal diet+DC-LIC37 at levels of 1×10^7 , 1×10^8 , and 1×10^9 CFU/kg diet, respectively. The results revealed that the HS condition decreased growth performance (body weight, average daily gain, and feed intake), European broiler index (EBI), cold carcass, heart, spleen, and breast weight including antioxidant capacity in the meat of broiler chickens. Moreover, HS also increased the mRNA expression of inflammatory cytokine (TNF- α) and transcription factor (NF- κ B). However, the supplementation of DC-LIC37 can improve growth performance, EBI, carcass, breast meat, heart, spleen, and liver weight in broilers under HS condition. Feeding DC-LIC37 in broilers subjected to HS can also mitigate the negative effect on lipid oxidation (decreased TBARS) and activate the antioxidant capacity (increased DPPH) in the thigh meat, improve gut morphology

and cecal microbial population in the HS groups. In addition, the DC-LIC37 fed groups can also down-regulate inflammatory cytokine (IL-6, IL-10) genes in the jejunal tissue including decrease liver mRNA expression of inflammatory transcription factor (NF- κ B) and heat shock protein (HSP70) in heat-stressed broilers. The results indicated that postbiotic DC-LIC37 supplementation at an optimal level of 1×10^7 CFU/kg diet has the potential to improve growth performance, carcass characteristics, meat quality, gut health, and reduce inflammatory in broilers under HS.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุทิสรา เข้มพะกา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวคิดและฝึกฝนทักษะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ทั้งในด้านความรู้ทางวิชาการ การดำเนินการทดลอง ทักษะในการวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล ทักษะการเขียนบทความทางวิชาการและการนำเสนอผลงาน รวมถึงการตรวจสอบและแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานทดลอง จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี ขอขอบพระคุณคณาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สาขาวิชาปรีคลินิก และสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางด้านวิชาการ ทักษะและกระบวนการคิด ตลอดจนประสบการณ์ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณทุนกิตติบัณฑิต จากทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาต่างๆ ตลอดจนค่าใช้จ่ายในการดำรงชีพตลอดระยะเวลาการศึกษา 2 ปี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานสัตว์ปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนงานทดลอง ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ผลจากทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณพี่-น้องสมาชิกห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว (F14117) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับคำแนะนำและช่วยเหลือต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ทั้งในด้านการเรียน การดำเนินการทดลอง การวิเคราะห์ผล ตลอดจนการพัฒนาทักษะการพูด การนำเสนอและการใช้ชีวิตในการอยู่ร่วมกับผู้อื่นอย่างมีความสุข

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและญาติพี่น้องทุกๆ ท่านที่คอยอบรมสั่งสอน ให้การสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างดีเสมอมา ตลอดจนคอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

สิทธิพงษ์ รังงาม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ความเครียดจากความร้อน.....	5
2.2 ความเครียดจากความร้อนต่อระบบอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ.....	6
2.3 ความเครียดจากความร้อนต่อการเกิดความเครียดออกซิเดชัน.....	7
2.4 ความเครียดจากความร้อนต่อความแข็งแรงและการอักเสบของลำไส้.....	9
2.5 กลไกการปรับตัวตอบสนองของไก่เนื้อภายใต้ความเครียดจากความร้อน.....	9
2.6 จุลินทรีย์โพรไบโอติกและโพสไบโอติก.....	11
2.7 การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อบรรเทาผลกระทบที่เกิดอันเนื่องมาจาก ความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อ.....	12
2.7.1 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต.....	12
2.7.2 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะซากและคุณภาพเนื้อ	13
2.7.3 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระ.....	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.4	ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบ	18
2.7.5	ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Acute phase protein และโปรตีนฮีตช็อก	21
2.7.6	ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความแข็งแรงของผนังลำไส้	21
2.7.7	ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้.....	23
2.7.8	ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้	25
3	วิธีดำเนินการวิจัย	27
3.1	การเตรียมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย (DC-LIC37).....	27
3.2	แผนการทดลอง สัตว์และโรงเรือนสัตว์ทดลอง	27
3.3	อาหารทดลอง.....	28
3.4	การเก็บข้อมูลและตัวอย่าง.....	28
3.5	การคำนวณและวิเคราะห์ผลการทดลอง	30
3.5.1	การวัดสมรรถนะการเจริญเติบโต	30
3.5.2	การวัดลักษณะซาก.....	31
3.5.3	การวัดคุณภาพเนื้อ.....	31
3.5.4	การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ.....	32
3.5.5	การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้.....	32
3.5.6	การวัดปริมาณประชากรจุลินทรีย์ในซีกัม	33
3.5.7	การวัดปริมาณการแสดงออกของยีน	33
3.6	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	35
3.7	สถานที่ในการทำการทดลอง.....	35
3.8	ระยะเวลาในการทดลองและวิเคราะห์ผล.....	35
4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
4.1	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน.....	36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะซากของไก่เนื้อที่ได้ รับความเครียดจากความร้อน	39
4.3	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้ รับความเครียดจากความร้อน	40
4.4	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของลำไส้ลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน.....	43
4.5	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ ของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน.....	46
4.6	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีน ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจาก ความร้อน	47
4.7	ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีน โปรตีน ฮีทช็อก และ Transcription factor ที่ควบคุมการอักเสบในตับของ ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนReferences.....	49
4.8	สรุปภาพรวมผลกระทบความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อและผลของการ เสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหาร	52
5	สรุปและข้อเสนอแนะ	54
5.1	บทสรุป.....	54
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	54
	รายการอ้างอิง.....	56
	ภาคผนวก.....	67
	ประวัติผู้เขียน.....	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 14
2.2	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะซากและคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อ ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 16
2.3	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 19
2.4	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบของไก่เนื้อที่ ได้รับความเครียดจากความร้อน 20
2.5	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อ Acute phase protein และโปรตีน ฮีตช็อกของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 22
2.6	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความแข็งแรงของผนังลำไส้ไก่เนื้อที่ ได้รับความเครียดจากความร้อน 23
2.7	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อ ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 24
2.8	ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของ ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 26
3.1	ส่วนประกอบและปริมาณโภชนาในอาหารพื้นฐาน 29
3.2	โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในซีกัม 33
3.3	โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน 34
4.1	ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน 38
4.2	ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะลักษณะซากของไก่เนื้อที่ได้รับความ เครียดจากความร้อน 41
4.3	ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียด จากความร้อน 42

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์และโปรตีนฮีทช็อก ในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน	51
ก1 การเตรียมความเข้มข้นมาตรฐาน MDA.....	72
ก2 อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด	76
ก3 องค์ประกอบในการทำ qPCR master mix.....	78
ก4 การกำหนดค่าสัมประสิทธิ์ของการเปรียบเทียบ.....	81



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	การตอบสนองต่ออุณหภูมิความเครียดจากความร้อนของสัตว์ปีก5
2.2	ดัชนีความเครียดระหว่างอุณหภูมิและความชื้น.....6
2.3	ความเครียดจากความร้อนต่อความเครียดออกซิดเจนในไมโทคอนเดรีย.....8
2.4	ความเครียดจากความร้อนต่อความแข็งแรงและการอักเสบของลำไส้.....9
2.5	ความเครียดออกซิเจนต่อการแสดงออกของโปรตีนในกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ 11
4.1	ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน..... 44
4.2	ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อ ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน..... 47
4.3	ภาพรวมผลกระทบการเกิดความเครียดจากความร้อนและผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน 53
ก1	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ..... 68
ก2	การเกิดปฏิกิริยา MDA-TBA..... 70
ก3	กราฟมาตรฐาน MDA..... 72
ก4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้..... 73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบกับปัญหาภาวะโลกร้อนและการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศอย่างรุนแรง ซึ่งภาวะดังกล่าวส่งผลกระทบต่อระบบอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์อย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อในภูมิภาคเขตร้อนขึ้นดังเช่นประเทศไทย (Nawab et al., 2018; Kpomasse et al., 2021; Thornton et al., 2021) เนื่องจากไก่เนื้อมีการปรับปรุงพันธุกรรมให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดีและมีอัตราการเจริญเติบโตสูง แต่อย่างไรก็ตามไก่เนื้อเหล่านี้ก็เกิดภาวะความเครียดจากความร้อนได้ง่าย (Awad et al., 2020; Kalmar et al., 2013) ความเครียดจากความร้อนจะเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายเกินกว่ากลไกของร่างกายจะสามารถกำจัดได้และก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress, OS) ซึ่งมีผลรบกวนระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ลำไส้ สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย ส่งผลให้สัตว์มีปริมาณการกินอาหารลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น และสมรรถนะการเจริญเติบโตลดลง (Nawab et al., 2018; Ranjan et al., 2019; Vandana et al., 2021) ลักษณะและองค์ประกอบซากเกิดความผิดปกติ (Mujahid et al., 2007; Quinteiro-Filho et al., 2010) รวมถึงคุณภาพเนื้อที่ด้อยลงและเกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็วจากการเกิดลิปิดออกซิเดชัน (Cramer et al., 2018) ซึ่งที่ผ่านมาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์มีการลดผลกระทบดังกล่าว ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับที่ต่ำกว่าการรักษาเพื่อเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตและปรับปรุงสุขภาพทางเดินอาหาร (Rahimi & Khaksefidi, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ในปริมาณมากและระยะเวลาที่นานจะทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อและผลิตภัณฑ์ และยังทำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการดื้อยา (Odore et al., 2015; Shazali et al., 2014) นำไปสู่การประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะของสหภาพยุโรปและอีกหลายๆ ประเทศตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 (Commission et al., 2005; Van Boeckel et al., 2015)

จุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) เป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่มีประโยชน์ โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) จึงเป็นสารเสริมอาหารสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการปรับปรุงสุขภาพทางเดินอาหาร และกระตุ้นการเจริญเติบโตในภาวะความเครียดจากความร้อนได้ (Jahromi et al., 2016; Sugiharto et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้โพรไบโอติกมีข้อกังวลและกำลังเป็นประเด็นถกเถียงในการส่งถ่ายยีนดื้อยา (Shazali et al., 2014) รวมถึงข้อจำกัดเรื่องความคงตัวของระหว่างกระบวนการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษาหลังกระบวนการผลิต

อาหารสัตว์ ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาใช้ในรูปแบบของโพรไบโอติก (postbiotics) เพื่อลดความกังวล และข้อจำกัดดังกล่าว

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ตาย (dead cell probiotics) ส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ (cell fragments) รวมถึงสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ ที่อยู่ในรูปของอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (cell free supernatant) อันอุดมไปด้วยกรดอินทรีย์ โปรตีน และเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา (ISAPP, 2021) ซึ่งในปัจจุบันมีการเรียกชื่อแตกต่างกัน คือ จุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย (ได้แก่ paraprobiotics, non-viable probiotics, heat-killed probiotics, tyndallized probiotics, parapsychobiotics, ghost probiotics, bacterial lysate) และจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบที่ปราศจากตัวเซลล์ (ได้แก่ metabiotics, postbiotics) (Salminen et al., 2021) การใช้จุลินทรีย์ในรูปแบบเซลล์ตายด้วยความร้อน พบว่าความร้อนจะมีผลในการทำลายผนังเซลล์และมีการปลดปล่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ออกมา อาทิเช่น Exopolysaccharide (EPS), Lipoteichoic acids, Peptidoglycans, Surface layer proteins รวมถึงสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ องค์ประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติลดการอักเสบ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เสริมสร้างความแข็งแรง และปรับปรุงสุขภาพลำไส้ได้ไม่แตกต่างกับเซลล์มีชีวิต (Adams, 2010; Piqué et al., 2019; Zhu et al., 2020) มีการรายงานว่า การเสริมโพรไบโอติกที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารมีผลปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะสัญญาณวิทยาของลำไส้ ลดจำนวนประชากรจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ เพิ่มการแสดงออกของยีน GHR และ IGF-1 ในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ (Danladi et al., 2022; Humam et al., 2019) การเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระ (glutathione peroxidase, GPx; catalase, CAT; glutathione, GSH) ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1, TNF- α) และความแข็งแรงของผนังลำไส้ (zonula occludin 1, ZO-1; mucin-2, MUC2; occludin, OCLD) รวมถึงลดการแสดงออกของยีน Heat shock protein 70 (HSP70) ในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ (Humam et al., 2021) จุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. ingluviei* C37 เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก (gram positive bacteria) กลุ่ม LAB ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่โคราช ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญของโพรไบโอติกฟังกมี เช่น ความสามารถในการทนกรดและกลื่อน้ำดีในทางเดินอาหาร ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้และความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค อีกทั้งยังมีคุณสมบัติจำเพาะบางประการ เช่น คุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน และคุณสมบัติในการลดคอเลสเตอรอล Mandal et al. (2013) รายงานว่าการเสริม *L. ingluviei* ADK10 ในอาหารหนู สามารถลดความเครียดออกซิเดชันได้ โดยสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระ (superoxide dismutase, SOD) CAT และ GSH ได้เพิ่มมากขึ้น การใช้ *L. ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตายในเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

(lipopolysaccharide, LPS) ที่ได้จากผนังเซลล์ของ *Escherichia coli* ซึ่งผลการศึกษพบว่า *L. ingluviei* C37 ที่คัดแยกได้ สามารถลดการหลั่งไซโตไคน์หรือสารที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ (TNF- α และ IL-6) และกระตุ้นการหลั่งสารที่ลดการอักเสบ (IL-10) ได้ (Tsukagoshi et al., 2020) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ *L. ingluviei* C37 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตยังสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเซลล์ตับ (LITAF และ TNFSF15) เพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้ (junctional adhesion molecule 2, JAM2; OCLD, ZO-1, MUC) และบรรเทาความเสียหายของผนังลำไส้ในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้อีกด้วย (Sirisopapong et al., 2021) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ *L. ingluviei* C37 แสดงผลดีต่อสัตว์ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย การเสริมจุลินทรีย์โพสไบโอติก *L. ingluviei* C37 ที่แยกได้ในรูปแบบเซลล์ตายในอาหารไก่เนื้อ นอกจากจะสามารถช่วยลดผลกระทบจากเรื่องความคงตัวจากกระบวนการอัดเม็ดและการจัดเก็บอาหารสัตว์แล้ว น่าจะสามารถลดผลกระทบที่เกิดจากความเครียดจากความร้อนได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ชนิดนี้ยังไม่ค่อยมีการศึกษาและทราบกลไกหรือคุณสมบัติอย่างแน่ชัดมากนัก

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์โพสไบโอติก *L. ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตาย (DC-LIC37) ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโปรตีนฮีตช็อกของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ DC-LIC37 ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตลักษณะซากและคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

1.2.2 เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ DC-LIC37 ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

1.2.3 เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ DC-LIC37 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนฮีตช็อกในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

การเสริมจุลินทรีย์โพสไบโอติก DC-LIC37 ในอาหาร สามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซากและคุณภาพเนื้อ รวมถึงปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้และเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโปรตีนฮีตช็อกในไก่ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์โพลีไบโอติก DC-LIC37 ในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโปรตีนฮีทช็อกของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงประสิทธิภาพและคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์โพลีไบโอติก DC-LIC37 ในการบรรเทาผลกระทบที่เกิดจากความเครียดจากความร้อน

1.5.2 ได้สารเสริมชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติในการบรรเทาผลกระทบและลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเนื่องมาจากความเครียดจากความร้อนสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกภูมิภาคเขตร้อนชื้น เพื่อรับมือกับการผลิตสัตว์ในยุคแห่งการพลิกผันของสภาวะอากาศโลกที่กำลังเกิดขึ้น

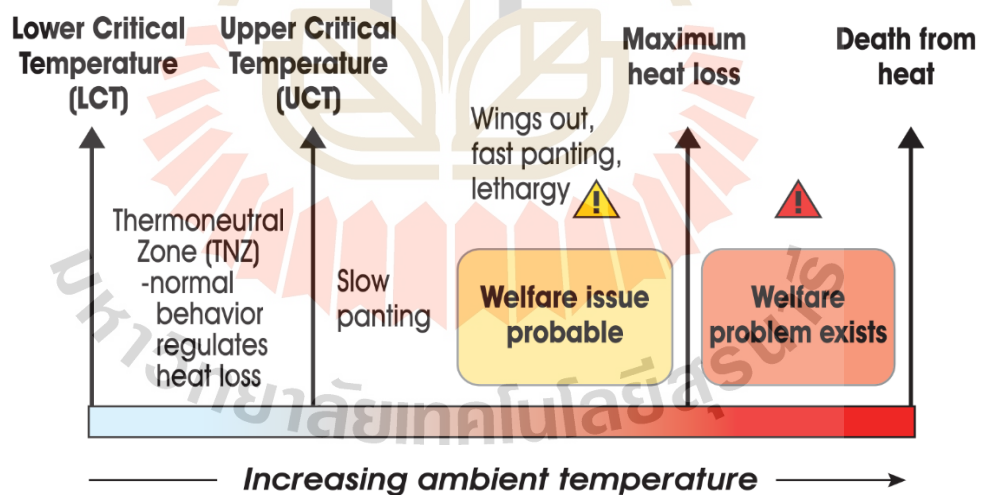
1.5.3 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ความปลอดภัยทางอาหาร รวมถึงสร้างขีดความสามารถในการแข่งขันให้กับอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ปีกในภูมิภาคเขตร้อนชื้นดังเช่นประเทศไทยในสถานการณ์ที่สภาวะโลกร้อนทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งจะส่งผลให้มีรายได้จากการส่งออกเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกเพิ่มมากขึ้น และมีผลผลิตมวลรวมภายในประเทศ (GDP) สูงเทียบเท่ากับประเทศที่พัฒนาแล้ว นำไปสู่ชีวิตและความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของเกษตรกรไทย

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเครียดจากความร้อน

ความเครียดจากความร้อน (heat stress, HS) จัดเป็นความเครียดที่เกิดขึ้นเนื่องจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมภายนอกที่มีอุณหภูมิ ความร้อนจากแสงอาทิตย์ และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่สูงเกินกว่าสภาวะที่อยู่อย่างสบายและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (thermoneutral zone, TNZ) จนทำให้สัตว์ไม่สามารถระบายความร้อนส่วนเกินออกจากร่างกายเพื่อรักษาอุณหภูมิร่างกายให้อยู่ในสภาวะปกติได้ (ประมาณ 41.3°C ในสัตว์ปีก) นอกจากนี้ภาวะ HS ยังขึ้นกับปัจจัยภายในตัวสัตว์ เช่น พันธุกรรม อัตราเมแทบอลิซึม กิจกรรม กระบวนการรักษาอุณหภูมิร่างกาย ตลอดจนสภาวะภายในโรงเรือนที่ไม่เหมาะสม (Lara & Rostagno, 2013) ซึ่งภาวะ HS ในไก่สามารถบ่งชี้ได้จากอุณหภูมิทวาร (rectal temperature) ที่มากกว่า 42.2°C และดัชนีความเครียดระหว่างอุณหภูมิและความชื้น (temperature and humidity stress index, THI) ที่มีค่าตั้งแต่ 70 ขึ้นไป (Ajakaiye et al., 2011)



ภาพที่ 2.1 การตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อนของสัตว์ปีก
ที่มา: Pawar et al. (2016)

		Relative Humidity (%)																			
Temperature °C		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	20	63	63	63	64	64	64	64	65	65	65	66	66	66	66	67	67	67	67	68	68
	22	64	65	65	66	66	66	67	67	67	68	68	69	69	69	70	70	70	71	71	72
	24	66	67	67	68	68	69	69	70	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74	75	75
	26	68	69	69	70	70	71	71	72	73	73	74	74	75	75	76	77	77	78	78	79
	28	70	70	71	72	72	73	74	74	75	76	76	77	78	78	79	80	80	81	82	82
	30	71	72	73	74	74	75	76	77	78	78	79	80	81	81	82	83	84	84	85	86
	32	73	74	75	76	77	77	78	79	80	81	82	83	84	84	85	86	87	88	89	90
	34	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
	36	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	93	94	95	96	97
	38	78	79	81	82	83	84	85	86	88	89	90	91	92	93	95	96	97	98	99	100

ภาพที่ 2.2 ดัชนีความเครียดระหว่างอุณหภูมิและความชื้น
ที่มา: Ajakaiye et al. (2011)

2.2 ความเครียดจากความร้อนต่ออุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ

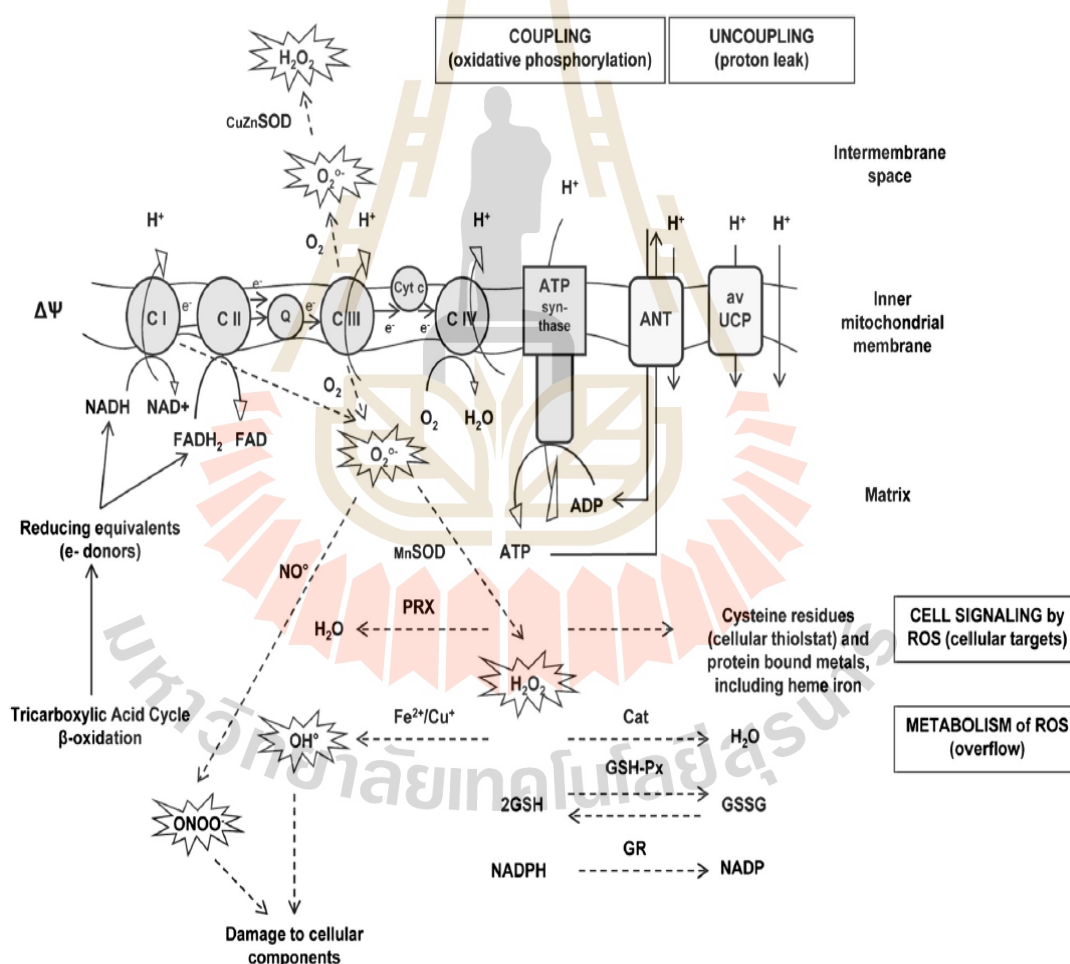
เนื่องจากในปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบกับปัญหาภาวะโลกร้อนและการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศอย่างรุนแรง ส่งผลให้อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ได้รับผลกระทบอย่างมาก โดยเฉพาะสัตว์ปีก ประเภทไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (Nawab et al., 2018) ประกอบกับประชากรโลกมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งคาดการณ์ว่าภายในปี พ.ศ. 2643 จะมีจำนวนสูงถึง 10.9 พันล้านคน หรือมีอัตราการเจริญเติบโตประมาณ 36.93% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2565 (Roser, 2019) อีกทั้งในปัจจุบันสถานการณ์โรคอหิวาห์ แอฟริกาที่กำลังระบาดในสุกร ซึ่งทำให้มีสุกรล้มตายเป็นจำนวนมากจนปริมาณผลผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภคและราคาจำหน่ายเพิ่มขึ้นเกือบเท่าตัว ส่งผลให้ผู้บริโภคหันไปเลือกบริโภคเนื้อไก่ทดแทนมากขึ้น เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีราคาถูก จากความต้องการของผู้บริโภคที่เพิ่มขึ้น บริษัทผู้พัฒนาสายพันธุ์ไก่เนื้อทางการค้าได้ทำการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้มีสมรรถนะการผลิตสูง และได้น้ำหนักส่งตลาดในระยะเวลาสั้น แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาพันธุ์ลักษณะนี้จะทำให้ไก่มีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สูง การพัฒนาของระบบต่าง ๆ ในร่างกายและการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าปกติ ส่งผลให้ไก่ไวต่อการเกิดความเครียดจากความร้อนได้ง่ายกว่าไก่ที่เจริญเติบโตช้า (Kalmar et al., 2013) แม้ว่าในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อทั่วโลกทั้งในเขตนานและเขตร้อน รวมถึงประเทศไทยจะมีการเลี้ยงในระบบโรงเรือนปิดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้สัตว์อยู่อย่างสบายและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (thermoneutral zone, TNZ) ประมาณ 18–28°C ได้ (Shakeri et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตามในฤดูร้อนประเทศในเขตร้อนมีอุณหภูมิสูงถึง 28.6–48.8°C เช่นเดียวกับประเทศไทยก็มีอุณหภูมิสูงถึง

39–43°C อีกทั้งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ซึ่งยากต่อการจัดการระบายอากาศภายในโรงเรือนที่ใช้หลักการระเหยของน้ำ (evaporative cooling system) ทำให้ระบบระบายอากาศทำงานไม่มีประสิทธิภาพและอุณหภูมิในโรงเรือนสามารถลดได้สูงสุดไม่เกิน 5–6°C เท่านั้น (ศิษย์, 2558) ส่งผลให้ไก่ไม่สามารถระบายความร้อนออกจากร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพและก่อให้เกิดความเครียด ซึ่งความเครียดจากความร้อนก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในไมโทคอนเดรียปริมาณมากเกินกว่าความสามารถและกลไกของร่างกายที่จะกำจัดได้ ทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลายและเกิดการอักเสบขึ้น โดยเฉพาะบริเวณผนังลำไส้ ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการย่อยและดูดซึมอาหาร นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกๆ ในการป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยและดูดซึมอาหารด้อยประสิทธิภาพลง นำไปสู่การมีสมรรถนะการเจริญเติบโตที่ลดลง โดย Sohail et al. (2010) พบว่าความเครียดจากความร้อนจะทำให้ไก่เนื้อลดการกินอาหาร 16.4% น้ำหนักตัวลดลง 32.6% และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเพิ่มขึ้น 25.6% ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล มูลค่าประมาณ 128–165 ล้านดอลลาร์สหรัฐในแต่ละปี (St-Pierre et al., 2003)

2.3 ความเครียดจากความร้อนต่อการเกิดความเครียดออกซิเดชัน

กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) เป็นกระบวนการที่เกิดบริเวณไมโทคอนเดรียและมีความสำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย เมื่อสัตว์ปีกเผชิญกับภาวะความเครียดจากความร้อนเซลล์จะมีความต้องการใช้พลังงานมากกว่าภาวะปกติถึงสองเท่า ซึ่งร่างกายจะมีกลไกการปรับตัวในการสร้างพลังงานให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกายผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนและออกซิเดชันของกรดไขมันเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามโปรตอนจะเกิดการรั่วไหล (proton leakage) มากขึ้นและก่อให้เกิดความต่างศักย์ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential, $\Delta\Psi$) เพิ่มขึ้น โดย $\Delta\Psi$ ที่สูงจะทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนไม่มีประสิทธิภาพและเกิดการรั่วไหลของโปรตอนมากขึ้น ส่งผลให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$) ที่เป็นอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ในไมโทคอนเดรียมากขึ้น (Akbarian et al., 2016) นอกจากนี้ยังทำให้การทำงานของ 3-Hydroxyacyl CoA dehydrogenase (3HADH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเกิดเบต้าออกซิเดชันของกรดไขมัน และ Citrate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสร้างพลังงานของวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) ลดลง (Azad et al., 2010) โดยปกติภายในไมโทคอนเดรียจะมีกลไกในการควบคุมปริมาณ $O_2^{\cdot-}$ ไม่ให้สูงเกินไปจนเป็นพิษกับเซลล์ด้วยการขนส่งโปรตอนที่รั่วไหลออกมาผ่านเข้าไปในเมทริกซ์ของไมโทคอนเดรียอีกครั้ง ผ่านทางโปรตีนเมมเบรนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (uncoupling proteins, UCP) ส่งผลให้ $\Delta\Psi$ ลดลงและกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อสร้างพลังงานมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

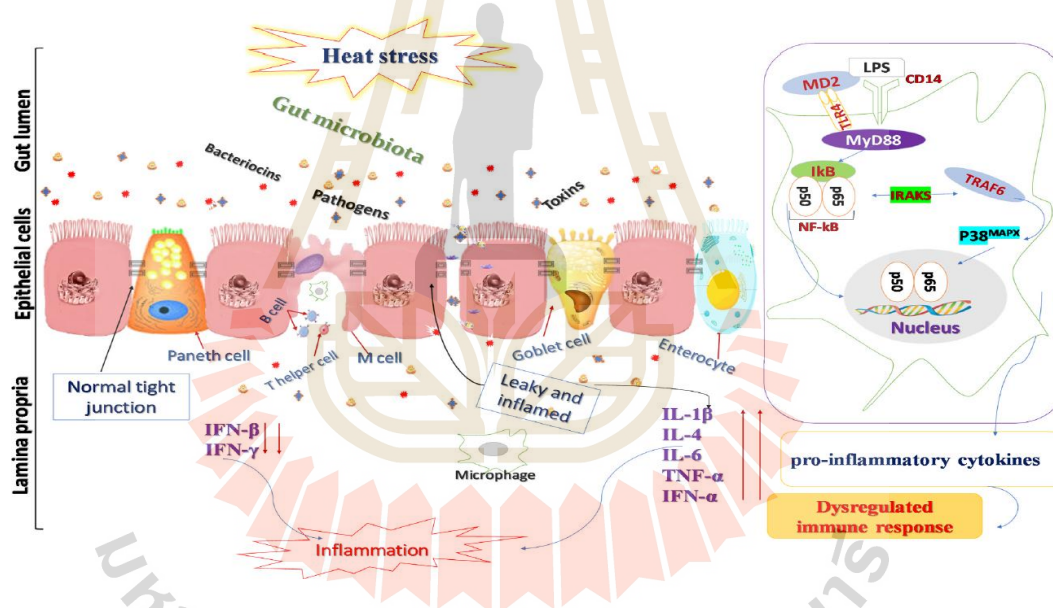
(Pamplona et al., 2012) อย่างไรก็ตามถ้าอนุมูลอิสระมีปริมาณมากเกินไปกว่าความสามารถที่จะกำจัดได้ ส่งผลให้โปรตีน ไขมันและกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ถูกทำลาย ตลอดจนกระบวนการในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ก็จะด้อยประสิทธิภาพลง นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นยังทำหน้าที่เป็น Secondary messenger ในการกระตุ้นการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กับตัวควบคุมการถอดรหัสของยีน (transcription factor) ที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ เช่น Activator protein 1 (AP-1) สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ NF- κ B สามารถกระตุ้นกลไกการอักเสบ และ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญที่จับกับตำแหน่ง Promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุมูลอิสระ (Akbarian et al., 2016; Leonarduzzi et al., 2010) ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ความเครียดจากความร้อนต่อความเครียดออกซิเดชันในไมโทคอนเดรีย
ที่มา: Akbarian et al. (2016)

2.4 ความเครียดจากความร้อนต่อความแข็งแรงและการอักเสบของลำไส้

ความเครียดจากความร้อนเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระปริมาณมากเกินกว่าความสามารถของร่างกายที่จะกำจัดได้ ซึ่งอนุมูลอิสระจะไปทำลายโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมัน โปรตีน และกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก ส่งผลให้เยื่อเมือก (intestinal mucosa) และเซลล์บริเวณผนังลำไส้ (intestinal cell) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการย่อยและการดูดซึมอาหารถูกทำลาย นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโปรตีนไทด์จังก์ชัน (tight junction, TJ) ที่ช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับเซลล์ผนังลำไส้ เมื่อ TJ ถูกทำลายจะทำให้ความแข็งแรงของลำไส้ลดลง และเชื้อจุลินทรีย์รวมถึงสารพิษต่างๆ จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อและอักเสบบริเวณลำไส้เพิ่มขึ้น นำไปสู่ความสามารถในการย่อยและการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนาและสมรรถนะการเจริญเติบโตที่ลดลง (Abdel-Moneim et al., 2021) ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ความเครียดจากความร้อนต่อความแข็งแรงและการอักเสบของลำไส้
ที่มา: Abdel-Moneim et al. (2021)

2.5 กลไกการปรับตัวตอบสนองของไก่เนื้อภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน

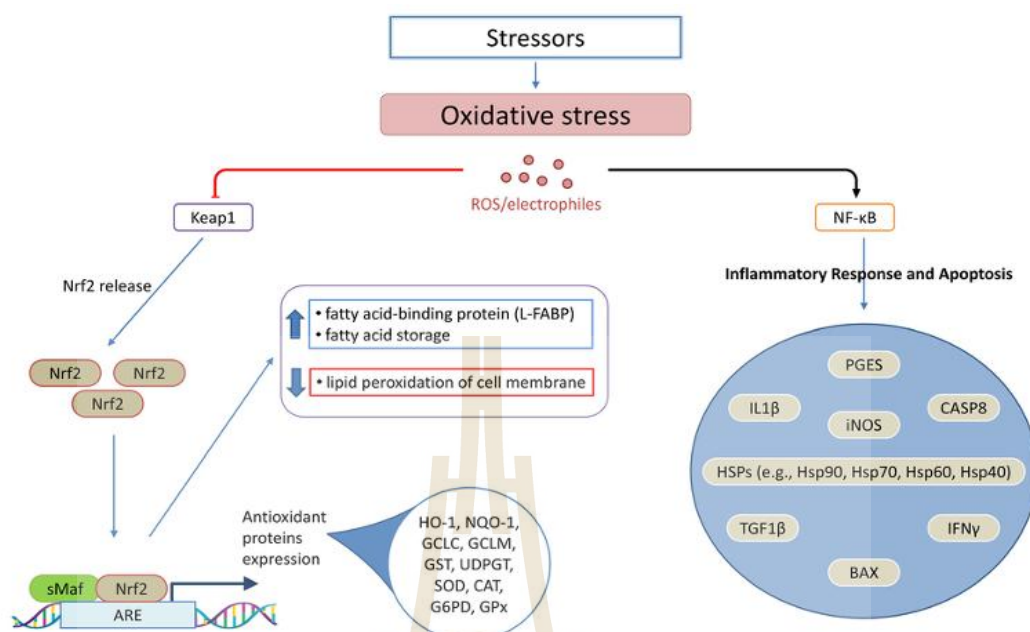
2.5.1 กลไกทางทางกายภาพ

ไก่เนื้อเป็นไก่สายพันธุ์ทางการค้าที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ให้มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามต้องมีการเลี้ยงในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิที่มีสภาวะเหมาะสมจึงจะเจริญเติบโตสูงสุดตามศักยภาพของพันธุ์กรรม นอกจากนี้ในสภาวะอากาศร้อนระบบระบายอากาศภายในโรงเรือนโดยเฉพาะพื้นที่เขตร้อนชื้นจะไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม (ประมาณ

18–28°C) ส่งผลให้ไก่เนื้อไม่สามารถระบายความร้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เกิดการสะสมความร้อนในร่างกายเกินกว่า 41°C และเหนียวทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน ไก่เนื้อเป็นสัตว์ปีกที่ไม่มีต่อมเหงื่อ มีกลไกการปรับตัวให้อยู่รอดโดยการระบายความร้อนออกจากร่างกายด้วยการเพิ่มอัตราการหายใจ การกางปีกและเกลือกกลิ้งแผ่รังสีความร้อนผ่านวัสดุรองพื้น การลดการสร้างความร้อนในร่างกายด้วยการลดกิจกรรมต่าง ๆ ลดการกินอาหารเพื่อลดความร้อนที่จะเพิ่มขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของโภชนะ โดยเฉพาะสารอาหารประเภทโปรตีนเนื่องจากมีความร้อนจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (heat increment from metabolism) ที่ค่อนข้างสูงกว่าคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ขณะเดียวกันความต้องการพลังงานในการดำรงชีพ (energy for maintenance) เพื่อใช้ในการระบายความร้อนออกจากร่างกายก็จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นยังทำให้สูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และเกิดไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ทำให้เลือดเป็นด่างมากขึ้น ส่งผลให้สมดุลของไอออน เช่น Na^+ K^+ และ Cl^- ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของน้ำและแร่ธาตุเปลี่ยนแปลงไป (Hakker, 2018)

2.5.2 กลไกในระดับเซลล์

เมื่อสัตว์ปีกเผชิญกับความเครียดจากความร้อน โปรตีนจะถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ และเกิดการม้วนพับที่ผิดปกติ ส่งผลให้ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ร่างกายจะมีกลไกด่านที่ 2 ในการปรับตัวให้อยู่รอดหรือป้องกันการถูกทำลายในระดับเซลล์ ด้วยการส่งสัญญาณให้ Transcription factors ที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวและอยู่รอดของเซลล์รับรู้ และเพิ่มการแสดงออกของยีน Heat shock protein (HSP) โดยการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์กระตุ้น Heat shock factors (HSF) ให้แยกจาก HSP ซึ่ง HSF จะอยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ และ HSF จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต 3 หมู่ จากนั้น HSF จะเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสเพื่อไปจับกับ Heat shock element (HSE) ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน HSP เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง HSP จะไปช่วยให้โปรตีนที่ถูกทำลายหรือเสียสภาพ เกิดการม้วนพับใหม่และทำงานได้อีกครั้ง นอกจากนี้ HSP ยังช่วยให้สัตว์ทนความร้อนได้ดีขึ้น (Shehata et al., 2020) อีกทั้งยังมีการส่งสัญญาณให้ Nrf2 ซึ่งเป็น Transcription factor ที่สำคัญที่จับกับตำแหน่งที่เป็น Promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น GPx, SOD และ CAT มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น (Akbarian et al., 2016; Leonarduzzi et al., 2010) ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ความเครียดออกซิเดชันต่อการแสดงออกของโปรตีนต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา: Abo-Al-Ela et al. (2021)

2.6 จุลินทรีย์โพรไบโอติกและโพลีโอบีโอติก

จากมาตรการการยกเลิกใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในอาหารสัตว์ (antibiotic growth promoters, AGPs) ของสหภาพยุโรปและอีกหลายๆ ประเทศ ในปี ค.ศ. 2006 (Commission et al., 2005; Van Boeckel et al., 2015) ส่งผลให้สัตว์ประสบปัญหาสุขภาพทางเดินอาหาร มีผลให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารและสมรรถนะการเจริญเติบโตลดลง นักอาหารสัตว์ทั่วโลกจึงได้พยายามมองหาสารเสริมตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติปรับปรุงสุขภาพทางเดินอาหารเช่นเดียวกับการใช้ AGPs และโพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่มีประโยชน์ โดยเฉพาะกลุ่ม LAB (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*) เมื่อมีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้การทำงานของระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นๆ ของร่างกาย ซึ่งได้รับความนิยมและเป็นที่สนใจอย่างมากในวงการอาหารสัตว์ (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010; Gaggia et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกมีข้อกังวลและกำลังเป็นประเด็นถกเถียงในการส่งถ่ายยีนดื้อยา รวมถึงข้อจำกัดเรื่องความคงตัวระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาหลังกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ (Shazali et al., 2014) ในปัจจุบันมีการพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ในหลากหลายรูปแบบเพื่อลดความกังวลและข้อจำกัดดังกล่าวและยังมีการเรียกชื่อแตกต่างกัน เช่น จุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย (ได้แก่ paraprobiotics, non-viable probiotics, heat-killed probiotics, tyndallized probiotics, parapsychobiotics, ghost probiotics, bacterial

lysate) และจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบที่ปราศจากตัวเซลล์ (ได้แก่ metabiotics, postbiotics) (Salminen et al., 2021) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ในรูปแบบเซลล์ตาย โดยการให้ความร้อนที่หลากหลายวิธี ซึ่งความร้อนจะทำลายผนังเซลล์และมีการปลดปล่อยองค์ประกอบของเซลล์ออกมา อาทิเช่น EPS, Lipoteichoic acids, Peptidoglycans, Surface layer proteins รวมถึงสารเมแทบอไลต์ต่าง ๆ องค์ประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติลดการอักเสบ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เสริมสร้างความแข็งแรงและปรับปรุงสุขภาพลำไส้ได้ไม่แตกต่างกับเซลล์มีชีวิต (Adams, 2010; Piqué et al., 2019; Zhu et al., 2020) ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสนและเป็นที่เข้าใจอย่างเป็นสากลโลก สมาคมวิทยาศาสตร์ระหว่างประเทศสำหรับโพรไบโอติกและพรีไบโอติก (The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, ISAPP) จึงได้ให้คำนิยามรวมของโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์ตายและปราศจากตัวเซลล์ใหม่ว่า “โพรไบโอติก (postbiotics)” ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่มีชีวิต องค์ประกอบของเซลล์และหรือสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ที่เซลล์จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้ที่ได้รับ (Salminen et al., 2021)

2.7 การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อบรรเทาผลกระทบที่เกิดอันเนื่องมาจากความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อ

2.7.1 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

สมรรถนะการเจริญเติบโตเป็นดัชนีวัดที่สำคัญในการประเมินความสามารถในการผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่ได้รับจากการผลิตไก่เนื้อในแต่ละรุ่น แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกยิ่งโน้มนำให้ไก่เกิดภาวะความเครียดมากขึ้น ส่งผลให้สมรรถนะการเจริญเติบโตลดลง จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* PB6 ในอาหารที่ระดับ 0.1% สามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อที่เสี่ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ (Al-Fataftah & Abdelqader, 2014) และเทียบเท่ากับการเลี้ยงในสภาวะปกติ (Abdelqader et al., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Roy et al. (2015) และ Wang et al. (2018) การเสริม *B. subtilis* DSM17299 ที่ระดับ 0.05% และ *B. subtilis* ที่ระดับ 0.1% สามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน การเสริมโพรไบโอติกรูปแบบผสมที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ กลุ่ม *L. pentosus* ITA23 ร่วมกับ *L. acidophilus* ITA44 กลุ่ม *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *Bifidobacterium* spp. และกลุ่ม *L. acidophilus*, *L. plantarum* *E. faecalis* ในอาหารที่ระดับ 0.1-0.15% ยังมีผลปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เช่นกันกับโพรไบโอติกในรูปแบบเดี่ยว (Jahromi et al., 2016; Ahmed et al., 2019; Li et al., 2020) และ Attia et al. (2017) ยังพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกผสม *S. cerevisiae* ร่วมกับ *L. acidophilus* ที่ระดับ

0.2% ในอาหาร สามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนดีกว่าวิตามินซีและวิตามินอี นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.3% ยังสามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะและวิตามินซี (Humam et al., 2019) และการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* และ *L. acidophilus* ในรูปแบบเซลล์ตาย (dead cell) ก็ยังช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหารได้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาวะปกติได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ (Zhu et al., 2020) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

2.7.2 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะซากและคุณภาพเนื้อ

ลักษณะซากรวมถึงคุณภาพเนื้อไก่ มีความสำคัญต่อการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภคอย่างมากและเป็นที่ผู้แปรรูปพึงปรารถนา แต่อย่างไรก็ตามความเครียดจากความร้อนมีผลให้ลักษณะซากไม่เป็นที่ต้องการและยังส่งผลให้เนื้อเน่าเสียอย่างรวดเร็ว จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ในอาหารที่ระดับ 0.1% สามารถเพิ่มน้ำหนักซาก เนื้ออก น่อง สะโพก และลดไขมันสะสมในช่องท้องของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ (Abdelqader et al., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Roy et al. (2015) ที่รายงานว่าการเสริม *B. subtilis* DSM17299 ที่ระดับ 0.05% สามารถเพิ่มน้ำหนักซาก เนื้ออกและสะโพก และ Ahmed et al. (2019) ที่รายงานว่าการเสริมโพรไบโอติกผสมที่ประกอบด้วย *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis* และ *Bifidobacterium spp.* ที่ระดับ 0.1% สามารถเพิ่มน้ำหนักซาก หัวใจและตับของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ การทดลองของ Humam et al. (2019) และ Humam et al. (2020) ยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 US5 และ UL4 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.3% สามารถเพิ่มน้ำหนักซาก ความสามารถในการอุ้มน้ำ (drip and cooking loss) และลดความเหลืองของเนื้ออก รวมถึงลดการเกิดลิปิดออกซิเดชัน (TBARS) ในเนื้อสะโพกของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะและวิตามินซี นอกจากนี้การเสริมโพรไบโอติกผสม *B. subtilis* ที่ระดับ 0.025% ยังสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ลด TBARS และลดการสูญเสียของเนื้ออกในสภาวะจัดเก็บที่มีออกซิเจนได้ถึง 5 วัน (Cramer et al., 2018) และการเสริมโพรไบโอติกผสม *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, และ *Lactobacillus spp.* ที่ระดับ 0.05% ยังมีผลเพิ่มแรงเคียนและลด TBARS ในเนื้ออกของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน (Kim et al., 2016) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 2.3×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> PB6 improved BW (17.84%), ADG (34.94%), FCR (27.94%) and SR (60%) of heat-stressed broilers.	Al-Fataftah and Abdelqader (2014)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic	Dietary inclusion of 0.05% of <i>B. subtilis</i> DSM17299 improved BW (10.72%) and FCR (12.05%) in broilers under heat stress.	Roy et al. (2015)
<i>L. pentosus</i> <i>L. acidophilus</i>	Probiotic 1×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% (a mixture of <i>L. pentosus</i> ITA23 and <i>L. acidophilus</i> ITA44) improved FI (4.46%), ADG (10.85%) and FCR (5.29%) in broilers under heat stress.	Jahromi et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> <i>L. acidophilus</i>	Probiotic	Dietary inclusion of 0.2% (a mixture of <i>S. cerevisiae</i> and <i>L. acidophilus</i>) improved BW (6.96%) and FCR (6.32%) in broilers under heat stress. Moreover, it restored the growth performance better than vitamins C and E	Attia et al. (2017)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 1×10^6 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> improved BW (13.45%), ADG (14.53%) and FCR (6.98%) in broilers under heat stress.	Wang et al. (2018)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	Probiotic	Dietary inclusion of 0.1% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> and <i>Bifidobacterium spp.</i>) improved BW (23.84%) of heat-stressed broilers.	Ahmed et al. (2019)

BW = body weight, ADG = average daily gain, FI = feed intake, FCR = feed conversion ratio, SR = survival rate

ตารางที่ 2.1 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ต่อ)

Species	Form	Results	Reference
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite) 3×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.3% <i>L. plantarum</i> RI11 improved BW (9.12%), ADG (14.12%) and FCR (6.40%) of heat-stressed broilers. Moreover, it restored the growth performance better than antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2019)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 3×10^7 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> PB6 improved BW and FCR in broilers under heat stress as similar to thermoneutral condition.	Abdelqader et al. (2020)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecalis</i>	Probiotic 1.5×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.15% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>E. faecalis</i>) improved FI (2.78%) in broilers under heat stress.	Li et al. (2020)
<i>B. subtilis</i> <i>L. acidophilus</i>	Postbiotic (dead cell) 5×10^7 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.05% heat-inactivated <i>B. subtilis</i> and <i>L. acidophilus</i> improved FCR (3.91%) in broilers under thermoneutral condition and supplemented with antibiotic.	Zhu et al. (2020)

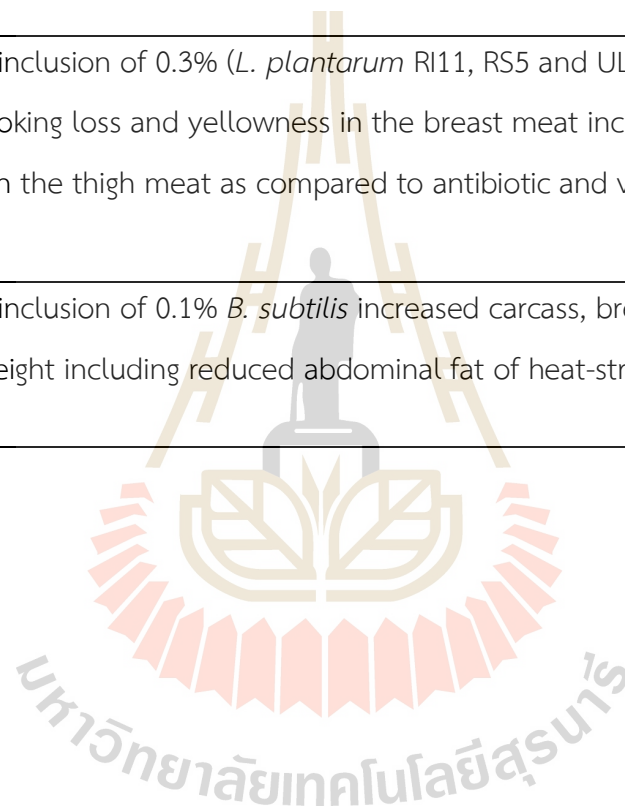
BW = body weight, ADG = average daily gain, FI = feed intake, FCR = feed conversion ratio, SR = survival rate

ตารางที่ 2.2 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะซากและคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic	Dietary inclusion of 0.05% of <i>B. subtilis</i> DSM17299 improved carcass, thigh, and breast weight in broilers under heat stress.	Roy et al. (2015)
<i>Enterococcus spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Probiotic 1×10^5 CFU/g	Dietary inclusion of 0.05% (a mixture of <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Pediococcus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , and <i>Lactobacillus spp.</i>) improved shear force and lipid oxidation (TBARS) in the breast meat of heat-stressed broilers.	Kim et al. (2016)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 1×10^6 CFU/g	Dietary inclusion of 0.025% <i>B. subtilis</i> alleviated negative effect of lipid oxidation (TBARS, DPPH) and reduced weight loss during 5 d of aerobic display storage in the breast meat of broilers under heat stress.	Cramer et al. (2018)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>	Probiotic	Dietary inclusion of 0.1% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> and <i>Bifidobacterium spp.</i>) improved carcass, heart, and liver weight of heat-stressed broilers.	Ahmed et al. (2019)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite) 3×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.3% (<i>L. plantarum</i> RI11, RS5 and UL4) increased carcass weight in broilers under heat stress as compared to antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2019)

ตารางที่ 2.2 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะซากและคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ต่อ)

Species	Form	Results	Reference
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite) 3×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.3% (<i>L. plantarum</i> RI11, RS5 and UL4) reduced drip loss, cooking loss and yellowness in the breast meat including reduced TBARS in the thigh meat as compared to antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2020)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 3×10^7 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> increased carcass, breast, drumstick, thigh weight including reduced abdominal fat of heat-stressed broilers.	Abdelqader et al. (2020)



2.7.3 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นกลไกของร่างกายในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ อาทิเช่น การที่สัตว์ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อน ซึ่งก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายเกินกว่าความสามารถของร่างกายที่จะกำจัดได้และมีผลทำลายเซลล์ต่างๆ จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ระดับ 0.025% ในอาหารสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระ (GPx, SOD) ในเนื้ออกของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อนได้ (Cramer et al., 2018) นอกจากนี้ Humam et al. (2020) ยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.3% สามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรวม (total antioxidant activity, T-OAC) การทำงานของเอนไซม์ CAT และ GHS ในเลือดของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ดีกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและวิตามินซี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Humam et al. (2021) ที่รายงานว่าการเสริม *L. plantarum* RI11 ที่ระดับ 0.4-0.8% สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ GPx, CAT และ GSH ในเลือดของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนเมื่อเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะและวิตามินซีเช่นกัน และยังพบว่าที่ระดับ 0.6% เพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับทุกๆ กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.3

2.7.4 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบ

ระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบเป็นกลไกของร่างกายในการป้องกันการติดเชื้อ การถูกทำลายของเซลล์และบ่งบอกถึงสุขภาพของสัตว์ได้ ความเครียดจากความร้อนก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้สัตว์เกิดการอักเสบของเซลล์และมีระบบภูมิคุ้มกันที่ลดลง จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์ โพรไบโอติก *L. acidophilus*, *L. plantarum* และ *E. faecalis* ที่ระดับ 0.15% ในอาหาร สามารถลดการแสดงออกของยีน Toll-like receptor (TLR5, TLR15) และ Avian beta-defensin (AvBD4, AvBD15) ที่ลำไส้เล็กส่วนท้ายได้ (Li et al., 2022) และยังสามารถลดปริมาณไซโตไคน์หรือสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (IL-6, TNF- α) รวมถึงเพิ่มปริมาณไซโตไคน์ที่ช่วยยับยั้งการอักเสบ (IL-10) ในเลือดของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ (Li et al., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang et al. (2018) ที่เสริม *B. subtilis* ในอาหารที่ระดับ 0.1% สามารถลดปริมาณโปรตีน IL-6 และเพิ่มปริมาณโปรตีน IL-10 ในตับไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน นอกจากนี้ Humam et al. (2021) ยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.6% นั้นสามารถลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (TNF- α)

และเพิ่มการแสดงออกของยีน IL-10 ในลำไส้เล็กส่วนท้าย เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและวิตามินซี ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 2.5×10^5 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.025% <i>B. subtilis</i> improved endogenous antioxidant enzyme activity by increasing GPx and SOD in the breast meat of heat-stressed broilers.	Cramer et al. (2018)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite)	Dietary inclusion of 0.3% <i>L. plantarum</i> RI11 significantly increased T-OAC, CAT and GSH in the blood of heat-stressed broilers as compared to antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite)	Dietary inclusion of 0.4–0.8% <i>L. plantarum</i> RI11 improved antioxidant enzyme activity by increasing GPx, CAT and GSH in the blood of heat-stressed broilers as compared to antibiotic and vitamin C. The RI11 at level of 0.6% showed the highest antioxidant activity than the other groups.	Humam et al (2021)

GPx = glutathione peroxidase, SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase, GSH = glutathione, T-OAC = total antioxidant activity

ตารางที่ 2.4 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อภูมิคุ้มกันและการอักเสบของไก่เนื้อ ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 1×10^6 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> decreased hepatic inflammatory cytokine (IL-6) and increased anti-inflammatory cytokine (IL-10) protein concentrations levels in broilers under heat stress.	Wang et al. (2018)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecalis</i>	Probiotic 1.5×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.15% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>E. faecalis</i>) reduced inflammatory cytokine (IL-6, TNF- α) and increased anti-inflammatory cytokine (IL-10) in the blood of broilers under heat stress.	Li et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite)	Dietary inclusion of 0.6% <i>L. plantarum</i> RI11 upregulated anti-inflammatory cytokine (IL-10) genes and down-regulated pro-inflammatory cytokine (TNF- α) gene in the ileal tissue of heat-stressed broilers as compared to antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2021)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecalis</i>	Probiotic 1.5×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.15% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>E. faecalis</i>) down-regulated mRNA expression levels of TLR5, TLR15, AvBD4 and AvBD15 in the ileum of heat-stressed broilers.	Li et al. (2022)

IL-5/6/8/10/15 = interleukin 5/6/8/10/15, TNF- α = tumor necrosis factor alpha, AvBD4/15 = avian beta-defensin 4/15

2.7.5 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อ Acute phase protein (APP) และโปรตีนฮีทช็อก

APP เป็นโปรตีนที่ร่างกายสร้างจากตับเพื่อมาตอบสนองต่อกลไกการอักเสบและการติดเชื้อ และ HSP ก็เป็นโปรตีนที่ช่วยที่ไม่ให้โปรตีนอื่น ๆ เกิดการเสียสภาพจนไม่สามารถทำงานได้ โดยความเครียดจากความร้อนมีผลให้เกิดการอักเสบและการเสียสภาพของโปรตีนเพิ่มมากขึ้น จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.3% สามารถลดปริมาณ APP (α 1-AGP, CPN) ในเลือดของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ดีกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและวิตามินซี (Humam et al., 2020) และ Humam et al. (2021) ยังพบการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 ที่ระดับ 0.4-0.8% ในอาหาร สามารถลดการแสดงออกของยีน HSP70 และ α 1-AGP ในตับของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ดีกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang et al. (2018) ที่รายงานว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ในอาหารที่ระดับ 0.1% สามารถลดการแสดงออกของยีนและปริมาณโปรตีน HSP70 ในตับของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.5

2.7.6 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความแข็งแรงของผนังลำไส้

TJ เป็นโปรตีนที่อยู่ระหว่างเซลล์ลำไส้ ซึ่งทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ผนังลำไส้ ป้องกันการรั่วไหลของสารพิษและเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด โดยภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลให้โปรตีน TJ ถูกทำลายและส่งผลให้ความแข็งแรงของผนังลำไส้ลดลง จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. acidophilus*, *L. plantarum* และ *E. faecalis* ในอาหารที่ระดับ 0.15% สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน TJ (OCLD) ในลำไส้เล็กส่วนท้ายของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ (Li et al., 2022) นอกจากนี้การทดลองของ Humam et al. (2021) ยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.4–0.8% ก็สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน TJ (ZO-1, MUC2) ในลำไส้เล็กส่วนท้ายของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ดีกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและวิตามินซี และยังพบว่าการเสริมที่ระดับ 0.6% ให้ผลดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อ Acute phase protein และโปรตีน
ฮีตช็อกของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 1×10^6 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> decreased hepatic HSP70 mRNA expression levels and concentration in broilers under heat stress.	Wang et al. (2018)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite)	Dietary inclusion of 0.3% <i>L. plantarum</i> RI11 significantly reduced acute phase protein (α 1-AGP, CPN) concentration in the blood of broilers under heat stress when compared with antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite)	Dietary inclusion of 0.4–0.8% <i>L. plantarum</i> RI11 down-regulated hepatic HSP70 and α 1-AGP genes in broilers under heat stress when compared with antibiotic groups.	Humam et al. (2021)

HSP70 = heat shock protein 70, α 1-AGP = alpha 1 acid glycoprotein, CPN = ceruloplasmin.

ตารางที่ 2.6 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อความแข็งแรงของผนังลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite)	Dietary inclusion of 0.4–0.8% <i>L. plantarum</i> RI11 increased mRNA expression of ZO-1 and MUC2 in the ileum tissue of heat-stressed broilers as compared to antibiotic and vitamin C groups. The RI11 at level of 0.6% was upregulated highest than the other groups.	Humam et al. (2021)
<i>L. acidophilus</i>	Probiotic	Dietary inclusion of 0.15% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>E. faecalis</i>) increased TJ protein (OCLD) mRNA expression in the ileum tissue of heat-stressed broilers.	Li et al. (2022)

ZO-1 = zonula occludin 1, MUC2 = mucin 2, OCLN = occludin

2.7.7 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้

ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการย่อยและการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนาในอาหาร แต่อย่างไรก็ตามความเครียดจากความร้อนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระทำลายผนังลำไส้ ส่งผลให้สัณฐานวิทยาของลำไส้ถูกทำลายและยังส่งผลให้ความสามารถในการย่อยและใช้ประโยชน์ได้ของโภชนาด้วยประสิทธิภาพลง จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ในอาหารที่ระดับ 0.1% สามารถปรับปรุงความสูงของวิลไล ความลึกของเซลล์ครีปต์ พื้นที่ผิวสัมผัสวิลไลและเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนต้นและท้ายในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ (Al-Fataftah and Abdelqader, 2014; Abdelqader et al., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Li et al. (2020) ที่รายงานว่าการเสริม *L. acidophilus*, *L. plantarum* และ *E. faecalis* ในอาหารที่ระดับ 0.15% สามารถเพิ่มความสูงของวิลไลและสัดส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกเซลล์ครีปต์ในลำไส้เล็กของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ นอกจากนี้ Humam et al. (2019) ยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 รูปแบบสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.3%

ยังสามารถเพิ่มความสูงของวิลไลและสัดส่วนความสูงวิลไลต่อความลึกของเซลล์คริปต์ในลำไส้เล็กของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนและเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและวิตามินซีได้เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 2.3×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> PB6 improved villus height, crypt depth, villus surface area and absorptive epithelial cell area in the SI (duodenum, ileum) of heat-stressed broilers.	Al-Fataftah and Abdelqader, (2014)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite) 3×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.3% <i>L. plantarum</i> RI11 increased villus height and villus height per crypt depth ratio in the SI (duodenum, jejunum and ileum) of heat-stressed broilers as compared to antibiotic and vitamin C groups.	Humam et al. (2019)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 3×10^7 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> improved duodenal villus height, crypt depth, villus surface area and absorptive epithelial cell area in of heat-stressed broilers.	Abdelqader et al. (2020)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecalis</i>	Probiotic 1.5×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.15% (a mixture of <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>E. faecalis</i>) improved villus height and villus height per crypt depth ratio in the SI of heat-stressed broilers.	Li et al. (2020)

SI = small intestine

2.7.8 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้เป็นดัชนีที่สามารถบ่งบอกถึงสุขภาพสัตว์ได้ แต่อย่างไรก็ตามความเครียดจากความร้อนก็มีผลรบกวนสมดุลจุลินทรีย์และทำให้จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารขาดความสมดุล โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ลดลงและจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มมากขึ้น จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ในอาหารที่ระดับ 0.1% สามารถเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้เล็ก โดยลดจำนวนประชากรจุลินทรีย์ก่อโรค (*Clostridium*, *Coliforms*) และเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) ในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (Al-Fataftah and Abdelqader, 2014; Abdelqader et al., 2020) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jahromi et al. (2016) ที่รายงานว่าการเสริม *L. pentosus* ITA23 และ *L. acidophilus* ITA44 ที่ระดับ 0.1% ในอาหารสามารถเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* ในซีกัมของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ นอกจากนี้ Humam et al. (2019) ยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 RS5 และ UL4 รูปแบบสารเมแทบอลิটที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell-free supernatant) ในอาหารที่ระดับ 0.3% สามารถลดจำนวนประชากรจุลินทรีย์ *Enterobacterium*, *E. coli* และ *Salmonella* รวมถึงเพิ่มจำนวนประชากรจุลินทรีย์ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ในซีกัมของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน และยังพบว่าสายพันธุ์ RI11 มีศักยภาพสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและวิตามินซี ดังแสดงในตารางที่ 2.8



ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Species	Form	Results	Reference
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 2.3×10^8 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> PB6 improved harmful bacteria (<i>Clostridium</i> , <i>Coliforms</i>) and beneficial bacteria (<i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i>) in the SI of heat-stressed broilers.	Al-Fataftah and Abdelqader, (2014)
<i>L. pentosus</i> <i>L. acidophilus</i>	Probiotic 1×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion 0.1% (a mixture of <i>L. pentosus</i> ITA23 and <i>L. acidophilus</i> ITA44) increased the population of <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> in the caecum of heat-stressed broilers.	Jahromi et al. (2016)
<i>L. plantarum</i>	Postbiotic (metabolite) 3×10^9 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.3% (<i>L. plantarum</i> RI11, RS5 and UL4) reduced cecal harmful bacteria (<i>Enterobacterium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>) and increased beneficial bacteria (<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>) in broilers under heat stress. The RI11 shown the greatest potential than other postbiotic strains, antibiotic and vitamin C groups	Humam et al. (2019)
<i>B. subtilis</i>	Probiotic 3×10^7 CFU/kg	Dietary inclusion of 0.1% <i>B. subtilis</i> improved harmful bacteria (<i>Clostridium</i> , <i>Coliforms</i>) and beneficial bacteria (<i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i>) in the SI of heat-stressed broilers.	Abdelqader et al. (2020)

SI = small intestine

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพลีไบโอติก DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโปรตีนฮีตช็อกของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน ซึ่งมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

3.1 การเตรียมจุลินทรีย์โพลีไบโอติกรูปแบบเซลล์ตาย (DC-LIC37)

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ DC-LIC37 โดยขยายต้นเชื้อลงในอาหาร Lactobacillus De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (HIMEDIA[®], Mumbai, India) ในอัตราส่วน 0.5 ml ต่ออาหาร 400 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C กวนด้วยความเร็ว 200 rpm และวัดค่า OD₆₀₀ ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนค่า OD₆₀₀ ได้ 2 ซึ่งจะมีจำนวนมวลเซลล์ขั้นต่ำที่ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10⁸ CFU/ml (ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที และเติม PBS เพื่อล้างและรักษาสภาพเซลล์ จำนวน 3 รอบ แล้วนำส่วนที่มีเฉพาะตัวเซลล์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

3.2 แผนการทดลอง สัตว์และโรงเรือนสัตว์ทดลอง

การทดลองใช้ไก่เนื้อเพศผู้สายพันธุ์รอส 308 อายุ 1 วัน จำนวน 360 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ซ้ำ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ซึ่งไก่แต่ละกลุ่มจะถูกเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิแบบปล่อยบนพื้นแกลบ กรงขนาด 0.8×1×1 เมตร ภายในกรงมีลาดให้อาหารและระบบการให้น้ำแบบหัวหยด ซึ่งไก่ทุกตัวจะได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (ad libitum) และทำการกักให้ความอบอุ่นแก่ลูกไก่เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยอายุ 1–7 วันแรก จะทำการควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32±1°C จากนั้นค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลง จนถึง 21±1°C ที่อายุ 14 วัน เมื่ออายุครบ 15 วัน กลุ่มที่ 1 เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติที่อยู่อย่างสบาย (thermoneutral condition, TNZ) ที่อุณหภูมิ 21±1°C ขณะที่กลุ่มที่ 2 3 4 5 และ 6 เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนแบบเรื้อรัง โดยใช้เครื่องให้ความร้อน (heater) ที่อุณหภูมิ 32±1°C วันละ 5 ชั่วโมง (11.00–16.00 น.) จนสิ้นสุดการทดลองที่อายุ 42 วัน

3.3 อาหารทดลอง

อาหารทดลองมีการคำนวณระดับพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ ปริมาณโปรตีน กรดอะมิโนและ โภชนะต่างๆ ให้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายของไก่เนื้อในระยะนั้นๆ ตามคำแนะนำของ NRC (1994) ร่วมกับมาตรฐานสายพันธุ์ Ross (2019) ซึ่งอาหารทดลองเป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้ ข้าวโพดและกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลัก (corn-soy diets) แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะไก่เล็ก สำหรับไก่เนื้อช่วงอายุ 1–10 วัน 2) ระยะไก่รุ่น สำหรับไก่เนื้อช่วงอายุ 11–21 วัน 3) ระยะไก่ขุน สำหรับไก่เนื้อช่วงอายุ 22–42 วัน ซึ่งองค์ประกอบของวัตถุดิบและปริมาณโภชนะใน สูตรอาหาร (แสดงไว้ในตารางที่ 3.1) โดยอาหารทดลองประกอบด้วย 6 กลุ่มที่แตกต่างกัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติและได้รับอาหารพื้นฐาน (control)

กลุ่มที่ 2: กลุ่มควบคุมลบ กระตุ้นด้วยความเครียดจากความร้อนและได้รับอาหารพื้นฐานที่ ปราศจากสารเสริม (NC)

กลุ่มที่ 3: กลุ่มควบคุมบวก กระตุ้นด้วยความเครียดจากความร้อนและได้รับอาหารพื้นฐานที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะ Zinc bacitracin 0.05 g/kg diet (PC)

กลุ่มที่ 4: กลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยความเครียดจากความร้อนและได้รับอาหารพื้นฐานที่มีการ เสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 CFU/kg diet (Level 1)

กลุ่มที่ 5: กลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยความเครียดจากความร้อนและได้รับอาหารพื้นฐานที่มีการ เสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^8 CFU/kg diet (Level 2)

กลุ่มที่ 6: กลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยความเครียดจากความร้อนและได้รับอาหารพื้นฐานที่มีการ เสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^9 CFU/kg diet (Level 3)

3.4 การเก็บข้อมูลและตัวอย่าง

3.4.1 การเก็บข้อมูล

ทำการชั่งน้ำหนักและจดบันทึกข้อมูลที่อายุ 0 7 14 21 28 35 และ 42 วัน โดยชั่ง น้ำหนักไก่ทุกตัวในแต่ละเช้าและปริมาณอาหารเหลือค้างที่อยู่ในรางและชั่งอาหารใหม่เข้าทุกๆ สัปดาห์ จดบันทึกการตายของไก่ในแต่ละวัน

3.4.2 การเก็บตัวอย่าง

เมื่ออายุครบ 21 วัน สุ่มไก่ฆ่าละ 2 ตัว ทำสลบด้วยการรมคลอโรฟอร์มและเชือดเอา เลือดออก จากนั้นทำการเก็บสิ่งย่อยในซีกัมใส่หลอด 1.5 ml เก็บในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว เพื่อ วิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Real-time PCR และเก็บลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วน (duodenum, jejunum, ileum) ความยาวประมาณ 2–3 cm ใส่ในฟอर्मาลิน 10% เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทาง สัณฐานวิทยาของลำไส้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและปริมาณโภชนะในอาหารพื้นฐาน

Item	Starter (1-10 d)	Grower (11-21 d)	Finisher (22-42 d)
Ingredients (%)			
Corn	56.28	58.10	62.30
Soybean meal	30.4	28.75	25.10
Corn gluten meal	6.21	5.30	3.70
Palm oil	1.80	3.16	4.25
Limestone	1.49	1.34	1.24
Monocalcium phosphate	1.62	1.45	1.31
Salt	0.50	0.49	0.50
DL-methionine	0.31	0.27	0.27
L-lysine	0.47	0.37	0.46
L-threonine	0.20	0.14	0.13
L-arginine	0.22	0.13	0.24
Vitamin-mineral premix ¹	0.50	0.50	0.50
Calculated nutrients			
Metabolizable energy (kcal ME/kg)	3,000	3,100	3,200
Protein (%)	23.0	21.5	19.5
Fat (%)	4.31	5.69	6.86
Fiber (%)	3.37	3.29	3.12
Methionine + cysteine (%)	0.95	0.87	0.80
Lysine (%)	1.28	1.15	1.13
Calcium (%)	0.96	0.87	0.79
Available phosphorus (%)	0.48	0.44	0.40

¹ Vitamin-mineral premix provided the following per kg: vitamin A 3,000,000 IU; vitamin D 6,000,000 IU; vitamin E 5,000 IU; vitamin K 1,000 mg; thiamine 500 mg; riboflavin 1,400 mg; pantothenic acid 2,208 mg; niacin 7,000 mg; pyridoxine 900 mg; biotin 3 mg; folic acid 200 mg; choline 50,000 mg; Fe 16,000 mg; Cu 320 mg; Zn 9,000 mg; Mn 12,000 mg; I 80 mg; Se 30 mg.

เมื่ออายุครบ 42 วัน สุ่มไก่ฆ่าละ 4 ตัว โดย 2 ตัวแรก ทำการสับด้วยการมคมคลอโรฟอร์มและเลือดเอาเลือดออก จากนั้นทำการเก็บตับ ผงลำไส้เล็กส่วนกลาง (intestinal mucosa) ใส่หลอด 1.5 ml เก็บในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็วและนำไปแช่ -80°C เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีนและตัวควบคุมการอักเสบของตับ (HSP70, HSP90, NF-kB) ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้ (IL-6, IL-10, TNF- α) ด้วยเทคนิค Real time PCR และเก็บเนื้อส่วนสะโพก สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ (TBARS, DPPH) ส่วนอีก 2 ตัว ทำการชั่งน้ำหนักมีชีวิต (slaughter weight) จากนั้นทำสับด้วยการชोटด้วยกระแสไฟฟ้าและเลือดเอาเลือดออก ถอนชน ตัดส่วนคอและขาออกก่อนวัดคุณภาพซาก ชั่งน้ำหนักส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะภายใน ประกอบด้วยหัวใจ ม้าม ตับ กึ๋น ไขมันช่องท้องและต่อมเบอซา จากนั้นนำซากที่ตัดแต่งไปแช่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดคุณภาพเนื้อออก (pH, L*, b*, a*) และตัดแต่งชิ้นส่วน ออกน่อง สะโพก ปีกและบันทึกน้ำหนัก

3.5 การคำนวณและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.5.1 การวัดสมรรถนะการเจริญเติบโต (growth performance and productive index)

ทำการชั่งน้ำหนักและจดบันทึกข้อมูลที่อายุ 0 7 14 21 28 35 และ 42 วัน โดยชั่งน้ำหนักไก่ทุกตัวในแต่ละเช้าและปริมาณอาหารเหลือค้ำที่อยู่ในราง และชั่งอาหารใหม่เข้าทุกๆ สัปดาห์ เพื่อนำไปคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน ปริมาณอาหารที่กินรวมถึงประสิทธิภาพในการใช้อาหาร จำนวนไก่ที่ตายในแต่ละวัน เพื่อนำไปคำนวณอัตราการรอดชีวิตและดัชนีชีวิตสมรรถนะการผลิตไก่เนื้อของยุโรป ดังสูตรหรือสมการที่แสดงต่อไปนี้

น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain, g/bird)

$$= \text{น้ำหนักตัวสุดท้าย (g)} - \text{น้ำหนักตัวเริ่มต้น (g)}$$

น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน (average daily gain, g/bird/day)

$$= \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (g/bird)}}{\text{จำนวนวันที่ทำการทดลอง (day)}}$$

ปริมาณอาหารที่กิน (feed intake, g/bird)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินตลอดการทดลอง (g)}}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมด (bird)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion ratio)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (g/bird)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (g/bird)}}$$

อัตราการรอดชีวิต (survival rate, %)

$$= \frac{(\text{จำนวนไก่ที่เริ่มต้นการทดลอง} - \text{จำนวนไก่ที่ตาย}) \times 100}{\text{จำนวนไก่ที่เริ่มต้นการทดลอง}}$$

ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรป (European broiler index)

$$= \frac{\text{อัตราการรอดชีวิต} \times \text{น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน} \times 100}{\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร} \times 10}$$

3.5.2 การวัดลักษณะซาก (carcass characteristic)

การวัดลักษณะซาก โดยการชั่งและบันทึกน้ำหนักมีชีวิต น้ำหนักอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ม้าม ตับ กิ่ง ต่อมเบอเซา และไขมันช่องท้อง แล้วนำซากที่ตัดแต่งแล้วไปแช่ที่อุณหภูมิ 4°C (ซากเย็น) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการตัดแต่งแยกชิ้นส่วนซากและชั่งน้ำหนักสะโพก น่อง ปีกและอก เพื่อคำนวณสัดส่วนของน้ำหนักอวัยวะภายในและองค์ประกอบซาก ดังสมการต่อไปนี้

สัดส่วนของน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักมีชีวิต (visceral organs, % of live weight)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะภายใน (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักมีชีวิต (g)}}$$

สัดส่วนองค์ประกอบซากต่อซากเย็น (body composition, % of carcass weight)

$$= \frac{\text{น้ำหนักองค์ประกอบซาก (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักซากเย็น (g)}}$$

3.5.3 การวัดคุณภาพเนื้อ (meat quality)

3.5.3.1 การวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การวัด pH ของเนื้อส่วนอก โดยการใช้เครื่อง pH Meter วัดบริเวณส่วนบนของเนื้ออกที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเชือดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อหลังการตาย (post-mortem) ขณะที่พลังงานสำรองในรูปของไกลโคเจนหมด

3.5.3.2 การวัดสี (Color)

การวัดสีของเนื้อส่วนอก โดยใช้เครื่อง Colorimeter วัดค่า L* a* b* ของเนื้ออกด้านซ้ายที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเชือดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อหลังการตาย (post-mortem) ขณะที่พลังงานสำรองในรูปของไกลโคเจนหมด

3.5.4 การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ

3.5.4.1 การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเนื้อส่วนสะโพก ดัดแปลงจากวิธีการของ Cramer et al. (2018) โดยทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอล (ethanol) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่ให้อิเล็กตรอนหรือโปรตรอนในอุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง สีม่วงจะจางลงจนเป็นสีเหลือง จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})] \times 100$$

หมายเหตุ: A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง + สารละลาย DPPH

3.5.4.2 การวัดลิตออกซิเดชัน Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

การวัดการเกิดลิตออกซิเดชันในเนื้อส่วนสะโพก ด้วยวิธี TBARS ดัดแปลงจากวิธีการของ Cramer et al. (2018) โดยนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) ภายใต้สภาวะกรดและความร้อนที่ประมาณ 80°C ทำให้เกิด Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการเกิดลิตออกซิเดชันของตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ TBA เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพู จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 nm และนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐาน MDA ที่ความเข้มข้น 0–10 nM/ml เพื่อหาปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง

3.5.5 การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ (gut morphology)

การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ดัดแปลงตามวิธีการของ Al-Fataftah and Abdelqader (2014) และ Humam et al. (2019) การเตรียมตัวอย่างใช้เครื่อง Tissue processor ทำตัวอย่างให้แห้ง โดยแช่ฟอร์มาลิน 10% สารละลายเอทานอล (ethanol) 95 และ 100% ล้างด้วย Xylene และ Paraplast ที่ร้อน แล้วนำไปตรึง (embed) ด้วยพาราฟิน และตัดตามขวาง (cross section) ด้วยเครื่องตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (tissue cutting) ให้มีความหนาประมาณ 4 μm นำไปวางใน

อ่างน้ำ อุณหภูมิประมาณ 38°C แล้วใช้สไลด์ซ้อนขึ้นมาให้ตั้งและทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C จากนั้นนำไปย้อมสี Haematoxylin และ Eosin ทิ้งให้แห้ง นำไปปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่ต่อกับจอคอมพิวเตอร์และใช้ซอฟต์แวร์ในการวัดความสูงของวิลโลและความลึกของคริปต์

3.5.6 การวัดปริมาณประชากรจุลินทรีย์ในซีกัม (cecal microbial population)

การวัดชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในซีกัมด้วยเทคนิค Real-time PCR ดัดแปลงจากวิธีการของ Navidshad et al. (2012) และ Humam et al. (2019) โดยทำการสกัด genomic DNA (gDNA) จากสิ่งย่อยในซีกัมที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง น้ำหนักประมาณ 40–50 mg ด้วยชุดสกัด QIAamp® DNA Stool Mini kits (Qiagen, Hilden, Germany) และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAamp® spin column (Qiagen, Hilden, Germany) ตามวิธีการและคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน (amplified) ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์ (แสดงในตารางที่ 3.2) วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Absolute quantification เพื่อดูปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) และจุลินทรีย์ก่อโรค (*Enterobacterium*, *E. coli*)

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ในซีกัม

Target microbes	Primer sequence 5' - 3'	Product size (bp)
<i>Lactobacillus</i>	F-GCAGCAGTAGGGAATCTTCCA R-GCATTYCACCGCTACACATG	200
<i>Bifidobacterium</i>	F-GGGTGGTAAATGCCGATG R-TAAGCCATGGACTTTTCACACC	278
<i>Enterobacterium</i>	F-CATTGACGTTACCGCAGAAGAAGC R-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	195
<i>Escherichia coli</i>	F-GTGTGATATCTACCGCTTCGC R-AGAACGCTTTGTGGTTAATCAGGA	82

3.5.7 การวัดปริมาณการแสดงออกของยีน (gene expression)

การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้ ยีนที่ควบคุมการอักเสบและโปรตีนฮีทช็อกในตับ ดัดแปลงจากวิธีการของ Humam et al. (2021) ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากตัวอย่างเยื่อเมือกผนังลำไส้เล็กส่วนกลางด้วยชุดสกัด NucleoSpin® RNA (MACHINERY-NAGEL, Duren, Germany) โดยใช้ตัวอย่างที่บดละเอียดน้ำหนักประมาณ 30 mg ตามวิธีการและคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เมื่อได้ RNA ที่บริสุทธิ์แล้วทำการสังเคราะห์

Complementary DNA (cDNA) ขึ้นมาใหม่โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ (reverse transcription) ด้วย QuantiNova[®] reverse transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) ซึ่ง cDNA จะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ Messenger RNA (mRNA) เพื่อการแสดงผลของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้ (IL-6, IL-10, TNF- α) อีทซ็อกโปรตีนและตัวควบคุมการอักเสบของตับ (HSP70, HSP90, NF-kB) และใช้ GAPDH gene หรือ β -actin gene เป็นยีนควบคุม (ดังแสดงในตารางที่ 3.3) จากนั้นทำ Relative quantification (RQ) of gene expression ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ ตามวิธีการของ Livak and Schmittgen, (2001)

ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงผลของยีนด้วยเทคนิค Real time PCR

Target gene	Primer sequence 5' - 3'	Accession no.	Product size (bp)
TNF- α	F-CCCCTACCCTGTCCCACAA R-TGAGTACTGCGGAGGGTTCAT	NM204267.1	67
IL-6	F-CAAGGTGACGGAGGAGGAC R-TGGCGAGGAGGGATTCT	AJ309540	254
IL-10	F-GGAGCTGAGGGTGAAGTTTTGA R-GACACAGACTGGCAGCCAAA	NM_001004414.2	129
HSP70	F-GATCTGGGCACCACGTATTCT R-GGTTCAATTGCCACTTGTTCTT	FJ217667.1	-
HSP90	F-ACACATGCCAACCGCATTTA R-CCTCCTCAGCAGCAGTATCA	NM_001109785.1	-
NF-kB	F-GAAGGAATCGTACCGGGAACA R-CTCAGAGGGCCTTGTGACAGTAA	NM_205134	-
GAPDH	F-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT R-ACCTCTGCCATCTCTCCACA	K01458	264
β -actin	F-TTGGTTTGTCAAGCAAGCGG R-CCCCCACATACTGGCACTTT	NM_205518.1	100

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS software 16.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey's HSD และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย Orthogonal contrasts ดังนี้ 1) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่อยู่อย่างสบายและภาวะความเครียดจากความร้อน (TNZ or control vs HS) 2) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่อยู่อย่างสบายและภาวะความเครียดจากความร้อนที่มีการเสริมโฟสไบโอติก (control vs DC-LIC37) 3) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะและโฟสไบโอติก (PC vs DC-LIC37) 4) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนที่ปราศจากสารเสริมและโฟสไบโอติก (NC vs DC-LIC37) และกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

3.7 สถานที่ทำการทดลอง

3.7.1 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อาคารเครื่องมือ 11 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.7.2 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดียว อาคารเครื่องมือ 14

3.7.3 ส่วนงานสัตว์ปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.8 ระยะเวลาในการทำการทดลองและวิเคราะห์ผล

ทำการทดลอง 2 กันยายน 2564 – 14 ตุลาคม 2564

วิเคราะห์ผล 20 ตุลาคม 2564 – 25 เมษายน 2565

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน ปริมาณการกินอาหาร และดัชนีวัดประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรปต่ำกว่าไก่กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะปกติและอยู่อย่างสบาย ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารและอัตราการรอดชีวิต ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการเสริม DC-LIC37 ในอาหารไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนกลับมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและลดอัตราการตายดีกว่ากลุ่มควบคุมได้รับอาหารที่ปราศจากสารเสริม ($P > 0.05$) เพิ่มดัชนีวัดประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรปเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุมลบที่ได้รับอาหารที่ปราศจากสารเสริม ($P < 0.05$) และไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU/kg diet ส่งผลให้น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวันมีค่าเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม และ DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 CFU/kg diet ยังสามารถเพิ่มปริมาณการกินได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) นอกจากนี้การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 - 1×10^9 CFU/kg diet สามารถปรับปรุงดัชนีวัดประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรปได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมเช่นกัน ($P > 0.05$)

ไก่เนื้อเป็นไก่สายพันธุ์ทางการค้าที่ถูกปรับปรุงพันธุ์กรรมอย่างต่อเนื่องเพื่อให้มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเวลานานสั้น ซึ่งไก่เนื้อเหล่านี้จะมีอัตราการเมแทบอลิซึมที่สูง การพัฒนาของระบบต่าง ๆ เร็วกว่าปกติ มีความทนทานต่ำและเกิดความเครียดจากปัจจัยต่างๆ ที่มากระตุ้นได้ง่าย โดยเฉพาะความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อนจากสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงอย่างพลิกผันเช่นในปัจจุบัน (Kalmar et al., 2013) เมื่อไก่เผชิญกับภาวะความเครียดจากความร้อน อุณหภูมิร่างกายจะเพิ่มขึ้นเกินกว่าในสภาวะปกติที่ 41.5°C สัตว์จะมีกลไกการปรับตัวให้อยู่รอดเพื่อรักษาอุณหภูมิร่างกายในสภาวะดังกล่าวผ่านทางสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) โดยพยายามระบายความร้อนส่วนเกินออกจากร่างกายด้วยการเพิ่มอัตราการหายใจ ทางปัสสาวะและเกลือกลิ้งแผ่รังสีความร้อนผ่านวัสดุรองพื้น การลดการสร้างความร้อนในร่างกายจากกิจกรรมต่างๆ

รวมถึงลดการกินอาหารเพื่อลดกระบวนการเมแทบอลิซึมของโภชนะ (Lin et al., 2005) นอกจากนี้สมองส่วนไฮโปทาลามัสยังมีการกระตุ้นต่อมหมวกไตหลังฮอร์โมนคอติซอล (cortisol) และมีผลการหลั่งฮอร์โมนเลปติน (leptin) ทำให้รู้สึกอิ่มและไม่อยากอาหารจึงเป็นผลให้ปริมาณการกินได้ในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนลดลง ประกอบกับการหอบหายใจที่เพิ่มขึ้นนั้น ทำให้ไก่ไม่กินอาหารเช่นกัน (Nawaz et al., 2021) แต่ในขณะที่ความต้องการพลังงานสำหรับใช้ในการดำรงชีพ (เพื่อระบายความร้อนส่วนเกินออกจากร่างกาย) กลับเพิ่มขึ้น ทำให้เหลือพลังงานที่จะไปใช้ในการเจริญเติบโตน้อยลงและมีการสลายพลังงานสะสมไปใช้มากขึ้น (Lara and Rostagno, 2013; Teyssier et al., 2022) ประกอบกับความเครียดจากความร้อนยังมีผลให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ที่เกิดจากซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$) ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (Akbarian et al., 2016) ซึ่งมีผลไปทำลายเซลล์ต่างๆ รวมถึงเซลล์ผนังลำไส้และโปรตีนไทด์จังก์ชัน ทำให้เซลล์ที่บริเวณผนังลำไส้เกิดการอักเสบและติดเชื้อ ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยและใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะก็ลดลง (Abdel-Moneim et al., 2021) จึงเป็นผลให้สมรรถนะการเจริญเติบโตลดลง รวมถึงดัชนีวัดประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรปต่ำกว่ากลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่อยู่อย่างสบาย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Al-Fataftah and Abdelqader (2014) และ Attia et al. (2017) ที่รายงานว่าสภาวะอากาศร้อนมีผลทำให้ปริมาณการกินได้ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร น้ำหนักตัวและอัตราการรอดชีวิตลดลง การเสริม DC-LIC37 ในภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตให้ดีขึ้น อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของผนังเซลล์จุลินทรีย์ เช่น Surface layer protein และ Peptidoglycan ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการสร้างเยื่อเมือกมาปกคลุมผนังลำไส้ (Piqué et al., 2019) ซึ่งช่วยปกป้องลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ให้ถูกทำลายลดลง รวมถึงลดการยึดเกาะและตั้งถิ่นฐานของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ ลดการอักเสบจากอนุมูลอิสระ (ลดการแสดงออกของยีน transcription factor และ cytokine ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ) เพิ่มความแข็งแรงของลำไส้ เป็นผลให้ลำไส้ในไก่กลุ่มนี้มีสุขภาพที่ดี ส่งผลให้การย่อยได้และการใช้ประโยชน์ของโภชนะดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Sirisopapong et al. (2021) ที่รายงานว่า การเสริม *L. ingluviei* C37 สามารถเพิ่มความแข็งแรงและลดการอักเสบของผนังลำไส้ในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) และการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacilli* ก็ยังมีผลปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดเนื่องจากความร้อนได้ (Jahromi et al., 2016; Ahmed et al., 2019) นอกจากนี้การทดลองของ Zhu et al. (2020) ยังมีการรายงานว่า การเสริมจุลินทรีย์ *B. subtilis* และ *L. acidophilus* รูปแบบเซลล์ตาย สามารถปรับปรุงสมรรถนะการเจริญเติบโตในไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.1 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Parameter	Control	NC	PC	DC-LIC 37			SEM	P-value	Orthogonal contrasts			
				Level 1	Level 2	Level 3			1	2	3	4
IBW (g)	47.6	47.6	47.5	47.6	47.6	47.6	0.07	0.998	NS	NS	NS	NS
BWG (g)	3389.0 ^a	3007.1 ^b	3041.9 ^b	3192.5 ^{ab}	3092.7 ^b	3103.1 ^{ab}	35.57	0.002	0.0001	0.001	NS	NS
ADG (g/d)	80.7 ^a	71.6 ^b	72.4 ^b	76 ^{ab}	73.6 ^b	73.9 ^{ab}	0.85	0.002	0.0001	0.001	NS	NS
FI (g)	5060.1 ^a	4669.0 ^b	4645.1 ^b	4726.6 ^{ab}	4657.5 ^b	4645.0 ^b	42.27	0.003	0.0001	0.0001	NS	NS
FCR	1.49	1.55	1.53	1.49	1.51	1.50	0.01	0.55	NS	NS	NS	NS
SR (%)	100.00	92.50	90.63	96.88	96.88	97.50	1.21	0.079	NS	NS	NS	NS
EBI	540.45 ^a	426.89 ^b	415.02 ^b	493.10 ^{ab}	473.44 ^{ab}	494.42 ^{ab}	12.45	0.01	0.004	NS	0.03	0.04

^{a-b} Means with different superscript in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$).

Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS + Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg. SEM = standard error of means. NS = non-significant difference.

Orthogonal contrasts: 1 = TNZ vs HS, 2 = Control vs DC-LIC37, 3 = PC vs DC-LIC37, 4 = NC vs DC-LIC37. IBW = initial body weight. BWG = body weight gain. ADG = average daily feed intake. FI = feed intake. FCR = feed conversion ratio. SR = survival rate. EBI = European broiler index.

4.2 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะซากของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะซากของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความ ร้อน (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากความร้อนมีน้ำหนักมีชีวิตและน้ำหนักซากเย็น หลังจากเก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่ำกว่ากลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะที่อยู่อย่างสบาย นอกจากนี้ยังมีสัดส่วนน้ำหนักหัวใจ ม้าม และเนื้อส่วนนอกที่ลดลงและสัดส่วนน้ำหนักปีกที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัว ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจาก ความร้อนและเสริมด้วย DC-LIC37 มีน้ำหนักมีชีวิตดีกว่ากลุ่มควบคุมบวก (เสริมยาปฏิชีวนะ) และ กลุ่มควบคุมลบ (ปราศจากสารเสริม) นอกจากนี้ยังมีผลให้สัดส่วนน้ำหนักปีกลดลง สัดส่วนน้ำหนักตับ และเนื้อส่วนนอกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU/kg diet ส่งผลให้สัดส่วนน้ำหนักตับและเนื้อออกมากกว่ากลุ่มควบคุมบวก กลุ่ม ควบคุมลบและการเสริมที่ระดับ 1×10^9 CFU/kg diet ยังส่งผลให้สัดส่วนน้ำหนักปีกและอกเทียบเท่า กับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

เมื่อไก่ได้รับความเครียดจากความร้อนอุณหภูมิของร่างกายจะเพิ่มขึ้น ซึ่งสัตว์จะมีกลไกใน การรักษาอุณหภูมิด้วยการหอบหายใจ ลดการกินอาหารเพื่อลดความร้อนจากกระบวนการเมแท บอลิซึมของโภชนาและกินน้ำมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารและอัตราการเจริญเติบโต ต่ำกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่อยู่อย่างสบาย (Lara and Rostagno, 2013) การทดลองนี้พบว่าใน สภาวะอากาศร้อนมีผลทำให้น้ำหนักหัวใจ ม้ามและเนื้อส่วนนอกลดลง และน้ำหนักปีกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม น้ำหนักเครื่องในที่ลดลงยังไม่สามารถอธิบายเหตุผลได้อย่างแน่ชัด แต่คาดว่าน่าเป็นผลมาจากการ ปรับตัวที่มีผลมาจากการกินอาหารที่ลดลงและฮอร์โมนคอติซอลที่มีผลยับยั้งการพัฒนของอวัยวะ น้ำเหลืองที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Quinteiro-Filho et al., 2010) น้ำหนักปีกที่เพิ่มขึ้นอาจเป็น ผลมาจากการที่สัตว์พยายามกระพือปีกเพื่อระบายความร้อน น้ำหนักหัวใจที่ลดลงอาจเป็นผลมาจาก การปรับตัวของระบบร่างกายจากการกินอาหารที่ลดลง Zeferino et al. (2016) และน้ำหนักอกที่ ลดลงอาจเป็นเพราะมีการสลายไกลโคเจนที่สะสมไว้ในกล้ามเนื้อออกมาใช้และเนื้อส่วนนอกยัง ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อที่หดตัวเร็วและต้องใช้ไกลูโคส (fast glycolytic fibers) ทำให้ต้องอาศัย พลังงานไกลโคเจนที่มาจากอาหารมาใช้ในการพัฒนาที่มากกว่ากล้ามเนื้อส่วนอื่น ๆ ร่วมกับปริมาณ การกินได้ที่ลดลง ส่งผลให้พลังงานไม่เพียงพอและลดการสะสมโปรตีนในเนื้อส่วนนอก (Weng et al., 2022) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Zeferino et al. (2016) ที่รายงานว่าสภาวะอากาศร้อนมีผล ทำให้น้ำหนักตับ หัวใจและเนื้อส่วนนอกลดลง และน้ำหนักปีกเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักสะโพกและ น่อง และการรายงานของ Sohail et al. (2013) ที่พบว่าภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลให้ น้ำหนักม้ามลดลงเช่นกัน การเสริม DC-LIC37 ในภาวะความเครียดจากความร้อนส่งผลให้ไก่น้ำหนัก

มีชีวิตมากขึ้น อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของผนังเซลล์ DC-LIC37 เช่น Surface layer protein และ Peptidoglycan ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการสร้างเยื่อเมือกมาปกคลุมผนังลำไส้ที่ช่วยลดการอักเสบและการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระของเซลล์เยื่อผนังลำไส้และยังเพิ่มความแข็งแรงของผนังลำไส้ ส่งผลให้ลำไส้มีสุขภาพดี ทำให้การย่อยได้และการใช้ประโยชน์ของโภชนาดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Sirisopapong et al. (2021) ที่รายงานว่า การเสริม *L. ingluviei* C37 สามารถเพิ่มความแข็งแรงของผนังลำไส้และลดการอักเสบในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ น้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (ตับ) และเนื้อส่วนอกเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่เสริม DC-LIC37 เป็นผลมาจากน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ahmed et al. (2019) รายงานว่าการเสริมโพรไบโอติก PROBAC plus ในสภาวะอากาศร้อนมีผลในการเพิ่มน้ำหนักซาก หัวใจ ม้าม และตับ น้ำหนักปีกที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นการตอบสนองผ่านกลไก Hypothalamic-pituitary-adrenal axis ที่ลดลง (Mohammed et al., 2018)

4.3 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน (ตารางที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อส่วนสะโพกลดลง (ค่าการเกิดลิปิดออกซิเดชัน TBARS เพิ่มขึ้น และค่า DPPH ลดลง) ($P < 0.05$) การเสริม DC-LIC37 สามารถเพิ่มคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ดีขึ้น (ค่า TBARS ลดลง และค่า DPPH เพิ่มขึ้น) ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบ โดยการเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ CFU/kg diet ส่งผลให้ค่า TBARS และ DPPH เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เนื้อส่วนอกของไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริม DC-LIC37 ยังมีค่าความสว่าง (L^*) ลดลง และค่าความแดง (a^*) สูงขึ้น กว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

เมื่อไก่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง) เซลล์ต่างๆ ในร่างกาย จะต้องการพลังงานเพิ่มขึ้น โดยร่างกายจะมีกลไกการปรับตัวในการสร้างพลังงานให้เพียงพอกับความ ต้องการผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจะเกิดการรั่วไหลของโปรตอนและ ก่อให้เกิดความต่างศักย์ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนไม่มี ประสิทธิภาพและก่อให้เกิดอนุมูลอิสระมากเกินไปความสามารถของร่างกายจะกำจัดได้ (Akbarian et al., 2016) และเหนี่ยวนำให้เกิดลิปิดออกซิเดชันในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ส่งผลให้ปริมาณ MDA ซึ่งเป็น ผลิตภัณฑ์ของการเกิดลิปิดออกซิเดชัน (TBARS) เพิ่มขึ้น (Azad et al., 2010) นอกจากนี้อนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4.2 ผลของการเสริม DC-LIC37 ต่อลักษณะซากของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Parameters	Control	NC	PC	DC-LIC37			SEM	P-value	Orthogonal contrasts			
				Level 1	Level 2	Level 3			1	2	3	4
Live weight (g)	3305.0 ^a	3106.7 ^c	3108.4 ^c	3179.1 ^{bc}	3137.5 ^{bc}	3250.1 ^{ab}	15.21	0.0001	0.0001	0.002	0.02	0.02
Cold carcass weight (g)	2464.4 ^a	2353.9 ^b	2348.6 ^b	2400.0 ^{ab}	2388.2 ^{ab}	2409.0 ^{ab}	11.06	0.03	0.004	0.03	NS	NS
Visceral organs (% of live weight)												
Heart	0.48 ^a	0.4 ^c	0.43 ^{ab}	0.43 ^{ab}	0.42 ^c	0.44 ^{ab}	0.006	0.01	0.001	0.003	NS	NS
Spleen	0.10 ^a	0.08 ^b	0.09 ^{ab}	0.10 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.10 ^{ab}	0.003	0.01	0.02	NS	NS	NS
Liver	1.56 ^{ab}	1.47 ^b	1.54 ^{ab}	1.65 ^a	1.58 ^{ab}	1.62 ^a	0.01	0.003	NS	NS	NS	0.0001
Gizzard	1.07	1.08	1.13	1.11	1.13	1.11	0.01	0.54	NS	NS	NS	NS
Bursa of fabricius	0.06	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	0.002	0.22	NS	NS	NS	NS
Abdominal fat	1.27	1.28	1.22	1.33	1.21	1.20	0.02	0.46	NS	NS	NS	NS
Body composition (% of cold carcass weight)												
Thigh	16.90	17.82	17.35	17.25	17.46	17.83	0.11	0.18	NS	NS	NS	NS
Drumstick	13.73	13.90	13.90	13.96	13.98	14.04	0.06	0.78	NS	NS	NS	NS
Wing	9.64 ^a	10.28 ^b	9.92 ^{ab}	9.90 ^{ab}	9.88 ^{ab}	9.81 ^a	0.05	0.01	0.01	NS	NS	0.01
Breast	36.32 ^a	32.86 ^b	34.58 ^{ab}	35.77 ^a	34.69 ^{ab}	35.06 ^a	0.24	0.0001	0.002	0.045	NS	0.0001

^{a-c} Means with different superscript in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$).

Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS + Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg. SEM = standard error of means. NS = non-significant difference.

Orthogonal contrasts: 1 = TNZ vs HS, 2 = Control vs DC-LIC37, 3 = PC vs DC-LIC37, 4 = NC vs DC-LIC37.

ตารางที่ 4.3 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อคุณภาพเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Parameters	Control	NC	PC	DC-LIC37			SEM	P-value	Orthogonal contrasts			
				Level 1	Level 2	Level 3			1	2	3	4
pH 24 h	5.78	5.75	5.77	5.73	5.74	5.73	0.02	0.77	NS	NS	NS	NS
L*	51.14	52.69	51.04	50.08	51.12	51.43	0.31	0.29	NS	NS	NS	0.04
a*	-1.21	-1.57	-1.21	-1.32	-1.09	-1.12	0.07	0.27	NS	NS	NS	0.03
b*	5.15	4.03	5.22	5.10	4.77	4.66	0.18	0.40	NS	NS	NS	NS
TBARS (nmol/ml)	0.5 ^a	0.94 ^b	0.92 ^b	0.55 ^a	0.51 ^a	0.54 ^a	0.05	0.001	0.04	NS	0.001	0.0001
DPPH (%)	80.76 ^a	55.13 ^b	55.98 ^{ab}	68.35 ^{ab}	71.74 ^{ab}	79.16 ^{ab}	2.80	0.01	0.01	NS	0.02	0.02

^{a-b} Means with different superscript in the same row indicate significant difference (P<0.05).

Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS + Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg. SEM = standard error of means. NS = non-significant difference.

Orthogonal contrasts: 1 = TNZ vs HS, 2 = Control vs DC-LIC37, 3 = PC vs DC-LIC37, 4 = NC vs DC-LIC37.

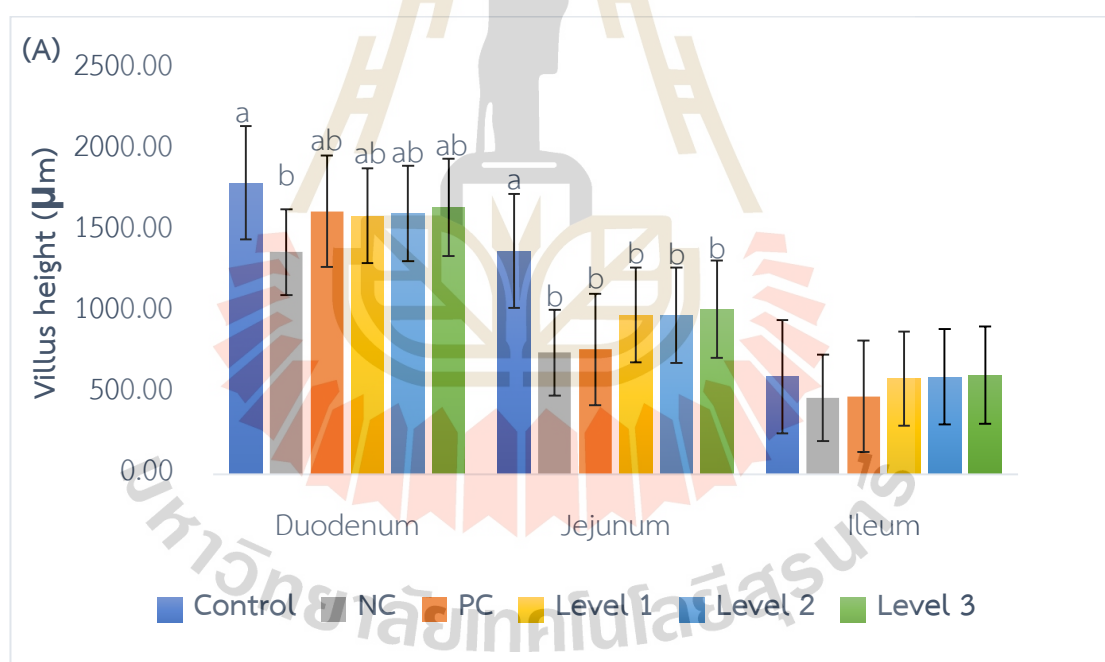
ยังมีผลให้เกิดการออกซิเดชันและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นใยโปรตีนในกล้ามเนื้อ (proteolytic susceptibility) เป็นผลให้เนื้อมีความชื้นและเยิ้มขึ้น (Zaboli et al., 2019) แต่การเสริม DC-LIC37 สามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ลดการเกิดลิปิดออกซิเดชันและโปรตีนออกซิเดชันลดลงเป็นผลให้ค่าความสว่างของเนื้อลดลงและความแดงเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Cramer et al. (2018) ที่ทำการเสริม *B. subtilis* ในไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน สามารถเพิ่มการต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิดลิปิดออกซิเดชันและลดความสว่างของเนื้อได้ นอกจากนี้ Kim et al. (2016) รายงานว่าการเสริมโพรไบโอติกสามารถช่วยลดการเกิดลิปิดออกซิเดชันในเนื้อระหว่างการเก็บรักษาได้เช่นกัน

4.4 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ภาพที่ 4.1) พบว่าการเสริม DC-LIC37 สามารถปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนได้ โดยการเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ CFU/kg diet สามารถเพิ่มความสูงของวิลโลที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น ลดความลึกของเซลล์คริปต์ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนท้ายดีกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P > 0.05$) รวมถึงเพิ่มสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความลึกเซลล์คริปต์ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนกลางได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) นอกจากนี้การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ CFU/kg diet ยังสามารถลดความลึกของเซลล์คริปต์ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนกลางได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก ($P > 0.05$)

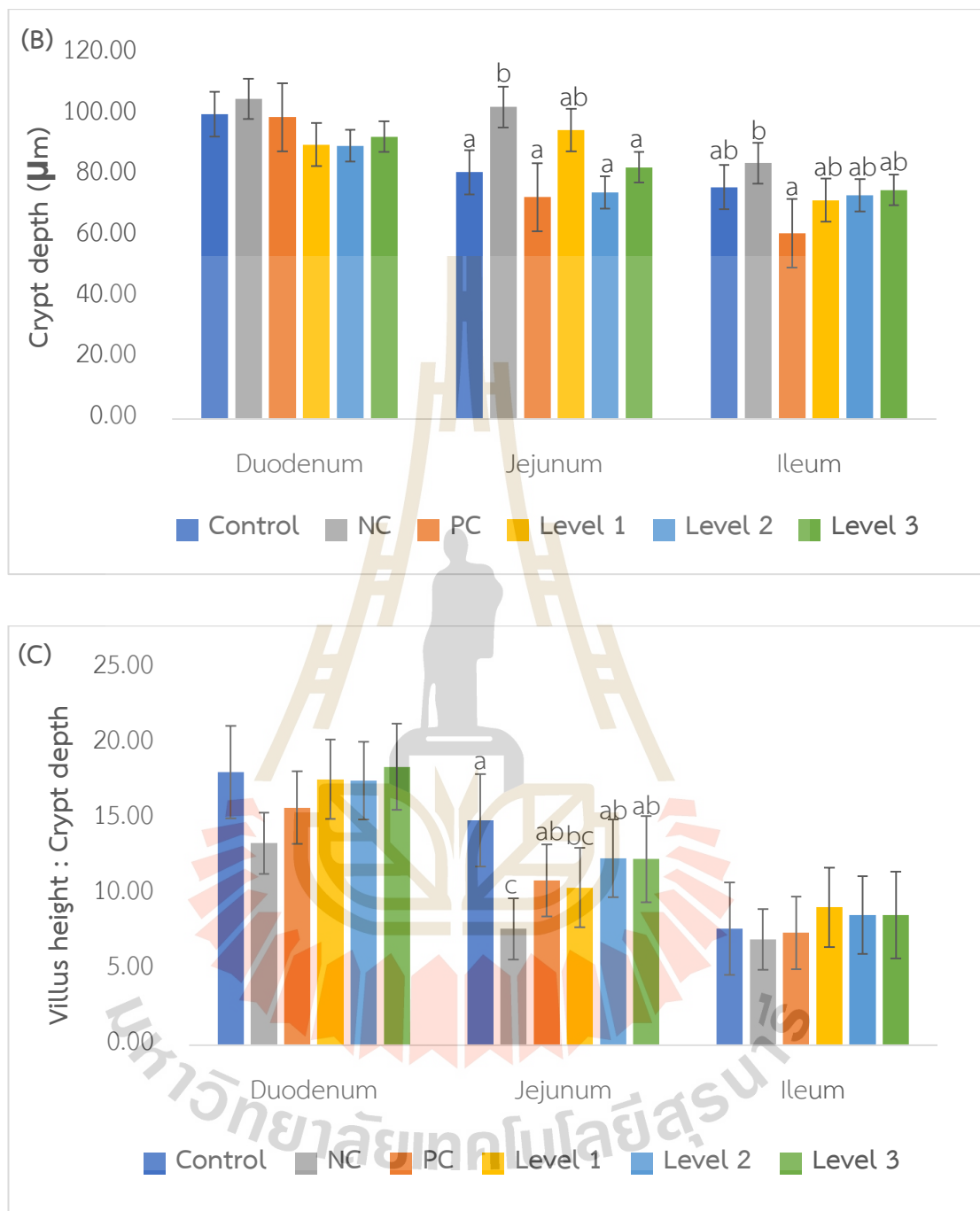
ตามปกติเมื่อไก่เกิดภาวะความเครียดจากความร้อนจะพยายามระบายความร้อนส่วนเกินออกจากร่างกาย โดยเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปยังบริเวณผิวหนัง ลดการไหลเวียนเลือดไปที่บริเวณลำไส้ นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) จากต่อมหมวกไตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีผลให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายและมีผลไปทำลายเยื่อเมือกเซลล์ผนังลำไส้และก่อให้เกิดการอักเสบ (Quinteiro-Filho et al., 2012) ส่งผลให้วิลโลที่ลำไส้เล็กเกิดการอักเสบและมีการพัฒนาที่ลดลง มีผลให้การย่อยและการดูดซึมโภชนาในอาหารด้อยประสิทธิภาพ (Rostagno, 2020) ซึ่งความสูงของวิลโลและความลึกของเซลล์คริปต์เป็นดัชนีที่สามารถบ่งชี้ถึงสุขภาพทางเดินอาหารได้ โดยการที่ความสูงของวิลโลมากขึ้นและความลึกของเซลล์คริปต์ลดลงจะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารดีขึ้น (Xu et al., 2003) และการเพิ่มสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความลึกของเซลล์คริปต์ยังบ่งชี้ว่าเซลล์ลำไส้มีการผลิตตัวที่ดีขึ้น (Kareem et al., 2016) DC-LIC37 เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน ซึ่งความร้อนจะทำลายผนังเซลล์และกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น

Peptidoglycans, Lipoteichoic acids และ Surface-layer protein (Piqué et al., 2019) ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับผนังลำไส้ กระตุ้นให้มีการสร้างเยื่อเมือกและยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์หรือสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Konstantinov et al., 2008; Wu et al., 2015) โดยมีการรายงานว่าการใช้ *L. ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตายในเซลล์แมโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS สามารถลดการหลั่งสารที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ ($\text{TNF}\alpha$ และ IL-6) และกระตุ้นการหลั่งสารที่ลดการอักเสบ (IL-10) ได้ (Tsukagoshi et al., 2020) และอาจเป็นผลให้สัญญาณวิทยาของลำไส้ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระในภาวะความเครียดจากความร้อนที่ลดลง (Xu et al., 2003) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Danladi et al. (2022) ที่รายงานว่าการเสริม *L. plantarum* RI11 และ RG14 รูปแบบเซลล์ตายสามารถเพิ่มความสูงของวิลไล ลดความลึกของเซลล์คริปต์และเพิ่มสัดส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกเซลล์คริปต์ได้ และการทดลองของ Humam et al. (2019) ที่รายงานว่าการเสริม *L. plantarum* RI11 ในสภาวะความร้อนสามารถเพิ่มความสูงของวิลไล ลดความลึกของเซลล์คริปต์และเพิ่มสัดส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกเซลล์คริปต์ในลำไส้ได้เช่นกัน



ภาพที่ 4.1 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะทางสัญญาณวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน

^{a-c} Means with different superscript in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$). Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS + Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg.



ภาพที่ 4.1 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน

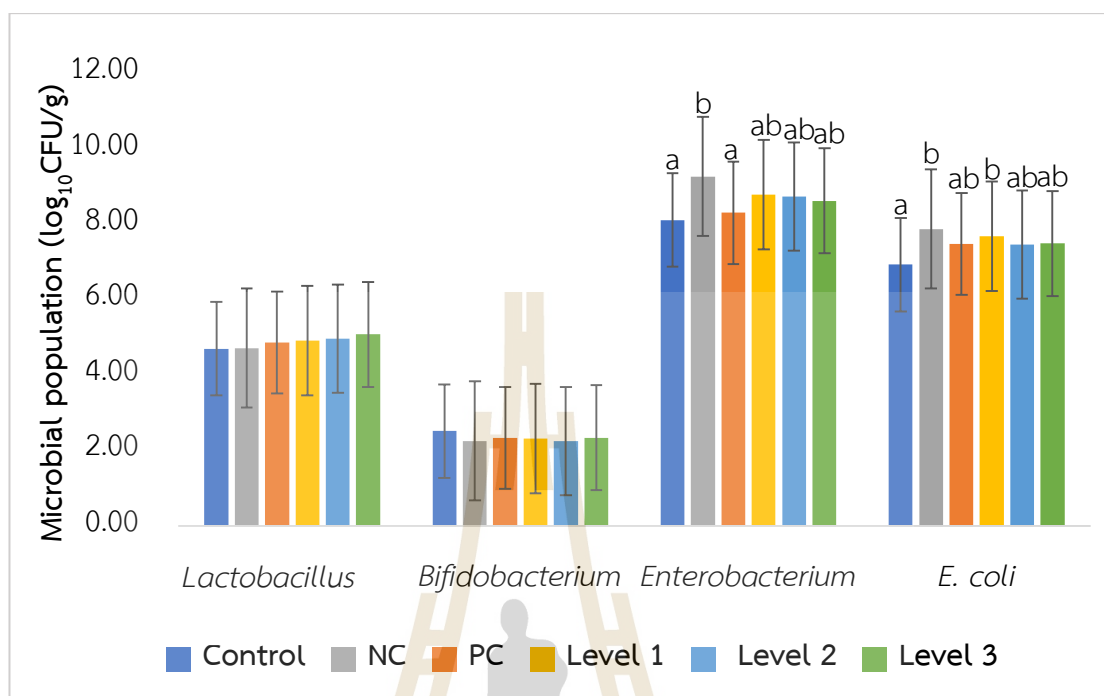
^{a-c} Means with different superscript in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$). Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS +

Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg.

4.5 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในซีกัมของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ภาพที่ 4.2) พบว่าสภาวะอากาศร้อนมีผลทำให้จุลินทรีย์ก่อโรค *Enterobacterium* และ *E. coli* เพิ่มขึ้น โดยการเสริม DC-LIC37 ในสภาวะอากาศร้อนสามารถลดจำนวนประชากรกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ได้ การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 - 1×10^9 CFU/kg diet สามารถลดจุลินทรีย์ก่อโรคได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวกที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะ ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม DC-LIC37 ไม่มีผลในการปรับเปลี่ยนจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ($P > 0.05$)

ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการดูดซึมและกระบวนการเมแทบอลิซึมของโภชนะ ระบบภูมิคุ้มกัน และสุขภาพของทางเดินอาหาร (Chen et al., 2022) การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสภาวะอากาศร้อนอาจเนื่องมาจากเมื่อไก่อยู่ในภาวะความเครียดจากความร้อนสมองส่วนไฮโปทาลามัสจะพยายามรักษาอุณหภูมิร่างกาย โดยลดการกินอาหารเพื่อลดความร้อนจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของโภชนะและเพิ่มการกินน้ำมากขึ้น ทำให้อาหารเกิดการไหลผ่านในทางเดินอาหารเร็วขึ้นและสิ่งย่อยมีความหนืดมากขึ้น ส่งผลให้สภาพแวดล้อมในลำไส้เกิดการเปลี่ยนแปลงและหลงเหลือสารอาหารในสิ่งย่อยที่จะถูกหมักย่อยและใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มมากขึ้น (Lara and Rostagno, 2013; Kers et al., 2018) ซึ่งมีผลรบกวนสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุม Gut-brain axis (Metzler-Zebeli et al., 2019; Cao et al., 2021) การเสริม DC-LIC37 สามารถเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ก่อโรคได้นั้น อาจเป็นผลมาจาก DC-LIC37 มีการปลดปล่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์และสารต่าง ๆ เช่น Surface-layer protein และ EPS (Piqué et al., 2019; Nguyen et al., 2020) โดย EPS สามารถแย่งจับกับผนังลำไส้และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค รวมถึงจับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคแบบหลวม ๆ และขับออก (Fanning et al., 2012) กลไกดังกล่าวอาจเป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม *Enterobacterium* และ *E. coli* ในซีกัมไก่ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนและเสริมด้วย DC-LIC37 มีจำนวนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Liu et al. (2017) ที่พบว่า ESP สามารถลดการจับกับและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ได้



ภาพที่ 4.2 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในซี่งไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

^{a-b} Means with different superscript in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$). Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS + Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg.

4.6 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้ในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของลำไส้ในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนมีการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ($\text{TNF-}\alpha$) ในลำไส้เล็กส่วนกลางมากกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงได้สภาวะปกติที่อยู่อย่างสบาย ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบชนิด IL-6 และไซโตไคน์ที่ยับยั้งการอักเสบ (IL-10) ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการเสริม DC-LIC37 ในอาหารไก่กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากความร้อนมีผลให้การแสดงออกของยีน $\text{TNF-}\alpha$ และ IL-6 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปราศจากสาร

เสริม ($P < 0.05$) นอกจากนี้การเสริม DC-LIC37 มีผลให้การแสดงออกของยีน IL-6 TNF- α และ IL-10 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวกที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะ การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ CFU/kg diet สามารถลดการแสดงออกของยีน IL-6 และ TNF- α ในลำไส้เล็กส่วนกลางเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมบวกยังมีการแสดงออกของยีน IL-6 ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่เสริมจุลินทรีย์โอฟิโอบา DC-LIC37 ($P < 0.05$)

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนส่งสัญญาณขนาดเล็กที่เซลล์ภูมิคุ้มกัน (immune cells: T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, natural killer cells) สร้างขึ้นมาเพื่อใช้ติดต่อสื่อสาร พัฒนาและตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Saleh and Al-zghoul, 2019) โดย TNF- α เป็นไซโตไคน์ชนิด Th1 ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่ต้องอาศัยเซลล์ (cellular immunity) ขณะที่ IL-6 และ IL-10 เป็นไซโตไคน์ชนิด Th2 ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่ไม่ต้องอาศัยเซลล์แต่อาศัยสารน้ำหรือแอนติบอดี (humoral immunity) (Kidd, 2016) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกหลั่งออกมาเมื่อสัตว์เกิดการอักเสบและติดเชื้อ (Hakansson and Molin, 2011) การแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (TNF- α , IL-6) ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับความเครียดจากความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากภาวะความเครียดจากความร้อน ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระที่มีผลไปทำลายผนังลำไส้และโปรตีนไทด์จังก์ชัน ทำให้เกิดการอักเสบ ลดความแข็งแรงของผนังลำไส้ เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลและทำให้สารพิษต่างๆ เข้าไปในกระแสเลือด (Abdel-Moneim et al., 2021) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าสภาวะอากาศร้อนมีผลให้จำนวนประชากรจุลินทรีย์ก่อโรค (*Enterobacterium*, *E. coli*) เพิ่มขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะมี LPS ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้เช่นกัน (Tucureanu et al., 2018) ส่งผลให้ไก่เนื้อมีการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Humam et al. (2021) ที่รายงานว่าภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน TNF- α ในลำไส้เล็กส่วนท้ายของไก่เนื้อ และ Wang et al. (2018) ที่พบว่าภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลให้ปริมาณ TNF- α และ IL-6 ในเลือดของไก่เนื้อเพิ่มขึ้นเช่นกัน การเสริม DC-LIC37 สามารถลดการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-6 ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ อาจเป็นผลมาจากจุลินทรีย์ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน ยังคงคุณสมบัติในการยึดเกาะผนังลำไส้ (Chen et al., 2013) ประกอบกับความร้อนจะทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์และมีการกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ออกมา เช่น Peptidoglycans, Lipoteichoic acids และ Surface-layer protein (Piqué et al., 2019) ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับผนังลำไส้ กระตุ้นให้มีการสร้างเยื่อเมือก ยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ผนังลำไส้ (Konstantinov et al., 2008; Wu et al., 2015) และ EPS ยังสามารถแย่งจับกับผนังลำไส้และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค รวมถึงจับกับผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคแบบหลวมๆ และ

ข้อบกพร่องทางมูลเป็นผลให้มีการสร้างสารพิษลดลง (Fanning et al., 2012) ซึ่งส่งผลให้มีการอักเสบของลำไส้เล็กส่วนกลางลดลงและมีผลการแสดงของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tsukagoshi et al. (2020) ที่รายงานว่าการใช้ *L. ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตายในเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS สามารถลดการแสดงออกของยีนและปริมาณไซโตไคน์ TNF- α และ IL-6 รวมถึงกระตุ้นการแสดงออกของยีนและเพิ่มปริมาณไซโตไคน์ที่ลดการอักเสบ (IL-10) ได้ และการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร ยังสามารถลดปริมาณไซโตไคน์ TNF- α และ IL-6 และเพิ่มปริมาณ IL-10 ในเลือดของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน (Wang et al., 2018; Li et al., 2020)

4.7 ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีนโปรตีนฮีตช็อกและ Transcription factor ที่ควบคุมการอักเสบในตับของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน

ผลของการเสริมจุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีนโปรตีนฮีตช็อกและ Transcription factor ที่ควบคุมการอักเสบในตับของไก่เนื้อที่ได้รับ ความเครียดจากความร้อน (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrasts พบว่าไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลให้การแสดงออกของยีน NF- κ B ในตับ ซึ่งเป็น Transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมการอักเสบมีการแสดงออกมากกว่าการเลี้ยงในสภาวะปกติที่อยู่อย่างสบาย ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามการเสริม DC-LIC37 ในอาหารไก่กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากความร้อน สามารถลดการแสดงออกของยีน NF- κ B ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวกที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มควบคุมลบที่ปราศจากสารเสริม ($P < 0.05$) กลุ่มที่เสริม DC-LIC37 มีการแสดงออกของยีนโปรตีนฮีตช็อก 70 (HSP70) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) แต่การแสดงออก HSP70 และ HSP90 ในกลุ่มที่เสริม DC-LIC37 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะปกติ ($P > 0.05$) การเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 – 1×10^9 CFU/kg diet สามารถลดการแสดงออกของยีน HSP70 ได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก และการเสริม DC-LIC37 ที่ระดับ 1×10^7 CFU/kg diet ยังมีผลลดการแสดงออกของยีน NF- κ B ได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวกเช่นกัน

เมื่อไก่เผชิญกับสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นเนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความหนาแน่นในการเลี้ยง การอดอาหาร สภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม ตลอดจนการจับและการขนส่งเข้าโรงเชือด จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายที่มีผลไปทำลายโครงสร้างของโปรตีนและเกิดการม้วนพับที่ผิดปกติ จนสูญเสียหน้าที่การทำงานหรือทำงานได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ (Soleimani et al., 2012) สัตว์จะมีกลไกการปรับตัวอยู่รอดโดยเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีนฮีตช็อก ซึ่งเป็นโปรตีนตัวช่วย

(molecular chaperone) ในการคลายเกลียวโปรตีนที่เกิดการม้วนพับผิดปกติและเสียสภาพจนไม่สามารถทำงานได้ให้กลับมาทำงานได้อีกครั้ง (Zininga et al., 2018) โปรตีนชนิดนี้จะมีการแสดงออกมากเมื่อไก่ออยู่ในภาวะความเครียดจากความร้อน และ HSP70 ยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อได้ (Zulkifili et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน HSP70 ที่มากขึ้นยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีการหลั่งไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ โดยจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ (scavenger receptor) ของ Natural killer cells ทำให้เกิดการส่งสัญญาณกระตุ้น Transcription factor NF- κ B ให้เคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสและกระตุ้นการถอดรหัสของยีน (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Zininga et al., 2018) จึงเป็นผลให้ยีน NF- κ B ในตับของไก่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Liu et al. (2022) ที่รายงานว่าภาวะความเครียดจากความร้อนมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน NF- κ B และไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (TNF- α , IL-6) ในตับของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน การเสริม DC-LIC37 สามารถลดการแสดงออกของยีน HSP70 และ NF- κ B ในตับของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ ปริมาณการแสดงออกของยีน HSP70 ที่ลดลง สามารถบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ DC-LIC37 มีคุณสมบัติในการบรรเทาหรือลดผลกระทบที่เกิดจากความเครียดจากความร้อนได้ เนื่องจากการแสดงออกของยีน HSP70 ที่ลดลงจะช่วยยับยั้งการกระตุ้น การสังเคราะห์โปรตีนที่ก่อให้เกิดการอักเสบ รวมถึงการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Malago et al., 2002) สำหรับกลไกในส่วนนี้ยังไม่ทราบอย่างเป็นที่แน่ชัด แต่คาดว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติก DC-LIC37 น่าจะมีคุณสมบัติในการเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในภาวะความเครียดจากความร้อนและลดการอักเสบของเซลล์ผนังลำไส้ที่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระได้ (Jang et al., 2015; Humam et al., 2021) จึงอาจเป็นผลให้มีการแสดงออกของยีน HSP70 ที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Wang et al. (2018) ที่รายงานว่า การเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* สามารถลดการแสดงออกของยีนและปริมาณโปรตีน HSP70 ในตับของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้ และการทดลองของ Humam et al. (2021) ที่พบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. plantarum* RI11 สามารถลดการแสดงออกของยีน HSP70 ในตับและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ GPx CAT ในเลือดของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.4 ผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์และโปรตีนฮีตช็อกในไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

Parameter	Control	NC	PC	DC-LIC37			SEM	P-value	Orthogonal contrasts			
				Level 1	Level 2	Level 3			1	2	3	4
Jejunal mucosa tissue												
TNF- α	1 ^a	3.18 ^b	1.69 ^{ab}	1.53 ^{ab}	1.58 ^{ab}	1.56 ^{ab}	0.14	0.03	0.049	NS	NS	0.003
IL-6	1 ^{ab}	2.24 ^b	0.19 ^a	1.04 ^{ab}	0.91 ^{ab}	0.87 ^{ab}	0.18	0.02	NS	NS	NS	0.004
IL-10	1	0.45	0.47	1.67	1.47	1.20	0.11	0.29	NS	NS	0.05	NS
Liver tissue												
HSP70	1 ^a	4.12 ^b	1.49 ^a	0.38 ^a	0.92 ^a	0.91 ^a	0.30	0.001	NS	NS	0.02	0.0001
HSP90	1	1.26	1.05	0.87	0.87	0.89	0.05	0.083	NS	NS	NS	NS
NF-kB	1 ^a	24.42 ^d	2.31 ^{ab}	3.7 ^{abc}	9.61 ^c	8.72 ^{bc}	1.83	0.001	0.0001	0.004	0.01	0.0001

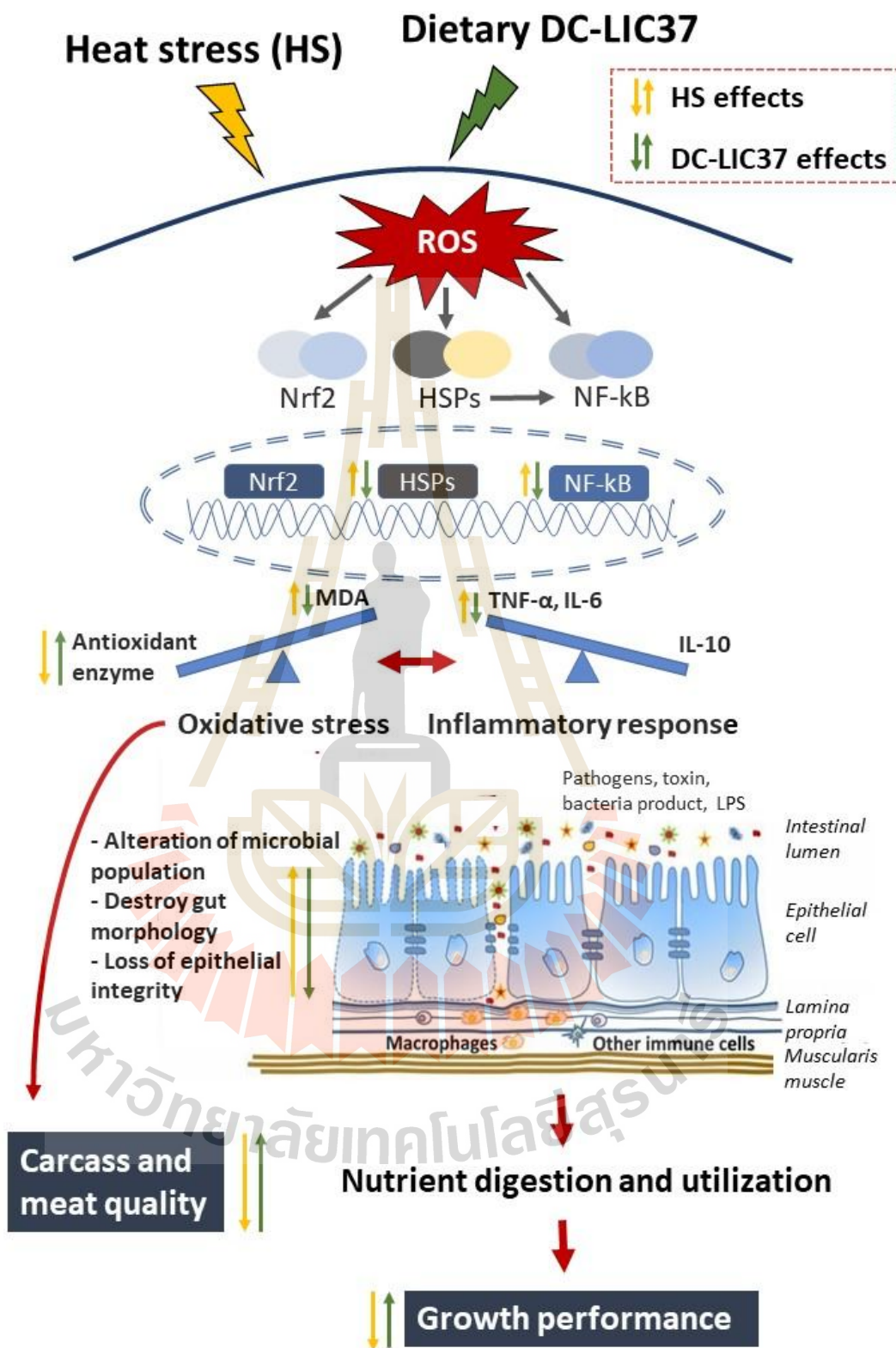
^{a-b} Means with different superscript in the same row indicate significant difference (P<0.05).

Control = Thermoneutral condition (TNZ), NC = Heat stress (HS), PC = HS + Zinc bacitracin 0.05 g/kg, Level 1 = HS + DC-LIC37 1×10^7 CFU/kg, Level 2 = HS + DC-LIC37 1×10^8 CFU/kg, Level 3 = HS + DC-LIC37 1×10^9 CFU/kg. SEM = standard error of means. NS = non-significant difference. Orthogonal contrasts: 1 = TNZ vs HS, 2 = Control vs DC-LIC37, 3 = PC vs DC-LIC37, 4 = NC vs DC-LIC37.

4.8 สรุปภาพรวมผลกระทบความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อและผลของการเสริม จุลินทรีย์ DC-LIC37 ในอาหาร

จากการศึกษาพบว่าภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อนมีผลกระทบต่อการแสดงออกของ ยีนโปรตีนฮีตช็อก (HSPs) ยีนที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (NF- κ B) เป็น ผลให้ไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ TNF- α และ IL-6 มีการแสดงออกมากขึ้น สภาวะอากาศ ร้อนยังมีผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงและเกิดลิพิดออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น เป็นผล ให้คุณภาพซากและคุณภาพเนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังมีผลรบกวนสมดุลของจุลินทรีย์ รวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ถูกทำลายและส่งผลให้สมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ ลดลง แต่อย่างไรก็ตามการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก DC-LIC37 ในภาวะที่ได้รับผลกระทบจากความ ร้อนกลับมีผลในการลดกระทบดังกล่าวได้ โดยลดการแสดงออกของยีน HSPs NF- κ B TNF- α IL-6 ลดการเกิดความเครียดออกซิเดชัน ปรับปรุงคุณภาพซาก คุณภาพเนื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของลำไส้ เปลี่ยนแปลงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อได้ ภาพรวมดังแสดงไว้ในภาพที่ 4.3





ภาพที่ 4.3 ภาพรวมผลกระทบการเกิดความเครียดจากความร้อนและผลของการเสริม DC-LIC37 ในอาหารไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อน

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โอสไปโอติก *L. ingluviei* C37 รูปแบบเซลล์ตาย (DC-LIC37) ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและโปรตีนฮีตช็อกของไก่เนื้อที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ ดังนี้

5.1.1 การเสริมจุลินทรีย์โอสไปโอติก DC-LIC37 ในอาหาร สามารถปรับปรุงน้ำหนักตัว ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อของยุโรป (EBI) น้ำหนักซากเย็น และเนื้อส่วนนอก ลดน้ำหนักปีก เพิ่มน้ำหนักหัวใจและตับ นอกจากนี้ยังสามารถลดการเกิดลิปิดออกซิเดชัน (TBARS) และเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ในเนื้อของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้

5.1.2 การเสริมจุลินทรีย์โอสไปโอติก DC-LIC37 ในอาหาร สามารถปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็ก (เพิ่มความสูงของวิลไล ลดความลึกของเซลล์คริปต์ และเพิ่มสัดส่วน ความสูงของวิลไลต่อความลึกของเซลล์คริปต์) และลดจำนวนประชากรจุลินทรีย์ก่อโรค (*Enterobacterium*, *E. coli*) ในซีกัมของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้

5.1.3 การเสริมจุลินทรีย์โอสไปโอติก DC-LIC37 ในอาหาร สามารถลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (TNF- α , IL-6) ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (NF-kB) รวมถึงลดการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีน 70 (HSP70) ในตับของไก่เนื้อที่ได้รับความเครียดจากความร้อนได้

5.1.4 ระดับการเสริมจุลินทรีย์โอสไปโอติก DC-LIC37 ในอาหารที่เหมาะสม คือ 1×10^7 CFU/kg อาหารสัตว์ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์โอสไปโอติก DC-LIC37 สามารถบรรเทาหรือลดผลกระทบที่เกิดอันเนื่องมาจากความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อ นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการใช้เป็นสารเสริมอาหารสัตว์ชนิดใหม่ เพื่อลดความเครียดจากความร้อนในอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ภูมิภาคเขตร้อนได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจาก *L. ingluviei* C37 เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ไม่ได้ถูกระบุในพระราช

บัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ของประเทศไทย ส่งผลให้การนำไปใช้เป็นสารเสริม โพรไบโอติกอย่างถูกต้องตามกฎหมายค่อนข้างยาก แต่อย่างไรก็ตามการใช้ในรูปแบบโพรไบโอติกเซลล์ ตาย สามารถลดข้อจำกัดดังกล่าวได้ อีกทั้งยังง่ายต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลกระทบในเรื่องความคงตัวระหว่างกระบวนการผลิต การขนส่ง และการจัดเก็บรักษา อาหารสัตว์

5.2.2 เนื่องจากการทดลองนี้พบว่าการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก DC-LIC37 มีผลต่อการ แสดงออกของยีนไซโตไคน์ และตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ก่อให้เกิดการอักเสบ รวมถึงโปรตีน ฮีทช็อก ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลว่ายีนเหล่านี้สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ ควรมีการวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการแปลรหัสของยีนนั้น ๆ เพิ่มเติม นอกจากนี้ยังพบว่าการ เสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก มีผลเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและลดการเกิดลิพิดออกซิเดชัน ในเนื้อได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกอย่างชัดเจน ดังนั้นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับตัวควบคุมการ ถอดรหัส Nrf2 และเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบถึงกลไกที่เกี่ยวข้อง



รายการอ้างอิง

- ศิษณ์ท์ พงศ์พิทักษ์. (2558). โรงเรือนระบบ *evap*. กับการเลี้ยงสัตว์เขตร้อนชื้น. สืบค้นจาก <https://www.evap-cooling.com/16807297>.
- Abdel-Moneim, A. M. E., Shehata, A. M., Khidr, R. E., Paswan, V. K., Ibrahim, N. S., El-Ghoul, A. A., Aldhumri, S. A., Gabr, S. A., Mesalam, N. M., Elbaz, A. M., Elsayed, M. A., Wakwak, M. M., & Ebeid, T. A. (2021). Nutritional manipulation to combat heat stress in poultry – a comprehensive review. **Journal of Thermal Biology**, 98, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102915>.
- Abdelqader, A., Abuajamieh, M., Hayajneh, F., & Al-Fataftah, A. R. (2020). Probiotic bacteria maintain normal growth mechanisms of heat stressed broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**, 92, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.10264>.
- Abo-Al-Ela, H. G., El-Kassas, S., El-Naggar, K., Abdo, S. E., Jahejo, A. R., & Al Wakeel, R. A. (2021). Stress and immunity in poultry: light management and nanotechnology as effective immune enhancers to fight stress. **Cell Stress and Chaperones**, 26(3), 457–472. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01204-6>.
- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutrition Research Reviews**, 23(1), 37–46. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000090>.
- Ahmed, E., Abdelrahman, M., & Gahreeb, K. (2019). Effect of probiotic on growth performance, carcass traits, and clinical health parameters of broilers reared under heat stress in upper Egypt. **SVU-International Journal of Veterinary Sciences**, 2(2), 27–44. <https://doi.org/10.21608/svu.2019.11221.1012>.
- Ajakaiye, J., Perez, A., & Mollineda, A. (2011). Effects of high temperature on production in layer chickens supplemented with vitamins C and E. **Revista MVZ Cordoba**, 16(1), 2283–2291.

- Akbarian, A., Michiels, J., Degroote, J., Majdeddin, M., Golian, A., & De Smet, S. (2016). Association between heat stress and oxidative stress in poultry: mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 7(37), 2–14. <https://doi.org/10.1186/s4010416-0097-5>.
- Al-Fataftah, A. R., & Abdelqader, A. (2014). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. **Animal Feed Science and Technology**, 198, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.10.012>.
- Attia, Y. A., Al-Harhi, M. A., El-Shafey, A. S., Rehab, Y. A., & Kim, W. K. (2017). Enhancing tolerance of broiler chickens to heat stress by supplementation with Vitamin E, Vitamin C and/or probiotics. **Annals of Animal Science**, 17(4), 1155–1169. <https://doi.org/10.1515/aoas-2017-0012>.
- Awad, E. A., Najaa, M., Zulaikha, Z. A., Zulkifli, I., & Soleimani, A. F. (2020). Effects of heat stress on growth performance , selected physiological and immunological parameters , caecal microflora , and meat quality in two broiler strains. **Asian–Australasian Journal of Animal Science**, 33(5), 778–787.
- Azad, M. A. K., Kikusato, M., Sudo, S., Amo, T., & Toyomizu, M. (2010). Time course of ROS production in skeletal muscle mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 157(3), 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.07.011>.
- Cao, C., Chowdhury, V. S., Cline, M. A., & Gilbert, E. R. (2021). The microbiota-gut-brain axis during heat stress in chickens: a review. **Frontiers in Physiology**, 12, 1– 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.752265>.
- Chaucheyras-Durand, F., & Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial Microbes**, 1(1), 3–9. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>.
- Chen, C., Tsen, H., Lin, C., Lin, C., Chuang, L., Chen, C., & Chiang, Y. (2013). Enhancement of the immune response against *Salmonella* infection of mice by heat-killed multispecies combinations of lactic acid bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, 62, 1657–1664. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.061010-0>.
- Chen, S., Luo, S., & Yan, C. (2022). Gut microbiota implications for health and welfare in farm animals: a review. **Animals**, 12(93), 1–14.
- Commission of the european communities. (2005). Commission regulation (EC) No

- 378/2005. **Official Journal of the European Union**. L 59/8, 8–15.
- Cramer, T. A., Kim, H. W., Chao, Y., Wang, W., Cheng, H. W., & Kim, Y. H. B. (2018). Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on meat quality characteristics of breast muscle from broilers exposed to chronic heat stress. **Poultry Science**, 97, 3358–3368. <https://doi.org/10.3382/ps/pey176>.
- Danladi, Y., Loh, T. C., Foo, H. L., Akit, H., Tamrin, N. A., & Azizi, M. N. (2022). Effects of postbiotics and paraprobiotics as replacements for antibiotics on growth performance, carcass characteristics, small intestine histomorphology, immune status and hepatic growth gene expression in broiler chickens. **Animals**, 12(197), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ani12070917>.
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M. O. C., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., & Van Sinderen, D. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109(6), 2108–2113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115621109>.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, 141, S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>.
- Hakansson, A., & Molin, G. (2011). Gut microbiota and inflammation. **Nutrients**, 3, 637–682. <https://doi.org/10.3390/nu3060637>.
- Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., Mustapha, N. M., Zulkifli, I., & Izuddin, W. I. (2019). Effects of feeding different postbiotics produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, carcass yield, intestinal morphology, gut microbiota composition, immune status, and growth gene expression in broilers under heat stress. **Animals**, 9(644), 1–20.
- Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Izuddin, W. I., Awad, E. A., Idrus, Z., Samsudin, A. A., & Mustapha, N. M. (2020). Dietary supplementation of postbiotics mitigates adverse impacts of heat stress on antioxidant enzyme activity, total antioxidant, lipid peroxidation, physiological stress indicators, lipid profile and meat quality in broilers. **Animals**, 10(982), 1–21.
- Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Izuddin, W. I., Zulkifli, I., Samsudin, A. A., &

- Mustapha, N. M. (2021). Supplementation of postbiotic RI11 improves antioxidant enzyme activity, upregulated gut barrier genes, and reduced cytokine, acute phase protein, and heat shock protein 70 gene expression levels in heat-stressed broilers. **Poultry Science**, 100(3), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.011>.
- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP). 2021. *Behind the publication: understanding ISAPP's a new scientific consensus definition of postbiotic*. Retrieved from <https://isappsience.org/behind-the-publication-understanding-isapps-new-scientific-consensus-definition-of-postbiotics>.
- Jahromi, M. F., Altaher, Y. W., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., Tufarelli, V., & Liang, J. B. (2016). Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. **International Journal of Biometeorology**, 60(7), 1099–1110. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1103-x>.
- Jang, I., Ko, Y., Moon, Y., & Sohn, S. (2015). Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, heat shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 27(5), 749–756. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13852>.
- Kalmar, I. D., Vanrompay, D., & Janssens, G. P. J. (2013). Broiler ascites syndrome: collateral damage from efficient feed to meat conversion. **Veterinary Journal**, 197(2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.011>.
- Kareem, K. Y., Loh, T. C., Foo, H. L., Akit, H., & Samsudin, A. A. (2016). Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers. **BMC Veterinary Research**, 12(163), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0790-9>.
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., & Smidt, H. (2018). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. **Frontiers in Microbiology**, 9, 1–14.
- Kidd, P. (2016). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review**, 8(3), 233–246.
- Kim, H. W., Yan, F. F., Hu, J. Y., Cheng, H. W., & Kim, Y. H. B. (2015). Effects of probiotics feeding on meat quality of chicken breast during postmortem storage. **Poultry Science**, 95, 1457–1464. <https://doi.org/10.3382/ps/pew055>.

- Konstantinov, S. R., Smidt, H., De Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., Singh, S. K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T. R., & Van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105(49), 19474–19479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810305105>.
- Kpomasse, C. C., Oke, O. E., Houndonougbo, F. M., & Tona, K. (2021). Broiler production challenges in the tropics: a review. **Veterinary Medicine and Science**, 7(3), 831–842. <https://doi.org/10.1002/vms3.435>.
- Lara, L. J., & Rostagno, M. H. (2013). Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, 3(2), 356–369. <https://doi.org/10.3390/ani3020356>.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B., & Poli, G. (2010). Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacology and Therapeutics**, 128(2), 336–374. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.08.003>.
- Li, Q., Ouyang, J., Zhou, H., You, J., & Li, G. (2022). Effect of probiotic supplementation on the expression of tight junction proteins, innate immunity-associated genes, and microbiota composition of broilers subjected to cyclic heat stress. **Animal Science Journal**, 93, 1–16. <https://doi.org/10.1111/asj.13719>.
- Li, Q., Wan, G., Peng, C., Xu, L., Yu, Y., Li, L., & Li, G. (2020). Effect of probiotic supplementation on growth performance, intestinal morphology, barrier integrity, and inflammatory response in broilers subjected to cyclic heat stress. **Animal Science Journal**, 91, 1–9. <https://doi.org/10.1111/asj.13433>.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules**, 19, 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>.
- Lin, H., Zhang, H. F., Du, R., Gu, X. H., Zhang, Z. Y., Buyse, J., & Decuypere, E. (2005). Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures II four weeks of age. **Poultry Science**, 84, 1173–1178. <https://doi.org/10.1093/ps/84.8.1173>.
- Liu, Y. L., Ding, K. N., Shen, X. L., Liu, H. X., Zhang, Y. A., Liu, Y. Q., & He, Y. M. (2022). Chronic heat stress promotes liver inflammation in broilers via enhancing NF- κ B

- and NLRP3 signaling pathway. **BMC Veterinary Research**, 18(289), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03388-0>.
- Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., & Tao, X. (2017). Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. **Journal of Dairy Science**, 100(9), 6895–6905. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11944>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Malago, J. J., Koninkx, J. F. J. G., & Dijk, J. E. V. (2002). The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium. **Cell Stress and Chaperones**, 7(2), 191–199.
- Mandal, A., Paul, T., Roy, S., Mandal, S., Pradhan, S., Mondal, K. C., & Nandi, D. K. (2013). Effect of newly isolated *Lactobacillus ingluviei* ADK10, from chicken intestinal tract on acetaminophen induced oxidative stress in Wistar rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, 51(2), 174–180.
- Metzler-Zebeli, B. U., Siegerstetter, S. C., Magowan, E., Lawlor, P. G., Petri, R. M., O'Connell, N. E., & Zebeli, Q. (2019). Feed restriction modifies intestinal microbiota-host mucosal networking in chickens divergent in residual feed intake. **MSystems**, 4(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00261-18>.
- Mohammed, A. A., Jacobs, J. A., Murugesan, G. R., & Cheng, H. W. (2018). Animal well-being and behavior: effect of dietary synbiotic supplement on behavioral patterns and growth performance of broiler chickens reared under heat stress. **Poultry Science**, 97(4), 1101–1108. <https://doi.org/10.3382/ps/pex421>.
- Mujahid, A., Akiba, Y., & Toyomizu, M. (2007). Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. **Poultry Science**, 86(2), 364–371. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.364>.
- Navidshad, B., Liang, J. B., & Jahromi, M. F. (2012). Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR. **International Journal of Molecular Sciences**, 13(2), 2119–2132. <https://doi.org/10.3390/ijms13022119>.

- Nawab, A., Ibtisham, F., Li, G., Kieser, B., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Nawab, Y., Li, K., Xiao, M., & An, L. (2018). Heat stress in poultry production: mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. **Journal of Thermal Biology**, 78, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010>.
- Nawaz, A. H., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Zhang, W. L., & Zhang, L. (2021). Poultry response to heat stress: its physiological, metabolic, and genetic implications on meat production and quality including strategies to improve broiler production in a warming world. **Frontiers in Veterinary Science**, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081>.
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. **AIMS Microbiology**, 6(4), 451–469. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2020027>.
- Odore, R., De Marco, M., Gasco, L., Rotolo, L., Meucci, V., Palatucci, A. T., Rubino, V., Ruggiero, G., Canello, S., Guidetti, G., Centenaro, S., Quarantelli, A., Terrazzano, G., & Schiavone, A. (2015). Cytotoxic effects of oxytetracycline residues in the bones of broiler chickens following therapeutic oral administration of a water formulation. **Poultry Science**, 94(8), 1979–1985. <https://doi.org/10.3382/ps/pev141>.
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 1, 1–14.
- Pamplona, R., & Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology-Regulatory and Comparative Physiology**, 301, R843–R863.
- Pawar, S. S., Basavaraj, S., Dhansing, L. V., Pandurang, K. N., Saherao, K. A., Vitthal, N. A., Pandit, B. M., & Kumar, B. S. (2016). Assessing and mitigating the impact of heat stress in poultry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, 4(6), 332–341. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.6.332.341>.
- Piqué, N., Berlanga, M., & Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(10), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms20102534>.
- Quinteiro-Filho, W. M., Gomes, A. V. S., Pinheiro, M. L., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V.,

- Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. P., & Palermo-Neto, J. (2012). Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, 41(5), 421–427. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.709315>.
- Quinteiro-Filho, W. M., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M. L., Sakai, M., Sá, L. R. M., Ferreira, A. J. P., & Palermo-Neto, J. (2010). Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, 89, 1905–1914. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00812>.
- Rahimi, S., & Khaksefidi, A. (2006). A comparison between the effects of a probiotic (Bioplus 2B) and an antibiotic (virginiamycin) on the performance of broiler chickens under heat stress condition. **Iranian Journal of Veterinary Research**, 7(3), 23–28.
- Ranjan, A., Sinha, R., Devi, I., Rahim, A., & Tiwari, S. (2019). Effect of heat stress on poultry production and their managerial approaches. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 8(2), 1548–1555.
- Roser, M. (2019). *Future population growth*. Retrieved from <https://ourworldindata.org/future-population-growth>.
- Rostagno, M. H. (2020). Effects of heat stress on the gut health of poultry. **Journal of Animal Science**, 98(4), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa090>.
- Roy, B. C., Chowdhury, S. Das, & Kabir, S. M. L. (2015). Effects of feeding *Bacillus subtilis* to heat stressed broiler chickens with or without an antibiotic growth promoter. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, 1(1), 80–88.
- Saleh, K. M., & Al-zghoul, M. B. (2019). Effect of acute heat stress on the mRNA levels of cytokines in broiler chickens subjected to embryonic thermal manipulation. **Animals**, 9(449), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani9080499>.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quiley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews**, 18, 669–647. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>.

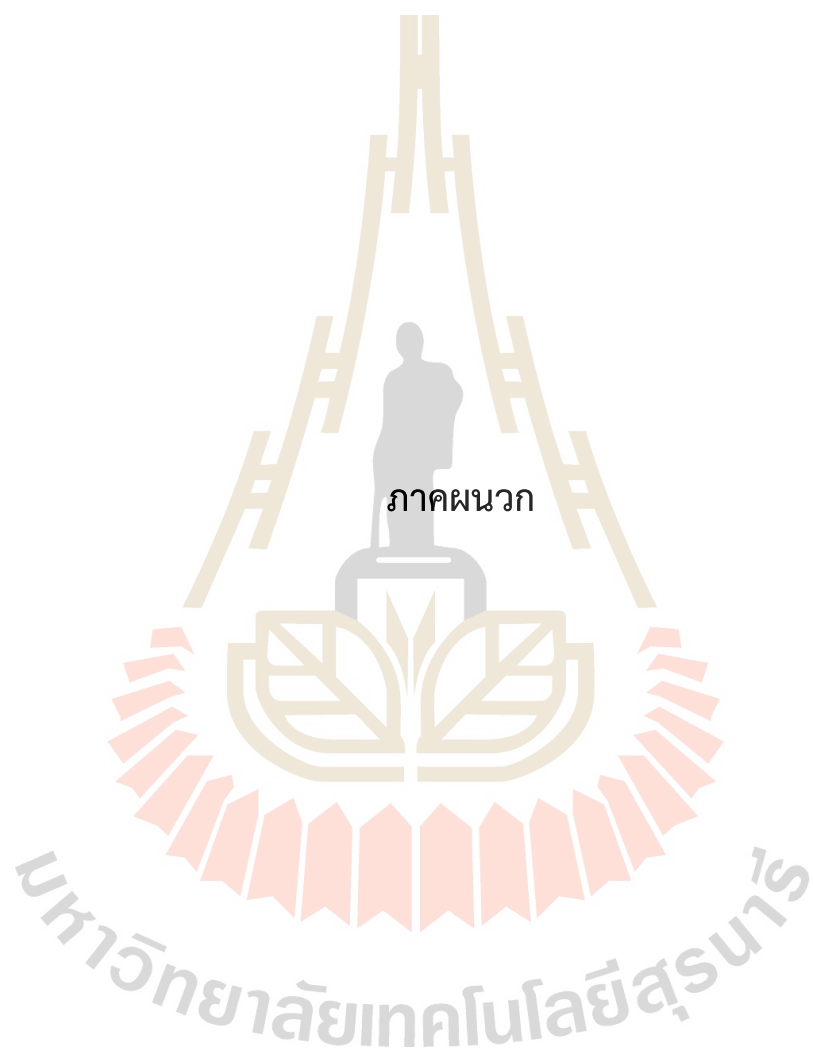
- Sirisopapong, M., Okratok, S., Pukkung, C., & Khempaka, S. (2021). *Lactobacillus ingluviei* C37 supplementation alleviates immunological stress and improves intestinal barrier gene expression in lipopolysaccharide challenged broiler chickens]. **Khon Kaen Agriculture Journal**. 42(2), 929.
- Shakeri, M., Oskoueian, E., Le, H. H., & Shakeri, M. (2020). Strategies to combat heat stress in broiler chickens: unveiling the roles of selenium, vitamin E and vitamin C. **Veterinary Sciences**, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.3390/VETSCI7020071>.
- Shazali, N., Foo, H. L., Loh, T. C., Choe, D. W., & Abdul Rahim, R. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. **Gut Pathogens**, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-1>.
- Shehata, A. M., Saadeldin, I. M., Tukur, H. A., & Habashy, W. S. (2020). Modulation of heat-shock proteins mediates chicken cell survival against thermal stress. **Animals**, 10(12), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ani10122407>.
- Sohail, M. U., Hume, M. E., Byrd, J. A., Nisbet, D. J., Ijaz, A., Sohail, A., Shabbir, M. Z., & Rehman, H. (2010). Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. **Poultry Science**, 91(9), 2235–2240. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02182>.
- Sohail, M. U., Ijaz, A., Younus, M., Shabbir, M. Z., Kamran, Z., Ahmad, S., Anwar, H., Yousaf, M. S., Ashraf, K., Shahzad, A. H., & Rehman, H. (2013). Effect of supplementation of mannan oligosaccharide and probiotic on growth performance, relative weights of viscera, and population of selected intestinal bacteria in cyclic heat-stressed broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, 22(3), 485–491. <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00682>.
- Soleimani, A. F., Zulkifli, I., Omar, A. R., & Raha, A. R. (2012). The role of heat shock protein 70 in resistance to *Salmonella enteritidis* in broiler chickens subjected to neonatal feed restriction and thermal stress. **Poultry Science**, 91, 340–345. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01703>.
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., & Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries. **Journal of Dairy Science**, 86(SUPPL. 1), E52–E77. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5).

- Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., Widiastuti, E., & Kusumanti, E. (2017). Dietary supplementation of probiotics in poultry exposed to heat stress-a review. **Annals of Animal Science**, 17(3), 591–604. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0062>.
- Teyssier, J., Brugaletta, G., Sirri, F., Dridi, S., & Rochell, S. J. (2022). A review of heat stress in chickens part II: insights into protein and energy utilization and feeding. **Frontiers in Physiology**, 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.943612>.
- Thornton, P., Nelson, G., Mayberry, D., & Herrero, M. (2021). Increases in extreme heat stress in domesticated livestock species during the twenty-first century. **Global Change Biology**, 27(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/gcb.15825>.
- Tsakagoshi, M., Sirisopapong, M., Namai, F., Ishida, M., Okrathok, S., Shigemori, S., Ogita, T., Sato, T., Khempaka, S., & Shimosato, T. (2020). *Lactobacillus ingluviei* C37 from chicken inhibits inflammation in LPS-stimulated mouse macrophages. **Animal Science Journal**, 91(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/asj.13436>.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.
- Vandana, G. D., Sejian, V., Lees, A. M., Silpa, M. V., & Maloney, S. K. (2021). Heat stress and poultry production: impact and amelioration. **International Journal of Biometeorology**, 65, 163–179.
- Wang, W. C., Yan, F. F., Hu, J. Y., Amen, O. A., & Cheng, H. W. (2018). Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, 96(5), 1654–1666. <https://doi.org/10.1093/jas/sky092>.
- Weitner, T., Inic, S., Jablan, J., Gabricevic, M., & Domijan, A. (2016). Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. **Croatica Chemica Acta**, 89(1), 133–139. <https://doi.org/10.5562/cca2902>.
- Weng, K., Huo, W., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Chen, G., & Xu, Q. (2022). Fiber characteristics and meat quality of different muscular tissues from slow- and fast-growing broilers. **Poultry Science**, 101(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/>

j.psj.2021.101537.

- Wu, Z., Pan, D., Guo, Y., Sun, Y., & Zeng, X. (2015). Peptidoglycan diversity and anti-inflammatory capacity in *Lactobacillus* strains. **Carbohydrate Polymers**, 128, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.026>.
- Xu, Z. R., Hu, C. H., Xia, M. S., Zhan, X. A., & Wang, M. Q. (2003). Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry Science**, 82, 1030–1036. <https://doi.org/10.1093/ps/82.6.1030>.
- Zaboli, G., Huang, X., Feng, X., & Ahn, D. U. (2019). How can heat stress affect chicken meat quality? - a review. **Poultry Science**, 98(3), 1551–1556.
- Zhu, C., Gong, L., Huang, K., Li, F., Tong, D., & Zhang, H. (2020). Effect of heat-inactivated compound probiotics on growth performance, plasma biochemical indices, and cecal microbiome in Yellow-feathered broilers. **Frontiers in Microbiology**, 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585623>.
- Zininga, T., Ramatsui, L., & Shonhai, A. (2018). Heat shock proteins as immunomodulants. **Molecules**, 23(2846), 1–17.
- Zulkifili, I., Najafi, P., Nurfarahin, A. J., Soleimani, A. F., Kumari, S., Aryani, A. A., Reilly, E. L. O., & Eckersall, P. D. (2014). Acute phase proteins, interleukin 6, and heat shock protein 70 in broiler chickens administered with corticosterone. **Poultry Science**, 93, 3112–3118. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04099>.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

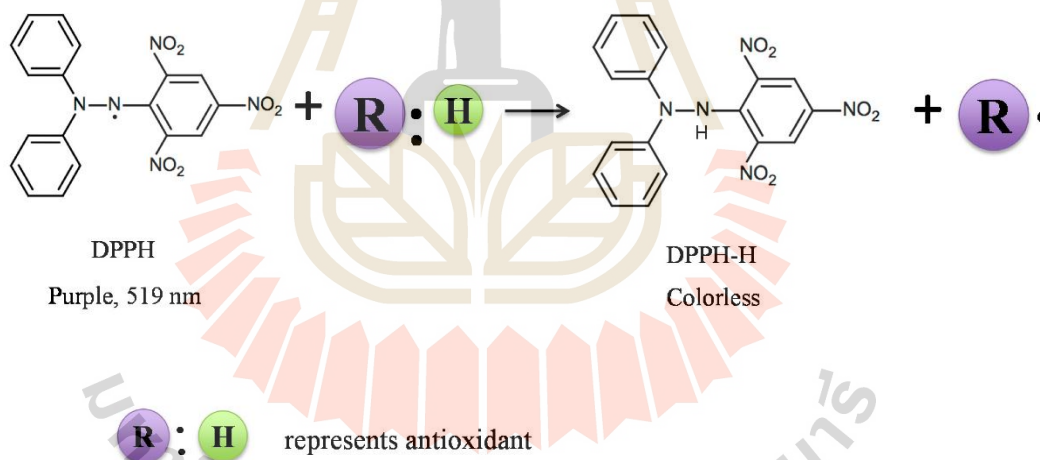


การวิเคราะห์ผล

1. การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อ

1.1 การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

การวัดค่า DPPH ในเนื้อส่วนสะโพก เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอม ทำให้สีม่วงจางลง จนเป็นสีเหลือง (ภาพที่ ก1) การวัดผลทำโดยการนำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว มาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)



ภาพที่ ก1 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา: Liang & Kitts, (2014)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียว
3. Vortex mixer
4. Homogenizer

5. 96 well plate
6. Microplate spectrophotometer
7. Micropipette
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
9. เครื่องปั่น (blender)

สารเคมี

1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
2. Ethanol

วิธีการวัดค่า DPPH

1. นำเนื้อส่วนสะโพกมาทำการหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ เก็บส่วนที่เป็นเอ็นหรือมันออกและนำไปบดด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียดอีกครั้ง จากนั้นชั่งประมาณ 5 g ใส่หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 ml แล้วเติมสารละลายเอทานอล 10 ml และนำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer จนกระทั่งเข้ากัน

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใส (supernatant) ปริมาณ 100 μ l ใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml แล้วเติมสารละลาย 0.11 mM DPPH ปริมาณ 400 μ l ส่วน control เตรียมโดยใช้สารละลายเอทานอล 250 μ l และ สารละลาย 0.11 mM DPPH ปริมาณ 250 μ l เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex

3. นำหลอดตัวอย่าง และ control เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่าง และ control ปริมาณ 200 μ l ใส่ 96 well plate อย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 nm

4. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})] \times 100$$

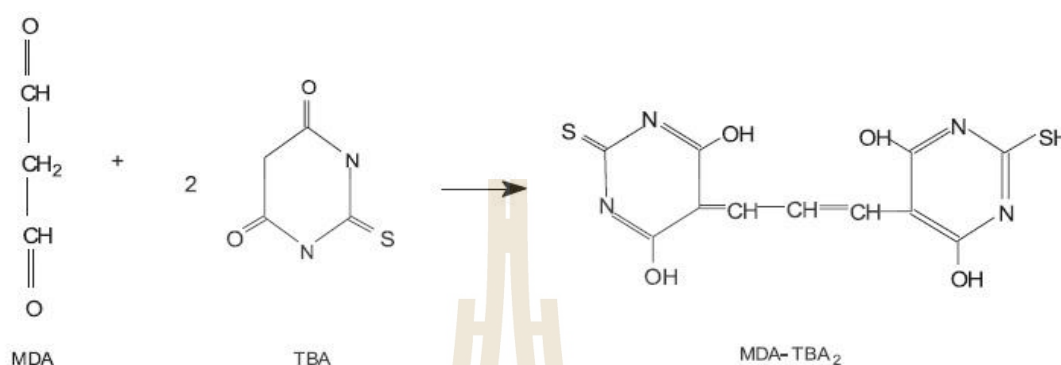
หมายเหตุ: A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง + สารละลาย DPPH

1.2 การวัดลิปิดออกซิเดชัน Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

การวัดการเกิดลิปิดออกซิเดชันในเนื้อส่วนสะโพก ด้วยวิธี TBARS จากปริมาณ Malondialdehyde (MDA) โดย MDA ที่เกิดขึ้นภายในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ภายใต้สภาวะความเป็นกรดและความร้อน จนเกิดสารประกอบสีชมพู (MDA-TBA)

(ภาพที่ ก2) การวัดผลทำโดยการนำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)



ภาพที่ ก2 การเกิดปฏิกิริยา MDA-TBA

ที่มา: Weitner et al. (2016)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง
2. Eppendorf tube
3. หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด
4. Vortex mixer
5. 96 well plate
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
7. Homogenizer
8. Microplate spectrophotometer
9. Water bath
10. Volumetric flask

สารเคมี

1. Thiobarbuturic acid (TBA)
2. Trichloroacetic acid (TCA)
3. Butylhydroxytoluene (BHT)
4. น้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ (Deionized water)
5. Malondialdehyde bis (dimethyl acetate) (MDA)

วิธีการวัดค่า TBARS

1. นำตัวอย่างเนื้อส่วนสะโพกที่บดละเอียดแล้ว (ได้จากข้อ 1 ที่เตรียมจากการวัด TBARS) ชั่งน้ำหนักประมาณ 5 g ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 50 ml แล้วเติมสารละลาย BHT 7.2% ปริมาณ 50 μ l และน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ 15 ml จากนั้นนำไปบดให้เข้ากันโดยเครื่อง Homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน

2. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1:2 ตัวอย่าง:สารละลาย TBA-TCA (V:V) เตรียมโดยการดูดตัวอย่างที่บดเข้ากันแล้ว 1 ml ใส่ในหลอด 5 ml แล้วเติมสารละลาย TBA-TCA (เตรียม 20 mM TBA ใส่สารละลาย TCA 15%) 2 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ปิดฝาให้เรียบร้อยแล้วนำไปใส่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 90°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปิดน้ำไหลผ่านให้เย็น

3. จากนั้นเมื่อนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบน 200 μ l ใส่ 96 well plate อย่างละ 2 ซ้ำ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 532 nm

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน MDA

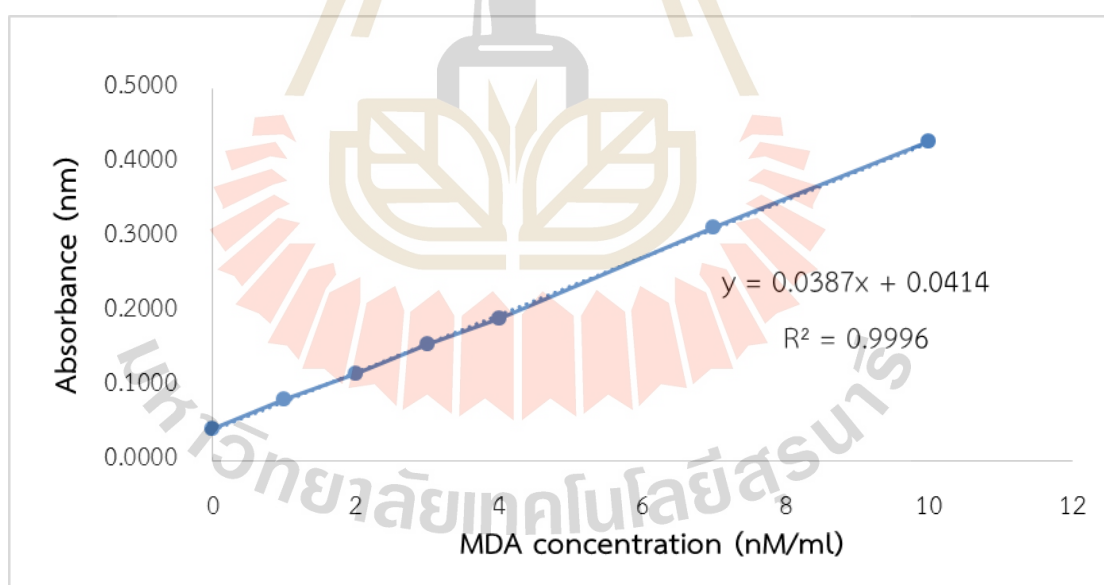
สารละลายมาตรฐาน MDA ความเข้มข้น 100 nM/ml เตรียมจากสารละลายมาตรฐาน MDA จำนวน 17 μ l ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ (ควรเก็บไว้ในที่มืดหรือห่อฟรอร์ดย์ไม่ให้สัมผัสแสง) เพื่อนำมาใช้เตรียมสารละลายมาตรฐาน MDA ตามระดับความเข้มข้นที่ 0 1 2 3 4 7 และ 10 nM/ml ตามตารางที่ ก1 จากนั้นดูดสารละลายมาตรฐาน MDA แต่ละความเข้มข้นจำนวน 200 μ l ใส่หลอด Eppendorf เติมสารละลาย TBA-TCA ปริมาณ 400 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปใส่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 90°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปิเปต 200 μ l ใส่ 96 well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 532 nm นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหา TBARS ในตัวอย่าง โดยคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ดังภาพที่ ก3

ตารางที่ ก1 วิธีการเตรียมความเข้มข้นสารมาตรฐาน MDA

Concentration (nM)	MDA Standard (μl)	Deionized water (μl)
0	0	1000
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960
7	70	930
10	100	900

วิธีการทำคำนวณ

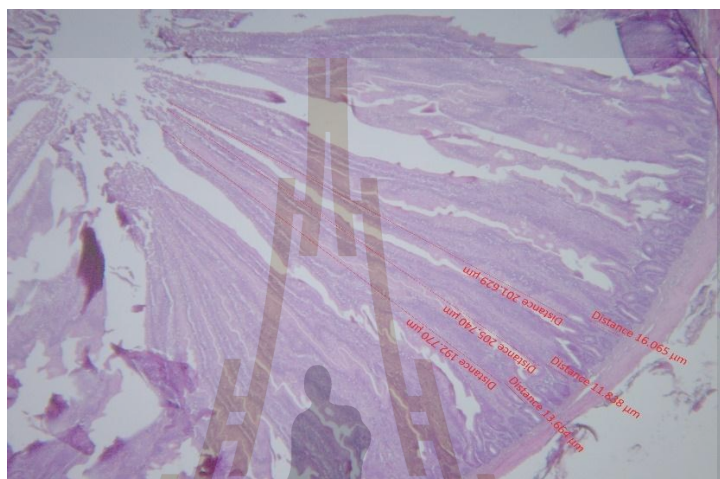
ทำการอ่านค่าความเข้มข้นจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ Malondialdehyde bis (dimethyl acetate) ดังแสดงในภาพที่ ก3



ภาพที่ ก3 กราฟมาตรฐาน MDA

2. การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้

การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กเป็นการประเมินสุขภาพทางเดินอาหารทางกายภาพในเบื้องต้น และอาจบ่งชี้ถึงความสามารถในการย่อยและใช้ประโยชน์ของโภชนาในอาหารได้ ซึ่งสามารถทำได้โดยการตัดลำไส้ตามขวางอย่างบางๆ แล้วนำไปย้อมสีและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ ก4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ (10X)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่อง Tissue processor
2. เครื่อง Embedding
3. เครื่องหล่อเย็น (Cryo console)
4. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ
5. ใบมีด
6. Tissue cassettes
7. แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
8. Water bath
9. Slide dryer
10. โกล์และชุดย้อมสไลด์

สารเคมี

1. Formalin
2. 95% alcohol
3. Absolute alcohol

4. Dehyol absolute
5. Xylene
6. Paraplast (paraffin แบบเม็ด)
7. สีย้อม Hematocylene
8. สีย้อม Eosin

วิธีการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้

1. นำตัวอย่างลำไส้มาตัดตามขวางให้มีความยาวประมาณ 0.5 cm จำนวน 2-3 ชิ้น ใส่ใน Tissue cassettes อย่างระมัดระวังและปิดฝาให้เรียบร้อย
2. จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Tissue processor โดยมีกระบวนการ ดังนี้ แช่ Formalin จำนวน 1 ชั่วโมง 1 ครั้ง แช่ Dehyol absolute, Xylene และ Paraplast (paraffin หลอมเหลว) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ
3. นำตัวอย่างที่แห้งแล้วมาฝังใน Paraffin ด้วยเครื่อง Embedding โดยหยด Paraffin ใส่บล็อก แล้วนำตัวอย่างเข้าไปฝังและทิ้งไว้ให้แข็งตัวบนเครื่องหล่อเย็น จนสามารถแกะออกจากบล็อกได้
4. นำตัวอย่างที่ฝังอยู่ใน Paraffin มาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้เป็นแพทติดกัน ความหนาประมาณ 4 μm และนำมาลอยน้ำอุ่นบน Water bath เพื่อให้คลายตัวที่อุณหภูมิประมาณ 38°C จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ที่สะอาดซ้อนเนื้อเยื่อส่วนที่ต้องการขึ้นมา แล้วนำมาวางบน Slide dryer เพื่อให้ตัวอย่างติดกับแผ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 57°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
5. นำสไลด์มาย้อมสีด้วยวิธีการ ดังนี้
 - แช่ Xylene เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง
 - แช่ Absolute alcohol เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 ครั้ง
 - แช่ 95% alcohol เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 ครั้ง
 - ล้างน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
 - แช่สี Hematocylene เป็นเวลา 5 นาที
 - ล้างน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
 - แช่ Absolute alcohol เป็นเวลา 10 วินาที
 - ล้างน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
 - แช่สี Eosin เป็นเวลา 1 นาที
 - แช่ 95% alcohol เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง
 - แช่ Absolute alcohol เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 ครั้ง
 - แช่ Xylene เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 2 ครั้ง

6. นำสไลด์ที่แห้งแล้วมาหยด Mounting media และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำสไลด์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X ที่ต่อกับจอคอมพิวเตอร์ เพื่อวัดความสูงของวิลไลและความลึกของเซลล์คริปต์ จำนวน 3 จุด ซึ่งสามารถทำได้โดยการตัดลำไส้ตามขวางอย่างบางๆ แล้วนำไปย้อมสีและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

7. จากนั้นนำสไลด์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X ที่ต่อกับจอคอมพิวเตอร์ เพื่อวัดความสูงของวิลไลและความลึกของเซลล์คริปต์ จำนวน 3 จุด

3. การวัดปริมาณประชากรจุลินทรีย์ในซีกัม

การวัดปริมาณจุลินทรีย์ในซีกัมด้วยเทคนิค Real time PCR โดยทำการสกัด gDNA จากสิ่งย่อยในซีกัมซึ่งเป็นที่ตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนและใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยเทียบกับความเข้มข้นของจุลินทรีย์มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (absolute quantification)

3.1 การทำความเข้มข้นของจุลินทรีย์มาตรฐาน

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง
4. Pipet
5. หลอด Microcentrifuge
6. Petri dishes
7. หลอดพลาสติก 15 ml

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (media)
2. Agar powder
3. L-Cysteine hydrochloride

วิธีการทำความเข้มข้นของจุลินทรีย์มาตรฐาน

1. เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ใส่ขวดแก้ว โดยเตรียมอาหารเหลว (nutrient broth) สำหรับขยายเชื้อจุลินทรีย์ และอาหารวุ้น (nutrient agar) สำหรับทำ Spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาหารวุ้นจะมีการเติม Agar powder 1.5% เพื่อให้อาหารเซตตัวโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่แตกต่างกัน (แสดงในตารางที่ ก2) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C แรงดัน 15 PSI เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรับนำอาหารวุ้นมาเทใส่ Petri

dishes ในตู้ปลอดเชื้อ เพลทละ 20 ml เมื่ออาหารเหลวเย็นลงแล้วให้ทำการแบ่งใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 15 ml

2. นำต้นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ต้องการศึกษามาขยาย โดยดูดต้นเชื้อปริมาณ 0.1 ml ใส่ในหลอดอาหารเหลวที่เตรียมไว้จากข้อ 1 แล้วนำไปบ่มไว้ที่สภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ ก2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดออกมา 1 ml ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml แล้วเจือจางแบบ Serial dilution ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนซ์ที่ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ

4. ทำการดูลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 200 μ l ใส่ในอาหารรุ้นที่เตรียมไว้ อย่างละ 3 ข้าง และ Spread plate ด้วยวิธีการ Aseptic technique จนแห้ง แล้วนำไปบ่มไว้ที่สภาวะต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ ก2) เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเพลทที่เชื้อขึ้นไม่หนาแน่น มาทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณกลับเพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อใน 1 ml

ตารางที่ ก2 อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

Microbes	Media	Condition
<i>Lactobacillus</i>	MRS (55.15 g/l)	37°C
<i>Bifidobacterium</i>	MRS (55.15 g/l) + 0.05% Cysteine	37°C (anaerobe)
<i>Enterobacterium</i>	Nutrient (13 g/l)	30°C
<i>E. coli</i>	Tryptic soy (30 g/l)	37°C

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry)
2. เครื่องชั่ง
3. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม Real time PCR
4. ชุด Kit สำหรับสกัด DNA
5. Pipet
6. หลอด Microcentrifuge แบบฝาเกลียว
7. หลอด Microcentrifuge
8. Metal bead media

สารเคมี

1. Primer sequences for targeting microbes

2. SYBR Green
3. Nuclease free water

วิธีการ

1. นำตัวอย่างสิ่งย่อยในซีกัมที่เก็บไว้ในตู้ -80°C มาทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการชั่งประมาณ 40-50 mg ใส่หลอด Centrifuge ฝาเกลียว ขนาด 2 ml ที่มี Metal bead media 2-3 เม็ด ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว
2. ทำการสกัด DNA ด้วยชุดสกัด QIAamp® DNA Stool Mini kits (Qiagen, Hilden, Germany) และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAamp spin column (Qiagen, Hilden, Germany) ตามวิธีการและคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำถ่ายใส่หลอด Microcentrifuge ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป
3. ทำกราฟมาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทราบความเข้มข้น (ได้จากข้อ 3.1) โดยเตรียม qPCR master mix สำหรับทำ Real time PCR จำนวน 10 µl ต่อหลุมปฏิกิริยา โดยใช้จุลินทรีย์มาตรฐานเป็นแม่แบบ (template) และใช้ RNase free water เป็นแม่แบบของ Negative control ดังแสดงไว้ในตารางที่ ก3 จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา
4. เตรียม qPCR master mix สำหรับทำ Real time PCR จำนวน 10 µl ต่อหลุมปฏิกิริยา โดยใช้ DNA ของจุลินทรีย์ที่สกัดได้จากซีกัมเป็นแม่แบบ องค์ประกอบต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ ก3 จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง Real time PCR โดยเริ่มจาก Initial denaturation (94°C เป็นเวลา 5 นาที) ตามด้วยกระบวนการ Denaturation Annealing และ Extension จำนวน 40 รอบ (denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 20 วินาที; annealing ที่ 50°C สำหรับ *E. coli*, ที่ 58°C สำหรับ *Lactobacillus*, ที่ 60°C สำหรับ *Bifidobacterium* และ *Enterobacterium* gene เป็นเวลา 30 วินาที; และตามด้วย final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที) วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Absolute quantification เพื่อเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของจุลินทรีย์นั้นๆ ตามวิธีการของ Navidshad et al. (2012) และ Humam et al. (2019)

ตารางที่ ก3 องค์ประกอบในการทำ qPCR master mix

qPCR master mix	Volum/reaction (μl)
2X SYBR Green	5.0
Forward primer	0.4
Reverse primer	0.4
RNase free water	2.2
DNA template	2.0

4. การวัดปริมาณการแสดงออกของยีน

การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนในลำไส้เล็กส่วนกลางและตับ ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยทำการสกัด Total RNA จากตัวอย่างให้ได้ RNA ที่บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription) นำไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ SYBR Green ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแสดงออกมาเป็นค่า Threshold cycle (Ct) และวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Relative quantification เพื่อวัดปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจเทียบกับยีนควบคุม (reference gene)

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) และสังเคราะห์ cDNA (reverse transcription)

วัสดุและอุปกรณ์

1. โกร่งบด
2. เครื่องชั่ง
3. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermal cycler
4. เครื่อง Nanodrop
5. ชุด Kit สำหรับสกัด RNA
6. ชุด Reverse transcription kit
7. Pipet
8. หลอด Microcentrifuge แบบฝาเกลียว
9. หลอด Microcentrifuge
10. Metal bead media
11. PCR tube

สารเคมี

1. Reverse transcription enzyme
2. RNase free water
3. ไนโตรเจนเหลว

วิธีการ

1. นำตัวอย่าง (เยื่อเมือกผนังลำไส้เล็กส่วนกลางและตับ) มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลวตลอดเวลา และชั่งน้ำหนักประมาณ 30 mg ใส่หลอด Centrifuge ฝาเกลียวขนาด 2 ml ที่มีเม็ด Metal bead media 2-3 เม็ด ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
2. ทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัด NucleoSpin[®] RNA (MACHINARY-NAGEL, Duren, Germany) โดยย่อยทำลายเซลล์ด้วย Buffer RA1 350 μ l และ β -Mercaptoethanol 3.5 μ l จากนั้นดูดตัวอย่างมาใส่คอลัมน์ที่มีเยื่อกรองและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 11,000 $\times$ g เป็นเวลา 1 นาที แล้วดึงเยื่อกรองทิ้ง เติมน้ำละลายเอทานอล 70% จำนวน 350 μ l ผสมให้เข้ากัน ดูดใส่คอลัมน์ที่มีเยื่อกรองสำหรับจับ RNA (silica membrane filter) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 $\times$ g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างเยื่อกรองด้วย Desalting buffer 350 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 $\times$ g เป็นเวลา 1 นาที ย่อยชิ้นส่วน DNA ที่ติดบนเยื่อกรองด้วยเอนไซม์ DNase 45 μ l ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ล้างเยื่อกรองด้วย Buffer จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติม RNase free water 50 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อชะล้าง RNA ที่ติดอยู่กับเยื่อกรองใส่หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ตรวจสอบคุณภาพ และความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer
3. ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RNA ที่สกัดได้เป็นแม่แบบ ด้วย QuantiNova[®] reverse transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) ใส่หลอด PCR tube ซึ่งองค์ประกอบด้วย gDNA removal, IC, RNase free water และ RNA template ปริมาณ 2 1/4 และ 8 μ l ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำการ Pre-incubation ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำ Reverse transcription enzyme 5 μ l/reaction และนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยมีกระบวนการ Annealing ที่ 25°C เป็นเวลา 3 นาที Reverse transcription ที่ 45°C เป็นเวลา 10 นาที และ Inactivate ที่ 85°C เป็นเวลา 5 นาที

4.2 วิเคราะห์การแสดงออกของยีน

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม Real time PCR
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง
3. 96 well plate สำหรับทำ Real time PCR
4. Pipet

5. หลอด Microcentrifuge

สารเคมี

1. Primer sequences for targeting genes
2. SYBR Green
3. RNase free water

วิธีการ

1. เตรียม Real time PCR master mix ใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ซึ่งประกอบด้วย SYBR Green, Forward primer, Reverse primer และ RNase free water ปริมาณ 5, 0.4, 0.4 และ 2.2 $\mu\text{L}/\text{reaction}$ ตามลำดับ จากนั้นดูดใส่ 96 well plate ปริมาณ 8 $\mu\text{L}/\text{reaction}$ ตามด้วย cDNA 2 $\mu\text{L}/\text{reaction}$ โดยใช้ยีน GAPDH หรือ β -actin แล้วปิดให้แน่นและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000Xg for 1 min
2. นำไปเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Real time PCR โดยเริ่มจาก Initial denaturation (95°C เป็นเวลา 10 นาที) ตามด้วยกระบวนการ Denaturation Annealing และ Extension จำนวน 40 รอบ (denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 10 วินาที; annealing ที่ 59°C สำหรับยีน IL-6, IL-10, TNF- α , ที่ 60°C สำหรับยีน HSP70, HSP90, NF-kB เป็นเวลา 30 วินาที; และตามด้วย final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที) วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนแบบ Relative quantification ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ ตามวิธีการของ Livak and Schmittgen, (2001)

5. การกำหนดค่าสัมประสิทธิ์ของการเปรียบเทียบ (contrast coefficient)

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย Orthogonal contrasts โดยกำหนดค่าสัมประสิทธิ์ของการเปรียบเทียบ ดังนี้ 1) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่อยู่อย่างสบายและภาวะความเครียดจากความร้อน (TNZ or control vs HS) 2) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่อยู่อย่างสบายและภาวะความเครียดจากความร้อนที่มีการเสริมโสมไบโอติก (control vs DC-LIC37) 3) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะและโสมไบโอติก (PC vs DC-LIC37) 4) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากความร้อนที่ปราศจากสารเสริมและโสมไบโอติก (NC vs DC-LIC37)

ตารางที่ ก4 การกำหนดค่าสัมประสิทธิ์ของการเปรียบเทียบ

Contrasts	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆
1	-5	+1	+1	+1	+1	+1
2	-3	0	0	+1	+1	+1
3	0	0	-3	+1	+1	+1
4	0	-3	0	+1	+1	+1

G₁ = TNZ or control, G₂ = NC, G₃ = PC, G₄ = DC-LIC37 level 1, G₅ = DC-LIC37 level 2, G₆ = DC-LIC37 level 3



ประวัติผู้เขียน

นายสิทธิพงษ์ รังงาม เกิดเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2541 ที่อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ เริ่มศึกษาระดับชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนกาบเชิงมิตรภาพที่ 190 ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนกาบเชิงวิทยาและชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนสุรวิทยาคาร อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ ในปี พ.ศ. 2559 ได้รับทุนเฉลิมพระเกียรติ 84 พรรษา เพื่อศึกษาต่อระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2563 หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตสัตว์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่งและได้รับรางวัลเข็มทองคำพระราชทาน สำหรับผู้มีคะแนนเฉลี่ยสะสมสูงสุดของหลักสูตร จากสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เมื่อสำเร็จการศึกษาในปีเดียวกัน ได้รับทุนกิตติบัณฑิตสำหรับบัณฑิตเกียรตินิยม เพื่อเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างที่ศึกษาได้เป็นผู้ช่วยสอน ปฏิบัติการนักศึกษาระดับปริญญาตรี ในรายวิชาโภชนศาสตร์สัตว์และกายวิภาคศาสตร์สัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

