

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้า
เพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ไข่



ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2568

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้า
เพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ไข่



ชลดา ปาทำมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้า
เพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ไข่

ชลดา ปาห์มา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพปภา พิสิษฐ์กุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยศ สัมฤทธิ์สกุล)

รองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้าเพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ไข่
ชื่อผู้เขียน	นางสาวชลดา ปาทำมา
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน

บทคัดย่อ

ไก่ไข่เป็นหนึ่งในสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย วัตถุประสงค์อาหารสัตว์และสารส่งเสริมการเจริญสำหรับสัตว์มากมายจึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพของการเลี้ยงไก่ไข่ดังกล่าว ซึ่งยาปฏิชีวนะเป็นสารส่งเสริมการเจริญในไก่ไข่ที่ถูกใช้มาอย่างยาวนาน แต่ปัจจุบันได้ถูกต่อต้านโดยองค์กรภาครัฐและองค์กรอิสระในสังคม ทำให้ผู้ประกอบการจำเป็นต้องแสวงหาสารส่งเสริมการเจริญแหล่งอื่นที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับ ปัจจุบันโพรไบโอติกเป็นสารเติมแต่งอาหารสัตว์ทางเลือกที่ทั่วโลกนิยมใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ ประกอบกับการเลี้ยงไก่ไข่ของประเทศไทยมักพบปัญหาความเครียดของไก่อันเนื่องมาจากสภาวะอากาศร้อนซึ่งทำให้ผลผลิตไข่ไก่ลดลง ซึ่งมีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่พบว่า การเสริมสารกาบ้าในอาหารสัตว์ช่วยลดผลกระทบจากความเครียดของไก่ได้ ดังนั้นงานวิจัยที่นำเสนอในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่ที่มีศักยภาพผลิตสารกาบ้าและมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสำหรับไก่ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับไก่ต่อไป ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารไก่ทั้งหมด 42 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลต LH5 มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะจำลองของทางเดินอาหารไก่ โดยสามารถเจริญได้ที่ pH 2.0 – 3.5 และมีน้ำดีความเข้มข้นสูงร้อยละ 1.0 (w/v) พื้นผิวเซลล์แสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำระดับปานกลางโดยมีค่า %CSH เท่ากับร้อยละ 57 ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด penicillin, ampicillin, vancomycin, cefoxitin, chloramphenicol, clindamycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, cephalothin and rifampicin แต่ต้านยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin, erythromycin และ nalidixic acid และ ไอโซเลต LH5 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella Typhi* และไม่แสดงคุณสมบัติการสลายเม็ดเลือดแดง ได้รับการระบุชนิดเป็น *Enterococcus faecium* ด้วยค่า %similarity ร้อยละ 100 ทั้งนี้ *E. faecium* LH5 สามารถผลิตสารกาบ้าได้สูงที่สุดที่ 39.05 ± 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตมวลเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิ 21.9

องศาเซลเซียส การเสริมน้ำตาลกลูโคส 15.1 กรัมต่อลิตร และการเสริมโมโนโซเดียมกลูตาเมต 2.9 กรัมต่อลิตร ผลผลิตชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระดับห้องปฏิบัติการ (ปริมาตรอาหาร 700 มิลลิลิตร) และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ปริมาตรอาหาร 3.5 ลิตร) ไม่แตกต่างกัน และในกระบวนการขึ้นรูปผงโปรไบโอติกนั้นพบว่ารำข้าวเป็นสารห่อหุ้มที่ถูกคัดเลือกนำมาใช้เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ระหว่างกระบวนการขึ้นรูปผงโปรไบโอติกด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นอกจากนี้ เซลล์ของ *E. faecium* LH5 ในผงโปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 95.39 ± 0.07 และ 94.15 ± 0.19 หลังการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ระหว่างอุณหภูมิทั้งสองระดับในแต่ละสัปดาห์ จากการทดลองทั้งหมด ชี้ให้เห็นว่า *E. faecium* LH5 มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก สามารถเพิ่มกำลังขยายผลผลิตชีวมวล และขึ้นรูปเป็นผงที่เก็บรักษาได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ ผลการวิจัยสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมในไก่ไข่ต่อไปและใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

คำสำคัญ : โปรไบโอติก, สารกักเก็บ, ไก่ไข่, ความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน, อาหารเสริมสัตว์

Title	SELECTION OF PROBIOTIC BACTERIA CAPABLE OF GABA PRODUCTION FOR THE APPLICATION AS FEED SUPPLEMENT IN LAYING HENS
Author	Miss Chonlada Pathamma
Degree	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Pairote Wongputtisin

ABSTRACT

Laying hens are important economic animals of Thailand. Many feeds and growth promoting ingredients have been developed to enhance the efficiency of laying hens raising. Antibiotics are the growth promoting substances in laying hens that have been used for a long time. However, the use of antibiotics has been banned by the government and independent organizations, therefore many entrepreneurs have been seeking for alternative sources of the effective and acceptable growth promoting substances. Nowadays, probiotic becomes a popular alternative feed additive to replace the antibiotic use worldwide. addition, laying hens production in Thailand often face a heat stress problem due to high temperature environment, which causes a decrease of egg production. Many studies have found that supplementing GABA in feed reduces the effects of hen stress. Therefore, this research aimed to isolate and screen lactic acid bacteria from the chicken digestive tract with a potential in GABA production and exhibit the probiotic properties for further development as feed additive in laying hens The results showed that a total of 42 lactic acid bacteria isolates were collected from the digestive tract of laying hens. The preliminary study of probiotic properties found that isolate LH5 showed the most promising probiotic potential when tested under the simulated chicken gastrointestinal conditions. LH5 could grow at pH 2.0–3.5 and in the 1.0% (w/v) bile salt concentration. Its cell surface exhibited moderate hydrophobicity with a percentage of cell surface hydrophobicity (%CSH) value of 57. It was susceptible to penicillin, ampicillin, vancomycin, cefoxitin, chloramphenicol,

clindamycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, cephalothin and rifampicin, but resistant to gentamycin, erythromycin and nalidixic acid. Isolate LH5 inhibited the growth of the pathogenic bacteria *Salmonella* Typhi and did not exhibit hemolytic properties. It was identified as *Enterococcus faecium* with 100% similarity *E. faecium* LH5 was able to produce the highest GABA at 39.05 ± 0.003 mg/L at 12 hours of cultivation under the optimal conditions for cell mass production, i.e. 21.9 °C, 15.1 g/L and 2.9 g/L of glucose and monosodium glutamate supplementation, respectively. The biomass yields from laboratory-scale cultivation (700 ml medium volume) and in bioreactors (3.5 L medium volume) were not different. In the formulation of probiotic powder, rice bran was the selected encapsulating agent to prevent the damage of cell during freeze-drying process of probiotic powder. In addition, the survival of *E. faecium* LH5 cells in the probiotic powder was as high as 95.39 ± 0.07 and $94.15 \pm 0.19\%$ after 12 weeks of storage at 4 °C and room temperature (approximately 30 °C), respectively, and not significantly different ($p>0.05$) between the two temperature levels in each week. From all the experiments, it was indicated that *E. faecium* LH5 was an effective probiotic bacterium. Production of its biomass could be up scaled and formulated into powder form without the quality change. This product can be further developed into a feed supplement for laying hens and subsequently commercialized

Keywords : Probiotic, GABA, Laying hens, Heat stress, Animal feed supplements

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจาก คณาจารย์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณพระคุณ ผศ. ดร. ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ คำปรึกษา คำแนะนำ เรียนรู้เทคนิค ประสบการณ์ ตลอดระยะเวลาการปฏิบัติงานของข้าพเจ้าในห้องปฏิบัติการจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่อง ความเอาใจใส่ข้าพเจ้าอย่างยิ่ง และให้ความรู้จน วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณ ผศ. ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และ ผศ.ดร.ทิพป ภา พิสิษฐกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดระยะเวลาในการทำ วิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ข้าพเจ้าขอขอบคุณพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุน ข้าพเจ้าจนการวิจัย ประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณคุณเจ้าหน้าที่ และผู้ที่มีส่วนร่วมทุกท่านที่ข้าพเจ้าเคารพรัก ที่ช่วยให้ คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ ความสะดวกแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในพระคุณอย่างสูง หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอ มอบส่วนดีทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่าคณาจารย์ บิดา มารดา และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน จนทำให้ผลงานวิจัย เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่เข้ามาศึกษา เพื่อพัฒนา งานวิจัยต่อไป

ชลดา ปาท่ามา

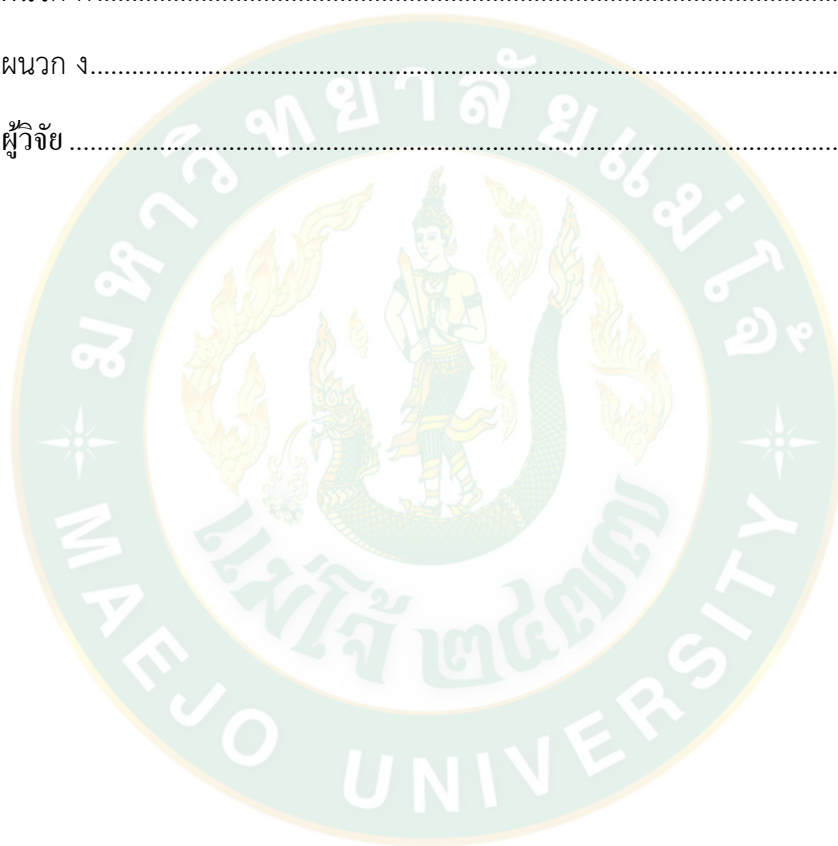
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ซ
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทคัดย่อ	1
Abstract.....	3
กิตติกรรมประกาศ	5
บทที่ 1	6
บทนำ	6
วัตถุประสงค์.....	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2	9
ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร.....	9
1. ไก่ไข่ (laying hens).....	9
1.1 ระบบการเลี้ยงไก่ไข่.....	9
1.1.1 การเลี้ยงไก่ไข่แบบขังกรง.....	9
1.1.2 การเลี้ยงไก่ไข่แบบปล่อยอิสระ.....	9
1.2 อาหารและการให้อาหารไก่ไข่	10
1.2.1 อาหารไก่ไข่.....	10

1.2.2 ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ไข่.....	11
1.3 ระบบทางเดินอาหารไก่.....	12
1.5 ปัญหาสุขภาพของสัตว์ปีก.....	15
1.6 ความเครียดจากความร้อน (heat stress).....	16
1.7 โรคสำคัญในสัตว์ปีก.....	18
2. แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria).....	22
2.1 กระบวนการหมักกรดแลคติก.....	22
2.1.1 โฮโมเฟอร์เมนเตชัน (homofermentation).....	22
2.1.2 เฮเทอโรเฟอร์เมนเตชัน (heterofermentation).....	23
2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	23
2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก.....	25
3. โพรไบโอติก (probiotics).....	26
3.1 ความหมายของโพรไบโอติก.....	26
3.2 เกณฑ์การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี.....	27
3.3 ประโยชน์จากการใช้โพรไบโอติกในสัตว์.....	27
4. กาบา (GABA).....	29
5. ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	31
บทที่ 3.....	35
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	35
อุปกรณ์ และสารเคมี.....	35
วิธีการทดลอง.....	37
1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบาได้.....	37
1.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่.....	37
1.2. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารกาบา.....	38

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic properties)	38
2.1 ทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)	39
2.2 การทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีในทางเดินอาหาร (Acid and bile tolerant ability)	39
2.3 ทดสอบความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ (Cell surface hydrophobicity: CSH)	39
2.4 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test)	40
2.5 ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal pathogen inhibition test)	40
3. การระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	40
4. ศึกษาลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	41
5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตชีวมวลของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก	41
6. ทดสอบขยายการผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก	42
7. ศึกษากระบวนการทำแห้งของชีวมวลโพรไบโอติก	43
8. ทดสอบอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกชนิดผง	43
บทที่ 4	44
ผลการทดลองและการวิจารณ์	44
1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบ้าได้	44
2. การทดสอบความสามารถผลิตสารกาบ้าโดยโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้และการระบุชนิด	53
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตชีวมวลของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก	55
4. ทดสอบขยายการผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก	58
5. ศึกษากระบวนการทำแห้งของชีวมวลโพรไบโอติกและการทดสอบอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์	61
บทที่ 5	65

สรุปผลการทดลอง	65
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก.....	74
ภาคผนวก ก	75
ภาคผนวก ข	77
ภาคผนวก ค	79
ภาคผนวก ง.....	80
ประวัติผู้วิจัย	82



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารไก่	13
ตารางที่ 2 อาหาร และเครื่องดื่มหมักดอง และแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง.....	24
ตารางที่ 3 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก	26
ตารางที่ 4 การศึกษาวิจัยศักยภาพของโพรไบโอติกในสัตว์ปีก	27
ตารางที่ 5 ระดับของแต่ละปัจจัยโดยการออกแบบ Box- Behnken Design.....	41
ตารางที่ 6 แผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ของทั้ง 3 ปัจจัย	42
ตารางที่ 7 คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จากจุลินทรีย์ รวมของไก่ไข่	44
ตารางที่ 8 ความสามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือ และการยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุลำไส้	49
ตารางที่ 9 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้	50
ตารางที่ 10 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	51
ตารางที่ 11 แผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ของทั้ง 3 ปัจจัย	56
ตารางที่ 14 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและค่าดูดกลืนแสงของขวดปริมาตร 700 มิลลิลิตร และถึงปฏิกรณ์ ชีวภาพ ปริมาตร 3.5 ลิตร.....	59
ตารางที่ 15 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโพรไบโอติก E. faecium LH5 ในรูปแบบผงหลังจากการเก็บ รักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 สัปดาห์	64

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การเลี้ยงไก่ในระบบขังกรง.....	10
ภาพที่ 2 ระบบทางเดินอาหารไก่.....	13
ภาพที่ 3 ผลของความเครียดจากความร้อนต่อลักษณะพฤติกรรม สรีรวิทยา ระบบประสาทต่อมไร้ท่อ และลักษณะการผลิตของไข่.....	16
ภาพที่ 4 โรคฝีดาษไก่แบบแห้ง.....	19
ภาพที่ 5 ตุ่มขนที่ผิวหนังของไก่ที่ติดเชื้อไวรัสโรคมาเร็็กซ์เป็นปมูน.....	20
ภาพที่ 6 โรคบิดในไก่.....	21
ภาพที่ 7 แผนผังแสดงผลิตภัณฑ์จากการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative และ homofermentative ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	23
ภาพที่ 8 วิถีเมแทบอลิซึมของสารกาบ้าในพืชและสัตว์.....	30
ภาพที่ 9 การเก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารไก่.....	37
ภาพที่ 10 ลักษณะการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบ γ -hemolysis และ.....	46
ภาพที่ 11 ภาพตัวอย่างลักษณะวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก (A) การยับยั้งของเชื้อ E. Coli และ (B) การยับยั้งของเชื้อ S. Typhi.....	52
ภาพที่ 12 การวิเคราะห์การผลิตสารกาบ้า ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากระบบทางเดินอาหารไก่ โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง.....	54
ภาพที่ 13 สันฐานวิทยาของโคโลนี Enterococcus faecium LH5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรแข็ง (A) สันฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (B) และลำดับยีน 16S rRNA แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง E. faecium LH5 กับสายพันธุ์ของสปีชีส์ที่เกี่ยวข้อง (C)	55
ภาพที่ 14 กราฟพื้นที่ผิวแสดงความสัมพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ E. faecium.....	57
ภาพที่ 15 ถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตรสำหรับการผลิตมวลเซลล์ของ E. faecium LH5.....	59
ภาพที่ 16 การเจริญของแบคทีเรีย E. faecium LH5 จากการวัดค่าความขุ่น (A_{600}) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 700 มิลลิลิตร (A) และ 3.5 ลิตร (B).....	60
ภาพที่ 17 ปริมาณการผลิตสารกาบ้าของเชื้อจุลินทรีย์ E. faecium LH5.....	61

ภาพที่ 18 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกภายใต้สารสื่อชนิดต่างๆหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	62
ภาพที่ 19 ชีวมวลของโพรไบโอติกของ E. faecium LH5 (A) มวลเซลล์สด และ (B) ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก	63
ภาพที่ 20 ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกภายใต้สภาวะการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 สัปดาห์	64
ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายกาบ้ำมาตรฐาน ด้วยเทคนิคการดูดกลืนแสง A_{630}	79
ภาพที่ 22 ภาพตัวอย่างลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	81



บทคัดย่อ

ไก่ไข่เป็นหนึ่งในสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพของการเลี้ยงไก่ไข่ดังกล่าว ซึ่งยาปฏิชีวนะเป็นสารส่งเสริมการเจริญในไก่ไข่ที่ถูกใช้อย่างยาวนาน แต่ปัจจุบันได้ถูกต่อต้านโดยองค์กรภาครัฐและองค์กรอิสระในสังคม ทำให้ผู้ประกอบการจำเป็นต้องแสวงหาสารส่งเสริมการเจริญแหล่งอื่นที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับ ปัจจุบันโพรไบโอติกเป็นสารเติมแต่งอาหารสัตว์ทางเลือกที่ทั่วโลกนิยมใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ ประกอบกับการเลี้ยงไก่ไข่ของประเทศไทยมักพบปัญหาความเครียดของไก่อันเนื่องมาจากสภาวะอากาศร้อนซึ่งทำให้ผลผลิตไข่ไก่ลดลง ซึ่งมีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่พบว่าการเสริมสารกาบ้าในอาหารสัตว์ช่วยลดผลกระทบจากความเครียดของไก่ได้ ดังนั้นงานวิจัยที่นำเสนอในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่ที่มีศักยภาพผลิตสารกาบ้าและมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสำหรับไก่ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับไก่ไข่ต่อไป ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารไก่ทั้งหมด 42 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลต LH5 มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะจำลองของทางเดินอาหารไก่ โดยสามารถเจริญได้ที่ pH 2.0 – 3.5 และมีน้ำตีความเข้มข้นสูงร้อยละ 1.0 (w/v) พื้นผิวเซลล์แสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำระดับปานกลางโดยมีค่า %CSH เท่ากับร้อยละ 57 ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด penicillin, ampicillin, vancomycin, cefoxitin, chloramphenicol, clindamycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, cephalothin and rifampicin แต่ต้านยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin, erythromycin และ nalidixic acid และ ไอโซเลต LH5 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Salmonella* Typhi และไม่แสดงคุณสมบัติการสลายเม็ดเลือดแดง ได้รับการระบุชนิดเป็น *Enterococcus faecium* ด้วยค่า % similarity ร้อยละ 100 ทั้งนี้ *E. faecium* LH5 สามารถผลิตสารกาบ้าได้สูงที่สุดที่ 39.05 ± 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตมวลเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิ 21.9 องศาเซลเซียส การเสริมน้ำตาลกลูโคส 15.1 กรัมต่อลิตร และการเสริมโมโนโซเดียมกลูตาเมต 2.9 กรัมต่อลิตร ผลผลิตชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระดับห้องปฏิบัติการ (ปริมาตรอาหาร 700 มิลลิลิตร) และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ปริมาตรอาหาร 3.5 ลิตร) ไม่แตกต่างกัน และในกระบวนการขึ้นรูปผงโพรไบโอติกนั้นพบว่ารำข้าวเป็นสารห่อหุ้มที่ถูกคัดเลือกลำบากมาใช้เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ระหว่างกระบวนการขึ้นรูปผงโพรไบโอติกด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นอกจากนี้ เซลล์ของ *E. faecium* LH5 ในผงโพรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 95.39 ± 0.07 และ 94.15 ± 0.19 หลังการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ระหว่างอุณหภูมิทั้งสองระดับในแต่ละสัปดาห์ จากการทดลองทั้งหมด ชี้ให้เห็นว่า *E. faecium* LH5 มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก สามารถเพิ่มกำลังขยายผลผลิตชีวมวล และขึ้นรูปเป็นผงที่เก็บรักษาได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง

คุณภาพ ผลการวิจัยสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมในไก่ไข่ต่อไปและใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

คำสำคัญ: โพรไบโอติก ; สารกาบ่า ; ไก่ไข่ ; ความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน ; อาหารเสริมสัตว์



Abstract

Laying hens are important economic animals of Thailand. Many feeds and growth promoting ingredients have been developed to enhance the efficiency of laying hens raising. Antibiotics are the growth promoting substances in laying hens that have been used for a long time. However, the use of antibiotics has been banned by the government and independent organizations, therefore many entrepreneurs have been seeking for alternative sources of the effective and acceptable growth promoting substances. Nowadays, probiotic becomes a popular alternative feed additive to replace the antibiotic use worldwide. In addition, laying hens production in Thailand often face a heat stress problem due to high temperature environment, which causes a decrease of egg production. Many studies have found that supplementing GABA in feed reduces the effects of hen stress. Therefore, this research aimed to isolate and screen lactic acid bacteria from the chicken digestive tract with a potential in GABA production and exhibit the probiotic properties for further development as feed additive in laying hens. The results showed that a total of 42 lactic acid bacteria isolates were collected from the digestive tract of laying hens. The preliminary study of probiotic properties found that isolate LH5 showed the most promising probiotic potential when tested under the simulated chicken gastrointestinal conditions. LH5 could grow at pH 2.0–3.5 and in the 1.0% (w/v) bile salt concentration. Its cell surface exhibited moderate hydrophobicity with a percentage of cell surface hydrophobicity (%CSH) value of 57. It was susceptible to penicillin, ampicillin, vancomycin, cefoxitin, chloramphenicol, clindamycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, cephalothin and rifampicin, but resistant to gentamycin, erythromycin and nalidixic acid. Isolate LH5 inhibited the growth of the pathogenic bacteria *Salmonella* Typhi and did not exhibit hemolytic properties. It was identified as *Enterococcus faecium* with 100% similarity. *E. faecium* LH5 was able to produce the highest GABA at 39.05 ± 0.003 mg/L at 12 hours of cultivation under the optimal conditions for cell mass production, i.e. 21.9 °C, 15.1 g/L and 2.9 g/L of glucose and monosodium glutamate supplementation, respectively. The biomass yields from laboratory-scale cultivation (700 ml medium volume) and in bioreactors (3.5 L medium volume) were not different. In the formulation of probiotic powder, rice bran was the selected encapsulating agent to prevent the damage of cell during freeze-drying process of probiotic powder. In addition, the survival of *E. faecium* LH5 cells in the probiotic powder was as high as 95.39 ± 0.07 and $94.15 \pm 0.19\%$ after 12 weeks of storage at 4 °C and room temperature (approximately 30 °C), respectively,

and not significantly different ($p>0.05$) between the two temperature levels in each week. From all the experiments, it was indicated that *E. faecium* LH5 was an effective probiotic bacterium. Production of its biomass could be up scaled and formulated into powder form without the quality change. This product can be further developed into a feed supplement for laying hens and subsequently commercialized.

keyword: Probiotics; GABA; Laying hens; Heat stress; Animal feed supplements



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจาก คณาจารย์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ พระคุณ ผศ. ดร. ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ เรียนรู้เทคนิค ประสบการณ์ ตลอดระยะเวลาการปฏิบัติงานของข้าพเจ้าในห้องปฏิบัติการจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่อง ความเอาใจใส่ข้าพเจ้าอย่างยิ่ง และให้ความรู้จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และ ผศ.ดร.ทิพปภา พิสิษฐกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุน ข้าพเจ้าจนการวิจัยประสบความสำเร็จ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และผู้ที่มีส่วนร่วมทุกท่านที่ข้าพเจ้าเคารพรัก ที่ช่วยให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความสะดวกแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในพระคุณอย่างสูง หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่าคณาจารย์ บิดา มารดา และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน จนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่เข้ามาศึกษา เพื่อพัฒนางานวิจัยต่อไป



บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปสัตว์ปีกเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญในประเทศไทย หนึ่งในนั้นคือการผลิตไข่ไก่ ข้อมูลสถิติจากกระทรวงพาณิชย์รายงานว่าปี พ.ศ. 2563-2567 ประเทศไทยผลิตไข่ไก่ออกสู่ตลาดปีละประมาณ 15,000 ล้านฟอง ซึ่งมาจากการเลี้ยงแบบขังกรง แบบปล่อยในโรงเรือน และแบบปล่อยอิสระ นอกจากนี้ ตลาดไข่ไก่ยังแบ่งได้เป็นอีก 2 กลุ่ม คือกลุ่มผลิตภัณฑ์มาตรฐานและกลุ่มผลิตภัณฑ์พิเศษ เช่น ไข่ที่ได้จากการเลี้ยงแบบอินทรีย์ (organic farming) หรือการเลี้ยงแบบปล่อยอิสระ (free-range farming) เป็นต้น (กัญญาณัฐ กิตติวงศ์ และ กรรณิกา แซ่ลิว, 2562) อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยมากมายที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตของอุตสาหกรรมสัตว์ปีก ไม่ว่าจะเป็นปัญหาโรคระบาด การขาดแคลนวัตถุดิบอาหาร และสภาวะอากาศที่แปรปรวน เป็นต้น ซึ่งความร้อนนับเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกอย่างมีนัยสำคัญโดยส่งผลเชิงลบต่อสุขภาพและผลผลิตของสัตว์ปีก (Oluwagbenga and Fraley, 2023) ความร้อนทำให้ไก่เกิดภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน (heat stress) ทำให้ประสิทธิภาพการวางไข่ การอยากอาหาร และสภาวะภูมิคุ้มกันลดลง นอกจากนี้ความเครียดจากความร้อนยังส่งผลให้แม่ไก่ไข่จิกชนตัวเองทำให้มีพฤติกรรมและสรีรวิทยาที่ไม่ดี เกิดติดโรคระบาดได้ง่ายและมีอัตราการตายที่สูง อุตสาหกรรมไก่ไข่ไม่มีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการรักษาและรวมถึงส่งเสริมการเจริญเพื่อบรรเทาปัญหาจากภาวะดังกล่าว แต่อาจเกิดผลที่ตามมาคือมีการตกค้างของสารเคมีและยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภค อีกทั้งในระยะยาวเกิดปัญหาเชื้อโรคดื้อยาและยากต่อการรักษา ทำให้ปัจจุบันหลายประเทศมีมาตรการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในปศุสัตว์อันเนื่องมาจากกังวลเรื่องสารตกค้างดังกล่าวจึงมีการส่งเสริมการใช้สารอื่นเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ (Kim and Lee, 2023) การเสริมอาหารสัตว์ด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิต (viable probiotics) แทนการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกหนึ่งที่แพร่หลายและได้รับการยอมรับ โดยโพรไบโอติกสามารถส่งเสริมให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ลดการติดเชื้อก่อโรค ส่งเสริมภูมิคุ้มกัน ปรับปรุงสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ เพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ย่อยอาหาร ส่งเสริมการเสริมสุขภาพให้แก่สัตว์ เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids; SCFAs) เอนไซม์ และวิตามิน เป็นต้น และลดอัตราการตาย (Kim et al., 2024) ในกรณีการเลี้ยงไก่ไข่ พบว่าโพรไบโอติกช่วยปรับปรุงการผลิตไข่ น้ำหนักไข่ มวลไข่ และอัตราการแลกเนื้อ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและไนโตรเจน และสามารถลดความเครียดจากอากาศร้อนได้ (Sobczak and Kozłowski, 2015; Mangan and Siwek, 2024) ในส่วนของประเทศไทยนั้น กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกประกาศลงวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ.2559 กำหนดให้แบคทีเรียและฟังไจจำนวน 48 ชนิดสามารถใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ที่เรียกว่า “สารเสริมชีวณะ” ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ สกุล (genus) *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. นอกจากนี้ มาตรฐานของการเลี้ยงปศุสัตว์อินทรีย์ยังอนุญาตให้ใช้โพรไบโอติกเป็นสารเสริมโภชนะในการเลี้ยงสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพได้ (มกษ.9000 เล่ม 2-2561, สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ)

กรดแกมมา-อะมิโนบิวทิริก (γ -aminobutyric acid) หรือที่เรียกว่าสารกาบ้า (GABA) เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ใช่องค์ประกอบในโครงสร้างโปรตีน ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลางและเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทบางชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าไม่เพียงแต่ควบคุมการตอบสนองทางพฤติกรรมและสรีรวิทยาต่างๆ แต่ยังมีประโยชน์ต่อประสิทธิภาพของลูกไก่ ด้วยการบรรเทาผลกระทบเชิงลบของความเครียดจากความร้อนและมีรายงานว่า การเสริมอาหารและน้ำด้วยกาบ้าช่วยลดผลกระทบจากปัญหาดังกล่าวในไก่ไข่ ทั้งยังช่วยปรับปรุงผลผลิตและคุณภาพของไข่ไก่และดัชนีบ่งชี้สุขภาพอื่นๆ เช่น ระดับไขมันในเลือดและภาวะภูมิคุ้มกันของไก่ได้ (Park and Kim, 2015; Elkomy et al., 2020; Zhang et al., 2012) แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดนอกจากมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกแล้วยังสามารถผลิตสารกาบ้าได้ เช่น *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilacobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactocaseibacillus paracasei* และ *Lactiplantibacillus plantarum* (Devi et al., 2023) แบคทีเรียเหล่านี้จึงอาจเป็นเครื่องมือสำคัญที่ปลอดภัยในการบรรเทาปัญหาความเครียดจากความร้อนในปศุสัตว์ได้ จึงเกิดเป็นประเด็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการคัดเลือกโพรไบโอติกที่จำเพาะต่อไก่ไข่และเป็นชนิดที่สามารถผลิตสารกาบ้าได้ เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อยอดเป็นสารเสริมชีวนะส่งเสริมสุขภาพและเพิ่มผลผลิตไก่ไข่ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยที่เผชิญกับปัญหาสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง งานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารของไก่ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและสามารถผลิตสารกาบ้าได้ และทดสอบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกดังกล่าวภายหลังการขึ้นรูปเป็นผงผลิตภัณฑ์เพื่อการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับสัตว์ปีกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงไก่ไข่ในอนาคต รองรับระบบการเลี้ยงไก่ทั้งแบบอินทรีย์และทั่วไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารกาบ้าและมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารไก่ไข่
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตชีวมวลของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก
3. เพื่อคัดเลือกสารสื่อที่เหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกแบบแช่เยือกแข็ง
4. เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาของผงชีวมวลโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รวบรวมแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบ้าและมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกสำหรับการใช้ประโยชน์ในปศุสัตว์ต่อไป
2. ได้ข้อมูลคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากระบบทางเดินอาหารไก่ไข่แต่ละสายพันธุ์
3. ได้ต้นแบบกระบวนการผลิตผงหั่วเชื้อโพรไบโอติกสำหรับใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบแต่งในอาหารสัตว์ปีกต่อไป
4. ได้ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อโพรไบโอติกที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไก่ไข่
5. ได้นำผลงานวิจัยนำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าในเชิงพาณิชย์และยังส่งเสริมการพัฒนานวัตกรรมจากผลงานวิจัยเพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศ

บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

1. ไก่ไข่ (laying hens) (กรมปศุสัตว์, 2559)

ในอดีตการเลี้ยงไก่ไข่ในประเทศไทย มีการเลี้ยงในครัวเรือนเพื่อการบริโภคไข่ ปัจจุบันไก่ไข่ถือว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรได้อย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี และไข่ยังคงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค และยังคงเป็นที่ต้องการของตลาดทั่วประเทศ

1.1 ระบบการเลี้ยงไก่ไข่

1.1.1 การเลี้ยงไก่ไข่แบบขังกรง

ระบบการเลี้ยงไก่ไข่ในโรงเรือนตรงตลอดเวลาในพื้นที่จำกัดการเลี้ยงไก่ในไก่ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระ หรือได้แสดงพฤติกรรมตามธรรมชาติได้ เช่น การคลุกฝุ่น การคุ้ยเขี่ย การไชร่ปีกและการไข่ในรังปัจจุบันได้มีการพัฒนาให้เหมาะสมมีความสะดวกในการจัดการ โดยกรงจะต้องมีความสูงเพียงพอที่ไก่จะยืนแล้วรู้สึกสบายไม่อึดอัด โดยทั่วไปความสูงของกรงจะมีความสูงประมาณ 14-16 นิ้ว (31-41 เซนติเมตร) ความกว้างและความลึกของกรงขึ้นกับความเหมาะสม การเลี้ยงไก่ไข่แบบขังกรงเป็นอุตสาหกรรมในปัจจุบันนิยมเลี้ยง

1.1.2 การเลี้ยงไก่ไข่แบบปล่อยอิสระ

ระบบการเลี้ยงไก่ไข่โดยปล่อยให้ไก่สามารถออกนอกโรงเรือนได้อย่างอิสระ เป็นระบบการจัดการเลี้ยงไก่ที่ปล่อยให้ไก่ได้เจริญอย่างอิสระ โดยเป็นพื้นที่ที่มีหญ้าปกคลุม 5 ตารางเมตร/ไก่ไข่ 1 ตัว ส่วนพื้นที่ในโรงเรือน 1 ตารางเมตร/ไก่ไข่ 4 ตัว ทำให้ไก่ได้แสดงพฤติกรรมตามธรรมชาติ เช่น การคลุกฝุ่น การไชร่ขน การจิกกินพืช ผัก แมลง ทำให้ไก่มีความสุขอารมณ์ดี จึงเรียกว่า “Happy Chicken” คล้องกับมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ มีเหตุผลทางวิทยาศาสตร์และการปฏิบัติจริงของเกษตรกรในฟาร์มสนับสนุน คือ การเลี้ยงไก่แบบปล่อยทำให้ไก่มีความเป็นอยู่อย่างธรรมชาติ ร่วมกับการจัดการสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยที่ดีทำให้ไก่ไม่เครียด มีความสุข มีภูมิคุ้มกันโรค มีผลทำให้สุขภาพแข็งแรง ความจำเป็นที่ต้องใช้ยาป้องกันหรือรักษาจึงไม่มี ดังนั้นควรใช้ระบบมาตรฐานการเลี้ยงไก่อินทรีย์มาประยุกต์ใช้



ภาพที่ 1 การเลี้ยงไก่ในระบบขังกรง
ที่มา: กรมปศุสัตว์ (2559)

1.2 อาหารและการให้อาหารไก่ไข่

1.2.1 อาหารไก่ไข่

อาหารเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดที่จะทำให้การเลี้ยงไก่ไข่มีกำไร หรือขาดทุนเนื่องจากต้นทุนการผลิตประมาณร้อยละ 60-70 ของต้นทุนทั้งหมดเป็นค่าอาหารไก่ไข่นั้นนอกจากจะต้องการอาหารเพื่อการดำรงชีพการเจริญเติบโตแล้วยังต้องนำไปใช้ในการผลิตไข่อีกด้วย การที่ผู้เลี้ยงจะลดต้นทุนการผลิตในส่วนของคุณค่าอาหารลงนั้นสามารถทำได้โดยการประกอบสูตรอาหารที่มีราคาถูกแต่คุณภาพดีเลือกใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีราคาถูกตามฤดูกาลและให้อาหารแก่ไก่กินอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้ไข่ที่มีคุณภาพ และต้นทุนค่าการที่ไก่จะเจริญเติบโตได้ดีมีความแข็งแรงและให้ไข่มากจำเป็นจะต้องได้กินอาหารที่เพียงพอ และกินอาหารได้ดีสม่ำเสมอทุกวันโดยทั่วไปอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ไข่จะประกอบด้วยสารอาหาร 6 ประเภท ดังต่อไปนี้

- (1) โปรตีน: เป็นสารประกอบที่สำคัญต่อการเลี้ยงสัตว์ทุกชนิด ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารอาหารที่ช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย และช่วยในการสร้างและซ่อมแซมรักษาส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ขน เล็บ หนัง กระดูก อวัยวะภายในต่าง ๆ ของเม็ดเลือดแดงและเป็นส่วนประกอบของผลผลิต เช่น ไข่ รวมทั้งยังนำไปใช้ในการสร้างเนื้ออีกด้วยโดยปกติแล้วอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ไข่จะประกอบด้วยโปรตีนประมาณร้อยละ 13-19 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของไก่
- (2) คาร์โบไฮเดรต: เป็นสารอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาล มีหน้าที่ให้พลังงานให้ความอบอุ่น และช่วยให้ไก่อ้วน คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งในการให้พลังงานแก่ร่างกายเพื่อนำไปใช้ในการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ เพื่อการดำรงชีพการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิต เช่น ไข่ ฯลฯ

คาร์โบไฮเดรตถือเป็นอาหารหลัก เพราะเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารไก่ไข่ประมาณร้อยละ 38-61 ขึ้นอยู่กับอายุไก่ คาร์โบไฮเดรตแบ่งเป็น 2 พวกตามลักษณะความยากง่ายในการย่อย คือ น้ำตาลและแป้งกับเยื่อใย แหล่งคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ได้มาจากพืช

- (3) น้ำ: เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของร่างกายไก่ ร่างกายของไก่มีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 60- 70 ลูกไก่อายุ 1 วัน มีน้ำเป็นองค์ประกอบร้อยละ 85 และจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น น้ำมีหน้าที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น ช่วยในการย่อยอาหาร การดูดซึม การรักษาระดับความร้อนปกติในร่างกายและช่วยในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกาย น้ำนับว่าเป็นสารอาหารที่จำเป็นและมีความสำคัญที่สุดเพราะถ้าไก่ขาดน้ำจะทำให้ไก่ไม่ยอมกินอาหารและอาจถึงตายได้ ดังนั้นเกษตรกรจะต้องหาภาชนะใส่น้ำจัดสะอาดตั้งไว้ให้ไก่กินตลอดเวลา หากไก่ขาดน้ำจะกระแสร้นและการสูญเสียน้ำเพียงร้อยละ 10 ของร่างกายไก่สามารถตายได้
- (4) ไขมัน: เป็นแหล่งให้พลังงานแก่ร่างกายเช่นเดียวกับคาร์โบไฮเดรต แต่ไขมันให้พลังงานมากกว่าประมาณ 2 เท่า และยังให้กรดไขมันบางชนิดที่จำเป็นสำหรับร่างกายให้ความอบอุ่น ทำให้อ้วนและช่วยเพิ่มความอยากอาหาร ไขมันเป็นสารอาหารที่จะได้จากไขมันสัตว์และน้ำมันพืช หากปริมาณไขมันมากเกินไปจะทำให้ไก่ถ่ายเหลวหรือท้องเสีย ทำให้พื้นเปียกแฉะ วัสดุรองพื้นจะเสียเร็ว
- (5) วิตามิน: วิตามินเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของไก่ ช่วยสร้างความแข็งแรงและความกระปรี้กระเปร่าต่อการดำรงชีวิตของไก่ ช่วยสร้างความแข็งแรงและความสร้างความต้านทานโรคและบำรุงระบบประสาท แต่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เพื่อให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ ในร่างกายดำเนินไปตามปกติ วิตามินแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามคุณสมบัติในการละลาย คือ วิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามิน เอ ดี อี เค และวิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบี ซี ซึ่งหากไก่ขาดจะทำให้โตช้าและเป็นโรคขาดวิตามินนั้น ๆ
- (6) แร่ธาตุ: เป็นสารอาหารที่ช่วยในการสร้างโครงกระดูก สร้างความเจริญเติบโต สร้างเลือด สร้างเปลือกไข่และอื่น ๆ ร่างกายสัตว์มีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว แร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม คลอรีน เหล็ก กำมะถัน ไอโอดีน ทองแดง โคบอลต์ แมงกานีส และสังกะสี

1.2.2 ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ไข่

- (1) อาหารผสม เป็นอาหารผสมจากวัตถุดิบที่บดละเอียดแล้วหลาย ๆ อย่างคลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยส่วนมากจะเติมยาปฏิชีวนะ วิตามิน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนที่จำเป็น ลงไปด้วยในอาหารนำไปเลี้ยงไก่ได้ทันทีโดยไม่ต้องเสริมอาหารอื่นเพิ่ม
- (2) หัวอาหาร เป็นอาหารเข้มข้นที่ผสมจากวัตถุดิบจำพวกโปรตีนจากพืช สัตว์ ไวตามิน แร่ธาตุ และยาต่าง ๆ ยกเว้นธัญพืชหรือวัตถุดิบบางอย่าง ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมและลดต้นทุนค่าอาหาร แต่ละท้องถิ่นที่มีวัตถุดิบอื่นบางอย่างราคาถูกหรือที่ปลูกเก็บเกี่ยวเอง เช่น ข้าว ฟาง ข้าวโพด เมื่อผสมกับอาหารชั้นตามอัตราส่วนที่กำหนดก็จะได้อาหารสมดุลซึ่งมีโภชนะต่าง ๆ ครบถ้วนตามความต้องการ

- (3) อาหารอัดเม็ด เป็นการนำอาหารผสมสำเร็จรูปที่อยู่ในรูปของอาหารผสมไปผ่านกรรมวิธีการอัดเม็ดขนาดต่าง ๆ ตามอายุของไก่
- (4) อาหารเสริม คืออาหารหรือวัตถุดิบที่เติมไปกับส่วนประกอบต่าง ๆ ที่จะผสมเป็นอาหารใช้เลี้ยงสัตว์เพื่อช่วยเสริมคุณภาพของอาหารนั้น ๆ ให้ดีขึ้นและเป็นอาหารที่สมดุล

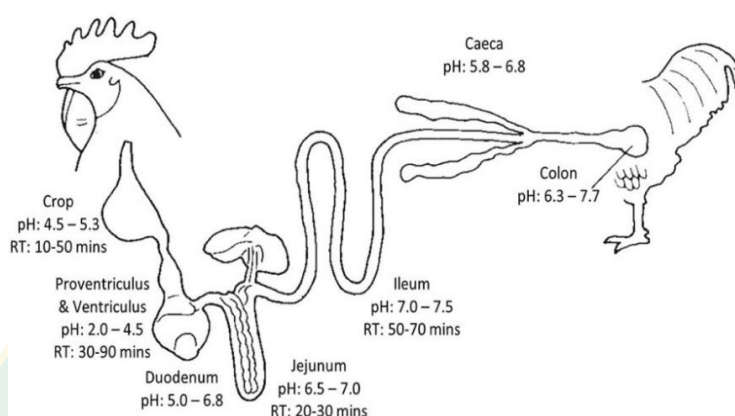
1.3 ระบบทางเดินอาหารไก่

ไก่เป็นสัตว์กระเพาะเดี่ยว (monogastric) ที่เริ่มต้นจากปากไปจนถึงรูทวาร ซึ่งแม้เป็นสัตว์กระเพาะเดี่ยวเช่นเดียวกับสุกรและมนุษย์แต่มีความแตกต่างในอวัยวะหลายจุดดังแสดงในภาพที่ 2 และรายละเอียดต่อไปนี้

- (1) ปาก (mouth) สัตว์ปีกเป็นสัตว์ที่ไม่มีริมฝีปาก ฟัน และกระพุ้งแก้มขึ้นมีลักษณะแข็งเป็นรูปสามเหลี่ยมทำหน้าที่ช่วยในการกลืนอาหาร มีต่อมน้ำลายอยู่บริเวณด้านข้างของปากทำหน้าที่ผลิตน้ำลายซึ่ง มีลักษณะเป็นต่างอ่อน ๆ การเปียกชื้นและอ่อนนุ่ม และเอนไซม์ amylase ทำหน้าที่ในการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาล การย่อยในปากเพียงเล็กน้อยเนื่องจากอาหารจะอยู่ในปากเพียงระยะสั้น
- (2) หลอดอาหาร (esophagus) เป็นท่อน้ำลำเนื้อทำหน้าที่ในการลำเลียงอาหารจากปากไปยังกระเพาะตอนปลายของ หลอดอาหารจะขยายออกเกิดเป็นกระเพาะพัก (crop) ซึ่งมีในสัตว์ปีกเกือบทุกชนิด เป็นที่พักอาหารระยะเวลาอาหารที่อยู่ในกระเพาะพักจะขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร ปริมาณอาหารที่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกระเพาะพักในการเพาพักไม่มีการสร้างเอนไซม์แต่มีเอนไซม์ amylase จากน้ำลายที่จะย่อยแบ่งต่อไป
- (3) กระเพาะอาหาร (stomach) ต่ออยู่ทางด้านหลังของกระเพาะพักเป็นบริเวณที่มีต่อมต่าง ๆ อยู่มากมายจึงเรียกว่า glandular stomach ทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ เปปซิน (pepsin) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มีค่า pH ประมาณ 2
- (4) กระเพาะบด (gizzard) เป็นอวัยวะที่มีผนังหนาและมีกล้ามเนื้อแข็งแรงจึงเรียกว่า muscular stomach ทำหน้าที่บดอาหารแทนการเคี้ยวด้วยฟันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลงในอาหารจะทำให้การบดและการย่อยอาหารมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นบริเวณกระเพาะ
- (5) ลำไส้เล็ก (small intestine) ส่วนที่ไม่มีการหลั่งเอนไซม์เป็นท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะโค้งเป็นห่วง (loop) เรียกว่า duodenal loop เป็นที่กักขังกับตับอ่อน (pancreas) ซึ่งตับอ่อนจะทำหน้าที่ในการผลิตน้ำย่อย (pancreatic juice) เข้าสู่ลำไส้เล็ก
- (6) ไส้ติ่งหรือไส้ตัน (caeca) ปีกเกือบทุกชนิด 2 ชิ้น มีลักษณะเป็นถุงตอนปลายใหญ่กว่าตอนโคนต่อกับอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้ใหญ่ (leocad- rectal junction) เป็นส่วนสุดท้ายสำหรับการย่อยอาหารและการดูดซึมน้ำเป็นบริเวณที่เกิดการย่อยอาหารโดยแบคทีเรียลำไส้ใหญ่ (large intestine) อยู่ต่อจากลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วมมีความยาวเพียงประมาณ 10 เซนติเมตร ในส่วนนี้จะมีการผสมน้ำจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกายทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้งก่อนที่จะขับถ่ายออกจากร่างกาย
- (7) ลำไส้ใหญ่ (large intestine) อยู่ต่อกับลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วมในลำไส้ใหญ่ จะมีขนาดใหญ่กว่าลำไส้เล็กถึง 2 เท่า แต่มีความยาวที่สุุดมากเพียง 10 เซนติเมตร โดยอาหารที่

ย่อยแล้วและอาหารบางส่วนที่ไม่ถูกการย่อยจะเคลื่อนตัวมาเพื่อการขับถ่ายออก นอกจากนี้ จะมีการดูดซึมของน้ำและสารอาหารเข้าสู่ร่างกาย

- (8) ทวารร่วม (cloaca) เป็นส่วนสุดท้ายของระบบทางเดินอาหารจะเปิดเข้าสู่ทวารร่วมเป็นท่อร่วมระหว่าง ระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์



ภาพที่ 2 ระบบทางเดินอาหารไก่

ที่มา: Gabriel et al. (2006)

ระบบทางเดินอาหารของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์มากมาย ไก่ที่มีอายุน้อยมักจะมีจำนวนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก แต่ยังไม่เข้าสู่สภาวะสมดุลในลำไส้จนกระทั่งมีอายุได้ประมาณ 3-6 สัปดาห์ จึงเข้าสู่สภาวะสมดุล การเปลี่ยนแปลงของสภาวะของไก่อายุน้อยจึงมีมากกว่าไก่ที่มีอายุมาก การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมในไก่ ดังตารางที่ 1 มีสภาวะความเป็นกรดและด่าง ทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบสามารถเจริญได้ดีการย่อยอาหาร และการดูดซึมสารอาหาร ดังภาพที่ 2 อย่างช้าๆ ทำให้สารอาหารค้างอยู่ในลำไส้ และผ่านท่อทางเดินอาหาร เกิดการหมักของสารอาหารในท่อทางเดินอาหารมากขึ้น ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีตามมา (เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ, 2546)

ตารางที่ 1 ค่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารไก่

Position	pH
Crop	4.00-6.30
Proventriculus	3.17-4.80
Gizzard	2.5-4.74
Duodenum	5.70-6.00
Jejunum	5.80-5.90
Ileum	6.30-6.40
Rectum	6.30-6.40
Ceca	5.70-8.40
Cloaca	5.40-8.40

ที่มา: รุจา มาลัยพวง (2544)

1.4 ปัญหาของการเลี้ยงไก่

ตั้งแต่ ค.ศ.1920 เป็นต้นมาพบว่า การเลี้ยงไก่ในครัวเรือนเพื่อการบริโภคไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคในตลาด จึงมีการเลี้ยงในรูปแบบอุตสาหกรรมมากขึ้นเช่นการเลี้ยงแบบกรงตับ แต่ต่อมาในช่วงตั้งแต่ ค.ศ. 1960 ได้มีการปรับปรุงระบบการเลี้ยง เนื่องจากการเลี้ยงไก่จำนวนมากในระบบกรงขัง ส่งผลเสียต่อเสรีภาพและสวัสดิภาพของไก่ในการเคลื่อนที่ พักผ่อน เล็มขน และยืดขา กลายเป็นประเด็นสาธารณะหลังจากมีการตีพิมพ์ในหนังสือ Animal Machines โดย Ruth Harrison โดยเน้นย้ำเสรีภาพของสัตว์ทั้ง 5 ประการ (Webster, 2001)

- 1) ความหิวและการกระหายน้ำโดยให้มือน้ำสะอาดตลอด 20 ชั่วโมงต่อวันและมีอัตราส่วนที่มีคุณภาพหรือสมดุลเพื่อรักษาสุขภาพและควมมีชีวิตชีวา
- 2) จัดให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและสบายตัว
- 3) ป้องกันหรือการวินิจฉัยความเจ็บปวด การบาดเจ็บ และโรค โดยรักษาอย่างรวดเร็ว
- 4) มีระยะห่างเพียงพอ วัสดุหรืออุปกรณ์ที่เหมาะสม ต่อเสรีภาพในการแสดงพฤติกรรม
- 5) จัดการสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมไม่ก่อให้เกิดความเครียด

ส่งผลให้มีการนำระบบการเลี้ยงแบบทางเลือกมาใช้ กฎหมายสิทธิสัตว์และการคุ้มครองสัตว์ ได้รับการทบทวน และภาคเกษตรกรรมต้องปฏิบัติตามกฎหมายเหล่านี้เนื่องจากแรงกดดันจากสาธารณชน ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1970 ถึง 1990 ด้วยความช่วยเหลือจากรัฐบาลแห่งชาติและกลุ่มสวัสดิภาพสัตว์บางกลุ่ม ความสนใจส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่ระบบทางเลือกแทนกรง ซึ่งรวมถึงการใช้วัสดุรองพื้นหนา คอกฟาง และการเลี้ยงแบบปล่อยอิสระ ในปี ค.ศ. 2012 จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการเลี้ยงไก่ไข่และระบบการเลี้ยงแบบใหม่จำนวนมาก ระบบการผลิตสำหรับไก่ไข่ถูกกำหนดให้เป็นระบบแบบไม่ใช้กรงและระบบเสริมสารอาหารโดยสหภาพยุโรป ระบบแบบไม่ใช้กรงในหลายส่วนของโลก (Mench et al., 2011) ระบบกรงแบบธรรมดาเป็นระบบโรงเรือนเชิงพาณิชย์ที่ใช้กันมากที่สุดในโลกสำหรับการผลิตไข่เนื่องจากมีประสิทธิภาพทางเศรษฐกิจ มีการระบุว่าไก่ไข่มากกว่าร้อยละ 95 ถูกเลี้ยงไว้ในกรงไก่แบบแบตเตอรี่ในประเทศนอกสหภาพยุโรป การประเมินสวัสดิการในระบบการผลิตไข่ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาอย่างต่อเนื่องเนื่องจากไม่ใช้กระบวนการที่ง่ายและต้องพิจารณาปัจจัยหลายประการ ตัวอย่างของการพัฒนาล่าสุดดังกล่าวคือแบบจำลองสวัสดิการสัตว์ปีกระบบคอมพิวเตอร์ วิเคราะห์ระบบการผลิตเป็นปัจจัยนำเข้าและสวัสดิการเป็นผลลัพธ์โต้แย้งว่าระบบการผลิตไข่ทุกระบบมีข้อจำกัดของตัวเองเกี่ยวกับสวัสดิการ และผ่านการคัดเลือกตามลักษณะสวัสดิการ เช่น ความแข็งแรงของกระดูก ขนที่ขึ้นน้อย และการกินเนื้อกันเอง ถือเป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงสวัสดิการของไก่ นอกเหนือจากภูมิหลังทางประวัติศาสตร์โดยย่อข้างต้นของการพัฒนาระบบการผลิตไข่ไก่

ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 สหภาพยุโรปมีการห้ามการเลี้ยงไก่ไข่บนกรงตับ เนื่องจากห่วงใยต่อสวัสดิภาพของสัตว์ และในขณะเดียวกันการเลี้ยงไก่แบบอินทรีย์ที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น และขยายตัวอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะกลุ่มผู้บริโภคที่ห่วงใยต่อสุขภาพของตนเองและมีรายได้มากพอต่อการซื้อสินค้าเพื่อบริโภค ด้วยเหตุนี้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เรียกว่า โปรไบโอติก เป็นเทคนิคการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ซึ่งเป็นกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ผนวกกับความรู้ทางด้านของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ การคัดสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อคัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เพื่อ

นำมาผสมอาหารหรือน้ำให้สัตว์กินเสริมสร้างสุขภาพโพโรไบโอติก เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์เมื่อสัตว์กินเข้าไปแล้วทำให้ปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ และต้านจุลินทรีย์ก่อโรคโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ของลำไส้

1.5 ปัญหาสุขภาพของสัตว์ปีก (Tainika and Şekeroğlu, 2020)

ความผิดปกติของกระดูกและกระดูกอกเป็นหนึ่งในปัญหาด้านสวัสดิภาพสัตว์ที่ทราบกันดีซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมไข่ ความผิดปกติเหล่านี้ ได้แก่ กระดูกหัก กระดูกบิดเบี้ยวและคดงอ และกระดูกเปราะบาง

มีการศึกษามากมาย รายงานถึงการเลี้ยงไก่ในกรงตับส่งผลให้กระดูกแข็งและกระดูกต้นแขนเกิดความเสียหายเนื่องจากขาดการออกกำลังกายทำให้สูญเสียแร่ธาตุในกระดูกมากเกินไป กระดูกเป็นปัญหาสุขภาพและสวัสดิภาพสัตว์ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง และการขาดการเคลื่อนไหวหรือกิจกรรมที่ลดลง ไก่ไม่มีกระบังลมและต้องอาศัยการเคลื่อนไหวของกระดูกงูและซี่โครงเพื่อกระบวนหายใจ ดังนั้น ความเสียหายของกระดูกจะส่งผลให้เกิดความเจ็บปวดและการเคลื่อนไหวที่จำกัด ซึ่งส่งผลต่อกลไกการเผาผลาญและการควบคุมอุณหภูมิของไก่โดยทำให้การหายใจบกพร่องสาเหตุหนึ่งเกิดจากการใช้คอนเลี้ยงไก่มากเกินไป รวมถึงการตกจากการลงคอนอย่างไม่เหมาะสมและการชนกับคอน มีการเสนอให้ใช้คอนที่นุ่มเพื่อลดการบาดเจ็บของกระดูก เพื่อป้องกันความเสียหายของกระดูกอก

อัตราการตายถือเป็นตัวบ่งชี้สวัสดิภาพของสัตว์ปีกที่ชัดเจน อัตราการตายที่สูงแสดงให้เห็นถึงสวัสดิภาพที่ไม่ดี มีการระบาดของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและปรสิตและการกินเนื้อกันเองมีสูงในไก่ที่เลี้ยงแบบปล่อยอิสระเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในกรง ใช้พื้นที่ธรรมชาติ ไม่ค่อยรักษาความสะอาด จากเศษอาหารที่ล่วงพื้นและเกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรค การเลี้ยงแบบปล่อยอิสระเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในกรง ระบบเหล่านี้มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดอัตราการตาย เช่น ดิน และอุจจาระซึ่งเป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์ และอย่างที่เราทราบกันดีว่าความหนาแน่นของการเลี้ยงไก่ ทำให้การกินเนื้อกันเองจึงสูงกว่าในระบบกรง ยังส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียบนเปลือก การเลี้ยงไก่ในกรงแบบเตอไรส์และกรงที่มีสารอาหารตกค้าง มีฝุ่นละอองและแบคทีเรียปนเปื้อนในอากาศสูงกว่า ($>5.3 \log \text{ cfu/m}^3$) การเลี้ยงไก่มีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของไก่ เช่น ผลิตภัณฑ์ของเสีย อาหาร วัสดุรองพื้น และดินเป็นแหล่งที่มาหลักของฝุ่นละอองในโรงเรือนสัตว์ปีก นอกจากนี้ ระดับของฝุ่นละอองหรือมลพิษทางอากาศยังเป็นสัดส่วนกับระดับของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในโรงเรือนสัตว์ปีก เนื่องจากฝุ่นละอองเป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถพาเชื้อโรค เช่น แบคทีเรีย รา

น้ำหนักตัวของสัตว์เป็นอีกหนึ่งตัวบ่งชี้เพื่อแสดงว่าสวัสดิภาพและสุขภาพของสัตว์ น้ำหนักตัวที่ต่ำและกระดูกสันนูนที่ยื่นออกมาเป็นบ่งบอกว่าไก่ผอมแห้ง น้ำหนักตัวที่น้อยไม่ได้ตามเป้าหรือมาตรฐานที่กำหนดไว้เมื่ออายุตามเกณฑ์ที่กำหนดมีสุขภาพที่ไม่สมบูรณ์แข็งแรง

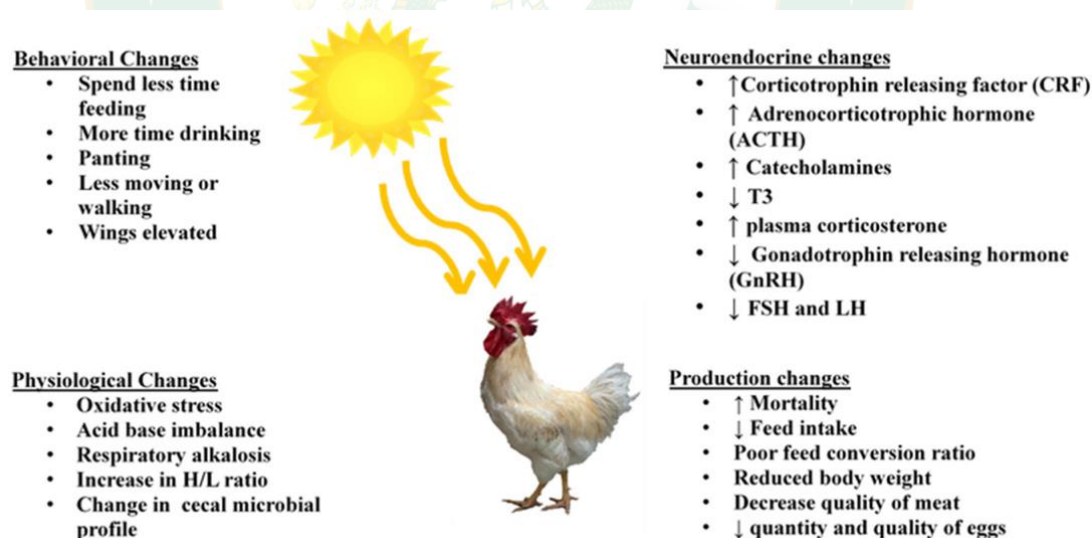
ภาวะขนร่วงแสดงให้เห็นถึงสวัสดิภาพที่ไม่ดีของไก่โดยมีความสำคัญต่อกลไกควบคุมอุณหภูมิของไก่และป้องกันการบาดเจ็บ ตลอดจนเป็นเกราะป้องกันการติดเชื้อบางชนิด โดยทั่วไปแล้วขนที่ปกคลุมดีมีประโยชน์อย่างมากต่อสวัสดิภาพของไก่ตัวเมีย เนื่องจากเมื่อขนร่วง ความร้อนใน

ร่างกายของไก่จะเพิ่มขึ้น และส่งผลให้อัตราการเผาผลาญของไก่เพิ่มขึ้นเพื่อรักษาอุณหภูมิร่างกายในสถานการณ์นี้การบริโภคอาหารจะเพิ่มขึ้นเพื่อให้ไกรักษาระดับพลังงานที่ต้องการได้

การกินเนื้อกันเองและการจิกชนที่มากเกินไปจนได้รับบาดเจ็บ พบได้ในระบบการผลิตไข่ทุกระบบ แม้ว่าการเกิดขึ้นของระบบกรงจะน้อยกว่า ความชุกนั้นสัมพันธ์กับจำนวนไก่ที่เลี้ยงไว้ต่อตารางเมตรหรือขนาดกลุ่ม นอกจากนี้ คุณภาพวัสดุรองพื้นที่ไม่ดียังส่งผลเชิงลบต่อพฤติกรรมการหากินและอาบฝุ่น และทำให้การจิกชนของไก่แต่ละตัวเพิ่มมากขึ้นด้วย ระบบเลี้ยงแบบปล่อยอิสระมีอัตราการจิกผ่านช่องระบายอากาศสูงสุ่มมากกว่าระบบกรงแบบโรงนาและกรงที่มีอุปกรณ์ตกแต่งทั่วไปถึงสองเท่า ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของไก่ในระดับที่สูงและตำแหน่งของคอนที่เพิ่มช่องระบายอากาศ

1.6 ความเครียดจากความร้อน (heat stress)

ความหนาแน่นของการเลี้ยงไก่ไข่ในโรงเรือนส่งผลให้เกิดความร้อนสะสมในโรงเรือนอันเนื่องมาจากการเผาผลาญสารอาหารเพื่อผลิตพลังงานในร่างกายสัตว์และปลดปล่อยความร้อนออกจากร่างกาย ความเครียดจากความร้อนเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก เมื่อปี พ.ศ. 2546 ความเครียดจากความร้อนส่งผลในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 165 ล้านดอลลาร์ (St-Pierre et al., 2003) โดยอุณหภูมิในสิ่งแวดล้อมที่สูงส่งผลอย่างยิ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา ระบบต่อมไร้ท่อ และพฤติกรรมหลายประการ เช่น ความเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ความไม่สมดุลของกรด-ด่าง ภูมิคุ้มกันที่ต่ำลง การผลิตไข่ลดลง ซึ่งนำไปสู่อัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้น (Wasti et al., 2020) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลของความเครียดจากความร้อนต่อลักษณะพฤติกรรม สรีรวิทยา ระบบประสาทต่อมไร้ท่อ และลักษณะการผลิตของไก่ไข่

ที่มา : Wasti et al. (2020)

ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในสัตว์ปีกทำให้เสียหายทางชีวภาพ ความผิดปกติ อัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง และส่งผลเสียทางเศรษฐกิจ อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และเปอร์ออกไซด์ มักถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ แต่เป็นสาเหตุของภาวะความเครียดออกซิเดชัน ซึ่งความเครียดจากความร้อนส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะความเครียดออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากการสะสมของ ROS สร้างความเสียหายให้กับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก

ความร้อนที่สูงส่งผลต่อความไม่สมดุลของกรด-เบสในร่างกายไก่ ซึ่งไก่ไม่มีต่อมเหงื่อ และมีขนทั่วทั้งตัวทำให้กลไกระบายความร้อนทำงานอยู่ตลอดเวลา เมื่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น การหายใจหอบจึงเป็นอีกหนึ่งของกลไกการระบายความร้อน ขณะหายใจหอบการขับ CO_2 เกิดขึ้นในอัตราที่มากกว่าการผลิต CO_2 ของเซลล์ ซึ่งทำให้ระบบบัฟเฟอร์ไบคาร์บอเนตมาตรฐานในเลือดเปลี่ยนแปลงไป การลดลงของ CO_2 ส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) และไฮออนไฮโดรเจน (H^+) ลดลง ในทางตรงกันข้าม ความเข้มข้นของไฮออนไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) จะเพิ่มขึ้น ดังนั้น ค่า pH ของเลือดจึงสูงขึ้น กลายเป็นสภาวะต่าง กลไกการรักษาสมดุลค่า pH ของเลือดจะเริ่มขับถ่าย HCO_3^- มากขึ้นและกักเก็บ H^+ จากไตระดับ H^+ ที่สูงขึ้นทำให้สมดุลกรด-เบสเปลี่ยนไป ส่งผลให้เกิดภาวะต่างในเลือดสูงในระบบทางเดินหายใจและกรดเกินในเลือดจากการเผาผลาญ

ภูมิคุ้มกันของไก่ที่ลดลงเป็นผลจากความเครียดจากความร้อนเช่นกัน ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ ที่ตามมา เช่น โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease :ND) โรคกัมโบรู (Gumboro) ที่ระบาดมากขึ้นในช่วงฤดูร้อน (Badruzzaman et al., 2015) ทั้งนี้ความเครียดจากความร้อนยังส่งผลต่อขนาดของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ม้าม ต่อมไทมัส ต่อมน้ำเหลือง ความเครียดจากความร้อนยังส่งผลให้ระดับของแอนติบอดี และจำนวนของเม็ดเลือดขาวทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่อัตราส่วนของเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (heterophil/lymphocyte ratio, H/L) สูงขึ้น

มีการเปลี่ยนแปลงของระบบประสาทต่อมไร้ท่อเมื่อไก่อยู่ในภาวะเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน ระบบต่อมไร้ท่อมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะธำรงดุล (homeostasis) ของร่างกายและสรีรวิทยาในร่างกายสัตว์ปีก การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิกระตุ้นการทำงานของระบบ (sympathoadrenal medullary system, SAM) ซึ่งเป็นระบบที่เชื่อมโยงระหว่างระบบประสาทซิมพาเทติกและต่อมหมวกไตส่วนใน โดยส่งแรงกระตุ้นไปยังต่อมหมวกไตส่วนเมดัลลาให้เพิ่มการผลิตคาเทโคลามีน (Catecholamine) ซึ่งทำให้มีการหลั่งกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น ลดไกลโคเจนในตับและกล้ามเนื้อ เพิ่มอัตราการหายใจ ขยายหลอดเลือดส่วนปลาย และเพิ่มความไวของระบบประสาทเพื่อรับมือกับความเครียด เมื่อความเครียดคงอยู่เป็นเวลานานขึ้น แกนไฮโปทาลามัส-ต่อมใต้สมอง-ต่อมหมวกไต (HPA) จะถูกกระตุ้นในการตอบสนองต่อความเครียดฮอร์โมนที่หลั่งออกมาเพื่อกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโทรฟิน (CRH) จากไฮโปทาลามัส ซึ่งจะกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโทรฟิก (ACTH) ฮอร์โมนนี้จะเพิ่มการผลิตและการปล่อยคอร์ติโคสเตียรอยด์ (Corticosteroid) โดยต่อมหมวกไต คอร์ติโคสเตียรอยด์กระตุ้นการสร้างกลูโคสใหม่เพื่อเพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมา ฮอร์โมนไทรอยด์ ไทรไธโรไอโดไทโรนีน (T_3) และไทรอกซิน (T_4) ซึ่งหลั่งออกมาจากต่อมไทรอยด์ ยังมีบทบาทสำคัญในการรักษาอัตราการเผาผลาญ การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็น

เห็นว่าความเข้มข้นของ T3 ลดลงในสัตว์ปีกที่เครียดจากความร้อน นอกจากนี้ ยังพบว่าการหลั่งฮอร์โมนที่ปลดปล่อยโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin) ลดลง

ไถ่มีการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมเมื่ออุณหภูมิแวดล้อมสูงขึ้น ร่างกายของสัตว์ปีกจะพยายามระบายความร้อนส่วนเกินในร่างกาย ซึ่งแสดงออกมาทางพฤติกรรมของสัตว์ปีก ซึ่งจะเดินและยืนใช้เวลานี้น้อยลง กินอาหารและดื่มน้ำน้อยลง และมีอาหารหอบหืดที่มากขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา ระบบประสาทต่อมไร้ท่อ และพฤติกรรมที่สำคัญเหล่านี้ส่งผลให้อัตราการตายเพิ่มขึ้น การกินอาหารลดลง น้ำหนักตัวสุดท้ายลดลง คุณภาพของเนื้อและไข่ลดลง ดังนั้น ความเครียดจากความร้อนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกที่ต้องเร่งแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันที่โลกเผชิญกับปัญหาภาวะโลกร้อนเพิ่มอีกด้วย

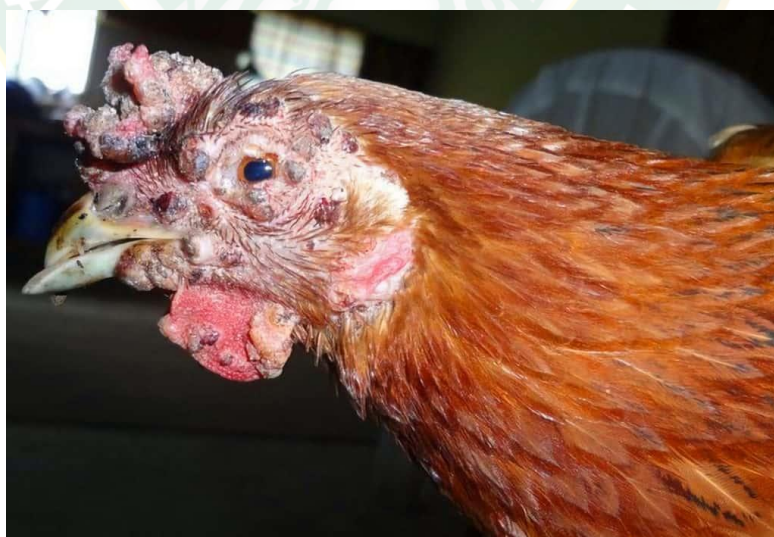
1.7 โรคสำคัญในสัตว์ปีก (ประภากร ธาราฉาย, 2560)

โรค (diseases) หมายถึง ภาวะที่ร่างกายไม่สามารถทำงานได้เป็นปกติ อาจเกิดจากเชื้อโรคต่างๆ ทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจในสัตว์ปีกได้ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราหลากหลายชนิด ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอาจเพิ่มจำนวนเชื้อโรคเหล่านี้จนทำให้เกิด การเจ็บป่วย การได้รับอุบัติเหตุ การผิดปกติของร่างกายและจิตใจ รวมทั้งอาการที่เกิดจากสภาพดังกล่าวด้วย ภาวะที่ทำให้สภาพร่างกายของสัตว์ปีกเจ็บป่วย หรือผิดไปจากปกติเช่น ไม่กิน อาหาร การเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตไข่ลดลง ถ้าป่วยมากอาจถึงขั้นตายได้ โดยโรคที่มักพบในสัตว์ปีก ยกตัวอย่างเช่น

1. โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease; ND) เกิดจากเชื้อพารามิกโซไวรัส (Paramyxovirus type 1) ซึ่งแบ่งตามความรุนแรงและกลุ่มอาการที่แสดงออกได้ 5 ชนิด ดังนี้
 - (1) ชนิดรุนแรงมากและแสดงอาการที่ลำไส้ (Viscerotropic velogenic virus) เป็นชนิดที่แสดงอาการรุนแรงมากโดยแสดงอาการมีจุดเลือดออกที่บริเวณลำไส้ให้เห็น
 - (2) ชนิดรุนแรงมากและแสดงอาการทางระบบประสาท (Neurotropic velogenic virus) เป็นชนิดที่แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบประสาทร่วมกับโรคนิวคาสเซิลที่เกิดจากเชื้อสเตรนนี้จะม้อัตราการตายสูงมาก
 - (3) ชนิดรุนแรงปานกลาง (Mesogenic virus) เป็นชนิดที่แสดงอาการกับระบบทางเดินหายใจและอาจมีอาการทางประสาทร่วมด้วยแต่จะมีอัตราการตาย
 - (4) ชนิดไม่รุนแรง และแสดงอาการกับระบบทางเดินหายใจ (Lentogenic respiratory virus) เป็นชนิดที่แสดงอาการกับระบบทางเดินหายใจเพียงเล็กน้อยหรือไม่แสดงอาการให้เห็นชัดเจนนัก
 - (5) ชนิดไม่รุนแรง และแสดงอาการกับระบบทางเดินอาหาร (Asymptomatic enteric virus) เป็นชนิดที่เกิดกับระบบทางเดินอาหารแต่ไม่แสดงอาการให้เห็นเด่นชัดนัก โดยทั่วไปโรคนิวคาสเซิลสามารถเป็นได้กับสัตว์ปีกทุกชนิด แต่พบว่าจะไม่ค่อยแสดงอาการให้เห็นเด่นชัดนักในสัตว์ปีกจำพวกเป็ดและห่านแต่จะแสดงอาการเด่นชัดและรุนแรงมากถ้าเกิดกับสัตว์ปีกจำพวกไก่
- 2.) โรคหลอดลมอักเสบติดต่อกัน (Infectious bronchitis; IB) เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนา (Coronavirus) ที่อยู่ใน Family Coronaviridae การติดต่อกันนี้ติดต่อกันได้ทางอากาศไก่อป่วยเป็น

พาหะและโดยมีสิ่งนำพาอื่น ๆ ระยะฟักตัว ประมาณ 18 – 36 ชั่วโมง เมื่อไก่ป่วยเป็นโรคนี้ จะหายใจลำบาก มีเสียงดังครืดคราดในหลอดลม น้ำมูกไหล ไก่จะอ้าปาก ไอ หายใจถี่ๆ บางครั้งมีน้ำตาไหล ไก่ไม่แสดงอาการทางระบบประสาทเหมือนโรคนิวคาสเซิล ในกรณีที่เกิดกับไก่ในระยะกอาจทำให้อัตราการตายสูงถึงร้อยละ 30 ของฝูง ถ้าเป็นในไก่ไข่ทำให้ผลผลิตไข่ลดลง ขนาดไข่เล็กลง มีรูปร่างผิดปกติ เปลือกไข่บางขรุขระและแตกง่าย คุณภาพภายในฟองไข่เลวลง ไข่ขาวเหลวเป็นน้ำ

- 3.) โรคกล่องเสียงอักเสบติดต่อ (Infectious laryngotracheitis; ILT) เกิดจากเชื้อเฮอร์เปสไวรัส (Herpes virus) Family Herpesviridae, Subfamily Alpha herpesvirinae มีเพียงซีโรไทป์เดียวคือ Gallid herpesvirus การติดต่อไก่ที่เป็นโรคเป็นพาหะนำโรค ซึ่งแพร่กระจายทางอากาศ และมีสิ่งนำพาอื่นๆ ระยะฟักตัว ประมาณ 6 – 12 วัน ไก่ที่เป็นโรคนี้จะมีอาการ ไอ จาม หายใจลำบาก ยึดคอเวลาหายใจ บางครั้งหายใจมี เสียงดัง มีเสมหะปนออกมาเวลาไ้สะบัดหัว ไก่ไข้ลด และบางครั้งอาจมีน้ำตาไหล
- 4.) โรคฝีดาษ (Fowl pox) เกิดจากเชื้อไวรัส *borrelia avium* เป็นเชื้ออยู่ใน Genus avipox, Family Poxviridae การติดต่อจากการสัมผัสโดยตรงกับไก่ป่วย และมีเยื่อเป็นพาหะที่สำคัญไ้มักเป็นโรคนี้บริเวณที่ ยุงกัด เช่น หงอน เหนียง หน้า รอบตา รุงมูก ขา นิ้ว และหน้าแข้ง ฯลฯ ไม่มีการรักษาโดยตรงอาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอาการ
 - (1) ชนิดแห้ง (Dry pox) ไก่ป่วยจะหงอย ซึม ไม่กินอาหาร มีเม็ดตุ่มคล้ายหูดเกิดขึ้นที่ผิวหนัง
 - (2) ชนิดเปียก (Wet pox) เกิดบริเวณพื้นผิวหนังเยื่อที่เปียกชุ่ม เช่น ในปาก ลิ้น คอ หลอดอาหาร กระเพาะพัก ถุงลม ภายในลำไส้เล็ก บริเวณขอบตา ฯลฯ



ภาพที่ 4 โรคฝีดาษไก่แบบแห้ง

ที่มา : <https://bukoolavet.com/fowl-pox/>

5. โรคมาร์เร็กซ์(Marek's disease) เกิดจากเชื้อไวรัสเฮอร์ปี (Lymphotropic herpes virus) มี 3 ซีโรไทป์ เชื้อไวรัสจะหลุดออกมาพร้อมกับแผ่นสะเก็ดจากผิวหนังไก่ป่วย ไก่ตัวอื่นติดโรคจากการหายใจเอาสะเก็ดนี้เข้าไป เมื่อไก่ป่วยจะแสดงอาการในระยะแรกๆ คล้ายกับไก่ขาอ่อนขึ้นต่อไปอาจถึงอัมพาตเดินไม่ได้และมีอาการปิกตก หางตก กล้ามเนื้อคอบิดเบี้ยว รุขุมขนขยายใหญ่ นัยน์ตามีสีเทา ไม่มีวิธีรักษา การป้องกัน ทำวัคซีนป้องกันโรคมาร์เร็กซ์เมื่ออายุ 1 วัน เพียงครั้งเดียว ทำความสะอาดโรงเรือน เพื่อไม่ให้มีเชื้อตกค้างอยู่



ภาพที่ 5 ตุ่มขนที่ผิวหนังของไก่ที่ติดเชื้อไวรัสโรคมาร์เร็กซ์เป็นปมูนูน
ที่มา : procurement (2563)

6. โรคคอหิวด์สัตว์ปีก (Fowl cholera) สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pasteurella multocida* การติดต่อโรคนี้ติดต่อได้จากการสัมผัสมูลน้ำมูกของสัตว์ป่วยโดยตรงหรืออาจติดต่อโดยทางน้ำ และอาหาร ระยะฟักตัว ประมาณ 2 – 9 วัน อาการไก่ที่ป่วยจะแสดงอาการท้องร่วง ถ่ายมูลสีเขียวหรือเหลือง ไก่มีอาการหอบและเหนื่อย อ่อน มีน้ำมูก ขนยุ่ง ในรายที่ป่วยเรื้อรัง อาจมีอาการบวมที่เหนียง ในกรณีที่เป็นอย่างเฉียบพลันไก่ป่วย มักตายอย่างกะทันหัน
7. โรคบิด (Coccidiosis) สาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัว ไอเมอเรีย ซึ่งมีถึง 8 ชนิด คือ
 - (1) *Eimeria acervulina* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้นโดยจะมองเห็นแถบขาวตามขวางลำไส้ ซึ่งเกิดจาก oocyte ผนังลำไส้หนาขึ้น
 - (2) *Eimeria tenella* เกิดโรคที่ลำไส้ต้นโดยจะเกิดเป็นจุดเลือดออกผนังลำไส้หนาขึ้น เยื่อเมือกเป็นสีขาวและมีลิ้มเลือดติดอยู่
 - (3) *Eimeria necatrix* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนกลางทำให้เกิดลำไส้โป่งพองมีจุดสีขาว มีเยื่อเมือกและเลือดปนกับเนื้อตายและเกิดการตกเลือด
 - (4) *Eimeria maxima* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนกลางโดยทำให้ผนังลำไส้หนาขึ้น มีเยื่อหรือเมือกปนเลือดและมีเนื้อตาย

- (5) *Eimeria brunetti* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนปลายไปจนถึงลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดเนื้อตาย มีเลือดออกและลำไส้อักเสบ
- (6) *Eimeria praecox* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้น รอยโรคไม่แสดงอาการชัดเจนนัก เยื่อเมือกหลุดลอก
- (7) *Eimeria mitis* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้น ไม่แสดงรอยโรคให้เห็น หรืออาจจะมีเยื่อหรือเมือกหลุดลอก การติดต่อทางมูลโดยเชื้อแพร่กระจายไปตามพื้นวัสดุรองพื้นหรือติดไปกับรองเท้าผู้เลี้ยง ระยะฟักตัว ประมาณ 4 – 6 วัน อาการ ไก่ที่ป่วยเป็นโรคบิดจะกินอาหารน้อยลง แต่กินน้ำมากขึ้น หงอยซึม ขนยุ่ง ปีกตก ท้องร่วง มีเลือดปนออกมาในอุจจาระ โดยมักจะเห็นเป็นสีแดง น้ำตาล หรือแดงเข้ม



ภาพที่ 6 โรคบิดในไก่

ที่มา : อรชร แก้วช่วย (2565)

การระบาดของเชื้อโรคของสัตว์ปีก เช่น โรคนิวคาสเซิล ND โรคไข้หวัดนก avian influenza และโรคติดเชื้อซัลโมเนลลา (Salmonellosis) ส่งผลต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีก จึงมีการใช้วัคซีนเพื่อรักษาโรคระบาดของสัตว์ปีก และมีวัคซีนจำนวนมากที่ได้รับอนุญาตให้ใช้สำหรับโรคสัตว์ปีกที่เกิดจากไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต อย่างไรก็ตาม วัคซีนเหล่านี้อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้ ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีนำไปสู่การศึกษาพัฒนาวัคซีน และสารเสริมภูมิคุ้มกันใหม่สำหรับใช้ในสัตว์ปีก เช่น การใช้สารเสริมภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ และสารเสริมภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ การกำหนดเป้าหมายแอนติเจนไปยังเซลล์นำเสนอแอนติเจน และการใช้โพรไบโอติก (Bodman-Harris et al., 2024) มีงานวิจัยรายงานว่าโพรไบโอติกสามารถช่วยลดปัญหาของโรคที่กล่าวมา เช่น การใช้จุลินทรีย์ของ *L. acidophilus* สามารถใช้เพื่อปรับปรุงภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล (Gharajalar et al., 2020) และ (Talebi et al., 2015) รายงานว่าการเสริมด้วยไบโอมิน อิมโบ (Biomin Imbo) ในอาหารช่วยเพิ่ม

ภูมิคุ้มกันของโรคของโรค โรคนิวคาสเซิล ND โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ IB และโรคกัมโบโร หรือ เบอร์ซาล์อักเสบติดต่อ IBD ได้อย่างมีนัยสำคัญ ชี้ให้เห็นว่าการใช้อาหารเสริมสามารถช่วยเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของโรคที่เกิดขึ้นในไก่ได้

การใช้โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและยังสามารถลดการก่อโรคที่กล่าวมา ซึ่งปัจจุบันประเทศที่กำลังพัฒนาให้ความสำคัญต่อการผลิตของสัตว์ที่เน้นความปลอดภัย ซึ่งแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ช่วยย่อยและช่วยการดูดซึมของสารอาหาร และสร้างวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย

2. แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria)

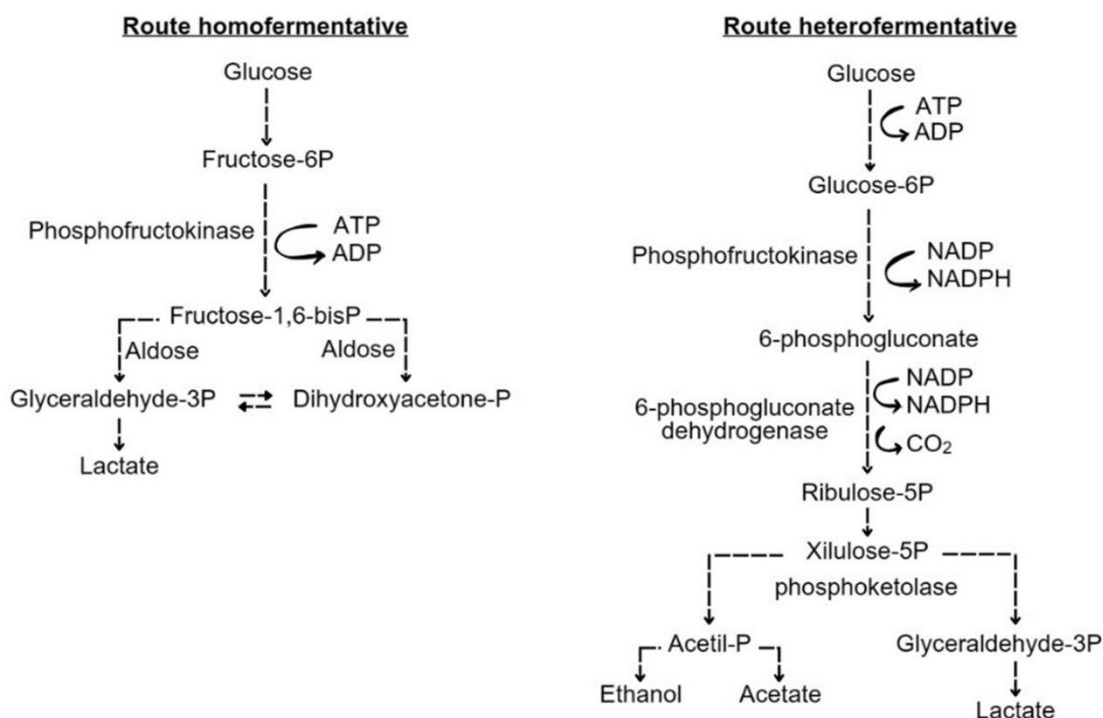
แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส (catalase-negative) ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด-เบส ต่ำกว่า pH5 ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยต่อการเจริญเติบโต เป็นแบคทีเรียรูปร่างแบบกลมและแบบท่อนที่ไม่เคลื่อนไหว หลายสปีชีส์ของ LAB เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค โดยได้รับการรับรองว่าปลอดภัย (GRAS: Generally Regarded as Safe) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดินและน้ำ อาหารหมักดอง ระบบทางเดินอาหาร ช่องคลอดของสัตว์ การจัดจำแนก LAB แบ่งตามสัณฐานวิทยา วิธีการหมักกลูโคส ความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ และการใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นคาร์บอน โดยตามการจำแนกทางอนุกรมวิธานปัจจุบัน LAB อยู่ในไฟลัม Firmicutes ชั้น Bacilli อันดับ *Lactobacillales* วงศ์นี้ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* โดย *Lactobacillus* เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดมีมากกว่า 100 ชนิด (Mokoena, 2017)

2.1 กระบวนการหมักกรดแลคติก

น้ำตาลเป็นอาหารที่แบคทีเรียนำมาใช้ในการเจริญเติบโต และผลิตสารต่างๆ ซึ่งเกิดขึ้นจากการหมักทำให้เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการหมักน้ำตาลที่แตกต่างกัน (Mozzi, 2016) แสดงดังภาพที่ 7 สามารถแบ่งรูปแบบกระบวนการหมัก 2 รูปแบบ คือ

2.1.1 โฮโมเฟอร์เมนเตชัน (homofermentation) หมายถึง แบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคส เปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตโดยเอนไซม์ aldolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วทำให้เกิดกรดแลคติกร้อยละ 85 หรือมากกว่า จากการหมักคาร์โบไฮเดรตโดยผ่านกระบวนการ glycolytic pathway หรือ Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) จากการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อผ่านเข้าสู่ EMP จะได้ ไพรูเวต 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กรดแลคติก ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* เช่น *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น

2.1.2 เฮเทอโรเฟอร์เมนเตชัน (heterofermentation) หมายถึง แบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคส เป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติกร้อยละ 50 เอทานอลร้อยละ 20-25 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 โดยผ่าน phosphogluconate pathway แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการ thiamine ในการเจริญ และสร้างเอนไซม์ phosphoketolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ aldolase ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Leuconostoc* และบางชนิดในสกุล *Lactobacillus*



ภาพที่ 7 แผนผังแสดงผลิตภัณฑ์จากการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative และ homofermentative ของแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่มา: Aguirre-Garcia et al. (2024)

2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียโพรไบโอติก มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในกระบวนการหมักอาหารและการใช้เป็นโพรไบโอติก รวมไปถึงการผลิตกรดแลคติกโดยการหมักกรดแลคติกเป็นสารเคมีอย่างหนึ่งที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารใช้เพื่อเพิ่มรสชาติ เครื่องสำอางใช้เป็นสารเพิ่มความชุ่มชื้น และเป็นส่วนประกอบพื้นฐานสำหรับการสังเคราะห์พอลิเมอร์พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น พอลิแลคติกแอซิด (PLA) (Tarraran and Mazzoli, 2018) และแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ที่สามารถส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้าน เช่น เพิ่มภูมิคุ้มกัน ลดการติดเชื้อ รักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหาร (Bernal-Castro et al., 2024)

ตารางที่ 2 อาหาร และเครื่องดื่มหมักดอง และแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์	Lactic acid bacteria
ผลิตภัณฑ์นม	
ชีส	<i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. menesteroides</i> sp. <i>cremoris</i>
เนย	<i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. menesteroides</i> sp. <i>cremoris</i> <i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
โยเกิร์ต	<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ,
คีเฟอร์	<i>S. thermophilus</i> <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofacies</i> , <i>L. brevis</i>
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	
ไส้กรอกหมัก	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i>
ไส้กรอกหมัก	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
ผลิตภัณฑ์ผักดอง	
กะหล่ำปลีดอง	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>L. brevis</i> ,
แตงกวาดอง	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>
มะกอกดอง	<i>L. pentosus</i> ,
ผักดอง	<i>L. plantarum</i> <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i>
ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่	
Sourdough	<i>L. sanfransiscensis</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> ,

ผลิตภัณฑ์	Lactic acid bacteria
	<i>L. amylovorus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>W. cibaria</i>
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก	<i>L. alimentarius</i> , <i>C. piscicola</i>

ที่มา: ดัดแปลงจาก Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010)

2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก

โพรไบโอติกเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ที่มีจำหน่ายเป็น LAB ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* แต่ยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium*, *Leuconostocs*, *Pediococci*, *Lactococci*, *Enterococci* และ *Streptococci* ด้วยโดยปกติแล้ว สายพันธุ์โพรไบโอติกจะถูกแยกจากผลิตภัณฑ์หมักแบบดั้งเดิม จากลำไส้ อุจจาระ และน้ำนมแม่ของมนุษย์ (Fontana et al., 2013) ในแง่ LAB มีบทบาทสำคัญในผลดีต่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านการหมักและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร เครื่องดื่ม เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเนื่องจากมีรสชาติดี และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และต้านเนื้องอก ป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด แม้ว่าโพรไบโอติกจะใช้เพื่อประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารเป็นหลัก แต่การใช้โพรไบโอติกยังสามารถใช้เพื่อดูแลสุขภาพผิวหนัง ช่องปาก และช่องคลอด รวมถึงการรักษาอาการแพ้ โรคตับ และโรคเมแทบอลิซึมได้อีกด้วย เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความเชื่อมโยงระหว่างลำไส้กับสมองชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในลำไส้มีบทบาทสำคัญในความผิดปกติทางอารมณ์และความวิตกกังวล มีข้อเสนอแนะว่าการปรับปรุงการทำงานของลำไส้ผ่านการปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์ ลดสารก่อการอักเสบในเนื้อเยื่อไขมัน ลดโอกาสในการเกิดโรคอ้วน และภาวะดื้อต่ออินซูลิน โพรไบโอติกอาจควบคุมจุลินทรีย์ในลำไส้ของเจ้าบ้าน ปรับปรุงการทำงานของลำไส้และภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไปแบคทีเรียโพรไบโอติกจะเข้าไปเจริญยึดครองในลำไส้ก่อนแล้วจึงเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองภูมิคุ้มกันของชั้นเยื่อเมือกที่ผนังลำไส้ มีรายงานจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยเฉพาะ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* และผลิตภัณฑ์หมักของแบคทีเรียเหล่านี้ อาจช่วยปรับปรุงภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและโดยปรับตัว ป้องกันการเกิดแผลในเยื่อเมือกของกระเพาะอาหาร บรรเทาอาการแพ้ และสร้างการป้องกันการติดเชื้อจากเชื้อโรคในลำไส้ นอกจากนี้ แบคทีเรียโพรไบโอติกในกลุ่ม LAB ยังถูกนำไปใช้ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณสมบัติเฉพาะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ของลำไส้ เช่น โรคลำไส้อักเสบ ท้องผูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีการพิสูจน์แล้วว่าอาหารสัตว์มีประโยชน์ต่อโภชนาการของหมูและโภชนาการของสัตว์ในฟาร์มอื่นๆ เป็นเครื่องมือในการลดความผิดปกติของจุลินทรีย์ในลำไส้ เพิ่มกิจกรรมต่อต้านแบคทีเรีย และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน การยึดครองของจุลินทรีย์ในระบบย่อยอาหารของสัตว์เริ่มต้นทันทีหลังคลอด บทบาทของจุลินทรีย์ในลำไส้ของสัตว์กับมนุษย์นั้นไม่แตกต่างกันมาก การสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์สามารถปรับปรุงได้โดยแบคทีเรียโพรไบโอติก เช่น ลดเชื้อ *Escherichia coli* O157 ในวัวและเชื้อ *Salmonella* ในสัตว์ปีก รวมถึงป้องกันโรคท้องร่วงในลูกหมู (Työppönen et al., 2003)

3. โพรไบโอติก (probiotics)

3.1 ความหมายของโพรไบโอติก

โพรไบโอติก (probiotic) มีรากศัพท์จากภาษากรีก หมายถึง “เพื่อชีวิต” ได้รับการนิยามว่าเป็น “จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมแล้ว จะส่งผลดีต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน” (FAO/WHO 2001) โพรไบโอติกถูกนำมาใช้ประโยชน์มานานหลายศตวรรษ ปัจจุบันมีการประเมินทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับกลไกที่มีต่อการทำงานของภูมิคุ้มกัน ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร (Hotel and Cordoba, 2001) ดังนั้น ผู้คนจึงสนใจบริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมากขึ้น

คำจำกัดความของคำว่าโพรไบโอติกได้รับการเปลี่ยนแปลงและขยายขอบเขตมากขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมา แม้ว่าคำจำกัดความที่ WHO/FAO พัฒนาขึ้นจะได้รับการยอมรับจากนักวิจัยส่วนใหญ่ แต่ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีการเพิ่มคำจำกัดความใหม่ๆ ลงในคำศัพท์เกี่ยวกับโพรไบโอติก เช่น พาราโพรไบโอติก (paraprobiotic) ที่หมายถึงเซลล์ที่ตายหรือไม่ทำงานของโพรไบโอติก และคำว่าโพสโตไบโอติก (post-biotic) หมายถึงเมแทบอลิต์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพซึ่งผลิตขึ้นจากโพรไบโอติก คำศัพท์ที่กล่าวถึง คำว่าโพรไบโอติก ยังไม่ครอบคลุมเพียงพอที่จะสะท้อนถึงความหมายที่ต้องการเกี่ยวกับทุกแง่มุมที่มีประโยชน์ของโพรไบโอติกทั้งหมด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการและแนวความคิดใหม่ในคำศัพท์เกี่ยวกับโพรไบโอติกเพื่อใช้ในระดับโลกในทุกข้อความ ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในปัจจุบัน (Zendeboodi et al., 2020)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก

สกุล (genus)	สายพันธุ์
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. mesenteroides</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. oralis</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i>

ที่มา: Zendeboodi et al. (2020)

3.2 เกณฑ์การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี

กิจจา และคณะ (2537) และ Kumar et al. (2023) กล่าวถึงคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดีควรมี ดังนี้

- (1) ส่งเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้านหรือต้านทานเชื้อโรค
- (2) ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษต่อสัตว์และมนุษย์สามารถทนกรดได้ดีไม่ถูกทำลายโดยน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร (pH ต่ำ) และน้ำดีจากตับอ่อน
- (3) สามารถเจริญยึดครอง (colonization) บนเยื่อบุผิวในลำไส้
- (4) สามารถเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน
- (5) มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร
- (6) มีสามารถผสมผสานกับจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารและออกฤทธิ์ได้ดีกับทางเดินอาหารทุกส่วน
- (7) จุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติภายหลังจากเข้าสู่ร่างกาย

3.3 ประโยชน์จากการใช้โพรไบโอติกในสัตว์

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของสัตว์มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น พันธุกรรม อายุ อาหาร สารอาหารที่เพียงพอเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต และการพัฒนาการของสัตว์ รวมไปถึงการปรับปรุงการย่อยอาหารสัตว์มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต (Meng et al., 2010) โพรไบโอติกเป็นหนึ่งในปัจจัยด้านอาหาร ที่หากเสริมในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลดีต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน เช่น สร้างสมดุลที่ดีระหว่างจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารกับเชื้อโรคในระบบทางเดินอาหาร เพิ่มความสามารถในการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร และยังได้รับการพิสูจน์แล้วว่าการใช้โพรไบโอติกสามารถยับยั้งและลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เช่น *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis* และ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *Y. enterocolica*, *C. albicans* (Smialek et al., 2018) มีงานวิจัยหลายชิ้นรายงานผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตของสัตว์และประสิทธิภาพจากการใช้โพรไบโอติก ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกต้องได้รับการพิจารณาอย่างดี ยกตัวอย่างการศึกษาวิจัยศักยภาพของโพรไบโอติกในสัตว์ปีก ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การศึกษาวิจัยศักยภาพของโพรไบโอติกในสัตว์ปีก

สายพันธุ์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	รายละเอียด	อ้างอิง
<i>Lactobacillus</i> sp.	แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสช่วยลดจำนวนของ <i>C. perfringens</i> ในไก่แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อช่องลำไส้ของโฮสต์	Gérard et al., 2008
<i>Lactobacillus</i> sp.	โพรไบโอติกจาก LAB ขนาด 1×10^5 CFU ช่วยลดการแพร่พันธุ์ของเชื้อ <i>Salmonella</i> ในช่วงวัยแรก	PenhaFilho et al., 2015

สายพันธุ์ที่ใช้เป็น โพรไบโอติก	รายละเอียด	อ้างอิง
	ของลูกไก่	
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของไก่เนื้อ สุขภาพลำไส้ และการทำงานของระบบ	De Cesare et al., 2020
	เผาผลาญ	
<i>P. acidilactici</i>	การเสริมด้วย <i>P. acidilactici</i> (10^8 CFU/กิโลกรัมของอาหาร) ช่วยเพิ่มคุณภาพไข่และลดระดับคอเลสเตอรอลในไข่แดง	Mikulski et al., 2012
<i>B. subtilis</i>	1 กรัม/กิโลกรัม ของ <i>B. subtilis</i> ลดผลกระทบของความเครียดจากความร้อนต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และปรับปรุงการตั้งรกรากของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ใน	Abdelqader, 2020
<i>L. salivarius</i>	การเสริมด้วยส่วนผสม <i>L. salivarius</i> (0.5 หรือ 1 กรัม/กิโลกรัม) ช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวและ FCR	Shokryazdan et al., 2017
<i>L. sporogenes</i>	การเสริมด้วย <i>L. sporogenes</i> (100 มก./กก.) ช่วยเพิ่ม FCR และ BWG	Arun et al., 2007
<i>L. plantarum</i> , <i>P. polymyxa</i>	ระดับ ALT และครีเอตินินโคเนสลดลงเมื่อเสริมด้วย <i>L. plantarum</i> 16 และ <i>Paenibacillus polymyxa</i> 10 ในไก่เนื้อ	Wu et al., 2019
<i>Lactobacillus</i> sp.	ระดับ ALT และ AST ลดลงจากการบริโภคนจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสเป็นโพรไบโอติกในไก่เนื้อ	Fathi, 2013
<i>L. sporogenes</i>	การเสริมด้วย <i>L. sporogenes</i> ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในไก่เนื้อ	Panda et al., 2006
<i>L. acidophilus</i>	ระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ ALT ลดลงโดยการเสริมด้วย <i>L. acidophilus</i> D2/CSL CECT 4529 และ <i>B. subtilis</i> PB6 ATCC-PTA 6737	Forte et al., 2016
<i>E. faecium</i>	ระดับคอเลสเตอรอล ไขมัน และแคลเซียมลดลง การเสริมด้วย <i>E. faecium</i> M74 ในไก่ไข่ ISA Brown	Capcarova et al., 2010
<i>Lactobacillus</i> sp.	ระดับคอเลสเตอรอลในไข่ลดลงเหลือ 10.4% เมื่อเทียบกับไก่กลุ่มควบคุมที่อายุ 28 สัปดาห์ซึ่งได้รับอาหาร <i>Lactobacillus</i> sp.	Ramasamy et al., 2010
<i>L. fermentum</i>	โพรไบโอติกที่ผสม <i>L. fermentum</i> (1×10^7 CFU/g) และ <i>S. cerevisiae</i> (2×10^7 CFU/g) ใน	Bai et al., 2013

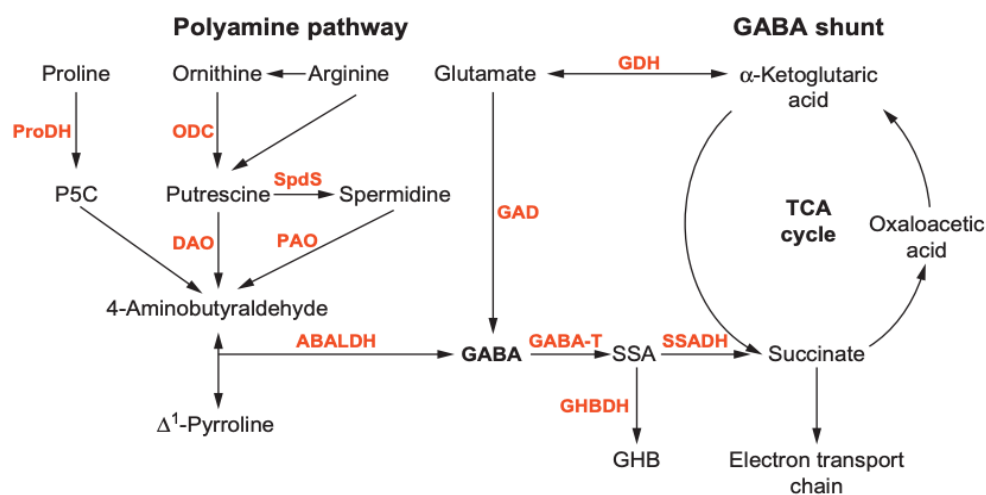
สายพันธุ์ที่ใช้เป็น โพรไบโอติก	รายละเอียด	อ้างอิง
<i>L. casei</i>	ปริมาณร้อยละ 0.1 และ 0.2 ในอาหารช่วย ยกระดับเซลล์ T ในลำไส้ของลูกไก่เนื้อ การเสริมด้วย <i>L. casei</i> (10^8 CFU/g) ทำให้ลิมโฟ ไซต์ภายในเยื่อบุผิวเพิ่มขึ้นและการอพยพของพว กมันโดยใช้เส้นทางการส่งสัญญาณคิโมไคน์ และ ปรับภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกโดยเพิ่มการแสดงออก ของไซโตไคนในลูกไก่	Tian et al., 2021
<i>B. subtilis</i>	เชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SP6 ลดอัตรา การตายในไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ยัง ลดจำนวนเชื้อ <i>C. perfringens</i> และปรับปรุง สุขภาพลำไส้ให้ดีขึ้น	Jayaraman et al., 2013
<i>B. licheniformis</i>	การลดอัตราการตายและการเพิ่มประสิทธิภาพการ ทำงานของลูกไก่ที่ได้รับ <i>B. licheniformis</i> เมื่อใช้ ในปริมาณมากและเป็นระยะเวลานาน	Knap et al., 2010
<i>E. faecium</i>	การเสริมด้วย <i>E. faecium</i> ช่วยลดจำนวนของ <i>C.</i> <i>perfringens</i> ในลูกไก่ในวันที่ฟักออกมา	Cao et al., 2013
<i>E. faecium</i>	สายพันธุ์ของ <i>E. faecium</i> ที่สกัดจากลำไส้ไก่เนื้อ แสดงฤทธิ์ในหลอดทดลองต่อ <i>C. perfringens</i>	Shin et al., 2008
<i>E. faecium</i>	การเสริม <i>E. faecium</i> (0.5 กรัม/ลิตร) ช่วยลด ผลกระทบของโรคโคซี่เดียและเพิ่มประสิทธิภาพ การเจริญเติบโตในไก่เนื้อ	El-Sawah et al., 2020
<i>E. faecium</i>	การเสริมด้วย <i>E. faecium</i> ในไก่เนื้อส่งผลให้ สามารถใช้สารอาหารได้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลให้ ประสิทธิภาพการเผาผลาญดีขึ้นด้วย	Zheng et al., 2016

ที่มา: ดัดแปลงจาก Halder et al. (2024)

4. กาบา (GABA)

สารกาบา (GABA) หรือกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (γ -aminobutyric acid) เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ใช่ช่องแคบประกอบในโครงสร้างของโปรตีน มีคาร์บอนสี่อะตอม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_9NO_2$ และมีน้ำหนักโมเลกุล 103.12 พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ (Rashmi et al., 2018) ผลิตขึ้นโดยการปฏิกิริยา Decarboxylation ของกรดแอลกลูตามิก (L-glutamic acid) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ซึ่งสารกาบามีหน้าที่หลักเป็นสารสื่อประสาทประเภทยับยั้งในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system: CNS) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ช่วยรักษาสมดุลของสมองเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภาวะ

ความเครียดต่างๆ ปัจจุบันกาบ้าสามารถผลิตได้ด้วยวิธีต่างๆ รวมถึงการสังเคราะห์ทางเคมี กระบวนการของเอมไซม์ และการผลิตของจุลินทรีย์ การสังเคราะห์กาบ้าทางเคมี มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เร็วกว่าวิธีอื่นๆ และให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามยังคงคำนึงถึงปัญหาที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพที่ตามมาบางประการ เช่น สารตกค้างที่หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นพืช จึงถูกห้ามใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร การสังเคราะห์สารกาบ้าด้วยเอมไซม์ใช้แอลกลูตาเมตเป็นวัตถุดิบและ GAD (EC 4.1.1.15) และ GABA-T (E.C. 2.6.1.19) และ SSADH (E.C. 1.2.2.16) ในขั้นตอน GAD จะเร่งปฏิกิริยาการ alpha-decarboxylase ของกลูตาเมตเป็นสารกาบ้าในปฏิกิริยาที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ เป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการสังเคราะห์สารกาบ้า จากนั้นสารกาบ้าจะถูกแปลงเป็น Semialdehyde succinic acid (SSA) โดย GABA-T และ SSADH ต่อไปจะแปลง SSA ให้เป็นซักซิเนต GABA-T ขึ้นอยู่กับไฟรเวตและไกลออกซิเลตเป็นตัวรับอะมิโน จึงผลิตอะลานีนและไกลซีนตามลำดับ ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 วิถีเมแทบอลิซึมของสารกาบ้าในพืชและสัตว์

ที่มา: Rashmi et al. (2018)

แต่อย่างไรก็ตามการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ นั้นซับซ้อนทำให้ต้นทุนการผลิตโดยรวมเพิ่มขึ้นอย่างมาก การผลิตสารกาบ้าด้วยจุลินทรีย์ถือเป็นเส้นทางที่น่าสนใจและมีแนวโน้มดีเนื่องจากเป็นทรัพยากรหมุนเวียน เช่น แอลกลูตาเมต โมโนโซเดียมกลูตาเมต กลูโคส โซโลส ลิกโนเซลลูโลส และกลีเซอรอล สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นหรือสารตั้งต้นร่วมในการหมักได้ สร้างมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลงในระหว่างกระบวนการผลิต (Luo et al., 2021) การผลิตสารกาบ้าของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ถูกกระตุ้นโดยอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต และใช้สภาวะการหมักที่เหมาะสมในการสังเคราะห์สารกาบ้า โดยการสังเคราะห์ปริมาณของสารกาบ้าจะขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก อันเนื่องมาจากกิจกรรม GAD ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่ออัตราการผลิตสารกาบ้าในระหว่างการหมัก ปัจจัย

สำคัญ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH เวลาเพาะเลี้ยง องค์ประกอบของตัวกลาง และสภาวะการหมัก (Yang et al., 2008)

กาบ้าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญทั้งในอาหารและยา และหน้าที่ทางชีวภาพที่สำคัญเป็นส่วนที่มีคุณค่าของอาหารที่มีความสมดุลและดีต่อสุขภาพในอาหารเพื่อสุขภาพที่สอดคล้องกับแนวทางโภชนาการของ WHO สารกาบ้าพบตามธรรมชาติในอาหารจากพืชและสัตว์ต่างๆ เช่น ธัญพืช ผัก เกล็ด อาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์นม มีหน้าที่ทางสรีรวิทยาที่หลากหลายและมีประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างมาก จึงพยายามเพิ่มปริมาณสารกาบ้าในผลิตภัณฑ์อาหารผ่านกระบวนการใหม่ๆ (Tufail et al., 2025)

5. ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อรทัย (2563) ศึกษาการคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus* sp เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในไก่ไข่ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสจำนวน 13 ไอโซเลต ทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์สูงกว่าร้อยละ 70 เมื่อนำมาผสมในอาหารไก่พบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 80 เมื่อนำไปเสริมเป็นโพรไบโอติกในอาหารไก่ในรูปแบบสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจินेटที่ระดับ 10^6 สปอร์ มีแนวโน้มทำให้ร้อยละของผลผลิตไข่ มวลไข่ และน้ำหนักเปลือกไข่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ จำนวนของ *Salmonella* sp. และ *E. coli* ในมูลไก่ลดลง ในขณะที่จำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกในมูลไก่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการวิจัยประสิทธิภาพของบาซิลลัสโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์สามารถนำไปสู่การพัฒนาและประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์ปีกได้

AlGhuri et al. (2016) การเสริมโพรไบโอติกด้วย *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 และ *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 ในอาหารของไก่ไข่โดยใช้ระยะเวลา 45-50 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนัก ผลการผลิไข่ และคุณภาพไข่ มีประสิทธิภาพไปในทิศทางที่ดีขึ้น

Kim et al. (2012) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 230 ไอโซเลต จากตัวอย่างกิมจิ 20 ตัวอย่าง และตรวจคัดกรองความสามารถในการสังเคราะห์กรด γ -aminobutyric (GABA) พบเพียง 68 ไอโซเลตที่มีความสามารถดังกล่าว และระบุสปีชีส์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis* และ *Weissella viridescens*

Li et al. (2020) ศึกษาจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ในระดับไฟลัม และการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ตามอายุของไก่ โดยสรุปว่าจุลินทรีย์ทั่วไปที่คัดแยกในลำไส้ของไก่ ได้แก่ Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria และ Actinobacteria มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกสามารถเป็นสารเสริมอาหารช่วยเพิ่มความแข็งแรงแก่จุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้ ส่งผลให้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในลำไส้ เช่น *Salmonella* และ *Campylobacter* แสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของอาหารและสุขภาพ

Qi et al. (2021) ศึกษา การเสริมอาหารด้วย *Pediococcus pentosaceus* ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในอนาคตพบว่า *P. pentosaceus* มีความสามารถในการต้านจุลชีพ และผลิตแบคเทอรีโอซินมีบทบาทต้านแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในระบบนิเวศของจุลินทรีย์ และมีคุณสมบัติเป็นโพร

ไบโอติกมีความสามารถในการต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ล้างพิษ และลดไขมันในเลือดได้ *P. pentosaceus* จึงเป็นที่น่าสนใจของภาคเกษตรกรรม การเลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร

Musikasang et al. (2009) ศึกษาศักยภาพของโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของไก่ และศึกษาความสามารถการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด จากการทดลองจำแนกได้ว่าเป็นโพรไบโอติกเป็นแบคทีเรีย *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium*, *P. pentosaceus* และ *E. faecium* สามารถต้านฤทธิ์เชื้อ *Salmonella sp*, *S. aureus* และ *E. coli*

Zhang et al. (2012) ศึกษาผลของสารกาบ้ำในอาหารที่มีต่อประสิทธิภาพการวางไข่ คุณภาพของไข่ ภูมิคุ้มกัน และฮอร์โมนต่อมไร้ท่อในแม่ไก่ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน ผู้วิจัยประเมินผลของ γ -aminobutyric acid (GABA) ต่อประสิทธิภาพการวางไข่ คุณภาพของไข่ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร ระดับฮอร์โมน และกิจกรรมของภูมิคุ้มกันในไก่ไข่ภายใต้ความเครียดจากความร้อน ไก่พันธุ์โรมัน (อายุ 320 วัน) ถูกป้อนด้วยสารกาบ้ำ 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหารสัตว์ ตามลำดับในระหว่างการทดลอง 60 วัน จากการศึกษาพบว่า การเสริมสารกาบ้ำ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหารสัตว์ ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการวางไข่และคุณภาพของไข่ โดยเพิ่มการผลิตไข่ น้ำหนักไข่เฉลี่ย และความแข็งแรงของเปลือกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ลดอัตราส่วนอาหารต่อไข่และระดับคอเลสเตอรอล ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Park et al. (2022) ศึกษาผลของสารกาบ้ำ ต่อประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในไก่เนื้อภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีความเครียด จากงานวิจัย แสดงให้เห็นว่าสารกาบ้ำ ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์ยับยั้งช่วยลดความเครียดในสภาพแวดล้อมการเลี้ยงปศุสัตว์ที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ และปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงาน

Wijayanti et al. (2019) ศึกษาผลของการเติมโพรไบโอติก และสารเพิ่มกรดเพื่อเป็นทางเลือกให้กับสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของยาปฏิชีวนะต่อค่า pH ของอาหารย่อยและจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ไข่ พบว่าการใช้ส่วนผสมของโพรไบโอติก (*Lactobacillus sp.* และ *Bacillus sp.*) และสารเพิ่มกรดเพื่อเป็นทางเลือกแทนสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของยาปฏิชีวนะต่อค่า pH ของน้ำย่อยและจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ไข่ สามารถใช้เป็นทางเลือกแทนยาปฏิชีวนะที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตได้

Edalatian Dovom et al. (2023) ศึกษาการคัดกรองสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมแบบดั้งเดิมของอิหร่านสำหรับการผลิตสารกาบ้ำ และการปรับให้เหมาะสม ผู้วิจัยศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งหมด 50 ชนิด ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมแบบดั้งเดิมของอิหร่านมีความสามารถผลิตสารกาบ้ำได้ จากการยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และกิจกรรมของเอนไซม์ GAD ทั้งนี้สกุล *Lactococcus* มีการผลิตกาบ้ำสูงสุดที่ 3.3 mM สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตสารกาบ้ำ คือใช้ความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมต (ระหว่าง 25 ถึง 150 mM อุณหภูมิที่บ่มในช่วง 25 ถึง 37 องศาเซลเซียส) และ pH ระหว่าง 4.0 ถึง 5.0

Xu et al. (2022) ศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CML352 ที่แยกได้จากไก่ของประเทศไทยเพื่อปรับปรุงคุณภาพของลำไส้และคุณภาพไข่ในระยะสุดท้าย ผู้วิจัยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและจำเป็นต่ออุตสาหกรรมไก่ไข่เพื่อปรับปรุงคุณภาพลำไส้ของสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีแนวโน้มของการ

ผลิตไข่เพิ่มมากขึ้น ผู้วิจัยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* ได้ทั้งหมด 57 ไอโซเลต โดยคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารไก่ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกโดยแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CML352 ที่แยกได้มีประสิทธิภาพการเป็นโพรไบโอติกที่ดี มีประสิทธิภาพสร้างสมดุลให้แก่ลำไส้และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของแม่ไก่ไข่ซึ่ง *L. salivarius* CML352 มีความทนทานต่อกรดและเกลือน้ำดีสูง พื้นผิวเซลล์แสดงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูง และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ลดอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรีย Firmicutes ต่อ Bacteroidetes ลงอย่างมีนัยสำคัญเพิ่มการแสดงออกของยีน *Muc-2* และลดการแสดงออกของ *MyD88*, *IFN- γ* และ *TLR-4* นอกจากนี้ยังสามารถลดการสะสมของไขมันหน้าท้องของสัตว์ และปรับปรุงคุณภาพของไข่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารไก่สายพันธุ์ *L. salivarius* มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่คุ้มค่าและส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ในเชิงบวก

Zhang et al. (2017) ศึกษาการเสริมโพรไบโอติกที่ช่วยลดความเครียดจากความร้อนเสริมการทำงาน และปรับปรุงจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ไข่ ผู้วิจัยการทดลองศึกษาประโยชน์และกลไกของส่วนผสมโพรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *E. faecium* ต่อประสิทธิภาพของแม่ไก่ไข่ภายใต้ความเครียดจากความร้อน โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มการทดลองได้แก่ กลุ่มที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มการทดลองควบคุม กลุ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มการทดลองความเครียดที่ได้จากความร้อน และกลุ่มทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โดยให้อาหารผสมของโพรไบโอติก ทดลองเป็นเวลา 20 วัน ผลการทดลองกลุ่มทดลองผสมโพรไบโอติกสามารถเพิ่มอัตราการผลิตไข่ และน้ำไข่เพิ่มขึ้นเมื่อแม่ไก่ไข่ได้รับความเครียดจากความร้อนอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ความหนาของเปลือกไข่และความสูงของไข่ขาวเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งโพรไบโอติกสามารถช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของลำไส้ และยับยั้งเชื้อก่อโรคจากการศึกษาโพรไบโอติกสามารถลดความเครียดจากความร้อนที่เป็นปัญหาหลักของอุตสาหกรรมสัตว์ปีกได้

Hwang et al. (2012) ศึกษาการผลิตชีวมวลของ *Lactobacillus plantarum* Pi06 เป็นสายพันธุ์ที่ช่วยเพิ่มคุณค่าโดยคัดแยกจากอุจจาระทารกที่แข็งแรง การศึกษาเบื้องต้นพบว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร MRS สามารถผลิตชีวมวลได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และน้ำหมักข้าวโพด ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ปริมาตร 16 ลิตร ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ กลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน พบว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *Lactobacillus plantarum* Pi06 ที่ระดับ 8.94 กรัมของน้ำหนักแห้ง/ลิตร องค์ประกอบที่เหมาะสมประกอบไปด้วยกลูโคส 35 กรัม/ลิตร สารสกัดยีสต์ 35 กรัม/ลิตร และเปปโตน 40 มิลลิกรัม/ลิตร

Silaban et al. (2025) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและการผลิตชีวมวลของเชื้อ *Lactiplantibacillus plantarum* DLBSK207 จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมที่สุดคือกลูโคส 33.76 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 32.59 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 28.38 กรัมต่อลิตร ที่ค่า pH เริ่มต้น 6.0 และอุณหภูมิ 35 องศา

เซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิต $9.30 \log \text{CFU.ml}^{-1}$ และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง $4.319 \text{ กรัมต่อลิตร}$ ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.82 เท่าเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS

Verlhac et al. (2020) ศึกษากระบวนการทำแห้งของโปรไบโอติก เปรียบเทียบการห่อหุ้มเซลล์ได้แก่ แล็กโทสและพอลิเมอร์ (PVP) หลังกระบวนการทำแห้งพบว่าอัตราการระเหิดเพิ่มขึ้นเมื่อความดันก๊าซทั้งหมดและอุณหภูมิชั้นวางเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการระเหิดสามารถลดลงได้ประมาณร้อยละ 40



บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar)	Himedia, India
1.2 MRS BROTH (Lactobacillus MRS Broth)	Himedia, India
1.3 Peptone, Bacteriological	Himedia, India
1.4 Yeast extract	Himedia, India

2. สารเคมี

2.1 Monosodium glutamate	-
2.2 Ammonium sulfate	RCI labscan, Thailand
2.3 Bromocresol purple	Fisher scientific, Thailand
2.4 Sodium acetate trihydrate	RCI labscan, Thailand
2.5 di-Potassium hydrogen phosphate	KemAus
2.6 Manganese sulfate	Qrec, Newzealand
2.7 Magnesium sulphate	Anhydrous AR QReC™
2.8 Gamma-aminobutyric acid	Sigma

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องวัดดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	Genesys 20
3.2 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	Binder, USA
3.3 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)	Vortex-Genie-2, USA
3.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance)	Mettler-Toledo, Switzerland
3.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance)	OHAUS, USA
3.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (autoclave)	Sturdy, Thailand
3.7 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)	Microtech, Thailand
3.8 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (incubator)	Gallenkamp
3.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Drawell
3.10 ไมโครปิเปต (automatic pipette)	Gilson, France
3.11 ไมโครปิเปตทิป (pipette tip)	Hycon
3.12 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)	Hycon
3.13 Gamma aminobutyric acid ELISA kit	krishgen biosystems, US
3.14 เครื่องไมโครเพลท (microplate reader)	Drawell
3.15 หลอดทดลอง (test tubes)	PYREX

3.16 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack stainless)	-
3.17 ปีกเกอร์ (beaker)	KIMAX, USA
3.18 แท่งแก้วคนสาร (glass string rod)	-
3.19 กระบอกตวง (cylinder)	-
3.20 ขวดฝาเกลียว (duran)	-
3.21 หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)	Superclear, USA
3.22 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)	Schott Duran, Germany
3.23 ขวดปริมาตร (volumetric flask)	JSGW
3.24 ช้อนตักสาร (spatula)	-
3.25 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)	-
3.26 พาราฟิล์ม (parafilm)	BEMIS, USA



วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบ้าได้

1.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่

เก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารไก่ไข่ อายุประมาณ 17 สัปดาห์ จากคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยใช้ก้านสำลีปลอดเชื้อกวาดภายในรูทวารเล็กประมาณ 1-2 นิ้ว แสดงดังภาพที่ 9 จากนั้นบ่มในอาหารเหลวสูตร de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS, Himedia, India) 5 มิลลิลิตร ที่เติม Bromocresol purple ร้อยละ 0.005 (w/v) ทันทัน และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobe) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางในสารละลาย Sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็งสูตร MRS ที่เติม bromocresol purple ร้อยละ 0.005 (w/v) บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนี และคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันมาเก็บไว้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร MRS ด้วยเทคนิค streak plate บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวมาศึกษาเบื้องต้นด้วยการย้อมสีแกรม (Gram stain) ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test) เลือกโคโลนีที่ติดสีแกรมบวก ให้ผลทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเป็นลบ และรูปร่างท่อนหรือกลมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) (Edalatian Dovom et al., 2023) และเก็บรักษาเชื้อในสารกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 9 การเก็บตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารไก่ไข่

1.2. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารกาบ้า

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของโมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) (Han et al., 2023) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์สารกาบ้าทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยวิธีการทางสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดยการวิเคราะห์สารกาบ้าด้วยเทคนิค TLC ทำได้โดยหยดสารละลายส่วนใส 0.5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นซิลิกาเจลสำเร็จรูป รุ่น F₂₅₄ (Merck, Germany) ใช้สารละลายผสมของ butanol: acetic acid: deionized water อัตราส่วน 5:2:2 (v/v/v) เป็นตัวพาเคลื่อนที่ ทำให้แถบสารปรากฏโดยการจุ่มในสารละลาย ninhydrin ความเข้มข้นร้อยละ 2 (w/v) อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏแถบสาร

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารกาบ้าทำโดยวิธีของ Le et al. (2020) มีวิธีการคือผสมสารละลายส่วนใส 0.4 มิลลิลิตร กับสารละลาย Borate buffer pH 9.0 ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Phenol reagent ความเข้มข้นร้อยละ 6 (w/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำให้เย็นลงโดยการแช่ในอ่างน้ำ จากนั้นเติมสารละลาย sodium hypochlorite (NaClO) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 (w/v) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่ในอ่างน้ำและทิ้งไว้ให้เย็น และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารกาบ้าโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกาบ้า (Sigma-Aldrich, U.S.)

วิเคราะห์ปริมาณสารกาบ้าที่ผลิตขึ้นโดยใช้ชุดทดสอบ Gamma aminobutyric acid ELISA kit ที่มีวิธีการโดยย่อคือหยดสารละลายส่วนใสของแต่ละตัวอย่างลงในไมโครเพลทที่เคลือบด้วย antibody GABA 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม biotinylated GABA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปิดแผ่นไมโครเพลทให้สนิท จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาดูดและล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นเติม streptavidin HRP conjugate 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทั้งหมดและปิดเพลทให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดและล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง ซับให้แห้งเติม TMB substrate 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสาร stop solution 100 ไมโครลิตร (เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารกาบ้าโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกาบ้า

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic properties)

ทำการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกในระดับ *in vitro* โดยนำไอโซเลตที่คัดเลือกมากระตุ้นโดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้ในการทดสอบดังต่อไปนี้

2.1 ทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

โดยทดสอบด้วยอาหารสูตร blood agar (Biomérieux, France) ด้วยเทคนิคการ Streak plate จากนั้นบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Klimko et al., 2020) สังเกตลักษณะรอบๆ โคลนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) มีการย่อยเม็ดเลือดแดงบางส่วน (α -hemolysis) และมีการย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (β -hemolysis) โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่การย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ (γ -hemolysis) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีในทางเดินอาหาร (Acid and bile tolerant ability)

การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ในสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหาร โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 2 ครั้ง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่ปรับ pH เป็น 2.0 2.5 3.0 และ 3.5 ในส่วนของการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี ถ่ายเชื้อจำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่เติม oxgall ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 (w/v) และร้อยละ 1 (w/v) จากนั้นบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Sirisopapong et al., 2023) ตรวจจำนวนเซลล์ของเชื้อ แบคทีเรียกรดแลคติกที่รอดชีวิตบนอาหารแข็งสูตร MRS ด้วยเทคนิค drop plate ของตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 3 และ 6 ควบคู่กับการตรวจสอบการ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS เป็น blank และสามารถคำนวณร้อยละของการรอดชีวิตได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนของแบคทีเรียหลังการทดสอบ}}{\text{จำนวนของแบคทีเรียเริ่มต้น}} \times 100$$

2.3 ทดสอบความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ (Cell surface hydrophobicity: CSH)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตร MRS เช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถทนกรดและน้ำดี นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ ที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นปรับความหนาแน่นของสารแขวนลอยเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.50 McFarlane จากนั้นย้ายไปใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารโกลูอิน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นแล้วนำส่วนชั้นวุ้นภาคของน้ำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Rodríguez-Sánchez et al., 2021) คำนวณค่า %CSH ดังสมการ

$$\text{Cell surface hydrophobicity (\%)} = [1 - (A_{15}/A_0)] \times 100$$

เมื่อ A_0 และ A_{15} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อนและหลังผสมโพลีเอทิลีนตามลำดับ

2.4 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility test)

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้แผ่น Susceptibility Antibiotic Disc (Oxoid™, Germany) ดัดแปลงจาก (Mohamad et al., 2020) โดยวางแผ่นยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็งสูตร MRS ที่เกลี่ยสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกไว้ โดยกำหนดปริมาณเชื้อที่ระดับ 0.5 McFarland จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ 24 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นยาปฏิชีวนะ โดยแผ่นยาปฏิชีวนะ 13 ชนิดในการทดลองนี้ ได้แก่ penicillin (10 µg), ampicillin (10 µg), vancomycin (30 µg), cefoxitin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), clindamycin (2 µg), ceftriaxone (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), cephalothin (30 µg), erythromycin (15 µg), rifampicin (5 µg), nalidixic acid (30 µg)

2.5 ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal pathogen inhibition test)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็งสูตร MRS โดยเทคนิคการจุด (spotting) จากนั้นบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันเตรียมแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Staphylococcus aureus* โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion (BHI) บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ที่ pH 7.2 เขย่าให้เข้ากัน ปรับความหนาแน่นของเซลล์ ให้มีความขุ่น 0.5 McFarland จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าว 20 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารกึ่งเหลวสูตร BHI ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเทบลงบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร MRS ที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ บ่มต่อในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก (Reuben et al., 2019)

3. การระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ระบุสปีชีส์ (species) ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและผลิตสารกาบาด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยเตรียมดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, China) โดยนำแบคทีเรียที่เลือกปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (Frank et al., 2008) นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ (ATGC Co., Ltd, Thailand) และวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับฐานข้อมูล BLAST ของ the National Center for

Biotechnology Information (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Botthoulath et al., 2018) และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับแบคทีเรียชนิดอื่นโดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0.10 ตามวิธีการของ Neighbour-joining method (Tamura et al., 2021) โดยเลือกใช้ค่า Bootstrap ที่ 1,000

4. ศึกษาลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร MRS เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นแช่ตะกอนเซลล์ด้วย Glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ใน PBS แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 80 90 และ 95 โดยแต่ละความเข้มข้นแช่เป็นระยะเวลา 30 นาที

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตชีวมวลของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและผลิตสารกาบ้าได้แล้ว ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าว โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD) แบบ 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณของน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นของโมโนโซเดียมกลูตาเมต และอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยกำหนดปัจจัยดังตารางที่ 5 ได้จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมด 17 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 6 โดยแต่ละชุดการทดลองใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 0.5 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร MRS โดยเลี้ยงได้สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/ml) ด้วยเทคนิค drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร MRS จากนั้นนำค่าที่ได้ไปประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Design-Expert® Software

ตารางที่ 5 ระดับของแต่ละปัจจัยโดยการออกแบบ Box- Behnken Design

ปัจจัย	-1	0	1
ปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต (ร้อยละ)	0.1	5.05	10
ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส (ร้อยละ)	10	20	30
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	10	25	40

ตารางที่ 6 แผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ของทั้ง 3 ปัจจัย

ชุดการทดลอง	ปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
1	0.03	0.3	25
2	3	0.3	25
3	0.03	0.9	25
4	3	0.9	25
5	0.03	0.6	10
6	3	0.6	10
7	0.03	0.6	40
8	3	0.6	40
9	1.515	0.3	10
10	1.515	0.9	10
11	1.515	0.3	40
12	1.515	0.9	40
13	1.515	0.6	25
14	1.515	0.6	25
15	1.515	0.6	25
16	1.515	0.6	25
17	1.515	0.6	25

6. ทดสอบขยายการผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขณะที่การทดสอบขยายการหมักทำการเปรียบเทียบระหว่างการหมักขนาดอาหารปริมาณ 700 มิลลิลิตร ในขวดตูเรนปริมาตร 1 ลิตร และในขนาดอาหาร 3.5 ลิตรในถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตร (WINPACT, รุ่น FS-06, USA) ใช้อาหารเหลวสูตร MRS โดยใช้แบบการหมักเพื่อผลิตมวลเซลล์แบบกะ (batch fermentation) ทั้งสองการทดลองใช้หัวเชื้อในปริมาณร้อยละ 0.5 (v/v) เพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างเพื่อวัดอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชั่วโมงที่ 0 3 6 9 12 18 และชั่วโมงที่ 24 ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/ml) ด้วยเทคนิค drop plate นอกจากนี้ทำการวัดปริมาณสารกาบาที่ผลิตขึ้นโดยใช้ชุดทดสอบ Gamma aminobutyric acid ELISA kit ที่มีวิธีการโดยย่อคือหยด

สารละลายส่วนในของตัวอย่างลงในไมโครเพลทที่เคลือบด้วย antibody GABA 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม biotinylated GABA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปิดแผ่นไมโครเพลทให้สนิท จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาดูดและล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นเติม streptavidin HRP conjugate 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทั้งหมดและปิดเพลทให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดและล้างด้วย wash buffer 4 ครั้ง ซับให้แห้งเติม TMB substrate 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสาร stop solution 100 ไมโครลิตร (เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารกาบ้าโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกาบ้า

7. ศึกษากระบวนการทำแห้งของชีวมวลโพรไบโอติก

ผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ และเตรียมเป็นสารแขวนลอยของเซลล์ในสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) เพื่อใช้ในการศึกษากระบวนการทำแห้งชีวมวลของโพรไบโอติกด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer) (Drawell DW-12N China) ทั้งนี้ เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดการตายของเซลล์ ระหว่างการทำแห้งโดยสารสื่อ (carrier) ชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลีพันธุ์หอมมะลิ เศษขนมปังบด หางนม มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) และผงแกนตะวัน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยผสมในอัตราส่วน 50 มิลลิลิตรต่อสารสื่อ 10 กรัม เมื่อทำแห้งเป็นที่เรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอย่าง 1 กรัม นำมาวัดอัตราการรอดชีวิตของเชื้อด้วยเทคนิค drop plate บนอาหารแข็งสูตร MRS และนำค่าไปประมวลผลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละการรอดชีวิต

8. ทดสอบอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกชนิดผง

ทำการผลิตผงโพรไบโอติกด้วยกระบวนการที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ แบ่งบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟรอย์ที่ปิดสนิท ถุงละ 1.00 กรัม และแบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียสโดยประมาณ) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้นและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/g) จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MRS โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตก่อนและหลังการทำแห้งและระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละสัปดาห์

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบ้าได้

จากตัวอย่างที่เก็บจากจุลินทรีย์รวมของไก่จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าสามารถรวบรวมโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 42 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญและเกิดเป็นโคโลนีสีครีม ลักษณะนูนและผลิตรกรขึ้นมาโดยสังเกตจากสีของอาหารแข็งบริเวณรอบโคโลนีที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเป็นลบ และมีรูปร่างกลมจำนวน 5 ไอโซเลต และรูปร่างท่อนจำนวน 37 ไอโซเลต ดังตารางที่ 7 ทั้งนี้แบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านต่างชนิดกันมักสามารถรอดชีวิตและเจริญยึดครองพื้นที่ในทางเดินอาหารของเจ้าบ้านต่างชนิดได้ในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้โพรไบโอติกสายพันธุ์ที่เหมาะสม สามารถเจริญยึดครองและให้ประโยชน์สูงสุดแก่ไก่จึงควรต้องคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารไก่ไข่ แบคทีเรียเหล่านี้จึงได้ถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกต่อไป โดยเป็นการทดสอบระดับ *in vitro* ในประเด็นที่เกี่ยวกับโอกาสที่เป็นเชื้อก่อโรค (การย่อยเม็ดเลือดแดง) การรอดชีวิตภายใต้สภาวะที่รุนแรงในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นจำลอง การยึดเกาะผนังลำไส้ ความไวต่อยาปฏิชีวนะ และความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ซึ่งผลจากการทดสอบกิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) โดยแบคทีเรียทั้ง 42 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียทั้งสิ้น 28 ไอโซเลตที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) แสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งสามารถบ่งชี้เบื้องต้นได้ว่าไม่มีแนวโน้มเป็นเชื้อก่อโรคที่ส่งผลเชิงลบต่อร่างกาย ในขณะที่มีแบคทีเรียจำนวน 4 และ 10 ไอโซเลตที่พบมีการย่อยเม็ดเลือดแดงทั้งในลักษณะ α -hemolysis และ β -hemolysis ตามลำดับ คุณลักษณะของแบคทีเรียทั้ง 42 ไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จากจุลินทรีย์รวมของไก่ไข่

ไอโซเลต	Gram strain	การสร้างสปอร์	รูปร่างเซลล์	การผลิตเอนไซม์คะตาเลส	การย่อยเม็ดเลือดแดง
LH1	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH2	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH3	+	ไม่สร้างสปอร์	cocci	-	γ -hemolysis
LH4	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH5	+	ไม่สร้างสปอร์	cocci	-	γ -hemolysis
LH6	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis

ไอโซเลต	Gram strain	การสร้างสปอร์	รูปร่างเซลล์	การผลิตเอนไซม์ อะตาเลส	การย่อยเม็ดเลือดแดง
LH7	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH8	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH9	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH10	+	ไม่สร้างสปอร์	cocci	-	γ -hemolysis
LH11	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH14	+	ไม่สร้างสปอร์	cocci	-	β -hemolysis
LH15	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	β -hemolysis
LH16	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	β -hemolysis
LH17	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	β -hemolysis
LH18	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH19	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	α -hemolysis
LH20	+	ไม่สร้างสปอร์	cocci	-	β -hemolysis
LH21	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH22	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH23	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH24	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	β -hemolysis
LH25	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH26	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH29	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH30	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH31	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	α -hemolysis
LH33	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH34	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH35	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	β -hemolysis
LH37	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH38	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH39	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	α -hemolysis
LH40	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH42	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH44	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH45	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis

ไอโซเลต	Gram strain	การสร้างสปอร์	รูปร่างเซลล์	การผลิตเอนไซม์ อะตาเลส	การย่อยเม็ดเลือดแดง
LH47	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	α -hemolysis
LH49	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH50	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH52	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	γ -hemolysis
LH53	+	ไม่สร้างสปอร์	rod	-	β -hemolysis



ภาพที่ 10 ลักษณะการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบ γ -hemolysis และ α -hemolysis

ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกแต่ละช่วงมีสภาวะที่แตกต่างกันอย่างมา การคัดเลือกโพรไบโอติกที่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นอีกหนึ่งข้อกำหนดของคุณสมบัติจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อที่สามารถรอดชีวิตในระบบย่อยอาหารของสัตว์ปีกได้ (Hidayat et al., 2018) แบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลตที่ไม่มีกิจกรรมย่อยสลายเม็ดเลือดแดงดังกล่าวได้ถูกนำมาทดสอบการรอดชีวิตภายใต้สภาวะจำลองของกระเพาะอาหารซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจำนวน 4 ระดับตั้งแต่ค่า pH 2.0 – 3.5 พบว่าแต่ละไอโซเลตสามารถรอดชีวิตและเจริญได้ในระดับที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8 ทั้งนี้ไอโซเลต LH5 สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีที่สุด โดยเป็นเพียงไอโซเลตเดียวที่รอดชีวิตและเจริญได้ดีที่ระดับ pH 2.0 ในขณะที่มีแบคทีเรีย 14 ไอโซเลตที่เจริญได้ที่ pH ระดับตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไป และไอโซเลตที่เหลือสามารถเจริญได้เมื่อ pH สูงกว่า 3.0 และทดสอบการรอดชีวิตในอาหารเหลวที่มีการเติมน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 1.0 (w/v) ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะของลำไส้เล็กส่วนต้น พบว่ามีเพียงไอโซเลต LH21 ที่ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำดีทุกระดับ จากผลการทดสอบทั้งสองนี้ทำให้สามารถสรุปว่าแบคทีเรียไอโซเลต LH5 LH9 LH34 LH37 LH38 LH40 LH42 LH44 LH45 LH49 LH50 และ LH52 เป็นแบคทีเรียที่มีโอกาสรอดชีวิต

จากสภาวะรุนแรงในทางเดินอาหารส่วนต้นได้ที่ประกอบไปด้วยกรด น้ำดีและเอนไซม์ของตับอ่อน เช่น อะไมเลส ไลเปส และโปรตีเอส กรดน้ำดีมีบทบาทสำคัญในการย่อยไขมันในลำไส้เล็กของมนุษย์ และในระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเกลือน้ำดีถูกผลิตขึ้นโดยตับเพื่อช่วยในการย่อยไขมัน (Jia et al., 2018) ระบบทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่ที่ต่อจากหลอดอาหารคือถุงพักอาหาร (crop) กระเพาะแท้ (proventriculus) และกิ้น (gizzard) ซึ่งล้วนมีความเป็นกรดที่ระดับต่างกัน โดยถุงพักอาหารของไก่ไข่มี pH ตั้งแต่ 4.1 – 6.8 ขึ้นกับสายพันธุ์ (Hervo et al., 2024; Kierończyk et al., 2016) กระเพาะแท้และกิ้นมี pH โดยประมาณ 4.2 – 5.27 และ 1.2 – 4.0 ตามลำดับ (Morgan et al., 2014; Recoules et al., 2019) ส่วนน้ำดีของไก่ประกอบไปด้วยกรดน้ำดี (bile acids) และเกลือน้ำดี (bile salts) ซึ่งมีการคอนจูเกต (conjugation) กับกรดอะมิโน taurine เป็นส่วนใหญ่ และน้ำดีมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 19.8 โดยน้ำหนักแห้ง (Tancharoenrat et al., 2022) นอกเหนือจากบทบาทช่วยส่งเสริมการย่อยไขมันในทางเดินอาหารแล้ว เกลือน้ำดียังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บนเยื่อหลายชนิด แต่แบคทีเรียโพรไบโอติก และแบคทีเรียก่อโรบบางชนิด เช่น *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในสัตว์ปีกมีกลไกทางชีวภาพในการต้านฤทธิ์ของเกลือน้ำดีได้ (Gunn, 2000) ส่วนในกรณีของโพรไบโอติกกลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria พบว่าใช้กลไกการผลิตเอนไซม์กลุ่ม bile salt hydrolase กลไกการขับเกลือน้ำดีออกจากเซลล์ (active efflux of bile acids/salts) และการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ (Ruiz et al., 2013) โดยทั่วไปแล้ว การคัดเลือกโพรไบโอติกที่ทนน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 – 0.30 (w/v) ถือว่าเพียงพอและเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์ปีก (Xu et al., 2023) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทดสอบถึงระดับความเข้มข้นร้อยละ 3.0 (w/v) เนื่องจากปัจจุบันได้มีงานวิจัยที่พบว่าการเสริมกรดน้ำดีเพิ่มในอาหารเลี้ยงไก่ไข่ช่วยปรับปรุงสมรรถนะการเจริญ เมแทบอลิซึมของไขมัน และสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารไก่ไข่ได้ (Yang et al., 2022) ดังนั้น แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีโอกาสรอดชีวิตจากลำไส้เล็กได้มากขึ้นในภาวะที่มีน้ำดีความเข้มข้นสูงกว่าที่พบในทางเดินอาหารไก่ไข่

ค่าความไม่ชอบน้ำบ่งชี้ถึงความสามารถของ LAB ในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อหุ้มลำไส้ ค่าความไม่ชอบน้ำที่สูงบ่งชี้ถึงความสามารถของแบคทีเรียที่ยึดติดกับเซลล์เยื่อหุ้มลำไส้ของเจ้าบ้าน แต่ระดับความไม่ชอบน้ำปานกลางไม่ได้หมายความว่าจุลินทรีย์จะมีแนวโน้มที่จะยึดเกาะลำไส้ของเจ้าบ้านลดลง เนื่องจากกลไกของการยึดเกาะเป็นกระบวนการที่แรงไม่ชอบน้ำและชอบน้ำมีปฏิสัมพันธ์กันลักษณะแรงผลักดัน ที่สำคัญยังขึ้นกับสายพันธุ์ของโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการหลีกเลี่ยงอุปสรรคทางชีวภาพระหว่างการย่อยอาหาร (Blajman et al., 2015) จากผลการทดลองเมื่อนำทุกไอโซเลตที่คัดเลือกได้ถูกประเมินความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่โดยทางอ้อมจากค่าความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของพื้นผิวเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมักสัมพันธ์กับความสามารถของเซลล์ในการจับกันเอง (auto-aggregation) และการยึดเกาะบนผนังลำไส้ ทั้งนี้ลำไส้ของสัตว์ปีกมีความยาวที่สั้นกว่าของมนุษย์ อาหารไหลผ่านใช้เวลาเพียง 2 - 3.5 ชั่วโมง ดังนั้นโพรไบโอติกต้องมีความสามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ดีเพื่อการเจริญยึดครองและป้องกันการยึดครองพื้นผิวลำไส้โดยแบคทีเรียก่อโรค (Xu et al., 2023) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 8 เช่นกัน พบว่ามีทั้งสิ้น 13 ไอโซเลตที่มีค่า %CSH ในระดับสูง โดยมีค่าสูงกว่าร้อยละ 70 และมีจำนวน 11 และ 4 ไอโซเลตที่มีค่า

%CSH ในช่วงร้อยละ 30-70 (ระดับปานกลาง) และ 0-30 (ระดับต่ำ) ตามลำดับ ตามเกณฑ์การแบ่งระดับของ Boutchard et al. (2015) ซึ่งหากพิจารณาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีศักยภาพรอดชีวิตจากลำไส้เล็กส่วนต้นแล้ว พบว่ามีเพียงไอโซเลต LH34 และ LH40 เท่านั้นที่แทบไม่มีความสามารถยับยั้งบนผนังลำไส้ใหญ่ได้ และไอโซเลต LH5 ที่สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีที่สุดมีค่า %CSH ในระดับปานกลาง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Ben-Miled et al. (2023) ที่รายงานค่า %CSH ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผึ้ง โดยพบว่ากลุ่มที่มีค่า %CSH สูงมักเป็นแบคทีเรียจากสกุล *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. ในขณะที่กลุ่มที่มีค่าปานกลางและต่ำอยู่ในสกุล *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Pediococcus* sp. และจากการรายงานค่า %CSH ของแบคทีเรีย *Salmonella* sp. จำนวนกว่า 22 serotypes ที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ทั้งในคนและสัตว์ปีกโดย Abdallah et al. (2014) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.29 ± 0.56 ถึง 29.55 ± 0.1 ซึ่งต่ำกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้ ดังนั้น จึงคาดว่าแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลตซึ่งมีค่า %CSH ระดับปานกลางและสูงเหล่านี้จะมีความสามารถในการแข่งขันเจริญยึดครองพื้นที่บนลำไส้ได้ดีกว่า *Salmonella* sp.

จากผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 13 ชนิด ของ LAB ทุกไอโซเลต โดยบันทึกขนาดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบแผ่นยาปฏิชีวนะและแปลผลโดยเทียบกับมาตรฐานของ The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ผลการทดสอบแสดงดัง ตารางที่ 9 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในระดับที่แตกต่างกัน ไอโซเลต LH18 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะมากที่สุดถึง 11 ชนิด รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลต LH5 และ LH38 ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ในขณะที่ไอโซเลต LH1 LH7 LH9 LH21 LH23 LH26 LH30 และ LH42 เป็นกลุ่มที่ไวต่อยาปฏิชีวนะน้อยที่สุด (ด้อยยาปฏิชีวนะ) โดยต้านยาปฏิชีวนะมากถึง 7-9 ชนิด ทั้งนี้ยา vancomycin เป็นยาปฏิชีวนะที่พบว่ามีเชื้อมากที่สุดถึง 26 ไอโซเลต ส่วนยา ampicillin, cephalothin และ chloramphenicol มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกได้ถึง 27 ไอโซเลต ทั้งนี้มีรายงานว่ายาปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *Lactobacilli*, *bifidobacteria* และ *enterococci* ได้ (Georgieva et al., 2015) ประเด็นความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของโพรไบโอติกยังคงเป็นที่ถกเถียงอย่างกว้างขวาง เนื่องจากนักวิจัยบางกลุ่มมีความเห็นว่าโพรไบโอติกควรเป็นสายพันธุ์ที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะได้หลากหลายเนื่องจากสามารถรอดชีวิตได้มากกว่าหากผู้บริโภค (คนและสัตว์) ต้องมีการรักษาอาการเจ็บป่วยด้วยยาปฏิชีวนะ แต่นักวิจัยกลุ่มที่คัดค้านกังวลถึงโอกาสที่อาจมีการส่งถ่ายยีนต้านยาปฏิชีวนะเหล่านี้จากโพรไบโอติกไปยังจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ในทางเดินอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้กลายเป็นสายพันธุ์ดื้อยาและยากต่อการรักษา (Sharma et al., 2017) งานวิจัยในครั้งนี้ มีความกังวลถึงความเสี่ยงของปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่นกัน จึงสนับสนุนการใช้โพรไบโอติกชนิดที่ไวต่อยาปฏิชีวนะในการพัฒนาเป็นอาหารเสริมในไก่ไข่ครั้งนี้

ตารางที่ 8 ความสามารถทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำและการยืดเกาะบนเซลล์เยื่อบุลำไส้

ไอโซ เลต	การเจริญในสภาวะกรด				การเจริญในสภาวะเกลือน้ำดี		% CSH
	pH2	pH2.5	pH3	pH3.5	ร้อยละ 0.3	ร้อยละ 1.0	
LH1	-	-	++	++	++	++	74.32
LH2	-	-	-	++	++	++	54.58
LH3	-	-	-	++	++	++	50.16
LH4	-	-	-	++	++	++	44.42
LH5	++	++	++	++	++	++	56.68
LH6	-	-	-	++	++	++	16.42
LH7	-	-	-	++	++	++	52.84
LH8	-	-	-	++	++	++	18.44
LH9	-	++	++	++	++	++	48.11
LH10	-	-	+	++	++	++	55.38
LH11	-	-	++	++	++	++	68.30
LH18	-	-	++	++	++	++	52.66
LH21	-	+	+	+	-	-	88.78
LH23	-	-	++	++	++	++	90.16
LH25	-	-	++	++	++	++	89.12
LH26	-	-	++	++	++	++	82.60
LH30	-	+	-	-	++	++	92.95
LH33	-	-	++	++	++	++	85.99
LH34	-	++	++	++	++	++	2.66
LH37	-	++	++	++	++	++	68.40
LH38	-	++	++	++	++	++	67.21
LH40	-	++	-	++	+	++	0.00
LH42	-	++	++	++	++	++	76.42
LH44	-	++	++	+	++	++	74.94
LH45	-	++	++	+	++	++	71.02
LH49	-	++	++	+	++	++	82.24
LH50	-	++	++	+	++	++	75.56
LH52	-	++	++	+	++	++	83.10

หมายเหตุ: “-” = no growth, “+” = growth with $A_{600} < 1.000$, “++” = growth with $A_{600} > 1.000$

ตารางที่ 9 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

ไอโซ เลต	P	AM	KF	VA	CRO	FOX	C	E	CC	GM	CIP	NA	RD
LH1	R	S	R	S	R	R	S	MS	R	R	R	R	S
LH2	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	MS	R
LH3	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
LH4	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
LH5	MS	S	S	S	MS	MS	S	R	MS	R	MS	R	S
LH6	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	MS	S
LH7	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
LH8	MS	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	MS	R
LH9	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	MS	R
LH10	MS	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH11	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
LH18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	MS	R	S
LH21	MS	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
LH23	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S
LH25	MS	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
LH26	MS	S	MS	R	MS	R	S	R	R	R	R	R	S
LH30	MS	S	MS	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
LH33	S	S	S	R	MS	R	S	R	S	R	MS	R	S
LH34	S	S	S	R	S	MS	S	MS	R	R	MS	R	S
LH37	S	S	S	R	S	MS	R	MS	S	R	MS	R	S
LH38	S	S	S	R	S	MS	S	MS	MS	R	MS	R	S
LH40	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH42	R	MS	MS	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S
LH44	MS	S	S	R	S	R	S	R	MS	R	MS	R	S
LH45	MS	S	S	R	S	R	S	MS	R	R	MS	R	S
LH49	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH50	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH52	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S

หมายเหตุ: “R”, “MS” and “S” หมายถึง ทนทาน ปานกลาง และอ่อนไหว ตามลำดับ

รายชื่อยาปฏิชีวนะ: P = penicillin (10 µg); AMP = ampicillin (10 µg); VA = vancomycin (30 µg); FOX = cefoxitin (30 µg); C = chloramphenicol (30 µg); CC = clindamycin (2 µg); CRO = ceftriaxone (30 µg); GM = gentamicin (10 µg); CIP = ciprofloxacin (5 µg); KF = cephalothin (30 µg); E = erythromycin (15 µg); RD = rifampicin (5 µg); NA = nalidixic acid (30 µg)

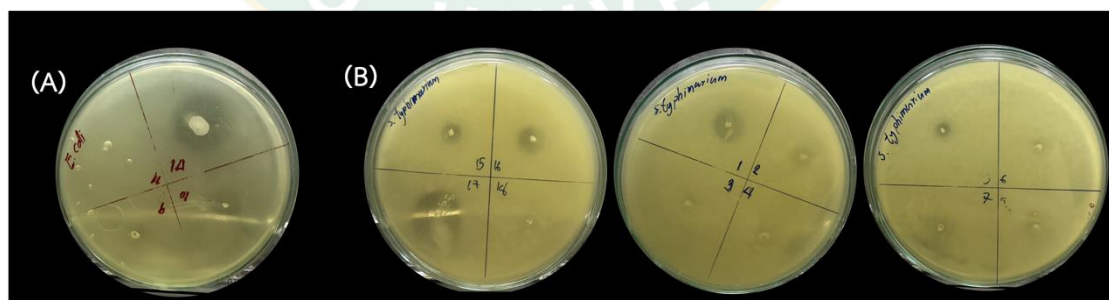
ผลการทดลองยังพบว่าไอโซเลต LH5 LH50 และ LH52 มีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Sal. Typhi* และ *S. aureus* โดยสร้างบริเวณยับยั้งขนาดเฉลี่ย 8.33 - 11.67 และ 14.33 - 15.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลตที่เหลือสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เพียง 1 ชนิด ลักษณะวงใส แสดงดังภาพที่ 11 อย่างไรก็ตาม มีแบคทีเรียกรดแลคติกมากถึง 19 ไอโซเลตที่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบครั้งนี้ได้ดังตารางที่ 10 แบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* sp. เป็นเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารรุนแรงในสัตว์ปีก คือโรค Salmonellosis ซึ่งมีอาการหลักคือท้องร่วง ซึม ไม่กินอาหารและตาย มักพบว่ามีปนเปื้อนของเชื้อในเนื้อไก่สดและไข่ไก่ซึ่งก่อโรคต่อไปในผู้บริโภคได้ มีรายงานว่าลูกไก่อายุ 1 วันสามารถเกิดการติดเชื้อ *Sal. Enteritidis* ได้แม้ได้รับเพียง 1-5 เซลล์ (Shaji et al., 2023) จึงต้องมีมาตรการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดในฟาร์มสัตว์ปีกทั่วโลกอย่างเข้มงวด แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้โดยการใช้กรดอินทรีย์ เช่น acetic acid และ lactic acid กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFAs) เช่น propionic acid และ butyric acid และสารกลุ่มแบคทีริโอซิน (bacteriocins) เช่น lactacin B, lactacin F, lactocin S, acidocin CH5 และ nisin เป็นต้น (สุทธิพร นันติ และคณะ, 2559)

หากพิจารณาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีศักยภาพนำมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์ได้ ได้แก่ LH5 LH50 และ LH52 เนื่องจากมีแนวโน้มรอดชีวิตจากสภาวะความเป็นกรดและน้ำดีระดับสูงในทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่ได้ดีที่สุด พื้นผิวเซลล์แบคทีเรียแสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำซึ่งส่งเสริมให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญบนผนังลำไส้ได้ดี ประกอบกับมีความสามารถต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค *Sal. Typhi* และ *S. aureus* ได้ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะชี้ให้เห็นว่า LH50 และ LH52 ต้านยาปฏิชีวนะมากถึง 6 ชนิด ดังนั้นไอโซเลต LH5 จึงเป็นเพียงไอโซเลตเดียวที่มีความน่าสนใจที่จะถูกคัดเลือกไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมชีวิตในกลุ่มโพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่ไข่ต่อไป

ตารางที่ 10 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง(mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>S. aureus</i>
LH1	-	-	-
LH2	-	-	-
LH3	-	-	-
LH4	-	-	-
LH5	-	11.67	14.33
LH6	-	-	-
LH7	-	-	11.00

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง(mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>S. aureus</i>
LH8	-	-	11.67
LH9	-	-	10.00
LH10	-	-	14.67
LH11	-	9.33	-
LH18	-	-	-
LH21	-	-	-
LH23	-	-	-
LH25	-	-	-
LH26	-	-	-
LH30	-	-	-
LH33	9.33	-	-
LH34	-	-	-
LH37	-	-	-
LH38	-	-	-
LH40	-	-	-
LH42	-	-	-
LH44	-	-	-
LH45	-	-	-
LH49	-	-	-
LH50	-	8.33	14.67
LH52	-	10.00	15.00



ภาพที่ 11 ภาพตัวอย่างลักษณะวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก (A) การยับยั้งของเชื้อ *E. Coli* และ (B) การยับยั้งของเชื้อ *S. Typhi*

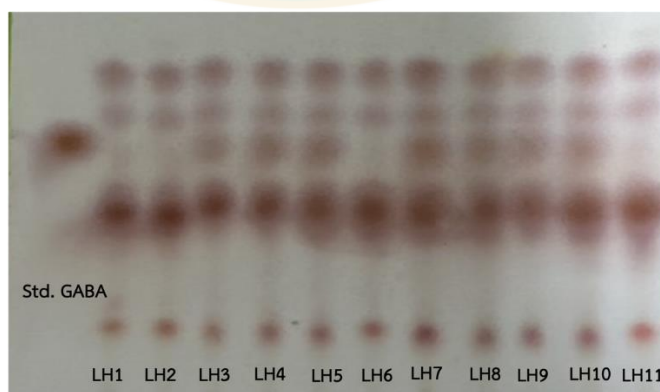
2. การทดสอบความสามารถผลิตสารกาบ้าโดยโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้และการระบุชนิด

แบคทีเรียกรดแลคติกโอโซเลต LH5 ได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารกาบ้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางสเปกโตรโฟโตเมทรีและโครมาโทกราฟฟีคิวบาง ทั้งนี้มีการทดสอบความสามารถดังกล่าวของโอโซเลต LH50 และ LH52 เปรียบเทียบด้วย ผลการทดสอบพบว่าโอโซเลต LH5 ผลิตสารกาบ้าได้ในปริมาณ 39.05 ± 0.003 mg/L ภายหลังเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เสริมโมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นสารตั้งต้น และสารกาบ้าที่ผลิตขึ้นนี้สามารถถูกตรวจพบได้บนแผ่นซีลีกาเจลโดยปรากฏแถบสารกาบ้าขึ้นเหนือแถบของสารโมโนโซเดียมกลูตาเมต แสดงดังภาพที่ 12 อย่างไรก็ตาม พบว่าโอโซเลต LH50 และ LH52 ผลิตสารกาบ้าได้เช่นกัน โดยผลิตในปริมาณ 2.14 ± 0.003 และ 4.52 ± 0.004 mg/L ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าผลผลิตโดยโอโซเลต LH5 อย่างชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ โอโซเลต LH5 จึงมีความเหมาะสมที่ถูกคัดเลือกนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมกลุ่มโพรไบโอติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบ้า เพื่อเป้าหมายในการแก้ไขปัญหากล้ามเนื้อลีบแห้งที่ระบุไว้แล้ว โอโซเลต LH5 เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก โคโลนีสีครีม รูปร่างกลมมน ดังภาพที่ 13 เจริญได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ และรูปร่างของเซลล์เมื่อศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเป็นทรงกลม อยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้น และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ได้เป็นแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* (accession number CP130861) และแผนภาพ dendrogram ที่แสดงการจัดกลุ่มคลัสเตอร์แบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank และโอโซเลต LH5 ในรูปแบบ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า *E. faecium* LH5 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มของ *E. faecium* แสดงดังภาพที่ 13

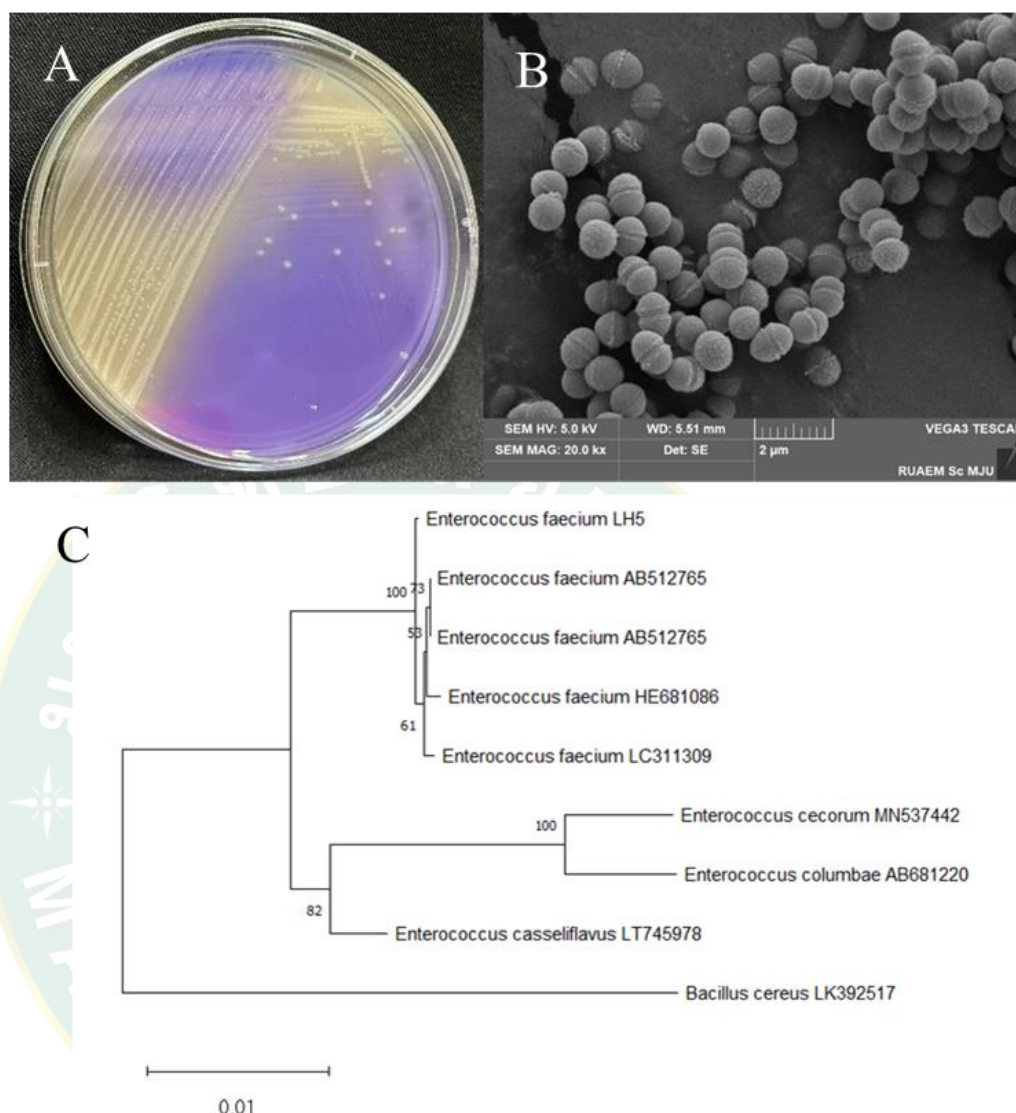
Enterococcus faecium เป็นหนึ่งในสมาชิกของแบคทีเรียกลุ่ม enterococci ที่ถูกรายงานว่ามีคุณสมบัติโพรไบโอติกมากกว่า 20 ปีและถูกใช้เชิงการค้าเพื่อเป็นอาหารเสริมในสัตว์โดยปราศจากผลข้างเคียง เช่น *E. faecium* SF68® และ *E. faecium* strain11181 ซึ่งได้รับอนุญาตจาก the European Food Safety Authority (EFSA) ให้ใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อใช้ขุนและเพิ่มสมรรถนะการเจริญของสัตว์หลายชนิด (Zommiti et al., 2022) สกุล *Enterococcus* sp. ยังถูกพบเป็นสัดส่วนสูงสุดในการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยพบในสัดส่วนร้อยละ 76.2 รองลงมาคือ *Lactococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. และในสกุล *Enterococcus* sp. นี้พบชนิด *E. faecium*, *E. faecalis* และ *E. avium* เป็นสัดส่วนสูงสุดคือร้อยละ 42.8 12.0 และ 9.5 ตามลำดับ (Carvajal et al., 2023) ในกรณีของการเลี้ยงไก่ไข่นั้น มีหลายงานวิจัยที่ใช้โพรไบโอติกชนิด *E. faecium* เพื่อปรับปรุงคุณภาพการเลี้ยงทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ไม่ว่าจะเป็น *E. faecium* DSM7134 ที่ช่วยเพิ่มผลผลิตไข่ ความหนาเปลือกไข่ และการย่อยได้ของสารอาหาร และยังช่วยลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในไก่พันธุ์ ISA brown (Park et al., 2016) นอกจากนี้ *E. faecium* ยังช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์และภาวะความเครียดออกซิเดชันในเลือด เพิ่มระดับ IgG ลดการติดเชื้อ *S. Enteritidis* ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยลดแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Synergistes* และ *Sutterella* แต่เพิ่มแบคทีเรียกลุ่ม *Barnesiella*, *Butyricimonas* และ *Biophila* (Huang et al., 2022) ผลการศึกษาเหล่านี้ล้วนยืนยันศักยภาพของ *E. faecium* ในการเป็นโพรไบโอติกได้ สำหรับประเทศไทยนั้น *E. faecium* ได้ถูกระบุไว้ในรายชื่อโพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารคน (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง “การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก

ในอาหาร” ลงวันที่ 27 มิถุนายน 2554) แต่กรณีอาหารสัตว์ ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลงวันที่ 21 พฤศจิกายน 2559 เรื่อง “กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์” ได้ระบุเป็นชนิด *Streptococcus faecium* ไว้ ซึ่งเป็นชื่อชนิดเดิมของ *E. faecium* (Zhou et al., 2020) ข้อมูลเหล่านี้ช่วยสร้างความมั่นใจว่า *E. faecium* LH5 ที่คัดเลือกได้นี้มีโอกาสดังกล่าวและศักยภาพนำไปใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติกในไก่ได้ อีกทั้งการเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากทางเดินอาหารไก่งามีโอกาสสูงที่สามารถรอดชีวิตและเจริญภายใต้สภาวะทางเดินอาหารของไก่ได้ (Carvajal et al., 2023; Gibson et al., 2004) เช่นเดียวกับรายงานของ Khalifa and Ibrahim (2023) ซึ่งคัดแยกโพรไบโอติก *E. faecium* CF2 จากมูลไก่แล้วนำกลับไปเสริมในอาหารเลี้ยงไก่พันธุ์ white leghorns แล้วพบว่าช่วยปรับปรุงน้ำหนักตัว ลดการตาย ลดการติดเชื้อ *Sal. enterica* ในม้ามและต่อมไทมัส และตรวจพบสาร proinflammatory cytokine ชนิด interleukin 1 β ในลำไส้ลดลง

ผลการศึกษาในครั้งนี้ *E. faecium* LH5 ผลิตสารกาบ่าได้ในปริมาณ 39 mg/L จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลผลิตที่ได้ยังอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดอื่นที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม สภาวะดังกล่าวอาจไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารกาบ่า โดยจากรายงานที่ผ่านมา *E. faecium* BS5 ซึ่งถูกคัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมของประเทศอินเดียได้ถูกรายงานว่ามีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและผลิตสารกาบ่าได้ (Bs et al., 2021) ในขณะที่ *E. avium* JS-N6B4 ที่แยกจากแมลงที่เป็นอาหารมนุษย์ (Jo et al., 2019) และ *E. avium* GL1 ที่คัดแยกได้จากเครื่องดื่ม Daqu ของประเทศจีน (Li et al., 2024) เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสารกาบ่าได้ในปริมาณสูงมากถึง 13.68 และ 206 g/L ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นที่มีศักยภาพผลิตสารกาบ่าได้ในปริมาณสูงและผ่านการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น *Weissella confusa* G2 (246.2 mg/L) แยกได้จากถั่วเขียวหมักของประเทศอินเดีย (Devi et al., 2023) และ *Levilactobacillus brevis* ในปริมาณ 4 -8 g/L ด้วย conversion ratio สูงถึงร้อยละ 89 (Casertano et al., 2024) แต่อย่างไรก็ตาม ข้อได้เปรียบของ *E. faecium* LH5 จากงานครั้งนี้ในการประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่คือเป็นโพรไบโอติกที่มีโอกาสรอดชีวิตสูงและเจริญในทางเดินอาหารของไก่ควบคู่กับการผลิตสารกาบ่าดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว



ภาพที่ 12 การวิเคราะห์การผลิตสารกาบ่า ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากระบบทางเดินอาหารไก่ โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง



ภาพที่ 13 สันฐานวิทยาของโคโลนี *Enterococcus faecium* LH5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรแข็ง (A) สันฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (B) และลำดับยีน 16S rRNA แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *E. faecium* LH5 กับสายพันธุ์ของสปีชีส์ที่เกี่ยวข้อง (C)

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตชีวมวลของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ผลการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของเชื้อ *E. faecium* LH5 ดังตารางที่ 11 พบว่าชุดการทดลอง ที่ 11 มีการเจริญสูงที่สุดที่ 9.07 ± 0.01 logCFU/ml และจากการวิเคราะห์ ANOVA แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (model) และความสมรูปของแบบจำลอง (lack of fit) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecium* มากที่สุดคืออุณหภูมิ โดยมีค่า p -value เท่ากับ 0.0062 โดยปัจจัยที่ให้ผลเชิงลบคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต แสดงดังตารางที่ 12

ส่วนปัจจัยเชิงบวกคือ อุณหภูมิ และปริมาณของกลูโคส ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสและโมโนโซเดียมกลูตาเมต มีความสัมพันธ์เชิงลบ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.8304 ในส่วนของอุณหภูมิมีความสัมพันธ์เชิงบวกทั้งปริมาณกลูโคส และโมโนโซเดียมกลูตาเมต โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0196 และ 0.2943 ตามลำดับ จากความสมรูปแบบจำลองมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ บ่งบอกถึงความผิดปกติของโมเดล ซึ่งอาจจะเกิดจากการประมวลผลที่มีความคลาดเคลื่อนสูง ดังภาพที่ 14 แสดงกราฟพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ (Response Surface Quadratic) แสดงสภาวะต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *E. faecium* สูงสุดที่อุณหภูมิ 21.971 องศาเซลเซียส ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส 15.063 กรัม และปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต 2.951 กรัม มีความแปรปรวนของการตอบสนองอธิบายได้ด้วยค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) บ่งบอกว่าค่าเฉลี่ยโดยรวมสามารถทำนายการตอบสนองอยู่ที่ 0.9100 แสดงดังตารางที่ 13 ซึ่งบ่งชี้ว่าสามารถอธิบายความแปรปรวนของการตอบสนองได้ร้อยละ 91.00 ซึ่งแสดงสมการ ดังนี้

$$Y = 9.02 + 0.5296A + 0.2365B - 0.0123C + 0.5850AB + 0.2200BC + 0.2200AC - 1.19A^2 - 0.2743B^2 + 0.0638C^2$$

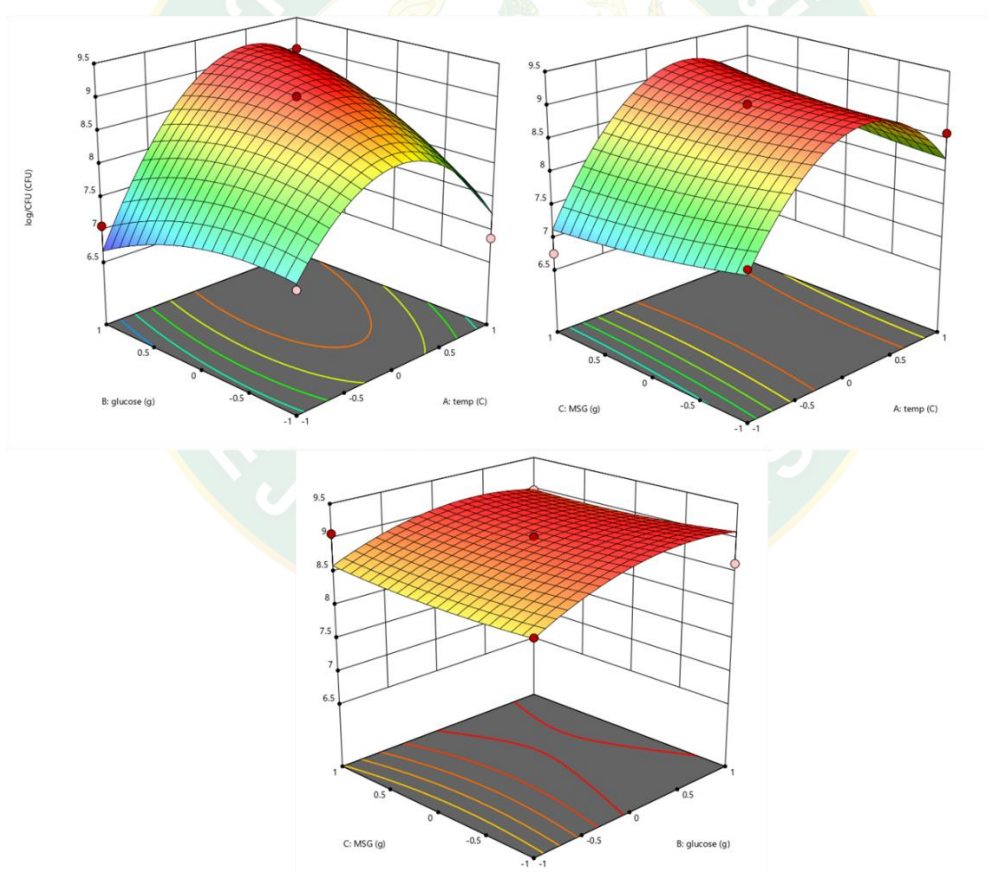
เมื่อ y = จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/ml), A =อุณหภูมิ, B =ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส, C =ปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าอุณหภูมิส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ *E. faecium* เมื่อใช้อุณหภูมิที่ต่ำในการเพาะเลี้ยงทำให้มีผลผลิตของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น และปริมาณของน้ำตาลกลูโคส และโมโนโซเดียมกลูตาเมต อาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งคาร์บอนของการเจริญของเชื้อ *E. faecium*

ตารางที่ 11 แผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design ของทั้ง 3 ปัจจัย

ชุดการทดลอง	ปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การเจริญของเชื้อ (logCFU/ml $\pm$ SD) *
1	0.03	0.3	25	7.28 $\pm$ 0.07
2	3	0.3	25	6.87 $\pm$ 0.01
3	0.03	0.9	25	7.07 $\pm$ 0.02
4	3	0.9	25	8.99 $\pm$ 0.02
5	0.03	0.6	10	7.67 $\pm$ 0.07
6	3	0.6	10	8.59 $\pm$ 0.04
7	0.03	0.6	40	6.75 $\pm$ 0.01
8	3	0.6	40	7.70 $\pm$ 1.14
9	1.515	0.3	10	8.55 $\pm$ 0.02

ชุดการทดลอง	ปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การเจริญของเชื้อ (logCFU/ml $\pm$ SD) *
10	1.515	0.9	10	8.63 $\pm$ 0.04
11	1.515	0.3	40	9.07 $\pm$ 0.03
12	1.515	0.9	40	8.96 $\pm$ 0.14
13	1.515	0.6	25	9.00 $\pm$ 0.03
14	1.515	0.6	25	9.03 $\pm$ 0.01
15	1.515	0.6	25	9.01 $\pm$ 0.11
16	1.515	0.6	25	9.00 $\pm$ 0.01
17	1.515	0.6	25	9.02 $\pm$ 0.01



ภาพที่ 14 กราฟพื้นที่ผิวแสดงความสัมพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecium*

เมื่อ A: อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเชื้อ

B: ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

C: ความเข้มข้นของปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมต

ตารางที่ 12 การประมาณค่าสัมประสิทธิ์โดยใช้แบบจำลองการถดถอย

Independent variables (parameter)	Coefficient	Standard error	Significant value (p-value)
Intercept	9.02	0.1736	
A-Temp	0.5296	0.1373	0.0062
B-Glucose	0.2365	0.1373	0.1285
C-MSG	-0.0123	0.1373	0.9309
AB	0.5850	0.1941	0.0196
AC	0.2200	0.1941	0.2943
BC	-0.0432	0.1941	0.8304

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) สำหรับการถดถอยแบบจำลอง (model regression)

Source	SS	DF	MS	F-value	Significant value (p-value)
Model	10.66	9	1.18	7.86	0.0063
Residual	1.05	7	0.1507		
Lack of fit	1.05	3	0.3515	3171.60	<0.0001
Pure Error	0.0004	4	0.0001		
Total	11.72	16			
$R^2 = 0.9100$					

SS= Sum of squares, DF= Degrees of freedom, MS= Mean square

4. ทดสอบขยายการผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากการทดสอบการขยายการผลิตมวลเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 700 มิลลิลิตร และ 3.5 ลิตรในถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ภาพที่ 15) ผลจากการหมักทั้ง 2 แบบ พบว่าการเจริญของเชื้อ *E. faecium* LH5 ซึ่งแสดงการเจริญจากการวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ที่เวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ ส่วนจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย ($\log CFU/ml$) แสดงในตารางที่ 14 ผลการทดลองพบว่าการเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ exponential phase โดยใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมง ด้วยการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีปริมาตรอาหาร 3.5 ลิตร ซึ่งเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดดูแรนที่มีปริมาตรอาหาร 700 มิลลิลิตร ที่ใช้เวลานานถึง 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การเจริญของแบคทีเรียการเพาะเลี้ยงทั้งสองระดับเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 9 เช่นเดียวกัน และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใกล้เคียงกัน ประมาณ 9 $\log CFU/ml$ แสดงดังภาพที่ 16 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการหมักเพื่อผลิตชีวมวล *E. faecium* LH5 ในขนาดอาหารทั้งสองระดับใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามการ

หมักด้วยถังหมักชีวภาพสามารถผลิตมวลเซลล์ได้มากกว่าในแง่ของผลได้ต่อหน่วยเวลา (productivity) ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากถึงปฏิกรณ์ชีวภาพช่วยรักษาให้สภาวะแวดล้อมไม่ว่าจะเป็น pH และอุณหภูมิให้คงที่ แบคทีเรียจึงสามารถปรับตัวและเจริญได้รวดเร็วขึ้น และอาจมีหลายสาเหตุในระหว่างการหมักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของพลศาสตร์ของโพลีไดแก ความหนาแน่น ความดัน ความตึงผิวและความหนืด พฤติกรรมของของโพลีไดแกทั้งที่อยู่นิ่งและเคลื่อนที่ ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ การเลือกความเร็ว และการออกแบบไบโพรดักที่เหมาะสมจึงจำเป็นต่อกระบวนการหมักจุลินทรีย์ ดังนั้น ความเข้าใจเกี่ยวกับพลวัตจลนศาสตร์ระหว่างการขยายเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง (Ziadi et al., 2020)

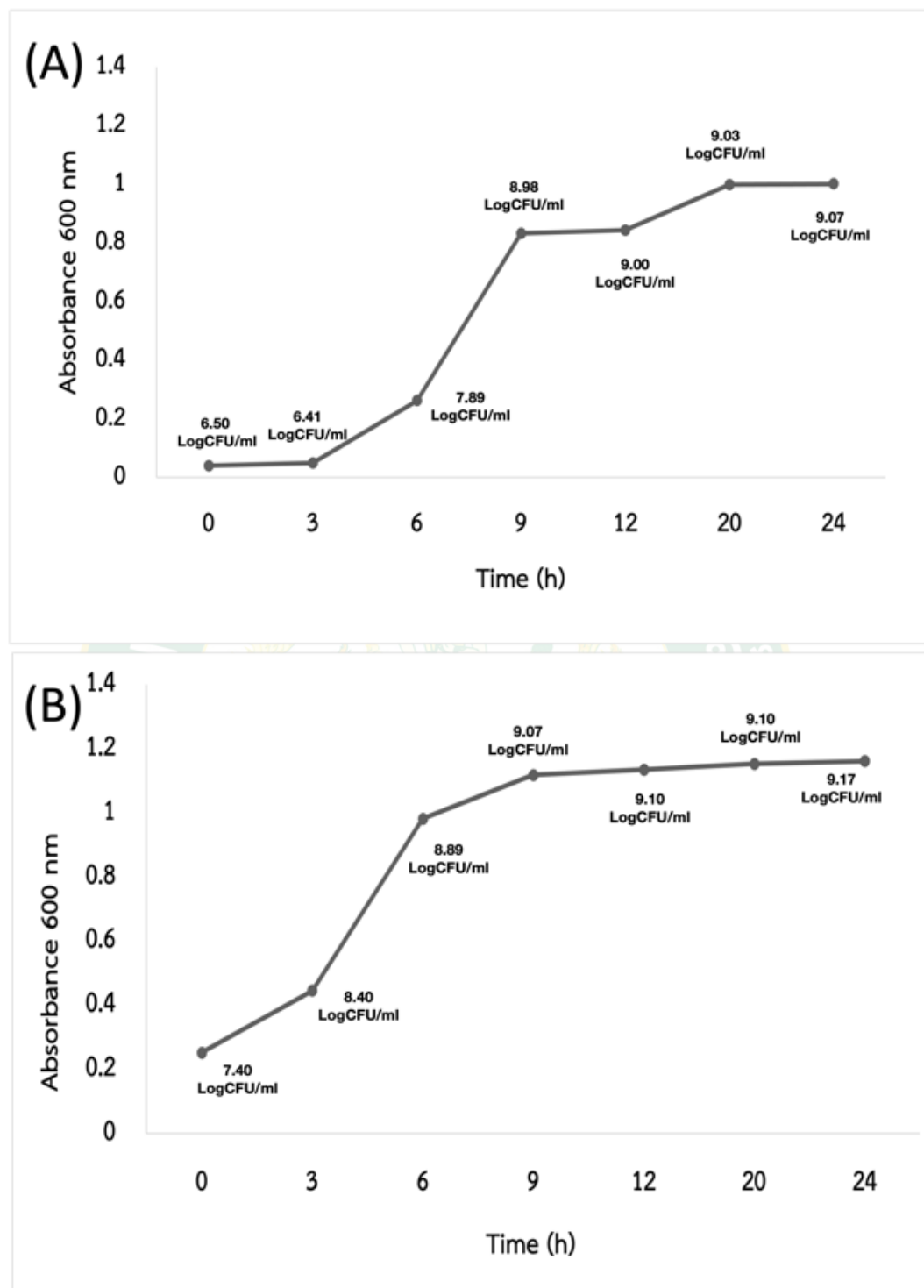


ภาพที่ 15 ถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตรสำหรับการผลิตมวลเซลล์ของ *E. faecium* LH5

ตารางที่ 12 จำนวนเซลล์มีชีวิตและค่าดูดกลืนแสงของขวดปริมาตร 700 มิลลิลิตร และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตร 3.5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตร 3.5 ลิตร		ปริมาตร 700 มิลลิลิตร	
	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	A ₆₀₀	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	A ₆₀₀
	(logCFU/ml)		(logCFU/ml)	
0	7.40±0.61	0	6.50±0.17	0.040
3	8.40±0.61	0.141	6.41±0.10	0.049
6	8.89±0.01	0.720	7.89±0.13	0.262
9	9.07±0.03	0.857	8.98±0.02	0.832
12	9.12±0.06	0.902	9.00±0.01	0.843
18	9.10±0.02	0.921	9.03±0.01	0.999
24	9.17±0.92	0.924	9.07±0.01	1.001

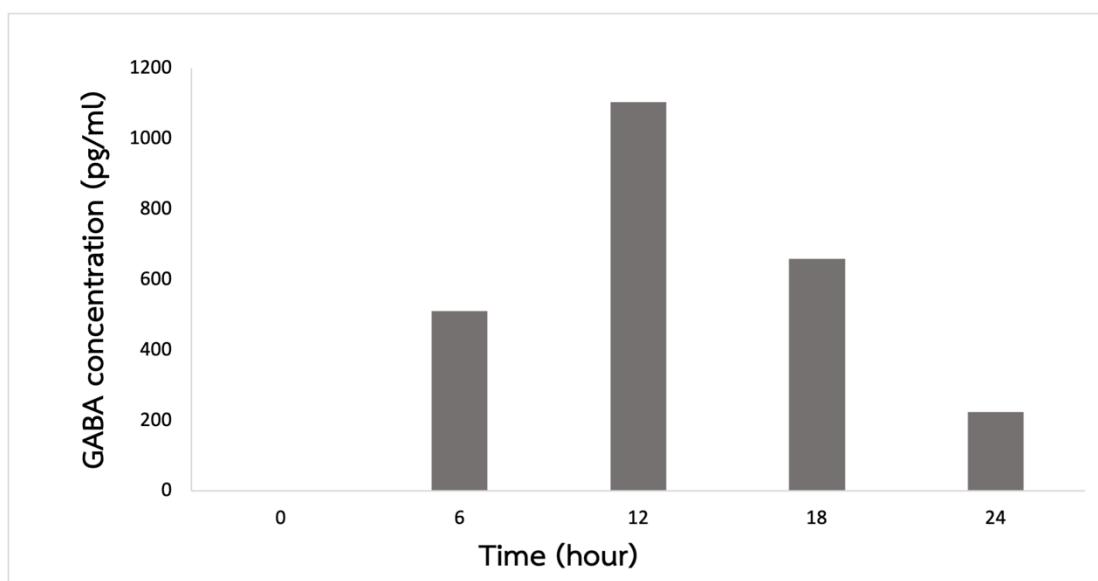
หมายเหตุ “*” ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 16 การเจริญของแบคทีเรีย *E. faecium* LH5 จากการวัดค่าความขุ่น (A_{600}) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาณ 700 มิลลิลิตร (A) และ 3.5 ลิตร (B)

นอกจากนี้ ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณของสารกาบ้าด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปซึ่งใช้หลักการของ ELISA พบว่า *E. faecium* LH5 สามารถผลิตสารกาบ้าได้สูงที่สุดที่ 1103.62 pg/ml ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงผลการ

วิเคราะห์นี้ แสดงดังภาพที่ 17 ดังสมการกราฟเส้นตรง $y = -0.0008x + 1.4759$ และ $R^2 = 0.6833$ พบปริมาณสารกาบ้าที่ผลิตขึ้นต่ำกว่าที่ตรวจพบได้ในขั้นตอนการคัดเลือกเป็นอย่างมาก ซึ่งความแตกต่างนี้เนื่องมาจากวิธีการทดสอบที่ต่างกัน และอาจเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารกาบานั้น แต่การเจริญที่รวดเร็วแบคทีเรียอาจนำโมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นอีกแหล่งหนึ่งของสารอาหารเพื่อการเจริญ ไม่เอื้อต่อการแสดงออกของเอนไซม์ GAD ทำให้การผลิตสารกาบลดลง (Castanie-Cornet and Foster, 2001)

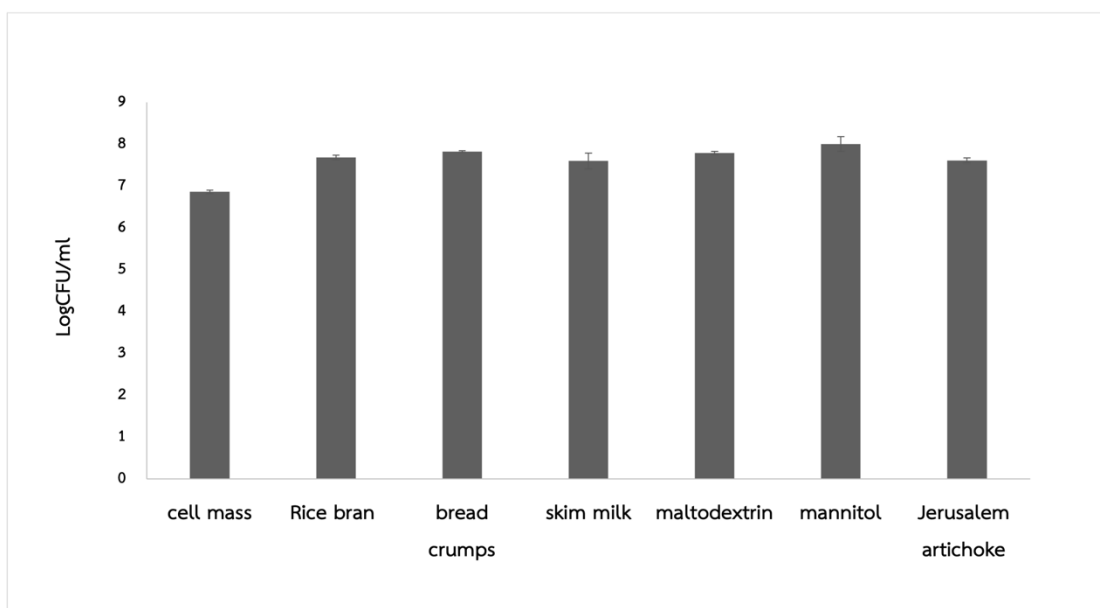


ภาพที่ 17 ปริมาณการผลิตสารกาบ้าของเชื้อจุลินทรีย์ *E. faecium* LH5

5. ศึกษากระบวนการทำแห้งของชีวมวลโพรไบโอติกและการทดสอบอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสื่อ (carrier) ชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลีพันธุ์หอมมะลิ เศษขนมปังบด หางนม มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) และผงแกนตะวัน ในการลดอัตราการตายของเซลล์แบคทีเรีย *E. faecium* LH5 ระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นประมาณ $6-7 \log\text{CFU}$ เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งพบว่า มอลโทเดกซ์ทรินมีประสิทธิภาพเป็นสารปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุด โดยที่ $7.83 \log\text{CFU/g}$ ซึ่งสูงกว่าการทำแห้งเซลล์อิสระที่ปราศจากการปกป้องด้วยสารสื่ออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 18 อย่างไรก็ตามผลจากการใช้สารสื่อชนิดอื่นๆ ไม่ได้ต่ำกว่าผลจากการใช้มอลโทเดกซ์ทรินอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และเนื่องจากในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะสำหรับใช้ในอาหารไก่ไข่ รำข้าวจึงเป็นสารสื่อที่น่าสนใจอย่างมากในการใช้เป็นสารสื่อปกป้องเซลล์ในกระบวนการทำแห้งเซลล์โพรไบโอติก ทั้งในแง่ของราคาและสารอาหารด้วยที่ให้ประโยชน์ต่อการเจริญของไก่ด้วย รำข้าวอุดมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายจึงใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงไก่และสัตว์อีกหลายชนิด งานวิจัยของ Wang et al. (2023)

โดยนำรำข้าวที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยความร้อนเป็นอาหารเสริมของไก่ไข่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตและการย่อยสลายอาหารในไก่ไข่ สามารถควบคุมการเผาผลาญของร่างกายผ่านทางกรดอะมิโน พลังงาน และการเผาผลาญไขมัน ซึ่งอาจปรับปรุงการย่อยสลายอาหารที่ชัดเจนและประสิทธิภาพการผลิตของไก่ไข่ได้ดียิ่งขึ้น



ภาพที่ 18 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกภายใต้สารสื่อชนิดต่างๆหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ลักษณะของมวลเซลล์สดของ *E. faecium* LH5 และที่ผ่านการทำแห้ง แสดงดังภาพที่ 19 โดยพบว่าเซลล์มีการรอดชีวิตภายหลังการทำแห้งร้อยละ 86.54 (คำนวณจากหน่วย logCFU) และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นในผงโพรไบโอติก 9.17 logCFU/g ต่อมาเมื่อเก็บรักษาผงโพรไบโอติกภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องพบว่าเซลล์ค่อนข้างมีความเสถียรและรอดชีวิตสูง มีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพียงเล็กน้อยตลอดการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการลดลงในระดับไม่เกิน 0.5 logCFU ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 15 คิดเป็นร้อยละการรอดชีวิต 95.39 ± 0.07 และ 94.15 ± 0.19 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นในผงโพรไบโอติก อีกทั้งแม้พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในผงโพรไบโอติกแต่ละสัปดาห์ที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสูงกว่าผงโพรไบโอติกที่เก็บในอุณหภูมิห้อง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงของความชื้นในผงผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 พบว่าปริมาณของความชื้นในผงโพรไบโอติกเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มสูงขึ้น ความชื้นที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญได้บ้างภายใต้สภาวะที่มีอาหารและความชื้นที่เพียงพอและเป็นสัญญาณถึงการซึมผ่านของออกซิเจนเข้ามายังผงผลิตภัณฑ์ด้วย และเร่งการเสื่อมเสียจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาให้เร็วขึ้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ตามมา อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเพียงพอในการคงสภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก *E. faecium* LH5 ได้และอุณหภูมิที่

เหมาะสมในการเก็บรักษาคือที่ 4 องศาเซลเซียส และที่สำคัญที่สุด ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเมื่อนำไปใช้งานผสมในอาหารสัตว์แล้ว ต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรวมกันไม่น้อยกว่า 10^5 CFU ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลงวันที่ 21 พฤศจิกายน 2559 เรื่อง “กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์” ทั้งนี้ มีรายงานว่า *E. faecium* แบคทีเรียที่ทนต่อความร้อนได้ดีโดยสามารถทนอุณหภูมิการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 62.5 องศาเซลเซียสได้นานถึง 20 นาที (Martínez et al., 2003; Špelina et al., 2007) จึงทำให้ยังคงพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่สูงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ประกอบกับ *E. faecium* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe ซึ่งแม้เจริญได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน แต่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อยก็ยังสามารถเจริญได้แต่ไม่สูงมาก (Kalode and Patil, 2023) ออกซิเจนเป็นสาเหตุการตายของโพรไบโอติกหลายชนิดด้วย เพราะออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียกลุ่ม obligate anaerobe ซึ่งไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญโดยทำให้เกิดการสะสมของ O_2^- , OH^- และ H_2O_2 ขึ้นภายในเซลล์แต่ไม่มีกลไกที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด reactive oxygen species เหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่า H_2O_2 ขัดขวางกิจกรรมของ fructose-6-phosphofructotransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาล (Cruz et al., 2009) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่านอกจาก *E. faecium* LH5 มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกที่ผลิตสารกาบ้าได้แล้วยังมีความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกที่มีความคงตัวสูง ความคงตัวของโพรไบโอติก *E. faecium* LH5 นี้อาจเป็นผลเชิงบวกมาจากรำข้าวที่ผสมเป็นสารสื่อ (carrier) ในการทำแห้งด้วย เนื่องจากรำข้าวมีสารพฤกษเคมี (phytochemicals) หลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation activity) ไม่ว่าจะเป็นวิตามิน E สาร tocotrienols สาร γ -oryzanol และสารประกอบฟีนอลิก เช่น coumaric acid, ferulic acid และ syringic acid เป็นต้น (Gul et al., 2015)

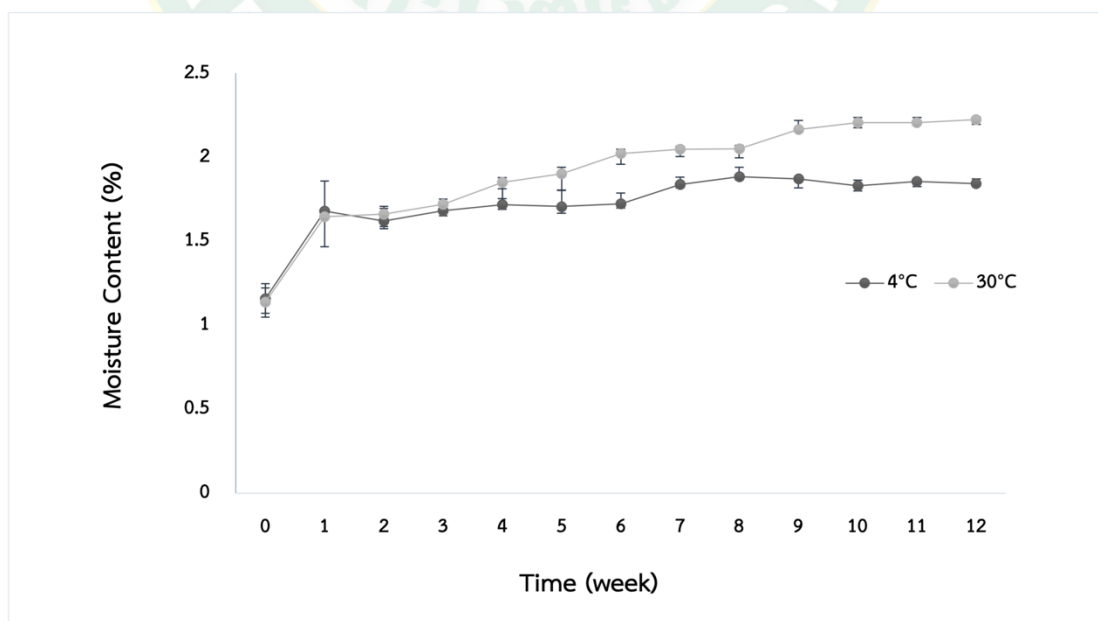


ภาพที่ 19 ชีวมวลของโพรไบโอติกของ *E. faecium* LH5 (A) มวลเซลล์สด และ (B) ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ตารางที่ 13 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโพรไบโอติก *E. faecium* LH5 ในรูปแบบผงหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เวลา (สัปดาห์)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (logCFU/g)	
	4°C	อุณหภูมิห้อง (30°C)
0	8.89 ± 0.05 ^f	8.89 ± 0.02 ^d
1	8.76 ± 0.60 ^{ef}	8.70 ± 0.01 ^{cd}
2	8.75 ± 0.01 ^e	8.67 ± 0.01 ^{bcd}
3	8.63 ± 0.02 ^{cd}	8.56 ± 0.02 ^{abc}
4	8.67 ± 0.06 ^{de}	8.51 ± 0.04 ^{abc}
5	8.59 ± 0.01 ^{bcde}	8.51 ± 0.03 ^{abc}
6	8.54 ± 0.06 ^{abcd}	8.40 ± 0.13 ^{ab}
7	8.41 ± 0.10 ^{ab}	8.42 ± 0.16 ^{abc}
8	8.50 ± 0.03 ^{abcd}	8.40 ± 0.12 ^{ab}
9	8.39 ± 0.09 ^a	8.46 ± 0.12 ^{abc}
10	8.40 ± 0.10 ^a	8.34 ± 0.07 ^a
11	8.46 ± 0.04 ^{abc}	8.37 ± 0.11 ^a
12	8.48 ± 0.07 ^{abcd}	8.39 ± 0.19 ^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษรยกกำลังที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ค่าเฉลี่ยระหว่างอุณหภูมิ 2 แบบในแต่ละสัปดาห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยการทดสอบ t-test



ภาพที่ 20 ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกภายใต้สภาวะการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 สัปดาห์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารไก่ไข่ที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก และสามารถผลิตสารกาบ้าได้ พบว่า *E. faecium* LH5 เป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพการเป็นโพรไบโอติก โดยไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง สามารถทนน้ำดี และสามารถเกาะกลุ่มเองได้ดี ไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *Sal. Typhi* และ *S. aureus* ได้ และสามารถผลิตสารกาบ้าได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตมวลเซลล์ของ *E. faecium* LH5 คือที่อุณหภูมิ 21.9 องศาเซลเซียส ปริมาณของน้ำตาลซูโครส 15.1 กรัมต่อลิตร และปริมาณของโมโนโซเดียมกลูตาเมต 2.9 กรัมต่อลิตร ผลผลิตชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระดับห้องปฏิบัติการและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพไม่แตกต่างกัน และรำข้าวเป็นสารห่อหุ้มที่ถูกคัดเลือกนำมาใช้เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ *E. faecium* LH5 ระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อผลิตผงผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษาผงโพรไบโอติกภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือนมีอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองทั้งหมด ชี้ให้เห็นว่า *E. faecium* LH5 มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก สามารถเพิ่มกำลังขยายผลิตชีวมวล และขึ้นรูปเป็นผงที่เก็บรักษาได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ สามารถต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมในไก่ไข่ต่อไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าในเชิงพาณิชย์ และยังสามารถพัฒนานวัตกรรมจากผลงานวิจัยเพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศ

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็น โพรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่. ปรินญาณพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- กัญญาณัฐ กิตติวงศ์ และ กรรณิกา แซ่ลิว. (2562). การผลิตและการตลาดไข่ไก่ในประเทศไทย. แก่นเกษตร, 47, 889-894.
- ประภากร ธาราฉาย. 2560. โรคสัตว์ปีกและการป้องกัน. สัตวศาสตร์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- วัชรวัฒน์ ครองเคหา. (2565). การคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารกาบาจากอาหารหมัก. วารสารวิชาการ มทร. สุวรรณภูมิ, 10(1), 66-77.
- เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ. (2546). การพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ไก่กระดุกดำ: รายงานการวิจัย (ฉบับสมบูรณ์)/ เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ. เชียงใหม่ มูลนิธิโครงการหลวง.
- ไชยวัฒน์ ไชยสุด. 2556. โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. นทบุรี : โรงพิมพ์ สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- Badruzzaman, A., Noor, M., Mamun, M., Husna, A., Islam, K., Alam, K., & Rahman, M. (2015). Prevalence of diseases in commercial chickens at Sylhet Division of Bangladesh. *International Clinical Pathology Journal*, 1(5), 00023.
- Bernal-Castro, C., Espinosa-Poveda, E., Gutiérrez-Cortés, C., & Díaz-Moreno, C. (2024). Vegetable substrates as an alternative for the inclusion of lactic acid bacteria with probiotic potential in food matrices. *Journal of Food Science and Technology*, 61(5), 833-846.
- Blajman, J., Gaziano, C., Zbrun, M. V., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Scharpen, A. R., Signorini, M., & Frizzo, L. (2015). In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 101, 50-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.017>
- Bodman-Harris, O., Rollier, C. S., & Iqbal, M. (2024). Approaches to Enhance the Potency of Vaccines in Chickens. *Vaccines*, 12(12), 1337.
- Botthoulath, V., Upaichit, A., & Thumarat, U. (2018). Identification and in vitro assessment of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* SKI19, a bacteriocinogenic strain isolated from Thai fermented pork sausage. *Journal of food science and technology*, 55, 2774-2785.
- Bs, S., Thankappan, B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Femil Selta, D. R., & Angayarkanni, J. (2021). Evaluation of GABA production and probiotic activities

- of *Enterococcus faecium* BS5. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13, 993-1004.
- Carvajal, E., Contreras, S., Díaz, W., Martinez-Bello, D., McCown, M., Ardila, Y., & Vásquez, M. C. (2023). Enterococcus isolated from poultry intestine for potential probiotic use. *Veterinary World*, 16(8), 1605.
- Casertano, M., Fryganas, C., Valentino, V., Troise, A., Vitaglione, P., Fogliano, V., & Ercolini, D. (2024). Gut production of GABA by a probiotic formula: An in vitro study. *Beneficial Microbes*, 15(1), 67-81.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E., Sousa, A. L. O., Faria, J. A., & Saad, S. M. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42(9), 1233-1239.
- Devi, P. B., Rajapuram, D. R., Jayamanohar, J., Verma, M., Kavitate, D., Avany, B. A. M., Rani, P. U., Ravi, R., & Shetty, P. H. (2023). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production by potential probiotic strains of indigenous fermented foods origin and RSM based production optimization. *Lwt*, 176, 114511.
- Edalatian Dovom, M. R., Habibi Najafi, M. B., Rahnema Vosough, P., Norouzi, N., Ebadi Nezhad, S. J., & Mayo, B. (2023). Screening of lactic acid bacteria strains isolated from Iranian traditional dairy products for GABA production and optimization by response surface methodology. *Scientific Reports*, 13(1), 440.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35-S50. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., & Rumyan, N. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 84-91.
- Gharajalar, S. N., Mirzai, P., Nofouzi, K., & Madadi, M. S. (2020). Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* on Newcastle disease vaccination in chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 72, 101520.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17(2), 259-275.

- Gul, K., Yousuf, B., Singh, A., Singh, P., & Wani, A. A. (2015). Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(1), 24-30.
- Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and infection*, 2(8), 907-913.
- Han, J., Zhao, X., Zhao, X., Wang, Q., Li, P., & Gu, Q. (2023). Microbial-Derived γ -Aminobutyric Acid: Synthesis, Purification, Physiological Function, and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(41), 14931-14946.
- Hervo, F., Létourneau-Montminy, M.-P., Méda, B., & Narcy, A. (2024). Effect of limestone particle size and microbial phytase on phosphorus and calcium digestion kinetics along the gastrointestinal tract in laying hens. *British Poultry Science*, 65(5), 605-614.
- Hidayat, M. N., Malaka, R., Agustina, L., & Pakiding, W. (2018). Characteristics isolate bacteria lactic acid of origin digestive tract of broiler as probiotic candidate for poultry. *Int. J. Sci. Eng. Res*, 9(2), 1787.
- Huang, X., Gao, Y., Chen, W., Hu, Q., He, Z., Wang, X., Li, D., & Lin, R. (2022). Dietary variety relates to gut microbiota diversity and abundance in humans. *European Journal of Nutrition*, 61(8), 3915-3928.
- Jia, W., Xie, G., & Jia, W. (2018). Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 15(2), 111-128.
- Jo, M.-H., Hong, S.-J., Lee, H.-N., Ju, J.-H., Park, B.-R., Lee, J.-h., Kim, S.-A., Eun, J.-B., Wee, Y.-J., & Kim, Y.-M. (2019). Gamma-aminobutyric acid production from a novel *Enterococcus avium* JS-N6B4 strain isolated from edible insects.
- Kierończyk, B., Pruszyńska-Oszmałek, E., Świątkiewicz, S., Rawski, M., Długosz, J., Engberg, R., & Józefiak, D. (2016). The nisin improves broiler chicken growth performance and interacts with salinomycin in terms of gastrointestinal tract microbiota composition. *J. Anim. Feed Sci*, 25(4), 309-316.
- Kim, Y. B., Park, J., Lee, H.-G., Song, J.-Y., Kim, D.-H., Ji, W., Joo, S. S., Kim, M., Jung, J. Y., & Kim, M. (2024). Dietary probiotic *Lactobacillus paracasei* NSMJ56 modulates gut immunity and microbiota in laying hens. *Poultry science*, 103(4), 103505.
- Klimko, A. I., Cherdyntseva, T. A., Brioukhanov, A. L., & Netrusov, A. I. (2020). In vitro evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, 1139-1148.

- Li, T., Luo, B., Zou, X., Yin, J., Lv, S., Wang, J., & Gong, L. (2024). *Enterococcus avium* from a traditional Chinese liquor fermentation system with the potential for the de novo synthesis of GABA. *Lwt*, 206, 116560.
- Luo, H., Liu, Z., Xie, F., Bilal, M., Liu, L., Yang, R., & Wang, Z. (2021). Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 491-512. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1869688>
- Martínez, S., López, M., & Bernardo, A. (2003). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in applied microbiology*, 37(6), 475-481.
- Mench, J., Sumner, D., & Rosen-Molina, J. (2011). Sustainability of egg production in the United States—The policy and market context. *Poultry science*, 90(1), 229-240.
- Meng, Q., Yan, L., Ao, X., Zhou, T., Wang, J., Lee, J., & Kim, I. (2010). Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *Journal of animal science*, 88(10), 3320-3326.
- Mohamad, N., Manan, H., Sallehuddin, M., Musa, N., & Ikhwanuddin, M. (2020). Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as potential probiotics. *Aquaculture reports*, 18, 100523.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Morgan, N., Walk, C., Bedford, M., & Burton, E. (2014). The effect of dietary calcium inclusion on broiler gastrointestinal pH: Quantification and method optimization. *Poultry science*, 93(2), 354-363.
- Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 501-508). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- Park, J., Jeong, J., Lee, S., & Kim, I. (2016). Effect of dietary supplementation with a probiotic (*Enterococcus faecium*) on production performance, excreta microflora, ammonia emission, and nutrient utilization in ISA brown laying hens. *Poultry science*, 95(12), 2829-2835.
- Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K., & Nadaf, A. (2018). Chapter 13 - γ -Aminobutyric Acid (GABA): Biosynthesis, Role, Commercial Production, and

- Applications. In R. Atta ur (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 57, pp. 413-452). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00013-2>
- Recoules, E., Lessire, M., Labas, V., Duclos, M. J., Combes-Soia, L., Lardic, L., Peyronnet, C., Quinsac, A., Narcy, A., & Réhault-Godbert, S. (2019). Digestion dynamics in broilers fed rapeseed meal. *Scientific Reports*, 9(1), 3052.
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R.-U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC microbiology*, 19, 1-20.
- Rodríguez-Sánchez, S., Fernández-Pacheco, P., Seseña, S., Pintado, C., & Palop, M. L. (2021). Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry. *LWT*, 143, 111142.
- Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 396.
- Shaji, S., Selvaraj, R. K., & Shanmugasundaram, R. (2023). Salmonella infection in poultry: a review on the pathogen and control strategies. *Microorganisms*, 11(11), 2814.
- Sharma, C., Gulati, S., Thakur, N., Singh, B. P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S. K., Puniya, A. K., Gill, J. P. S., & Panwar, H. (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech*, 7, 1-14.
- Sirisopapong, M., Shimosato, T., Okrathok, S., & Khempaka, S. (2023). Assessment of lactic acid bacteria isolated from the chicken digestive tract for potential use as poultry probiotics. *Animal bioscience*, 36(8), 1209.
- Smialek, M., Burchardt, S., & Koncicki, A. (2018). The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with *Campylobacter* spp.-Field study. *Research in Veterinary Science*, 118, 312-316.
- Špelina, V., Schlemmerová, L., Landfeld, A., Kýhos, K., Měřička, P., & Houška, M. (2007). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(5), 283.
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., & Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of dairy science*, 86, E52-E77.
- Talebi, A., Amani, A., Pourmahmod, M., Saghaei, P., & Rezaie, R. (2015). Synbiotic enhances immune responses against infectious bronchitis, infectious bursal

- disease, Newcastle disease and avian influenza in broiler chickens. *Veterinary Research Forum*,
- Tancharoenrat, P., Zaefarian, F., & Ravindran, V. (2022). Composition of chicken gallbladder bile. *British Poultry Science*, 63(4), 548-551.
- Tufail, T., Ain, H. B. U., Virk, M. S., Ashraf, J., Ahmed, Z., Khalil, A. A., Rasheed, A., & Xu, B. (2025). GABA (γ -aminobutyric acid) enrichment and detection methods in cereals: Unlocking sustainable health benefits. *Food Chemistry*, 464, 141750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141750>
- Työppönen, S., Petäjä, E., & Mattila-Sandholm, T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), 233-244. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00379-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00379-3)
- Wasti, S., Sah, N., & Mishra, B. (2020). Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals*, 10(8), 1266.
- Webster, A. J. (2001). Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *The veterinary journal*, 161(3), 229-237.
- Xu, Y., Li, D., Ding, X., Wang, Y., Liang, S., Xie, L., Zhang, Y., Fu, A., Yu, W., & Zhan, X. (2023). Probiotic characterization and comparison of broiler-derived lactobacillus strains based on technique for order preference by similarity to ideal solution analysis. *Poultry science*, 102(5), 102564.
- Yang, B., Huang, S., Zhao, G., & Ma, Q. (2022). Dietary supplementation of porcine bile acids improves laying performance, serum lipid metabolism and cecal microbiota in late-phase laying hens. *Animal Nutrition*, 11, 283-292.
- Yang, S.-Y., Lü, F.-X., Lu, Z.-X., Bie, X.-M., Jiao, Y., Sun, L.-J., & Yu, B. (2008). Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino acids*, 34, 473-478.
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>
- Zhou, X., Willems, R. J., Friedrich, A. W., Rossen, J. W., & Bathoorn, E. (2020). *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9, 1-13.
- Ziadi, M., M'Hir, S., Aydi, A., & Hamdi, M. (2020). Bioreactor scale-up and kinetic modeling of lactic acid and biomass production by *Enterococcus faecalis* SLT13 during batch culture on hydrolyzed cheese whey. *Journal of Chemistry*, 2020(1), 1236784.

Zommiti, M., Chevalier, S., Feuilleley, M. G., & Connil, N. (2022). Special issue “enterococci for probiotic use: Safety and risk”. In (Vol. 10, pp. 604): MDPI.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa, and Sharpe agar (MRS agar)

Peptone	10.0	g
Beef extract	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Glucose	20.0	g
Tween 80	1.0	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
Triammonium citrate	2.0	g
MgSO ₄ ·12H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄	0.2	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000	ml

ซั่งอาหารสำเร็จรูปสูตร De Man, Rogosa, and Sharpe agar 55.15 กรัม ปรับ pH เป็น 7.4 และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar)

Peptone Mixture	10.0	g
Beef Heart Infusion	10.0	g
Calf Brain Infusion	7.50	g
Dextrose	2.00	g
Disodium Phosphate	2.50	g
Sodium Chloride	5.0	g
Bacteriological Agar	15.0	g
Agar	15.0	g

ซั่งอาหารสำเร็จรูปสูตร Brain Heart Infusion Agar 37.0 กรัม และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. sheep blood agar

Tryptone	15.0	g
Phytone or soytone	5.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	18.0	g
Distilled water	1000	ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

จำแนกจุลินทรีย์โดยใช้ข้อมูลของลำดับเบสยีน rRNA ได้แก่ การสกัด DNA ของแบคทีเรีย ด้วยการเพิ่ม PCR product ให้บริสุทธิ์ และนำข้อมูลเทียบกับฐานข้อมูล

โปรแกรม PCR reaction (Primer 27F และ1492R)

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส 5 นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส 1 นาที 25 รอบ
Annealing	55 องศาเซลเซียส 1 นาที 25 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส 1 นาที 25 รอบ
Final Extension	72 องศาเซลเซียส 5 นาที
Set Hold	20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการ run gel-electrophoresis ดังนี้

1. นำ 1.5% agarose gel ปริมาณ 30 ml ไปหลอมด้วยไมโครเวฟ
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เจลมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส
3. เติม gel star ปริมาตร 1 µl/agarose gel 10 ml
4. เทเจลลงในแม่พิมพ์และเสียบขั้วลงไป เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยดตัวอย่าง
5. รอให้เจลแข็งและนำเจลไปป้อนไว้ที่มืด
6. เมื่อเจลแข็งให้ค่อยๆดึงหัวออกแล้วนำแผ่นเจลไปวางไว้ในเครื่อง electrophoresis
7. เติม TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล นำ marker และตัวอย่างมาหยอดลงในแต่ละ ช่องดังนี้
-marker: marker 1 µl+TAE buffer 4 µl+ loading dye 2 µl
-sample: DNA 3 µl+ loading dye 2 µl
8. ปิดฝาเครื่อง electrophoresis โดยตั้งค่าไว้ที่ 100v ให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปยัง ขั้วบวก
9. ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที จากนั้นปิดเครื่อง electrophoresis
10. นำแผ่นเจลไปวางบนเครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

นำผลของลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม bioEdit และเทียบกับ ฐานข้อมูล ใน NCBI ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต *E. faecium* LH5

TTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAAC
CGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACATTGGGACTGAGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCA
ATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT
GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT
GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG
AGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACG
CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCAC
TCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTC
AGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCGAAGT
CGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC
ATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารกาบ้า

การเตรียมสารเคมี

Borate buffer ความเข้มข้น 0.2 M pH 9.0

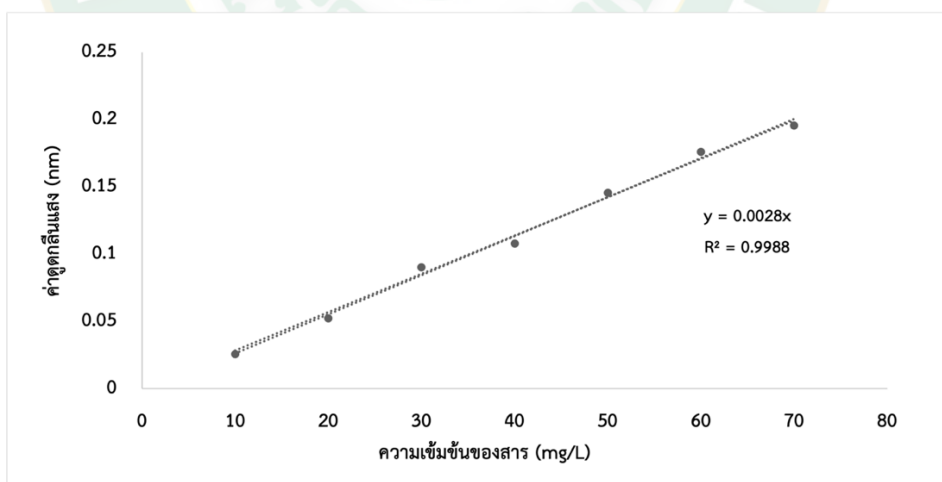
เตรียมสารละลาย 0.2 M Borate buffer pH 9.0 ปริมาตร 100 ml จากการชั่ง Boric Acid, (BH_3O_3 , MW 61.83 กรัม/โมล) 12.40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในเครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก แล้วจึงปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH ลงในสารละลาย boric acid จนกว่า pH เท่ากับ 9.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Phenol reagent ร้อยละ 6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง phenol (MW 94.11124 กรัม/โมล) 6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

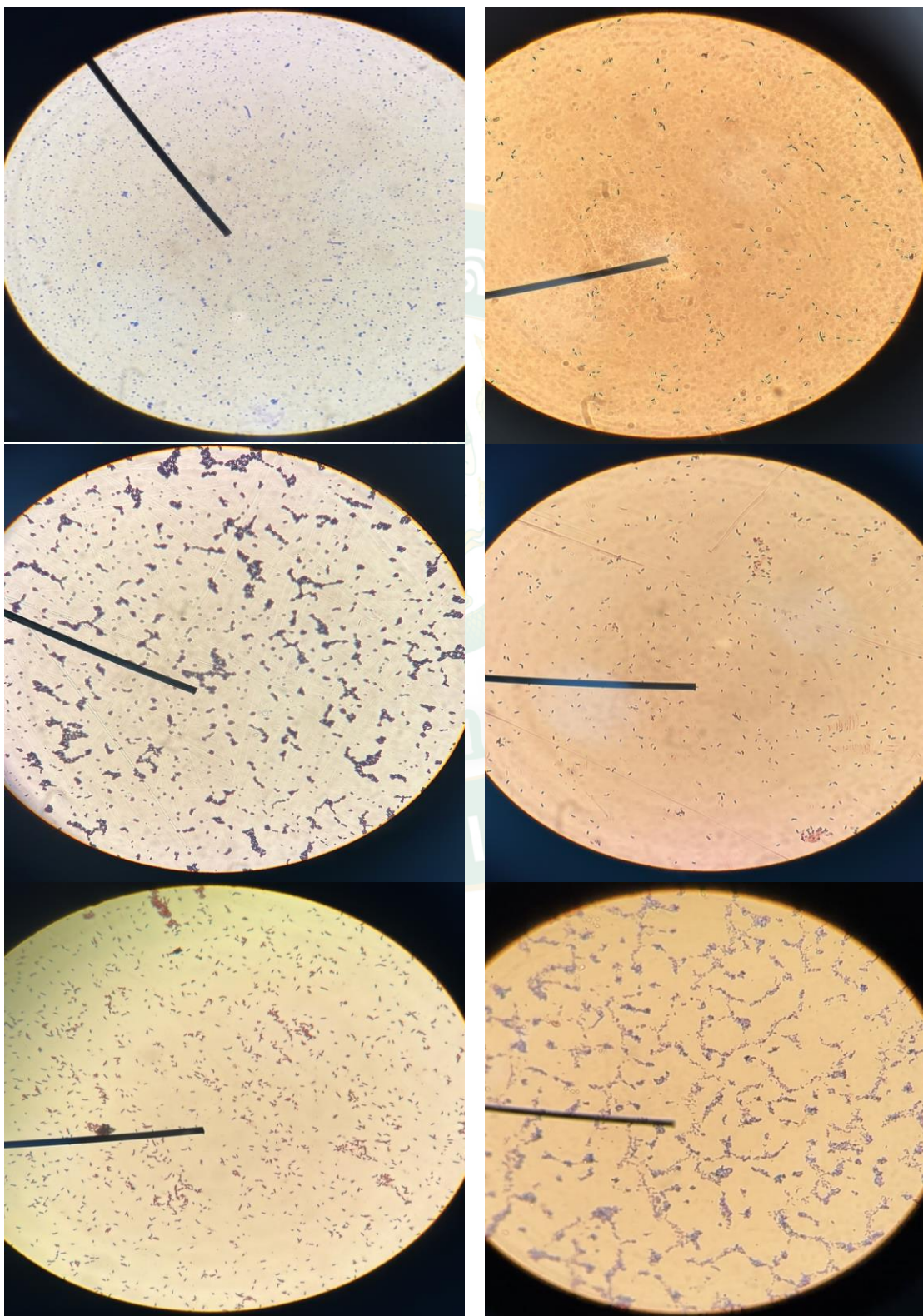
ขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานกาบ้า (stock solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

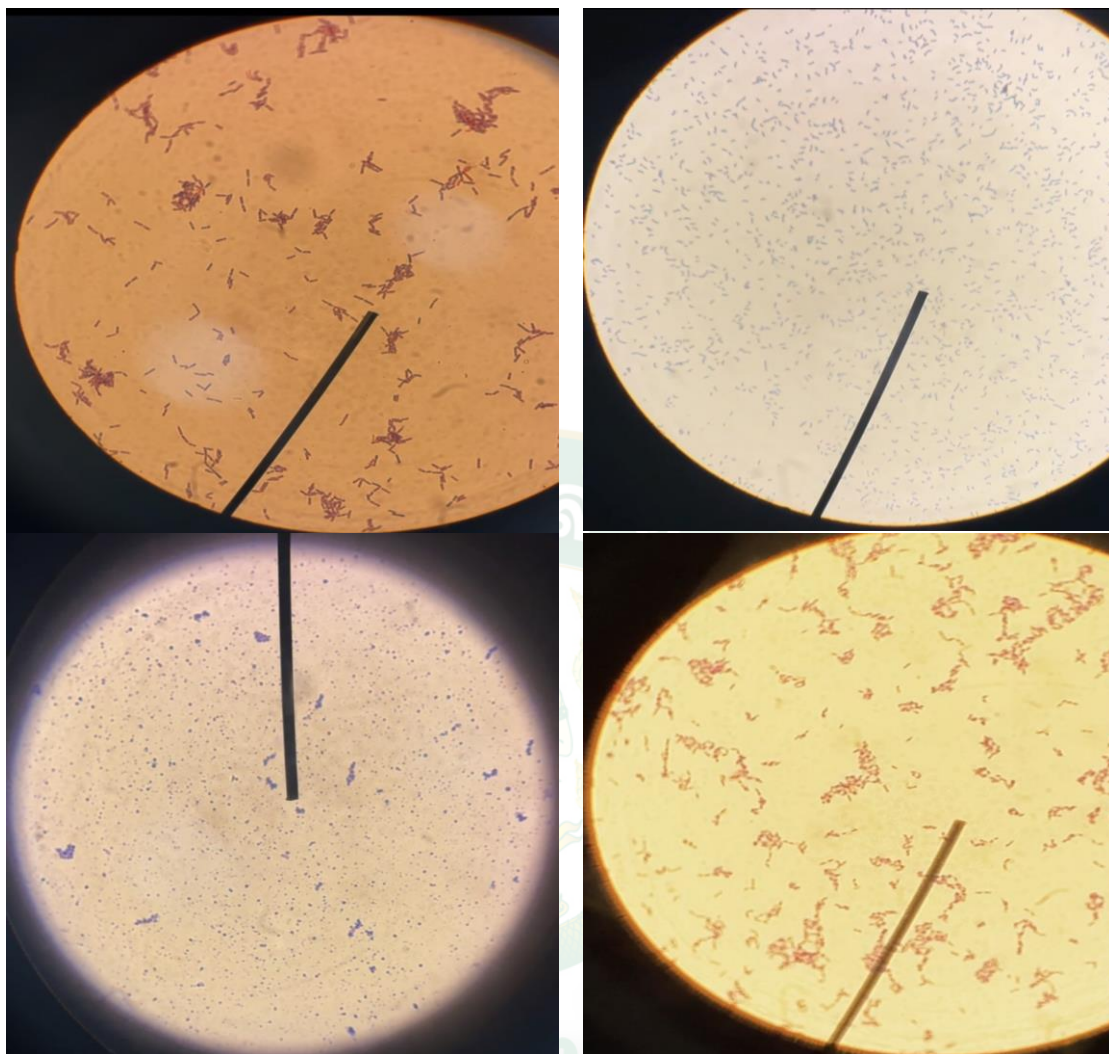
เตรียมสารละลายกาบ้ามาตรฐานจากกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (Gamma-aminobutyric acid, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2$) AR, assay 99%, MW 103.12 กรัม/โมล วิธีเตรียม ชั่งสารมาตรฐานกาบ้า 0.1000 g ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายกาบ้ามาตรฐาน ความเข้มข้น 10, 20 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยปิเปตต์สารละลายกาบ้ามาตรฐาน 100 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายกาบ้ามาตรฐาน ด้วยเทคนิคการดูดกลืนแสง A_{630}

ภาคผนวก ง
ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์





ภาพที่ 22 ภาพตัวอย่างลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	chonlada pathamma
เกิดเมื่อ	22 Dec 1998
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554-2560 มัธยมศึกษาจากโรงเรียนมหาไถ่ศึกษาเลย พ.ศ. 2560-2564 ปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2565-2568 ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ประวัติการทำงาน	เข้าร่วมงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งประเทศไทย (Thai Society for Biotechnology International Conference (TSB)) เรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถ ผลิตสารกาบ้าเพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ (Selection of probiotic bacteria capable of GABA production for the application as feed supplement in laying hens) วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่30(ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2568 เรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้าเพื่อ ประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ (Selection of probiotic bacteria capable of GABA production for the application as feed supplement in laying hens)