



การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยโซเดียมอัลจิเนต  
และโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัข  
ENCAPSULATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN SODIUM ALGINATE AND  
SODIUM ALGINATE-GOAT MILK FOR DOG SUPPLEMENT

งามลักษณ์ ฟุ้งสวาท

การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยโซเดียมอัลจีเนต  
และโซเดียมอัลจีเนตร่วมกับนมแพะ เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัข



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ENCAPSULATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN SODIUM ALGINATE AND  
SODIUM ALGINATE-GOAT MILK FOR DOG SUPPLEMENT



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยโซเดียมอัลจิเนต  
และโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับบนมแพะ เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัข

ของ

งามลักษณ์ พุ่งสวาท

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

|   |  |
|---|--|
| ..... ที่ปรึกษาหลัก                     | ..... ประธาน                                   |
| (รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)  | (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สุคนธ์สิงห์)   |
| ..... ที่ปรึกษาร่วม                     | ..... กรรมการ                                  |
| (รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริจุ) | (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์) |

|                      |  |
|----------------------|--|
| ชื่อเรื่อง           | การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยไฮเดียมอัลจิเนต และไฮเดียมอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัข |
| ผู้วิจัย             | งามลักษณ์ พึ่งสวาท   |
| ปริญญา               | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต   |
| ปีการศึกษา           | 2565   |
| อาจารย์ที่ปรึกษา     | รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ  |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งศิริ   |

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาลักษณะของโพรไบโอติกที่มีศักยภาพทั้งทางฟิโนไทป์ และจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอุจจาระของสุนัข นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกโดยใช้วิธีเอกซทรูชันในไฮเดียมอัลจิเนตและไฮเดียมอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ รวมทั้งเพื่อประเมินการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายใต้สภาวะต่าง ๆ จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ จาก 20 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterococcus hirae* Pom4, *Limosilactobacillus fermentum* Pom5, *Pediococcus pentosaceus* Chi8 และ *Ligilactobacillus animalis* FB2 แสดงคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ความทนต่อกรดและเกลือได้ดี ความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง และการเกาะกลุ่มกับเซลล์โรดต่าง ๆ ความไม่ชอบน้ำ การเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 รวมถึง ความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase และการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้การตรวจสอบความปลอดภัยของโพรไบโอติกของทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า ทุกสายพันธุ์ไม่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่สร้างเอมีน และยังไม่ก่อปัญหาชีวเนื้องอกใหญ่ที่ใช้ในการศึกษา จากการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดพบว่า ขนาดจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์อยู่ระหว่าง 1.74-2.92 ล้านคู่เบส ไม่พบยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่ถ่ายทอดได้และยีนที่ทำให้เกิด ความรุนแรงของโรค ยกเว้นจีโนมของ *E. hirae* Pom4 ซึ่งพบยีนที่ดื้อยา tetracycline บริเวณเดียวกับพลาสมิด และเพื่อเพิ่มความเสถียรและความมีชีวิตของโพรไบโอติก จึงนำแบคทีเรียไปห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะทำให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มภายใต้สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ สภาวะทางเดินอาหารจำลอง การเก็บรักษาในตู้เย็นเป็นเวลา 28 วัน และที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ และอัตราการปลดปล่อยของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีเท่ากับ 86.61 และ 85.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อสัมผัสกับสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า สายพันธุ์โพรไบโอติกที่คัดเลือกมาจากจุลินทรีย์จากสุนัขนี้มีศักยภาพในการใช้เป็นโพรไบโอติก โดยเฉพาะกับสุนัข นอกจากนี้ การห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกในไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนตร่วมกับนมแพะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกสำหรับสุนัขต่อไป

คำสำคัญ : โพรไบโอติก, การห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติก, สุนัข, อัลจิเนต, อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ

|                |   |
|----------------|---|
| Title          | ENCAPSULATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN SODIUM ALGINATE AND SODIUM ALGINATE-GOAT MILK FOR DOG SUPPLEMENT |
| Author         | NGAMLAK FOONGSAWAT  |
| Degree         | MASTER OF SCIENCE   |
| Academic Year  | 2022  |
| Thesis Advisor | Associate Professor Dr. Onanong Pringsulaka   |
| Co Advisor     | Associate Professor Dr. Achariya Rangsiruji   |

The objectives of this study were to screen and investigate the phenotypic and genomic characteristics of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) isolated from canine fecal samples. Additionally, this study aimed to encapsulate selected LAB strains using the extrusion method with sodium alginate (SA) and sodium alginate-goat milk (SAGM), as well as to evaluate the survival of free and encapsulated bacterial cells under different conditions. Among the twenty LAB isolates examined, four strains - *Enterococcus hirae* Pom4, *Limosilactobacillus fermentum* Pom5, *Pediococcus pentosaceus* Chi8, and *Ligilactobacillus animalis* FB2 – and exhibited potential probiotic properties, such as antibacterial activity, acid and bile salt tolerance, auto- and co-aggregation, hydrophobicity, adhesion to the Caco-2 cell line,  $\beta$ -galactosidase and antioxidant activities. The safety assessments of the four selected probiotic strains revealed that all strains did not show hemolytic activity on blood agar, cytotoxicity, or production of biogenic amines, and were sensitive to the majority of tested antibiotics. Whole-genome sequencing revealed that the genome size of the LAB strains ranged from approximately 1.74 to 2.92 Mb, and they lacked transferable antibiotic-resistance and virulence genes, except for *E. hirae* Pom4, which had tetracycline resistance genes in the same region as the plasmid-related replication genes. In order to improve the stability and viability of the probiotics, encapsulation in alginate matrices (SA and SAGM) was investigated. Encapsulated cells in SAGM exhibited the highest viability compared to those in SA and non-encapsulated cells under various conditions, including simulated gastrointestinal conditions, refrigerated storage at 4°C for 28 days, and exposure to pasteurization temperatures. The release rate of encapsulated cells from SA and SAGM matrices reached a maximum of 86.61% and 85.01%, respectively, after six hours of exposure to simulated intestinal juice. These findings indicated that the selected strains, derived from the canine microbiota, and had the potential to serve as host-specific LAB probiotics for dogs. Furthermore, the use of SAGM microcapsules shows promise in the development of probiotic-containing foods tailored for dogs.

Keyword : Probiotics, Microencapsulation, Dogs, Alginate, Alginate-Goat milk

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนพัฒนานักวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2566 สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยครั้งนี้

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความสามารถอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลภาวะ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.อัฉริยา รังษิรุจิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และได้ให้การสนับสนุนแก่ผู้วิจัยในทุกด้าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริวิรัช ศรวงษ์นิยารักษ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐิภา สุวรรณาศรัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญนันท์ นันทวิสัย ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพรรณ สุนทรสิงห์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สิรินธร สุนทรธรรมมาสน์ ที่ได้ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน รวมทั้งสอนเทคนิคการทำวิจัย การวิเคราะห์ผลที่ได้ และช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คมวิทย์ สุรชาติ ที่ได้สละเวลาช่วยสอนและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลและการหาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรีย พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขผลการวิเคราะห์ที่ได้

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวฟุ้งสวาท ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย ทำให้ผู้วิจัยไม่มีความกังวลในเรื่องปัญหาอื่น ๆ ในระหว่างการศึกษา

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่เคยร่วมงาน เป็นกำลังใจ ร่วมทุกข์ ร่วมสุข และให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ ทำให้ผู้วิจัยสามารถผ่านอุปสรรคและปัญหาต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในระหว่างการศึกษา

งามลักษณ์ ฟุ้งสวาท

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย .....  | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....   | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ฉ    |
| สารบัญ .....   | ช    |
| สารบัญตาราง.....   | ฅ    |
| สารบัญรูปภาพ .....   | ด    |
| บทที่ 1 บทนำ.....  | 1    |
| ภูมิหลัง .....   | 1    |
| วัตถุประสงค์.....  | 2    |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย .....  | 3    |
| ผลที่คาดว่าจะได้รับ .....  | 3    |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....   | 5    |
| 1. โพรไบโอติก (probiotic) .....  | 5    |
| 1.1 ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติก .....  | 5    |
| 1.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก.....   | 6    |
| 1.2.1 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร.....  | 6    |
| 1.2.2 การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดีในลำไส้.....   | 7    |
| 1.2.3 ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเมือกหรือเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ของโฮสต์<br>และเซลล์ไลน์..... | 8    |
| 1.2.4 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ.....   | 11   |
| 1.2.4.1 การดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ .....   | 12   |



|  |    |
|--|----|
| 1.2.4.2 การดื้อยาปฏิชีวนะที่ได้รับมาภายหลัง .....                          | 13 |
| 1.2.5 ความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิটที่เป็นประโยชน์ .....                | 15 |
| 1.2.5.1 กอร์ดอินทรีย์ .....  | 15 |
| 1.2.5.2 แบคเทอริโอซิน .....  | 16 |
| 1.2.5.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ .....   | 16 |
| 1.2.5.4 Exopolysaccharide .....  | 17 |
| 1.2.5.5 สารต้านอนุมูลอิสระ .....   | 17 |
| 1.2.5.6 การสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase .....                       | 17 |
| 1.3 ประโยชน์ของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก .....                            | 18 |
| 1.4 เกณฑ์การคัดเลือกและข้อกำหนดสำหรับสายพันธุ์โพรไบโอติก .....             | 18 |
| 1.5 การนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์ .....                      | 19 |
| 1.5.1 การนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมาใช้กับสัตว์ในฟาร์มและปศุสัตว์ ..... | 20 |
| 1.5.2 การนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมาใช้กับสัตว์เลี้ยง .....             | 22 |
| 2. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก .....   | 23 |
| 2.1 ความหมายและวัตถุประสงค์ของวิธีการไมโครเอนแคปซูล .....                  | 23 |
| 2.2 วิธีการไมโครเอนแคปซูลประเภทต่าง ๆ .....                                | 23 |
| 2.2.1 เอกซ์ทราซัน .....  | 23 |
| 2.2.2 อิมัลชัน .....   | 24 |
| 2.3 ไฮโดรคอลลอยด์ที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก .....                        | 25 |
| 2.3.1 การห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต .....   | 26 |
| 2.3.2 การห่อหุ้มด้วยนมและโปรตีนจากนม .....                                 | 27 |
| 2.4 การปลดปล่อยของเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม .....                       | 30 |

|   |    |
|---|----|
| 3. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมนมแพะสำหรับนำไปใช้ในสุนัข..... | 30 |
| 3.1 กระบวนการให้ความร้อน.....   | 31 |
| 3.2 การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ .....   | 31 |
| 3.3 ระบบทางเดินอาหารของสุนัข.....   | 32 |
| 3.3.1 กระเพาะอาหารของสุนัข .....  | 33 |
| 3.3.2 ลำไส้ของสุนัข .....   | 33 |
| บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง .....   | 35 |
| 1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง .....   | 35 |
| 2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....  | 36 |
| 3. อุปกรณ์เพิ่มเติม.....  | 37 |
| 4. Molecular marker .....   | 37 |
| 5. เซลล์ไลน์ที่ใช้ทดสอบ .....   | 37 |
| 6. วิธีการทดลอง .....   | 37 |
| 6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอุจจาระของสุนัข .....                                    | 37 |
| 6.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น .....   | 38 |
| 6.2.1 การศึกษาความสามารถในการทนกรด .....  | 38 |
| 6.2.2 การศึกษาความสามารถในการทนเกลือแร่.....  | 38 |
| 6.2.3 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค.....                                | 38 |
| 6.2.4 การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ .....  | 39 |
| 6.2.5 การศึกษาการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                     | 39 |
| 6.2.6 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ .....                  | 40 |
| 6.3 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA โดยการทำให้ colony PCR .....               | 40 |

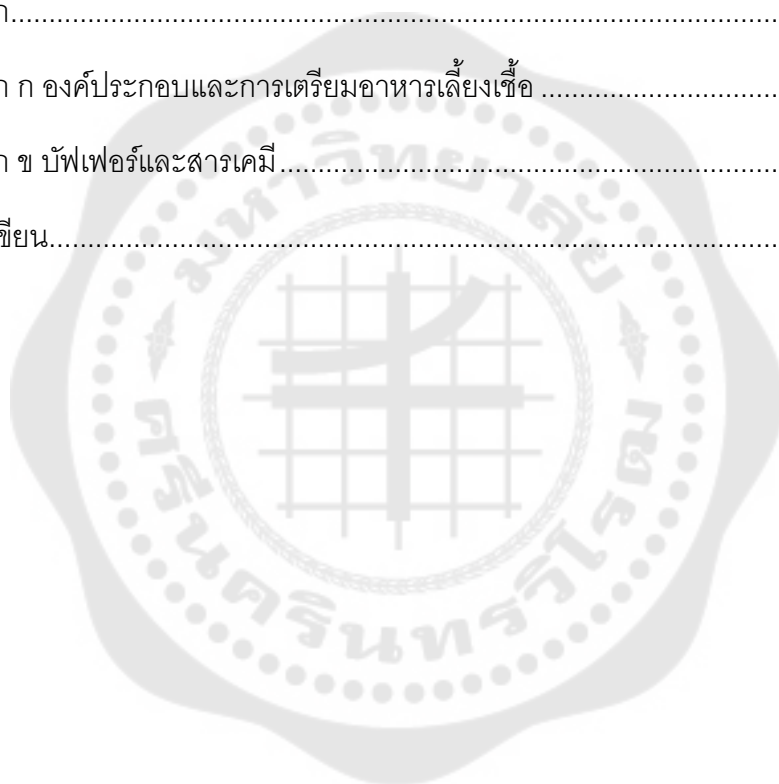
|  |    |
|--|----|
| 6.4 การสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก .....                                       | 41 |
| 6.5 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเพิ่มเติม .....  | 42 |
| 6.5.1 การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 .....                               | 42 |
| 6.5.1.1 การเตรียมเซลล์ไลน์ Caco-2 .....  | 42 |
| 6.5.1.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก .....   | 43 |
| 6.5.1.3 การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 .....                             | 43 |
| 6.5.2 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก .....  | 43 |
| 6.5.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase .....  | 44 |
| 6.5.4 การศึกษาการสร้างสารต้านสารอนุมูลอิสระ .....  | 44 |
| 6.5.5 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase .....   | 45 |
| 6.4 การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่แยกได้ .....                                      | 45 |
| 6.4.1 การศึกษาการสร้าง amine .....   | 45 |
| 6.4.2 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง .....  | 46 |
| 6.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ..                                | 46 |
| 6.4.3.1 การเตรียมเซลล์ Vero .....  | 46 |
| 6.4.3.2 การสกัดสารจากเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก .....   | 47 |
| 6.4.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ..... | 47 |
| 6.4.4 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test .....   | 47 |
| 6.5 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing .....                       | 48 |
| 6.5.1 การสกัดดีเอ็นเอของเซลล์โพรไบโอติก .....  | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 6.5.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส .....  | 49 |
| 6.5.3 การวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมด .....   | 49 |
| 6.6 การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกโดยวิธีเอกซทรูชัน.....  | 49 |
| 6.6.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก .....  | 49 |
| 6.6.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกสำหรับการห่อหุ้ม .....  | 49 |
| 6.6.3 การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจินต .....  | 50 |
| 6.6.4 การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจินตร่วมกับนมแพะ .....  | 50 |
| 6.6.5 การนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติก.....   | 51 |
| 6.6.5.1 การนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกอิสระ .....   | 51 |
| 6.6.5.2 การนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม .....   | 51 |
| 6.6.6 การวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency และขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้.....   | 51 |
| 6.6.6.1 การวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency .....  | 51 |
| 6.6.6.2 การศึกษาขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้ .....  | 51 |
| 6.6.7 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัข.....                        | 52 |
| 6.6.7.1 สภาวะจำลองในปากของสุนัข .....   | 52 |
| 6.6.7.2 สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัข .....   | 52 |
| 6.6.7.3 สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขที่มีการเติมเกลือแร่.....   | 52 |
| 6.6.8 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง..... | 52 |
| 6.6.9 การศึกษาการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง .....                                      | 53 |

|  |    |
|--|----|
| 6.6.10 การศึกษาความเสถียรของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายในไมโครแคปซูลในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....                | 53 |
| 6.6.11 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายในไมโครแคปซูลในนมแพะ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส .....               | 54 |
| 6.6.12 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์..... | 54 |
| 6.6.13 การศึกษาโครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด .....  | 54 |
| 6.7 การทดสอบทางสถิติ.....  | 54 |
| บทที่ 4 ผลการศึกษา .....   | 56 |
| 1. การตัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอุจจาระของสุนัข .....   | 56 |
| 2. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น .....   | 58 |
| 2.1 การศึกษาความสามารถในการทนกรด .....   | 58 |
| 2.2 การศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี.....  | 58 |
| 2.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค.....   | 60 |
| 2.4 การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ .....   | 61 |
| 2.5 การศึกษาการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก.....   | 63 |
| 2.6 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ.....  | 64 |
| 3. การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA .....  | 67 |
| 4. การสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ .....   | 68 |
| 5. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเพิ่มเติม .....   | 69 |
| 5.1 การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 .....   | 69 |
| 5.2 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก.....   | 69 |
| 5.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase.....  | 70 |

|   |    |
|---|----|
| 5.4 การศึกษาการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ.....   | 70 |
| 5.5 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase.....   | 71 |
| 6. การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่คัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์.....   | 73 |
| 6.1 การตรวจสอบการสร้าง amine .....  | 73 |
| 6.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง.....  | 73 |
| 6.3 การศึกษาความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ไลน์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay .....                        | 74 |
| 6.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test.....   | 75 |
| 7. การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing.  | 80 |
| 8. การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกโดยวิธีเอกซทราซัน .....  | 83 |
| 8.1 การวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency และขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้  | 83 |
| 8.2 การศึกษาโครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....   | 84 |
| 8.3 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัข.....                          | 85 |
| 8.3.1 สภาวะจำลองในปากของสุนัข.....  | 85 |
| 8.3.2 สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัข.....  | 86 |
| 8.3.3 สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขที่มีการเติมเกลือแร่.....   | 89 |
| 8.4. การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง ..... | 89 |
| 8.5 การศึกษาการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง .....  | 92 |
| 8.6. การศึกษาความเสถียรของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส .....                 | 92 |

|  |     |
|--|-----|
| 8.7 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในนมแพะ<br>ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส .....                    | 92  |
| 8.8 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในระหว่าง<br>กระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ ..... | 92  |
| บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง .....   | 110 |
| บรรณานุกรม .....   | 122 |
| ภาคผนวก.....   | 136 |
| ภาคผนวก ก องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....   | 137 |
| ภาคผนวก ข บัฟเฟอร์และสารเคมี.....  | 113 |
| ประวัติผู้เขียน.....   | 118 |



## สารบัญตาราง

|   | หน้า |
|---|------|
| ตาราง 1 คำจำกัดความของโพรไบโอติก <sup>(1)</sup> .....   | 5    |
| ตาราง 2 การดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติที่มักพบในแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก <sup>(32)</sup> .....                            | 12   |
| ตาราง 3 ตัวอย่างรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก .....  | 28   |
| ตาราง 4 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA .....  | 41   |
| ตาราง 5 ขั้นตอนการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA .....   | 41   |
| ตาราง 6 รายละเอียดการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 20 ไอโซเลทจากตัวอย่าง .....  | 57   |
| ตาราง 7 ความสามารถในการทนกรดและเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ .....  | 59   |
| ตาราง 8 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้ .....                            | 60   |
| ตาราง 9 ค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ .....   | 62   |
| ตาราง 10 ค่าการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ .....  | 63   |
| ตาราง 11 ค่าการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้กับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ .....  | 64   |
| ตาราง 12 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ .....                     | 66   |
| ตาราง 13 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลท .....         | 67   |
| ตาราง 14 ความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ..... | 69   |
| ตาราง 15 ความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ .....    | 71   |
| ตาราง 16 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ .....     | 72   |



|  |    |
|--|----|
| ตาราง 17 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์.....   | 74 |
| ตาราง 18 ผลความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ไลน์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay .....  | 75 |
| ตาราง 19 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยวิธี E-test .....  | 76 |
| ตาราง 20 ลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ .....  | 80 |
| ตาราง 21 ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกของวัสดุห่อหุ้มแต่ละชนิด และขนาดของไมโครแคปซูล.....  | 84 |
| ตาราง 22 การรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะจำลองในปากของสุนัข .....                                  | 87 |
| ตาราง 23 การรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะน้ำย่อยจำลองของสุนัข .....                                | 88 |
| ตาราง 24 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองที่มีการเติมเกลือแร่ของสุนัข.....   | 90 |
| ตาราง 25 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขแบบต่อเนื่อง.....       | 91 |
| ตาราง 26 จำนวนการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง .....  | 94 |
| ตาราง 27 จำนวนของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ภายหลังจากเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส .....                | 95 |
| ตาราง 28 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในนมแพะ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....                     | 96 |
| ตาราง 29 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในระหว่างกระบวนการทำให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์..... | 97 |

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

|  |    |
|--|----|
| ภาพประกอบ 1 รูป A แสดงลักษณะของชั้นโปรตีน S-layer, รูป B แสดงบทบาทของโปรตีน S-layer ในการเกาะกลุ่มกันเอง (auto-aggregation) และการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ (co-aggregation) และรูป C แสดงภาพการยึดเกาะกับเยื่อเมือกหรือเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ <sup>(22)</sup> ..... | 10 |
| ภาพประกอบ 2 การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Epsilonometer test (E-test) <sup>(38)</sup> .....   | 14 |
| ภาพประกอบ 3 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจาก แบคทีเรียกรดแลคติก <sup>(42)</sup> .....  | 16 |
| ภาพประกอบ 4 การห่อหุ้มโดยใช้วิธีเอกซัทรอน <sup>(67)</sup> .....  | 24 |
| ภาพประกอบ 5 การห่อหุ้มโดยใช้วิธีอิมัลชัน <sup>(67)</sup> .....   | 25 |
| ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของอัลจิเนตและการเกิดไฮโดรเจลของแคลเซียมอัลจิเนต <sup>(72)</sup> .....  | 26 |
| ภาพประกอบ 7 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก.....   | 44 |
| ภาพประกอบ 8 ภาพรวมการห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยไฮเดียมอัลจิเนตและไฮเดียมอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัข .....  | 55 |
| ภาพประกอบ 9 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่มีการเติม แคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร).....   | 56 |
| ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ (กำลังขยาย 1,000 เท่า) .....  | 57 |
| ภาพประกอบ 11 แผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ โดยตัวเลขที่ node แสดงระดับความเชื่อมั่น bootstrap (%) จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง และ scale bar แสดงอัตราการถูกแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ .....  | 68 |
| ภาพประกอบ 12 การอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยจากภาพไม่พบการยับยั้งที่บริเวณแต่ละจุดตัดของสายพันธุ์ ซึ่งแสดงถึงการอยู่ร่วมกันโดยไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน .....   | 70 |

ภาพประกอบ 13 กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ ..... 72

ภาพประกอบ 14 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่มีการเจริญใน 96 well plate ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ..... 75

ภาพประกอบ 15 ลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ จากวงด้านนอกสู่วงด้านในแสดงตามลำดับดังนี้ วงที่ 1 คือ forward strand, วงที่ 2 คือ reverse strand, วงที่ 3 คือ GC content, วงที่ 4 คือ GC skew และวงที่ 5 คือ ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยสีในแต่ละวง รวมถึงตำแหน่งของ tRNA และ rRNA แสดงดังสัญลักษณ์ทางด้านขวาของภาพ ..... 81

ภาพประกอบ 16 ลักษณะของเม็ดไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจินต (A) และอัลจินตร่วมกับนมแพะ เป็นวัสดุห่อหุ้ม (B) ..... 83

ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (bar = 1 ไมโครเมตร) A และ B ไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแบบอัลจินต C และ D ไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแบบอัลจินต ร่วมกับนมแพะ ..... 85

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารถือเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สำคัญที่ส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะสุนัข โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสุนัข ทั้งควบคุมระบบเมแทบอลิซึมให้เป็นปกติ ป้องกันเชื้อก่อโรค และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น การรักษาปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ให้สมดุลจะช่วยส่งเสริมสุขภาพรวมทั้งยังช่วยยืดอายุและป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารให้แก่สุนัข เช่น ท้องผูก ท้องเสีย โรคกระเพาะหรือลำไส้อักเสบ โรคลำไส้แปรปรวน อาการแพ้ต่าง ๆ นอกจากนี้การนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาใช้ยังส่งผลในการรักษาโรคเบาหวาน การมีน้ำหนักเกิน อาการเครียด และโรคติดเชื้อจากปรสิตได้อีกด้วย ในปัจจุบันการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในลำไส้เหล่านี้นิยมใช้ยาปฏิชีวนะ ทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ภายในลำไส้มีปริมาณลดลง มีแบคทีเรียดื้อยาจำนวนมากขึ้น รวมทั้งยังส่งผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของสุนัขในระยะยาวอีกด้วย โดยจากผลเสียดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่จะนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาผสมกับอาหารสัตว์หรือนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในสุนัขหรือสัตว์เลี้ยง เพื่อใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคและความผิดปกติต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นในสุนัข ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่จะนำมาใช้ควรมีความจำเพาะต่อโฮสต์ โดยในกรณีที่น่าไปใช้ในสุนัข จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกก็ควรแยกมาจากสุนัขด้วย นอกจากนี้สุนัขในแต่ละพื้นที่ย่อมจะมีโภชนาการที่แตกต่างกันตามอาหารที่ได้รับ การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในแต่ละพื้นที่จึงเป็นสิ่งจำเป็นและสามารถนำไปใช้ได้กับสุนัขในพื้นที่นั้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาและการพัฒนาโพรไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในสัตว์โดยเฉพาะสุนัขนั้นยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะในประเทศไทยที่ยังไม่มีการศึกษาเพื่อนำไปใช้จริงในสุนัข

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพร่างกายของโฮสต์ แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น lactobacilli และ bifidobacteria เป็นต้น การใช้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในสุนัขหรือสัตว์เลี้ยงนอกจากจะช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้แล้ว ยังช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้แก่สุนัข ส่งผลให้สุนัขมีสุขภาพที่ดีและมีอายุยืนยาว การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาใช้จริงนั้นต้องแยกจากทางเดินอาหารสัตว์ที่มีสุขภาพดี มีความปลอดภัยหรือมีประวัติในการนำไปใช้ที่ปลอดภัย สามารถจัดจำแนกหรือระบุสายพันธุ์ได้

อย่างถูกต้อง ไม่มีข้อมูลว่าสามารถก่อโรคได้ ไม่มีผลข้างเคียงต่อโฮสต์ รวมทั้งไม่มียีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่สามารถถ่ายทอดได้ นอกจากคุณสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์แล้ว แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกจะต้องสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นในลำไส้ในการเข้าเกาะ มีความสามารถในการสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของสุนัขตลอดจนต้องทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิตทางการค้า ความแห้งและสภาวะทางกายภาพอื่นในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นเพื่อให้โพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารและไปถึงที่ลำไส้ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายในปริมาณที่เพียงพอเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ให้แก่สุนัข ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคการห่อหุ้ม (microencapsulation) มาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก โดยวิธีที่ใช้คือ วิธีเอกซ์ทรูชัน (extrusion technique) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สภาวะในการห่อหุ้มที่ไม่รุนแรง จึงช่วยปกป้องและส่งเสริมการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก และใช้ไฮโดรคอลลอยด์หรือเมทริกซ์ที่ใช้ในการห่อหุ้มเป็นอัลจิเนต (alginate) และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ (alginate-goat milk) นอกจากนี้ยังศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่อยู่ในเมทริกซ์ทั้งสองแบบในสภาวะทางเดินอาหารจำลองของสุนัข ในสภาวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหาร และในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อ จัดจำแนกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสุนัขสุขภาพดี ศึกษาความปลอดภัยของสายพันธุ์ที่คัดเลือก ได้แก่ การหาบริเวณยีนดื้อยาปฏิชีวนะและการสร้างสารเมแทบอลิต์ของเชื้อโดยอาศัยการหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ โดยวิธี next generation sequencing
2. เพื่อศึกษาคูณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดีของเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกโดยใช้วิธีเอกซ์ทรูชันในรูปแบบของเมทริกซ์อัลจิเนต และเมทริกซ์ร่วมระหว่างอัลจิเนตและนมแพะ รวมทั้งศึกษาโครงสร้างของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopic; SEM)
4. เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในสภาวะทางเดินอาหารจำลองของสุนัข ในสภาวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหาร และในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

เพื่อแยกเชื้อ จัดจำแนกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสุนัขสุขภาพดี ศึกษาความปลอดภัยของสายพันธุ์ที่คัดเลือก ได้แก่ การหาบริเวณยีนดีเอ็นเอที่จำเพาะ และการสร้างสารเมแทบอลิต์ของเชื้อโดยอาศัยการหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ โดยวิธี next generation sequencing จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด ได้แก่ การสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ความสามารถในการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารจำลอง คุณสมบัติในการเข้าเกาะที่ลำไส้ จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดีมาห่อหุ้มโดยใช้วิธีเอกซทราซันในรูปแบบของเมทริกซ์อัลจิเนต เมทริกซ์ร่วมระหว่างอัลจิเนตและนมแพะ จากนั้นทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก (encapsulation efficiency) และขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้ ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในแคปซูลในสภาวะจำลองในปาก น้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองและสภาวะที่มีเกลือแร่ของสุนัข ทั้งแบบเดี่ยวและแบบต่อเนื่อง ศึกษาการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส และในระหว่างการเก็บรักษาในนมแพะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน รวมถึงการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร คือ ที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization)

### ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย และมีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดี เมื่อนำมาห่อหุ้มในเมทริกซ์อัลจิเนต และเมทริกซ์ไฮเดียมอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ สามารถปกป้องแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกให้มีปริมาณคงเหลือมากกว่า  $10^6$  CFU/g ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 1. โพรไบโอติก (probiotic)

##### 1.1 ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

โพรไบโอติก มาจากภาษากรีกสองคำ คือ “pro” และ “bios” ซึ่งมีความหมายว่า “เพื่อชีวิต” โพรไบโอติกได้ถูกกล่าวถึงและให้ความหมายครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Elie Metchnikoff ซึ่งตั้งข้อสังเกตว่า ชาวบัลแกเรียที่บริโภคนมเปรี้ยวที่ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ในปริมาณมากมักจะมีอายุยืน โดย Metchnikoff เชื่อว่าน่าจะเกิดจากจุลินทรีย์ในนมเปรี้ยวที่ส่งผลต่อลำไส้ทำให้สุขภาพโดยรวมแข็งแรง หลังจากนั้นคำว่าโพรไบโอติกได้ถูกให้ความหมายที่แตกต่างกัน<sup>(1)</sup> ดังตาราง 1

ตาราง 1 คำจำกัดความของโพรไบโอติก<sup>(1)</sup>

| ปี ค.ศ. | คำจำกัดความ  |
|---------|--|
| 1965    | สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งหลังออกมาแล้วสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง   |
| 1971    | สารสกัดซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ได้   |
| 1974    | จุลินทรีย์และสารที่ส่งผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้   |
| 1989    | อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ส่งผลดีต่อโฮสต์ โดยการปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้   |
| 1992    | การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตแบบสายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสมเพื่อนำไปใช้สำหรับมนุษย์หรือสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวจะส่งผลดีต่อโฮสต์โดยการปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น |
| 1996    | การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์นมที่หมักจากจุลินทรีย์ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์และส่งผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์  |
| 1999    | จุลินทรีย์ที่เป็นอาหารเสริมที่มีประโยชน์ต่อโฮสต์ โดยการปรับภูมิคุ้มกันที่เยื่อเมือก รวมทั้งปรับปรุงสมดุลทางโภชนาการและจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร  |

ตาราง 1 (ต่อ)

| <b>คำจำกัดความ</b> |  |
|--------------------|--|
| 2001               | การเตรียมหรือผลิตผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีปริมาณที่เพียงพอ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะไปเข้าเกาะและตั้งรกรากในส่วนต่าง ๆ ของโฮสต์ ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ |

คำจำกัดความของโพรไบโอติกในปัจจุบันถูกกำหนดขึ้นในปี ค.ศ. 2002 โดยองค์กรอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) และ International Scientific Association of Probiotic and Prebiotics (ISAPP) ซึ่งได้ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่า “เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อรับประทานในปริมาณที่เพียงพอจะส่งผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์”<sup>(1, 2)</sup> แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นอาหารเสริมที่เป็นประโยชน์แก่โฮสต์ทั้งในคนและสัตว์ โดยจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของโฮสต์ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ช่วยในการดูดซึมอาหารของโฮสต์ ลดอาการแพ้ น้ำตาลแลคโตส ลดความเสี่ยงที่จะเกิดโรคต่าง ๆ ภายในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์<sup>(3)</sup> รวมถึงแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกจะทำหน้าที่ย่อยสลายสารอาหารต่าง ๆ และสร้างเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อโฮสต์ เช่น วิตามินต่าง ๆ กรดอะมิโน กรดแลคติก และสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น โดยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งจะรู้จักกันอย่างแพร่หลายในกลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria

## 1.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกต้องสอดคล้องกับหลักเกณฑ์ที่ Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food กำหนดขึ้นในปี ค.ศ. 2002 ดังนี้

### 1.2.1 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร

แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกจะถูกรับประทานเข้าไปพร้อมอาหาร ซึ่งจะต้องเผชิญกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะบริเวณกระเพาะอาหารซึ่งถือว่าเป็นบริเวณที่มีผลทำให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกลดลงมากที่สุด<sup>(4)</sup> กระเพาะอาหารของคนและสัตว์นอกจากจะมีสภาวะความเป็นกรดสูง (มีค่า pH ประมาณ 1.0 - 2.5) แล้ว ยังประกอบด้วยเอนไซม์ pepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารจำพวก



โปรตีน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจำเป็นต้องรอดชีวิตจากสภาวะไม่เหมาะสมเหล่านี้ภายใน กระเพาะอาหาร เข้าสู่บริเวณของลำไส้เล็ก และถึงจะเข้ายึดเกาะที่บริเวณลำไส้ได้<sup>(5)</sup> ซึ่งโดยทั่วไป จีโนส *Lactobacillus* มีความทนต่อความเป็นกรดสูง แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการทนกรด นี้จะมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์และสายพันธุ์ ซึ่งจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะมีความไวต่อค่า pH ที่ต่ำกว่า 3.0<sup>(4)</sup>

Jin และคณะ (1998)<sup>(6)</sup> ได้ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อในจีโนส *Lactobacillus* จำนวน 12 สายพันธุ์ที่แยกได้จากมูลไก่ในสภาวะที่เป็นกรดสูงที่ค่า pH เท่ากับ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่า เชื้อในจีโนส *Lactobacillus* ส่วนใหญ่สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดได้ และมีการรอดชีวิตที่มากที่สุดที่ค่า pH เท่ากับ 4 และ 5 และการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลงเมื่อค่า pH ต่ำลง โดยที่ค่า pH เท่ากับ 0.5 มีการรอดชีวิตน้อยที่สุด

Tokatli และคณะ (2015)<sup>(7)</sup> ได้ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อจีโนส *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในสภาวะที่เป็นกรดสูงและในสภาวะน้ำย่อยจำลองที่ประกอบด้วยเอนไซม์ pepsin พบว่า เชื้อในจีโนส *Lactobacillus* ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตต่ำกว่า 1 Log CFU/ml ที่ค่า pH เท่ากับ 2.5 เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ยกเว้น *L. plantarum* และ *L. brevis* ที่ยังคงมีการรอดชีวิตที่สูง

### 1.2.2 การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดีในลำไส้

ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt) ถือเป็นเกณฑ์สำคัญในการ คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก<sup>(8)</sup> ซึ่งเกลือน้ำดีจะถูกสังเคราะห์ขึ้นจากรดน้ำดี (bile acid) ภายในตับโดยใช้คอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้น โดยน้ำดี (bile) จะมีลักษณะเป็น ของเหลวสีเขียวแกมเหลือง<sup>(9)</sup> จากนั้นจะถูกส่งไปเก็บไว้ที่ถุงน้ำดีในรูปของเกลือน้ำดีผ่านท่อน้ำดี และจะหลั่งออกมาในลำไส้ภายใต้การควบคุมโดยฮอร์โมนหลายชนิด ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ ดูดซึมไขมันในลำไส้ของทั้งคนและสัตว์ โดยความเข้มข้นของเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กจะอยู่ที่ ประมาณ 4-20 mM แต่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะอดอาหาร<sup>(10)</sup> น้ำดีที่ถูก หลั่งออกมาที่ลำไส้เล็กนี้จะมีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยจะช่วยละลายไขมันจึงมีผลไป ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นไขมันและกรดไขมัน<sup>(11)</sup> ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการ รั่วไหล ส่งผลต่อกระบวนการ proton motive force ของจุลินทรีย์ และมีผลทำให้เซลล์ตายในที่สุด<sup>(12)</sup> ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกที่ยึดเกาะบริเวณลำไส้จึงต้องมีการพัฒนากลไกการป้องกัน ตัวเองจากเกลือน้ำดีในลำไส้ อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีจะมีความ แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก<sup>(13)</sup>

de Valdez และคณะ (2003)<sup>(14)</sup> ได้ศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดีในระดับ *in vitro* ของเชื้อ *L. reuteri* พบว่าเชื้อ *L. reuteri* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม oxgall เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม oxgall เมื่อศึกษาเชิงลึกพบว่า *L. reuteri* มีการปรับตัวให้ทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีโดยลดปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์และมีอัตราส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง

Šušićkovic และคณะ (2000)<sup>(8)</sup> ได้ศึกษาความสามารถของ *L. acidophilus* M92 ในการทนต่อ oxgall และเกลือน้ำดีเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า *L. acidophilus* M92 สามารถทนต่อ oxgall และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Jatmiko และคณะ (2017)<sup>(15)</sup> ได้ศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีในระดับ *in vitro* ของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum* และ *E. faecium* มากกว่า 20 สายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) เป็นเวลา 210 นาที

### 1.2.3 ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเมือกหรือเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ของโฮสต์และเซลล์ไลน์

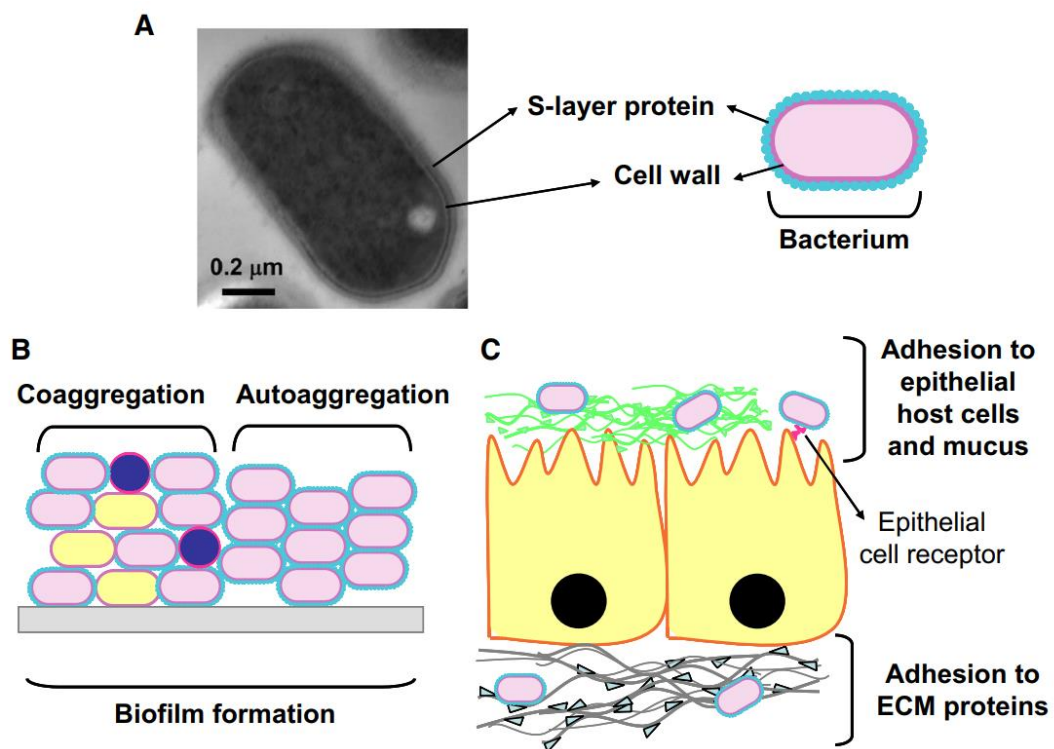
ความสามารถในการเกาะติดลำไส้ของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารเป็นหนึ่งในคุณสมบัติในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก โดยโพรไบโอติกจำเป็นต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารและสามารถเข้าเกาะติดกับเยื่อบุผิวลำไส้ (epithelial cell) ของโฮสต์และสามารถสร้างสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ เพื่อที่จะสามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพโฮสต์<sup>(16)</sup> ซึ่งการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการเข้ายึดเกาะบริเวณเยื่อบุผิวลำไส้ของโฮสต์ และการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคนิตต่าง ๆ ถือเป็นบทบาทสำคัญของโพรไบโอติกเมื่อไปถึงบริเวณลำไส้<sup>(17)</sup> การทดสอบความสามารถในการเข้าเกาะติดของโพรไบโอติกอาจทดสอบโดยใช้เซลล์ไลน์ (cell line) ของลำไส้เพื่อเลียนแบบการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ ทั้งนี้การยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้ของโฮสต์นั้นเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยป้องกันการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรคในลำไส้ โดยจะไปขัดขวางการเข้าเกาะที่บริเวณรีเซพเตอร์ของเยื่อบุผิวลำไส้ ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะแย่งชิงพื้นที่ในการเข้าเกาะและเพิ่มจำนวนทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเข้าเกาะ และถูกกำจัดออกจากระบบทางเดินอาหาร โดยปัจจัยที่ช่วยให้โพรไบโอติกสามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือก (mucus) หรือเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ รวมถึงเซลล์ไลน์ มีดังนี้

### 1.2.3.1 โปรตีน S-layer

โปรตีน S-layer (S-layer proteins; SlpA) เป็นองค์ประกอบชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (ภาพประกอบ 1) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในจีโนม *Lactobacillus* ชั้นของโปรตีน S-layer จะช่วยส่งเสริมการยึดเกาะที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ของโฮสต์และยังช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันในเยื่อเมือกลำไส้อีกด้วย จึงถือได้ว่า โปรตีน S-layer เป็นโครงสร้างแรกของแบคทีเรียที่มีปฏิสัมพันธ์กับผิวเยื่อบุผิวลำไส้ของโฮสต์<sup>(18)</sup> โดยโปรตีน S-layer ประกอบด้วย หน่วยย่อยของโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนเรียงตัวต่อกันเป็นผลึกรูปหกเหลี่ยม หรือรูปสี่เหลี่ยม มีมวลโมเลกุลประมาณ 40-200 kDa<sup>(19)</sup> ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน S-layer ที่ช่วยในการยึดเกาะของเชื้อในกลุ่ม lactobacilli ตัวอย่างเช่น

Beganovic และคณะ (2011)<sup>(20)</sup> ได้ทำการศึกษาลักษณะและหน้าที่ของโปรตีน S-layer ของเชื้อ *L. helveticus* M92 เปรียบเทียบกับ *L. helveticus* M92 ที่ถูกกำจัดยีน *slpA* ที่ถอดรหัสให้โปรตีน SlpA ออกไป พบว่า โปรตีน SlpA มีความเกี่ยวข้องกับการรวมกลุ่มกันเอง (auto-aggregation) ของเชื้อ *L. helveticus* M92 และเกี่ยวข้องกับการเกาะข้ามกลุ่มกัน (co-aggregation) ของเชื้อ *L. helveticus* M92 กับ *Salmonella* Typhimurium FP1 นอกจากนี้หลังจากป้อนเชื้อ *L. helveticus* M92 ที่มียีน *slpA* ให้แก่หนู mice ก่อนที่จะทำการป้อนเชื้อก่อโรค *S. Typhimurium* FP1 ยังแสดงผลการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกันที่ดี และลดการติดเชื้อ *S. Typhimurium* FP1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อ *L. helveticus* M92 ที่ถูกกำจัดยีน *slpA* และกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *L. helveticus* M92 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ *S. Typhimurium* FP1 ที่ลดลงในหนูที่ได้รับ *L. helveticus* M92 นั้นอาจเกี่ยวข้องกับการแข่งขันการยึดเกาะกับเชื้อก่อโรคในลำไส้และการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นจากการได้รับเชื้อ *L. helveticus* M92 ที่มียีน *slpA*

Xue และคณะ (2012)<sup>(21)</sup> ได้คัดแยกเชื้อ *Lactobacillus* 5 สายพันธุ์จากลำไส้ของมนุษย์และนมหมัก และนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรคในลำไส้โดยใช้เซลล์ไลน์ HT-29 พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* ที่ถูกกำจัดโปรตีน S-layer มีความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในลำไส้กับเซลล์ไลน์ HT-29 ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน S-layer เป็นโครงสร้างที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวเซลล์ลำไส้ของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก



ภาพประกอบ 1 รูป A แสดงลักษณะของชั้นโปรตีน S-layer, รูป B แสดงบทบาทของโปรตีน S-layer ในการเกาะกลุ่มกันเอง (auto-aggregation) และการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ (co-aggregation) และรูป C แสดงภาพการยึดเกาะกับเยื่อเมือกหรือเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้<sup>(22)</sup>

### 1.2.3.2 พื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

นอกจากโปรตีน S-layer ที่ช่วยในการยึดเกาะที่เยื่อบุผิวเซลล์ลำไส้แล้ว พื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (cell surface hydrophobicity) ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการรวมกลุ่มหรือยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกภายในลำไส้ของโฮสต์ ซึ่งในการทดสอบความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก นิยมใช้วิธีการทดสอบการยึดเกาะกับสารไฮโดรคาร์บอน (Bacterial Adhesion To Hydrocarbons; BATH หรือ Microbial Adherence To Hydrocarbons; MATH) ซึ่งวิธีการทดสอบความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์แบคทีเรียนี้สามารถนำมาใช้ในการประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นได้ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถยึดเกาะกับสารไฮโดรคาร์บอนได้ดีจะแสดงถึงความไม่ชอบ

น้ำที่มาก ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวต่าง ๆ ได้ดี<sup>(23)</sup> โดยจากการศึกษาของ Duary และคณะ (2010)<sup>(23)</sup> มีรายงานว่าเชื้อ *L. plantarum* Lp91 ที่แยกได้จากอุจจาระของมนุษย์แสดงเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำที่สูง (% hydrophobicity) เมื่อทดสอบกับสารไฮโดรคาร์บอนคือ เฮกเซนและโทลูอีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ HT-29 และ Caco-2 ที่แสดงการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมื่อดังกล่าวได้สูงที่สุดเช่นกัน

### 1.2.3.3 การเกาะกลุ่มกันเอง

การเกาะกลุ่มกันเอง (auto-aggregation) หรือการจับกลุ่มของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในสายพันธุ์เดียวกัน มีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมื่อดังกล่าวและป้องกันการตั้งรกราก (colonization) ของเชื้อก่อโรค ซึ่งแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มกันและมีพื้นผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำอาจมีโอกาที่จะเกิดการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อเมื่อดังกล่าวของระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ได้มากขึ้น จากการศึกษาของ Abdulla และคณะ (2014)<sup>(24)</sup> พบว่า เมื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติของผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำสูงมาศึกษาความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง พบว่ามีหนึ่งสายพันธุ์ที่แสดงความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองที่สูงถึง 63.1 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS

### 1.2.3.4 การเกาะกลุ่มกันหรือการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ

นอกจากการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกแล้ว การเกาะกลุ่มกันระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกและเซลล์ของเชื้อก่อโรค (co-aggregation) นั้นอาจช่วยป้องกันการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรค บริเวณลำไส้ของโฮสต์ได้ จากรายงานของ Dlamini และคณะ (2018)<sup>(25)</sup> ที่ศึกษาความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง การเกาะกลุ่มกันกับเชื้อก่อโรค และศึกษาความไม่ชอบน้ำของเซลล์ *Lactobacillus* ที่แยกได้ พบว่า ไอโซเลทที่แยกได้ในการศึกษานี้มีความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง การเกาะกลุ่มกันกับเชื้อก่อโรค และความไม่ชอบน้ำของเซลล์ที่สูง ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวนี้ไอโซเลทดังกล่าวจึงเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกต่อไป

### 1.2.4 ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เกณฑ์การคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ การประเมินความไวต่อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งจัดเป็นการประเมินความปลอดภัยก่อนการนำโพรไบโอติกไปใช้ในโฮสต์ การเติมยาปฏิชีวนะลงในอาหารสัตว์และการใช้ยาปฏิชีวนะในปศุสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์นั้นส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโพร

ไบโอดีทเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การดื้อยาอาจเกิดจากการถ่ายทอดยีนดื้อยาจากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ มายังแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอดีท ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอดีท สำหรับสัตว์นั้นไม่ควรมียีนต้านยาปฏิชีวนะที่สามารถถ่ายทอดได้<sup>(26, 27)</sup>

กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะแบ่งออก 2 ประเภท ได้แก่

#### 1.2.4.1 การดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ

การดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) เป็นลักษณะที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอดีทบางชนิด มักจะเป็นลักษณะที่ต้องการ เนื่องจากโพรไบโอดีทที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ จะช่วยฟื้นฟูจุลินทรีย์ในลำไส้ของโฮสต์ ในระหว่างหรือหลังการได้รับยาปฏิชีวนะ โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะตามธรรมชาติ จะอยู่บนโครโมโซม ซึ่งจะไม่สามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นโดยวิธี horizontal gene transfer<sup>(28, 29)</sup> จึงถือว่าการแสดงออกของการดื้อยาปฏิชีวนะแบบธรรมชาตินี้จะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค<sup>(30)</sup> ยีนดื้อยาปฏิชีวนะตามธรรมชาตินี้จะมี ความอนุรักษณ์บนโครโมโซมค่อนข้างสูงจึงสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันในรุ่นต่อไปได้ (vertical gene transfer) และมักพบว่ายีนดื้อยาปฏิชีวนะตามธรรมชาติที่พบในแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอดีทมักพบในแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มที่คล้ายคลึงกัน<sup>(30, 31)</sup> ดังตาราง 2

ตาราง 2 การดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติที่มักพบในแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอดีท<sup>(32)</sup>

| ยาปฏิชีวนะ     | <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Bifidobacterium</i> | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
|----------------|---------------------|----------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Vancomycin     | R                   | R                    | R                      | -                         | -                                 |
| Kanamycin      | -                   | R                    | R                      | R                         | R                                 |
| Gentamycin     | -                   | R                    | R                      | R                         | R                                 |
| Streptomycin   | R                   | R                    | R                      | R                         | R                                 |
| Metronidazole  | -                   | R                    | R                      | -                         | -                                 |
| Norfloxacin    | -                   | -                    | R                      | R                         | -                                 |
| Nalidixic acid | -                   | R                    | R                      | -                         | -                                 |
| Polymyxin B    | -                   | -                    | R                      | R                         | -                                 |
| Neomycin       | -                   | -                    | -                      | -                         | R                                 |
| Cephalosporins | R                   | -                    | -                      | -                         | -                                 |

ตาราง 2 (ต่อ)

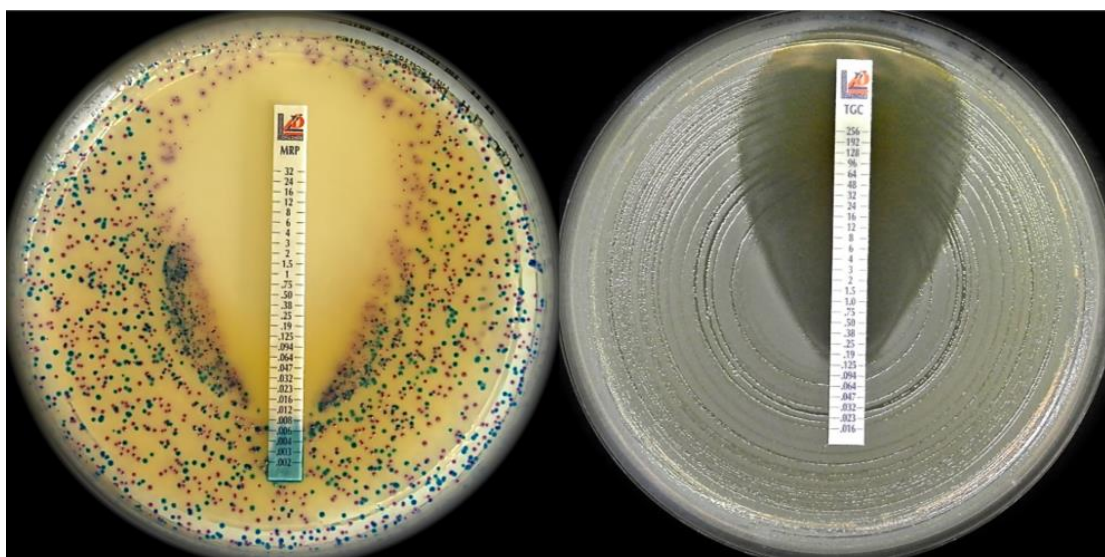
|              |   |   |   |   |   |
|--------------|---|---|---|---|---|
| Erythromycin | R | - | - | - | - |
| Penicillin G | - | - | - | R | - |

หมายเหตุ: R หมายถึง การดื้อยาปฏิชีวนะ (resistant), - หมายถึง ไม่มีข้อมูล (no data)

#### 1.2.4.2 การดื้อยาปฏิชีวนะที่ได้รับมาภายหลัง

การดื้อยาปฏิชีวนะที่ได้รับมาภายหลัง (acquired antibiotic resistance) เกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะมีการกลายพันธุ์ให้ดื้อยาหรือการได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยามาจากแบคทีเรียอื่นโดยวิธี horizontal gene transfer ผ่านกระบวนการ transformation, transduction และ conjugation<sup>(33)</sup> ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยามากกว่าการดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติ ซึ่งคณะกรรมการพิจารณาสารเจือปน ผลิตภัณฑ์และสารเคมีที่ใช้ในอาหารสัตว์ (The Panel on Additives and Products or substances used in Animal Feed; FEEDAP) ได้กำหนดไว้ว่า สายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่เกิดจากการได้รับยีนดื้อยาปฏิชีวนะภายหลัง jumping genes หรือ transposable elements นั้นไม่เป็นที่ยอมรับในการใช้ผสมในอาหารสัตว์<sup>(34)</sup>

วิธีการตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับได้แก่ การประเมินค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ หรือค่า minimum inhibitory concentration (MIC)<sup>(35)</sup> วิธีหนึ่งที่ยอมรับในการประเมินค่า MIC เพื่อตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ คือ Epsilon test (E-test) วิธีนี้จะนำแผ่นของยาปฏิชีวนะที่มีการไล่ระดับความเข้มข้นวางลงบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเชื้อที่ต้องการตรวจสอบ แผ่นของยาปฏิชีวนะจะมีการแพร่ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะลงบนอาหารและยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยสามารถหาค่า MIC ได้โดยการสังเกตจากปลายของวงรีของแผ่นยาและอ่านค่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะบริเวณนั้น<sup>(36)</sup> (ภาพประกอบ 2) ซึ่งเทคนิคนี้มีความแม่นยำสูงและสามารถทำซ้ำได้<sup>(37)</sup>



ภาพประกอบ 2 การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Epsilon test (E-test)<sup>(38)</sup>

เทคนิคในระดับโมเลกุล เช่น polymerase chain reaction (PCR), microarray analysis หรือ whole genome sequencing ได้ถูกนำมาใช้ในการระบุแผนที่ยีนบริเวณที่ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ รวมถึงระบุชนิดของยีนดื้อยาต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกชนิดนั้นต้านทานได้<sup>(30)</sup> การศึกษาของ Li และคณะ (2018)<sup>(39)</sup> ได้ทำการประเมินความปลอดภัยของ *E. durans* KLDS6.0930 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก โดยวิเคราะห์ลำดับของจีโนมทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์หายีนที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัย ได้แก่ ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ยีนก่อโรค ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่ไม่เหมาะสม โดยการศึกษาเหล่านี้จะเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล comprehensive antibiotic resistance database (CARD; <http://arpcard.mcmaster.ca/>) และ virulence factors database (VFDB; <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) เพื่อระบุชนิดของยีนดื้อยาปฏิชีวนะและยีนก่อโรค และระบุกลไกของการดื้อยาปฏิชีวนะที่ได้รับมาภายหลัง โดยใช้ฐานข้อมูล ResFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า จีโนมของ *E. durans* KLDS6.0930 มียีนที่คาดว่าจะเป็ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ 12 ยีน และไม่พบยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่ได้รับมาภายหลังจากการถ่ายทอดแบบ horizontal gene transfer ไม่พบยีนก่อโรคและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และไม่พบยีนที่ใช้สร้างสารเมแทบอลิต์ที่ไม่เหมาะสมอีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า *E. durans* KLDS6.0930 สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกที่มีความปลอดภัยในมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ghattargi และคณะ (2018)<sup>(40)</sup> ได้



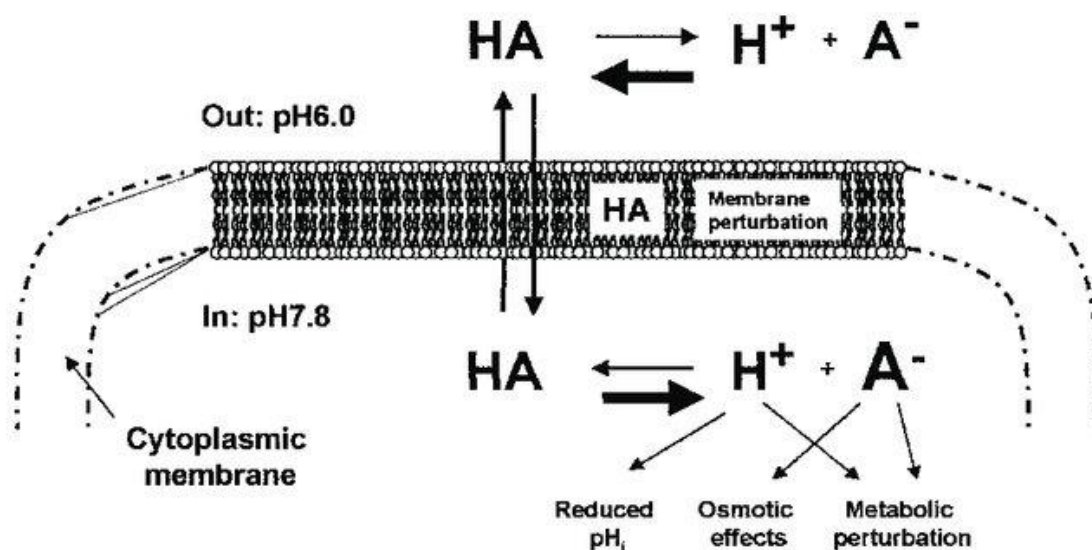
ศึกษายีนดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. faecium* 17OM39 โดยการศึกษาลำดับของจีโนมทั้งหมด ซึ่งพบว่า *E. faecium* 17OM39 ไม่มียีนดื้อยา vancomycin และ tetracycline นอกจากนี้ยังพบว่าจีโนมของ *E. faecium* 17OM39 มีความเสถียร เนื่องจากไม่พบส่วนของ transposable elements อีกด้วย

### 1.2.5 ความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่เป็นประโยชน์

ความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่เป็นประโยชน์หรือการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ของแบคทีเรียโพรไบโอติก ถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญในการคัดเลือกโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ โดยตัวอย่างของสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่โพรไบโอติกสร้างขึ้น ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น<sup>(41)</sup> ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของโพรไบโอติก

#### 1.2.5.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก ถือเป็นสารเมแทบอลิต์หลักที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น นอกจากนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มของ heterofermentative ยังสามารถผลิตกรดแอซีติกได้นอกจากกรดแลคติก โดยการผลิตและสะสมกรดทั้งสองชนิดนี้ทำให้สภาวะแวดล้อมในลำไส้มีความเป็นกรดที่มากขึ้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบแบบไม่จำเพาะ โดยกรดแลคติกและกรดแอซีติกจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เข้าไปภายใน cytoplasm ของเซลล์ ซึ่งภายใน cytoplasm จะมีค่า pH ที่สูงกว่าค่า pKa (ค่าคงที่การแตกตัวของกรดอ่อน) มีผลทำให้กรดแลคติกและกรดแอซีติกแตกตัวและได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) (ภาพประกอบ 3) ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของระบบเมแทบอลิซึมที่จำเป็นของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น proton motive force, oxidative phosphorylation และ substrate translocation



ภาพประกอบ 3 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลคติก<sup>(42)</sup>

### 1.2.5.2 แบคทีเรียไอซิน

แบคทีเรียไอซิน (bacteriocins) เป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ค่อนข้างจำเพาะกว่ายาปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียไอซินส่วนใหญ่ ยกเว้น nisin จะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียไอซินมักจะออกฤทธิ์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยจะไปรบกวนกระบวนการ proton motive force ก่อให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียพลังงานและเกิดการรั่วไหลของไอออน ทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด<sup>(43)</sup> ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์จะสามารถผลิตแบคทีเรียไอซินได้เพียงชนิดเดียว ในขณะที่บางสายพันธุ์สามารถผลิตแบคทีเรียไอซินได้มากกว่า 1 ชนิด โดยตัวอย่างของแบคทีเรียไอซินที่มีการนำมาใช้ในอาหาร เช่น nisin และ pediocin เป็นต้น<sup>(44)</sup> โดยมีการศึกษาจำนวนมากได้รายงานว่า แบคทีเรียไอซินที่ถูกสร้างจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกนำไปใช้ในอาหาร แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกที่มักก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria*<sup>(45)</sup>

### 1.2.5.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) ในสภาวะที่มีออกซิเจน ผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านเอนไซม์ฟลาวิน ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีความรุนแรง และส่งผลต่อชั้นไขมันในของเยื่อหุ้ม

เซลล์ โมเลกุลของโปรตีน รวมถึงโครงสร้างของกรดนิวคลีอิก ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด<sup>(46)</sup> ทั้งนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งยีสต์ แบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก และแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ<sup>(43)</sup>

#### 1.2.5.4 Exopolysaccharide

Exopolysaccharide ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น D-glucose, D-galactose และ L-rhamnose ซึ่งในบางกรณี ยังมี N-acetylglucosamine (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc) หรือกรดกลูโคโรนิก (GlcA) เป็นองค์ประกอบด้วย<sup>(47)</sup> โดย exopolysaccharide มีส่วนช่วยในการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกกับเยื่อชีวภาพ นอกจากนี้ยังช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะที่รุนแรงในกระเพาะอาหาร ส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีการรอดชีวิตเมื่อผ่านกระเพาะอาหารมากขึ้น<sup>(48)</sup> รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยังช่วยในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น สภาวะ osmotic shock การทำแห้ง การแช่แข็ง สภาวะที่มียาปฏิชีวนะหรือสารเคมีที่รุนแรง นอกจากนี้ exopolysaccharide ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดนั้นยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *E. coli* O157 และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น<sup>(49)</sup>

#### 1.2.5.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่ในโมเลกุล มีผลทำให้เป็นสารที่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ซึ่งหากมีการสะสมสารอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูงจะส่งผลเสียและก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ โดยมีการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo*<sup>(50)</sup>

#### 1.2.5.6 การสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase

อาการแพ้น้ำตาลแลคโตสเนื่องจากขาดเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยน้ำตาลแลคโตส อาจใช้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส และสามารถผลิตได้จาก *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* บางสายพันธุ์

### 1.3 ประโยชน์ของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

ในปัจจุบันการใช้จ่ายปฏิชีวนะในการรักษาโรคต่าง ๆ ทำให้จุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารเสียความสมดุลซึ่งอาจส่งผลให้เกิดโรคหรือปัญหาทางด้านสุขภาพอื่น ๆ ตามมา ดังนั้นการให้จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น โดยบทบาทที่สำคัญของโพรไบโอติกนั้นอาจไม่ใช่การรักษาโรคต่าง ๆ แต่เป็นการป้องกันหรือบรรเทาปัญหาทางด้านสุขภาพ เช่น การใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในกรณีเป็นโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ อาการแพ้ น้ำตาลแลคโตส โรคในกลุ่มอาการแพ้ต่าง ๆ โรคลำไส้อักเสบ การติดเชื้อ *Helicobacter pylori* การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และยังสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษากลไกของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในการส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์ เช่น การสร้างสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ ออกมายับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ ในระบบทางเดินอาหาร เช่น กรดแลคติก กรดแอซิติค กรดไขมัน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียโอซิน และอื่น ๆ โดยสารเมแทบอลิต์ที่เป็นกรดจะทำให้ค่า pH ภายในลำไส้ลดลง ส่งผลให้สภาวะในลำไส้มีความเป็นกรด ทำให้สภาวะในลำไส้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ส่วนใหญ่ไม่ทนต่อกรด แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกยังสามารถป้องกันการตั้งรกรากของจุลินทรีย์ก่อโรคภายในลำไส้ของโฮสต์ โดยการแก่งแย่งพื้นที่ผิวเยื่อและเพิ่มจำนวนที่บริเวณเยื่อบุผิวลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเข้าเกาะและถูกกำจัดออกจากทางเดินอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกยังมีประโยชน์ด้านการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ดังรายงานของ Scharek และคณะ (2007)<sup>(51)</sup> พบว่า เมื่อป้อน *B. cereus var. toyoi* ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกให้กับแม่และลูกสุกรพบว่า สามารถกระตุ้นการหลั่ง IgA ภายในลำไส้ได้เพิ่มขึ้น มีการสร้างเยื่อเมือกมากขึ้นเพื่อป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกผ่านทางกรกิน อาจเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha, Interferon-gamma ซึ่งการหลั่ง cytokines เหล่านี้มีผลในการรักษาระดับของภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาวะสมดุล<sup>(52)</sup>

### 1.4 เกณฑ์การคัดเลือกและข้อกำหนดสำหรับสายพันธุ์โพรไบโอติก

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) และหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority; EFSA) ได้กำหนดเกณฑ์การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เป็นโพรไบโอติกในด้านคุณสมบัติต่าง ๆ ความปลอดภัยและการนำไปใช้เป็นประโยชน์ทางเทคโนโลยี โดยโพรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติตามที่กล่าวไปข้างต้น อาทิเช่น โพรไบโอติกต้องสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร สามารถยึด

เกาะและเพิ่มจำนวนกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ของโฮสต์ สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ ภายในลำไส้ได้ และโพรไบโอติกที่จะนำมาใช้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย โดยต้องเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกจากมนุษย์หรือสัตว์ที่มีสุขภาพดี และโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ควรเป็นสายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกับโฮสต์ เนื่องจากโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์จะก่อให้เกิดประโยชน์ในโฮสต์ที่จำเพาะ ดังนั้นโพรไบโอติกที่จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์จึงควรถูกคัดเลือกให้เหมาะสมกับสัตว์ในแต่ละสายพันธุ์ให้มากที่สุด ซึ่งจำเป็นต้องมีการระบุลักษณะทางฟีโนไทป์และลักษณะทางจีโนไทป์ที่แม่นยำ ไม่มีบริเวณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคหรือการสร้างสารพิษ รวมทั้งต้องไม่พบบริเวณของยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สามารถถ่ายทอดได้อีกด้วย นอกจากนี้ในด้านการนำไปใช้เป็นประโยชน์ทางเทคโนโลยีแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่ถูกเติมลงในอาหารสัตว์ควรทนต่ออุณหภูมิและความดันที่ใช้ในกระบวนการผลิตทางการค้า มีความเสถียรหรือมีกิจกรรมในการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่เป็นประโยชน์ที่สูง เช่น ยังคงความสามารถในการสร้างเอนไซม์หรือสารยับยั้งจุลินทรีย์ สามารถขยายการผลิตหัวเชื้อได้ง่าย มีอัตราการรอดชีวิตสูงในระหว่างการจัดการและจัดเก็บ มีความเสถียรทางพันธุกรรม และมีความต้านทานต่อการติดเชื้อของไวรัสที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย<sup>(1)</sup>

### 1.5 การนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์

ในปัจจุบันการใช้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์เป็นที่นิยมมากขึ้นเพื่อส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ และเพื่อป้องกันปัญหาทางด้านสุขภาพต่าง ๆ โดยสุขภาพที่ดีของสัตว์นั้นจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ภายในลำไส้เช่นเดียวกับมนุษย์ การผสมจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์โดยตรงหรือใช้ในรูปของอาหารเสริมจะช่วยให้การรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และป้องกันเชื้อก่อโรคในลำไส้ นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเหล่านี้ยังช่วยในการผลิตวิตามิน สารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ และช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหารต่าง ๆ อีกด้วย<sup>(53)</sup> ซึ่งการนำโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารสัตว์นี้อาจใช้ในรูปสายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสม โดยผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ให้กับสัตว์อาจอยู่ในรูปของผง น้ำ แคปซูล และเจลหรือเพสต์ (paste) เป็นต้น ตัวอย่างรายงานการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้ในสัตว์มีดังนี้

Nikoskelainen และคณะ (2001)<sup>(54)</sup> รายงานว่า หลังจากบ่อน *L. rhamnosus* ATCC 53103 ให้แก่ปลา Rainbow trout ซึ่งถูกทำให้ติดเชื้อด้วย *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* พบว่า ปลาที่มีอัตราการตายที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการบ่อนเชื้อ *L. rhamnosus* ATCC 53103

กีวีวิชญ์ เพชรจุล และ ทศพร เครือศรี (2559)<sup>(55)</sup> ศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติก และอีเอ็มต่ออัตราการเจริญ อัตราการรอดชีวิต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาหมอไทยที่เลี้ยงในกระชัง พบว่า ปลาหมอไทยที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการผสมโพรไบโอติกจะมีอัตราการรอดตายสูงจากการตายโดยธรรมชาติ และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ดีกว่าปลาหมอไทยในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่มีการเติมโพรไบโอติก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การผสมโพรไบโอติกกับอาหารสำเร็จรูปสามารถนำมาใช้เลี้ยงเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและเพิ่มอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาหมอไทยได้

สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์และคณะ (2564)<sup>(56)</sup> ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ลงในอาหารเลี้ยงผึ้ง *Apis mellifera* และศึกษาผลต่อการสร้างสเปิร์มของผึ้ง พบว่า ผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารที่เสริมโพรไบโอติกมีการสร้างสเปิร์มสูงกว่าผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ และผึ้งที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการผสมโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ชาญวิทย์ สุวรรณ และ ชนกกันต์ จิตมนัส (2563)<sup>(57)</sup> ได้ศึกษาถึงการให้ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปที่มีการผสมแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *B. subtilis* ในการเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันของปลานิลในบ่อดิน พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งมีน้ำหนักสุดท้าย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าปลานิลที่ไม่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก และผลของการเสริมภูมิคุ้มกันของปลานิลพบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 1.5.1 การนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมาใช้กับสัตว์ในฟาร์มและปศุสัตว์

สัตว์ที่ถูกเลี้ยงในฟาร์มจะเผชิญกับความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม เช่น วิธีการเลี้ยง การจัดการฟาร์ม หรือองค์ประกอบของอาหาร อาทิเช่น การเติมสารปฏิชีวนะหรือสารเร่งการเจริญลงในอาหาร ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ อาจทำให้เกิดการเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ทำให้เกิดการพัฒนาของจุลินทรีย์ให้มีการติดต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น และส่งผลให้เกิดอาการแพ้หรือโรคต่าง ๆ ได้<sup>(58)</sup> ซึ่งมีการศึกษาจำนวนมากที่ยืนยันว่าการเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์นั้นส่งผลให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงการให้โพรไบโอติกในปริมาณที่เหมาะสมทั้งสายพันธุ์เดียว หรือสายพันธุ์ผสมนั้น มีผลอย่างมากต่อการดูดซึมสารอาหาร น้ำหนักตัวโดยรวม

ของสัตว์ รวมทั้งยังมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของนม เนื้อสัตว์ และไข่ที่ดีขึ้น<sup>(59)</sup> ดังรายงานต่อไป

Bohmer และคณะ (2006)<sup>(60)</sup> ได้ศึกษาถึงการเติมโพรไบโอติกสายพันธุ์ *E. faecium* DSM 7134 ลงในอาหารของแม่สุกร 33 ตัว ระหว่างวันที่ 90 ของการตั้งท้อง จนถึงวันที่ 28 ของการให้นม พบว่า แม่สุกรที่ได้รับอาหารที่มีการเติมโพรไบโอติกมีการบริโภคอาหารที่มากขึ้น รวมถึงขนาดตัวของลูกสุกร น้ำหนักของแม่และลูกสุกรสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยน้ำหนักตัวของแม่สุกรในวันที่ 28 ของการให้นมสูงกว่าแม่สุกรที่ไม่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก 11 กิโลกรัม

Mountzouris และคณะ (2007)<sup>(61)</sup> ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ผสมที่ถูกเติมลงในอาหารและน้ำในการเลี้ยงไก่เนื้อ 400 ตัว โดยมีการเติมโพรไบโอติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ร่วมกัน ดังนี้ *L. reuteri*, *E. faecium* และ *P. acidilactici* ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของไก่ที่มีสุขภาพดี เปรียบเทียบกับอาหารไก่ที่มีการเติมยา avilamycin และกลุ่มควบคุม คือ อาหารไก่ที่ไม่มีการเติมโพรไบโอติกและยา avilamycin พบว่า ไก่ที่ได้รับอาหารและน้ำที่มีการเติมโพรไบโอติกสายพันธุ์ผสม และไก่ที่ได้รับอาหารที่มีการเติมยา avilamycin มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่ได้รับอาหารในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังได้ทำการประเมินระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ พบว่าเมื่อการทดลองสิ้นสุดลง ไก่เนื้อที่ได้รับอาหารและน้ำที่มีการเติมโพรไบโอติก ตรวจพบจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ ได้แก่ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารไก่ที่มีการเติม avilamycin และยังพบ fatty acids และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดจากแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก ได้แก่  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase และ  $\beta$ -glucuronidase ในระดับสูงอีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมอาหารไก่ด้วยโพรไบโอติก สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของไก่ และสามารถปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้อีกด้วย

Haddadin และคณะ (2018)<sup>(62)</sup> ได้ศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* ความเข้มข้น  $4 \times 10^6$  CFU/g ของอาหารไก่ โดยทำการบ่มให้ไก่เป็นเวลา 48 สัปดาห์ พบว่า ผลผลิตและคุณภาพของไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบระดับคอเลสเตอรอลในไข่แดงที่ลดลงในไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการผสมโพรไบโอติก

### 1.5.2 การนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมาใช้กับสัตว์เลี้ยง

สัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะสุนัขหรือแมวมักประสบปัญหาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร เช่น อากาศท้องร่วงขับปัสสาวะหรือเรื้อรัง ลำไส้อักเสบ เบื่ออาหาร รวมทั้งอาการอาเจียน การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในสัตว์เลี้ยงเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ควรใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่แยกมาจากโฮสต์เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม โพรไบโอติกที่ใช้ในเชิงพาณิชย์สำหรับสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข ไม่ได้มีแหล่งกำเนิดมาจากสุนัข ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ลดลง โดยได้มีงานวิจัยที่นำโพรไบโอติกที่แยกจากลำไส้หรืออุจจาระของสุนัขที่มีสุขภาพดี เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกสำหรับสุนัข ดังนี้

O'Mahony และคณะ (2009)<sup>(63)</sup> ได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารของสุนัขที่มีสุขภาพดีและทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกในระดับ *in vitro* และ *in vivo* ภายใต้สมมติฐานที่ว่า การแยกและคัดเลือก lactobacilli และ bifidobacteria ที่ยึดเกาะในทางเดินอาหารของสุนัขสุขภาพดีจะทำให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถนำไปใช้สำหรับสุนัขได้ ซึ่งพบว่า *B. animalis* AHC7 สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ได้ดี มีอัตราการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารที่สูง และสามารถยับยั้งและลดการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำไปทดสอบในสุนัขพบว่า เมื่อสุนัขบริโภค *B. animalis* AHC7 สามารถลดการติดเชื้อในกลุ่มของ Clostridia โดยเฉพาะ *C. difficile* ได้

Kumar และคณะ (2017)<sup>(64)</sup> ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 9 สายพันธุ์จากอุจจาระของสุนัข พบว่า *L. johnsonii* cPRO23 มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก จากนั้นได้นำโพรไบโอติกที่ได้มาผสมลงในอาหารสุนัขลาบราดอร์ที่โตเต็มวัย 15 ตัว เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้นแอมโมเนียในอุจจาระของสุนัขที่ได้รับโพรไบโอติกลดลง แต่มีความเข้มข้นของ acetate, butyrate และ lactate ที่สูงขึ้น และยังพบว่าสุนัขที่มีการกินโพรไบโอติกจะมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cell-mediated immune response) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสุนัขที่ได้รับโพรไบโอติกที่มาจากผลิตภัณฑ์นม และกลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก

อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังมีการศึกษาการนำโพรไบโอติกที่แยกจากลำไส้หรืออุจจาระของสุนัขที่มีสุขภาพดีสำหรับมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมของสุนัขน้อยมาก โดยสุนัขในแต่ละพื้นที่ย่อมที่จะมีโภชนาการที่แตกต่างกันตามอาหารที่ได้รับ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในแต่ละพื้นที่จึงเป็นสิ่งจำเป็น และสามารถนำไปใช้ได้กับสุนัขในพื้นที่นั้น ๆ<sup>(65)</sup> ซึ่งนอกจากจะเกิดประโยชน์กับสุนัขดังกล่าวมาแล้ว จุลินทรีย์ดังกล่าวยังสามารถอยู่รอดได้ในทางเดินอาหารของสุนัขในประเทศไทยอย่างแท้จริง



## 2. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

ในปัจจุบันโพรไบโอติกได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมของทั้งคนและสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามส่วนสำคัญที่สุดที่โพรไบโอติกจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องมีจำนวนของเซลล์โพรไบโอติกในปริมาณที่มากพอเมื่อถึงบริเวณเป้าหมาย เช่น บริเวณลำไส้ของโฮสต์ นอกจากนี้โพรไบโอติกจะต้องสามารถรอดชีวิตในสภาวะต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมในระหว่างกระบวนการผลิต รวมถึงสภาวะที่รุนแรงในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการที่ช่วยปกป้องและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเมื่อผ่านสภาวะที่ไม่เหมาะสมดังกล่าว โดยวิธีการไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) ได้ถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งมาเพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

### 2.1 ความหมายและวัตถุประสงค์ของวิธีการไมโครเอนแคปซูลชัน

การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยใช้วิธีไมโครเอนแคปซูลชัน เป็นกระบวนการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับเมทริกซ์ (matrix) หรือสารที่ใช้ในการห่อหุ้มที่สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้เป็นไมโครแคปซูล (microcapsule) และสามารถควบคุมการปลดปล่อยไมโครแคปซูลได้ในสภาวะที่ต้องการ<sup>(66)</sup> โดยการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยวิธีไมโครเอนแคปซูลชัน มีวัตถุประสงค์เพื่อปกป้องเซลล์โพรไบโอติกจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสภาวะในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ แต่จะต้องสามารถปลดปล่อยเซลล์โพรไบโอติกเมื่อเข้าสู่ลำไส้ของโฮสต์

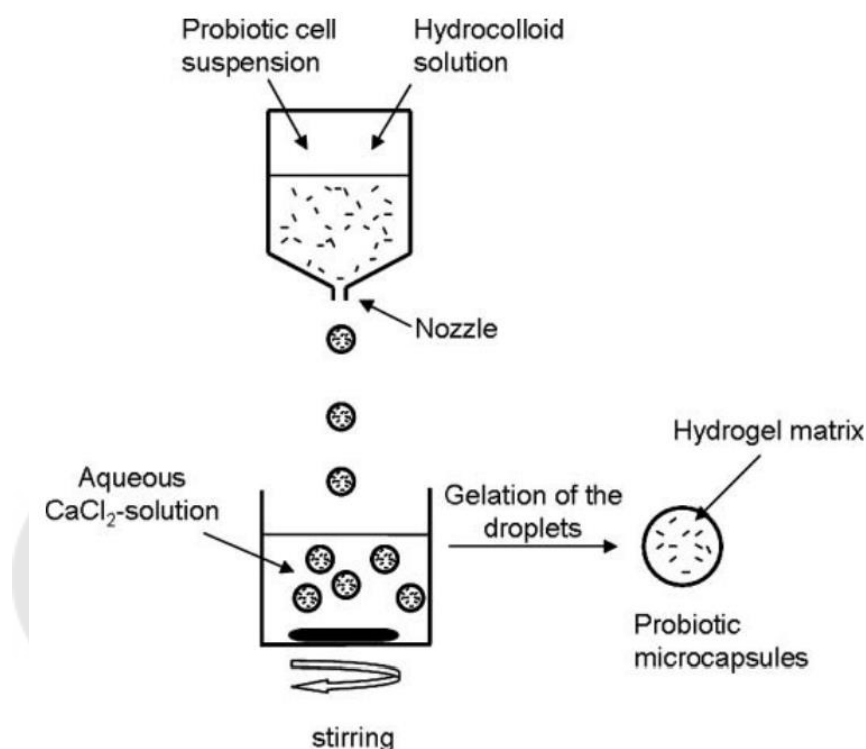
### 2.2 วิธีการไมโครเอนแคปซูลชันประเภทต่าง ๆ

วิธีการไมโครเอนแคปซูลชันที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลัก ได้แก่ เอกซ์ทรูชัน (extrusion) อิมัลชัน (emulsion) และการทำให้แห้งโดยการพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ที่นำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นมมีส่วนใหญ่ผลิตขึ้นโดยใช้เทคนิคเอกซ์ทรูชัน และอิมัลชัน<sup>(67)</sup>

#### 2.2.1 เอกซ์ทรูชัน

วิธีเอกซ์ทรูชัน จะเริ่มจากการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ หรือเมทริกซ์ที่ใช้ในการห่อหุ้ม จากนั้นจะมีการเติมสารแขวนลอยจุลินทรีย์เข้มข้นลงไป ในสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการหยดสารผสมของเซลล์และไฮโดรคอลลอยด์ผ่านหัวฉีดลงในสารละลายที่ทำให้เกิดการแข็งตัว ซึ่งจะได้เป็นเม็ดไมโครแคปซูลขนาดเล็กเกิดขึ้น (ภาพประกอบ 4) โดยการห่อหุ้มที่ใช้วิธีเอกซ์ทรูชันนี้นิยมใช้โซเดียมอัลจีเนต (sodium-alginate) เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์หรือสารห่อหุ้มซึ่งจะถูกหยดลงสู่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) ซึ่งจะเกิดเป็นไมโครแคปซูลแคลเซียมอัลจีเนตเกิดขึ้น โดยขนาดของไมโครแคปซูลที่ได้

จากวิธีการนี้จะขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวฉีด ระยะห่างระหว่างหัวฉีดและสารละลายที่ทำให้เกิดการแข็งตัว และความหนืดของส่วนผสมเซลล์ไฮโดรคอลลอยด์ ซึ่งวิธีเอกซ์ทรูชันนี้เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนต่ำและมีสภาวะในการห่อหุ้มที่ไม่รุนแรง จึงไม่ส่งผลกระทบต่อชีวิตของเซลล์โพรไบโอติก ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีนี้ในการศึกษาการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกอย่าง



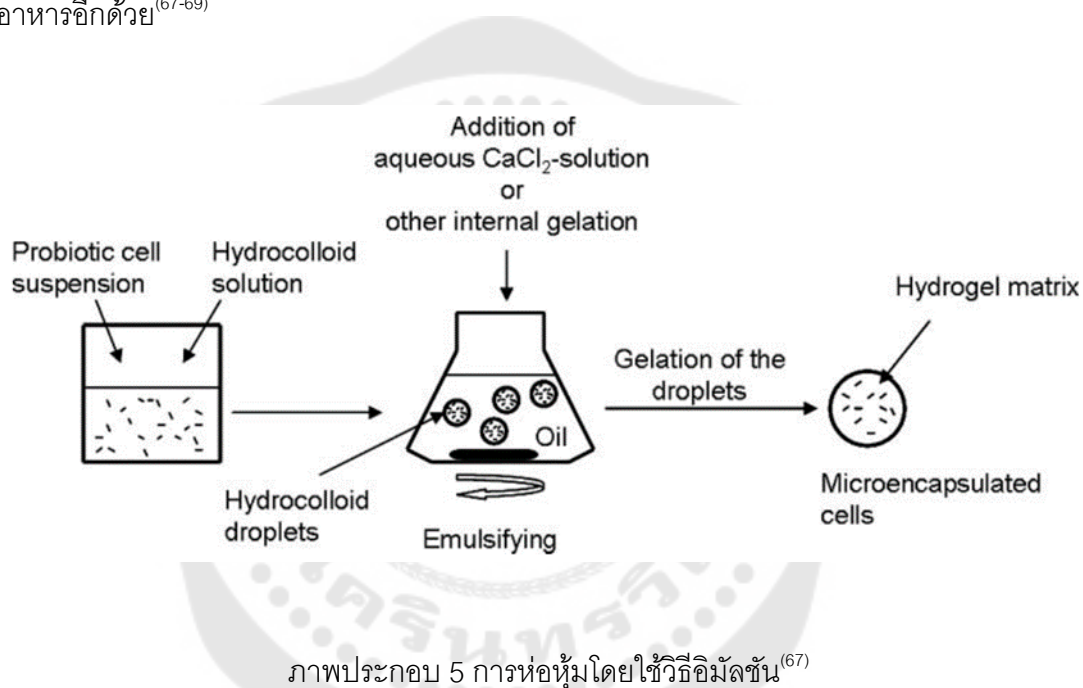
แพร่หลาย ถึงแม้ว่าขนาดของไมโครแคปซูลที่ได้จากวิธีนี้จะมีขนาดใหญ่อยู่ในช่วง 0.5-3 มิลลิเมตรก็ตาม<sup>(67)</sup>

ภาพประกอบ 4 การห่อหุ้มโดยใช้วิธีเอกซ์ทรูชัน<sup>(67)</sup>

### 2.2.2 อิมัลชัน

วิธีอิมัลชันจะใช้สารไฮโดรคอลลอยด์ในการห่อหุ้มเช่นเดียวกับวิธีเอกซ์ทรูชัน โดยวิธีนี้จะอาศัยความสัมพันธ์ของเฟสไม่ต่อเนื่องและเฟสต่อเนื่อง ซึ่งสารผสมระหว่างเซลล์และสารไฮโดรคอลลอยด์ปริมาณเล็กน้อยจะถูกทำให้เป็นอิมัลชันก่อน จากนั้นจะถูกเติมลงในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวฟ่าง น้ำมันดอกทานตะวัน หรือ light paraffin oil ที่มีปริมาณมากกว่า และจะถูกกวนเบา ๆ จนเกิดอิมัลชันในน้ำมันอยู่ในรูปของ water-in-oil emulsion เสร็จแล้วจึงเติมสารละลายที่ทำให้เจลแข็งตัว เช่น แคลเซียมคลอไรด์ ทำให้เกิดเป็นเม็ดไฮโดร

คอลลอยด์ (hydrocolloid droplets) (ภาพประกอบ 5) ซึ่งในการควบคุมขนาดของไมโครแคปซูลนั้นจะขึ้นอยู่กับความเร็วในการกวน และความเข้มข้นและความหนืดระหว่างเฟสไม่ต่อเนื่องและเฟสต่อเนื่อง วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายต่อการผลิตไมโครแคปซูลขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเอกซ์ทรูชัน แต่อย่างไรก็ตาม วิธีอิมัลชันเป็นวิธีที่มีต้นทุนที่สูงกว่าวิธีเอกซ์ทรูชัน นอกจากนี้ขนาดและรูปร่างของ ไมโครแคปซูลจะมีความไม่สม่ำเสมอ และควบคุมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อได้ยาก รวมถึงบางครั้งอาจไม่เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหรือนมที่มีไขมันต่ำ เนื่องจากอาจมีการตกค้างของน้ำมันที่ใช้ในกระบวนการห่อหุ้ม และอาจส่งผลกระทบต่อรสชาติของอาหารอีกด้วย<sup>(67-69)</sup>



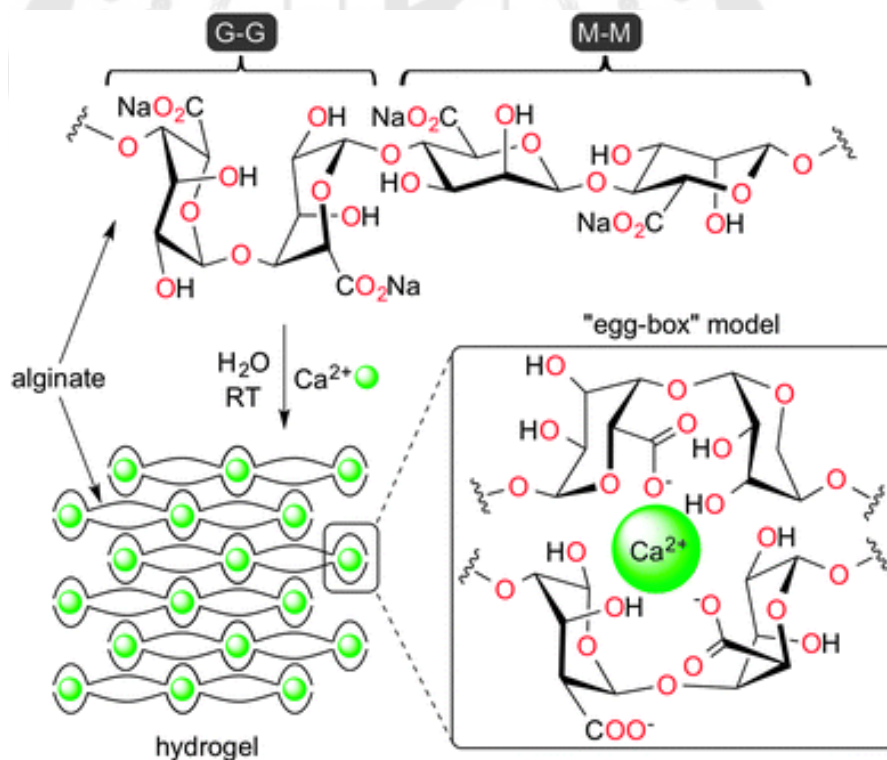
ภาพประกอบ 5 การห่อหุ้มโดยใช้วิธีอิมัลชัน<sup>(67)</sup>

### 2.3 ไฮโดรคอลลอยด์ที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

ในกระบวนการการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกนั้นสามารถใช้ไฮโดรคอลลอยด์ที่เป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่มีความเสถียร สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกได้ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการเตรียมไมโครแคปซูล ซึ่งตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่มีการใช้สำหรับการห่อหุ้ม ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ เช่น อัลจิเนต ไคโตซาน gellan gum, xanthan gum หรือโปรตีน เช่น เคซีน โปรตีนเวย์ และผลิตภัณฑ์ที่มีทั้งเคซีนและโปรตีนเวย์ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวของการเลือกพอลิเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว การคำนึงถึงลักษณะของผลิตภัณฑ์สุดท้ายของไมโครแคปซูลที่จะนำไปใช้นั้นก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกพอลิเมอร์ห่อหุ้มที่เหมาะสมอีกด้วย

### 2.3.1 การห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต

อัลจิเนตจัดเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์สายตรงที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายชนิดต่าง ๆ เช่น สาหร่ายสีน้ำตาล เป็นต้น ประกอบด้วยโครงสร้างของ  $\beta$ -D-mannuronic (M) และ  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) สำหรับในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก จะนิยมใช้อัลจิเนตในรูปของแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 0.5-4 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษและผ่านการยอมรับโดยองค์การอาหารและยาว่าสามารถใช้ในการเติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย (Generally recognized as safe: GRAS) มีความเข้ากันได้กับเซลล์แบคทีเรีย มีต้นทุนต่ำ ใช้สภาวะในการเกิดเจลที่ไม่รุนแรง และสามารถปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายในลำไส้ได้ ซึ่งอัลจิเนตจะสามารถเกิดเป็นไฮโดรเจล (hydrogel) เมื่อสัมผัสกับโลหะไดวาเลนต์ เช่น แคลเซียม แคลเดียม หรือสังกะสี เป็นต้น<sup>(70)</sup> ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า egg box model ซึ่งเป็นการเชื่อมกันระหว่างโลหะไดวาเลนต์ และหมู่คาร์บอกซิลของ  $\alpha$ -L-guluronic acid 4 ตัว<sup>(71)</sup> (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของอัลจิเนตและการเกิดไฮโดรเจลของแคลเซียมอัลจิเนต<sup>(72)</sup>

แต่อย่างไรก็ตามการใช้อัลจินเตในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกก็ยังมีข้อเสีย เช่น ไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจินเตเป็นวัสดุห่อหุ้มมีความไวต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง เช่น สภาวะในกระเพาะอาหารของโฮสต์ นอกจากนี้พื้นผิวของไมโครแคปซูลที่ได้มีรูพรุน หรือรอยแตกค่อนข้างมากซึ่งส่งผลเสียต่อการป้องกันเซลล์โพรไบโอติกจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ อีกทั้งการขยายขนาดของกระบวนการผลิตค่อนข้างยาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาการนำพอลิเมอร์อื่น ๆ ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับอัลจินเตเพื่อลดข้อเสียดังกล่าว<sup>(67, 73)</sup> ตัวอย่างเช่น การห่อหุ้มด้วยอัลจินเตร่วมกับแป้ง<sup>(74)</sup> อัลจินเตร่วมกับเจลาติน<sup>(75)</sup> และอัลจินเตร่วมกับโปรตีนเวย์ (whey protein)<sup>(76)</sup> เป็นต้น

### 2.3.2 การห่อหุ้มด้วยนมและโปรตีนจากนม

นมและโปรตีนจากนมเป็นสารห่อหุ้มในธรรมชาติสำหรับการห่อหุ้มโพรไบโอติก และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้ในอาหารหลายประเภท เนื่องจากคุณสมบัติทางโครงสร้างและทางเคมีกายภาพของโปรตีน ซึ่งนมและโปรตีนจากนมมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์โพรไบโอติก มีความเป็นบัฟเฟอร์สูง และมีโครงสร้างที่สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีในระหว่างกระบวนการทางอาหารและในสภาวะระบบทางเดินอาหาร ซึ่งโปรตีนจากนมเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่น่าสนใจในการใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับอัลจินเตเพื่อปรับปรุงลักษณะโครงสร้างของอัลจินเต<sup>(77, 78)</sup> ไมโครแคปซูลที่ใช้โปรตีนจากนมในการห่อหุ้มจะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร<sup>(79)</sup> โดยนมและโปรตีนจากนมที่มีการใช้ในการห่อหุ้มได้แก่ เคซีน โปรตีนเวย์ รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่มีทั้งเคซีนและโปรตีนเวย์ เช่น นมวัว หรือนมแพะ เป็นต้น นอกจากนี้การใช้นมและโปรตีนจากนมเป็นวัสดุห่อหุ้มมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากนมในการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้นอีกด้วย ตัวอย่างรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยนมและโปรตีนจากนม แสดงดังตาราง 3

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะผลิตภัณฑ์จากนมแพะมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับอัลจินเต เพื่อลดข้อบกพร่องของการปกป้องโพรไบโอติกในสภาวะที่ไม่เหมาะสม และเพื่อส่งเสริมการรอดชีวิตและนำส่งเซลล์โพรไบโอติกไปยังบริเวณเป้าหมายได้ในปริมาณที่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุนัข นอกจากนี้นมแพะยังเป็นผลิตภัณฑ์นมที่นิยมให้สุนัขรับประทานจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มร่วมกับอัลจินเตในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุนัข

ตาราง 3 ตัวอย่างรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

| วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้ม  | วิธีการห่อหุ้ม | สายพันธุ์ของโพรไบโอติก                                 | สรุปผลการทดลอง   |
|--|----------------|--|--|
| อัลจิเนต   | เอกซ์ทรูชัน    | <i>L. casei</i> /NCDC-298                              | เชื้อ <i>L. casei</i> ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีความเป็นกรดความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูง และในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ <sup>(80)</sup>  |
| อัลจิเนต   | เอกซ์ทรูชัน    | <i>Lactococcus (Lc.) lactis</i> subsp. cremoris LM0230 | การห่อหุ้ม <i>Lc. lactis</i> ในไมโครแคปซูลในรูปของแคลเซียมอัลจิเนตสามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของ <i>Lc. lactis</i> ได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน <sup>(81)</sup>   |
| อัลจิเนตร่วมกับ skim milk อัลจิเนตร่วมกับ dextrin อัลจิเนตร่วมกับไคโตซานและอัลจิเนตร่วมกับโปรตีนเวย์ | เอกซ์ทรูชัน    | <i>L. plantarum</i> EMCC1039                           | <i>L. plantarum</i> ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับ skim milk สามารถส่งเสริมการรอดชีวิตได้ดีที่สุดในระหว่างการเก็บรักษา กระบวนการผลิตอาหาร และในระบบทางเดินอาหารจำลอง และการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกไม่ส่งผลกระทบต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ต่างๆของโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษานี้ <sup>(78)</sup>  |
| อัลจิเนต อัลจิเนตร่วมกับนมวัว อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ และอัลจิเนตร่วมกับ casein hydrolysate             | เอกซ์ทรูชัน    | <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> CCUG 52486     | การใช้นมวัวและนมแพะเป็นวัสดุห่อหุ้มร่วมกับอัลจิเนตส่งผลในการลดรูพรือรอยแตกบนผิวของไมโครแคปซูล และยังช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง และในระหว่างการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์นมและนมวัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ได้ดีกว่าการใช้อัลจิเนตร่วมกับ casein hydrolysate และอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวเป็นวัสดุห่อหุ้ม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การใช้นมแพะเป็นวัสดุห่อหุ้มร่วมกับอัลจิเนตมีศักยภาพในการใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มชนิดใหม่ที่จะช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์นม <sup>(77)</sup> |

ตาราง 3 (ต่อ)

|                           |             |  |  |
|---------------------------|-------------|--|--|
| วัสดุที่ใช้ในการหมัก      | วิธีการหมัก | สายพันธุ์ของโพรไบโอติก   | สรุปผลการทดลอง   |
| อัลจินเตร่วมกับโปรตีนเวย์ | เอกซ์ทรูชัน | <i>L. acidophilus</i> La-14  | การหมักนมเชลล์ <i>L. acidophilus</i> ด้วยอัลจินเตร่วมกับโปรตีนเวย์สามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของเชลล์โพรไบโอติกในระหว่างสภาวะทางเดินอาหารจำลอง กระบวนการให้ความร้อน และในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาในตู้เย็นและการแช่แข็งได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชลล์อิสระในสภาวะเดียวกัน <sup>(82)</sup>  |
| อัลจินเต                  | เอกซ์ทรูชัน | <i>L. acidophilus</i> C5CC 2400 และ C5CC 2409                                      | สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมัก <i>L. acidophilus</i> C5CC 2400 และ C5CC 2409 คือใช้อัลจินเตความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) $\text{CaCl}_2 \cdot 0.1 \text{ M}$ และหัวนมฉีด 450 ไมโครเมตร โดยสามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของเชื้อที่อุณหภูมิในสภาวะนำย้อยจำลอง (pH 2) และในสภาวะที่มีน้ำเค็มความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ได้ดีกว่าเชลล์อิสระภายใต้สภาวะเดียวกัน <sup>(83)</sup> |
| อัลจินเตร่วมกับโปรตีนเวย์ | เอกซ์ทรูชัน | <i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. plantarum</i> CIP A159 และ <i>L. plantarum</i> 800 | การหมักนมเชลล์โดยใช้อัลจินเตร่วมกับการเคลือบด้วยโปรตีนเวย์สามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของ <i>L. plantarum</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้มากกว่า <i>L. plantarum</i> ที่ถูกหมักด้วยอัลจินเตเพียงอย่างเดียวภายใต้สภาวะนำย้อยจำลอง <sup>(76)</sup>  |
| อัลจินเตร่วมกับ pure milk | เอกซ์ทรูชัน | <i>L. bulgaricus</i>   | การหมักนมเชลล์ <i>L. bulgaricus</i> โดยใช้อัลจินเตร่วมกับ pure milk สามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของ <i>L. bulgaricus</i> ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น สภาวะนำย้อยและค่าได้จำลอง รวมถึงในระหว่างการรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับเชลล์ <i>L. bulgaricus</i> ที่ไม่ถูกหมัก <sup>(84)</sup>  |

## 2.4 การปลดปล่อยของเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม

ในการประยุกต์ใช้ไมโครแคปซูลที่มีการห่อหุ้มโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องทำการทดสอบความสามารถการปกป้องเซลล์โพรไบโอติกภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เพื่อให้เซลล์โพรไบโอติกมีชีวิตรอดได้อย่างเพียงพอ รวมทั้งยังต้องทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะที่จำเพาะ หรือในบริเวณเป้าหมาย เช่น ในสภาวะลำไส้ของโฮสต์ ซึ่งความสามารถในการปลดปล่อยโพรไบโอติกออกจากไมโครแคปซูลนี้ถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์โพรไบโอติกและโฮสต์

อย่างไรก็ตาม กลไกการควบคุมการปลดปล่อยโพรไบโอติกยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน ซึ่งได้มีการศึกษาการปลดปล่อยของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะลำไส้จำลองในระดับ *in vitro* โดย Shi และคณะ (2013)<sup>(84)</sup> ได้ทำการศึกษาค้นคว้าการปลดปล่อยของเซลล์ *L. bulgaricus* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับ pure milk ในสภาวะลำไส้จำลองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า มีการปลดปล่อย *L. bulgaricus* อย่างรวดเร็วภายหลังจาก 60 นาที ซึ่งกลไกการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มนี้อาจเกิดจากการบวมหรือการสลายของโครงสร้างไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับ pure milk โดยการปลดปล่อยจะขึ้นกับความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มที่นำมาใช้อีกด้วย นอกจากนี้ Liao และคณะ (2019)<sup>(85)</sup> ได้ทำการศึกษาค้นคว้าการปลดปล่อยและการรอดชีวิตของ *L. fermentum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับโพรไบโอติกชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีรายงานว่า การห่อหุ้มโดยใช้อัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับโพรไบโอติกชนิดต่าง ๆ มีความเสถียรภายใต้สภาวะน้ำย่อยจำลอง และมีการปลดปล่อยเซลล์อย่างช้า ๆ เมื่อสัมผัสกับสภาวะลำไส้จำลอง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gebara และคณะ<sup>(86)</sup> ซึ่งมีรายงานว่า การห่อหุ้ม *L. acidophilus* La5 ด้วยเพกตินที่เคลือบด้วยโปรตีนเวย์ที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนสามารถปกป้องเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายใต้สภาวะน้ำย่อยจำลองเป็นเวลา 120 นาทีเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และมีการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มเมื่อภายหลังจากการสัมผัสกับสภาวะลำไส้จำลองเป็นเวลา 300 นาที

## 3. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมนมแพะสำหรับนำไปใช้ในสุนัข

ปริมาณของโพรไบโอติกที่มีชีวิตเป็นข้อกำหนดที่สำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก ซึ่งได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกเพื่อให้โพรไบโอติกมีปริมาณที่เพียงพอในการก่อให้เกิดประโยชน์ต่อโฮสต์ ซึ่งในระหว่างขั้นตอนการผลิตหรือในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสภาวะในระบบ



ทางเดินอาหารของโฮสต์นั้นจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในการประยุกต์ใช้ร่วมกับอาหารสัตว์หรือใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัขนั้นมีดังนี้

### 3.1 กระบวนการให้ความร้อน

กระบวนการให้ความร้อน (heat treatment) เป็นหนึ่งในกระบวนการแปรรูปอาหารของผลิตภัณฑ์นม และเพื่อให้เซลล์โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพและเหลือรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมนมแพะ โพรไบโอติกจึงจำเป็นต้องมีการรอดชีวิตในอุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ลดปริมาณเชื้อก่อโรคหรือลดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์นม โดยจากการศึกษาของ Teoh และคณะ (2011)<sup>(87)</sup> มีรายงานว่า *L. acidophilus* LA-5 และ *B. pseudocatenulatum* G4 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับแป้งและถูกเคลือบด้วยโคโคซานมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์อิสระเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส และการศึกษาของ Mahmoud และคณะ (2020)<sup>(78)</sup> รายงานว่า *L. plantarum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับ skim milk มีการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกมากกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2015)<sup>(88)</sup> ที่รายงานว่า การห่อหุ้ม *L. kefirifaciens* M1 ด้วยอัลจิเนตร่วมกับ gellan gum และ skim milk ทำให้โครงสร้างของไมโครแคปซูลที่ได้แข็งแรงขึ้นซึ่งมีผลในการช่วยปกป้องเซลล์ *L. kefirifaciens* M1 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงถึง 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และการศึกษาของ Ilha และคณะ (2015)<sup>(89)</sup> รายงานว่า การห่อหุ้ม *L. paracasei* FNU ด้วย skim milk และ cheese whey สามารถป้องกันเซลล์ได้เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม

### 3.2 การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ในปัจจุบันโพรไบโอติกได้รับความนิยมใช้เป็นอาหารเสริมของคน สัตว์ในฟาร์ม รวมถึงสัตว์เลี้ยง โดยควรมีปริมาณของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อย่างน้อย  $10^6$  CFU/g หรือ CFU/ml ในผลิตภัณฑ์อาหาร ณ เวลาที่บริโภค เพื่อก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์<sup>(90)</sup> ซึ่งกระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่อยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ซึ่งการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษานั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา และระยะเวลาในการเก็บรักษา เป็นต้น ซึ่งในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีโพรไบโอติกควรเก็บที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส<sup>(91)</sup> โดยตัวอย่างรายงานเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาโพรไบโอติกมีดังนี้

Mortazavian และคณะ (2007)<sup>(91)</sup> ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 2, 5 และ 8 องศาเซลเซียส ต่อการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* LA-5 และ *B. lactis* BB-12 ในโยเกิร์ต เป็นเวลา 20 นาที พบว่า *L. acidophilus* LA-5 มีการรอดชีวิตที่สูงที่สุดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *B. lactis* BB-12 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

Shi และคณะ (2013)<sup>(84)</sup> ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. bulgaricus* ที่ถูกห่อหุ้ม และไม่ถูกห่อหุ้มในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มสามารถรอดชีวิตและไม่มี การลดลงของจำนวนเซลล์ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตที่ลดลงจาก 10 log CFU/ml เหลือเพียง 2.3 log CFU/ml ภายหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน

Liao และคณะ (2019)<sup>(85)</sup> รายงานว่า *L. fermentum* L7 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต ร่วมกับพรีไบโอติกชนิดต่าง ๆ มีการรอดชีวิตที่มากกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

Prasanna และคณะ (2018)<sup>(77)</sup> รายงานว่า การห่อหุ้ม *B. longum* subsp. *infantis* CCUG 5248 ด้วยอัลจิเนต อัลจิเนตร่วมกับนมวัว อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ และอัลจิเนตร่วมกับ casein hydrolysate โดยวิธีเอกซิทูชัน สามารถป้องกันเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาในนมแพะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม โดยเฉพาะการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะสามารถปกป้องเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มให้มีการรอดชีวิตได้สูงที่สุด ดังนั้น การใช้อัลจิเนตร่วมกับนมแพะจึงเหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกจากนมแพะ

### 3.3 ระบบทางเดินอาหารของสุนัข

เมื่อรับประทานอาหารเสริมที่มีโพรไบโอติก โพรไบโอติกจะต้องมีจำนวนที่รอดชีวิตเพียงพอจนถึงบริเวณลำไส้เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์แก่โฮสต์ ซึ่งระบบทางเดินอาหารของคนหรือสัตว์นั้นมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะที่รุนแรงซึ่งจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก ดังนั้น งานวิจัยต่าง ๆ จึงนำเทคนิคการห่อหุ้มมาใช้ในการห่อหุ้มโพรไบโอติก เพื่อให้โพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่เพียงพอและยังช่วยในการขนส่งโพรไบโอติกไปยังบริเวณเป้าหมายอีกด้วย โดยสภาวะของระบบทางเดินอาหารของสุนัขที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมีดังนี้

### 3.3.1 กระเพาะอาหารของสุนัข

ความเป็นกรดและเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของสุนัขเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญสำหรับการรอดชีวิตของโพรไบโอติก โดยเมื่ออาหารถูกขนส่งมาถึงกระเพาะอาหารของสุนัข ภายในกระเพาะอาหารจะมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3-6 ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารนั้น ๆ ดังนั้น การนำโพรไบโอติกมาใช้ร่วมกับอาหารเสริมของสุนัขจึงมักทำการประเมินความทนต่อค่า pH ในช่วง 2-5<sup>(92)</sup> โดยในน้ำย่อยกระเพาะอาหารของสุนัขจะมีสภาวะที่เป็นกรดสูง และประกอบด้วยเอนไซม์ pepsin ซึ่งจะทำงานในสภาวะที่มีความเป็นกรด และทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน และฮอร์โมน gastrin ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการย่อยอาหารของสุนัข ซึ่งระบบย่อยอาหารของสุนัข จะมีความแตกต่างจากมนุษย์ โดยในสุนัขนั้นอาหารที่ถูกละลายจะถูกเก็บไว้ในกระเพาะอาหารนานกว่ามนุษย์ โดยใช้เวลาประมาณ 4-8 ชั่วโมง จากนั้นอาหารที่ย่อยแล้วรวมอยู่กับน้ำย่อยหรือ chyme จะถูกส่งไปสู่ส่วนของลำไส้<sup>(93)</sup>

### 3.3.2 ลำไส้ของสุนัข

เมื่อ chyme เข้าสู่ลำไส้เล็กจะมีการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ซึ่งลำไส้เล็กของสุนัขมีทั้งหมด 3 ส่วนคือ duodenum, ileum และ jejunum ซึ่งโดยรวมจะทำหน้าที่ในการย่อยอาหารให้สมบูรณ์เพื่อให้ดูดซึมได้ดีขึ้น ซึ่งในส่วนของลำไส้เล็กจะมีองค์ประกอบของเกลือแร่ที่ถูกละลายออกมาจากถุงน้ำดี ซึ่งทำให้สภาวะในลำไส้มีความเป็นด่าง และมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายและดูดซึมไขมัน ซึ่งน้ำดีนั้นจะส่งผลกระทบต่อชีวิตของโพรไบโอติก เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของโพรไบโอติกมีส่วนประกอบหลักคือไขมันและกรดไขมัน ทำให้จำนวนโพรไบโอติกลดลง โดยในลำไส้เล็กของสุนัขจะมีความเข้มข้นของเกลือแร่แตกต่างกันในแต่ละส่วนของลำไส้เล็ก โดยมีความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 44.58 milliequivalents/liter (mEq/L)<sup>(94)</sup> และจะใช้เวลาอยู่ที่ลำไส้เล็กสั้นกว่าในกระเพาะอาหาร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ อาทิเช่น ขนาดตัวของสุนัข สายพันธุ์ของสุนัข อายุของสุนัข สุขภาพโดยรวม และอาหารของสุนัข เป็นต้น<sup>(95)</sup> และในส่วนของลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายในการเกาะติดและตั้งรกรากของโพรไบโอติก มีหน้าที่หลักคือเป็นแหล่งกักเก็บของอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งในบริเวณลำไส้ใหญ่นี้ไม่มีการย่อยอาหาร ยกเว้นการย่อยอาหารโดยจุลินทรีย์ต่าง ๆ ภายในลำไส้ ซึ่งจะมีการดูดซึมเฉพาะของเหลว สาร electrolytes กรดไขมันที่ผลิตขึ้นจากการหมักเส้นใยหรืออาหารที่สุนัขไม่สามารถย่อยได้ และรวมถึงวิตามิน A, B และ K<sup>(93)</sup> ซึ่งควรมีปริมาณของเซลล์โพรไบโอติกในลำไส้ไม่น้อยกว่า  $10^6$ - $10^7$  CFU/ml เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุนัขได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(96)</sup> โดยปริมาณที่เหมาะสมของเซลล์โพรไบโอติกจะขึ้นอยู่กับขนาดและน้ำหนักตัวของสุนัข

ดังนั้นความสามารถในการรอดชีวิตต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมทั้งในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อน การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสภาวะในระบบทางเดินอาหารของสุนัข เช่น ความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร สภาวะที่มีเกลือแร่ในลำไส้เล็ก จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกโพรไบโอติก และเพื่อให้โพรไบโอติกไปถึงบริเวณเป้าหมายในปริมาณเพียงพอ ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการนำวิธีการห่อหุ้มมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และควบคุมการขนส่งโพรไบโอติกให้ไปถึงบริเวณเป้าหมายได้อย่างเพียงพอต่อการก่อให้เกิดประโยชน์แก่โฮสต์



### บทที่ 3

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- กระบอกฉีดยา (Syringe) (Nipro, Thailand)
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus Optical Co., Ltd. Japan)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL InTouchScope, USA)
- กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope) (Nikon, Japan)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Taitec, Japan)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker) (Chemoscience, Thailand)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Merck, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับไมโครทิวป์ (Microcentrifuge) (Witeg Labortechnik GmbH, Germany)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler) (Scilogex, USA)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) (Mupid, Japan)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) (Bio-Rad, USA)
- เครื่องกวนสาร (Stirrer) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Dry bath incubator) (Major Science, USA)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Denver Instrument, USA)
- เครื่องสั่นด้วยเสียง (Ultra-sonicator) (Yihua, China)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (Scientific Industries, Inc., USA)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Gallenkamp, UK)
- ตู้บ่มที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer) (Sanden intercool, Thailand)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class 2) (Science Tech, Canada)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot-air sterile oven) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Witeg Labortechnik GmbH, Germany)
- 24 well plate (Thermo Fisher Scientific, Denmark)
- Haemocytometer (Boeco, Germany)

T-flask (Thermo Fisher Scientific, USA)

Vernier caliper (Misumi, Thailand)

## 2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar (Himedia, India)

Agarose (Invitrogen, New Zealand)

Beef extract (Himedia, India)

Bile salt (Himedia, India)

Calcium chloride (Thermo Fisher Scientific, USA)

Calcium carbonate (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chloroform (RCI Labscan Limited, Thailand)

de Man, Rogosa, and Sharpe MRS broth (Himedia, India)

D (+)- glucose (Thermo Fisher Scientific, USA)

Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)  
(Gibco-Invitrogen, USA)

Ethanol (Merck, USA)

Ethidium bromide (Sigma Chemical, USA)

Fetal bovine serum (FBS) (Gibco-Invitrogen, USA)

GelRed loading buffer (Biosharp, China)

Glycerol (Merck, USA)

Hexadecane (Sigma, USA)

Isopropanol (Merck, USA)

Potassium chloride (Sigma Chemical, USA)

Peptone (Himedia, India)

Phenol saturated (Amresco, USA)

Penicillin-streptomycin (10,000 U/ml) (Gibco-Invitrogen, USA)

Phosphate buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific, USA)

Pepsin (Himedia, India)

Sodium bicarbonate (Himedia, India)

Sodium chloride (Thermo Fisher Scientific, USA)

TE buffer (Bio Basic Inc., Canada)

Tris acetate EDTA (TAE) buffer (Cepham Life Sciences, USA)

Tris base (Serva, Germany)

Triton X-100 (Merck, Germany)

Trypsin EDTA (Gibco-Invitrogen, USA)

Tri-sodium citrate (Prolabo, Belgium)

Xylene (Sigma, USA)

### 3. อุปกรณ์เพิ่มเติม

Cellulose acetate filter, pore size 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Germany)

Hypodermic needle 21G (Nipro sales, Thailand)

### 4. Molecular marker

100 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

Generular™ DNA ladder mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 5. เซลล์ไลน์ที่ใช้ทดสอบ

Human colon carcinoma cell line (Caco-2) (ATCC HTB37)

Vero cell line (ATCC CCL-81)

### 6. วิธีการทดลอง

#### 6.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอุจจาระของสุนัข

เก็บตัวอย่างอุจจาระของสุนัขที่มีสุขภาพดี จำนวน 30 ตัว (กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน 2563) มาเจือจาง 10 เท่าในอาหารเหลว MRS จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่บ่มแล้วมา spread บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ภายหลังจากการบ่มจะคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

และนำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะคัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

## 6.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น

### 6.2.1 การศึกษาความสามารถในการทนกรด

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 6.1 มาศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี โดยดัดแปลงจากวิธีของ Guo และคณะ (2010)<sup>(97)</sup> โดยเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) และวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) ให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นใส่ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 3.5 และ 4.5 โดยใช้ 1 N HCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นชุดควบคุม

### 6.2.2 การศึกษาความสามารถในการทนเกลือ น้ำดี

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 6.1 มาศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี โดยดัดแปลงจากวิธีของ Guo และคณะ (2010)<sup>(97)</sup> ทำการเตรียมเชื้อดังข้อ 6.3.2 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{600}$  ให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นใส่ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือ น้ำดี 0.15, 0.3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จากนั้นบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีการเติมเกลือ น้ำดีซึ่งเป็นชุดควบคุม

### 6.2.3 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากข้อ 6.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่กรองได้มาศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี agar well diffusion<sup>(98)</sup> โดยใช้อาหารแข็ง NA (ภาคผนวก ก) ที่มีการ spread เชื้อทดสอบ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae* และ *Bacillus cereus* จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ดูดส่วนใสที่กรองได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในบริเวณหลุมที่เจาะไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบริเวณหลุม ซึ่งแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ สำหรับการศึกษารสร้างแบ



คเทอริโอซินจะใช้วิธี agar well diffusion โดยใช้อาหารแข็ง MRS ที่มีการ spread เชื้อทดสอบ เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่ส่วนใสที่ได้ให้นำมาปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.0 จากนั้น นำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และแบ่งเป็น 2 หลอด หลอดที่ 1 ดูดส่วนใสที่ กรองได้ลงในบริเวณหลุมที่เจาะไว้ อีก 1 หลอดที่เหลือ นำไปบ่มร่วมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ protease, proteinase K, และ trypsin จากนั้นดูผลในบริเวณหลุมที่เจาะไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลว่าเชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินหรือไม่ โดยดู จากหลุมที่ไม่มีบริเวณใสหรือมีบริเวณใสแคบลงหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน จะจัดว่า เป็นแบคเทอริโอซิน

#### 6.2.4 การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

ทำการเตรียมเชื้อดังข้อ 6.2.1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 0.5 กำหนดให้เป็น A<sub>0</sub> นำไปใส่ลงในหลอดทดลอง 3.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม hexadecane หรือ xylene 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยโดยใช้เครื่องผสมสารละลายเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้เกิดการแยกชั้นเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของ ตัวอย่างในชั้น aqueous ด้านล่าง กำหนดให้เป็น A<sub>1</sub> คำนวณค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ หรือ cell surface hydrophobicity ได้จากสมการดังนี้

$$\text{cell surface hydrophobicity (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

จุลินทรีย์ที่มีค่า cell surface hydrophobicity (%) มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แสดง ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่สูง (high hydrophobicity)

จุลินทรีย์ที่มีค่า cell surface hydrophobicity (%) อยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ แสดงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ปานกลาง (moderate hydrophobicity)

จุลินทรีย์ที่มีค่า cell surface hydrophobicity (%) ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดง ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ต่ำ (low hydrophobicity)<sup>(99)</sup>

#### 6.2.5 การศึกษาการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการเตรียมเชื้อดังข้อ 6.3.2 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นนำไปใส่หลอดทดลอง 3 มิลลิลิตร กำหนดให้เป็น A<sub>0</sub> จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นดูผลส่วนใสด้านบนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กำหนดให้เป็น A<sub>20</sub> คำนวณค่าการเกาะกลุ่มกันเองหรือ auto-aggregation จาก สมการดังนี้

$$\text{auto-aggregation (\%)} = \frac{A_0 - A_{20}}{A_0} \times 100$$

### 6.2.6 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 6.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp.*, *V. cholerae* และ *B. cereus* ในอาหารเหลว NB (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) และวัดค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ( $A_{\text{probiotic}}$ ) และแบคทีเรียก่อโรค ( $A_{\text{pathogens}}$ ) ไปใส่หลอดทดลองเดียวกันชนิดละ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยโดยใช้เครื่องผสมสารละลายจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดส่วนใสด้านบนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ หรือ co-aggregation จากสมการดังนี้

$$\text{co-aggregation} = [(1 - A_{\text{mix}}) / (A_{\text{probiotic}} + A_{\text{pathogens}})] / 2 \times 100$$

### 6.3 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA โดยการทำ colony PCR

นำแบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดสอบข้างต้นมาจัดจำแนกสปีชีส์โดยใช้เทคนิค colony PCR โดยใช้ universal primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA ที่มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer (27F): 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'

Reverse primer (1492R): 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS ที่ได้จากการ cross streak มาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultra-sonicator จากนั้นนำไปใส่ลงในส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR reaction โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังตาราง 4 จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ซึ่งแสดงในตาราง 5 โดยขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส ซึ่งจะทำการ

ตรวจสอบซีเอ็นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เปรียบเทียบขนาดของซีเอ็นดีเอ็นเอที่ได้กับซีเอ็นเอมาตรฐาน โดยแถบซีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีขนาดที่ต้องการจะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ตาราง 4 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนซีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

| ส่วนประกอบ                        | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | ความเข้มข้นสุดท้าย  |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| 2X TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN) | 25                  | 1X                  |
| Forward primer 10 $\mu$ M         | 1                   | 0.2 ไมโครโมลาร์     |
| Reverse primer 10 $\mu$ M         | 1                   | 0.2 ไมโครโมลาร์     |
| น้ำกลั่นสำหรับ PCR                | 8                   | -                   |
| ดีเอ็นเอแม่แบบ                    | 15                  | $\leq$ 250 นาโนกรัม |
| <b>รวม</b>                        | <b>50</b>           |                     |

หมายเหตุ: 2X TopTaq Master Mix Kit ประกอบด้วย TopTaq DNA Polymerase, PCR buffer ( $MgCl_2$  3  $\mu$ M) และ dNTP 400  $\mu$ M

ตาราง 5 ขั้นตอนการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนซีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

| ขั้นตอน              | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา      | จำนวนรอบ |
|----------------------|-------------------------|-----------|----------|
| Initial denaturation | 94                      | 5 นาที    |          |
| Denaturation         | 94                      | 30 วินาที | } 35 รอบ |
| Annealing            | 55                      | 40 วินาที |          |
| Extension            | 72                      | 1.30 นาที |          |
| Final extension      | 72                      | 7 นาที    |          |

#### 6.4 การสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการระบุสายพันธุ์แล้วจากข้อ 6.3 และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

กรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank มาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree เพื่อแสดงการจัดกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter โดยใช้โปรแกรม MEGA11 ver. 11.0.10 และกำหนดความเชื่อมั่นของ bootstrap เท่ากับ 1,000 ซ้ำ (replicate)

## 6.5 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเพิ่มเติม

### 6.5.1 การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์

#### Caco-2

##### 6.5.1.1 การเตรียมเซลล์ไลน์ Caco-2

นำเซลล์ไลน์ Caco-2 (ATCC HTB37) มาเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium ที่มีการเติม fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin (10,000 U/ml) 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ใน T-flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการสังเกตรูปร่างของเซลล์ทุก ๆ วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับจนกระทั่งเซลล์ไลน์ Caco-2 มีการเจริญจนเต็มพื้นผิวและยึดเกาะบริเวณพื้นผิวด้านล่างของ T-flask เป็นชั้นเดียว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 21 วัน โดยในระหว่างการบ่มจะทำการเปลี่ยนอาหาร DMEM ทุก ๆ 2 วัน จากนั้นจะทิ้งส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ซึ่งจะเหลือเพียงเซลล์ไลน์ Caco-2 ซึ่งจะติดอยู่บนพื้นผิวของ T-flask จากนั้นจะทำการล้างเซลล์ไลน์ Caco-2 ด้วย PBS เพื่อกำจัดด้วยยั้งเอนไซม์ trypsin จากนั้นเติม trypsin-EDTA 0.25 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ไลน์ Caco-2 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวหลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว โดยห้ามมีการเขย่าเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มกันเองของเซลล์ไลน์ Caco-2 จากนั้นเติมอาหาร DMEM 5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ trypsin จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 7000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส และละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร DMEM และนำไปย้อมด้วยสี trypan blue แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยให้จำนวนเซลล์ต่อหลุมของ 24 well plate เท่ากับ  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นทำการบ่มจนเซลล์มีการเจริญและยึดเกาะที่ก้นหลุม โดยจะทำการเปลี่ยนอาหาร DMEM ทุก ๆ 2 วัน จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2

### 6.5.1.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีการเติม FBS และยาปฏิชีวนะ นับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกเริ่มต้นในหน่วย Log CFU/ml และนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

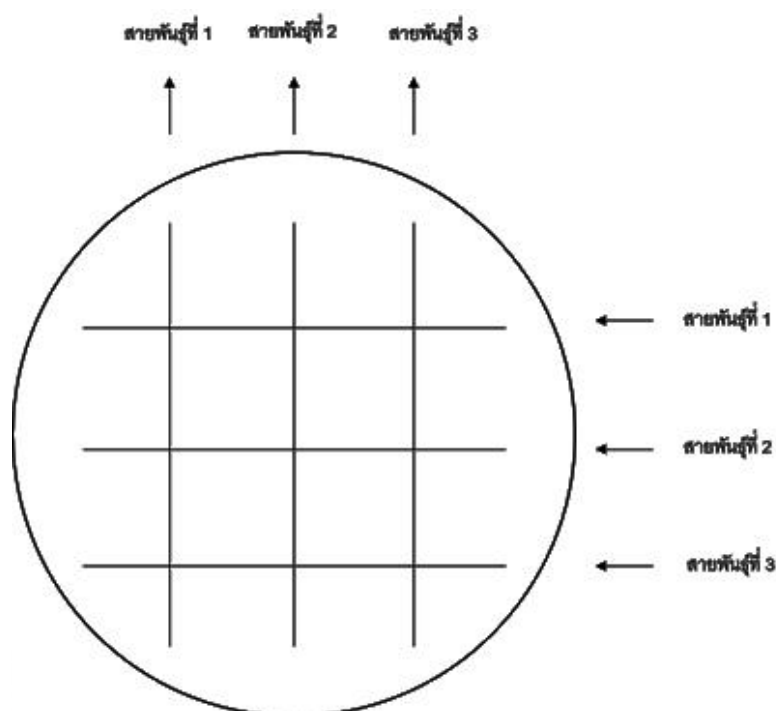
### 6.5.1.3 การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2

นำเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่มีการเจริญใน 24 well plate มาล้างด้วย PBS เพื่อล้างสารยับยั้งเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ปรับความเข้มข้นในข้อ 6.5.1.2 มาเติมลงใน 24 well plate ที่มีการเจริญของเซลล์ไลน์ Caco-2 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้ยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Triton X-100 0.5 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ในที่เย็น เป็นเวลา 3 นาที เพื่อชะเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่มีการยึดเกาะกันออกจากกันหลวม นำไปนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 โดยวิธีการ spread plate ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และรายงานผลในหน่วย Log CFU/ml คำนวณเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเซลล์โพรไบโอติกกับเซลล์ไลน์ Caco-2 จากสูตรดังนี้<sup>(100)</sup>

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่สามารถยึดเกาะเซลล์ไลน์ Caco-2 หลังจากการบ่ม 4 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนเซลล์โพรไบโอติกเริ่มต้น}}$$

### 6.5.2 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สายพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก (coexistence test) ตามวิธีของ Daeschel และคณะ (2019)<sup>(101)</sup> โดยขีดลงบนอาหารแข็ง MRS ในแนวตั้ง และขีดในแนวตั้งฉากกันอีกครั้ง ดังภาพประกอบ 7 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสังเกตการเจริญของเชื้อบริเวณจุดตัด โดยจะคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่มีบริเวณการยับยั้งกัน ซึ่งแสดงถึงการอยู่ร่วมกันโดยไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน



ภาพประกอบ 7 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก

### 6.5.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สายพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเกลือน้ำดี ทำการเตรียมเชื้อดั่งข้อ 6.2.1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{600}$  ให้เท่ากับ 0.5 นำไปหยดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม taurodeoxycholate (TDC) (ภาคผนวก ก) 10 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase หรือไม่ โดยตรวจสอบจากบริเวณของการตะกอน (opaque zone) รอบรอยหยดเชื้อ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการย่อยสลายเกลือน้ำดี

### 6.5.4 การศึกษาการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สายพันธุ์ต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH assay) ตามวิธีของ Yang และคณะ (2020)<sup>(102)</sup> ทำการเตรียมเชื้อดั่งข้อ 6.2.1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{600}$  ให้เท่ากับ 0.5 กำหนดเป็น  $A_{sample}$  จากนั้นใส่เชื้อลงใน 96 well plate ปริมาตรหุลุมละ 100 ไมโครลิตร และผสมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.4 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ สารละลายเมทานอลที่ผสมกับ สารละลาย DPPH กำหนดเป็น  $A_{\text{control}}$  และคำนวณความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้

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

#### 6.5.5 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สายพันธุ์ต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ตามวิธีของ Miller<sup>(103)</sup> ทำการเตรียมเชื้อดังข้อ 6.2.1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{600}$  ให้เท่ากับ 0.5 ในสารละลาย Z buffer (ภาคผนวก ข) และทำการเจือจางสารละลายตะกอนเซลล์ 10 เท่าในสารละลาย Z buffer กำหนดให้เป็น V เติมสารละลาย chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมด้วยสารละลาย o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG; 4 mg/mL) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กำหนดให้เป็น T จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและดูดสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Eppendorf และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดตะกอนเซลล์จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 550 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ดังนี้

$$\text{Miller Units} = 1000 \times [(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})] / (T \times V \times OD_{600})$$

### 6.4 การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่แยกได้

#### 6.4.1 การศึกษาการสร้าง amine

การตรวจสอบการสร้างสารประกอบ amine เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ decarboxylase ของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งจะเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารประกอบเอมีนที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ ทำการเตรียมเชื้อดังข้อ 6.2.1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง  $OD_{600}$  ให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นใส่เชื้อลงในอาหาร decarboxylase base broth ที่มีการเติมกรดอะมิโน 4 ชนิดแยกกัน ได้แก่ histidine, lysine, arginine และ ornithine (ภาคผนวก ก) เติม paraffin เหลวความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างสารประกอบ amine โดยสังเกตจากสีอินดิเคเตอร์ของอาหาร คัดเลือกเชื้อที่ไม่มีการสร้างสารประกอบ amine

#### 6.4.2 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สายพันธุ์ต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเพื่อประเมินความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ทำการ cross streak เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ลงบนอาหารแข็ง Columbia ที่มีการเติมเลือดแกะ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สังเกตผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงรอบโคโลนี ดังนี้

beta-hemolysis เป็นการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดยสมบูรณ์ จะเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อ

alpha-hemolysis เป็นการย่อยสลายเม็ดแดงที่ไม่สมบูรณ์ จะเกิดโซนใสสีเขียวรอบโคโลนีของเชื้อ

gamma-hemolysis คือ ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงรอบโคโลนีของเชื้อ<sup>(104)</sup>

#### 6.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

##### 6.4.3.1 การเตรียมเซลล์ Vero

นำเซลล์ Vero (ATCC CCL-81) มาเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium ที่มีการเติม fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin (10,000 U/ml) 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ใน T-flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการสังเกตรูปร่างของเซลล์ทุก ๆ วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับจนกระทั่งเซลล์ Vero มีการเจริญจนเต็มพื้นผิวและยัดเกาะบริเวณพื้นผิวด้านล่างของ T-flask เป็นชั้นเดียว โดยในระหว่างการบ่มจะทำการเปลี่ยนอาหาร DMEM ทุก ๆ 2 วัน จากนั้นจะทิ้งส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ซึ่งจะเหลือเพียงเซลล์ Vero ซึ่งจะติดอยู่บนพื้นผิวของ T-flask จากนั้นจะทำการล้างเซลล์ Vero ด้วย PBS เพื่อกำจัดด้วยบัฟเฟอร์เอนไซม์ trypsin จากนั้นเติม trypsin-EDTA 0.25 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ Vero ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวหลุดออกเป็นเซลล์ จากนั้นเติมอาหาร DMEM 5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ trypsin จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 7000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส และละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร DMEM และนำไปย้อมด้วยสี trypan blue แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยให้จำนวนเซลล์ต่อหลุมของ 96 well plate เท่ากับ  $3 \times 10^3$  เซลล์ต่อ



ตารางเซนติเมตร จากนั้นทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

#### 6.4.3.2 การสกัดสารจากเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ผ่านการกรองไปใช้ในการทดสอบต่อไป

#### 6.4.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

นำเซลล์ Vero ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน 96 well plate มาดูดส่วนของอาหาร DMEM ออก จากนั้นเติมส่วนของแบคทีเรียที่ได้จากการเตรียมในข้อ 6.4.3.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และอาหาร DMEM 180 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออก เติม MTT reagent ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และอาหาร DMEM 80 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งหากเซลล์ยังมีชีวิตจะมีการสร้างเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenases ไปรีดิวซ์สีเหลืองของสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นผลิตภัณฑ์ม่วงของ formazan จากนั้นละลายผลิตภัณฑ์ formazan ด้วยการเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คืออาหาร DMEM และ positive control คือ TritonX-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ คำนวณอัตราการมีชีวิตของเซลล์ Vero หรือ cell viability จากสมการดังนี้

$$\text{cell viability (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Sample}} - \text{OD}_{\text{Blank}}}{\text{OD}_{\text{Control}} - \text{OD}_{\text{Blank}}} \times 100$$

#### 6.4.4 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test

ทำการเตรียมเชื้อดังข้อ 6.2.1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 0.5 ทำการ spread plate เชื้อบนอาหารแข็ง MRS จากนั้นนำแผ่นยาปฏิชีวนะ (biodisk) ได้แก่ Ampicillin, Gentamycin, Erythromycin, Chloramphenicol และ Tetracycline วางลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พิจารณาค่า MIC โดยสังเกตจากปลายวงรีของแผ่นยา นำค่า MIC ของแต่ละเชื้อที่ได้ไป

เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed เพื่อประเมินความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

## 6.5 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing

### 6.5.1 การสกัดดีเอ็นเอของเซลล์โพรไบโอติก

นำเชื้อบริสุทธิ์ของโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform method) ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (1989)<sup>(105)</sup> โดยนำมาเชื้อโพรไบโอติกมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS นำไปปั่นข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าความขุ่นที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างและละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย Tris-EDTA buffer (ภาคผนวก ข) นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultra-sonicator จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์ และปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเติมด้วยสารละลาย lysis buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติมด้วยสารละลาย phenol: chloroform (อัตราส่วน 1: 1) ปริมาตรเท่ากับสารแขวนลอยเซลล์ที่มีอยู่เดิม และผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสในชั้นบน (aqueous phase) ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติมสารละลาย chloroform ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่เดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม sodium acetate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3 M และเติมสารละลาย isopropanol ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาเติมด้วยสารละลาย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เย็น และทำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย ethanol 99 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เย็น และทำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้ง ระเหยสารละลาย ethanol ออกจากตะกอนดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 45

องศาเซลเซียส ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) และตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 6.5.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำอะกาโรส (agarose) 1 กรัม ละลายในสารละลาย TAE buffer (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปหลอมให้อะกาโรสละลาย เติมสีย้อมดีเอ็นเอ GelRed ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาผสมกับสาร loading dye buffer (10X) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X นำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใน TAE buffer นำเจลที่ได้ไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel-documentation)

### 6.5.3 การวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมด

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดในข้อ 6.3.11.1 ไปตรวจสอบลำดับเบสโดยใช้ BGISEQ-500 จากนั้นข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของแบคทีเรียที่ได้จะถูกนำมาทำ assembled โดยใช้ SPAdes 3.11.1 ข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของแบคทีเรียจะถูกวิเคราะห์หาถิ่นกำเนิดยาปฏิชีวนะโดยใช้ comprehensive antibiotic resistance database (CARD, <http://arpcard.mcmaster.ca/>) และ Resfinder วิเคราะห์หาบริเวณที่ก่อให้เกิดโรคโดยใช้ virulence factors database (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/Fs/main.htm>) วิเคราะห์หา Clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) และ prophage โดยใช้ CRISPR Finder (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>) และ PHASTER ตามลำดับ<sup>(39)</sup>

## 6.6 การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกโดยวิธีเอกซ்தูชัน

### 6.6.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การเตรียมเซลล์โพรไบโอติกเข้มข้น ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกและผ่านการระบุชนิดโดยการเปรียบเทียบการหาลำดับ 16S rDNA แล้วที่เก็บในกลีเซอรอล อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นนำมา cross streak บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ และเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงในอาหารเหลวเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### 6.6.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกสำหรับการห่อหุ้ม

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย NaCl

0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) และวัดค่าการดูดกลืนแสง OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 1 เพื่อทำไปใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

### 6.6.3 การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนต

วิธีการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยอัลจิเนตโดยวิธีเอกซ์ทรูชันได้ทำตามวิธีของ Prasanna และ Charalampopoulos (2018)<sup>(77)</sup> ซึ่งในการเตรียมไฮโดรคอลลอยด์ที่มีเพียงไฮเดียมอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวทำได้โดยเตรียมสารละลายไฮเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ละลายในน้ำกรอง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเมื่อผสมสารไฮโดรคอลลอยด์เรียบร้อยแล้ว ให้เติมแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่เตรียมได้ในข้อ 6.4.2 ลงในสารละลายไฮเดียมอัลจิเนตในอัตราส่วน 4: 1 (ไฮโดรคอลลอยด์ไฮเดียมอัลจิเนต: เซลล์แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเข้มข้น, ปริมาตร/ปริมาตร) โดยในขั้นตอนการเตรียมไมโครแคปซูลที่มีเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกอยู่ด้านในทำได้โดยการปล่อยสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเข้มข้นผ่านหัวเข็มฉีดยาที่มีขนาด 21G ให้มีลักษณะเป็นหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 M โดยมีการกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนสารตลอดเวลา ซึ่งความสูงที่ใช้ในการหยดคือ 10 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เม็ดไมโครแคปซูลแข็งตัว จากนั้นนำไมโครแคปซูลที่ได้ไปล้างด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ก่อนที่จะนำไปเก็บในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

### 6.6.4 การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ

การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะโดยวิธีเอกซ์ทรูชันได้ทำตามวิธีของ Prasanna และ Charalampopoulos (2018)<sup>(77)</sup> โดยเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์จากการนำสารละลายไฮเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ละลายในน้ำกรอง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมนมแพะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในสารละลายไฮเดียมอัลจิเนตในอัตราส่วน 2: 1 (ไฮโดรคอลลอยด์ไฮเดียมอัลจิเนต: นมแพะ, ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นเติมแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่เตรียมได้ในข้อ 6.4.2 และทำการเตรียมไมโครแคปซูลที่มีเซลล์โพรไบโอติกอยู่ด้านใน โดยทำการปล่อยสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเข้มข้นผ่านหัวเข็มฉีดยาที่มีขนาด 21G ให้มีลักษณะเป็นหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 M โดยมีการกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนสารตลอดเวลา ซึ่งความสูงที่ใช้ในการหยดคือ 10 เซนติเมตร ทิ้งไว้

30 นาทีเพื่อให้เม็ดไมโครแคปซูลแข็งตัว จากนั้นนำไมโครแคปซูลที่ได้ไปล้างด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ก่อนที่จะนำไปเก็บในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 6.6.5 การนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติก

### 6.6.5.1 การนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกอิสระ

นำตัวอย่างเซลล์โพรไบโอติกอิสระมาเจือจาง 10 เท่า ใน NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนับจำนวนเชื้อโดยใช้วิธีการ spread plate ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และรายงานผลในหน่วย Log CFU/ml<sup>(77)</sup>

### 6.6.5.2 การนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม

ซึ่งตัวอย่างไมโครแคปซูลอัลจิเนต หรืออัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมซิติเรทความเข้มข้น 50 mM pH 7.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ไมโครแคปซูลที่อยู่ในรูปของแคลเซียมอัลจิเนตจะกลับมายู่ในรูปของโซเดียมอัลจิเนตที่สามารถละลายได้ จากนั้นเจือจางตัวอย่างของไมโครแคปซูลที่ละลายแล้วเป็นลำดับ และนำมานับจำนวนเชื้อโดยใช้วิธีการ spread ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และรายงานผลในหน่วย Log CFU/g<sup>(77)</sup>

## 6.6.6 การวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency และขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้

### 6.6.6.1 การวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency

ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกของวัสดุห่อหุ้มแต่ละชนิดสามารถทำได้โดยนำไมโครแคปซูลแต่ละชนิดมาละลายและนับจำนวนตามข้อ 6.6.5.2 จากนั้นนำคำนวณหาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (encapsulation efficiency) ซึ่งคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ปลดปล่อยออกมาจากเม็ดไมโครแคปซูล}}{\text{จำนวนเซลล์โพรไบโอติกเริ่มต้นที่ถูกเติมลงไปก่อนการห่อหุ้ม}} \times 100$$

### 6.6.6.2 การศึกษาขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้

สุ่มไมโครแคปซูลที่เตรียมได้แต่ละชนิดจำนวน 30 เม็ด มาวัดขนาดโดยใช้ vernier caliper และนำไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย รายงานในหน่วยมิลลิเมตร

## 6.6.7 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูล ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัข

### 6.6.7.1 สภาวะจำลองในปากของสุนัข

ซึ่งไมโครแคปซูลอัลจิเนต และไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม หรือคุดตัวอย่างเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสภาวะจำลองในปากของสุนัข (simulated saliva juice; SSJ) ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 7.4 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 5 นาที จากนั้นนำมาเจือจางและนับจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่รอดชีวิตตามข้อ 6.6.5

### 6.6.7.2 สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัข

ซึ่งไมโครแคปซูลอัลจิเนต และไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม หรือคุดตัวอย่างเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัข (simulated gastric juice; SGJ) ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 2.1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำมาเจือจางและนับจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่รอดชีวิตตามข้อ 6.6.5<sup>(77)</sup>

### 6.6.7.3 สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขที่มีการเติมเกลือน้ำดี

ซึ่งไมโครแคปซูลอัลจิเนต และไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม หรือคุดตัวอย่างเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขที่มีการเติมเกลือน้ำดี (Simulated Intestinal Juice; SIJ) ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 7.4 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำมาเจือจางและนับจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่รอดชีวิตตามข้อ 6.6.5<sup>(77)</sup>

## 6.6.8 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูล ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง

ซึ่งไมโครแคปซูลอัลจิเนต และไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม หรือคุดตัวอย่างเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสภาวะจำลองในปากของสุนัข ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 5 นาที เพื่อ นับจำนวนเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะที่รอดชีวิต ตามข้อ 6.6.5 ในส่วนของเซลล์อิสระ นำส่วนที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป ในส่วนของ

ไมโครแคปซูลดูดส่วนน้ำย่อยในปากจำลองทิ้ง จากนั้นนำทั้งตะกอนเซลล์อิสระและไมโครแคปซูล มาใส่ลงในน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัขปัมใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 60, 120 และ 180 นาที เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะที่รอดชีวิตตามข้อ 6.6.5 ในส่วนของเซลล์อิสระ นำส่วนที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเก็บตะกอนเซลล์ สำหรับส่วนของไมโครแคปซูลดูดน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองทั้ง นำทั้งตะกอนเซลล์อิสระและไมโครแคปซูลใส่ลงในน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขนำไปปัมใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 240, 300 และ 360 นาที เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะตามข้อ 6.4.5

#### 6.6.9 การศึกษาการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลใน สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง

ซึ่งไมโครแคปซูลอัลจิเนต และไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม จากนั้นนำไปใส่ลงในน้ำย่อยลำไส้จำลอง และนำไปปัมใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดตัวอย่างส่วนของเหลวด้านนอกไมโครแคปซูล 100 ไมโครลิตร ทำ การเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ ถูกปลดปล่อยออกจากไมโครแคปซูลตามข้อ 6.6.5 ซึ่งในระหว่างที่มีการเก็บตัวอย่างที่มีการ ดูดออกจะต้องมีการเติมน้ำย่อยลำไส้จำลองลงไป 100 ไมโครลิตรเพื่อรักษาระดับปริมาตรของ น้ำย่อยลำไส้จำลอง

#### 6.6.10 การศึกษาความเสถียรของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายในไมโครแคปซูลในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การศึกษารอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายในไมโครแคปซูล ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำได้โดยเก็บตัวอย่างไมโครแคปซูลอัลจิเนต และ ไมโครแคปซูลอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ หรือดูดตัวอย่างเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด ทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ วันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน มาบันทึกจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีการในข้อ 6.6.5<sup>(77)</sup>

### 6.6.11 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มภายในไมโครแคปซูลในนมแพะ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ซึ่งไมโครแคปซูลที่มีการห่อหุ้มเซลล์ทั้งแบบอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม หรือดูดตัวอย่างของเหลวเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการเชื้อแล้วที่มีการเติมนมแพะที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ วันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีการในข้อ 6.6.5<sup>(77)</sup>

### 6.6.12 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์

ซึ่งไมโครแคปซูลที่มีการห่อหุ้มเซลล์ทั้งแบบอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ 1 กรัม หรือดูดตัวอย่างของเหลวเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในนมแพะที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากการผ่านกระบวนการให้ความร้อนตามวิธีการในข้อ 6.6.5<sup>(78)</sup>

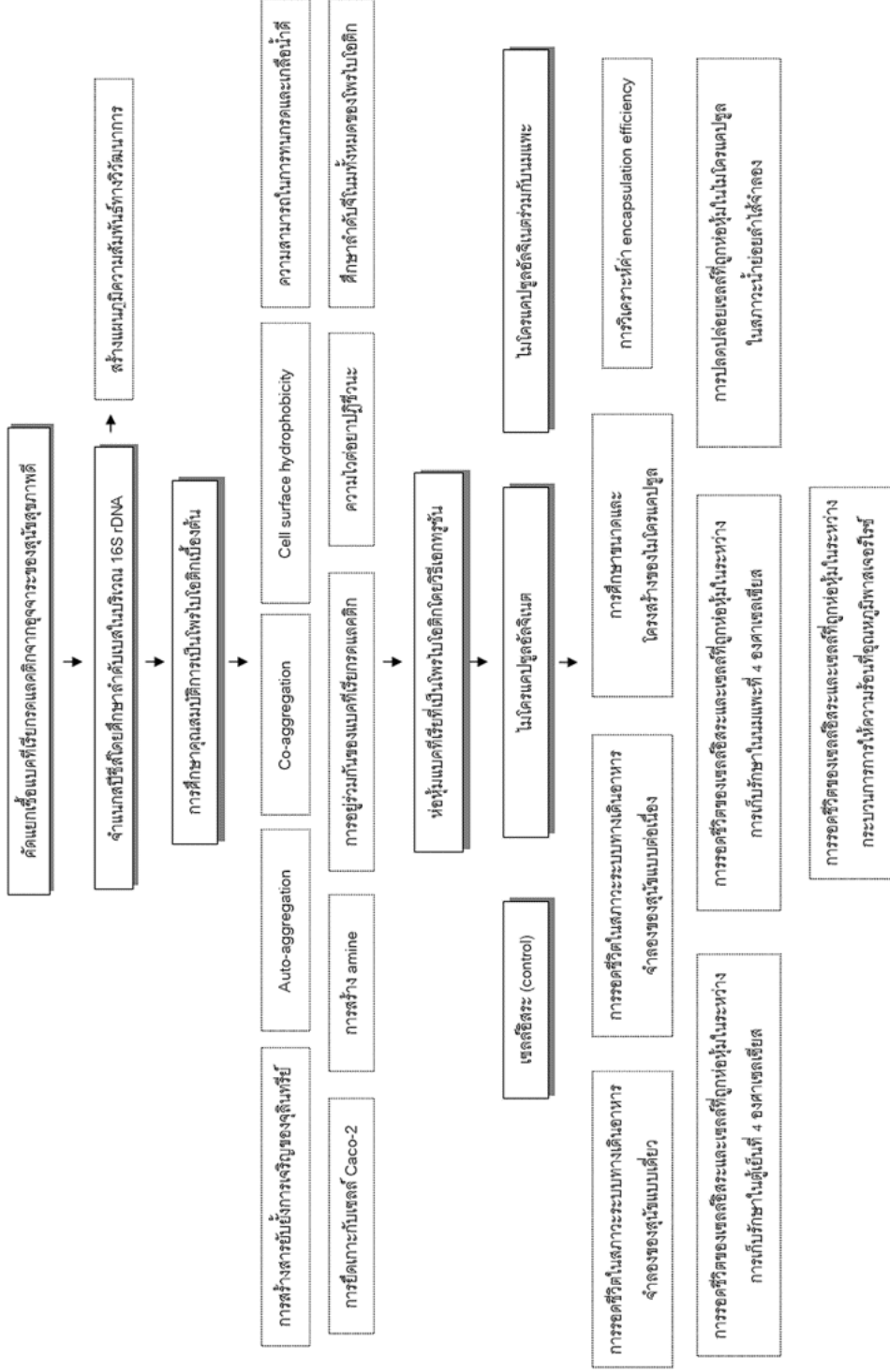
### 6.6.13 การศึกษาโครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำเม็ดไมโครแคปซูลที่มีการห่อหุ้มเซลล์ทั้งแบบอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมาดัดน้ำออกโดยใช้ความเข้มข้นของ ethanol ตามลำดับดังนี้ 30, 50, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นนำมาทำให้แห้งและตรึงตัวอย่างบน SEM stub และนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด<sup>(77)</sup>

## 6.7 การทดสอบทางสถิติ

การทดสอบทางสถิติของผลการวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency และขนาดของไมโครแคปซูลจะใช้ Student's t-test ที่ค่า  $p < 0.05$  และวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะทางเดินอาหารจำลองน้ำลายของสุนัข น้ำย่อยจำลอง น้ำย่อยลำไส้จำลอง ทางเดินอาหารจำลองสุนัขแบบต่อเนื่อง ในระหว่างเก็บรักษานมแพะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ โดยใช้ One-Way ANOVA ซึ่งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD (Honestly significant difference) test โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 20



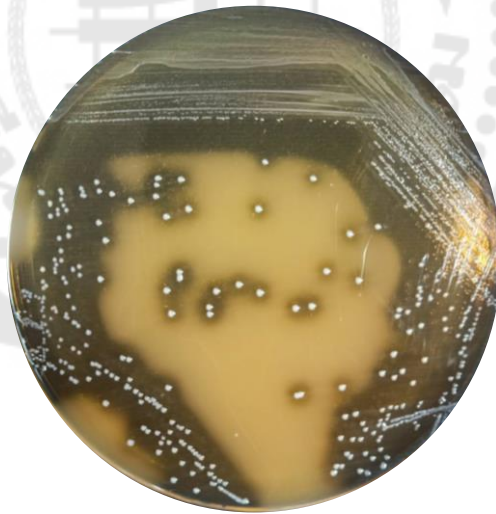


ภาพประกอบ 8 ภาพรวมการห่อหุ้มแบบคี่เรย์ที่เป็นไฟโบรบลาสต์โดยวิธีเอกพหุชนและใช้เตรียมอัลจินเนตและไฮโดรเจลร่วมกับเมมเบร เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุนัข

## บทที่ 4 ผลการศึกษา

### 1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอุจจาระของสุนัข

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอุจจาระของสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) (ภาพประกอบ 9) พบว่า มีทั้งหมด 20 ไอโซเลท ที่มีบริเวณใส จากนั้นนำไปย้อมสีแกรมเพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน กลมหรือรูปไข่ ไม่สร้างสปอร์ (ภาพประกอบ 10) พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างกลม 6 ไอโซเลท รูปร่างท่อน 8 ไอโซเลท และรูปทรงไข่ 6 ไอโซเลท (ตาราง 6) และนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกต่อไป



ภาพประกอบ 9 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่มีการเติม  
แคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร)



ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้  
(กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ตาราง 6 รายละเอียดการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 20 ไอโซเลทจากตัวอย่าง

| สายพันธุ์สุนัข | ไอโซเลทที่แยกได้ | รูปร่าง |
|----------------|------------------|---------|
| French bulldog | FB1              | รูปกลม  |
| Pomeranian     | FB2              | รูปท่อน |
| Pomeranian     | Pom1             | รูปท่อน |
| Pomeranian     | Pom2             | รูปท่อน |
| Pomeranian     | Pom4             | รูปไข่  |
| Pomeranian     | Pom5             | รูปท่อน |
| Pomeranian     | Pom9             | รูปท่อน |
| Chihuahua      | Chi3             | รูปไข่  |
| Chihuahua      | Chi4             | รูปไข่  |
| Chihuahua      | Chi5             | รูปไข่  |
| Chihuahua      | Chi6             | รูปกลม  |
| Chihuahua      | Chi7             | รูปกลม  |

ตาราง 6 (ต่อ)

|             |      |         |
|-------------|------|---------|
| Mongrel dog | MD2  | รูปกลม  |
| Mongrel dog | MD3  | รูปท่อน |
| Mongrel dog | MD12 | รูปท่อน |
| Mongrel dog | MD13 | รูปไข่  |
| Shih-Tzu    | Shi1 | รูปท่อน |
| Poodle      | PD3  | รูปกลม  |

## 2. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น

### 2.1 การศึกษาความสามารถในการทนกรด

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มาศึกษาความสามารถในการทนกรด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลทสามารถรอดชีวิตในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 3.5 และ 4.5 ตามลำดับ (ตาราง 7) จึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลทเพื่อศึกษาความสามารถในการทนเกลือแร่ต่อไป

### 2.2 การศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือแร่

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทนกรดทั้ง 20 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 20 ไอโซเลทสามารถรอดชีวิตในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือแร่ทั้ง 0.15, 0.3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการทนต่อกรดและเกลือแร่ทั้ง 20 ไอโซเลท (ตาราง 7) ไปศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

ตาราง 7 ความสามารถในการทนกรดและเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

| ไอโซเลท | ความสามารถในการทนกรด* |        | ความสามารถในการทนเกลือแร่** |      |     |
|---------|-----------------------|--------|-----------------------------|------|-----|
|         | pH 3.5                | pH 4.5 | 0.15%                       | 0.3% | 1%  |
| FB1     | ++                    | ++     | ++                          | ++   | +   |
| FB2     | ++                    | +++    | ++                          | +    | +   |
| Pom1    | ++                    | +++    | +++                         | +    | +   |
| Pom2    | +                     | ++     | +++                         | ++   | +   |
| Pom4    | +++                   | +++    | +++                         | +++  | +++ |
| Pom5    | ++                    | +++    | ++                          | ++   | ++  |
| Pom9    | +                     | +++    | +                           | +    | +   |
| Chi3    | ++                    | ++     | ++                          | +    | +   |
| Chi4    | +                     | ++     | ++                          | ++   | +   |
| Chi5    | +                     | ++     | +++                         | +++  | +++ |
| Chi6    | ++                    | ++     | ++                          | +    | +   |
| Chi7    | +                     | +      | +++                         | +++  | +++ |
| Chi8    | +++                   | +++    | +++                         | +++  | +++ |
| MD1     | +                     | ++     | ++                          | ++   | +   |
| MD2     | +                     | ++     | +                           | +    | +   |
| MD3     | ++                    | +++    | +                           | +    | +   |
| MD12    | +                     | +++    | +                           | +    | +   |
| MD13    | ++                    | ++     | +                           | +    | +   |
| Shi1    | ++                    | ++     | +                           | +    | +   |
| PD3     | +                     | +      | +                           | +    | +   |

หมายเหตุ +: เจริญได้เล็กน้อย, ++: เจริญได้ดี และ +++: เจริญได้ดีเช่นเดียวกับชุดควบคุม

\*ชุดควบคุม คือ อาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH เท่ากับ 6, \*\*ชุดควบคุม คือ อาหารเหลว MRS ที่ไม่มีการเติมเกลือแร่)

### 2.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี ทั้ง 20 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี agar well diffusion โดยใช้เชื้อทดสอบ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. และ *B. cereus* พบว่า มีเพียงไอโซเลท Pom4, Pom5 และ Chi8 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 4 ชนิด ไอโซเลท FB2, Pom1, Pom2, Pom9 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 3 ชนิด ไอโซเลท Chi3, Chi5, Chi7, MD1 และ Shi1 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 2 ชนิด ไอโซเลท FB1, Chi4, MD2 และ MD3 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้เพียง 1 ชนิด นอกจากนี้ ไอโซเลท Chi6, MD12, MD13 และ PD3 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ (ตาราง 8)

ตาราง 8 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

| ไอโซเลท | ความกว้างของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (มิลลิเมตร) |                  |                  |                       |
|---------|---|------------------|------------------|-----------------------|
|         | <i>E. coli</i>  | <i>B. cereus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
| FB1     | -   | -                | 13±0.15          | -                     |
| FB2     | 13.42±0.10  | 14±0.13          | -                | 13.42±0.13            |
| Pom1    | 13±0.15   | 14±0.13          | 15±0.06          | -                     |
| Pom2    | 13±0.10   | 14±0.12          | 13±0.02          | -                     |
| Pom4    | 10.88±0.12  | 8.40±0.10        | 9.80±0.10        | 9.62±0.13             |
| Pom5    | 10.43±0.10  | 15±0.12          | 11.95±0.2        | 13.05±0.12            |
| Pom9    | -   | 14±0.13          | 15±0.10          | 11±0.13               |
| Chi3    | 12±0.12   | 12±0.14          | -                | -                     |
| Chi4    | 12±0.12   | -                | -                | -                     |
| Chi5    | 13±0.14   | 0.37±1.0         | -                | -                     |
| Chi6    | -   | -                | -                | -                     |
| Chi7    | 14±0.11   | 15±0.10          | -                | -                     |
| Chi8    | 12.79±0.10  | 14±0.20          | 13±0.14          | 13.42±0.12            |

ตาราง 8 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

|      |         |         |         |   |
|------|---------|---------|---------|---|
| MD1  | 12±0.15 | -       | 12±0.11 | - |
| MD2  | -       | 14±0.20 | -       | - |
| MD3  | -       | 13±0.30 | -       | - |
| MD12 | -       | -       | -       | - |
| MD13 | -       | -       | -       | - |
| Shi1 | -       | 12±0.3  | 12±0.2  | - |
| PD3  | -       | -       | -       | - |

สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 20 ไอโซเลท ไม่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินมายับยั้งเชื้อทดสอบและเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดจากการศึกษานี้ได้

#### 2.4 การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 20 ไอโซเลท มาศึกษาความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ หรือ cell surface hydrophobicity เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติการเกาะติดลำไส้เบื้องต้น พบว่า ไอโซเลทที่มีค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่สูง (high hydrophobicity) ได้แก่ Pom1 และ Pom2 ไอโซเลทที่มีค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์อยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ปานกลาง (moderate hydrophobicity) ได้แก่ FB2 และ MD13 และไอโซเลทที่มีค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ต่ำ (low hydrophobicity) ได้แก่ FB1, Pom4, Pom5, Pom9, Chi3, Chi4, Chi5, Chi6, Chi7, Chi8, MD1, MD2, MD3, MD12, Shi1 และ PD3 (ตาราง 9)

ตาราง 9 ค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

| ไอโซเลท | ค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ (%) | สรุปความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ |
|---------|-------------------------------------|----------------------------------|
| FB1     | 1.03±1.50                           | ต่ำ                              |
| FB2     | 56.66±0.0                           | ปานกลาง                          |
| Pom1    | 88.91±1.20                          | สูง                              |
| Pom2    | 88.45±1.50                          | สูง                              |
| Pom4    | 15.59±0.09                          | ต่ำ                              |
| Pom5    | 32.27±0.16                          | ต่ำ                              |
| Pom9    | 34.25±0.30                          | ต่ำ                              |
| Chi3    | 1.01±0.40                           | ต่ำ                              |
| Chi4    | 22.13±0.10                          | ต่ำ                              |
| Chi5    | 0.37±1.0                            | ต่ำ                              |
| Chi6    | 0.42±1.0                            | ต่ำ                              |
| Chi7    | 1.72±1.20                           | ต่ำ                              |
| Chi8    | 22.91±0.12                          | ต่ำ                              |
| MD1     | 5.84±1.10                           | ต่ำ                              |
| MD2     | 8.05±0.30                           | ต่ำ                              |
| MD3     | 0.04±0.40                           | ต่ำ                              |
| MD12    | 0.31±0.40                           | ต่ำ                              |
| MD13    | 63.89±1.0                           | ปานกลาง                          |
| Shi1    | 0.64±1.50                           | ต่ำ                              |
| PD3     | 5.57±1.40                           | ต่ำ                              |

หมายเหตุ; ต่ำ หมายถึง ค่าความไม่ชอบน้ำน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์, ปานกลาง หมายถึง ค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์อยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ และสูง หมายถึง ค่าความไม่ชอบน้ำมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์



## 2.5 การศึกษาการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท มาศึกษาการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก หรือ auto-aggregation พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท คือ FB1, FB2, Pom5, Chi3, Chi7 และ MD1 มีค่าการเกาะกลุ่มกันเองมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองที่สูง 11 ไอโซเลท คือ Pom1, Pom2, Pom4, Pom9, Chi4, Chi5, Chi6, Chi8, MD12, MD13 และ Shi1 มีค่าการเกาะกลุ่มกันเองอยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองปานกลาง และมี 3 ไอโซเลท คือ MD2, MD3 และ PD3 ที่มีค่าการเกาะกลุ่มกันเองต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองต่ำ

ตาราง 10 ค่าการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

| ไอโซเลท | ค่าการเกาะกลุ่มกันเอง (%) | สรุปความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง |
|---------|---------------------------|------------------------------------|
| FB1     | 80.76±0.08                | สูง                                |
| FB2     | 79.73±0.12                | สูง                                |
| Pom1    | 58.34±0.10                | ปานกลาง                            |
| Pom2    | 52.34±0.50                | ปานกลาง                            |
| Pom4    | 68.14±0.05                | ปานกลาง                            |
| Pom5    | 70.31±0.04                | สูง                                |
| Pom9    | 57.91±0.20                | ปานกลาง                            |
| Chi3    | 81.75±0.14                | สูง                                |
| Chi4    | 64.11±0.16                | ปานกลาง                            |
| Chi5    | 66.04±0.17                | ปานกลาง                            |
| Chi6    | 64.27±0.10                | ปานกลาง                            |
| Chi7    | 76.35±0.21                | สูง                                |
| Chi8    | 57.40±0.15                | ปานกลาง                            |
| MD1     | 71.57±0.16                | สูง                                |
| MD2     | 31.68±0.41                | ต่ำ                                |
| MD3     | 27.34±0.15                | ต่ำ                                |

ตาราง 10 (ต่อ) ค่าการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

|      |            |         |
|------|------------|---------|
| MD12 | 60.38±0.23 | ปานกลาง |
| MD13 | 58.99±0.20 | ปานกลาง |
| Shi1 | 63.78±0.19 | ปานกลาง |
| PD3  | 48.21±0.21 | ต่ำ     |

หมายเหตุ; ต่ำ หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มกันเองต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์, ปานกลาง หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มกันเองอยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ และสูง หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มกันเองมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

## 2.6 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท มาศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ หรือ co-aggregation พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท มีค่าการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความสามารถในการเกาะกลุ่มกันกับเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ ในระดับปานกลางถึงสูง

ตาราง 11 ค่าการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้กับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ

| ไอโซเลท | ค่าการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรค (%) |                  |                  |                       |
|---------|---|------------------|------------------|-----------------------|
|         | <i>E. coli</i>  | <i>B. cereus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
| FB1     | 76.16±0.15  | 78.75±0.22       | 75.8±0.20        | 72.73±0.11            |
| FB2     | 76.73±0.10  | 81.50±0.2        | 76.68±0.12       | 77.22±0.15            |
| Pom1    | 68.33±0.17  | 72.52±0.25       | 71.21±0.45       | 60.39±0.25            |
| Pom2    | 69.08±0.14  | 72.53±0.14       | 71.58±0.23       | 61.61±0.20            |
| Pom4    | 75.97±0.10  | 75.17±0.1        | 72.48±0.4        | 58.45±0.20            |
| Pom5    | 77.64±0.14  | 76.22±0.12       | 73.16±0.2        | 51.55±0.30            |
| Pom9    | 66.88±0.17  | 72.67±0.25       | 70.50±0.41       | 60.42±0.37            |
| Chi3    | 68.55±0.12  | 72.94±0.21       | 71.74±0.3        | 64.24±0.18            |
| Chi4    | 69.78±0.23  | 72.42±0.33       | 71.19±0.22       | 62.11±0.38            |
| Chi5    | 67.75±0.14  | 72.27±0.68       | 68.60±0.77       | 57.90±0.34            |

ตาราง 11 (ต่อ) ค่าการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้กับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ

|      |            |            |            |            |
|------|------------|------------|------------|------------|
| Chi6 | 71.41±0.33 | 72.81±0.55 | 72.13±0.66 | 63.29±0.22 |
| Chi7 | 69.18±0.32 | 72.63±0.77 | 69.52±0.27 | 59.04±0.23 |
| Chi8 | 52.73±0.11 | 72.52±0.21 | 79.17±0.3  | 51.55±0.09 |
| MD1  | 64.82±0.25 | 67.13±0.41 | 66.73±0.55 | 53.79±0.41 |
| MD2  | 62.50±0.45 | 65.59±0.17 | 64.21±0.47 | 48.49±0.56 |
| MD3  | 62.69±0.25 | 66.43±0.28 | 65.79±0.36 | 51.85±0.74 |
| MD12 | 66.24±0.29 | 70.48±0.09 | 68.16±0.24 | 57.67±0.05 |
| MD13 | 66.19±0.41 | 69.54±0.14 | 63.57±0.61 | 57.36±0.10 |
| Shi1 | 61.52±0.39 | 69.93±0.14 | 65.29±0.57 | 51.19±0.36 |
| PD3  | 64.53±0.36 | 69.36±0.09 | 67.63±0.23 | 55.19±0.25 |

จากคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 4 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติและสามารถเจริญในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท FB2, Pom4, Pom5 และ Chi8 ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตาราง 12 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

| ไอโซเลท | Catalase test | Gram's stain | pH  | Bile salts (%) | การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค |                  |                  | Hydrophobicity (%) | Auto-aggregation (%) | Co-aggregation (%) |                         |                  |                  |
|---------|---------------|--------------|-----|----------------|----------------------------|------------------|------------------|--------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------|------------------|
|         |               |              |     |                | <i>Salmonella</i> sp.      | <i>S. aureus</i> | <i>B. cereus</i> |                    |                      | <i>E. coli</i>     | <i>Salmonella</i> a sp. | <i>S. aureus</i> | <i>B. cereus</i> |
|         |               |              | 3.5 | 1              | <i>E. coli</i>             |                  |                  |                    |                      | <i>E. coli</i>     | <i>Salmonella</i> a sp. | <i>S. aureus</i> | <i>B. cereus</i> |
| FB2     | -             | +            | +   | +              | 13.42±0.1                  | 13.42±0.13       | -                | 14±0.11            | 56.66±0.2            | 79.73±0.12         | 77.22±0.                | 76.68±0          | 81.50±0          |
| Pom4    | -             | +            | +   | +++            | 10.88±0.12                 | 9.62±0.13        | 9.80±0.1         | 8.40 ±0.10         | 15.59±0.09           | 68.14±0.05         | 58.45±0.                | 72.48±0          | 75.17±0          |
| Pom5    | -             | +            | +   | +              | 10.43±0.10                 | 13.05±0.12       | 11.95 ±0.20      | 15±0.12            | 32.27±0.16           | 70.31±0.04         | 51.55±0.                | 73.16±0          | 76.22±0          |
| Chi8    | -             | +            | +   | +++            | 12.79±0.1                  | 13.42±0.12       | 13±0.14          | 14±0.20            | 22.91±0.12           | 57.40±0.15         | 51.55±0.                | 79.17±0          | 72.52±0          |
|         |               |              |     |                |                            |                  |                  |                    |                      | 0.15               | 09                      | .30              | .21              |

### 3. การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

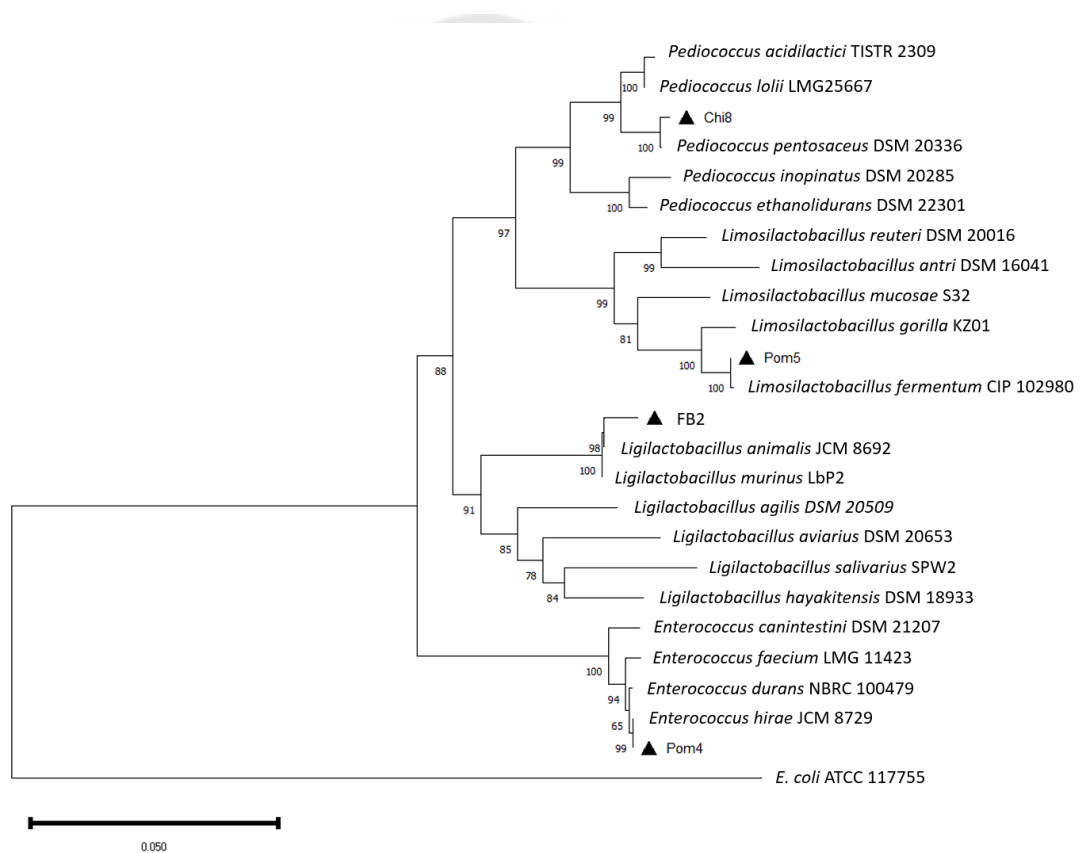
เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอและนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR พบว่า PCR product ที่ได้ มีขนาดประมาณ 1,500 bp เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เมื่อนำไปหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA และเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank เพื่อทำการระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า ไอโซเลท Pom4 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus hirae* (GenBank accession number; LR134297.1) 99 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลท Pom5 มีความคล้ายคลึงกับ *Limosilactobacillus (Lim.) fermentum* (GenBank accession number; MT611889.1) 99 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลท Chi8 มีความคล้ายคลึงกับ *Pediococcus pentosaceus* (GenBank accession number; MK402182.1) 99 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลท FB2 มีความคล้ายคลึงกับ *Ligilactobacillus (Lig.) animalis* (GenBank accession number; AB911530.1) 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 13 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลท

| ไอโซเลท | BLAST results                                      | Accession number | Similarity (%) | Length of obtained sequencing read (bp) | ผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย                 |
|---------|--|------------------|----------------|---|---|
| Pom4    | <i>Enterococcus hirae</i> strain NCTC12368         | LR134297.1       | 99.00%         | 1422/1427                               | <i>Enterococcus (E.) hirae</i>              |
| Pom5    | <i>Lactobacillus fermentum</i> strain 2950         | MT611889.1       | 99.86%         | 1425/1427                               | <i>Limosilactobacillus (Lim.) fermentum</i> |
| Chi8    | <i>Pediococcus pentosaceus</i> strain HBUAS53395   | MK402182.1       | 99.00%         | 1414/1416                               | <i>Pediococcus (P.) pentosaceus</i>         |
| FB2     | <i>Ligilactobacillus animalis</i> strain: JCM 8692 | AB911530.1       | 99.00%         | 1382/1383                               | <i>Ligilactobacillus (Lig.) animalis</i>    |

#### 4. การสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลท มาสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อด้วยวิธี neighbor joining (NJ) โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter โดยใช้โปรแกรม MEGA11 ver. 11.0.10 และกำหนดค่าความเชื่อมั่นของ bootstrap เท่ากับ 1,000 ซ้ำ (ภาพประกอบ 11) สามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ Pom4, Pom5, Chi8 และ FB2 จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก คือ *E. hirae*, *Lim. fermentum*, *P. pentosaceus* และ *Lig. animalis* โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 99, 100, 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพประกอบ 11 แผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ โดยตัวเลขที่ node แสดงระดับความเชื่อมั่น bootstrap (%) จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง และ scale bar แสดงอัตราการถูกแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์

## 5. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเพิ่มเติม

### 5.1 การศึกษาความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2

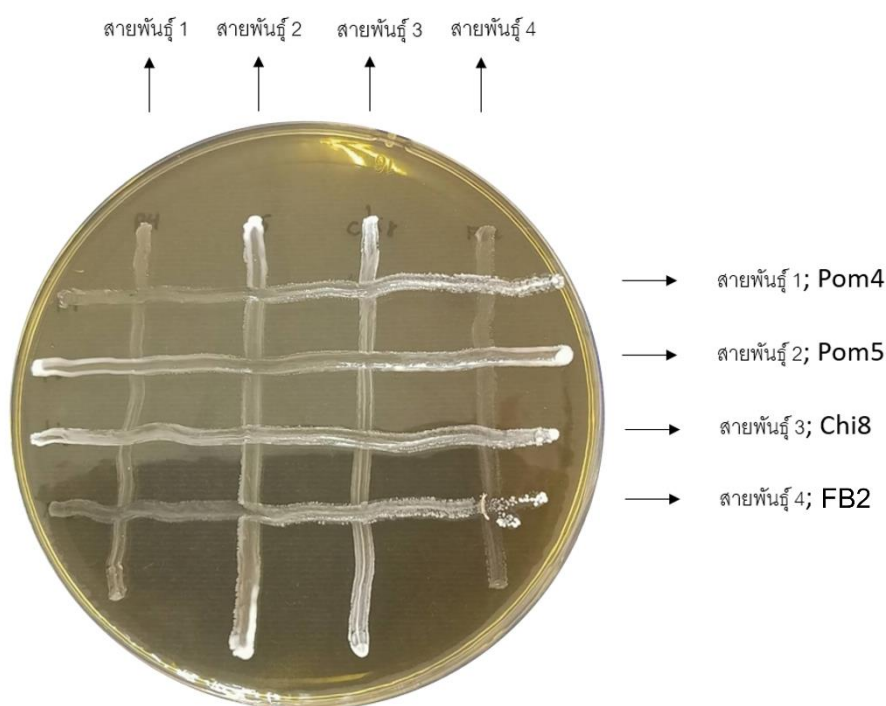
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มาศึกษาความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่า *E. hirae* Pom4, *Lim. fermentum* Pom5, *P. pentosaceus* Chi8 และ *Lig. animalis* FB2 มีอัตราการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 เท่ากับ 76.92, 88.40, 95.08 และ 83.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 หรือเซลล์ลำไส้ที่สูง (ตาราง 14)

ตาราง 14 ความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

| สายพันธุ์                  | ความสามารถของโพรไบโอติกในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 (%) |
|----------------------------|--|
| <i>E. hirae</i> Pom4       | 76.92±0.56   |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | 88.40±1.85   |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | 95.08±2.92   |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | 83.95±1.70   |

### 5.2 การศึกษาการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติก

การศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ชีดลงบนอาหารแข็ง MRS ในแนวตั้ง และชีดในแนวตั้งจากกันอีกครั้ง ดังภาพประกอบ 7 ซึ่งพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีการยับยั้งที่บริเวณแต่ละจุดตัดของสายพันธุ์ ซึ่งแสดงถึงการอยู่ร่วมกันโดยไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 การอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยจากภาพไม่พบการยับยั้งที่บริเวณแต่ละจุดตัดของสายพันธุ์ ซึ่งแสดงถึงการอยู่ร่วมกันโดยไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน

### 5.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase

การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase ในการย่อยเกลือน้ำดี taurodeoxycholate (TDC) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่พบ opaque zone รอบรอยหยดเชื้อ ซึ่งแสดงถึงไม่มีการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase ออกมาย่อยสลายเกลือน้ำดีประเภท taurodeoxycholate

### 5.4 การศึกษาการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก มาศึกษาความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH assay) โดยใช้กรด ascorbic เป็น positive control นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า *Lim. fermentum* Pom5 มีความสามารถในการสร้างสารต้าน



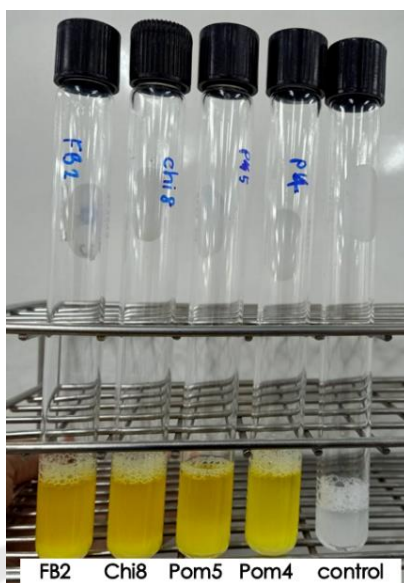
อนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 36.96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *E. hirae* Pom4, *Lig. animalis* FB2 และ *P. pentosaceus* Chi8 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 28.87, 23.34 และ 16.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 15)

ตาราง 15 ความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

| สายพันธุ์                        | ค่าการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ |
|----------------------------------|-------------------------------|
| <i>E. hirae</i> Pom4             | 28.87±0.02                    |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5       | 36.39±0.01                    |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8       | 16.42±0.01                    |
| <i>Lig. animalis</i> FB2         | 23.34±0.01                    |
| Ascorbic acid (positive control) | 83.41±0.02                    |

#### 5.5 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase โดยใช้ o-nitrophenyl-  $\beta$ -D-galactosidase (ONPG) เป็นสารตั้งต้น จากนั้นนำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้สร้างขึ้นในหน่วย Miller Unit พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ของทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ระหว่าง 301.90-373.48 Miller Unit (ตาราง 16)



ภาพประกอบ 13 กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

ตาราง 16 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

| สายพันธุ์                  | ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ $\beta$ -galactosidase (Miller unit) |
|----------------------------|--|
| <i>E. hirae</i> Pom4       | 301.90±0.01  |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | 327.75±0.18  |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | 373.48±0.16  |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | 364.23±0.02  |

## 6. การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่คัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์

### 6.1 การตรวจสอบการสร้าง amine

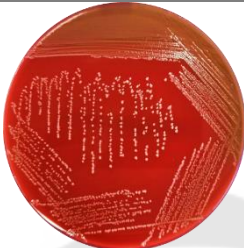

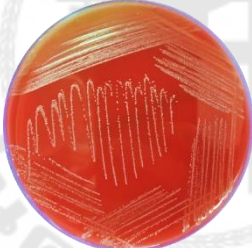

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาศึกษาการสร้างเอนไซม์ decarboxylase ซึ่งจะเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารประกอบเอมีนที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีการสร้างสารประกอบ amine เมื่อใช้กรดอะมิโน histidine, lysine, arginine และ ornithine เป็นสารตั้งต้น โดยสังเกตได้จากไม่มีการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์

### 6.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ gamma-hemolysis หรือ ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

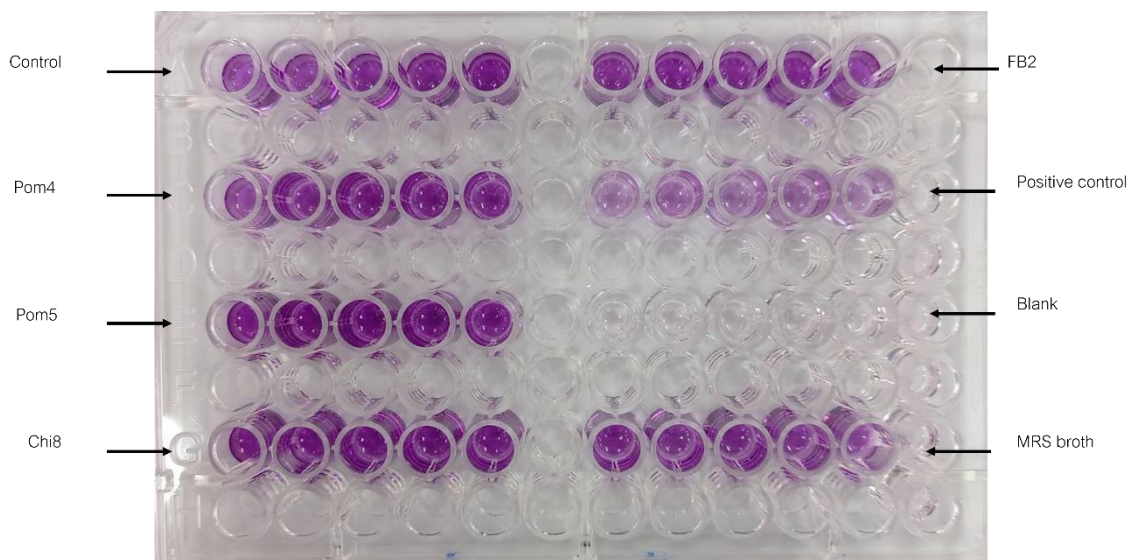


ตาราง 17 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์

| สายพันธุ์                  | ภาพการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง  | สรุปลักษณะ hemolysis ที่เกิดขึ้น |
|----------------------------|---|----------------------------------|
| <i>E. hirae</i> Pom4       |    | gamma-hemolysis                  |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 |   | gamma-hemolysis                  |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 |  | gamma-hemolysis                  |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   |  | gamma-hemolysis                  |

### 6.3 การศึกษาความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ไลน์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

เมื่อนำส่วนใสที่ผ่านการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาศึกษาการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero โดยยังคงมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่สูงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 18)



ภาพประกอบ 14 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่มีการเจริญใน 96 well plate ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

ตาราง 18 ผลความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ไลน์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

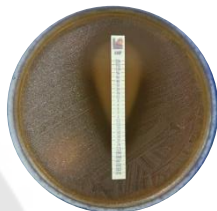
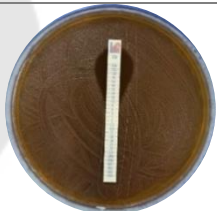

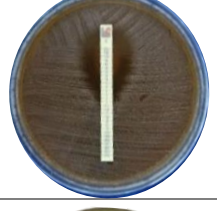

| สายพันธุ์                  | ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero (%) |
|----------------------------|------------------------------------|
| <i>E. hirae</i> Pom4       | 87.11±0.09                         |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | 93.26±0.17                         |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | 82.43±0.07                         |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | 74.58±0.01                         |

#### 6.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test

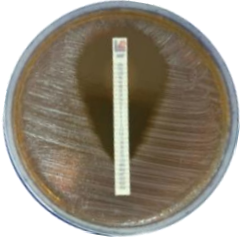
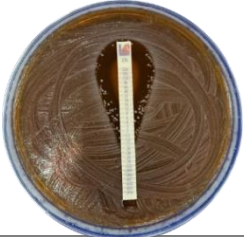


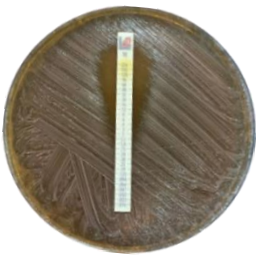
การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวิธี E-test โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะได้แก่ Ampicillin, Gentamycin, Erythromycin, Chloramphenicol และ Tetracycline จากผลการทดลองเมื่อนำค่า MIC ที่ได้ของแต่ละเชื้อไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ EFSA Panel on Additives and Products or

Substances Used in Animal Feed พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความไวต่อยาทั้ง 5 ชนิด มีเพียงสายพันธุ์ *E. hirae* Pom4 และ *Lig. animalis* FB2 ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Tetracycline (ตาราง 19)


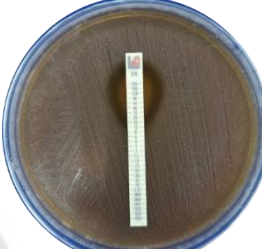

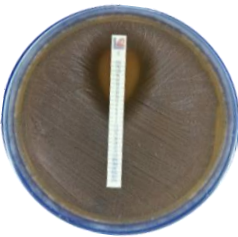

ตาราง 19 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยวิธี E-test

| สายพันธุ์               | ชนิดของยาปฏิชีวนะ | Cut-off value (mg/L)* | MIC (mg/L) | Sensitivity | ภาพประกอบผลการทดสอบ   |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|------------|-------------|---|
| <i>E. hirae</i><br>Pom4 | Ampicillin        | 2                     | .094       | S           |   |
|                         | Gentamicin        | 16                    | 12         | S           |  |
|                         | Erythromycin      | 1                     | .064       | S           |  |
|                         | Chloramphenicol   | 4                     | 2          | S           |  |
|                         | Tetracycline      | 4                     | 12         | R           |  |

ตาราง 19 (ต่อ) ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยวิธี E-test



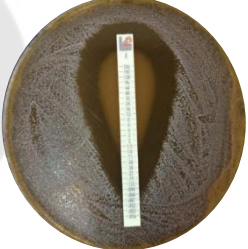


| สายพันธุ์                     | ชนิดของยาปฏิชีวนะ | Cut-off value (mg/L)* | MIC (mg/L) | Sensitivity | ภาพประกอบผลการทดสอบ   |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|------------|-------------|---|
| <i>Lim. fermentum</i><br>Pom5 | Ampicillin        | 2                     | .125       | S           |    |
|                               | Gentamicin        | 16                    | 7.5        | S           |   |
|                               | Erythromycin      | 1                     | .064       | S           |  |
|                               | Chloramphenicol   | 4                     | 3          | S           |  |
|                               | Tetracycline      | 8                     | 2          | S           |  |

ตาราง 19 (ต่อ) ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยวิธี E-test

| สายพันธุ์                     | ชนิดของยาปฏิชีวนะ | Cut-off value (mg/L)* | MIC (mg/L) | Sensitivity | ภาพประกอบผลการทดสอบ   |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|------------|-------------|---|
| <i>P. pentosaceus</i><br>Chi8 | Ampicillin        | 4                     | 2          | S           |    |
|                               | Gentamicin        | 16                    | 12         | S           |   |
|                               | Erythromycin      | 1                     | .19        | S           |  |
|                               | Chloramphenicol   | 4                     | 4          | S           |  |
|                               | Tetracycline      | 8                     | 6          | S           |  |



ตาราง 19 (ต่อ) ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์  
โดยวิธี E-test

| สายพันธุ์                | ชนิดของยาปฏิชีวนะ | Cut-off value (mg/L)* | MIC (mg/L) | Sensitivity | ภาพประกอบผลการทดสอบ   |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|------------|-------------|---|
| <i>Lig. animalis</i> FB2 | Ampicillin        | 4                     | .125       | S           |    |
|                          | Gentamicin        | 16                    | 2          | S           |   |
|                          | Erythromycin      | 1                     | .064       | S           |  |
|                          | Chloramphenicol   | 4                     | 2          | S           |  |
|                          | Tetracycline      | 8                     | 16         | R           |  |

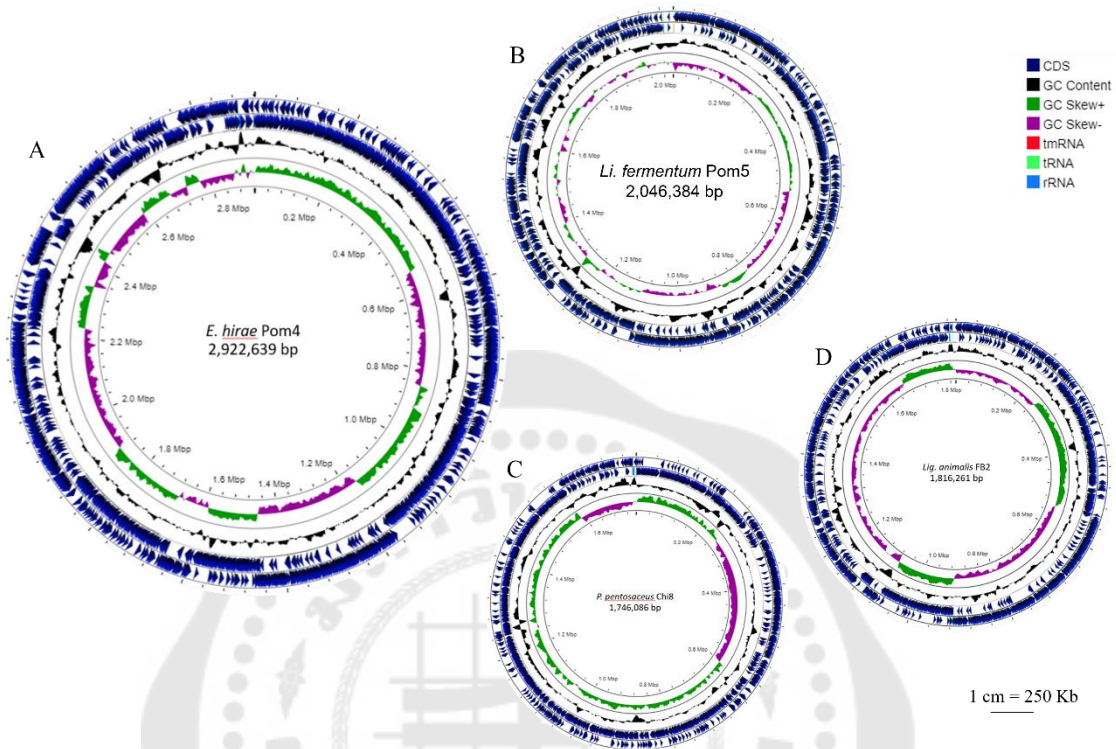
หมายเหตุ; \* หมายถึง ค่ามาตรฐานความไวของยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกอ้างอิงตามเกณฑ์ของ EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed

## 7. การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอ และนำไปวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดโดยใช้ BGISEQ-500 ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้ของแบคทีเรียจะถูกนำมาประกอบกัน โดยลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์แสดงดังตาราง 20 จากการศึกษาพบว่า ขนาดจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์อยู่ระหว่าง 1,746,086-2,922,639 คู่เบส โดยจีโนมของ *E. hirae* Pom4 มีขนาดใหญ่ที่สุด และ *P. pentosaceus* Chi8 มีขนาดของจีโนมที่เล็กที่สุด (ภาพประกอบ 15) และมีค่า G+C content อยู่ระหว่าง 36.6-52.0 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 20)

ตาราง 20 ลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์

| ลักษณะเฉพาะของ<br>จีโนม                      | สายพันธุ์ของโพรไบโอติก |           |           |           |
|--|------------------------|-----------|-----------|-----------|
|  | Pom4                   | Pom5      | Chi8      | FB2       |
| ขนาด (คู่เบส)                                | 2,922,639              | 2,046,384 | 1,746,086 | 2,046,384 |
| G + C content (%)                            | 36.6                   | 52.0      | 37.1      | 52.0      |
| N50 (คู่เบส)                                 | 222,522                | 72,163    | 331,800   | 254,780   |
| Contigs                                      | 78                     | 262       | 18        | 62        |
| Plasmid                                      | Present                | -         | Present   | -         |
| จำนวน<br>พลาสมิด                             | 4                      | -         | 1         | -         |
| บริเวณยีนต้านยา<br>ปฏิชีวนะ                  | 3                      | -         | -         | 1         |
| บริเวณที่คาดว่าเป็น<br>Prophage              | 1                      | 3         | 4         | 8         |
| บริเวณยีนที่<br>เกี่ยวข้องกับ<br>CRISPR      | 2                      | 1         | 1         | 2         |
| บริเวณยีนที่คาดว่า<br>สร้างแคเทอรีโอซิน      | 4                      | -         | -         | -         |
| บริเวณยีนที่สร้าง<br>$\beta$ -galactosidases | 2                      | 2         | 1         | 2         |



ภาพประกอบ 15 ลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ จากวงด้านนอกสู่วงด้านในแสดงตามลำดับดังนี้ วงที่ 1 คือ forward strand, วงที่ 2 คือ reverse strand, วงที่ 3 คือ GC content, วงที่ 4 คือ GC skew และวงที่ 5 คือ ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยสีในแต่ละวง รวมถึงตำแหน่งของ tRNA และ rRNA แสดงดังสัญลักษณ์ทางด้านขวาของภาพ

เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หา ยีนต้านยาปฏิชีวนะโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล comprehensive antibiotic resistance database (CARD, <http://arpcard.mcmaster.ca/>) และ Resfinder พบว่า ไม่พบยีนต้านยาปฏิชีวนะในจีโนมของ *Lim. fermentum* Pom5 และ *P. pentosaceus* Chi8 แต่ในส่วนของจีโนมของ *E. hirae* Pom4 พบยีนที่คาดว่าจะเป็ยีนต้านยาปฏิชีวนะทั้งหมด 3 ยีน คือ *aac(6')-lid*, *tet(45)* และ *tetM* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาในกลุ่มของ aminoglycoside และ tetracycline ตามลำดับ นอกจากนี้ จีโนมของ *Lig. animalis* FB2 ยังพบยีนต้านยาปฏิชีวนะ 1 ยีน ได้แก่ ยีน *tetM* ซึ่งเป็นยีนที่อาจส่งผลให้ดื้อต่อยาในกลุ่มของ tetracycline ทั้งนี้ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ

การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test ซึ่งเชื้อ *E. hirae* Pom4 และ *Lig. animalis* FB2 พบการต้านยาปฏิชีวนะ tetracycline

ในส่วนของบริเวณที่คาดว่าเป็นพลาสมิด พบว่า มีส่วนที่คาดว่าจะจะเป็นพลาสมิดในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 และ *P. pentosaceus* Chi8 โดยในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 พบพลาสมิด บริเวณเดียวกันกับบริเวณยีนต้านยาปฏิชีวนะ tetracycline อาจเป็นไปได้ว่ายีนต้านยาปฏิชีวนะนี้อาจจะอยู่บนพลาสมิด ซึ่งอาจเป็นยีนปฏิชีวนะที่ได้รับมาในภายหลัง ในขณะที่ จีโนมของ *P. pentosaceus* Chi8 ไม่พบยีนต้านทานยาปฏิชีวนะในบริเวณเดียวกันกับพลาสมิด

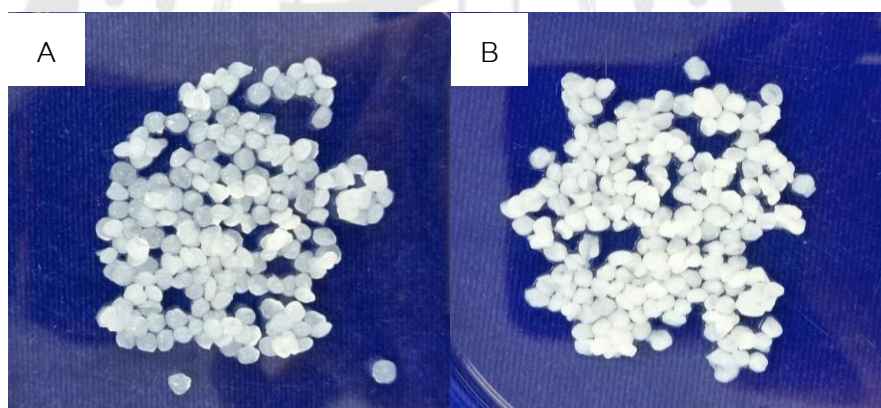
เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หาบริเวณยีนที่อาจก่อให้เกิดโรค โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล virulence factors database พบว่า มีเพียงจีโนมของ *E. hirae* Pom4 ที่พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นยีนที่อาจก่อให้เกิดโรคทั้งหมด 2 ยีน คือ ยีน *clpP* (proteolytic subunit of the ATP-dependent Clp protease) และ ยีน *bopD* (Maltose operon transcriptional repressor MalR, LacI family, biofilm formation) อย่างไรก็ตาม ไม่พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นยีนที่อาจก่อให้เกิดโรคในจีโนมของ *Lim. fermentum* Pom5, *P. pentosaceus* Chi8 และ *Lig. animalis* FB2

จากการนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หา prophage โดยใช้ PHASTER พบบริเวณของ prophage แทรกอยู่ในจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หาบริเวณของ Clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) และยีนที่สร้างแบคทีเรียโชนโดยใช้ CRISPR Finder (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>) และ BAGEL4 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถยืนยันส่วนของ CRISPR ในจีโนมของ *Lim. fermentum* Pom5 และ *Lig. animalis* FB2 และพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นบริเวณของ CRISPR ในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 และ *P. pentosaceus* Chi8 นอกจากนี้ ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นยีนที่สร้างแบคทีเรียโชนในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 ได้แก่ Enterolysin\_A, Hiracin และ Lanthipeptide class II

## 8. การห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกโดยวิธีเอกซ்தรูลชัน

### 8.1 การวิเคราะห์ค่า encapsulation efficiency และขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้

เมื่อทำการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะโดยวิธีเอกซ்தรูลชัน จะได้ลักษณะของไมโครแคปซูลแต่ละชนิดดังภาพประกอบ 16 และเมื่อนำไมโครแคปซูลที่ได้แต่ละชนิดมาศึกษา encapsulation efficiency พบว่า การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มโพรไบโอติกอยู่ระหว่าง 92.27-98.97 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การศึกษาขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้โดยใช้ vernier caliper ยังพบว่าขนาดของไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนตร่วมกับนมแพะเป็นวัสดุห่อหุ้มมีขนาดอยู่ระหว่าง 2.26-2.29 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนตเพียงอย่างเดียวเป็นวัสดุห่อหุ้มในเชื้อเดียวกัน



ภาพประกอบ 16 ลักษณะของเม็ดไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนต (A) และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะเป็นวัสดุห่อหุ้ม (B)

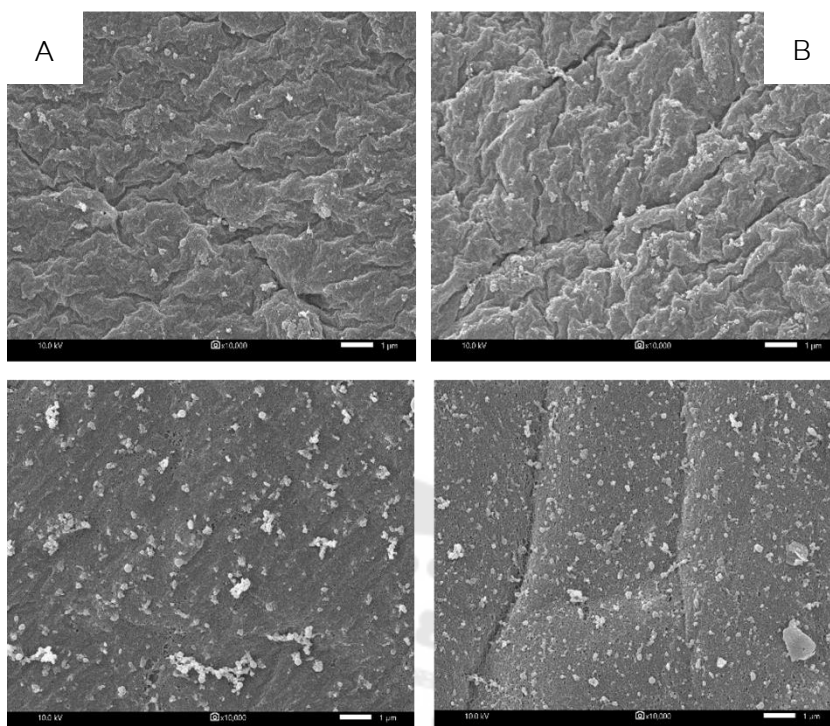
ตาราง 21 ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกของวัสดุห่อหุ้มแต่ละชนิด และขนาดของไมโครแคปซูล

| สายพันธุ์                  | ขนาด (มิลลิเมตร)       |                        | ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก (%) |                         |
|----------------------------|------------------------|------------------------|---|-------------------------|
|                            | อัลจิเนต               | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ   | อัลจิเนต                                    | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ    |
| <i>E. hirae</i> Pom4       | 2.20±0.04 <sup>B</sup> | 2.26±0.01 <sup>A</sup> | 93.35±0.98 <sup>A</sup>                     | 93.64±1.14 <sup>A</sup> |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | 2.24±0.02 <sup>B</sup> | 2.26±0.01 <sup>A</sup> | 94.05±1.29 <sup>A</sup>                     | 96.64±0.81 <sup>A</sup> |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | 2.21±0.02 <sup>B</sup> | 2.29±0.01 <sup>A</sup> | 92.27±1.16 <sup>B</sup>                     | 98.97±0.73 <sup>A</sup> |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | 2.23±0.02 <sup>B</sup> | 2.27±0.01 <sup>A</sup> | 95.13±0.84 <sup>B</sup>                     | 96.01±0.16 <sup>A</sup> |

หมายเหตุ; ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของขนาดและค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์เปรียบเทียบระหว่างวัสดุห่อหุ้มในเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน (แนวแถว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Student's t-test ที่ค่า  $p < 0.05$

## 8.2 การศึกษาโครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เมื่อนำไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกทั้งแบบอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะไปศึกษาโครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า พื้นผิวของเม็ดไมโครแคปซูลแบบอัลจิเนตมีรอยแตก หรือมีรูพรุนค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ ซึ่งมีพื้นผิวที่เรียบและไม่มีรูพรุน



ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (bar = 1 ไมโครเมตร)

A และ B ไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแบบอัลจิเนต

C และ D ไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแบบอัลจิเนต ร่วมกับนมแพะ

### 8.3 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัข

#### 8.3.1 สภาวะจำลองในปากของสุนัข

เมื่อนำเซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ มาศึกษาการรอดชีวิตเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองในปากของสุนัขที่มีการเติมเอนไซม์ amylase เป็นเวลา 5 นาที พบว่า เซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม โดยเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มและไม่ถูกห่อหุ้มทั้ง 4 สายพันธุ์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสกับสภาวะจำลองในปากของสุนัขเป็นเวลา 5 นาที (ตาราง 22)

### 8.3.2 สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัข

เมื่อนำแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินเตและอัลจินเตร่วมกับนมแพะไปศึกษาการรอดชีวิตเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มในสภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัขที่มีการเติมเอนไซม์ pepsin ที่มีค่า pH เท่ากับ 2 เป็นเวลา 180 นาที พบว่า เซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มของเซลล์โพรไบโอติกทุกสายพันธุ์มีการรอดชีวิตน้อยที่สุดภายหลังจากสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัขเป็นเวลา 180 นาที โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่า 6 log CFU/mL ซึ่งต่ำกว่าปริมาณที่แนะนำในการนำโพรไบโอติกมาใช้ให้เกิดประโยชน์แก่โฮสต์ ในขณะที่เซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินเตร่วมกับนมแพะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินเตและเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกสายพันธุ์ โดย *Lim. fermentum* Pom5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินเตร่วมกับนมแพะมีการรอดชีวิตที่สูงที่สุดคือ 7.57 log CFU/g รองลงมา คือ *P. pentosaceus* Chi8, *Lig. animalis* FB2 และ *E. hirae* Pom4 ซึ่งมีการรอดชีวิตเท่ากับ 7.45, 7.37 และ 7.32 log CFU/g ตามลำดับ (ตาราง 23)



ตาราง 22 การรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะจำลองในปากของสุนัข

| สายพันธุ์                  | รูปแบบการตรึงเซลล์               | ระยะเวลาในการบ่ม (นาที) |                        | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
|                            |                                  | 0                       | 5                      |                      |
| <i>E. hirae</i> Pom4       | อัลจิเนต                         | 8.96±0.08 <sup>a</sup>  | 8.84±0.08 <sup>a</sup> | 97.07 <sup>a</sup>   |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 9.10±0.28 <sup>a</sup>  | 9.05±0.08 <sup>a</sup> | 97.97 <sup>a</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.09±0.04 <sup>a</sup>  | 8.95±0.03 <sup>a</sup> | 97.48 <sup>a</sup>   |
|                            | อัลจิเนต                         | 7.76±0.05 <sup>a</sup>  | 7.65±0.06 <sup>a</sup> | 99.36 <sup>a</sup>   |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 7.83±0.05 <sup>a</sup>  | 7.79±0.17 <sup>a</sup> | 97.83 <sup>a</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 7.66±0.07 <sup>a</sup>  | 7.67±0.08 <sup>a</sup> | 98.20 <sup>a</sup>   |
|                            | อัลจิเนต                         | 7.79±0.03 <sup>a</sup>  | 7.77±0.07 <sup>a</sup> | 98.45 <sup>a</sup>   |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 7.73±0.06 <sup>a</sup>  | 7.70±0.09 <sup>a</sup> | 98.52 <sup>a</sup>   |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi6 | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 7.63±0.03 <sup>a</sup>  | 7.62±0.03 <sup>a</sup> | 99.55 <sup>a</sup>   |
|                            | อัลจิเนต                         | 8.96±0.13 <sup>a</sup>  | 8.88±0.27 <sup>a</sup> | 97.98 <sup>a</sup>   |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 9.00±0.08 <sup>a</sup>  | 8.79±0.24 <sup>a</sup> | 95.83 <sup>a</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.01±0.23 <sup>a</sup>  | 8.68±0.02 <sup>a</sup> | 95.57 <sup>a</sup>   |

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของวัสดุห่อหุ้มเปรียบเทียบของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวนอน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

ตาราง 23 การรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะนำย่อยจำลองของสุนัข

| สายพันธุ์                  | ระยะเวลาในการบ่ม (นาที)          |                        |                        |                        |                         |                        |                        | อัตราการรอดชีวิต (%)   |                    |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|
|                            | 0                                | 30                     | 60                     | 90                     | 120                     | 150                    | 180                    |                        |                    |
| <b>E. hirae Pom4</b>       | อัลจินต                          | 8.31±0.08 <sup>b</sup> | 8.13±0.10 <sup>a</sup> | 7.63±0.17 <sup>b</sup> | 7.24±0.08 <sup>b</sup>  | 7.17±0.05 <sup>b</sup> | 7.11±0.05 <sup>b</sup> | 7.01±0.07 <sup>b</sup> | 84.33 <sup>b</sup> |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ              | 8.22±0.08 <sup>b</sup> | 8.16±0.10 <sup>a</sup> | 8.13±0.10 <sup>a</sup> | 8.10±0.07 <sup>a</sup>  | 8.02±0.05 <sup>a</sup> | 7.82±0.05 <sup>a</sup> | 7.32±0.07 <sup>a</sup> | 89.02 <sup>a</sup> |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 8.81±0.06 <sup>a</sup> | 7.91±0.01 <sup>b</sup> | 7.07±0.08 <sup>c</sup> | 6.84±0.10 <sup>c</sup>  | 6.54±0.05 <sup>c</sup> | 6.02±0.10 <sup>c</sup> | 5.43±0.04 <sup>c</sup> | 61.70 <sup>c</sup> |
| <b>Lm. fermentum Pom5</b>  | อัลจินต                          | 8.07±0.05 <sup>c</sup> | 7.93±0.06 <sup>b</sup> | 7.77±0.05 <sup>b</sup> | 7.34±0.04 <sup>b</sup>  | 7.96±0.07 <sup>a</sup> | 7.22±0.08 <sup>b</sup> | 7.01±0.10 <sup>b</sup> | 86.86 <sup>b</sup> |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ              | 8.63±0.07 <sup>b</sup> | 8.56±0.19 <sup>a</sup> | 7.98±0.05 <sup>b</sup> | 7.86±0.03 <sup>a</sup>  | 7.99±0.11 <sup>a</sup> | 7.78±0.08 <sup>a</sup> | 7.57±0.21 <sup>a</sup> | 87.72 <sup>a</sup> |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 8.87±0.06 <sup>a</sup> | 7.81±0.06 <sup>b</sup> | 7.62±0.07 <sup>b</sup> | 7.02±0.10 <sup>c</sup>  | 6.48±0.05 <sup>b</sup> | 5.98±0.09 <sup>c</sup> | 5.87±0.07 <sup>c</sup> | 66.12 <sup>c</sup> |
| <b>P. pentosaceus Ch16</b> | อัลจินต                          | 8.17±0.02 <sup>b</sup> | 7.81±0.02 <sup>b</sup> | 8.05±0.08 <sup>b</sup> | 7.768±0.10 <sup>b</sup> | 7.52±0.21 <sup>b</sup> | 7.54±0.07 <sup>b</sup> | 6.95±0.08 <sup>b</sup> | 85.05 <sup>b</sup> |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ              | 8.35±0.08 <sup>a</sup> | 8.17±0.06 <sup>a</sup> | 8.10±0.06 <sup>a</sup> | 7.97±0.04 <sup>a</sup>  | 8.28±0.06 <sup>a</sup> | 7.75±0.07 <sup>a</sup> | 7.37±0.23 <sup>a</sup> | 88.23 <sup>a</sup> |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 8.89±0.03 <sup>a</sup> | 7.48±0.02 <sup>c</sup> | 7.24±0.07 <sup>c</sup> | 6.87±0.06 <sup>c</sup>  | 6.21±0.07 <sup>c</sup> | 5.95±0.06 <sup>c</sup> | 5.62±0.08 <sup>c</sup> | 63.20 <sup>c</sup> |
| <b>Lig. animalis FB2</b>   | อัลจินต                          | 8.21±0.04 <sup>c</sup> | 8.02±0.06 <sup>b</sup> | 7.88±0.07 <sup>a</sup> | 7.45±0.04 <sup>a</sup>  | 7.18±0.06 <sup>b</sup> | 7.22±0.07 <sup>b</sup> | 7.08±0.05 <sup>b</sup> | 86.22 <sup>a</sup> |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ              | 8.77±0.06 <sup>b</sup> | 8.49±0.05 <sup>a</sup> | 8.15±0.04 <sup>a</sup> | 8.02±0.07 <sup>a</sup>  | 8.03±0.05 <sup>a</sup> | 7.53±0.07 <sup>a</sup> | 7.45±0.04 <sup>a</sup> | 84.97 <sup>b</sup> |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 8.79±0.06 <sup>a</sup> | 7.47±0.02 <sup>c</sup> | 6.73±0.08 <sup>b</sup> | 6.06±0.08 <sup>b</sup>  | 5.46±0.04 <sup>c</sup> | 5.44±0.17 <sup>c</sup> | 5.15±0.04 <sup>c</sup> | 58.57 <sup>c</sup> |

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของวัสดุห่อหุ้มเปรียบเทียบของเซลล์แต่ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวนอน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

### 8.4.3 สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขที่มีการเติมเกลือน้ำดี

เมื่อทำการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขที่มีการเติมเกลือน้ำดีเป็นเวลา 180 นาที พบว่า เซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มของแต่ละสายพันธุ์มีการรอดชีวิตที่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มสูงกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว และเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *P. pentosaceus* Chi8 มีการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 8.09 log CFU/g รองลงมาคือ *Lig. animalis* FB2, *E. hirae* Pom4 และ *Lim. fermentum* Pom5 โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 7.99, 7.93 และ 7.63 log CFU/g ตามลำดับ (ตาราง 24)

### 8.4. การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง

เมื่อนำเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมาศึกษาการรอดชีวิตเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มจากสภาวะจำลองในปากของสุนัขเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปใส่ลงในน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองของสุนัขเป็นเวลา 180 นาที และใส่ลงในน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขเป็นเวลาอีก 180 นาที และนำไปนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ซึ่งพบว่า เซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะของทั้ง 4 สายพันธุ์มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว และเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อสัมผัสกับสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองเป็นเวลา 360 นาที โดย *Lim. fermentum* Pom5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากที่สุด คือ 6.89 log CFU/g ในขณะที่การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวและเซลล์อิสระ มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตต่ำกว่า 6 log CFU/g (หรือ CFU/ml) เมื่อสัมผัสกับระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขเป็นเวลา 360 นาที (ตาราง 25)

ตาราง 24 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกหน่วงในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะนำย่อยลำไส้จำลองที่มีการเติม  
เกลือน้ำดีของสุนัข

| สายพันธุ์                  | วัสดุที่หน่วง                      | ระยะเวลาในการบ่ม (นาที) <sup>1</sup> |                         |                        |                        |                        |                        |                        | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
|                            |                                    | 0                                    | 30                      | 60                     | 90                     | 120                    | 150                    | 180                    |                      |
| <i>E. hirae</i> Pom4       | อัลจินต                            | 8.46±0.05 <sup>B</sup>               | 8.29±0.04 <sup>C</sup>  | 7.86±0.06 <sup>B</sup> | 7.63±0.08 <sup>B</sup> | 7.61±0.03 <sup>C</sup> | 7.24±0.10 <sup>C</sup> | 7.01±0.08 <sup>B</sup> | 82.91 <sup>B</sup>   |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ                | 8.53±0.03 <sup>B</sup>               | 8.49±0.05 <sup>B</sup>  | 8.37±0.05 <sup>A</sup> | 8.22±0.06 <sup>A</sup> | 8.28±0.03 <sup>A</sup> | 7.96±0.05 <sup>A</sup> | 7.93±0.06 <sup>A</sup> | 92.96 <sup>A</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการ<br>หน่วง | 8.89±0.02 <sup>A</sup>               | 8.63±0.04 <sup>A</sup>  | 8.40±0.04 <sup>A</sup> | 8.09±0.04 <sup>A</sup> | 7.88±0.16 <sup>B</sup> | 7.47±0.10 <sup>B</sup> | 6.4±0.14 <sup>C</sup>  | 78.06 <sup>C</sup>   |
|                            | อัลจินต                            | 8.40±0.04 <sup>B</sup>               | 8.34±0.02 <sup>B</sup>  | 8.18±0.03 <sup>B</sup> | 7.91±0.10 <sup>B</sup> | 7.87±0.02 <sup>C</sup> | 7.78±0.03 <sup>B</sup> | 7.31±0.15 <sup>B</sup> | 87.06 <sup>B</sup>   |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | อัลจินตร่วมกับนมแพะ                | 8.51±0.08 <sup>B</sup>               | 8.43±0.06 <sup>B</sup>  | 8.39±0.02 <sup>A</sup> | 8.24±0.08 <sup>A</sup> | 8.21±0.02 <sup>A</sup> | 8.03±0.05 <sup>A</sup> | 7.63±0.22 <sup>A</sup> | 89.71 <sup>A</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการ<br>หน่วง | 8.83±0.03 <sup>A</sup>               | 8.53±0.03 <sup>A</sup>  | 8.35±0.04 <sup>A</sup> | 8.13±0.08 <sup>A</sup> | 8.06±0.05 <sup>B</sup> | 7.66±0.09 <sup>B</sup> | 7.05±0.01 <sup>C</sup> | 79.86 <sup>C</sup>   |
|                            | อัลจินต                            | 8.12±0.05 <sup>B</sup>               | 8.07±0.04 <sup>C</sup>  | 7.98±0.03 <sup>B</sup> | 7.84±0.09 <sup>B</sup> | 7.90±0.05 <sup>B</sup> | 7.71±0.05 <sup>B</sup> | 7.72±0.02 <sup>B</sup> | 94.99 <sup>A</sup>   |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ                | 8.83±0.03 <sup>A</sup>               | 8.72±0.02 <sup>A</sup>  | 8.49±0.03 <sup>A</sup> | 8.33±0.10 <sup>A</sup> | 8.39±0.03 <sup>A</sup> | 8.05±0.07 <sup>A</sup> | 8.09±0.05 <sup>A</sup> | 91.62 <sup>B</sup>   |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการ<br>หน่วง | 8.61±0.02 <sup>A</sup>               | 8.26±0.03 <sup>B</sup>  | 8.11±0.07 <sup>B</sup> | 7.97±0.06 <sup>B</sup> | 7.82±0.04 <sup>B</sup> | 7.49±0.10 <sup>C</sup> | 7.15±0.04 <sup>C</sup> | 83.04 <sup>C</sup>   |
|                            | อัลจินต                            | 8.10±0.04 <sup>A</sup>               | 8.21±0.06 <sup>B</sup>  | 8.00±0.02 <sup>C</sup> | 7.97±0.03 <sup>B</sup> | 7.92±0.02 <sup>B</sup> | 7.68±0.15 <sup>B</sup> | 7.68±0.02 <sup>B</sup> | 84.26 <sup>B</sup>   |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ                | 8.68±0.05 <sup>A</sup>               | 8.65±0.08 <sup>A</sup>  | 8.55±0.04 <sup>A</sup> | 8.22±0.10 <sup>A</sup> | 8.26±0.05 <sup>A</sup> | 8.14±0.07 <sup>A</sup> | 7.99±0.13 <sup>A</sup> | 94.81 <sup>A</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการ<br>หน่วง | 8.56±0.4 <sup>A</sup>                | 8.601±0.02 <sup>A</sup> | 8.36±0.04 <sup>B</sup> | 7.99±0.11 <sup>B</sup> | 7.82±0.06 <sup>B</sup> | 7.33±0.10 <sup>C</sup> | 7.21±0.02 <sup>C</sup> | 79.86 <sup>C</sup>   |

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของวัสดุที่หน่วงที่เปรียบเทียบของเซลล์ตายทันทีเวลาเดียวกัน (แนวคอลัมน์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

ตาราง 25 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของสุนัขแบบต่อเนื่อง

| สายพันธุ์                  | วัสดุห่อหุ้ม                     | ระยะเวลาในการปัม (นาที) <sup>1</sup> |                        |                        |                        | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
|                            |                                  | สภาวะจำลองในปากของสุนัข              | น้ำย่อยกระเพาะอาหาร    | น้ำย่อยลำไส้เล็กของงู  | อัตราการรอดชีวิต       |                      |
|                            |                                  | 0                                    | 10                     | 180                    | 360                    |                      |
| <b>E. hirae Pom4</b>       | อัลจิเนต                         | 9.054±0.04 <sup>A</sup>              | 9.00±0.07 <sup>A</sup> | 6.52±0.09 <sup>B</sup> | 5.86±0.09 <sup>B</sup> | 64.68 <sup>B</sup>   |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 9.06±0.07 <sup>A</sup>               | 8.97±0.10 <sup>A</sup> | 7.43±0.10 <sup>A</sup> | 6.94±0.09 <sup>A</sup> | 76.62 <sup>A</sup>   |
| <b>Lm. fermentum Pom5</b>  | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.13±0.07 <sup>A</sup>               | 9.04±0.09 <sup>A</sup> | 5.63±0.19 <sup>C</sup> | 4.66±0.31 <sup>C</sup> | 50.99 <sup>C</sup>   |
|                            | อัลจิเนต                         | 9.35±0.17 <sup>A</sup>               | 9.19±0.17 <sup>A</sup> | 6.54±0.07 <sup>B</sup> | 5.70±0.06 <sup>B</sup> | 61.02 <sup>B</sup>   |
| <b>P. pentosaceus Chi8</b> | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 9.34±0.19 <sup>A</sup>               | 9.29±0.13 <sup>A</sup> | 7.38±0.08 <sup>A</sup> | 6.86±0.06 <sup>A</sup> | 73.70 <sup>A</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.50±0.06 <sup>A</sup>               | 9.28±0.13 <sup>A</sup> | 5.64±0.11 <sup>C</sup> | 4.36±0.06 <sup>C</sup> | 45.88 <sup>C</sup>   |
| <b>Lg. animalis FB2</b>    | อัลจิเนต                         | 9.15±0.05 <sup>B</sup>               | 9.07±0.04 <sup>B</sup> | 6.60±0.22 <sup>B</sup> | 5.88±0.06 <sup>B</sup> | 64.25 <sup>B</sup>   |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 9.22±0.08 <sup>B</sup>               | 9.16±0.08 <sup>B</sup> | 7.29±0.14 <sup>A</sup> | 6.48±0.29 <sup>A</sup> | 70.22 <sup>A</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.45±0.05 <sup>A</sup>               | 9.39±0.05 <sup>A</sup> | 5.90±0.09 <sup>C</sup> | 4.78±0.17 <sup>C</sup> | 50.42 <sup>C</sup>   |
|                            | อัลจิเนต                         | 9.27±0.08 <sup>A</sup>               | 9.14±0.07 <sup>A</sup> | 6.70±0.15 <sup>B</sup> | 5.82±0.06 <sup>B</sup> | 62.75 <sup>B</sup>   |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 9.34±0.10 <sup>A</sup>               | 9.27±0.07 <sup>A</sup> | 7.25±0.05 <sup>A</sup> | 6.71±0.11 <sup>A</sup> | 71.85 <sup>A</sup>   |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.43±0.09 <sup>A</sup>               | 9.28±0.02 <sup>A</sup> | 5.66±0.13 <sup>C</sup> | 4.65±0.20 <sup>C</sup> | 49.25 <sup>C</sup>   |

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของวัสดุห่อหุ้มเปรียบเทียบของข้อแต่ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวคอลัมน์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

### 8.5 การศึกษาการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง

เมื่อนำเม็ดไมโครแคปซูลอัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะที่เตรียมได้ มาศึกษาการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะน้ำย่อยจำลอง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า เม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดของเชื้อโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์สัมผัสกับสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองจะมีการปลดปล่อยเซลล์ออกมาอย่างช้า ๆ ภายหลังจากการสัมผัสกับน้ำย่อยลำไส้จำลองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดย *Lim. fermentum* Pom5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว แสดงอัตราการปลดปล่อยที่สูงที่สุด คือ 86.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 26)

### 8.6. การศึกษาความเสถียรของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อนำเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดมาศึกษาการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่า เซลล์อิสระของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยที่สุด ในขณะที่ เซลล์โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว และเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังจากการเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน (ตาราง 27)

### 8.7 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในนมแพะ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อนำเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดมาศึกษาการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในนมแพะ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ทั้งเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ มีการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเก็บรักษาในนมแพะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน (ตาราง 28)

### 8.8 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์

เมื่อนำเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลแต่ละชนิดมาศึกษาการรอดชีวิตในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที พบว่า การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะให้การปกป้องเซลล์ในระหว่างกระบวนการให้ความ

ร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ได้ดีกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตเพียงอย่างเดียว และเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *P. pentosaceus* Chi8 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงสุด คือ 7.37 log CFU/g เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ *E. hirae* Pom4 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงสุด คือ 8.25 log CFU/g เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที (ตาราง 29)



ตาราง 26 จำนวนการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในสภานะนำย้อยลาใต้จำลอง

| สายพันธุ์                         | วัสดุที่ห่อหุ้ม       | ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) |                          |                         |                          |                         |                         |                         |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                   |                       | 0                          | 1                        | 2                       | 3                        | 4                       | 5                       | 6                       |
| <b><i>E. hirae</i> Pom4</b>       | อัลจิเนต              | 65.93±0.12 <sup>A</sup>    | 71.97±0.12 <sup>A</sup>  | 72.18±0.17 <sup>A</sup> | 7.01±0.12 <sup>A</sup>   | 74.36±0.12 <sup>A</sup> | 74.67±0.12 <sup>A</sup> | 77.42±0.04 <sup>A</sup> |
|                                   | อัลจิเนตร่วมกับบนมแพะ | 67.02±0.17 <sup>A</sup>    | 71.15±0.09 <sup>A</sup>  | 72.15±0.02 <sup>A</sup> | 7.09±0.16 <sup>A</sup>   | 75.52±0.09 <sup>A</sup> | 75.51±0.12 <sup>A</sup> | 77.44±0.07 <sup>A</sup> |
| <b><i>Lim. fermentum</i> Pom5</b> | อัลจิเนต              | 64.84±0.10 <sup>A</sup>    | 67.287±0.10 <sup>B</sup> | 69.33±0.05 <sup>B</sup> | 75.18±0.05 <sup>A</sup>  | 78.68±0.02 <sup>A</sup> | 82.44±0.05 <sup>A</sup> | 86.61±0.01 <sup>A</sup> |
|                                   | อัลจิเนตร่วมกับบนมแพะ | 65.80±0.03 <sup>A</sup>    | 69.19±0.07 <sup>A</sup>  | 72.40±0.06 <sup>A</sup> | 74.79±0.06 <sup>A</sup>  | 77.45±0.06 <sup>A</sup> | 80.42±0.09 <sup>A</sup> | 85.01±0.03 <sup>A</sup> |
| <b><i>P. pentosaceus</i> Chi8</b> | อัลจิเนต              | 60.96±0.06 <sup>A</sup>    | 66.99±0.09 <sup>A</sup>  | 73.72±0.47 <sup>A</sup> | 73.53±0.52 <sup>A</sup>  | 77.87±0.53 <sup>A</sup> | 78.82±0.33 <sup>A</sup> | 81.93±0.20 <sup>A</sup> |
|                                   | อัลจิเนตร่วมกับบนมแพะ | 61.18±0.14 <sup>A</sup>    | 71.59±0.13 <sup>A</sup>  | 70.70±0.50 <sup>B</sup> | 72.63±0.31 <sup>A</sup>  | 75.47±0.18 <sup>A</sup> | 77.15±0.41 <sup>A</sup> | 81.23±0.18 <sup>A</sup> |
| <b><i>Lig. animalis</i> FB2</b>   | อัลจิเนต              | 59.70±0.16 <sup>A</sup>    | 65.96±0.02 <sup>A</sup>  | 65.31±0.21 <sup>A</sup> | 68.02±0.049 <sup>A</sup> | 68.69±0.40 <sup>A</sup> | 70.18±0.34 <sup>A</sup> | 69.43±0.23 <sup>A</sup> |
|                                   | อัลจิเนตร่วมกับบนมแพะ | 61.07±0.05 <sup>A</sup>    | 67.48±0.12 <sup>A</sup>  | 67.19±0.21 <sup>A</sup> | 69.14±0.32 <sup>A</sup>  | 71.01±0.21 <sup>A</sup> | 71.89±0.30 <sup>A</sup> | 74.86±0.41 <sup>A</sup> |

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ห่อหุ้มเปรียบเทียบของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวนอน) อย่างไรก็ตามัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Student's t-test ที่ค่า  $p < 0.05$



ตาราง 27 จำนวนของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกหน่วงในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ภายหลังจากการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

| สายพันธุ์                  | วัสดุที่หน่วง                  | ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน) |                        |                        |                        |                         |                    | อัตราการรอด<br>ชีวิต (%) <sup>2</sup> |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
|                            |                                | 0                            | 7                      | 14                     | 21                     | 28                      |                    |                                       |
| <i>E. hirae</i> Pom4       | อัลจินต                        | 8.99±0.15 <sup>A</sup>       | 8.35±0.50 <sup>A</sup> | 7.75±0.13 <sup>B</sup> | 7.44±0.20 <sup>B</sup> | 7.57±0.23 <sup>B</sup>  | 79.84 <sup>B</sup> |                                       |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ            | 9.17±0.26 <sup>A</sup>       | 8.70±0.14 <sup>A</sup> | 8.57±0.12 <sup>A</sup> | 8.23±0.18 <sup>A</sup> | 7.89±0.26 <sup>A</sup>  | 86.06 <sup>A</sup> |                                       |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการหน่วง | 9.30±0.17 <sup>A</sup>       | 8.70±0.12 <sup>A</sup> | 8.02±0.3 <sup>B</sup>  | 8.29±0.27 <sup>A</sup> | 6.90±0.23 <sup>B</sup>  | 74.24 <sup>C</sup> |                                       |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | อัลจินต                        | 8.73±0.20 <sup>A</sup>       | 8.22±0.06 <sup>B</sup> | 7.87±0.08 <sup>B</sup> | 7.09±0.11 <sup>B</sup> | 7.051±0.10 <sup>B</sup> | 80.74 <sup>B</sup> |                                       |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ            | 8.9±0.27 <sup>A</sup>        | 8.69±0.40 <sup>A</sup> | 8.54±0.08 <sup>A</sup> | 8.17±0.06 <sup>A</sup> | 8.1±0.06 <sup>A</sup>   | 91.01 <sup>A</sup> |                                       |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการหน่วง | 8.92±0.04 <sup>A</sup>       | 8.86±0.08 <sup>A</sup> | 7.56±0.40 <sup>B</sup> | 6.50±0.17 <sup>B</sup> | 6.57±0.21 <sup>B</sup>  | 73.58 <sup>C</sup> |                                       |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | อัลจินต                        | 8.81±0.09 <sup>A</sup>       | 8.56±0.05 <sup>A</sup> | 7.71±0.01 <sup>B</sup> | 7.61±0.06 <sup>B</sup> | 7.06±0.04 <sup>B</sup>  | 80.17 <sup>B</sup> |                                       |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ            | 8.96±0.09 <sup>A</sup>       | 8.78±0.05 <sup>A</sup> | 8.57±0.02 <sup>A</sup> | 8.14±0.08 <sup>A</sup> | 7.98±0.08 <sup>A</sup>  | 89.06 <sup>A</sup> |                                       |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการหน่วง | 8.89±0.16 <sup>A</sup>       | 7.61±0.24 <sup>B</sup> | 6.82±0.05 <sup>C</sup> | 6.94±0.09 <sup>C</sup> | 6.55±0.10 <sup>C</sup>  | 73.67 <sup>C</sup> |                                       |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | อัลจินต                        | 9.06±0.20 <sup>A</sup>       | 8.92±0.03 <sup>A</sup> | 7.98±0.02 <sup>A</sup> | 7.57±0.07 <sup>B</sup> | 6.25±0.04 <sup>B</sup>  | 69.05 <sup>C</sup> |                                       |
|                            | อัลจินตร่วมกับนมแพะ            | 9.08±0.07 <sup>A</sup>       | 9.03±0.05 <sup>A</sup> | 7.84±0.04 <sup>A</sup> | 7.92±0.10 <sup>A</sup> | 7.92±0.04 <sup>A</sup>  | 87.21 <sup>A</sup> |                                       |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการหน่วง | 9.07±0.32 <sup>A</sup>       | 8.12±0.09 <sup>B</sup> | 6.96±0.30 <sup>B</sup> | 6.83±0.23 <sup>C</sup> | 6.58±0.20 <sup>B</sup>  | 72.61 <sup>B</sup> |                                       |

หมายเหตุ; ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของวัสดุที่หน่วงเปรียบเทียบของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวคอลัมน์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

ตาราง 28 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกทำลายในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในนมแพะ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

| สายพันธุ์                  | วัสดุที่ห่อหุ้ม                  | ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน) |                        |                        |                        |                        |                    | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|----------------------|
|                            |                                  | 0                            | 7                      | 14                     | 21                     | 28                     |                    |                      |
| <i>E. hirae</i> Pom4       | อัลจินเนต                        | 8.87±0.20 <sup>A</sup>       | 8.32±0.53 <sup>A</sup> | 8.15±0.62 <sup>A</sup> | 8.07±0.19 <sup>A</sup> | 7.80±0.54 <sup>A</sup> | 89.15 <sup>A</sup> |                      |
|                            | อัลจินเนตร่วมกับนมแพะ            | 8.78±0.15 <sup>A</sup>       | 8.34±0.51 <sup>A</sup> | 8.24±0.60 <sup>A</sup> | 8.12±0.33 <sup>A</sup> | 7.92±0.42 <sup>A</sup> | 90.53 <sup>A</sup> |                      |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 8.75±0.23 <sup>A</sup>       | 8.48±0.20 <sup>A</sup> | 8.30±0.28 <sup>A</sup> | 7.70±0.28 <sup>A</sup> | 7.48±0.24 <sup>A</sup> | 85.45 <sup>B</sup> |                      |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | อัลจินเนต                        | 8.87±0.08 <sup>A</sup>       | 8.83±0.25 <sup>A</sup> | 8.31±0.36 <sup>A</sup> | 8.25±0.29 <sup>A</sup> | 7.80±0.28 <sup>A</sup> | 87.98 <sup>B</sup> |                      |
|                            | อัลจินเนตร่วมกับนมแพะ            | 8.81±0.34 <sup>A</sup>       | 8.65±0.51 <sup>A</sup> | 8.17±0.29 <sup>A</sup> | 8.18±0.10 <sup>A</sup> | 8.16±0.54 <sup>A</sup> | 92.66 <sup>A</sup> |                      |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.03±0.07 <sup>A</sup>       | 8.77±0.24 <sup>A</sup> | 8.41±0.24 <sup>A</sup> | 8.10±0.14 <sup>A</sup> | 7.92±0.25 <sup>A</sup> | 87.67 <sup>B</sup> |                      |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | อัลจินเนต                        | 9.31±0.22 <sup>A</sup>       | 9.01±0.43 <sup>A</sup> | 9.09±0.39 <sup>A</sup> | 8.96±0.22 <sup>A</sup> | 8.70±0.57 <sup>A</sup> | 93.44 <sup>B</sup> |                      |
|                            | อัลจินเนตร่วมกับนมแพะ            | 9.19±0.40 <sup>A</sup>       | 9.23±0.54 <sup>A</sup> | 9.16±0.37 <sup>A</sup> | 8.97±0.58 <sup>A</sup> | 9.06±0.53 <sup>A</sup> | 98.66 <sup>A</sup> |                      |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.68±0.38 <sup>A</sup>       | 9.47±0.11 <sup>A</sup> | 8.86±0.38 <sup>A</sup> | 8.50±0.11 <sup>A</sup> | 8.11±0.11 <sup>A</sup> | 83.76 <sup>C</sup> |                      |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | อัลจินเนต                        | 9.03±0.38 <sup>A</sup>       | 9.21±0.49 <sup>A</sup> | 8.80±0.28 <sup>A</sup> | 8.77±0.40 <sup>A</sup> | 8.56±0.26 <sup>A</sup> | 95.10 <sup>A</sup> |                      |
|                            | อัลจินเนตร่วมกับนมแพะ            | 9.21±0.38 <sup>A</sup>       | 8.90±0.15 <sup>A</sup> | 8.89±0.08 <sup>A</sup> | 8.95±0.51 <sup>A</sup> | 8.59±0.36 <sup>A</sup> | 93.24 <sup>B</sup> |                      |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 9.73±0.23 <sup>A</sup>       | 9.43±0.13 <sup>A</sup> | 8.34±0.11 <sup>A</sup> | 8.62±0.29 <sup>A</sup> | 8.45±0.04 <sup>A</sup> | 86.84 <sup>C</sup> |                      |

หมายเหตุ; ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$  ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวคอลัมน์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

ตาราง 29 จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ (log CFU/mL) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม ในไมโครแคปซูล (log CFU/g) ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์

| สายพันธุ์                  | วัสดุห่อหุ้ม                     | กระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ |                         |
|----------------------------|----------------------------------|---|-------------------------|
|                            |                                  | 63°C, 15 min                                | 72°C, 15 s              |
| <i>E. hirae</i> Pom4       | อัลจิเนต                         | 3.57±0.14 <sup>B</sup>                      | 5.53±0.35 <sup>B</sup>  |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 7.10±0.02 <sup>A</sup>                      | 8.25±0.15 <sup>A</sup>  |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 3.53±0.03 <sup>B</sup>                      | 4.79±0.16 <sup>C</sup>  |
| <i>Lim. fermentum</i> Pom5 | อัลจิเนต                         | 4.44±0.12 <sup>B</sup>                      | 5.80±0.15 <sup>B</sup>  |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 7.22±0.11 <sup>A</sup>                      | 7.94±0.05 <sup>A</sup>  |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 3.71±0.18 <sup>C</sup>                      | 4.49±0.33 <sup>C</sup>  |
| <i>P. pentosaceus</i> Chi8 | อัลจิเนต                         | 4.65±0.05 <sup>B</sup>                      | 5.51±0.17 <sup>B</sup>  |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 4.91±0.14 <sup>A</sup>                      | 6.33±0.04 <sup>A</sup>  |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 2.21±0.18 <sup>C</sup>                      | 3.66±0.12 <sup>C</sup>  |
| <i>Lig. animalis</i> FB2   | อัลจิเนต                         | 4.81±0.07 <sup>B</sup>                      | 45.52±0.10 <sup>B</sup> |
|                            | อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ             | 7.37±0.05 <sup>A</sup>                      | 7.91±0.16 <sup>A</sup>  |
|                            | เซลล์อิสระที่ไม่ได้รับการห่อหุ้ม | 3.24±0.30 <sup>C</sup>                      | 4.75±0.11 <sup>C</sup>  |

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของวัสดุห่อหุ้มเปรียบเทียบของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เวลาเดียวกัน (แนวนอน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละการทดลอง การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า  $p < 0.05$

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารของสุนัขเพื่อนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกนั้น จะต้องมีความสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนกับเซลล์เยื่อเมือกลำไส้ของโฮสต์ สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ ภายในลำไส้ได้ เป็นต้น นอกจากนี้ โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย โดยต้องเป็นสายพันธุ์ที่ตัดแยกจากมนุษย์หรือสัตว์ที่มีสุขภาพดี และโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ควรเป็นสายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกับโฮสต์ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นจากอุจจาระของสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการทนกรดและเกลือแร่ดีซึ่งเป็นสภาวะที่พบในระบบทางเดินอาหาร พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 20 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดสูงที่ค่า pH เท่ากับ 3.5 และ pH 4.5 และสภาวะที่มีเกลือแร่ดีที่ความเข้มข้น 0.1, 0.15 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajoka และคณะ (2018)<sup>(106)</sup> ซึ่งรายงานไว้ว่า เชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์ปีกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงคือ 82 และ 93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสกับสภาวะที่เป็นกรดสูงที่มีค่า pH เท่ากับ 2 และ 3 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และยังสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีการเติมเกลือแร่ดีที่ความเข้มข้น 0.3, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jun Jang และคณะ (2021)<sup>(107)</sup> ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสมบัติการเป็นโพรไบโอติกจากอุจจาระของสุนัข และศึกษาความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ดีของ *B. longum* subsp. *longum* CACC517, *P. acidilactici* CACC537, *L. plantarum* subsp. *plantarum* CACC558 และ *L. paracasei* subsp. *tolerans* CACC566 ที่แยกได้ พบว่า CACC517, CACC537, CACC558 และ CACC566 สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดที่มีค่า pH เท่ากับ 2.5 และสภาวะที่มีเกลือแร่ดีที่ความเข้มข้น 0.3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103 (LGG) ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่ใช้ทางการค้า

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า มี 3 ไอโซเลท ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 4 ชนิด 5 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 3 ชนิด 4 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อ

โรคได้ 2 ชนิด และ 4 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 1 ชนิด โดยผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้มักเกิดจากการสร้างสารเมแทบอลิต์ชนิดต่าง ๆ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ไม่พบไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบหลังจากมีการปรับค่า pH ของส่วนใสให้เท่ากับ 6.0 จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า กรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยการผลิตและสะสมกรดอินทรีย์นี้ทำให้สภาวะแวดล้อมมีความเป็นกรดที่มากขึ้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบแบบไม่จำเพาะ<sup>(108)</sup> ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amarantini และคณะ (2019)<sup>(109)</sup> ที่ได้ทำการศึกษาศามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก Peda fish ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่าง ๆ คือ *Salmonella* Typhi BPE 127.1.MC, *Salmonella* Typhi BPE122.4.CCA, *Salmonella* Typhi NCTC 786, *Salmonella* Typhimurium FNCC 0050, *Pseudomonas putida* FNCC 0071, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยวิธี agar well diffusion พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 26 สายพันธุ์ แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทุกชนิด มีเพียง 21 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และมีเพียง 2 จาก 26 สายพันธุ์ที่ยังคงแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเมื่อปรับค่า pH ของส่วนใสให้มีค่าเท่ากับ 6.5 นอกจากนี้เมื่อนำส่วนใสที่ปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.5 มาทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการเป็นเชื้อทดสอบ พบว่า สารที่ผลิตขึ้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ซึ่งในเบื้องต้นนี้อาจสรุปได้ว่า เชื้อไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซิน อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดในการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน คือ เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบอาจไม่ใช่กลุ่มที่ไวต่อแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าเชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินหรือไม่จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

คุณสมบัติของพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สามารถใช้เพื่อประเมินความสามารถในการเกาะติดลำไส้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งในการคัดเลือกโพรไบโอติกเบื้องต้น จากงานวิจัยของ Falah และคณะ (2019)<sup>(110)</sup> ได้รายงานว่าการศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำถือเป็นการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในเบื้องต้น โดยในการศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำในงานวิจัยนี้จะใช้ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ hexadecane และ

นำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท มี 0.04-88.91 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวน 16 จาก 20 ไอโซเลท แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ต่ำ (<50%) มีเพียง 2 ไอโซเลท แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่สูง (>70%) และ 2 ไอโซเลท แสดงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ปานกลาง (50-70%) จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่สูงกว่าอาจแสดงการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ที่มากกว่า<sup>(111)</sup> และจากงานวิจัยของ Krausova และคณะ (2019)<sup>(112)</sup> ที่ทำการศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ *L. fermentum* และ *L. casei* ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ พบว่า มีค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์อยู่ระหว่าง 0.3-68.8 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากวิธี BATH ที่ใช้ทดสอบการยึดเกาะกับสารไฮโดรคาร์บอน และปัจจัยอื่น ๆ เช่น เวลาที่ใช้ในการบ่มองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และชนิดของสารไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น

การศึกษากการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก และการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. และ *B. cereus* พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท มีค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะกลุ่มกันเองอยู่ระหว่าง 27.37-81.75 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้ ในขณะที่การเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคมักมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรคที่บริเวณลำไส้ ดังนั้น ความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติก และการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคจึงถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่เหมาะสมกับทั้งสำหรับคนและสัตว์<sup>(113)</sup> โดยความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเอง และการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจเกิดจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันของพื้นผิวเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์<sup>(104)</sup>

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 4 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นที่ดี ได้แก่ ไอโซเลท Pom4, Pom5, Chi8 และ FB2 ไปทำการจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลท Pom4 มีความคล้ายคลึงกับ *E. hirae* (GenBank accession number; LR134297.1) 99 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลท Pom5 มีความคล้ายคลึงกับ *Lim. fermentum* (GenBank accession number; MT611889.1) 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท

Chi8 มีความคล้ายคลึงกับ *P. pentosaceus* (GenBank accession number; MK402182.1) 99 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลท FB2 มีความคล้ายคลึงกับ *Lig. animalis* (GenBank accession number; AB911530.1) 99 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่จัดจำแนกแล้วได้นำมาศึกษาความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ซึ่งถูกใช้เป็นตัวแทนของเซลล์เยื่ออุ้งลำไส้ จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ Pom4, Pom5, Chi8 และ FB2 มีอัตราการยึดเกาะอยู่ระหว่าง 76.92-95.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 หรือลำไส้ที่สูง แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ในระดับต่ำถึงปานกลาง คืออยู่ในช่วง 22.91-56.66 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์และการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 อาจไม่สัมพันธ์กันได้ เนื่องจากคุณสมบัติในการยึดเกาะของเซลล์ได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และค่า pH<sup>(114, 115)</sup> ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krausova และคณะ (2019)<sup>(112)</sup> ที่ได้ทำการศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำและการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่แยกได้จากมูลและน้ำลายของลูกโคและลูกสุกร ซึ่งพบว่า *L. reuteri* E3M2 และ *L. casei* E3TD แสดงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่ต่ำคือ 9.1 และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ แต่กลับแสดงความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ไลน์ Caco-2 ได้ดีที่สุดมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์

นอกจากคุณสมบัติที่กล่าวมาเบื้องต้นที่โพรไบโอติกควรมีแล้ว แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกบางสายพันธุ์อาจมีความสามารถในการสร้างสารที่มีประโยชน์แก่โฮสต์ เช่น ความสามารถในการสร้างสารอนุมูลอิสระ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase หรือความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase<sup>(116)</sup> ซึ่งผลการศึกษาดังนี้

- การศึกษาความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH assay) ซึ่งมีหลักการคือ สาร DPPH จะเป็นสารที่มีอนุมูลอิสระและมีสีม่วง หากมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ DPPH เปลี่ยนจากสารสีม่วงเป็นสารสีเหลือง จากผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 16.42-36.96 เปอร์เซ็นต์ โดย *Lim. fermentum* Pom5 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากการรายงานก่อนหน้านี้โดย Lee และคณะ (2006)<sup>(117)</sup> ซึ่งได้ทำการศึกษาคณะสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเชื้อ *L. plantarum* NK181 ด้วยวิธี DPPH เช่นเดียวกัน พบว่า เชื้อ *L. plantarum* NK181 มีค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึง

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม สาร DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร ซึ่งมีความไวต่อปฏิกิริยาน้อยกว่าสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจริง จึงทำให้สาร DPPH ทำปฏิกิริยาได้ช้ากว่า มีผลทำให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธี DPPH นี้ต่ำกว่าความเป็นจริงได้<sup>(118)</sup>

- การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยใช้ *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG) เป็นสารตั้งต้น พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ของทั้ง 4 ไอโซเลท อยู่ระหว่าง 301.90-373.48 Miller Unit โดยเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมนมเพื่อช่วยในการย่อยน้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดไขมันสายสั้น เช่น กรดแลคติก, กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เป็นต้น ซึ่งเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภคหรือโฮสต์<sup>(119)</sup> ทั้งนี้ได้มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ได้ อาทิเช่น งานวิจัยของ Son และคณะ (2017)<sup>(116)</sup> ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. rhamnosus* KCTC 12202BP, *L. plantarum* Ln4 และ *L. plantarum* G72 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมน้ำตาลแลคโตส พบว่า *L. plantarum* Ln4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidase สูงที่สุด เท่ากับ 3,320.99 Miller units

- การศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเกลือน้ำดีให้ได้เป็นกรดน้ำดีและกรดอะมิโนไกลซีนหรือทอรีน จากผลการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ taurodeoxycholate ที่เติมลงในอาหารแข็ง MRS เป็นสารตั้งต้น พบว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ bile salts hydrolase ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งอาจเกิดจากความจำเพาะของเอนไซม์ bile salts hydrolase ต่อสารตั้งต้น ที่จะมีการ conjugate ของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน<sup>(120)</sup> สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2012)<sup>(120)</sup> ซึ่งได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกัน คือ sodium glycocholate, sodium taurocholate และ taurodeoxycholate ซึ่งพบว่า มีแบคทีเรียกรดแลคติก 62 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถย่อย sodium glycocholate และ sodium taurocholate ได้และมีเพียง 12 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อย sodium glycocholate และ sodium taurocholate แต่ไม่สามารถย่อย sodium taurocholate และมี 4 สายพันธุ์ที่สามารถย่อย sodium glycocholate ได้เพียงอย่างเดียว และยังมีรายงานว่ เอนไซม์ bile salts hydrolase



ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถย่อย glycocholate ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ taurodeoxycholate<sup>(120)</sup>

นอกจากคุณสมบัติต่าง ๆ แล้ว การประเมินความปลอดภัยก่อนที่จะนำโพรไบโอติกไปใช้ในโฮสต์ยังมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในการศึกษานี้ได้ตรวจสอบจากการสร้างเอมีน การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ความเป็นพิษของ cell free supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์ไลน์ Vero และความไวต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งผลการศึกษาเป็นดังนี้

- ความสามารถในการสร้างเอมีน พบว่า เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีการสร้างสารประกอบเอมีน เนื่องจากไม่สามารถสร้างเอนไซม์ decarboxylase ซึ่งในการเปลี่ยนกรดอะมิโน histidine, lysine, arginine และ ornithine ที่ใช้ทดสอบเป็นสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ ที่อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อโฮสต์ โดยสารประกอบเอมีนเหล่านี้อาจทำให้เกิดอาการแพ้ต่าง ๆ หากได้รับในปริมาณที่มาก<sup>(121)</sup>

- การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและความเป็นพิษของ cell free supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์ไลน์ vero พบว่า เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง รวมทั้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติในการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cunha และคณะ (2021)<sup>(122)</sup> ได้ทำการประเมินความปลอดภัยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก คือ *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* R7 โดยได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร blood agar ที่มีการเติมเลือดม้า 7 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero พบว่า *Lc. lactis* R7 ไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง รวมถึงไม่มีความเป็นพิษเซลล์ไลน์ Vero หลังจากบ่มร่วมกับ cell free supernatant เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การประเมินความไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, gentamicin, chloramphenicol, tetracycline และ erythromycin ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า *Lim. fermentum* Pom5 และ *P. pentosaceus* Chi8 ไวต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบทุกชนิด แต่ *E. hirae* Pom4 และ *Lig. animalis* FB2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิด ยกเว้น tetracycline การศึกษาข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดที่ได้ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่า

- ขนาดจีโนมของของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์อยู่ระหว่าง 1,746,086-2,922,639 คู่เบส โดยจีโนมของ *E. hirae* Pom4 มีขนาดใหญ่ที่สุดและ *P. pentosaceus* Chi8

มีขนาดของจีโนมที่เล็กที่สุดและมีค่า G+C content อยู่ระหว่าง 36.6-52.0 เปอร์เซ็นต์ โดยขนาดจีโนมของเชื้อ *E. hirae* Pom4 (2,922,639 คู่เบส) และค่า G+C content (36.6 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในช่วงเดียวกันกับ *E. hirae* R17 ซึ่งมีขนาดของจีโนม เท่ากับ 2,886,481 bp และมีค่า G+C content เท่ากับ 36.96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อ *P. pentosaceus* Chi8 พบว่า ขนาดของจีโนม (1,746,086 คู่เบส) และค่า G+C content (37.1 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในช่วงเดียวกันกับ *P. pentosaceus* MR001 ซึ่งมีขนาดของจีโนม เท่ากับ 1,804,896 bp และมีค่า G+C content เท่ากับ 37.2 เปอร์เซ็นต์<sup>(123)</sup> ในส่วนของ *Lim. fermentum* Pom5 พบว่า ขนาดของจีโนม (2,046,384 คู่เบส) และค่า G+C content (52.0 เปอร์เซ็นต์) อยู่ในช่วงเดียวกันกับ *L. fermentum* YLE016 ซึ่งมีขนาดของจีโนม เท่ากับ 2,094,354 bp และมีค่า G+C content เท่ากับ 51.46 เปอร์เซ็นต์<sup>(124)</sup>

- การวิเคราะห์หาบริเวณ prophage โดยใช้ PHASTER พบบริเวณของ prophage แทรกอยู่ในจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ โดย prophage มีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดยีนในรูปแบบ lateral gene transfer ระหว่างสายพันธุ์ ทำให้เกิดความหลากหลายและความจำเพาะของสายพันธุ์<sup>(125)</sup> ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่าสามารถพบ prophage ในจีโนมของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ รวมทั้งแบคทีเรียในกลุ่มของ lactobacilli<sup>(126)</sup> และ *Pediococcus* สายพันธุ์ต่าง ๆ<sup>(127)</sup>

- การวิเคราะห์หาบริเวณ CRISPR สามารถยืนยันบริเวณที่เป็น CRISPR ในจีโนมของ *Lim. fermentum* Pom5 และ *Lig. animalis* FB2 ได้ นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณเป็น CRISPR ในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 (2 บริเวณ) และ *P. pentosaceus* Chi8 (1 บริเวณ) ซึ่งการพบบริเวณของ CRISPR ในจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้แสดงให้เห็นถึงความเสถียรของจีโนมและการต้านทานการแพร่กระจายของยีนที่ติดต่อโดยปฏิชีวนะแบบรับมาโดยกระบวนการต่าง ๆ เช่น กระบวนการ horizontal gene transfer เป็นต้น<sup>(128)</sup>

- การวิเคราะห์หาบริเวณยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน พบว่า มีเพียงจีโนมของ *E. hirae* Pom4 ที่พบบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณของยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน ได้แก่ Enterolysin\_A, Hiracin และ Lanthipeptide class II ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน การศึกษานี้ ซึ่งเป็นไปได้ว่า เชื้อทดสอบที่ใช้ไม่ไวต่อแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น เนื่องจากแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ถูกสร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมักจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน<sup>(129)</sup> ทำให้ไม่พบการสร้างแบคเทอริโอซินในการศึกษานี้

- การวิเคราะห์หาบริเวณยีนต้านยาปฏิชีวนะพบว่า ไม่พบบริเวณของยีนต้านยาปฏิชีวนะในจีโนมของ *Lim. fermentum* Pom5 และ *P. pentosaceus* Chi8 ซึ่งถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยในการนำไปใช้เป็นโพรไบโอติก ในขณะที่จีโนมของ *E. hirae* Pom4 และ *Lig. animalis* FB2 พบยีนที่คาดว่าจะเป็ยีนต้านยาปฏิชีวนะ tetracycline โดย tetracycline ถือเป็นหนึ่งนยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้สำหรับการติดเชื้อทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่าพบยีนที่คาดว่าจะเป็ยีนต้านยาปฏิชีวนะ tetracycline โดยเฉพาะยีน *tet(M)* ในจีโนมของแบคทีเรียกรดแลคติก<sup>(130)</sup> นอกจากนี้ เมื่อตรวจสอบส่วนของบริเวณที่คาดว่าเป็นพลาสมิด พบส่วนที่คาดว่าจะเป็พลาสมิดในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 และ *P. pentosaceus* Chi8 ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าอาจมีพลาสมิดแทรกในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 และ *P. pentosaceus* Chi8 โดยในจีโนมของ *E. hirae* Pom4 พบพลาสมิดบริเวณเดียวกันกับบริเวณยีนต้านยาปฏิชีวนะ tetracycline อาจเป็นไปได้ว่ายีนดื้อยาปฏิชีวนะนี้อาจจะอยู่บนพลาสมิด ซึ่งเป็นยีนต้านยาปฏิชีวนะที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากกระบวนการ horizontal gene transfer ในขณะที่จีโนมของ *P. pentosaceus* Chi8 ไม่พบยีนต้านทานยาปฏิชีวนะบนพลาสมิด ดังนั้นจากข้อมูลการพบยีนต้านยาปฏิชีวนะที่พลาสมิดของ *E. hirae* Pom4 นี้จึงสรุปได้ว่า เชื้อดังกล่าวอาจจะไม่ปลอดภัยหากจะนำไปใช้ในโฮสต์ เนื่องจากอาจมีการถ่ายถอดยีนต้านยาปฏิชีวนะไปยังสายพันธุ์อื่นในลำไส้ ส่งผลให้เชื้อเกิดการต้านยาปฏิชีวนะนั้น ๆ ขึ้น ทำให้การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะนั้นเป็นไปได้ยากขึ้น

- การวิเคราะห์หาบริเวณยีนที่อาจก่อให้เกิดโรคพบว่า มีเพียงจีโนมของ *E. hirae* Pom4 ที่พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นยีนที่อาจก่อให้เกิดโรคทั้งหมด 2 ยีน ได้แก่ *clpP* (proteolytic subunit of the ATP-dependent Clp protease) และ ยีน *bopD* (Maltose operon transcriptional repressor MalR, LacI family, biofilm formation) ซึ่งถูกระบุว่าเป็นยีนที่อาจก่อให้เกิดโรคในฐานข้อมูล VFDB เนื่องจากเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการปรับตัว, การอยู่รอด และการยึดเกาะกับโฮสต์ของแบคทีเรียก่อโรค แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการประเมินความปลอดภัยที่จำเพาะต่อแบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีผลทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนของผลการประเมิน<sup>(131)</sup> เช่น รายงานของ Liu และคณะ (2019)<sup>(132)</sup>

อย่างไรก็ตาม โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับสุนัข ต้องสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ และมีจำนวนของเซลล์โพรไบโอติกในปริมาณที่เพียงพอ โดยในการศึกษานี้ได้นำวิธีการไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) มาใช้เพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ โดยเมื่อทำการห่อหุ้มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่ถูกคัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์ไปห่อหุ้มด้วยโซเดียม

อัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวล/ปริมาตร) และโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับนมแพะด้วยวิธีเอกซเรย์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ encapsulation efficiency และขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้ พบว่า การห่อหุ้มแคปซูลที่เรียกรวดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มอยู่ระหว่าง 93.64-98.97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสูญเสียความมีชีวิตที่ต่ำ เนื่องจากการห่อหุ้มโดยวิธีเอกซเรย์ที่ใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในระหว่างการห่อหุ้มจึงไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์โพรไบโอติก และยังเป็นวิธีที่นิยมใช้ร่วมกับสารละลายไฮโดรคอลลอยด์<sup>(133)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของไมโครแคปซูลที่มีการเติมนมแพะร่วมกับอัลจิเนตมีขนาดใหญ่กว่าไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนตเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasanna และคณะ (2018)<sup>(77)</sup> ที่ได้ทำการห่อหุ้ม *B. longum* ด้วยอัลจิเนต อัลจิเนตร่วมกับ casein hydrolysate อัลจิเนตร่วมกับนมวัว และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ โดยวิธีเอกซเรย์ พบว่า การใช้อัลจิเนตร่วมกับนมวัวและนมแพะในการห่อหุ้มส่งผลให้ขนาดของไมโครแคปซูลใหญ่กว่าการใช้อัลจิเนตร่วมกับ casein hydrolysate และอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว โดยอาจเกิดจากปริมาณของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในนมวัวและนมแพะที่สูงจึงส่งผลให้ขนาดของไมโครแคปซูลที่ขนาดใหญ่กว่า

เมื่อนำไมโครแคปซูลที่เตรียมได้มาศึกษาโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดหรือ SEM โดยใช้กำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่า พื้นผิวของไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนตเพียงอย่างเดียวเป็นวัสดุในการห่อหุ้มมีลักษณะเป็นรูพรุนหรือมีรอยแตก ซึ่งอาจส่งผลให้ไมโครแคปซูลแบบอัลจิเนตไม่สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ เมื่อเปรียบเทียบไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนตร่วมกับนมแพะเป็นวัสดุห่อหุ้มซึ่งลักษณะพื้นผิวที่เรียบและไม่มียรอยแตก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasanna และ Charalampopoulos (2018)<sup>(134)</sup> ที่มีการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเม็ดไมโครแคปซูลที่ใช้อัลจิเนต อัลจิเนตร่วมกับนมวัว อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ และอัลจิเนตร่วมกับ casein hydrolysate โดยใช้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่า เม็ดไมโครแคปซูลที่ใช้วัสดุห่อหุ้มเป็นอัลจิเนตมีรูพรุนและรอยแตกบนพื้นผิว ในขณะที่เม็ดไมโครแคปซูลที่ใช้วัสดุห่อหุ้มอัลจิเนตร่วมกับนมวัวและนมแพะสามารถปรับปรุงโครงสร้างของเม็ดไมโครแคปซูลให้มีความหนา และไม่มียรอยแตก ซึ่งอาจส่งผลให้สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกที่อยู่ภายในเม็ดไมโครแคปซูลได้มากกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว

เมื่อทำการศึกษการรอดชีวิตของไมโครแคปซูลที่ใช้วัสดุห่อหุ้มเป็นอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับนมแพะเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองในปาก สภาวะนี้จำลองภาวะอาหาร

จำลอง และสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขแบบเดี่ยว พบว่า เซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีการรอดชีวิตที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระและ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทั้ง 3 สภาวะ ซึ่งสภาวะ น้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองมีค่า pH ที่ต่ำ และมีเอนไซม์ pepsin จึงส่งผลต่อการรอดชีวิตของ เซลล์โพรไบโอติกทั้งที่ถูกห่อหุ้มและไม่ถูกห่อหุ้มมากที่สุดภายหลังจากสัมผัสเป็นเวลา 120 นาที สอดคล้องกับงานของ Dikit และคณะ (2015)<sup>(135)</sup> ซึ่งรายงานค่า pH ที่ต่ำของสภาวะน้ำย่อย จำลองส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *L. plantarum* D6SM3 ที่ถูกห่อหุ้มและไม่ถูกห่อหุ้ม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เซลล์ *L. plantarum* D6SM3 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตมีการรอดชีวิตที่ มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม ซึ่งการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนต ร่วมกับนมแพะสามารถให้การปกป้องเซลล์โพรไบโอติกได้มากที่สุด อาจเกิดจากนมแพะมีความ เป็นบัฟเฟอร์ที่สูงส่งผลให้สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกได้มาก<sup>(134)</sup>

การศึกษากการรอดชีวิตเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองในปาก สภาวะน้ำย่อย กระเพาะอาหารจำลอง และสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองของสุนัขแบบของต่อเนืองของโพรไบโอติก ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า เซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะของทั้ง 4 สายพันธุ์ มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 6 log CFU/g ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ ต่อโฮสต์ และมีความแตกต่างกับกับโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวและเซลล์ อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสอดคล้องกับผลการศึกษากการรอดชีวิตในระบบทางเดิน อาหารจำลองแบบเดี่ยว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shoaei และคณะ (2022)<sup>(136)</sup> ซึ่งมีการศึกษา การรอดชีวิตของ *L. plantarum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับ arabic gum เปรียบเทียบกับเซลล์ ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม ในสภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารและสภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองแบบต่อเนือง พบว่า การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับ arabic gum ส่งผลให้การรอดชีวิตของ *L. plantarum* สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *L. plantarum* ที่ถูก ห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุด คือ  $6.37 \pm 0.10$  Log CFU/g ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มมีการรอด ชีวิตเหลือเพียง  $1.46 \pm 0.05$  Log CFU/g

การศึกษากการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดไมโครแคปซูลในสภาวะน้ำย่อยลำไส้ จำลองเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเม็ดไมโครแคปซูลของเชื้อโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์สัมผัสกับ สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลองจะมีการปลดปล่อยเซลล์ออกมาอย่างช้า ๆ โดย *Lim. fermentum* Pom5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวแสดงอัตราการปลดปล่อยเท่ากับ 86.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสอดคล้อง

กับงานวิจัยของ Shi และคณะ (2013)<sup>(84)</sup> ซึ่งได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยของเซลล์ *L. bulgaricus* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับ pure milk ในสภาวะลำไส้จำลองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า มีการปลดปล่อย *L. bulgaricus* อย่างรวดเร็วภายในหลังจาก 60 นาที ซึ่งกลไกการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มนี้อาจเกิดจากการบวมหรือการสลายของโครงสร้างไมโครแคปซูล ทั้งนี้ การปลดปล่อยเซลล์จะขึ้นกับความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มที่นำมาใช้อีกด้วย<sup>(84)</sup>

การศึกษารอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในนมแพะและในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน จะเห็นได้ว่า การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะสามารถปกป้องเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาในนมแพะและในตู้เย็นได้มากที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasanna และคณะ (2018)<sup>(134)</sup> ซึ่งศึกษารอดชีวิตของ *B. longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 ที่ไม่ถูกห่อหุ้มและถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะ อัลจิเนตร่วมกับนมแพะ อัลจิเนตร่วม casein hydrolysate และอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่า *B. longum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะมีการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัสดุอื่น ๆ ในการห่อหุ้ม โดยอาจเกิดจากการใช้นมแพะซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งอาจช่วยปรับปรุงโครงสร้างของอัลจิเนต ทำให้สามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้มากกว่าการใช้อัลจิเนตเพียงอย่างเดียว

กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เป็นกระบวนการให้ความร้อนที่สำคัญในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกจะไม่ทนต่อความร้อนส่งผลให้การรอดชีวิตลดลง จึงเป็นปัญหาในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม<sup>(137)</sup> จากการศึกษาการรอดชีวิตเซลล์โพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที พบว่า การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ด้วยอัลจิเนตร่วมกับนมแพะให้การปกป้องเซลล์ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ทั้งสองอุณหภูมิได้ดีกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวและเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *P. pentosaceus* Chi8 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด คือ 7.37 log CFU/g เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ *E. hirae* Pom4 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด คือ 8.25 log CFU/g เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lim. fermentum* Pom5 และ *P. pentosaceus* Chi8 ที่แยกได้จากอุจจาระของสุนัขที่อายุน้อยกว่า 5 ปี ซึ่งมีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกที่ดี และเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย และเมื่อนำไปห่อหุ้มโดยใช้อัลจิเนต และอัลจิเนตร่วมกับนมแพะเพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ พบว่า การห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้อัลจิเนตร่วมกับนมแพะเป็นวัสดุห่อหุ้มสามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ได้มากกว่าการใช้อัลจิเนตเป็นวัสดุห่อหุ้ม และเซลล์โพรไบโอติกที่ไม่ถูกห่อหุ้มได้ทั้งสภาวะทางเดินอาหารจำลอง การเก็บรักษาในตู้เย็น 28 วัน และยังทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์

ดังนั้นการห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lim. fermentum* Pom5 และ *P. pentosaceus* Chi8 โดยใช้อัลจิเนตร่วมกับนมแพะจึงช่วยในการรักษาการมีชีวิตของโพรไบโอติกให้มีปริมาณคงเหลือมากกว่า  $10^6$  CFU/g ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกสำหรับสุนัขต่อไป

### บรรณานุกรม

1. Markowiak P, Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathog.* 2018;10(1):1-20.
2. Hotel ACP, Cordoba A. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prev.* 2001;5(1):1-10.
3. Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;334(1):1-15.
4. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release.* 2012;162(1):56-67.
5. Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(6):3060-7.
6. Jin L, Ho Y, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol.* 1998;27(3):183-5.
7. Tokatlı M, Gülgör G, Bağder Elmacı S, Arslankoz İşleyen N, Özçelik F. *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
8. Šušković J, Kos B, Matošić S, Besendorfer V. The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World J Microbiol Biotechnol.* 2000;16(7):673-8.
9. Urdaneta V, Casadesús J. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Front Med.* 2017;4:163.
10. Maldonado-Valderrama J, Wilde P, Macierzanka A, Mackie A. The role of bile salts in digestion. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;165(1):36-46.
11. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from parmigiano reggiano cheese. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;244(1):129-37.



12. Ruiz L, Margolles A, Sánchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front Microbiol.* 2013;4:396.
13. Chateau N, Deschamps A, Sassi AH. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett Appl Microbiol.* 1994;18(1):42-4.
14. Taranto M, Fernandez Murga M, Lorca G, de Valdez GF. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J Appl Microbiol.* 2003;95(1):86-91.
15. . Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Indonesian naturally fermented milk. AIP conference proceedings; 2017: AIP Publishing LLC.
16. Garcia-Gonzalez N, Prete R, Battista N, Corsetti A. Adhesion properties of food-associated *Lactobacillus plantarum* strains on human intestinal epithelial cells and modulation of IL-8 release. *Front Microbiol.* 2018;9:2392.
17. Pogačar MŠ, Langerholc T, Mičetić-Turk D, Možina SS, Klančnik A. Effect of *Lactobacillus* spp. On adhesion, invasion, and translocation of campylobacter jejuni in chicken and pig small-intestinal epithelial cell lines. *BMC Vet Res.* 2020;16(1):1-14.
18. Wang R, Jiang L, Zhang M, Zhao L, Hao Y, Guo H, et al. The adhesion of *Lactobacillus salivarius* ren to a human intestinal epithelial cell line requires S-layer proteins. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-10.
19. Hynönen U, Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(12):5225-43.
20. Beganović J, Frece J, Kos B, Pavunc AL, Habjanić K, Šušković J. Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Leeuwenhoek.* 2011;100(1):43-53.
21. Xue C, Zhang L, Li H, Wang S, Li Q, Luo X, et al. Functionality of the S-layer proteins from *Lactobacillus* in the competitive against enteropathogens infection. *Eur Food Res Technol.* 2013;236(2):249-55.
22. Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell M, Gómez-Zavaglia A. Role of S-layer proteins

- in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015;31(12):1877-87.
23. Duary RK, Rajput YS, Batish VK, Grover S. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian J Med Res.* 2011;134(5):664.
24. Abdulla AA, Abed TA, Saeed A. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. *Microbiol.* 2014:381-91.
25. Dlamini ZC, Langa RL, Aiyegoro OA, Okoh AI. Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019;11(2):397-402.
26. Wright Av. Regulating the safety of probiotics-the european approach. *Curr Pharm Des.* 2005;11(1):17-23.
27. Authority EFS. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed-scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA J.* 2008;6(12):923.
28. Ammor MS, Flórez AB, Van Hoek AH, Clara G, Aarts HJ, Margolles A, et al. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Mol Microbiol.* 2008;14(1-3):6-15.
29. Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, et al. A novel gene, *optra*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(8):2182-90.
30. Jose NM, Bunt CR, Hussain MA. Implications of antibiotic resistance in probiotics. *Food Rev Int.* 2015;31(1):52-62.
31. Kapse N, Engineer A, Gowdaman V, Wagh S, Dhakephalkar P. Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics.* 2019;111(4):921-9.
32. Gueimonde M, Sánchez B, de Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4:202.
33. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *Bmj.*

- 1998;317(7159):657-60.
34. Authority EFS. Technical guidance-update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. EFSA J. 2008;6(7):732.
  35. Additives EPo, Feed PoSuiA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J. 2012;10(6):2740.
  36. de PMA Ribeiro M, de TF Dellias M, Tsai SM, Bolmströn A, Meinhardt LW, Bellato CdM. Utilization of the etest assay for comparative antibiotic susceptibility profiles of citrus variegated chlorosis and pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa*. Curr Microbiol. 2005;51(4):262-6.
  37. Ashraf R, Shah NP. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. Int Food Res J. 2011;18(3).
  38. liofilchem. Mic test strip [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 24]. Available from: [http://www.liofilchem.net/en/pdf/mic\\_brochure.pdf](http://www.liofilchem.net/en/pdf/mic_brochure.pdf)
  39. Li B, Zhan M, Evivie SE, Jin D, Zhao L, Chowdhury S, et al. Evaluating the safety of potential probiotic *Enterococcus durans* klds6. 0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study. Front Microbiol. 2018;9:1943.
  40. Ghattargi VC, Gaikwad MA, Meti BS, Nimonkar YS, Dixit K, Prakash O, et al. Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains. BMC Genom. 2018;19(1):1-16.
  41. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. Ann Nutr Metab. 2012;61(2):160-74.
  42. Hirshfield IN, Terzulli S, O'Byrne C. Weak organic acids: A panoply of effects on bacteria. Sci Prog. 2003;86(4):245-70.
  43. Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanić K, Matošić S. Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technol Biotechnol. 2010;48(3):296-307.
  44. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. Microb Physiol. 2007;13(4):194-9.

45. Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014;5:241.
46. Naidu A, Bidlack W, Clemens R. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (lab). *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1999;39(1):13-126.
47. Lee I-C, Tomita S, Kleerebezem M, Bron PA. The quest for probiotic effector molecules—unraveling strain specificity at the molecular level. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):61-74.
48. Denkova R, Goranov B, Teneva D, Denkova Z, Kostov G. Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: Mechanisms of interaction and methods of examination. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs.* 2017:201-12.
49. Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang Z. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* yw32. *Int J Biol Macromol.* 2015;74:119-26.
50. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients.* 2017;9(5):521.
51. Scharek L, Guth J, Filter M, Schmidt MF. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* ncimb 10415 (sf68) and *Bacillus cereus* var. Toyoi ncimb 40112 on the development of serum igg and faecal iga of sows and their piglets. *Arch Anim Nutr.* 2007;61(4):223-34.
52. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(3):202-9.
53. Patil V. Nutritionaloutlook.Com [Internet]. Connecticut: Nutritional Outlook; 2018 [cited 2021 Nov 30]. Available from: <https://www.nutritionaloutlook.com/view/probiotic-use-growing-animal-feed-and-nutrition>
54. Nikoskelainen S, Ouwehand A, Salminen S, Bylund G. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquac.* 2001;198(3-4):229-36.
55. เพชรจุล ก, เครือศรี ท. การเสริมโปรไบโอติกและอีเอ็มในอาหารต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของปลาหมอไทยที่เลี้ยงในกระชัง. *วารสารแก่นเกษตร.* 2021;44(1):29-34.

56. อยู่บริบูรณ์ ส, ชื่นชื่น ว, สำเภาลอย ฉ, ปาวะระ ธ. ผลของอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ต่อการสร้างสเปิร์มของผึ้งพันธุ์. *Journal of Science Ladkrabang*. 2021;30(1):44-54.
57. Suwan C, Chitmanat C. การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเสริมอาหารปลานิลเพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน. *Prawarun Agricultural Journal*. 2020;17(1):63-74.
58. Al-Shawi SG, Dang DS, Yousif AY, Al-Younis ZK, Najm TA, Matarneh SK. The potential use of probiotics to improve animal health, efficiency, and meat quality: A review. *Aquac*. 2020;10(10):452.
59. Musa HH, Wu S, Zhu C, Seri H, Zhu G. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J Anim Vet Adv*. 2009;8(2):313-21.
60. Böhmer B, Kramer W, Roth-Maier D. Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2006;90(7-8):309-15.
61. Mountzouris K, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult*. 2007;86(2):309-17.
62. Haddadin M, Abdulrahim S, Hashlamoun E, Robinson R. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poult*. 1996;75(4):491-4.
63. O'Mahony D, Murphy KB, MacSharry J, Boileau T, Sunvold G, Reinhart G, et al. Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium*—from gut to gut. *Vet Microbiol*. 2009;139(1-2):106-12.
64. Kumar S, Pattanaik AK, Sharma S, Jadhav SE, Dutta N, Kumar A. Probiotic potential of a *Lactobacillus* bacterium of canine faecal-origin and its impact on select gut health indices and immune response of dogs. *Probiotics Antimicrob*. 2017;9(3):262-77.
65. Silva B, Jung L, Sandes S, Alvim L, Bomfim M, Nicoli J, et al. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of

- healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef Microbes*. 2013;4(3):267-75.
66. Desai KGH, Jin Park H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry Technol*. 2005;23(7):1361-94.
67. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2012;52(4):291-311.
68. Zhu Y, Wang Z, Bai L, Deng J, Zhou Q. Biomaterial-based encapsulated probiotics for biomedical applications: Current status and future perspectives. *Mater Des*. 2021;210:110018.
69. Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):149-63.
70. Wahab SA, Ahmed M, Radwan F, Hassan R, El-Refae A. Relative permittivity and electrical conductivity of some divalent metal alginate complexes. *Mater Lett*. 1997;30(2-3):183-8.
71. Stokke BT, Draget KI, Smidsrød O, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K. Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca<sup>2+</sup> alginate gels. *Macromolecules*. 2000;33(5):1853-63.
72. Kühbeck D, Mayr J, Häring M, Hofmann M, Quignard F, Díaz DD. Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates. *New J Chem*. 2015;39(3):2306-15.
73. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng*. 2011;104(4):467-83.
74. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol*. 2000;62(1-2):47-55.
75. Li XY, Chen XG, Cha DS, Park HJ, Liu CS. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. *J Microencapsul*. 2009;26(4):315-24.
76. Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int J*

- Food Microbiol. 2009;129(1):103-5.
77. Prasanna P, Charalampopoulos D. Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. Food Biosci. 2018;21:72-9.
78. Mahmoud M, Abdallah NA, El-Shafei K, Tawfik NF, El-Sayed HS. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. Heliyon. 2020;6(3):e03541.
79. Burgain J, Scher J, Lebeer S, Vanderleyden J, Cailliez-Grimal C, Corgneau M, et al. Significance of bacterial surface molecules interactions with milk proteins to enhance microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* gg. Food Hydrocoll. 2014;41:60-70.
80. Mandal S, Puniya A, Singh K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* ncdc-298. Int Dairy J. 2006;16(10):1190-5.
81. Yeung TW, Arroyo-Maya IJ, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* Im0230 viability using calcium alginate beads. Food Funct. 2016;7(4):1797-804.
82. de Araújo Etchepare M, Nunes GL, Nicoloso BR, Barin JS, Flores EMM, de Oliveira Mello R, et al. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. LWT. 2020;117:108601.
83. Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions. J Microbiol Methods. 2004;56(1):27-35.
84. Shi L-E, Li Z-H, Li D-T, Xu M, Chen H-Y, Zhang Z-L, et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. J Food Eng. 2013;117(1):99-104.
85. Liao N, Luo B, Gao J, Li X, Zhao Z, Zhang Y, et al. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: Effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. Biotechnol Lett. 2019;41(2):263-72.
86. Gebara C, Chaves KS, Ribeiro MCE, Souza FN, Grosso CR, Gigante ML. Viability of

- Lactobacillus acidophilus* LA5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Int Food Res J.* 2013;51(2):872-8.
87. Teoh PL, Mirhosseini SH, Mustafa S, Manap MYA. Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration. *J Food Agric Environ.* 2011;9(1):69-73.
88. Wang S-Y, Ho Y-F, Chen Y-P, Chen M-J. Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefiranofaciens* m1. *Food Microbiol.* 2015;46:494-500.
89. Ilha EC, Da Silva T, Lorenz JG, de Oliveira Rocha G, Sant'Anna ES. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: Acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *Eur Food Res Technol.* 2015;240(5):977-84.
90. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, et al. Health benefits of probiotics: A review. *int sch res notices.* 2013;2013.
91. Mortazavian A, Ehsani M, Mousavi S, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer J. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Int J Dairy Technol.* 2007;60(2):123-7.
92. Zhang G, Raheem A, Zhang J, Yue M, Yan X, Wang M, et al. Evaluation of probiotic and antimicrobial potential of canine derived–lactobacilli. 2021.
93. Kerns N. The canine digestion process [Internet]. 2007 [cited 2022 January 27]. Available from: <https://www.whole-dog-journal.com/health/digestion/the-canine-digestion-process/>
94. Kiekens R, Wissocq P, Govaerts J. Lipase and bile salts in the small intestine of the dog. *Digestion.* 1971;4(5):295-308.
95. Richardson D. How long does it take a dog to digest food? [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 24]. Available from: <https://vetericyn.com/blog/how-long-does-it-take-a-dog-to-digest-food/>
96. Guillot J. Consequences of probiotics release in the intestine of animals. *Feed*



- manufacturing in the Mediterranean region Improving safety: From feed to food  
Zaragoza: CIHEAM. 2001:17-21.
97. Guo X-H, Kim J-M, Nam H-M, Park S-Y, Kim J-M. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*. 2010;16(4):321-6.
98. Schillinger U. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(8):1901-6.
99. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*. 1980;9(1):29-33.
100. Jang WJ, Choi S-Y, Lee JM, Lee GH, Hasan MT, Kong I-S. Viability of *Lactobacillus plantarum* encapsulated with poly- $\gamma$ -glutamic acid produced by *bacillus* sp. Sj-10 during freeze-drying and in an *in vitro* gastrointestinal model. *LWT*. 2019;112:108222.
101. Daeschel MA. Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms. In: Daeschel BRMA, editor. *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press; 2019. p. 57-80.
102. Yang SJ, Kim K-T, Kim TY, Paik H-D. Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju. *Foods*. 2020;9(9):1154.
103. Miller JH. Assay of  $\beta$ -galactosidase. *Experiments in molecular genetics*. 1972.
104. Li M, Wang Y, Cui H, Li Y, Sun Y, Qiu H-J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a wild boar as potential probiotics. *Front. Vet. Sci*. 2020;7:49.
105. Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Synthetic oligonucleotides. 1989.
106. Rajoka MSR, Hayat H, Sarwar S, Mehwish H, Ahmad F, Hussain N, et al. Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology*. 2018;87(1):116-26.

107. Beasley S, Manninen T, Saris P. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. J. Appl. Microbiol.. 2006;101(1):131-8.
108. Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, et al. Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. Foods. 2021;10(12):3131.
109. Screening of antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fish fermentation against pathogenic bacteria. Journal of Physics: Conference Series; 2019: IOP Publishing.
110. Falah F, Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S, Mortazavi SA, et al. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against escherichia coli causing urinary tract infection in humans. Microb. Pathog. 2019;131:246-53.
111. Sidira M, Kourkoutas Y, Kanellaki M, Charalampopoulos D. *In vitro* study on the cell adhesion ability of immobilized lactobacilli on natural supports. Int. Food Res. J. 2015;76:532-9.
112. Krausova G, Hysrlova I, Hynstova I. *In vitro* evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. Fermentation. 2019;5(4):100.
113. Dlamini ZC, Langa RL, Aiyegoro OA, Okoh AI. Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. Probiotics Antimicrob. Proteins. 2019;11(2):397-402.
114. García-Cayuela T, Korany AM, Bustos I, de Cadiñanos LPG, Requena T, Peláez C, et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. Int. Food Res. J. 2014;57:44-50.
115. Hernández-Hernández O, Muthaiyan A, Moreno FJ, Montilla A, Sanz ML, Ricke S. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. Food Microbiol. 2012;30(2):355-61.
116. Son S-H, Jeon H-L, Jeon EB, Lee N-K, Park Y-S, Kang D-K, et al. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* LN4 from kimchi: Evaluation of  $\beta$ -galactosidase and

- antioxidant activities. *LWT - Food Sci. Technol.* 2017;85:181-6.
117. Lee N-K, Kim H-W, Chang H-I, Yun C-W, Kim S-W, Kang C-W, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK181 isolated from jeotgal, a korean fermented food. *Food Sci. Biotechnol.* 2006;15(2):227-31.
118. Kedare SB, Singh R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 2011;48(4):412-22.
119. Naidu A, Bidlack W, Clemens R. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1999;39(1):13-126.
120. Kumar R, Grover S, Batish VK. Bile salt hydrolase (*bsh*) activity screening of lactobacilli: *In vitro* selection of indigenous *Lactobacillus* strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2012;4(3):162-72.
121. Barbieri F, Montanari C, Gardini F, Tabanelli G. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods.* 2019;8(1):17.
122. Cunha C, Uecker JN, Jaskulski IB, Rosolen MD, Bordini FW, Andrezza R, et al. Probiotic characterization and safety assessment of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 isolated from ricotta cheese. 2021.
123. Wanna W, Surachat K, Kaitimonchai P, Phongdara A. Evaluation of probiotic characteristics and whole genome analysis of *Pediococcus pentosaceus* MR001 for use as probiotic bacteria in shrimp aquaculture. *Sci. Rep.* 2021;11(1):18334.
124. Zhang L, Ma H, Kulyar MF-e-A, Pan H, Li K, Li A, et al. Complete genome analysis of *Lactobacillus fermentum* YLF016 and its probiotic characteristics. *Microb. Pathog.* 2022;162:105212.
125. Liu D-M, Huang Y-Y, Liang M-H. Analysis of the probiotic characteristics and adaptability of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL9010 to gastrointestinal environment by complete genome sequencing and corresponding phenotypes. *LWT.* 2022;158:113129.
126. Ramisetty BCM, Sudhakari PA. Bacterial 'grounded' prophages: Hotspots for genetic renovation and innovation. *Front. Genet.* 2019;10:65.

127. Jiang J, Yang B, Ross RP, Stanton C, Zhao J, Zhang H, et al. Comparative genomics of *Pediococcus pentosaceus* isolated from different niches reveals genetic diversity in carbohydrate metabolism and immune system. *Front. Microbiol.* 2020;11:253.
128. Alayande KA, Aiyegoro OA, Nengwekhulu TM, Katata-Seru L, Ateba CN. Integrated genome-based probiotic relevance and safety evaluation of *Lactobacillus reuteri* PNW1. *PLoS One.* 2020;15(7):e0235873.
129. Brenner S, Miller JH. *Brenner's encyclopedia of genetics.* Elsevier Science; 2014.
130. Tóth AG, Csabai I, Judge MF, Maróti G, Becsei Á, Spisák S, et al. Mobile antimicrobial resistance genes in probiotics. *Antibiotics.* 2021;10(11):1287.
131. Colautti A, Arnoldi M, Comi G, Iacumin L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: Something to carefully consider. *Food Microbiol.* 2022;103:103934.
132. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. Vfdb 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D687-D92.
133. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* 2003;13(1):3-13.
134. Prasanna P, Charalampopoulos D. Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. *Food Biosci.* 2018;21:72-9.
135. Dikit P, Maneerat S. Survival of encapsulated potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* D6SM3 with bioemulsifier derived from spent yeast in simulated gastrointestinal conditions. *Warasan Songkhla Nakharin.* 2015;37(4).
136. Shoaie F, Heshmati A, Mahjub R, Garmakhany AD, Taheri M. The assessment of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* survivability in rose petal jam and the changes in physicochemical, textural and sensorial characteristics of the product during storage. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1-13.
137. Mao L, Pan Q, Yuan F, Gao Y. Formation of soy protein isolate-carrageenan complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization

and *in vitro* digestion. Food Chem. 2019;276:307-14.



ภาคผนวก



**ภาคผนวก ก**  
**องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

1. de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth/agar

|                                |      |           |
|--------------------------------|------|-----------|
| Peptone                        | 10   | กรัม      |
| Meat extract                   | 8    | กรัม      |
| Yeast extract                  | 4    | กรัม      |
| D(+)-glucose                   | 20   | กรัม      |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 2    | กรัม      |
| Sodium acetate trihydrate      | 5    | กรัม      |
| Triammonium citrate            | 2    | กรัม      |
| Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2  | กรัม      |
| Manganese sulfate tetrahydrate | 0.05 | กรัม      |
| Tween 80                       | 1    | มิลลิลิตร |
| Agar (สำหรับ MRS agar)         | 15   | กรัม      |

นำองค์ประกอบของอาหารต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร หลังจากนั้นคนให้ส่วนผสมเข้ากัน และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. MRS agar ที่เติม calcium carbonate

องค์ประกอบของ MRS agar ที่แสดงในข้อ 1 จะถูกเติมด้วย calcium carbonate 3 กรัม จากนั้นละลายในน้ำกลั่น นำไปต้มให้ร้อนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 3. Nutrient broth (NB)

|                             |    |      |
|-----------------------------|----|------|
| Beef extract                | 3  | กรัม |
| Peptone                     | 5  | กรัม |
| Agar (สำหรับ Nutrient agar) | 15 | กรัม |

นำองค์ประกอบของอาหารต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 5. Decarboxylase base broth

|   |      |      |
|---|------|------|
| Peptone   | 5    | กรัม |
| Yeast extract   | 3    | กรัม |
| Dextrose  | 1    | กรัม |
| Bromocresol purple  | 0.02 | กรัม |
| Amino acid<br>(L-arginine หรือ L-lysine หรือ L-ornithine) | 5    | กรัม |

นำองค์ประกอบของอาหารต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

### บัฟเฟอร์และสารเคมี

#### 1. Sodium alginate 2%

Sodium alginate 0.08 กรัม

นำ Sodium alginate ละลายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. Sodium alginate 2%-Goat milk

Sodium alginate 0.08 กรัม

นมแพะ 2 มิลลิลิตร

นำ Sodium alginate ละลายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมนมแพะ 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Sodium alginate 4 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และคนให้ส่วนผสมเข้ากัน

#### 3. Sodium citrate 0.05 M

Sodium citrate 1.29 กรัม

นำ Sodium citrate ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. Calcium chloride 0.5 M

Calcium chloride 5.5 กรัม

นำ Calcium chloride ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 5. NaCl 0.85 %

|      |      |      |
|------|------|------|
| NaCl | 0.85 | กรัม |
|------|------|------|

นำ NaCl ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 6. Simulated salivary juice

|   |      |      |
|---|------|------|
| 100 U $\alpha$ -Amylase from porcine pancreas | 0.77 | กรัม |
|---|------|------|

|      |      |      |
|------|------|------|
| NaCl | 0.85 | กรัม |
|------|------|------|

นำ NaCl ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองเอนไซม์  $\alpha$ -Amylase ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่สารละลาย NaCl ที่ปราศจากเชื้อแล้ว

## 7. Simulated gastric juice

|      |      |      |
|------|------|------|
| NaCl | 0.85 | กรัม |
|------|------|------|

|        |     |      |
|--------|-----|------|
| Pepsin | 0.3 | กรัม |
|--------|-----|------|

นำ NaCl ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองเอนไซม์ Pepsin ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่สารละลาย NaCl ที่ปราศจากเชื้อแล้ว

## 8. Simulated intestinal juice

|      |     |      |
|------|-----|------|
| NaCl | 6.5 | กรัม |
|------|-----|------|

|     |       |      |
|-----|-------|------|
| KCl | 0.835 | กรัม |
|-----|-------|------|

|                   |      |      |
|-------------------|------|------|
| CaCl <sub>2</sub> | 0.22 | กรัม |
|-------------------|------|------|

|                    |       |      |
|--------------------|-------|------|
| NaHCO <sub>3</sub> | 1.386 | กรัม |
|--------------------|-------|------|

|           |   |      |
|-----------|---|------|
| Bile salt | 3 | กรัม |
|-----------|---|------|

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 9. 50X TAE buffer

|                     |      |           |
|---------------------|------|-----------|
| Tris-base           | 24.2 | กรัม      |
| Glacial acetic acid | 5.7  | มิลลิลิตร |
| 0.5 M EDTA (pH 8.0) | 10   | มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 10. Lysis buffer

|                       |     |           |
|-----------------------|-----|-----------|
| Tris-HCl              | 5   | มิลลิลิตร |
| 0.5 M EDTA            | 1   | มิลลิลิตร |
| Triton X-100          | 3   | มิลลิลิตร |
| Molecular-grade water | 250 | มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาผสมกัน และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 250 มิลลิลิตร ด้วย Molecular-grade water

#### 11. TE buffer

|            |       |           |
|------------|-------|-----------|
| Tris       | 1.211 | กรัม      |
| 0.5 M EDTA | 1     | มิลลิลิตร |

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 12. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%

|                        |    |      |
|------------------------|----|------|
| Sodium dodecyl sulfate | 10 | กรัม |
|------------------------|----|------|

นำมาละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร  
ด้วยน้ำปราศจากไอออน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

## 13. Z buffer

|  |      |      |
|--|------|------|
| 0.06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.08 | กรัม |
|--|------|------|

|  |      |      |
|--|------|------|
| 0.04 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.28 | กรัม |
|--|------|------|

|            |     |           |
|------------|-----|-----------|
| 0.01 M KCl | 0.5 | มิลลิลิตร |
|------------|-----|-----------|

|                         |      |           |
|-------------------------|------|-----------|
| 0.001 M $\text{MgSO}_4$ | 0.05 | มิลลิลิตร |
|-------------------------|------|-----------|

|                             |       |           |
|-----------------------------|-------|-----------|
| 0.05 M Beta-mercaptoethanol | 0.135 | มิลลิลิตร |
|-----------------------------|-------|-----------|

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาผสมกัน และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตรด้วย  
น้ำปราศจากไอออน



## ประวัติผู้เขียน

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| ชื่อ-สกุล         | งามลักษณ์ พุ่งสวาท |
| วัน เดือน ปี เกิด | 4 ธันวาคม 2540     |
| สถานที่เกิด       | สมุทรปราการ        |

