



การพัฒนาขนมอบแห้งชนิดใหม่สำหรับสุนัขที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก
DEVELOPMENT OF THE NEW DOG SNACKS IMPREGNATED WITH
PROBIOTIC BACTERIA



ญู จงหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การพัฒนาขนมอบแห้งชนิดใหม่สำหรับสุนัขที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF THE NEW DOG SNACKS IMPREGNATED WITH
PROBIOTIC BACTERIA



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

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาขนมอบแห้งชนิดใหม่สำหรับสุนัขที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก
ของ
ยู จงหาร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ) (ดร.สิรินทร์ สุนทรธรรมมาศ)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริจิ)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาขนมอบแห้งชนิดใหม่สำหรับสุนัขที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก
ผู้วิจัย	ยู จงหาร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รัชชัญจิ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่แยกได้จากมูลของสุนัข และศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกที่ดีในด้านต่าง ๆ จากนั้นนำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ดีไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์โดยนำไปเคลือบขึ้นต้นและเบคอนที่ผ่านการอบแห้งด้วยวิธีการพา โดยได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลท ได้แก่ Pom1 และ Pom5 มาศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกพบว่า เชื้อสามารถทนต่อพีเอชต่ำและเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงได้ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค สามารถเกาะกลุ่มกันเองและเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคลายพันธุ์ต่าง ๆ มีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้ดี และมีความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเมื่อนำไปประเมินความปลอดภัยพบว่า ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่สร้างเอมีน มีความไวต่อยายาปฏิชีวนะที่ทดสอบ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท Pom1 มีความคล้ายคลึงกับ *Agri lactobacillus fermenti* 99.83% และไอโซเลท Pom5 มีความคล้ายคลึงกับ *Limosilactobacillus fermentum* 100% เมื่อศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดพบว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีขนาดจีโนมอยู่ระหว่าง 2.0-2.5 ล้านคู่เบส ไม่พบบริเวณยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ไม่พบพลาสมิดและบริเวณยีนก่อโรคบนจีโนม เมื่อนำแบคทีเรียไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นขนมอบแห้งสำหรับสุนัข โดยนำไปโพรไบโอติกไปเคลือบบนขึ้นต้นและเบคอน โดยใช้ 3 สภาวะในการเคลือบ ได้แก่ การเคลือบโพรไบโอติกที่อยู่ในน้ำเปปไทน์ การเคลือบโพรไบโอติกด้วยไฮเดียมอัลจิเนต และการเคลือบโพรไบโอติกด้วยไฮเดียมอัลจิเนตและกลีเซอรอล จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยวิธีพา พบว่าชุดการทดลองที่เคลือบขึ้นต้นและเบคอนด้วยโพรไบโอติกร่วมกับอัลจิเนตและกลีเซอรอลเชื้อสามารถรอดชีวิตได้มากที่สุด ตลอดระยะเวลาการเก็บ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ยังคงรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยมีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกินมาตรฐานตลอดอายุการเก็บ นอกจากนี้ยังพบว่าการเคลือบขึ้นต้นและเบคอนด้วยโพรไบโอติกร่วมกับอัลจิเนตและกลีเซอรอลสามารถรักษาจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้มากที่สุดเมื่อสัมผัสกับสภาวะน้ำย่อยจำลอง การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า ชุดการทดลองที่เคลือบขึ้นต้นและเบคอนด้วยโพรไบโอติกร่วมกับอัลจิเนตมีการเกาะติดบนขึ้นต้นและเบคอนดีที่สุด จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถนำไปใช้ต่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกสำหรับอาหารสุนัขต่อไป

คำสำคัญ : โพรไบโอติก, ขึ้นต้นอบแห้ง, ขึ้นเบคอนอบแห้ง, การอบแห้งด้วยวิธีการพา, ขนมสุนัข



Title	DEVELOPMENT OF THE NEW DOG SNACKS IMPREGNATED WITH PROBIOTIC BACTERIA
Author	YOU CHONGHAN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Associate Professor Dr Onanong Pringsulaka
Co Advisor	Associate Professor Dr Achariya Rangsiruji

This study aimed to isolate lactic acid bacteria (LAB) with probiotic attributes from dog feces, characterized their probiotic properties, and developed as coatings for dog snacks. The isolated LAB strains, Pom1 and Pom5, were selected for probiotic potential. These isolates demonstrated resistance to low pH, tolerance to high bile salt concentrations, inhibitory effects against pathogenic bacteria, and auto- and co-aggregation. Both strains exhibited hydrophobic properties on their cell surfaces, strong adhesion to Caco-2 cells, and antioxidant activity. Safety evaluations revealed no hemolytic activity, no amine production, no sensitivity to the antibiotics in this study, and no cytotoxic effects on Vero cells. Identification of these isolates by 16S rDNA sequences showed Pom1 and Pom5 were closely related to *Agrilactobacillus fermenti* (99.83% identity) and *Limosilactobacillus fermentum* (100% identity). The genome analysis indicated sizes between 2.0-2.5 million base pairs, with no antibiotic resistance, plasmids, or virulence genes. The probiotic strains were employed in developing dry snacks for dogs by coating liver and bacon slices: coating with probiotics in peptone water, sodium alginate, and sodium alginate and glycerol, followed by conventional drying. The results showed that coating with sodium alginate and glycerol achieved the highest survival rates over a 28-day storage period at 4°C and 25°C. Additionally, these coatings maintained chemical and physical quality in accordance with recommended shelf-life and preserved probiotic viability under gastrointestinal conditions. These findings indicate that both strains exhibit strong probiotic characteristics, suggesting their potential incorporation into dried liver and bacon products coated with probiotics for canine consumption.

Keyword : Probiotics Bacon Pork liver Convectional drying Dog snacks

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาอย่างยิ่ง จากรองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์พรังสุลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.อัฉริยา รังษิรุจิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ที่ทุ่มเทให้ความช่วยเหลือ เสียสละเวลาเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ทั้งในด้านการศึกษา และการจัดทำวิจัยมาโดยตลอด อีกทั้งยังคอยตักเตือนสั่งสอน ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริวัชร ศรณียารักษ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐริกา สุวรรณาศรัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญนันท นันทวิสัย ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และดร.สิรินธร สุนทรธรรมาสน์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือการทำวิจัย และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สิรินธร สุนทรธรรมาสน์ ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัย แนะนำเทคนิคในการทำวิจัย คอยช่วยเหลือแก้ปัญหาต่าง ๆ ในระหว่างการทำวิจัย และให้กำลังใจตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คมวิทย์ สุรชาติ ที่ได้สละเวลาช่วยสอนและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลและการหาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรีย

ท้ายที่สุด ข้าพเจ้าขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนเป็นกำลังใจมาโดยตลอด และขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับมิตรภาพที่ดี กำลังใจ และความช่วยเหลือทุก ๆ ด้าน และขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ข้าพเจ้าขอบพระคุณอย่างสุดซึ้ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	20
ภูมิหลัง	20
ขอบเขตการศึกษาวิจัย	22
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	22
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
1. โพรไบโอติก	23
1.1 คำจำกัดความของโพรไบโอติก	23
1.2 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติก	23
1.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติก	24
1.3.1 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเกลือแร่ในกระเพาะอาหาร	25
1.3.2 ความสามารถในการเกาะติดลำไส้	26
1.3.2.1 โปรตีน Surface-layer	26
1.3.2.2 การทดสอบพื้นผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ.....	27
1.3.2.3 การเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน.....	27
1.3.2.4 การเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน	28

1.3.3 การยับยั้งเชื้อก่อโรค	28
1.3.3.1 กรดอินทรีย์	29
1.3.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	29
1.3.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์	29
1.3.3.4 แบคทีเรียอิน	30
1.4 การประเมินความปลอดภัย.....	30
1.4.1 ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ	30
1.4.2 การสร้างเอมีน	31
1.4.3 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง.....	31
1.4.4 การประเมินความปลอดภัยโดยใช้เทคนิค whole genome sequencing	31
2. ประโยชน์ของไฟโรไบโอติก.....	32
2.1 การส่งเสริมและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย	32
2.2 การป้องกันการเกิดมะเร็ง.....	33
2.3 การลดภาวะร่างกายไม่สามารถย่อยหรือไม่ทนต่อน้ำตาลแล็กโทส	33
2.4 การสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย	33
2.5 ช่วยปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย	34
3. การนำไฟโรไบโอติกไปใช้ในสัตว์.....	34
3.1 การนำไฟโรไบโอติกมาใช้ในสุนัข.....	34
3.1.1 ระบบทางเดินอาหารสุนัข	35
3.1.1.1 ปาก.....	35
3.1.1.2 กระเพาะอาหาร.....	35
3.1.1.3 ลำไส้	36
3.2 การนำไฟโรไบโอติกมาใช้ในสุกร	36

3.3 การนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์ปีก	37
3.4 การนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง	37
4. กระบวนการทำแห้ง.....	38
4.1 การทำแห้งแบบวิธีการพา	38
4.2 การทำแห้งแบบสุญญากาศ	39
4.3 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	39
5. ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก	40
6. การตรึงและการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกในอาหาร	40
6.1 ไมโครเอนแคปซูเลชัน	41
6.2 การเคลือบอาหารด้วยฟิล์มบิโอบาค์ที่มีโพรไบโอติก.....	42
7. ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของโพรไบโอติกในอาหาร	42
7.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก.....	43
7.2 ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร	43
7.3 Molecular oxygen	43
7.4 การแช่แข็งและการห่อหุ้มละลายอาหาร	44
7.5 วัสดุและสภาวะที่ใช้ผลิตบรรจุภัณฑ์	44
7.6 ค่าปริมาณน้ำอิสระ	44
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	46
1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	46
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี.....	47
3. วัสดุดิบ	47
4. Molecular marker	47
5. อุปกรณ์เพิ่มเติม	47

6. วิธีดำเนินการทดลอง	48
6.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก	48
6.2 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA.....	48
6.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก	49
6.3.1 การศึกษาความสามารถในการทนกรด	49
6.3.2 การศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดี.....	50
6.3.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค	50
6.3.4 การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ	51
6.3.5 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน	51
6.3.6 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน.....	52
6.3.7 การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของโพรไบโอติกกับเซลล์ Caco-2 ..	52
6.3.7.1 การเตรียมเซลล์ Caco-2	52
6.3.7.2 การศึกษาความสามารถการยึดเกาะของโพรไบโอติกกับเซลล์ Caco-2	53
6.3.8 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง	54
6.3.9 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase	54
6.3.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านสารอนุมูลอิสระ	54
6.3.11 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero.....	55
6.3.11.1การเตรียม เซลล์ Vero.....	55
6.3.11.2 การสกัดสารจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	55
6.3.11.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay	55
6.3.12 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Epsilonometer test (E-test)	56
6.3.13 การศึกษาความสามารถในการสร้างเอมีน	56

6.3.14 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing	57
6.3.14.1 การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียกรดแลคติก.....	57
6.3.14.2 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดเพื่อศึกษายีนต่าง ๆ ในโพรไบโอติกแบคทีเรีย	58
6.4 การผลิตผลิตภัณฑ์ขึ้นเบคอนและขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก.....	58
6.4.1 การเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติก	58
6.4.2 การเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติก.....	58
6.4.3 การเคลือบขึ้นเบคอนและขึ้นดับด้วยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก	59
6.4.4 การทำแห้งขึ้นเบคอนและขึ้นดับที่เคลือบด้วยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก.....	59
6.4.5 การเคลือบแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในขึ้นเบคอนและขึ้นดับด้วยอัลจินต	59
6.4.5.1 การเคลือบแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในขึ้นเบคอนและขึ้นดับด้วยอัลจินตเพียงอย่างเดียว	59
6.4.5.2 การเคลือบแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในขึ้นเบคอนและขึ้นดับด้วยอัลจินตร่วมกับกลีเซอรอล.....	60
6.4.6 การตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์และการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ	60
6.4.6.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์	60
6.4.6.1.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบสำหรับตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์.....	60
6.4.6.1.2 การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก	61
6.4.6.1.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด	61
6.4.6.1.4 การตรวจนับเชื้อยีสต์และรา	61

6.4.6.1.5 การตรวจนับปริมาณเชื้อ <i>Salmonella</i> sp.	61
6.4.6.2 การวัดค่า pH, water activity (Aw) และความชื้น	62
6.4.6.3 การวัดสี	62
6.4.7 การศึกษาการอยู่รอดของโพรไบโอติกในชั้นเบคอนและชั้นดับอบแห้งต่อ สภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลอง	62
6.4.7.1 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในปากจำลอง	62
6.4.7.2 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะจำลอง	63
6.4.7.3 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลอง	63
6.4.7.4 การอยู่รอดของเชื้อในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง	63
6.4.8 การศึกษาการเกาะติดบนพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด	64
6.5 การทดสอบทางสถิติ.....	64
บทที่ 4 ผลการศึกษา	65
1. การตัดแยกและการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียกรด แลคติก ที่แยกได้.....	65
2. การจัดจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA	66
4. การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือก.....	67
4.1 การตรวจสอบการสร้างเอมีน.....	67
4.2 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	67
4.3 การศึกษาความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ไลน์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay	68
4.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test.....	68
5. การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกโดยวิธี next generation sequencing	71

5.1 ผลการจัดจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรีย.....	71
5.2 การสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือก	71
5.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะจากลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก	73
6. ระยะเวลาในการอบขึ้นดับและเบคอนที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก.....	75
7. การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในขึ้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์.....	77
7.1 การนับจำนวนของโพรไบโอติก	77
7.1.1 การนับจำนวนโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	77
7.1.2 การนับจำนวนโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	77
7.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด	80
7.2.1 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	80
7.2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	80
7.3 การนับจำนวนยีสต์ ราและเชื้อ <i>Salmonella</i> ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	81
8. การวัดค่า a_w ในขึ้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก	84
8.1 การวัดค่า a_w ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	84
8.2 การวัดค่า a_w ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน.....	84
9. การวัดค่าความชื้นในขึ้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก	87
9.1 การวัดค่าความชื้นในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน..	87

9.2 การวัดค่าความชื้นในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน	87
10. การวัดค่า pH ในขั้นตอนและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยไฟโรโบอิติก.....	90
10.1 การวัดค่า pH ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน	90
10.2 การวัดค่า pH ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน	90
11. การวัดสีในขั้นตอนและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยไฟโรโบอิติก.....	93
12. การศึกษาการอยู่รอดของไฟโรโบอิติกในขั้นตอนและเบคอนภายใต้สภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลอง	95
12.1 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร	95
12.2 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลอง.....	97
12.3 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะทางเดินอาหารจำลองแบบต่อเนื่อง	99
13. การศึกษาการเกาะติดของไฟโรโบอิติกบนพื้นผิวขั้นตอนและเบคอนอบแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	101
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	104
บรรณานุกรม	114
ภาคผนวก.....	130
ภาคผนวก ก	131
ภาคผนวก ข	133
ประวัติผู้เขียน.....	137

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 PCR mixture สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA	49
ตาราง 2 ขั้นตอนการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA	49
ตาราง 3 คุณสมบัติการเป็นไพรไบโอติกของเชื้อไอโซเลท Pom1 และไอโซเลท Pom5	65
ตาราง 4 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลท Pom1 และ Pom5	67
ตาราง 5 กิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียไพรไบโอติกที่คัดเลือก	68
ตาราง 6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไพรไบโอติกที่คัดเลือก	69
ตาราง 7 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลท Pom1 และ Pom5	71
ตาราง 8 ลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียไพรไบโอติกที่คัดเลือก	73
ตาราง 9 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในชั้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agri. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ..	82
ตาราง 10 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในชั้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agri. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ..	83
ตาราง 11 ค่า water activity (a_w) ในชั้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agri. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom 5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	85
ตาราง 12 ค่า water activity (a_w) ในชั้นดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agri. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	86
ตาราง 13 แสดงผลค่าความชื้นในผลิตภัณฑ์ดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agri. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	88
ตาราง 14 แสดงผลค่าความชื้นในผลิตภัณฑ์ดับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agri. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	89

ตาราง 15 ค่า pH ในชั้นตับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agril. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom 5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	91
ตาราง 16 ค่า pH ในชั้นตับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย <i>Agril. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom 5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	92
ตาราง 17 แสดงการวัดสีของเบคอนและตับอบแห้งที่เคลือบด้วยด้วย <i>Agril. fermenti</i> Pom1 และ <i>Lim. fermentum</i> Pom 5	94



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 หลักเกณฑ์การคัดเลือกโพรไบโอติก และคุณลักษณะที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ งานในผลิตภัณฑ์อาหาร ⁽¹⁴⁾	24
ภาพประกอบ 2 แผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่คัดเลือก ได้ โดยตัวเลขที่ node แสดงระดับความเชื่อมั่น bootstrap (%) จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง และ scale bar แสดงอัตราการถูกแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์	72
ภาพประกอบ 3 แผนที่จีโนมของเชื้อ <i>Agil. fermenti</i> Pom1 (ซ้าย) และ <i>Lim. fermentum</i> Pom5 (ขวา) โดยวงที่ 1 และ 2 ลูกศรสีส้มแสดงทิศทางบนเส้น forward และ reverse strand วงที่ 3 คือ GC skew วงที่ 4 คือ GC content วงที่ 5 ด้านในสุดคือตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสีแดง ละตำแหน่งในแผนที่คือ tRNA และ rRNA	74
ภาพประกอบ 4 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลา 8 วัน	76
ภาพประกอบ 5 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งในระหว่างการ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน	78
ภาพประกอบ 6 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งในระหว่างการ เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน	79
ภาพประกอบ 7 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งต่อสภาวะใน กระเพาะจำลอง pH 2	96
ภาพประกอบ 8 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งต่อสภาวะน้ำย่อย ในลำไส้จำลอง	98
ภาพประกอบ 9 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งต่อสภาวะ ทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง	100
ภาพประกอบ 10 ภาพลักษณะผลิตภัณฑ์ของเบคอนและตับอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก .	101

ภาพประกอบ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพื้นผิวดัดบอบแห้งที่เคลือบด้วย a) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated, b) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated-SA และ c) *Lim. fermentum* Pom5 ในชุดการทดลอง Coated-SA-G ภาพด้านซ้ายแสดงที่กำลังขยาย 1,000 เท่าและภาพด้านขวาแสดงที่กำลังขยาย 5,000 เท่า ... 102

ภาพประกอบ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพื้นผิวเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย a) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated, b) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated-SA และ c) *Lim. fermentum* Pom5 ในชุดการทดลอง Coated-SA-G ภาพด้านซ้ายแสดงที่กำลังขยาย 1,000 เท่าและภาพด้านขวาแสดงที่กำลังขยาย 5,000 เท่า ... 103



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันสัตว์เลี้ยงทั่วโลกมีจำนวนหลายล้านตัว จึงทำให้อุตสาหกรรมอาหารสัตว์เลี้ยงมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นโดยเน้นหนักไปที่ความต้องการสารอาหารที่ครบถ้วนของสัตว์เลี้ยง โดยสัตว์เลี้ยงจะไม่มีอิสระในการบริโภคอาหาร ทั้งนี้สุนัขและแมวอาจได้รับอาหารที่คล้ายคลึงกับมนุษย์เนื่องจากการให้ของเจ้าของซึ่งจะเป็นผู้ตัดสินใจว่าสัตว์เลี้ยงเหล่านั้นชอบหรือไม่ชอบ⁽¹⁾ นอกจากนี้เจ้าของยังนิยมซื้ออาหารสัตว์แบบแห้งเนื่องจากมีอายุการเก็บที่ยาวนาน มีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอ และมีราคาถูก⁽²⁾ ซึ่งนอกจากอาหารแล้ว ผลิตภัณฑ์ประเภทนมสุนัขยังได้รับความนิยมจากผู้เลี้ยงเช่นเดียวกัน โดยมักจะให้เป็นรางวัลเมื่อสุนัขปฏิบัติตามคำสั่ง อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ประเภทนมเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกยังมีรายงานไม่มากนักทั่วโลก และผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกทั้งหมดถูกออกแบบมาเพื่อใช้ในมนุษย์และสัตว์จำพวกโคกระบือ และมีการศึกษาน้อยมากที่แยกโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของสุนัข

โพรไบโอติก หมายถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อรับประทานในปริมาณที่เพียงพอจะส่งผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์^(3, 4) การใช้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในสุนัขหรือสัตว์เลี้ยงนอกจากจะช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้แล้ว ยังช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้แก่สุนัข ส่งผลให้สุนัขมีสุขภาพที่ดีและมีอายุยืนยาว การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาใช้จริงนั้นต้องแยกจากทางเดินอาหารสัตว์ที่มีสุขภาพดี มีความปลอดภัยหรือมีประวัติในการนำไปใช้ทางการค้า สามารถจัดจำแนกหรือระบุสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง ไม่มีข้อมูลว่าสามารถก่อโรคได้ ไม่มีผลข้างเคียงต่อโฮสต์ รวมทั้งไม่มียีนที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่สามารถถ่ายทอดได้ นอกจากนี้คุณสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์แล้ว แบคทีเรียโพรไบโอติกจะต้องสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นในลำไส้ในการเข้าเกาะ มีความสามารถในการสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของสุนัข ตลอดจนต้องทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิตทางการค้า ความแห้งและสภาวะทางกายภาพอื่นในระหว่างการเก็บรักษา เพื่อให้โพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารและไปถึงที่ลำไส้ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายในปริมาณที่เพียงพอเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ให้แก่สุนัข

การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารอบแห้งประเภทขนมให้สุนัขในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการทำแห้ง (drying) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ในการถนอมอาหารและยาสมุนไพรที่ใช้มาแต่โบราณ โดยเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก เนื่องจากใช้เพียงแสงแดดในการทำแห้ง ในปัจจุบันได้มีการใช้อุปกรณ์หลายชนิดและมีการศึกษาถึงปัจจัยและขั้นตอนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำแห้ง เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสมและให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ เทคนิคในการทำแห้งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายได้แก่ กระบวนการทำแห้งที่ใช้วิธีการพา (convective drying; CD) กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying; FD) กระบวนการทำแห้งแบบสเปรย์ (spray drying; SD) กระบวนการทำแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum drying) กระบวนการการทำแห้งด้วยวิธีออสโมซิส (osmotic dehydration; OD) เป็นต้น ซึ่งการทำแห้งโดยวิธีการพา เป็นกระบวนการที่นำมาใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก สามารถใช้เครื่องมือที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ และเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในโรงงานอุตสาหกรรมทำแห้งในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ การทำแห้งโดยวิธีการพานี้ ผลิตภัณฑ์จะถูกให้ความร้อนโดยความร้อนแห้ง (hot air) ดังนั้นความชื้นในผลิตภัณฑ์จะสูญเสียไป โดยทั่วไปอาหารต่าง ๆ ที่ถูกทำให้แห้งจะต้องลดความชื้นประมาณ 10-15 % ลงจากความชื้นเริ่มต้น ซึ่งจะช่วยให้จุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียเจริญไม่ได้ การทำแห้งจึงถือเป็นวิธีที่จำเป็นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื่องจากจะทำให้เก็บผลิตภัณฑ์ได้ยาวนานขึ้นและง่ายต่อการขนส่งจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง⁽⁵⁾

อย่างไรก็ตามเพื่อให้โปรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารและไปถึงที่ลำไส้ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายในปริมาณที่เพียงพอเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ให้แก่สุนัข นอกจากการทำแห้งโดยวิธีการพาที่นิยมใช้กันแล้ว ยังมีวิธีการอื่น ๆ เช่น การห่อหุ้มในเมทริกซ์ (encapsulation) หรือการใช้วิธีการตรึงเซลล์ (immobilization) เพื่อช่วยให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตได้มากขึ้นเมื่อไปถึงลำไส้^(6, 7) ซึ่งการห่อหุ้มในเมทริกซ์ที่นิยมใช้จะเตรียมสารไฮโดรคอลลอยด์จากแป้ง (starch) อัลจิเนต (alginate) คาราจีแนน (carrageenan) และไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น โดยไฮโดรคอลลอยด์จะเคลือบที่บริเวณผิวของอาหารเกิดลักษณะเป็นฟิล์มเกิดขึ้น^(8, 9) ซึ่งการเคลือบชั้นผลิตภัณฑ์ด้วยไฮโดรคอลลอยด์ที่ผสมแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกนั้นนอกจากจะช่วยในการพัฒนาอาหารเสริมที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของสุนัขแล้วยังสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากมูลของสุนัข และศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกที่ดีในด้านต่าง ๆ และนำแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีคุณสมบัติที่ดีไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์โดยนำไปเคลือบขึ้นตัวและเบคอนที่ผ่านการอบแห้งด้วยวิธีการพา รวมทั้งศึกษาการเคลือบด้วยโปรไบโอติกที่ผสมกับไฮโดร

คอลลอยด์ชนิดอัลจินตเพื่อปกป้องเซลล์โพรไบโอติกก่อนที่จะนำไปทำแห้งด้วยวิธีการพา จากนั้นนำขึ้นดับและเบคอนที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกและโพรไบโอติกที่ผสมกับไฮโดรคอลลอยด์ชนิดอัลจินตมาทดสอบการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลอง และทดสอบความปลอดภัยโดยทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ รวมถึงการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing เพื่อค้นหายีนที่ก่อโรค หรือยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ รวมถึงศึกษาลักษณะการเกาะติดของโพรไบโอติกบนพื้นผิวตับและเบคอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งผลที่ได้จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นขนมสุนัขในทางการค้าต่อไป

ขอบเขตการศึกษาวิจัย

1. การศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกที่ดีในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การศึกษาความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของโพรไบโอติกกับเซลล์ Caco-2 และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test
2. การศึกษาจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติก
3. การผลิตขึ้นเบคอนและขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก รวมทั้งการเคลือบด้วยโพรไบโอติกที่ผสมกับไฮโดรคอลลอยด์ชนิดอัลจินตก่อนที่จะนำไปทำแห้งด้วยวิธีการพา และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปศึกษาการอยู่รอดของโพรไบโอติกในสภาวะของระบบทางเดินอาหารจำลอง
4. การศึกษาการเกาะติดของโพรไบโอติกบนพื้นผิวตับและเบคอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก คือสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค มีความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี มีคุณสมบัติพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ และมีความปลอดภัยสำหรับนำไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ขึ้นเบคอนและขึ้นดับอบแห้งเคลือบโพรไบโอติกเพื่อส่งเสริมสุขภาพสุนัข และเมื่อนำมาเคลือบบนขึ้นดับและเบคอนแล้วเชื้อสามารถอยู่รอดได้ในระหว่างการเก็บ และสามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โพรไบโอติก

1.1 คำจำกัดความของโพรไบโอติก

คำว่า “โพรไบโอติก” มาจากรากศัพท์ภาษากรีกมีความหมายว่า “สำหรับชีวิต” ซึ่งเป็นคำที่ใช้กำหนดความหมายของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ไม่ก่อโรคและเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลดีต่อโฮสต์ (host)⁽¹⁰⁾ โดยโพรไบโอติกถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 โดย Lilley และ Stillwell ซึ่งได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โพรไบโอติก คือ ผลิตภัณฑ์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง⁽¹¹⁾

Fuller ได้ให้คำจำกัดความเพิ่มเติมว่า โพรไบโอติกคือ จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคซึ่งเมื่อรับประทานเข้าไปจะส่งผลดีต่อสุขภาพหรือสรีรวิทยาของโฮสต์⁽¹²⁾

คำจำกัดความของโพรไบโอติกที่ใช้ในปัจจุบัน ถูกกำหนดโดยองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ และองค์การอนามัยโลก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสม จะส่งผลดีต่อสุขภาพโฮสต์⁽¹³⁾

1.2 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติก

ก่อนนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์เพื่อใช้ในการส่งเสริมสุขภาพของคนและสัตว์จะต้องมีเกณฑ์การคัดเลือก และสิ่งสำคัญคือความปลอดภัยของโพรไบโอติกเมื่อนำไปใช้ โดยหลักเกณฑ์การคัดเลือกโพรไบโอติกตามทฤษฎีเบื้องต้น และลักษณะที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้งานในผลิตภัณฑ์อาหาร แสดงรายละเอียดดังภาพประกอบ 1 โดยมีแนวทางหลัก ๆ ดังนี้

1) สามารถอาศัยอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ที่นำมาใช้ การที่โพรไบโอติกจะให้ผลที่เป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ได้นั้นจะต้องสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้ และสามารถทนกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีนของกระเพาะอาหารได้

2) การพิจารณาด้านความปลอดภัย ได้แก่ เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีประวัติการก่อโรค โดยจะต้องผ่านการคัดเลือกว่ามีความปลอดภัย ไม่สร้างสารพิษ และไม่มีความสามารถในการถ่ายยีนต้านยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียอื่น ๆ

3) มีปริมาณเพียงพอที่จะส่งผลดีต่อสุขภาพ (10^7 ถึง 10^9 cfu/ml ของผลิตภัณฑ์อาหาร)

4) สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยโพรไบโอติกหลายชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์และสารเมตาบอไลต์ ได้แก่ lactic acid และ acetic acid เป็นต้น

5) การยึดเกาะกับพื้นผิวของลำไส้ ความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้ นั้นเป็น การหลักเกณฑ์สำคัญในการคัดเลือกโพรไบโอติก ซึ่งการยึดเกาะกับลำไส้ของโพรไบโอติกนั้นจะ ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้ามาเกาะติดบริเวณทางเดินอาหารและยังสามารถช่วยส่งเสริมระบบ ภูมิคุ้มกันได้



ภาพประกอบ 1 หลักเกณฑ์การคัดเลือกโพรไบโอติก และคุณลักษณะที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้งานในผลิตภัณฑ์อาหาร⁽¹⁴⁾

1.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกที่นำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ในอาหารและยาจะต้องมีลักษณะเฉพาะ โดยสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร และความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ที่สำคัญโพรไบโอติกต้องคงไว้ซึ่งลักษณะเฉพาะที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบความเสถียรของคุณลักษณะเหล่านี้ในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารและการเก็บรักษา โดยโพรไบโอติกที่นำมาเสริมในอาหารต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้⁽¹⁵⁾

1.3.1 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเกลือแร่ในกระเพาะอาหาร

โพรไบโอติกจะสามารถส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์ได้นั้นจำเป็นต้องสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้ และต้องมีปริมาณเพียงพอที่จะไปถึงลำไส้ใหญ่ ดังนั้นโพรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะกรดและเกลือแร่ เนื่องจากเมื่อประทานอาหารที่ผสมโพรไบโอติกเข้าไปอาหารนั้นจะต้องผ่านกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดและลำไส้ซึ่งมีการหลั่งน้ำย่อยออกมาซึ่งมีผลทำให้จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกลดลง โดยความสามารถในการอยู่รอดของโพรไบโอติกในทางเดินอาหารแต่ละส่วนจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ บางสายพันธุ์ตายอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในกระเพาะอาหาร ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม bifidobacteria สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ตลอดระบบทางเดินอาหาร ซึ่งค่า pH กระเพาะอาหารมีค่าอยู่ที่ 1.2- 2.5⁽¹⁶⁾ ดังนั้นความสามารถในการทนกรดจึงเป็นหนึ่งในคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกสายพันธุ์โพรไบโอติก⁽¹⁷⁾ และอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของโพรไบโอติกคือต้องสามารถทนต่อเกลือแร่ เนื่องจากเป็นตัวกำหนดความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้เล็ก โดยเกลือแร่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับจากคอเลสเตอรอล และหลังจากถูกน้ำดีไปยังลำไส้เล็กส่วนต้น (500-700 มิลลิกรัม/วัน) ซึ่งช่วยในการย่อยสลายอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์⁽¹⁸⁾ โดยความเข้มข้นของเกลือแร่ที่ล้นไปยังลำไส้เล็กจะอยู่ในช่วงร้อยละ 1.5.- 2.0% ในช่วงแรกของทางเดินอาหาร จากนั้นความเข้มข้นของเกลือแร่จะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 0.3% ซึ่งเกลือแร่มีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยทำให้ผนังเซลล์ยอมให้สารซึมผ่านเข้าออกได้และมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างในส่วนไขมันทำให้โครงสร้างส่วนเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการบิดเบี้ยวผิดรูป และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบคทีเรียในที่สุด⁽¹⁹⁾ มีรายงานว่าเชื้อโพรไบโอติกในกลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria สามารถปรับตัวให้ทนต่อเกลือแร่ได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของเกลือแร่ โดยโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อเกลือแร่ได้มักจะทนต่อสภาวะเครียดอื่น ๆ ได้ด้วย (cross-resistance) เช่น ทนต่อสภาวะความเป็นกรดที่สูง และการทนต่อความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร เป็นต้น สิ่งนี้แสดงให้เห็นถึงกลไกทั่วไปของแบคทีเรียในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความเครียดต่าง ๆ และแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปรับตัวที่ดีของโพรไบโอติกในทางเดินอาหารซึ่งช่วยให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้⁽²⁰⁾ จากการรายงานของ Mohammad และคณะ (2017)⁽²¹⁾ ที่ได้ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากมูลสุนัขในสภาวะที่เป็นกรดที่ pH 2, 3 และ 6.5 พบว่าเชื้อ 20 ไอโซเลทจาก 28 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่ pH 2 และ 3 ในขณะที่ไอโซเลทอื่น ๆ มีการเจริญ

ต่ำมาก และพบว่าเชื้อทั้ง 20 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในเกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15% และเชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลื่อน้ำดีที่ 0.3 และ 1%

1.3.2 ความสามารถในการเกาะติดลำไส้

คุณสมบัติที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของโพรไบโอติก คือความสามารถในการเกาะติดกับพื้นผิวของลำไส้ โดยการเกาะติดกับเยื่อเมือกจะช่วยยืดระยะเวลาให้โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ ความสามารถในการเกาะติดกับพื้นผิวลำไส้ของโพรไบโอติกจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโพรไบโอติกแต่ละชนิด⁽²²⁾ นอกจากนี้การยึดเกาะของโพรไบโอติกในลำไส้ยังมีบทบาทสำคัญในการรักษาเยื่อเมือกที่เสียหาย และสามารถป้องกันการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้⁽²³⁾ โดยปัจจัยที่ทำให้โพรไบโอติกสามารถยึดเกาะกับเซลล์ลำไส้มีดังนี้

1.3.2.1 โปรตีน Surface-layer

โปรตีน Surface-layer หรือ S-layer ประกอบด้วยไกลโคโปรตีน หรือเรียกว่า S-protein มีมวลโมเลกุลระหว่าง 40 ถึง 200 kDa ซึ่งโปรตีนมีลักษณะเป็น 2 มิติ อยู่ชั้นนอกของเซลล์แบคทีเรีย⁽²⁴⁾ สามารถพบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งจะช่วยให้เกิดการเกาะติดกับเยื่อเมือก (epithelial cells) และเมือก (mucus) หรือโปรตีนที่ถูกสร้างออกมาอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (extracellular matrix; ECM proteins) มีการรายงานไว้ว่า โปรตีน S-layer พบได้ในจีโนม *Lactobacillus* และมีบทบาทสำคัญในการเกาะติดกับเซลล์ของลำไส้⁽²⁵⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Frece และคณะ (2004)⁽²⁶⁾ ได้ศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน S-layer ของโพรไบโอติก *L. acidophilus* M92 ในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อเมือกของลำไส้หนูทดลอง โดยตรวจสอบขนาดของโปรตีน S-layer ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบยีน *slpA* gene ที่สร้างโปรตีน S-layer ด้วยวิธี Southern blot รวมถึงศึกษาการเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ของหนูโดยเปรียบเทียบระหว่าง *L. acidophilus* M92 ที่ไม่มีโปรตีน S-layer กับ *L. acidophilus* M92 ที่มีโปรตีน S-layer ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เชื้อโพรไบโอติกที่มี *slpA* gene มีการแสดงออกของ S-layer โปรตีน โดยมีมวลโมเลกุลขนาด 45 kDa และเมื่อนำโปรตีน S-layer ออกจะลดการยึดเกาะของ *L. acidophilus* M92 กับเซลล์เยื่อเมือกของหนู นอกจากนี้การรอดชีวิตของเซลล์ที่ไม่มีโปรตีน S-layer จะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองที่ช่วง pH 2, 2.5 และ 3 และการรอดชีวิตลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะลำไส้จำลอง (simulated pancreatic juice และ bile salts ความเข้มข้น 1.5 และ 3 g/l) นอกจากนี้โปรตีน S-layer ของ *L. acidophilus* M92 สามารถทำให้เชื้อทนต่อ pepsin และ pancreatin แต่ไม่ทนต่อ proteinase K

1.3.2.2 การทดสอบพื้นผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ

การทดสอบพื้นผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ หรือ cell surface hydrophobicity เป็นการทดสอบคุณสมบัติการเกาะติดของเซลล์โพรไบโอติกเบื้องต้นก่อนการทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างแรกในการเกาะติดระหว่างเซลล์แบคทีเรียและโฮสต์⁽²⁷⁾ โดยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของไขมันที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ ซึ่งถ้ามีองค์ประกอบของไขมันมากก็จะทำให้เซลล์มีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำมาก⁽²⁸⁾ โดยวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ของโพรไบโอติกคือวิธี MATH (Microbial adhesion to hydrocarbons)⁽²⁹⁾ หรือการทดสอบสารไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียและเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการเกาะกับพื้นผิวของลำไส้ จึงนิยมนำมาใช้วัดความสามารถในการเกาะติดของโพรไบโอติก จากการรายงานของ Bhagya และคณะ (2018)⁽³⁰⁾ ได้ทดสอบคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของโพรไบโอติกที่แยกได้จากนมแม่ โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารไฮโดรคาร์บอน คือ xylene จากการทดลองพบว่าเชื้อ 4 โยไซเลทแสดงค่า % cell surface hydrophobicity น้อยกว่า 50% และเชื้อ 3 โยไซเลท ได้แก่ *L. plantarum* CKR5, *L. plantarum* CKR8 และ *L. plantarum* CKR22 แสดงค่า % cell surface hydrophobicity ที่สูง คือ 65%, 67% และ 74% ตามลำดับ โดยเชื้อ *L. plantarum* CKR28 แสดงค่าสูงสุด คือ 76% ซึ่งสอดคล้องกับผลความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งของลำไส้ Caco-2 cell line จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า % cell surface hydrophobicity ที่สูง จะทำให้ความสามารถในการยึดเกาะในลำไส้ที่สูง อย่างไรก็ตามความสามารถในการยึดเกาะอาจมาจากอิทธิพลอื่น ๆ อีกด้วย เช่น ประจุและโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์

1.3.2.3 การเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน

การเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน หรือ auto-aggregation ของโพรไบโอติกมีความสำคัญต่อการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวของลำไส้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของโพรไบโอติกในการตั้งรกราก (colonization) และการคงอยู่ของโพรไบโอติกในทางเดินอาหาร⁽³¹⁾ โดย auto-aggregation จะอาศัยลักษณะทางเฉพาะทางฟิสิกส์เคมีของผิวเซลล์ เช่น ความไม่ชอบน้ำ ซึ่งจะส่งผลให้แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวต่าง ๆ ได้ดีอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์บางส่วน และโปรตีน S-layer protein ของเชื้อโพรไบโอติกจีแนส *Lactobacillus* อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกาะติดเช่นกัน⁽³¹⁾ Topçu และคณะ (2020)⁽²⁷⁾ ได้ศึกษา cell surface hydrophobicity และ auto-aggregation ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จาก Pastirma จากการทดลองพบว่า ค่า % cell surface

hydrophobicity, % auto-aggregation และ ที่สูงที่สุดพบในเชื้อ *P. pentosaceus* K44 strain ซึ่งจากผลดังกล่าวสามารถพิจารณาได้ว่าเชื้อดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้⁽³²⁾ และสอดคล้องจากการรายงานผลการศึกษานอื่น ๆ มีการรายงานว่าคุณสมบัติ cell surface hydrophobicity และ auto-aggregation ของโพรไบโอติกนอกจากจะช่วยในการเกาะติดกับพื้นผิวของลำไส้แล้วยังสามารถป้องกันการเข้าเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ได้อีกด้วย

1.3.2.4 การเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน

การเกาะกลุ่มกันเองระหว่างเซลล์แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน หรือ co-aggregation จะมุ่งเน้นไปที่ปฏิสัมพันธ์ของโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรค⁽³³⁾ ซึ่งความสามารถดังกล่าวจะกีดขวางและป้องกันการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้⁽³⁴⁾ โดยจากการศึกษาของ Choi และคณะ (2018)⁽³⁵⁾ ได้ศึกษาความสามารถในการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน และศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน พบว่า % co-aggregation ที่สูงที่สุดพบในชุดการทดลองระหว่างเชื้อ *W. koreensis* KCCM 41517 กับ *Salmonella* Typhimurium KCTC ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกาะติดของเชื้อก่อโรคในลำไส้โดยทดสอบใน HT-29 cells พบว่าเชื้อโพรไบโอติกทุกสายพันธุ์สามารถลดการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรคใน HT-29 cells ได้ และพบว่าเชื้อ *W. koreensis* KCCM 41517 มี % auto-aggregation ที่สูงที่สุด อีกด้วย ซึ่งจากการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวสามารถพิจารณาได้ว่าเชื้อโพรไบโอติกดังกล่าวเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกได้

1.3.3 การยับยั้งเชื้อก่อโรค

เชื้อโพรไบโอติกในจีนัส *Lactobacillus* สามารถผลิต lactic acid, acetic acid, formic acid ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น นอกจากนี้ยังสามารถหลั่ง antimicrobial molecules เช่น ethanol, fatty acid, hydrogen peroxide และ bacteriocins เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดได้ เช่น *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., และ *Staphylococcus aureus*⁽³⁶⁾ ซึ่งสอดคล้องกับจากการศึกษาของ Prabhurajeshwar และคณะ (2019)⁽³⁷⁾ ซึ่งได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากโยเกิร์ตแล้วศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี agar well diffusion จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 13 ไอโซเลท แสดงผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้งหมด โดยฤทธิ์การยับยั้งจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก และพบว่าสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตออกมามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) แต่ไม่พบฤทธิ์ในการทำลาย (bactericidal) เชื้อก่อโรค ซึ่งรายละเอียดของสารที่โพรไบโอติกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นมีดังนี้

1.3.3.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ เช่น short chain fatty acids, lactic acid และ formic acid มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้จากการย่อยสลายน้ำตาล นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่ม hetero-fermentative จะสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้ผลผลิตเป็น acetic acid ด้วย⁽³⁸⁾ โดยกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคคือเมื่อกรดอินทรีย์เข้าสู่เซลล์จะเกิดการแตกตัวแล้วปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในเซลล์ จึงทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้⁽³⁹⁾ นอกจากนี้กรดอินทรีย์มีเป้าหมายหลักคือ ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เยื่อหุ้มเซลล์ และ specific metabolic functions (replication และ protein synthesis) ซึ่งนำไปสู่การรบกวนการทำงานของเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด อีกทั้งกรดอินทรีย์ยังทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค^(40, 41) จากการรายงานของ Desniar และคณะ (2020)⁽⁴²⁾ ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของชาวอินโดนีเซีย แล้วศึกษาชนิดของกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียในระหว่างการเจริญโดยใช้เทคนิค HPLC พบว่ากรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นปริมาณมากที่สุด คือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก และพบว่าเชื้อไอโซเลท SK (5) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* มากที่สุด (15 มิลลิเมตร)

1.3.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในสภาวะที่มีออกซิเจนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนโดยการทำงานของ flavoprotein oxidases หรือ NADH peroxidases⁽⁴³⁾ โดยคุณสมบัติของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คือเป็นตัวออกซิไดซ์รุนแรง มีผลต่อเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการทำลายโปรตีนและกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์จนทำให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถไปรวมตัวกับสารชนิดอื่นเกิดเป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดยจะทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็น hypothiocyanite เป็นผลิตภัณฑ์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย⁽⁴⁴⁾

1.3.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide, CO_2) เกิดจากการหมักน้ำตาลเฮกโซสของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ decarboxylation และทำให้เกิดการสะสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่บริเวณชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน⁽⁴³⁾

1.3.3.4 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 KDa) และส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ หรือทำลายแบคทีเรียได้⁽⁴⁵⁾ แบคเทอริโอซินสามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ proteases ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งทำให้แบคเทอริโอซินมีความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และสามารถนำไปใช้เป็นทางเลือกในการทดแทนสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้ ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่มีการศึกษามากที่สุด เช่น ไนซิน โดยทั่วไปกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไม่จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเชื้อประจำถิ่นอื่น กลไกการออกฤทธิ์จะทำให้เกิดรูรั่ว และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เกิดการตายในที่สุด⁽⁴⁶⁾

1.4 การประเมินความปลอดภัย

โพรไบโอติกจะต้องมีการประเมินความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ในมนุษย์และสัตว์ โดยการทดสอบภายนอก (*in vitro*) หรือในสัตว์ (*in vivo*) เพื่อประเมินความปลอดภัย และปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีดังนี้

1.4.1 ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ

ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียโพรไบโอติกส่วนหนึ่งมาจากการใช้ยาอย่างไม่ระมัดระวังในมนุษย์และสัตว์ โดยมีการใช้ยามากเกินกว่าความจำเป็นและไม่เหมาะสม โดยเฉพาะการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มน้ำหนักของสัตว์ ทำให้เกิดความกังวลต่อปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากโพรไบโอติกสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยมีการรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีการดื้อต่อยา bacitracin, furantoin, cefoxitin, kanamycin, norfloxacin, gentamicin, trimethoprim sulfadiazine, teicoplanin, streptomycin, metronidazole, และ vancomycin⁽⁴⁷⁾ ซึ่งกลไกการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมี 2 ประเภท ได้แก่⁽⁴⁸⁾

1) การดื้อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติของแบคทีเรียเอง (intrinsic resistance) เป็นการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกอยู่แล้วในธรรมชาติหรือมีการดื้อยามาตั้งแต่แบคทีเรียชนิด wild-type การดื้อยาโดยธรรมชาติจะไม่สามารถส่งถ่ายยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากยีนดื้อยามักอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวนี้สามารถเป็นประโยชน์ต่อโพรไบโอติกในร่างกายสัตว์หลังได้รับยาปฏิชีวนะ

2) การดื้อยาปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นภายหลัง (acquired resistance) เกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียไม่ได้มีการดื้อยาแต่ดั้งเดิม แต่การดื้อยาเกิดขึ้นภายหลังไม่ว่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์หรือการได้รับยีนกลายพันธุ์มาจาก horizontal gene transfer ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น และการใช้ยาปฏิชีวนะต่อเชื้อดื้อยาจึงไม่ได้ผล และส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของโพรไบโอติกก่อนนำไปใช้ โดยปัจจุบันมีวิธีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายวิธีด้วยกัน โดยการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธีที่นิยม ได้แก่ Kirby-Barer disk-diffusion method (K-B9 method), E-test (Epsilonometer test), microarray และ PCR เป็นต้น⁽⁴⁹⁾

1.4.2 การสร้างเอมีน

สารประเภทเอมีน เป็นสารเมตาบอไลต์ที่ไม่พึงประสงค์ที่โพรไบโอติกบางชนิดสร้างขึ้น โดยการทำงานของเอนไซม์ decarboxylase เปลี่ยนกรดอะมิโนทำให้ได้สารในกลุ่มเอมีน โดยมีการงานว่าสารในกลุ่มเอมีนที่มักตรวจสอบ คือ histamine และ tyramine เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อร่างกายของโฮสต์ โดย histamine จะทำให้เกิดอาการแพ้ เช่น ผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสีย เป็นต้น ส่วน tyramine มีผลทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงในผู้ป่วยที่ได้รับยาประเภท monoamine oxidase inhibitors โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้ระบุปริมาณ histamine ที่ยอมรับได้อยู่ที่ 50 ppm⁽⁵⁰⁾

1.4.3 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

Hemolysins เป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) และเป็น virulence factors ที่มีความสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anaemia) และอาการบวมของโฮสต์ (oedema) โดยมักตรวจสอบกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงด้วยการเพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Columbia agar plates ที่เติม 5% (v/v) sheep blood ซึ่งจะพบลักษณะของไฮนไล หรือ hemolytic zone ที่เกิดจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการนำโพรไบโอติกมาใช้ในมนุษย์และสัตว์จึงควรเลือกสายพันธุ์ที่ไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง⁽⁵¹⁾

1.4.4 การประเมินความปลอดภัยโดยใช้เทคนิค whole genome sequencing

ปัจจุบันนอกจากวิธีทั่วไปในการตรวจสอบและการประเมินความปลอดภัยของโพรไบโอติกแล้ว เทคนิคและวิธีในระดับโมเลกุลโดยเฉพาะ whole genome sequencing ได้รับความนิยมนอย่างมากและถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ยีนก่อโรค และยีนที่สร้างสาร

มีการติดเชื้อ แล้วพัฒนาเป็น macrophage เพื่อจับกินเชื้อโรค นอกจากนี้ไฟโรไบโอติกสามารถกระตุ้นการหลั่งสารในระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เพื่อมาทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม เช่น Immunoglobulin A, interleukin และ TNF-alpha⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾ ส่งผลให้ร่างกายสามารถป้องกันและต่อต้านเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายได้ สารเหล่านี้คล้ายกับฮอร์โมนในร่างกายโดยทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกระตุ้นให้ร่างกายป้องกันเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้ามา นอกจากนี้ไฟโรไบโอติกยังสามารถเพิ่มปริมาณสารต้านเชื้อโรคและทำให้สามารถสื่อสารกับเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในลำไส้ได้ดีมากขึ้น ทั้งยังก่อให้เกิดการสร้างสารป้องกันและเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เข้าสู่ภาวะสมดุล ตลอดจนทำให้เนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบลดลง และช่วยซ่อมแซมเซลล์ร่างกายให้กลับมาฟื้นตัวได้⁽⁵⁸⁾

2.2 การป้องกันการเกิดมะเร็ง

จากการศึกษาของ Goldin และคณะ (1980) พบว่าเชื้อไฟโรไบโอติก *L. acidophilus* สามารถลดสารเคมีที่ก่อให้เกิดเนื้องอกในลำไส้หนูได้ โดยกลไกอย่างหนึ่งในการยับยั้งการเกิดมะเร็งของไฟโรไบโอติก คือ การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง (procarcinogenic enzyme) ของแบคทีเรียในลำไส้⁽⁵⁹⁾ นอกจากนี้ไฟโรไบโอติกยังยับยั้งและควบคุมแบคทีเรียที่สร้างสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และยังมีผลต่อการเคลื่อนไหวและการบีบตัวของลำไส้ ส่งผลให้เกิดการกำจัดสารก่อมะเร็งให้ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น⁽⁶⁰⁾

2.3 การลดภาวะร่างกายไม่สามารถย่อยหรือไม่ทนต่อน้ำตาลแล็กโทส

ภาวะที่ไม่ทนต่อน้ำตาลแล็กโทส (lactose intolerance) เกิดจากร่างกายขาดเอนไซม์ beta-galactosidase สำหรับไปใช้ในการย่อยน้ำตาลแล็กโทส ทำให้เกิดอาการไม่สบายท้อง ท้องอืดได้⁽⁶¹⁾ ซึ่งไฟโรไบโอติกสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยน้ำตาลแล็กโทสได้ ทำให้ปริมาณน้ำตาลแล็กโทสในอาหารน้อยลง จึงทำให้ผู้ที่ภาวะไม่ทนน้ำตาลแล็กโทสสามารถรับประทานอาหารหรือดื่มนมโดยไม่เกิดอาการท้องอืดหรือท้องเฟ้อ⁽⁶²⁾

2.4 การสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย

ไฟโรไบโอติกสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายได้ เช่น วิตามิน K และ วิตามิน B 12⁽⁶³⁾ และสามารถสร้าง indole, short-chain fatty acids, extracellular proteins, extracellular vesicles, และ bacteriocins ซึ่งช่วยในการปกป้องเยื่อผิวเซลล์ลำไส้จากการติดเชื้อ การอักเสบ และความเสียหายที่เกิดขึ้น โดยจะไปจับกับ receptor บริเวณผิวเซลล์ของลำไส้แล้วกระตุ้นให้ Goblet cell เกิดการหลั่งเมือก และเพิ่มการหลั่ง antimicrobial peptide เป็นต้น⁽⁶⁴⁾ นอกจากนี้ไฟโรไบโอติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้⁽⁶⁵⁾

2.5 ช่วยปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย

การนำโพรไบโอติกมาใช้ในการรักษาอาการท้องร่วงในมนุษย์และสัตว์เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกันอย่างมากมาในปัจจุบัน โดยโพรไบโอติกจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกายทำให้สามารถลดอาการท้องเสียจากเชื้อก่อโรคต่าง ๆ เช่น ไวรัสและแบคทีเรีย⁽⁶⁶⁾ ซึ่งโพรไบโอติก ระยะเวลาของอาการท้องร่วง และลดอาการติดเชื้อในลำไส้ได้ โดยโพรไบโอติกจะเข้าไปแข่งขันและเข้าครอบครองพื้นที่ในลำไส้แทนที่เชื้อก่อโรค หรือแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อเชื้อก่อโรค และโพรไบโอติกสามารถใช้อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สัตว์รับประทานเข้าไปเพื่อสร้างพลังงานแล้วได้เป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติก ซึ่งกรดแลคติกที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้โพรไบโอติกยังผลิตสารอื่น ๆ เช่น แบคเทรีโอซิน มายับยั้งเชื้อก่อโรคได้⁽⁶⁷⁾

3. การนำโพรไบโอติกไปใช้ในสัตว์

ปัจจุบันมีการนำโพรไบโอติกมาใช้เป็นอาหารเสริมในการส่งเสริมสุขภาพสัตว์ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อลดการเจ็บป่วยและการตาย ช่วยเพิ่มผลผลิตสัตว์ในฟาร์ม ได้แก่ เนื้อ นม และไข่⁽⁶⁸⁾ โดยโพรไบโอติกจะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อโรคในสัตว์ ปรับปรุงระบบการย่อยอาหาร ช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารในลำไส้ และช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ เนื่องจากหลายทศวรรษที่ผ่านมาการใช้ยาปฏิชีวนะจนทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรค⁽⁶⁹⁾ โดยการนำโพรไบโอติกไปใช้กับสัตว์มักเตรียมในรูปแบบอาหารเม็ดผสมโพรไบโอติก หรือป้อนให้สัตว์ทางปากโดยตรง⁽⁷⁰⁾ โดยปัจจุบันได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้กับสัตว์หลายประเภทดังต่อไปนี้

3.1 การนำโพรไบโอติกมาใช้ในสุนัข

การนำโพรไบโอติกมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์นั้นจะต้องมีการประเมินความปลอดภัยก่อนการใช้ ดังนั้นการนำโพรไบโอติกไปใช้ในสุนัขจึงควรประเมินความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ด้วยเช่นกัน⁽⁷¹⁾ โดยการนำโพรไบโอติกมาใช้ในสุนัขจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของสุนัขให้ดีขึ้น โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และสามารถนำโพรไบโอติกไปใช้ในการรักษาโรคระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal disease) สุนัขได้อีกด้วย^(72, 73) ปัจจุบันได้มีงานวิจัยหลายฉบับที่นำเอาโพรไบโอติกมาใช้ส่งเสริมสุขภาพสุนัข ดังต่อไปนี้

Vahjen และคณะ (2003)⁽⁷⁴⁾ ได้ศึกษาการป้อนโพรไบโอติก *E. faecium* NCIB 10415 (Enteroferm) ที่แยกได้จากสุนัขที่มีสุขภาพดีให้แก่สุนัข 12 ตัว (ความเข้มข้นเชื้อ 9.2×10^9 cfu/สุนัข/วัน) เป็นเวลา 18 วัน แล้วเก็บตัวอย่างอุจจาระมาวิเคราะห์ พบว่าการป้อนโพรไบโอติก

สามารถลดปริมาณ *Clostridium* spp. ในอุจจาระของสุนัขได้ แต่ไม่สามารถลดจำนวน *Campylobacter* spp. และ *Salmonella* spp. ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการป้อนโพรไบโอติกให้แก่สุนัข ส่งผลเกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสุนัขทุกตัว

Biagi และคณะ (2007)⁽⁷⁵⁾ ได้ศึกษาผลการป้อนโพรไบโอติก *L. animalis* LA4 ให้แก่สุนัขโตเต็มวัย 9 ตัว เป็นเวลา 10 วัน แล้วเก็บตัวอย่างอุจจาระมาวิเคราะห์ พบว่าการป้อนเชื้อโพรไบโอติกส่งผลทำให้เกิดการลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม enterococci และเชื้อ *Clostridium perfringens* และเพิ่มจำนวนเชื้อในกลุ่ม lactobacilli นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียในอุจจาระสุนัขลดลงในขณะที่ความเข้มข้นของกรดแลคติกเพิ่มขึ้น และพบว่าโพรไบโอติกยังสามารถอยู่รอดในทางเดินอาหารสุนัขได้

3.1.1 ระบบทางเดินอาหารสุนัข

โพรไบโอติกเมื่อเข้าไปอยู่ในสุนัขจะส่งเสริมสุขภาพของสุนัขให้ดีขึ้นโดยจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของสุนัข ดังนั้นโพรไบโอติกจึงต้องมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารของสุนัขได้ โดยระบบทางเดินอาหารของสุนัขประกอบด้วย

3.1.1.1 ปาก

การย่อยอาหารของสุนัขเริ่มต้นที่ปากด้วยกลไกของการเคี้ยว โดยใช้ฟันขนาดใหญ่ 42 ซี่ เมื่อสุนัขกินอาหารเข้าไปส่วนใหญ่มักจะกลืนอาหารทันทีโดยจะเคี้ยวเฉพาะส่วนที่กลืนยากเท่านั้น และจะมีการหลั่งน้ำลายออกมา น้ำลายจะประกอบด้วยสารคัดหลั่งซึ่งช่วยให้สามารถกลืนอาหารได้สะดวก โดยปริมาณน้ำลายที่หลั่งออกมาจะขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร โดยค่า pH ของน้ำลายสุนัขจะอยู่ในช่วง 7.34-7.80 หลังจากนั้นอาหารจะผ่านหลอดอาหารลงสู่กระเพาะอาหารโดยการบีบตัวของกล้ามเนื้อในทางเดินอาหาร⁽⁷⁶⁾

3.1.1.2 กระเพาะอาหาร

เมื่ออาหารผ่านคอหอยและหลอดอาหารแล้ว อาหารจะเข้าสู่กระเพาะอาหาร โดยอาหารจะถูกย่อยให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลง โดยกระเพาะอาหารทำหน้าที่ในการพักอาหารไว้ชั่วคราว อาหารที่ถูกย่อยไปบางส่วนและผสมอยู่กับน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เรียกว่าคายม์ (chyme) ซึ่งน้ำย่อยในกระเพาะอาหารประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เปปซิน (pepsin) ทำหน้าที่ในการย่อยอาหารในกลุ่มโปรตีน เอนไซม์เปปซินที่หลั่งออกมาจะอยู่ในรูปที่ยังทำงานไม่ได้ โดยจะทำงานได้ต่อเมื่อมีการกระตุ้นจากกรดเกลือ ซึ่งช่วยรักษาความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร โดยค่า pH ในกระเพาะอาหารจะอยู่ในช่วง 2-5.5⁽⁷⁷⁾ โดยการทำงานของเอนไซม์และความเป็นกรดในกระเพาะอาหารสามารถก่อให้เกิดการเสียหายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และดีเอ็นเอของแบคทีเรียโพรไบโอติกทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกไม่สามารถรอดชีวิตได้ อาหารแต่ละชนิดจะใช้

เวลาในการย่อยและอยู่ในกระเพาะอาหารต่างกัน โดยอาหารเหลวใช้เวลาเพียงครึ่งชั่วโมงในกระเพาะอาหาร แต่อาหารแข็งหรืออาหารประเภทไขมันจะใช้เวลาถึง 4 ชั่วโมง จากนั้นคายม์จะเคลื่อนสู่ลำไส้เล็ก⁽⁷⁸⁾

3.1.1.3 ลำไส้

เมื่อคายม์เคลื่อนสู่ลำไส้เล็กจะมีการดูดซึมอาหารบริเวณนี้ ลำไส้เล็กของสุนัขแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเช่นเดียวกับมนุษย์ คือ ส่วนต้น เรียกดูโอดินัม (duodenum) ส่วนกลาง เรียกเจจูนัม (jejunum) และส่วนปลาย เรียกไอลีอัม (ileum) โดยน้ำย่อยที่หลังจากตับอ่อนและผนังลำไส้เล็กจะเปลี่ยนคายม์ให้มีสถานะเป็นต่างอีกครั้ง ซึ่งค่า pH ของลำไส้เล็กจะอยู่ในช่วง 7.6 – 8.2 และอาหารจะอยู่ในลำไส้เล็กเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ซึ่งอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันจะถูกย่อยในบริเวณลำไส้เล็กโดยเอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อน จากนั้นอาหารจะเคลื่อนที่สู่ลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะมีการดูดซึมอาหารเล็กน้อย และจะมีการดูดซึมน้ำและ electrolytes เข้าสู่ร่างกายของสุนัขบริเวณนี้ และเป็นบริเวณที่มีการเข้าเกาะและตั้งรกรากของโพรไบโอติก นอกจากนี้บริเวณลำไส้ใหญ่ยังมีความหลากหลายของแบคทีเรียและจุลินทรีย์จำนวนมาก เมื่อโพรไบโอติกเมื่อเข้าไปยึดเกาะบริเวณลำไส้ใหญ่จะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และช่วยส่งเสริมสุขภาพของสุนัข⁽⁷⁹⁾

3.2 การนำโพรไบโอติกมาใช้ในสุกร

การเลี้ยงสุกรในปัจจุบันได้ปรับปรุงแนวทางในการเลี้ยงแบบใหม่เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด แต่อาจทำให้สุกรเกิดความเครียดเนื่องจากความเป็นอยู่ที่แออัด และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ส่งผลให้สุกรด้านทานเชื้อก่อโรคได้น้อย นอกจากนี้มีการรายงานว่าในระหว่างที่ลูกสุกรหย่านม ลูกสุกรจะถูกแยกออกจากแม่อย่างกะทันหัน ทำให้เกิดความเครียดในลูกสุกร และการเปลี่ยนแปลงอาหารจากนมแม่มาเป็นอาหารแข็งทำให้เกิดการระคายเคืองของลำไส้และดูดซึมสารอาหารได้ยาก จนทำให้เกิดปัญหาสุขภาพในลูกสุกร⁽⁸⁰⁾ ดังนั้นการนำโพรไบโอติกมาใช้กับสุกรจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ความสมบูรณ์ของเยื่อบุผิวลำไส้ทำให้ส่งเสริมสุขภาพของสุกรในสภาวะที่เกิดความเครียดได้⁽⁸¹⁾

Giang และคณะ (2010)⁽⁸²⁾ ได้ศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติกสายพันธุ์ผสม ได้แก่ *E. faecium* 6H2 จำนวน 3×10^8 cfu/g, *L. acidophilus* C3 จำนวน 4×10^6 cfu/g และ *L. plantarum* 1K8 จำนวน 2×10^6 cfu/g ในอาหารของลูกสุกรหย่านมอายุ 21-23 วัน พบว่าลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญเฉลี่ย (average daily gain, ADG) อัตราการกินอาหาร (average daily feed intake, ADFI) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว

(feed conversion ratio, FCR) ที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เติมโพรไบโอติก ภายหลัง 2 สัปดาห์แรกหลังการหย่านม

3.3 การนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์ปีก

ในฟาร์มเลี้ยงขนาดใหญ่สัตว์ปีกมักเผชิญกับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม และปัญหาจากโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีก นำไปสู่การนำยาปฏิชีวนะมาใช้เพื่อป้องกันและควบคุมโรค อย่างไรก็ตาม การนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในสัตว์ปีกทำให้เกิดความกังวลเกี่ยวกับปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โพรไบโอติกจึงได้รับพิจารณาให้เป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรเพื่อนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ^(69, 83)

Higgins และคณะ (2007)⁽⁸⁴⁾ ได้ศึกษาการป้อนโพรไบโอติกที่ความเข้มข้นเชื้อแตกต่างกันให้ลูกไก่แรกเกิดทางปากและสังเกตการลดจำนวนของเชื้อ *Salmonella Enteritidis* ในลูกไก่ พบว่าเมื่อป้อนเชื้อให้แก่ลูกไก่ที่ความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 cfu/ml สามารถลดจำนวน *S. Enteritidis* ได้ แต่เมื่อนำส่วนใสที่ไม่มีเซลล์ (cell-free supernatant) มาป้อนให้แก่ลูกไก่พบว่าไม่สามารถลดจำนวน *S. Enteritidis* ได้

X. Zhou และคณะ (2010)⁽⁸⁵⁾ ได้ศึกษาผลการเสริมโพรไบโอติก *B. coagulans* ZJU0616 ที่ความเข้มข้นเชื้อแตกต่างกันในอาหารไก่ พบว่าการเสริมโพรไบโอติกที่ความเข้มข้น 2.0×10^6 cfu/g ลงในอาหารไก่ช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการอยู่รอดของไก่มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมโพรไบโอติกลงในอาหาร

3.4 การนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ปัจจุบันได้มีการนำเอาโพรไบโอติกมาใช้ในโคนมและโคเนื้อกันอย่างแพร่หลาย โดยมีการรายงานว่าการป้อนเชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ให้แก่สัตว์เคี้ยวเอื้องโดยตรงจะช่วยส่งเสริมการเจริญ เพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน

Krehbiel และคณะ (2014)⁽⁸⁶⁾ ได้ศึกษาผลการป้อนเชื้อโพรไบโอติกโดยตรงให้แก่โคนม พบว่าการเสริมโพรไบโอติกช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของโคนม และเพิ่มปริมาณการผลิตนม นอกจากนี้การเสริมโพรไบโอติกยังช่วยลดการติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 อีกด้วย

Ghazanfer และคณะ (2015)⁽⁸⁷⁾ ได้ศึกษาผลการเสริมโพรไบโอติก *S. cerevisiae* ในอาหารโคนม พบว่าชุดการทดลองที่มีการเสริมด้วยโพรไบโอติกช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวเฉลี่ยของโคนมเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เสริมโพรไบโอติกลงในอาหาร และยังพบว่าการเสริมโพรไบโอติกช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมากขึ้น

4. กระบวนการทำแห้ง

การทำแห้ง (Drying process) เป็นวิธีการเก็บและถนอมอาหารที่เก่าแก่ที่สุด ซึ่งใช้ยังคงนิยมใช้วิธีการนี้ในการถนอมอาหารจนถึงปัจจุบัน โดยการทำแห้งเป็นการดึงน้ำออกจากอาหารโดยการระเหยให้เป็นไอหรือการระเหิด ซึ่งจะลดจำนวนของจุลินทรีย์ในอาหารและลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ส่งผลให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร⁽⁸⁸⁾ นอกจากนี้การทำแห้งยังช่วยลดขนาดของบรรจุภัณฑ์ที่ใช้บรรจุ น้ำหนัก รวมถึงค่าใช้จ่ายในการขนส่งอีกด้วย โดยข้อสำคัญในกระบวนการนี้คือ การขจัดน้ำออกจากผลิตภัณฑ์โดยยังคงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ดีไว้ โดยใช้ต้นทุนในการดำเนินงานที่ต่ำ⁽⁸⁹⁾ ส่วนการทำแห้งโพรไบโอติกนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาเชื้อและประหยัดต้นทุนในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การทำแห้งจะทำให้โพรไบโอติกมีความเสถียรโดยสามารถคงสภาพไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมต่าง ๆ ของโพรไบโอติก⁽⁹⁰⁾ ซึ่งวิธีการทำแห้งในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกันดังต่อไปนี้

4.1 การทำแห้งแบบวิธีการพา

การทำแห้งแบบวิธีการพา (Convective drying) เป็นวิธีการที่นิยมกันใช้มากในโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และใช้ต้นทุนต่ำ การทำแห้งด้วยวิธีการพาเป็นการถ่ายโอนความร้อนจากอากาศไปยังอาหาร จากนั้นความร้อนจะถ่ายเทเข้าสู่ภายในอาหาร ส่งผลให้น้ำภายในอาหารเกิดการระเหยออกและถูกพัดพาออกไปด้วยลมร้อน⁽⁹¹⁾ การเพิ่มอุณหภูมิและความเร็วลมในการทำแห้งจะทำให้อัตราการระเหยสูงขึ้น ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการทำแห้ง⁽⁹²⁾ อย่างไรก็ตามการทำแห้งในระยะเวลาที่นานเกินไปอาจส่งผลต่อคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารได้

Burca-Busaga และคณะ (2020)⁽⁶⁸⁾ ได้ศึกษาการทำแห้งขึ้นแปปเปิ้ลที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก *L. salivarius* CECT 4063 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบวิธีการพา เปรียบเทียบกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) พบว่าการทำแห้งแบบวิธีการพาสามารถรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ในแปปเปิ้ลได้ดีที่สุดโดยการรอดชีวิตของโพรไบโอติกจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเติม trehalose เข้าไป

Argyropoulos และคณะ (2011)⁽⁹³⁾ ได้ศึกษาการทำแห้งเลมอน บาล์ม (*Melissa officinalis* L.) ด้วยวิธีการทำแห้งแบบวิธีการพาที่อุณหภูมิ 30, 40, 45, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วลมคงที่ 0.2 เมตร/วินาที พบว่าการทำแห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถรักษาสรรพคุณทางยา (medicinal qualities) และสีของเลมอน บาล์มได้ดีที่สุด แต่การทำแห้งอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อสี ทำให้ปริมาณ rosmarinic acid และปริมาณน้ำมันหอมระเหยลดลง

4.2 การทำแห้งแบบสุญญากาศ

การทำแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum drying) เป็นการทำให้แห้งโดยการดึงน้ำออกจากอาหารด้วยการลดความดันลงให้ต่ำเป็นสุญญากาศ น้ำจะระเหยออกอย่างรวดเร็วภายใต้แรงดันต่ำ และการทำแห้งวิธีนี้ใช้อุณหภูมิต่ำ จึงเหมาะสำหรับอาหารที่ไวต่อความร้อนสูง ซึ่งนิยมใช้การอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยา เคมีภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์อาหาร และเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากนี้การทำแห้งด้วยวิธีแบบสุญญากาศสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของอาหาร ทำให้ลดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร และการทำแห้งภายใต้แรงดันที่ลดลงจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์แห้งได้เร็วยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการทำแห้งด้วยวิธีนี้ต้องใช้พลังงานมาก ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานในการทำแห้ง⁽⁹⁴⁾

Noorbakhsh และคณะ (2013)⁽⁹⁵⁾ ได้ศึกษาการทำแห้งแอปเปิ้ลที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก ด้วยวิธีทำแห้งแบบสุญญากาศประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการทำแห้งแบบวิธีการพาเปรียบเทียบกับการทำแห้งแบบวิธีการพา หรือวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอย่างใดอย่างหนึ่ง แล้วนำผลิตภัณฑ์ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วัน พบว่าเมื่อเก็บแอปเปิ้ลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิธีการทำแห้งแบบสุญญากาศร่วมกับวิธีการทำแห้งแบบวิธีการพาทำให้เชื้อโพรไบโอติกในแอปเปิ้ลมีการรอดชีวิตมากที่สุด จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าการทำแห้งแบบสุญญากาศร่วมกับวิธีการทำแห้งแบบวิธีการพา ให้ผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสที่ดีตลอดการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 130 วัน

4.3 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เป็นกระบวนการดึงน้ำออกจากอาหาร โดยอาศัยหลักการระเหิดของน้ำจากสภาพของแข็งกลายเป็นไอโดยไม่ผ่านสถานะของเหลวในภาวะสุญญากาศ โดยการระเหิดของน้ำแข็งในอาหารกลายเป็นไอจะทำให้ความชื้นของอาหารลดลง อาหารจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างและเกิดการหดตัวเล็กน้อย ซึ่งประโยชน์ของการทำแห้งด้วยวิธีนี้คือสามารถรักษาค่าทางโภชนาการของอาหารและคุณภาพทางประสาทสัมผัสได้ดีกว่าการทำแห้งแบบทั่วไป⁽⁹⁶⁾

Lee และคณะ (2004)⁽⁹⁷⁾ ได้ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. bulgaricus* KFRI673 ที่ห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลเคลือบด้วยไคโตซาน แล้วนำเม็ดแคปซูลไปทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเชื้อโพรไบโอติกมีจำนวนการรอดชีวิตคงที่ตลอดการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการเคลือบด้วยไคโตซานช่วยส่งเสริมให้โพรไบโอติกมีการรอดชีวิตที่ดีขึ้นเมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส

5. ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกได้มีการขยายตัวมากขึ้น การเสริมโพรไบโอติกลงในอาหารเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ⁽⁹⁸⁾ การบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกจะช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดความเสี่ยงในการเป็นเบาหวาน และช่วยลดภาวะไม่ทนต่อแล็กโทส⁽⁹⁹⁾ โดยเชื้อที่โพรไบโอติกที่นำมาใช้เสริมในอาหารมีหลายสายพันธุ์ ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ทนอุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรด และสภาวะที่เป็นเกลือ จึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องทำแห้ง⁽¹⁰⁰⁾ โดยโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในอาหารแห้งและขนมขบเคี้ยวมีดังรายงานต่อไปนี้

Afzaal และคณะ (2020)⁽¹⁰¹⁾ ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมแอปเปิ้ลอบแห้งเสริมโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและคาราจีแนน พบว่าแอปเปิ้ลเสริมโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยวัสดุทั้ง 2 ชนิดสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติก ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน และการห่อหุ้มโพรไบโอติกช่วยเพิ่มปริมาณ phenolic content และการอยู่รอดของโพรไบโอติกในสภาวะทางเดินอาหารจำลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

González-Forte และคณะ (2014)⁽¹⁰²⁾ ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมบิสกิตอบแห้งเสริมโพรไบโอติกสำหรับอาหารสุนัข โดยนำบิสกิตที่เสริมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกมาเคลือบด้วยอัลจิเนต และ starch-glycerol เพื่อช่วยในการอยู่รอดของโพรไบโอติก พบว่าการเคลือบด้วย starch-glycerol ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกในสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้ และพบว่าการเคลือบช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บเป็นเวลา 28 วัน

Miranda และคณะ (2020)⁽¹⁰³⁾ ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ลูกอมเคี้ยวหนึบ (jelly candies) เสริมโพรไบโอติก *B. coagulans* GBI-306086 พบว่าลูกอมสามารถคงคุณสมบัติทางกายภาพเคมีไว้ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดการเก็บรักษา และมีความปลอดภัยสำหรับการบริโภคตามหลักกฎหมายของประเทศบราซิล โดยมีปริมาณโพรไบโอติกคงเหลือมากกว่า $6.4 \log \text{ cfu/g}$ ตลอด 90 วัน และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารจำลอง การบริโภคลูกอมในปริมาณ 30 กรัมจะได้รับโพรไบโอติกประมาณ $7.82 \log \text{ cfu/g}$ ซึ่งเป็นจำนวนที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพต่อผู้บริโภค

6. การตรึงและการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกในอาหาร

เพื่อให้โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมสุขภาพ จึงจำเป็นต้องรักษาการรอดชีวิตและกิจกรรมการสร้างเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายไว้ ทั้งในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร ตลอดจนอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงได้มีการ

พัฒนาวิธีการต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโพรไบโอติกให้ทนต่อความร้อน pH ต่ำ และความเครียดจากแรงดันออสโมติก เป็นต้น โดยปัจจุบันได้นำวิธีการไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) ร่วมกับการเคลือบด้วยฟิล์มที่บริโภคได้ (edible packaging) นำมาใช้ในการตรึงเซลล์และห่อหุ้ม เพื่อช่วยในการปกป้องและส่งเสริมการรอดชีวิตของโพรไบโอติก⁽¹⁰⁴⁾ และเป็นทางเลือกอีกหนึ่งวิธีในการเสริมโพรไบโอติกลงในอาหาร

6.1 ไมโครเอนแคปซูเลชัน

ไมโครเอนแคปซูเลชัน (Microencapsulation) เป็นกระบวนการตรึงเซลล์หรือห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์โดยการเคลือบด้วยสารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) เพื่อแยกเซลล์ออกจากสภาพแวดล้อมโดยรอบ และสามารถเกิดการปลดปล่อยเซลล์ในลำไส้ได้⁽¹⁰⁵⁾ โดยการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกสามารถรักษาและปกป้องเซลล์จากปัจจัยแวดล้อมที่เป็นอันตราย เช่น ค่าความเป็นกรดสูง ผลกระทบจากความเย็นที่เกิดจากสภาวะของกระบวนการแช่แข็ง การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง รวมทั้งโมเลกุลออกซิเจน เป็นต้น⁽¹⁰⁶⁾ นอกจากนี้ไมโครเอนแคปซูเลชันยังช่วยปรับปรุงคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส และวิธีการนี้สามารถตรึงเซลล์ให้เกิดการกระจายเป็นเนื้อเดียวกันทั่วทั้งผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งกระบวนการนี้ถูกนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โพรไบโอติกในอาหาร ตลอดจนการทดสอบในทางเดินอาหารจำลอง โดยสารไฮโดรคอลลอยด์ที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์มีหลายชนิด ได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต เซลลูโลส เจลาติน คาราจีแนน และ acetate phthalate เป็นต้น⁽¹⁰⁷⁾

Gbassi และคณะ (2009)⁽¹⁰⁸⁾ ได้ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตที่เคลือบเวย์โปรตีน พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่เคลือบด้วยเวย์โปรตีน มีการรอดชีวิตในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง ได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเคลือบด้วยเวย์โปรตีน และจากภาพตัดขวางแสดงให้เห็นกระจายของเชื้อโพรไบโอติกทั่วทั้งแคปซูลอัลจิเนต

Nualkaekul และคณะ (2012)⁽¹⁰⁹⁾ ได้ศึกษาผลการรอดชีวิตของ *L. plantarum* ที่ห่อหุ้มอัลจิเนตและอัลจิเนตที่เคลือบด้วยโคโคซานในน้ำทับทิม พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่เคลือบด้วยโคโคซานช่วยส่งเสริมให้เชื้อโพรไบโอติกอยู่รอดได้ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง (pH 1.5) โดยมีจำนวนการรอดชีวิตมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เคลือบด้วยโคโคซาน 0.5-2 log cfu/ml และมีจำนวนเชื้อคงเหลือมากกว่า 5.5 log cfu/ml ตลอดจนการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่เซลล์อิสระไม่สามารถอยู่รอดได้หลังจากเก็บเป็นเวลา 4 สัปดาห์

6.2 การเคลือบอาหารด้วยฟิล์มบริโภาคได้ที่มีโพรไบโอติก

ความใส่ใจของผู้บริโภคต่อสุขภาพ โภชนาการ ความปลอดภัยของอาหาร และ ปัญหาสิ่งแวดล้อมนำไปสู่การพัฒนาฟิล์มบริโภาคได้ (Edible film) ที่สามารถย่อยสลายได้โดยง่าย โดยฟิล์มบริโภาคได้ คือวัสดุแผ่นบางที่มีความหนาน้อยกว่า 0.3 มิลลิเมตร เกิดจากการผสมของพอลิเมอร์ชีวภาพและสารเติมแต่งต่าง ๆ แล้วนำมาใช้ในการห่อหุ้มหรือเคลือบลงบนอาหารโดยตรง⁽¹¹⁰⁾ การเคลือบฟิล์มลงบนอาหารสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การจุ่ม (dipping) การสเปรย์ (spraying) การทา (brushing) และการร่อน (panning) เป็นต้น โดยฟิล์มบริโภาคได้นั้นสามารถแบ่งได้ตามวัสดุที่ใช้ในการทำฟิล์มคือ ไชมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต⁽¹¹¹⁾ ประโยชน์ของการเคลือบอาหารด้วยฟิล์ม คือ ป้องกันแสงยูวี การระเหยของน้ำและสารอินทรีย์ในอาหาร ป้องกันความเสียหายของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการขนส่ง และเพิ่มอายุการเก็บรักษา⁽¹¹¹⁾ โดยวัตถุประสงค์ของการนำโพรไบโอติกมาผสมลงในฟิล์มบริโภาคได้ คือ การเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร และสามารถรอดชีวิตได้เมื่อเผชิญต่อสภาวะของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก⁽¹¹²⁾ นอกจากนี้การรอดชีวิตของโพรไบโอติกอาจขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและการเก็บรักษาที่สภาวะแตกต่างกัน โดยตัวอย่างการศึกษาการเคลือบอาหารด้วยฟิล์มบริโภาคได้ที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกมีดังต่อไปนี้

Soukoulis และคณะ (2014)⁽¹¹³⁾ ได้ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. rhamnosus* โดยนำโพรไบโอติกไปผสมกับฟิล์มอัลจินตและโปรตีนเวย์แล้วนำไปเคลือบบนชิ้นเบเกอรี่ พบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดได้หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

Bambace และคณะ (2019)⁽¹¹⁴⁾ ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์บลูเบอร์รีเสริมโพรไบโอติก โดยนำเชื้อโพรไบโอติก *L. rhamnosus* CECT 8362 มาผสมกับฟิล์มอัลจินตแล้วนำไปเคลือบกับบลูเบอร์รี พบว่าเชื้อโพรไบโอติกมีจำนวนอยู่รอดมากกว่า $6.2 \log \text{ cfu/g}$ ตลอดการเก็บรักษา และมีปริมาณจุลินทรีย์อื่น ๆ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และให้ค่าการยอมรับทางประสาทสัมผัสที่ดี

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของโพรไบโอติกในอาหาร

ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากเพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ก่อนจำหน่ายแก่ผู้บริโภค โดยการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารหมายถึง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโพรไบโอติกต่อกรัมหรือต่อมิลลิกรัมในอาหาร⁽¹¹⁵⁾ ดังนั้นเพื่อรักษาความเชื่อมั่นของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก สิ่งสำคัญคือต้องแน่ใจว่าแบคทีเรียมีชีวิตการรอดชีวิตสูงในระหว่างการผลิตอาหารและตลอดอายุการเก็บรักษา แม้จะยัง

ไม่มีข้อตกลงกันทั่วโลกของจำนวนโพรไบโอติกที่ควรบริโภคเข้าไป แต่โดยทั่วไปแล้วควรบริโภคเข้าไปในปริมาณอย่างน้อย 10^6 หรือ 10^7 - 10^8 cfu/mL (cfu/g) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าปริมาณอาหารเสริมโพรไบโอติกที่ควรบริโภคเข้าไปอยู่ที่ 100 กรัมต่อวัน เพื่อส่งผ่านเซลล์โพรไบโอติกปริมาณ 10^9 เข้าสู่ลำไส้⁽¹¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาเติมลงในอาหารโดยตรงจะทำให้อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียต่ำ เนื่องจากต้องเผชิญกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร และในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารมีดังนี้

7.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก

ในการคัดเลือกโพรไบโอติกสำหรับนำมาใช้ในอาหารควรไปเป็นตามเกณฑ์การคัดเลือก โดยหลักการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร คือความเข้ากันได้ของสายพันธุ์แบคทีเรียกับผลิตภัณฑ์อาหาร การทนต่อสภาวะต่าง ๆ ในอาหาร และการมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหาร โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมนั้นจะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเมื่อนำมาเสริมในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ความทนต่อสภาวะต่าง ๆ ของโพรไบโอติกนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (strain-specific)^(117, 118)

7.2 ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร

ค่า pH และปริมาณกรดที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์โพรไบโอติก ซึ่งค่า pH ที่ต่ำเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่จำกัดการเจริญและความเสถียรของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากไฮโดรเจนไอออนในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเป็นกรดจะไปทำลายเซลล์โพรไบโอติก และในอาหารที่มี pH ที่ต่ำมาก อาจทำให้ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตรอดของเชื้อโพรไบโอติก โดยกรดอินทรีย์จะสามารถเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์และเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ทำให้ pH ภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้กรดอินทรีย์อาจจับกับสารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของโพรไบโอติกได้⁽¹¹⁹⁾

7.3 Molecular oxygen

เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในกลุ่ม lactobacilli สามารถทนอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ (aerotolerant) ในขณะที่ bifidobacteria เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญได้ในภาวะที่ไม่มีอากาศหรือไม่มีออกซิเจนเท่านั้น ดังนั้นโมเลกุลออกซิเจนจึงเป็นอันตรายต่อการเจริญและการอยู่รอดของโพรไบโอติก อย่างไรก็ตามระดับความไวต่อออกซิเจนจะแตกต่างกันไปตามสปีชีส์และสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli สามารถทนต่อออกซิเจนได้ดีกว่า bifidobacteria โดยผลกระทบของออกซิเจนที่มีผลต่อโพรไบโอติกมี 3 ประการดังนี้ 1) เป็นพิษต่อ

เซลล์โดยตรง 2) ในที่มีออกซิเจนจะมีการสร้างสารเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์โพรไบโอติก 3) อนุมูลอิสระที่เกิดจากการออกซิเดชันขององค์ประกอบไขมันสามารถเป็นพิษต่อเซลล์โพรไบโอติก⁽¹²⁰⁾ ดังนั้นจึงต้องมีการลดปริมาณออกซิเจนในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ใช้สารที่มีคุณสมบัติสามารถดูดซับออกซิเจนได้ (oxygen scavengers) เช่น ascorbic acid และควบคุมกระบวนการผลิตให้ออกซิเจนผ่านเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ได้น้อยที่สุด^(121, 122)

7.4 การแช่แข็งและการหลอมละลายอาหาร

ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Freezing operations) เซลล์โพรไบโอติกสามารถเกิดการบาดเจ็บได้ ไม่ว่าจะเป็นการทำให้ผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งเกิดจากความตึงเครียดเชิงกล (mechanical stresses) ของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นข้างในและข้างนอกเซลล์ และอุณหภูมิที่ลดลงจะทำให้เกิดการควบแน่นของตัวถูกละลายทั้งภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ หรือทำให้เซลล์ขาดน้ำ ปัจจัยที่กล่าวมาทั้งหมดทำให้เกิดการเสื่อมสภาพที่สำคัญของเซลล์ลดลงหรือหยุดชะงักซึ่งจำเป็นต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก⁽¹²³⁾ ในการกระบวนการแช่แข็งขนาดของผลึกน้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นตามอัตราการแช่เยือกแข็ง (freezing rate) ที่ลดลง ดังนั้นการแช่แข็งอย่างรวดเร็วหลังจากการเติมเชื้อโพรไบโอติกลงไปในอาหาร มีส่วนช่วยในการรักษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารได้ดี อย่างไรก็ตามการละลาย (thawing) ของผลิตภัณฑ์แช่แข็งจะส่งผลให้เซลล์โพรไบโอติกต้องเผชิญกับความเครียดทางเคมี (chemical stresses) อีกครั้งซึ่งอาจทำให้เซลล์ตายได้⁽¹²⁴⁾

7.5 วัสดุและสภาวะที่ใช้ผลิตบรรจุภัณฑ์

บรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโพรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการซึมผ่านของออกซิเจนในผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้ลดจำนวนเชื้อโพรไบโอติก การรอดชีวิตของโพรไบโอติกมาจากอิทธิพลต่าง ๆ เช่น ชนิดของวัสดุบรรจุภัณฑ์ (แก้วและพลาสติก) ความหนา และการประยุกต์ใช้ระบบ active/intelligent packaging นอกจากวัสดุบรรจุภัณฑ์แล้ว อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการซึมผ่านของออกซิเจน ทั้งนี้นอกจากการเลือกบรรจุภัณฑ์ที่ช่วยรักษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแล้ว ยังควรพิจารณาด้านเศรษฐศาสตร์ด้วย (ราคาของวัสดุบรรจุภัณฑ์ และราคาของเครื่องจักรที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์) เพราะส่งผลอย่างมากต่อราคาของผลิตภัณฑ์และการเลือกซื้อของผู้บริโภค⁽¹²⁵⁾

7.6 ค่าปริมาณน้ำอิสระ

ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity) มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก โดยทั่วไปแล้วอาหารสดจะมีปริมาณน้ำอิสระที่สูง ทำให้อายุการเก็บรักษาของโพรไบโอติกในอาหารสดนั้นสั้น (ประมาณหนึ่งสัปดาห์) ส่วนในอาหารแห้งจะมีค่าปริมาณน้ำอิสระที่

ต่ำทำให้มีอายุการเก็บรักษาที่นานกว่า มีการรายงานว่าค่าปริมาณน้ำอิสระมีบทบาทสำคัญต่อกลไกในการอยู่รอดของโพรไบโอติก โดยค่าปริมาณน้ำอิสระที่มากกว่า 0.3 ขึ้นไปจะส่งผลต่อการอยู่รอดของโพรไบโอติก⁽¹²⁵⁾ และจากการรายงานของ Weinbrecket และคณะ (2010)⁽¹²⁶⁾ ซึ่งได้ศึกษาผลของค่าปริมาณน้ำอิสระ ที่ 0.15 และ 0.7 ต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG พบว่าค่าปริมาณน้ำอิสระ ที่ 0.7 ส่งผลให้จำนวนโพรไบโอติกลดลงมากกว่า 10 log ภายในระยะเวลาการเก็บ 2 สัปดาห์ ในขณะที่ค่าปริมาณน้ำอิสระที่ 0.15 ทำให้จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่า อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าค่าปริมาณน้ำอิสระที่ต่ำจะส่งผลดีต่อการอยู่รอดของโพรไบโอติก แต่การทำให้ค่าปริมาณน้ำอิสระต่ำมากต้องใช้พลังงานสูงในการทำแห้งและส่งผลเสียต่อรสชาติของอาหารได้



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Gallenkamp, UK)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Witeg Labortechnik GmbH, Germany)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer) (Sanden intercool, Thailand)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (Science Tech, Canada)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot-air sterile oven) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- เครื่องวัด pH (pH meter) (Denver Instrument, USA)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) (Mupid, Japan)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Dry bath incubator)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) (Bio-Rad, USA)
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Microscope) (Olympus Optical Co.Ltd, Japan)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL InTouchScope, USA)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker) (Chemoscience, Thailand)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Merck, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบไม่ควบคุมอุณหภูมิ (Microcentrifuge) (Witeg Labortechnik GmbH, Germany)
- Vernier caliper (Misumi, Thailand)
- เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (water activity meter) (Charpa Techcenter, England)
- เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (Stomacher) (Seaward, England)
- เครื่องวัดสี (Colorimeter) (X-Rite, USA)
- โกดักความชื้น (deciactor) (Misumi, Thailand)
- 24 well plate (Thermo Fisher Scientific, Denmark)
- Haemocytometer (Boeco, Germany)
- T-flask (Thermo Fisher Scientific, USA)

2.อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

Peptone water (Himedia, India)

Yeast extract (Himedia, India)

Beef extract (Himedia, India)

Sodium chloride (Thermo Fisher Scientific, USA)

Calcium chloride (Thermo Fisher Scientific, USA)

Agar (Himedia, India)

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

Ethanol (Merck, USA)

GelRed Loading Buffer (Biosharp, China)

Glycerol (Merck, USA)

Isopropanol (Merck, USA)

Phenol (Amresco, USA)

TE buffer (Bio Basic Inc., Canada)

Tris base (Serva, Germany)

Pepsin (Himedia, India)

Triton X-100 (Merck, Germany)

3. วัสดุติด

ตลับหมึก (บริษัทเบทาโกร)

เบคอน (บริษัทบีเอ็มพี)

4. Molecular marker

GenerarTM DNA ladder mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

100 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA)

5. อุปกรณ์เพิ่มเติม

Cellulose acetate filter, pore size 0.45 μm (Sartorius, Germany)

6. วิธีดำเนินการทดลอง

6.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทำได้โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระจากสุนัขทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 6 สายพันธุ์ได้แก่ Chihuahua, French bulldog, Mongrel dog, Poodle, Shih-Tzu และ Pomeranian ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยนำตัวอย่างอุจจาระมาเจือจาง 10 เท่าเพื่อให้มีจำนวนที่เหมาะสมในอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา spread plate ลงบนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ก) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3% (w/v) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar คัดเลือกโคโลนีที่มีการสร้างบริเวณใส (clear zone) มา streak ลงบนอาหาร MRS agar 2-3 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะติดสีแกรมบวก นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป ส่วนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่บริสุทธิ์นำไปเก็บรักษาในอาหาร MRS broth ที่เติมกลีเซอรอล 20% (v/v) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือกมาจัดจำแนกด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S rDNA ดังนี้

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

Reverse primer (1429R): 5' -TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเลี้ยงบนอาหาร MRS agar ทำการ cross streak เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำโคโลนีเดียวที่ได้มาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultra-sonicator จากนั้นนำไปใส่ลงในส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR reaction โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งแสดงในตาราง 1 นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ดังแสดงในตาราง 2 นำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำดีเอ็นเอส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลพันธุกรรมกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ GenBank เพื่อระบุสปีชีส์

ตาราง 1 PCR mixture สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2X TopTaq Master Mix	25
10 μ M 27F primer	1
10 μ M 1492R primer	1
น้ำกลั่นสำหรับ PCR	8
ดีเอ็นเอแม่แบบ	15
ปริมาตรรวม	50

ตาราง 2 ขั้นตอนการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที่)	จำนวนรอบ
1. pre-denaturation	94	7	1
2. denaturation	94	1	35
3. annealing	47	1	
4. extension	72	2	
5. final extension	72	5	1

6.3 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

6.3.1 การศึกษาความสามารถในการทนกรด

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาทดสอบความสามารถในการทนกรด โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงใน MRS broth นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลาย NaCl 0.85% (w/v) (ภาคผนวก ข) นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับความเข้มข้นด้วย NaCl 0.85% (w/v) ให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงใน MRS broth ที่ปรับค่า pH เป็น 2, 3, 4 และ 5 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบการรอดชีวิตของ

แบคทีเรียกรดแลคติก โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ และเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นชุดควบคุม

6.3.2 การศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดี

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 6.3.1 จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงใน MRS broth ที่เติมเกลือน้ำดี 0.15, 0.3 และ 1.0% (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ และเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีการเติมเกลือน้ำดีซึ่งเป็นชุดควบคุม

6.3.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (cell free supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งจะแบ่งออกเป็นสองการทดลองย่อย โดยการทดลองแรกจะใช้เชื้อทดสอบได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., และ *B. cereus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อทดสอบมาปรับความเข้มข้นให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นนำมา spread ลงบนอาหาร TSA แล้วทำการเจาะหลุมโดยใช้ cork borer เติมส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้น ส่วนการทดลองที่สองเป็นการทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซิน นำส่วนใสไปปรับ pH ให้เป็น 6 (neutralize cell free supernatant) จากนั้นเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ trypsin, pepsin และ proteinase K นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนการทดสอบทำได้โดยนำเชื้อทดสอบได้แก่ *Enterococcus hirae* NCTC12368, *Pediococcus pentosaceus* HBUAS3 3 9 5 , *Limosilactobacillus fermentum* YL-11 และ *Ligilactobacillus animalis* JCM 8692 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความเข้มข้นให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นนำมา spread ลงบนอาหาร MRS agar แล้วเจาะหลุมโดยใช้ cork borer เติมส่วนใสที่เตรียมข้างต้น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar แล้วตรวจสอบว่าเชื้อมีการสร้าง แบคทีเรียโอซินหรือไม่ โดยดูจากบริเวณการยับยั้ง หากบริเวณการยับยั้งน้อยลงหรือไม่พบหลังจากเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนลงไป แสดงว่า

เชื้อมีการสร้างแบคทีเรียโอสิน โดยในการศึกษานี้จะมีส่วนที่ไม่ปรับค่า pH และส่วนที่ปรับค่า pH ทำควบคู่ไปด้วย

6.3.4 การศึกษาพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาศึกษาความไม่ชอบน้ำเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ โดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกลงใน MRS broth นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 6.3.1 ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วบันทึกเป็นค่าเริ่มต้น (A₀) จากนั้นเติม hexadecane 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นออกเป็น 2 ส่วน แยกส่วนน้ำออกมาซึ่งเป็นส่วนชั้นล่าง (aqueous cell suspension) มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ จากนั้นบันทึกค่า (A₁) แล้วคำนวณค่า cell surface hydrophobicity โดยใช้สูตรดังสมการต่อไปนี้

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

โดย A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และ A₁ คือค่าการดูดกลืนแสงในส่วนที่แยกชั้น (aqueous cell suspension)

ค่า cell surface hydrophobicity (%) มากกว่า 70% แสดงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่สูง (high hydrophobicity)

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

ค่า cell surface hydrophobicity (%) ต่ำกว่า 50% แสดงความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ต่ำ (low hydrophobicity)

6.3.5 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาศึกษาการเกาะกลุ่มกันเองภายในสายพันธุ์เดียวกันหรือ auto-aggregation โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 6.3.1 แล้วบันทึกค่าเริ่มต้นเป็น A₀ จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกาะกลุ่มกันจากการตกตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด

แล้วทำการเก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเชื้อส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ บันทึกเป็นค่า A₂₀ แล้วคำนวณค่า % auto-aggregation โดยใช้สูตรดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Auto-aggregation (\%)} = \frac{A_0 - A_2}{A_0} \times 100$$

โดย A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และ A₂ คือค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 2 ชั่วโมง

6.3.6 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาศึกษาการเกาะกลุ่มในสายพันธุ์ต่างกัน หรือ co-aggregation โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเลี้ยงลงใน MRS broth ส่วนแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. และ *B. cereus* นำมาเลี้ยงในอาหาร TSB จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำโดยการล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบด้วย 0.85% NaCl (w/v) แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับความเข้มข้นด้วย 0.85% NaCl (w/v) ให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการดูดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียทดสอบอย่างละ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารแขวนลอยส่วนบนนำมาวัดค่า OD₆₀₀ คำนวณค่า % co-aggregation โดยใช้สูตรดังสมการต่อไปนี้

โดย $A_{\text{co-aggregation (\%)}} = \frac{1 - A_{\text{pathogens}}}{A_{\text{mix}}}$ คือ OD₆₀₀ ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และ A_{mix} คือ OD₆₀₀ ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผสมกับเชื้อโปรไบโอติก

6.3.7 การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของโปรไบโอติกกับเซลล์

Caco-2

6.3.7.1 การเตรียมเซลล์ Caco-2

ทำการเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เติม fetal bovine serum 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 1% (v/v) ใน T-flask จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นสังเกตการเจริญ และการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โดยตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 วัน เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งมีการเจริญเต็มทีซึ่งสังเกตจากการเกาะบริเวณด้านล่างของภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้เหลือเพียงเซลล์ Caco-2 แล้วล้างด้วย PBS buffer เป็น

เวลา 5 นาที แล้วเติม 0.25% Trypsin-EDTA (w/v) 3 มิลลิลิตร บนเซลล์ให้ทั่วเพื่อให้เซลล์ที่ติดอยู่บนภาชนะแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว นำไปบ่มเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,000xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เพื่อทำเป็นเซลล์แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยไปย้อมด้วยสี trypan blue ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร แล้วนำเซลล์ไปใส่ใน 24 well plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 48 ชั่วโมง โดยเลี้ยงเซลล์จนเซลล์มีการเจริญติดที่ก้นหลุมของ 24 well plate นำเซลล์ที่ได้ไปใช้ศึกษาความสามารถในยึดเกาะของไฟโรไบโอติกกับเซลล์ Caco-2 ต่อไป

6.3.7.2 การศึกษาความสามารถการยึดเกาะของไฟโรไบโอติกกับเซลล์

Caco-2

ทำการเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อไฟโรไบโอติก โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำโดยการล้างตะกอนเซลล์ 3 รอบด้วย 0.85% NaCl (w/v) แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่เติม fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 จากนั้นศึกษาความสามารถการยึดเกาะของไฟโรไบโอติกกับเซลล์ Caco-2 โดยนำเซลล์ Caco-2 ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3.7.1 มาล้างด้วย PBS buffer 2 ครั้ง แล้วเติมสารแขวนลอยของไฟโรไบโอติกที่เตรียมไว้ลงใน 24 well plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ไฟโรไบโอติกที่ไม่ยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ด้วย PBS buffer จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำการย่อยเซลล์ Caco-2 โดยเติม 0.5% Trion X-100 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ไฟโรไบโอติกที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 แล้วคำนวณหาอัตราการยึดเกาะ (%) โดยใช้สูตรดังสมการต่อไปนี้

$$\text{อัตราการยี้ดเกาะ(\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่ยี้ดเกาะ}}{\text{จำนวนเซลล์โพรไบโอติกเริ่มต้น}} \times 100$$

6.3.8 การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง

ทำการขีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหาร blood agar (7% (sheep blood) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะอาหารรอบโคโลนี ได้แก่ ไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ -hemolysis) รอบโคโลนี เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบางส่วน (α -hemolysis) และรอบโคโลนีเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ทั้งหมด (β -hemolysis)

6.3.9 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase

นำแบคทีเรียที่เรียกรดแลคติกที่แยกได้มาตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase โดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกลงใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 6.3.1 จากนั้นดูดลงบนอาหาร MRS agar ที่เติม taurodeoxycholate (TDC) 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ bile salt hydrolase โดยจะมีตะกอนสีขาวขึ้นรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการย่อยสลายเกลือน้ำดี

6.3.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรดแลคติกที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH assay) ในการศึกษาครั้งนี้ดัดแปลงวิธีมาจาก Yang และคณะ (2020)⁽¹²⁷⁾ โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 6.3.1 แล้วเติมลงใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.4 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (กำหนดให้เป็น A_{sample})

ในขณะที่ชุดควบคุม คือ สารละลายเมทานอลที่ผสมกับสารละลาย DPPH (กำหนดให้เป็น A_{control}) จากนั้นห่อด้วยกระดาษฟอยด์นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณกิจกรรมการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตรดังสมการต่อไปนี้

$$\text{DPPH activity (\%)} = 1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

6.3.11 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero

6.3.11.1 การเตรียม เซลล์ Vero

ทำการเลี้ยงเซลล์ Vero (ATCC CCL-81) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium ที่มีการเติม fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 % (v/v) และยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin (10,000 U/ml) 1 % (v/v) ใน T-flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้บ่มที่ประกอบด้วย 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C จนกว่าเซลล์เจริญเติบโตเต็ม flask ในระหว่างนั้นทำการสังเกตการเจริญ และการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โดยตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 วัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้เหลือเพียงเซลล์ Vero แล้วล้างด้วย PBS buffer แล้วเติม 0.25% Trypsin-EDTA (w/v) 3 มิลลิลิตร บ่มในตู้ CO₂ ประมาณ 1 นาที เมื่อครบเวลานำ flask ออกมาและเคาะ flask เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิว เติมน้ำ DMEM (เพื่อยับยั้งการทำงานของ Trypsin-EDTA) 5 ml จากนั้นนำเซลล์จาก flask ใส่ลงในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร Centrifuge ที่อุณหภูมิห้อง 7000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร DMEM และนำไปย้อมด้วยสี trypan blue แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ 3×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร แล้วนำเซลล์ไปใส่ใน 96 well plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีปริมาณ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

6.3.11.2 การสกัดสารจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเลี้ยงอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนส่วนใสมากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนในที่กรองแล้วไปใช้ในการทดสอบต่อไป

6.3.11.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

นำเซลล์ Vero ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3.11.1 ดูดเอาส่วนของอาหารออกจาก 96 well plate แล้วเติมส่วนใสของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3.11.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และอาหาร DMEM 180 ไมโครลิตร ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีปริมาณ CO₂ 5% เป็น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดส่วนของอาหารออก และใส่ MTT reagent 20 ไมโครลิตร และอาหาร DMEM 80 ไมโครลิตร ต่อหลุม หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มีปริมาณ CO₂ 5% เป็น เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะนี้ MTT จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ mitochondrial reductase ได้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดอาหาร

เลี้ยงเซลล์และสารละลาย MTT ออกจากหลุม แล้วละลายผลึกformazan ด้วย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

6.3.12 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Epsilometer test (E-test)

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี E-test โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำโดยการล้างตะกอนเซลล์สองรอบด้วย 0.85% NaCl (w/v) แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาปรับความเข้มข้นด้วย 0.85% NaCl (w/v) ให้ได้ความเข้มข้นตามมาตรฐาน 0.5 McFarland Standard (1.5×10^8 cells/ml) จากนั้นใช้ไม้ปั่นสำลีปาดจากเชื้อจุ่มเชื้อที่เตรียมเอาไว้ แล้วนำไปป้ายลงบนอาหาร MRS agar ให้ทั่ว แล้วคืบแผ่นยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ gentamycin, chloramphenicol, ampicillin, erythromycin และ tetracycline วางลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตบริเวณการยับยั้งรอบแผ่นยา จากนั้นนำไปพิจารณาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed⁽¹²⁸⁾

6.3.13 การศึกษาความสามารถในการสร้างเอมีน

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอมีน โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 6.3.1 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร decarboxylase medium (ภาคผนวก ก) ที่เติมกรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ L-histidine, L-lysine, L-arginine และ L-ornithine โดยมีหลอดควบคุมเป็นหลอดที่ไม่เติมกรดอะมิโนลงไป จากนั้นเติมพาราฟินลงไปให้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นบันทึกผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ในอาหารทดสอบ โดยผลบวกคือ หลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและหลอดที่มีกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นสีม่วง ส่วนผลลบคือ หลอดควบคุมและหลอดที่มีกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

6.3.14 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกโดยวิธี next generation sequencing

6.3.14.1 การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ⁽¹²⁹⁾ ซึ่งทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย Tris-EDTA-NaCl (ภาคผนวก ข) 2 รอบ จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาละลายด้วยสารละลาย Tris-EDTA-NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยของเชื้อที่ได้ไปวางในปิกเกอร์ที่บรรจุน้ำแข็ง นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง ultra-sonicator เป็นเวลา 4 วินาที แล้วหยุด 4 วินาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ จากนั้นเติม lysozyme (ความเข้มข้น 50 mg/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออกแล้วเติมสารละลาย lysis buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% (w/v) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 (v/v) กลับหลอดขึ้นลงเบา ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบน (aqueous phase) โดยไม่ถูกส่วนที่อยู่ชั้นกลาง (interphase) ซึ่งมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ไปส่วนหลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 เท่าเดิม ทำซ้ำจนกว่ามองไม่เห็นชั้นโปรตีนที่อยู่ตรงกลาง แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสให้หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 0.5 M sodium acetate และเติมสารละลาย isopropanol แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วเติมสารละลาย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออก แล้วทำการระเหย ethanol ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE buffer แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

6.3.14.2 การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดเพื่อศึกษายีนต่าง ๆ ในโพรไบโอติก แบคทีเรีย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 6.3.10.1 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสใช้เครื่อง BGISEQ-500 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการประกอบเรียงขึ้นลำดับเบสดีเอ็นเอใหม่ (assembly) โดยใช้โปรแกรม SPAdes 3.11.1 จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์หา ยีนต่าง ๆ ดังนี้

- 1) วิเคราะห์ยีนดื้อยาปฏิชีวนะโดยฐานข้อมูล The comprehensive antibiotic resistance database (CARD, <http://arpcard.mcmaster.ca/>)
- 2) วิเคราะห์ Clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) โดยใช้ CRISPR Finder (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>) และ prophage โดยใช้ PHASTER (<https://phaster.ca/>)
- 3) วิเคราะห์หา ยีนก่อโรค โดยใช้ virulence factors database (<http://www.mgc.ac.cn/Fs/main.htm>)
- 4) วิเคราะห์หา ยีนสร้างแบคทีเรียโอซินโดยฐานข้อมูล BAGEL 4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>)
- 5) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลพันธุกรรมกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ GenBank เพื่อระบุสปีชีส์ แล้วสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA7

6.4 การผลิตผลิตภัณฑ์ขึ้นเบคอนและขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก

6.4.1 การเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสุนัขที่ผ่านการคัดเลือกและมีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปใช้ในการศึกษาดังต่อไปนี้

6.4.2 การเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติก

เลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นที่เหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ล้างตะกอนเซลล์ด้วย peptone water 2 ครั้ง จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นด้วย peptone water ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^9 - 10^{10} cfu/ml

6.4.3 การเคลือบขึ้นเบคอนและขึ้นด้บด้วยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

การเคลือบขึ้นเบคอนและขึ้นด้บด้วยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกประยุกต์ตามวิธีของ Perihan Kubra Akman และคณะ (2019)⁽¹³⁰⁾ โดยหั่นขึ้นเบคอนและขึ้นด้บให้มีขนาด 5x5 เซนติเมตร นำไปลวกในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 วินาที และ 2 นาที ตามลำดับ เพื่อฆ่าเชื้อบางส่วนที่อยู่บนขึ้นเบคอนและขึ้นด้บ จากนั้นนำไปใส่ในขวดอาหารเหลว peptone water ที่มีหัวเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกที่เตรียมไว้ในข้อ 6.4.2 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปทำให้แห้งในตู้ biosafety cabinet class 2 เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้แบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกเกาะกับขึ้นเบคอนและขึ้นด้บและระเหยน้ำส่วนเกินออก โดยขั้นตอนนี้จะมีตัวควบคุมเป็นขึ้นเบคอนและขึ้นด้บที่นำไปใส่ในขวดอาหาร peptone water แต่ไม่มีเชื้อโพรไบโอติก

6.4.4 การทำแห้งขึ้นเบคอนและขึ้นด้บที่เคลือบด้วยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

นำขึ้นเบคอนและขึ้นด้บที่เคลือบด้วยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก ในข้อ 6.4.3 มาผ่านกระบวนการทำแห้งโดยวิธีการพาหรือ convective drying โดยขั้นตอน convective drying ทำได้โดยนำขึ้นเบคอนและขึ้นด้บที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง ในเครื่องอบไอร้อน (hot air oven) จากนั้นนำขึ้นผลิตภัณฑ์มาเก็บในสภาวะสุญญากาศโดยใช้เครื่อง vacuum sealer ในถุงสุญญากาศปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมานับจำนวนของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่รอดชีวิตและวัดค่า water activity ทุก ๆ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน จากนั้นคัดเลือกเวลาในการทำแห้งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตขึ้นด้บและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก แล้วนำเวลาในการทำแห้งที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

6.4.5 การเคลือบแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในขึ้นเบคอนและขึ้นด้บด้วยอัลจินต

6.4.5.1 การเคลือบแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในขึ้นเบคอนและขึ้นด้บด้วยอัลจินตเพียงอย่างเดียว

การห่อหุ้มด้บและเบคอนด้วยไฮเดียมอัลจินตประยุกต์ตามวิธีของ Gonzalez-Forte และคณะ (2014)⁽¹⁰²⁾ ทำได้โดยเตรียมสารละลายไฮเดียมอัลจินตความเข้มข้น 2% (w/v) ละลายในน้ำกรอง จากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อผสมให้สารละลายเข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำขึ้นด้บและเบคอนที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเตรียมจากการคัดเลือกเวลาในการทำแห้งที่เหมาะสมในข้อ 6.4.4 นำมาทำการ

เคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปจุ่มลงใน 0.05 M CaCl_2 เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้โซเดียมอัลจิเนตแข็งตัว นำไปทำให้แห้งในเครื่องอบไอร้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำขึ้นผลิตภัณฑ์มาเก็บในสภาวะสุญญากาศโดยใช้เครื่อง vacuum sealer ในถุงสุญญากาศปราศจากเชื้อนำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมานับจำนวนของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่รอดชีวิตและนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ทุก ๆ 7 วัน

6.4.5.2 การเคลือบแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในชั้นเบคอนและชั้นด้วยอัลจิเนตร่วมกับกลีเซอรอล

การห่อหุ้มตับและเบคอนด้วยโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับกลีเซอรอลประยุกต์ตามวิธีของ Gonzalez-Forte และคณะ (2014)⁽¹⁰²⁾ ทำได้โดยเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% (w/v) แล้วเติมกลีเซอรอล 2% (v/v) ละลายในน้ำกรอง จากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อผสมให้สารละลายเข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตับและเบคอนที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเตรียมจากการคัดเลือกเวลาในการทำแห้งที่เหมาะสมในข้อ 6.4.4 นำมาทำการเคลือบด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ผสมกับกลีเซอรอลที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปจุ่มลงใน 0.05 M CaCl_2 เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้โซเดียมอัลจิเนตแข็งตัว นำไปทำให้แห้งในเครื่องอบไอร้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำขึ้นผลิตภัณฑ์มาเก็บในสภาวะสุญญากาศโดยใช้เครื่อง vacuum sealer ในถุงสุญญากาศปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมานับจำนวนของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่รอดชีวิตและนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ทุก ๆ 7 วัน

6.4.6 การตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์และการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

6.4.6.1 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Holda และคณะ (2017)⁽¹³¹⁾ ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการดังต่อไปนี้

6.4.6.1.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบสำหรับตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

การเตรียมตัวอย่างทดสอบและการเจือจางสำหรับตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดยนำตัวอย่างชิ้นเบคอนหรือชิ้นตับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 กรัม จากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 ใส่ลงในถุง stomacher bag เติมหอาหารเหลว peptone water ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างอาหารที่เป็น

เนื้อเดียวกันมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่าในอาหารเหลว peptone water แล้วดูตัวอย่างแต่ละความเจือจางไปนับจำนวนแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ต่อไป

6.4.6.1.2 การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำตัวอย่างสารละลายขึ้นต้นและเบคอนที่เจือจางไว้ในหัวข้อ 6.4.6.1.1 มานับจำนวนโพรไบโอติก ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3% CaCO_3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar ทำการตรวจนับแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกโดยบันทึกเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัมอาหาร (cfu/g)

6.4.6.1.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

การตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดทำได้โดยนำตัวอย่างสารละลายขึ้นต้นและเบคอนที่เจือจางไว้ในหัวข้อ 6.4.6.1.1 มานับจำนวน total aerobic bacteria ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร Plate count agar (PCA) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย โดยบันทึกเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัมอาหาร (cfu/g)

6.4.6.1.4 การตรวจนับเชื้อยีสต์และรา

การตรวจนับเชื้อยีสต์และรา ทำได้โดยนำตัวอย่างสารละลายขึ้นต้นและเบคอนที่เจือจางไว้ในหัวข้อ 6.4.6.1.1 มานับจำนวนยีสต์และรา ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) (ภาคผนวก ก) ที่เติม chloramphenicol 0.05 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจนับเชื้อ ยีสต์และรา โดยบันทึกเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัมอาหาร (cfu/g)

6.4.6.1.5 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *Salmonella* sp.

นำตัวอย่างขึ้นเบคอนหรือขึ้นต้นบดแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 กรัม จากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 ใส่ลงในถุง stomacher bag เติมน้ำอาหาร buffer peptone water (BPW) (ภาคผนวก ก) 45 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง หากมีเชื้อ *Salmonella* sp. อาหารจะเปลี่ยนสีจากใสเป็นขุ่น นำมาทดสอบต่อ โดยดูตัวอย่างที่พลเป็นบวก 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร Rappaport-Vassiliadis (RV) broth (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจาก RV broth ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose lysine deoxycholate (XLD) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลตัวอย่างที่มีลักษณะโคโลนีสีแดงใส และมีจุดสีดำอยู่ตรงกลางแสดงว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* sp.

6.4.6.2 การวัดค่า pH, water activity (A_w) และความชื้น

นำขึ้นดับและเบคอนที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกจากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปวัดค่า water activity ด้วยเครื่อง water activity meter ส่วนการวัดค่า pH นำตัวอย่างดับและเบคอนทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วมาวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter โดยวัดในช่วงเริ่มต้นและในระหว่างการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ สำหรับการวัดความชื้นทำได้โดยนำตัวอย่าง 5 กรัม ชั่งและนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้น้ำหนักคงที่ แล้วบันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น (H) จากสูตร

$$H (\%) = \frac{W_i - W_f}{W_f} \times 100$$

โดย $H(\%)$ คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น, W_i คือ น้ำหนักเริ่มต้น (ก่อนอบ) ของตัวอย่าง และ W_f คือน้ำหนักสุดท้าย (หลังอบ)

6.4.6.3 การวัดสี

นำตัวอย่างขึ้นเบคอนหรือขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกจากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 มาวัดค่าความเข้มสีที่ผิวโดยใช้เครื่อง colorimeter โดยวัดค่า luminosity L^* และค่า chromaticity a^* และ b^* ค่าที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดตัวอย่างโดยวัดซ้ำในตัวอย่างเดียวกันอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยค่า L^* ใช้กำหนดค่าความสว่าง (Lightness) ค่า a^* ใช้กำหนดสีแดงหรือสีเขียว และค่า b^* ใช้กำหนดสีเหลืองหรือสีน้ำเงิน

6.4.7 การศึกษาการอยู่รอดของโพรไบโอติกในขึ้นเบคอนและขึ้นดับอบแห้งต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลอง

6.4.7.1 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในปากจำลอง

การทดสอบการอยู่รอดในสภาวะน้ำย่อยในปากจำลองประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Quattrin และคณะ (2020)⁽¹³²⁾ ทำได้โดยนำตัวอย่างขึ้นเบคอนหรือขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 กรัม จากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 เติมด้วยน้ำย่อยในปากจำลอง (simulated salivary fluid) ที่มีค่า pH 7.5 (ภาคผนวก ข) 45 มิลลิลิตร นำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที นับจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อที่เวลา 0 และ 2 นาที โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า แล้วนำมานับจำนวนโพรไบโอติกบนอาหาร MRS agar รายงานผลเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัม (cfu/g)

6.4.7.2 การย่อยของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะจำลอง

การทดสอบการย่อยในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง ประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Ranadheera และคณะ (2012)⁽¹³³⁾ ทำได้โดยนำตัวอย่างขึ้นเบคอนหรือขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 กรัม จากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 เติมน้ำย่อยในกระเพาะจำลอง (simulated gastric fluid) ที่มีค่า pH 2 (ภาคผนวก ข) 45 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า แล้วนำมานับจำนวนโพรไบโอติกบนอาหาร MRS agar รายงานผลเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัม (cfu/g)

6.4.7.3 การย่อยของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลอง

การทดสอบการย่อยในสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลองประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Ranadheera และคณะ (2012)⁽¹³³⁾ ทำได้โดยนำตัวอย่างขึ้นเบคอนหรือขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 กรัม จากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 เติมน้ำย่อยในลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid) ที่มีค่า pH 8 (ภาคผนวก ข) 45 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นับจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อที่เวลา 0, 30, 60, 120, 180 และ 240 นาที โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า แล้วนำมานับจำนวนโพรไบโอติกบนอาหาร MRS agar รายงานผลเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัม (cfu/g)

6.4.7.4 การย่อยของเชื้อในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง

การทดสอบการย่อยในสภาวะน้ำย่อยในทางเดินอาหารจำลองประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Burca-Busaga และคณะ (2021)⁽¹³⁴⁾ ทำได้โดยนำตัวอย่างขึ้นเบคอนหรือขึ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 กรัม จากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 ใส่ในสภาวะน้ำย่อยในปากจำลอง pH 7.5 ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) จากนั้นนำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที นับจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่เวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างจากน้ำย่อยในปากจำลองมาผสมกับน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง pH 2 ในอัตราส่วน 1:5 (v/v) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อที่เวลา 60 และ 120 นาที แล้วนำตัวอย่างจากน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองไปผสมกับน้ำย่อยลำไส้จำลอง pH 8 ในอัตราส่วน 1:1.8 (v/v) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นับจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อที่เวลา 60, 120, 180 และ 240 นาที

6.4.8 การศึกษาการเกาะติดบนพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำตัวอย่างชิ้นเบคอนหรือชิ้นตับอบแห้งที่เคลือบด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกจากข้อ 6.4.4 และ 6.4.5 มาทำการดึ่งน้ำออกโดยเติม ethanol ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95 และ 100% โดยแต่ละครั้งที่เติม ethanol จะทำการทิ้งตัวอย่างไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารละลายออกแล้วค่อยเติม ethanol ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจากนั้นนำไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer แล้วติดตัวอย่างบนแผ่น stub จากนั้นนำไปเคลือบด้วยทอง แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

6.5 การทดสอบทางสถิติ

การทดสอบทางสถิติประมวลผลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS (Statistic Packages for the Social Science) version 26 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; One-way) และใช้การเปรียบเทียบด้วยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD (Fisher's Least Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกและการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Foongsawat และคณะ(2023)⁽¹³⁵⁾ ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากตัวอย่างอุจจาระของสุนัขจำนวน 12 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท โดยได้คัดเลือกเชื้อ 2 ไอโซเลทจากงานวิจัยมาศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ ไอโซเลท Pom1 และไอโซเลท Pom5 ผลการทดลองแสดงดังตาราง 3 อย่างไม่กี่ตามเมื่อนำมาทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซิน พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทไม่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้

ตาราง 3 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อไอโซเลท Pom1 และไอโซเลท Pom5

ไอโซเลท	Pom1	Pom 5
ความสามารถในการทนกรด ^a		
pH 2	+	++
pH 3	++	+++
pH 4	+++	+++
pH 5	+++	+++
ความสามารถในการทนเกลือ ^b		
0.15%	+++	+++
0.3%	++	+++
1.0%	++	++
ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง; มิลลิเมตร)		
<i>S. aureus</i>	9.31±0.11	10.14±0.15
<i>B. cereus</i>	11.22±0.12	10.68±0.11
<i>E. coli</i>	15.23±0.13	12.54±0.10
<i>Salmonella</i> sp.	-	16.58±0.12
ค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ (hydrophobicity index; %) ^c		
	88.91±0.13 (ไม่ชอบน้ำมาก)	34.89±0.05 (ไม่ชอบน้ำต่ำ)
ค่าการเกาะกลุ่มกันเอง (%autoaggregation) ^d		
	58.34±0.10 (ปานกลาง)	68.36±0.17 (ปานกลาง)

ตาราง 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	Pom1	Pom 5
ค่าการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรค ^a		
<i>S. aureus</i>	71.21±0.14 (สูง)	69.28±0.14 (ปานกลาง)
<i>B. cereus</i>	72.52±0.12 (สูง)	71.49±0.11 (สูง)
<i>E. coli</i>	68.33±0.11 (ปานกลาง)	71.38±0.02 (สูง)
<i>Salmonella</i> sp.	60.39±0.04 (ปานกลาง)	57.83±0.14 (ปานกลาง)
อัตราการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 (%)	87.63	84.25
ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase	-	-
เปอร์เซ็นต์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH activity) ^f	16.74	32.23

หมายเหตุ

+: เจริญได้เล็กน้อย, ++: เจริญได้ดี และ +++: เจริญได้ดีมากเหมือนกับ Control

^aControl คือ MRS broth ที่มีค่า pH เท่ากับ 6^bControl คือ MRS broth ที่ไม่เติมเกลือน้ำดี

^cค่าความไม่ชอบน้ำ (%hydrophobicity index) มากกว่า 70% จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำมาก (high hydrophobicity), HPBI ระหว่าง 50-70% จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำปานกลาง (moderate hydrophobicity) และ HPBI ต่ำกว่า 50% จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำต่ำ (low hydrophobicity)

^dค่าการเกาะกลุ่มกันเอง (%autoaggregation) ต่ำ หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มกันเองน้อยกว่า 50%, ปานกลาง หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มกันเองอยู่ระหว่าง 50-70% และสูง หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มกันเองมากกว่า 70%

^eค่าการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรค (%coaggregation) ต่ำ หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มน้อยกว่า 50%, ปานกลาง หมายถึง หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มอยู่ระหว่าง 50-70% และสูง หมายถึง หมายถึง ค่าการเกาะกลุ่มมากกว่า 70%

^fPositive Control ที่ใช้คือ ascorbic acid ซึ่งมีค่า (%DPPH activity) เท่ากับ 93.70%

2. การจัดจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของไอโซเลท Pom1 และ Pom5 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยการทำ PCR พบว่าขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (base pair; bp) และเมื่อนำมาจัดจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลท Pom1 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus* sp. strain CC-MHH1034 92% และไอโซเลท Pom 5 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus*

salivarius strain HBUAS54044 99% จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ Pom1 ไม่สามารถระบุปียีสได้ดังนั้น เพื่อระบุปียีสเชื้อไอโซเลท Pom1 จึงนำเชื้อไปทดสอบในการทดลองต่อไปเพื่อระบุปียีส

ตาราง 4 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับปียีสโดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลท Pom1 และ Pom5

ไอโซเลท	ผลการจัดจำแนก	Accession number	% identity
Pom1	<i>Lactobacillus</i> sp. strain CC-MHH1034	MH379635.1	92%
Pom5	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain HBUAS54044	MH473275.1	99%

4. การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือก

4.1 การตรวจสอบการสร้างเอมีน

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ decarboxylase โดยแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารและสร้างกรดทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ indicator เป็นสีเหลือง หลังจากนั้นน้ำตาลกลูโคสหมด เชื้อบางชนิดจะใช้กรดอะมิโน lysine, histidine, arginine และ ornithine ในอาหารโดยสร้างเอนไซม์ decarboxylase เกิดเป็นสารประกอบเอมีนและคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้สีของ indicator เปลี่ยนเป็นสีม่วง โดยจากการทดลองพบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถใช้กรดอะมิโน lysine, histidine, arginine และ ornithine ในการสร้างเอมีนได้

4.2 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จัดอยู่ในกลุ่ม Gamma hemolysis (γ) (ตาราง 5)

ตาราง 5 กิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือก

สายพันธุ์	Hemolysis activity	ลักษณะในการย่อยเม็ดเลือดแดง
<i>Agril. fermenti</i> Pom1	γ	
<i>Lim. fermentum</i> Pom5	γ	

4.3 การศึกษาความเป็นพิษของ cell free supernatant ต่อเซลล์ไลน์ Vero ด้วยวิธี

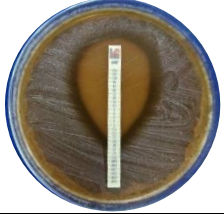
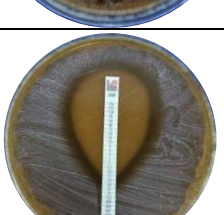
MTT colorimetric assay

นำส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell free supernatant) ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไลน์ Vero โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay จากนั้นนำไปคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง *Agril. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ 85.69% และ 91.26% ตามลำดับ

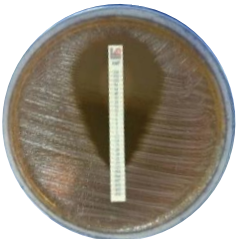
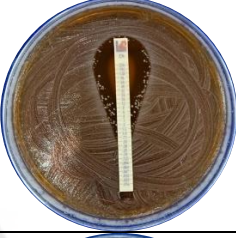
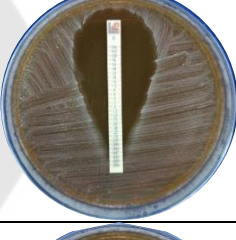
4.4 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Gentamicin, Erythromycin, Chloramphenicol และ Tetracycline โดยใช้วิธี E-test ผลการทดลองแสดงดังตาราง 6 จากการทดลองเมื่อเทียบค่า MIC ที่ได้กับค่า MIC มาตรฐานของ EFSA Panel on Additives and products or Substances Used in Animal Feed พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด

ตาราง 6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไฟโรไบโอติกที่คัดเลือก

สายพันธุ์	ชนิดยาปฏิชีวนะ	Cut-off value (mg/L)*	MIC (mg/L)	Sensitivity	ผลการทดสอบ
<i>Agri. fermenti</i> Pom1	Ampicillin	2	0.75	S	
	Gentamicin	16	7.5	S	
	Erythromycin	1	0.125	S	
	Chloramphenicol	4	4	S	
	Tetracycline	8	0.38	S	

ตาราง 6 (ต่อ)

สายพันธุ์	ชนิดยาปฏิชีวนะ	Cut-off value (mg/L)*	MIC (mg/L)	Sensitivity	ผลการทดสอบ
<i>Lim. fermentum</i> Pom5	Ampicillin	2	0.125	S	
	Gentamicin	16	7.5	S	
	Erythromycin	1	0.064	S	
	Chloramphenicol	4	3	S	
	Tetracycline	8	2	S	

หมายเหตุ; R = ดื้อ, I = ไวปานกลาง, S = ไว,* หมายถึง ค่ามาตรฐานความไวของยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกอ้างอิงตามเกณฑ์ของ EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed

5. การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกโดยวิธี next generation sequencing

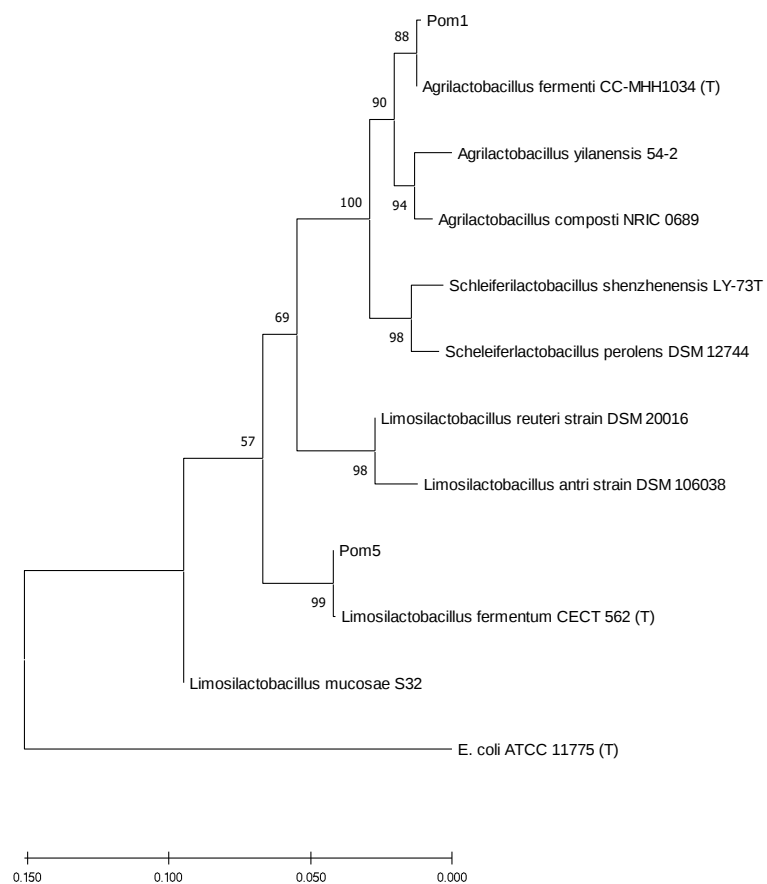
5.1 ผลการจัดจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรีย

เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียมาจัดจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลท Pom1 มีความคล้ายคลึงกับ *Agriactobacillus fermenti* 99.83% และไอโซเลท Pom 5 มีความคล้ายคลึงกับ *Limosilactobacillus fermentum* 100% (ตาราง 7) ตาราง 7 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลท Pom1 และ Pom5

ไอโซเลท	ผลการจัดจำแนก	Accession number	% identity
Pom1	<i>Agriactobacillus fermenti</i> strain CC-MHH1034 (Agril.)	MH379635.1	99.83%
Pom5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> strain HFD1 (Lim.)	CP050919.1	100%

5.2 การสร้างแผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือก

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA และใช้เชื้อ *E. coli* ATCC 11775 เป็น out group โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining โมเดล Kimura 2-parameter และกำหนดค่า bootstrap 1,000 (ภาพประกอบ 2) พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก Pom1 และ Pom5 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *Agriactobacillus fermenti* CC-MHH1034 และ *Limosilactobacillus fermentum* CECT 562 โดยมีค่า Bootstrap 88 % และ 99 % ตามลำดับ



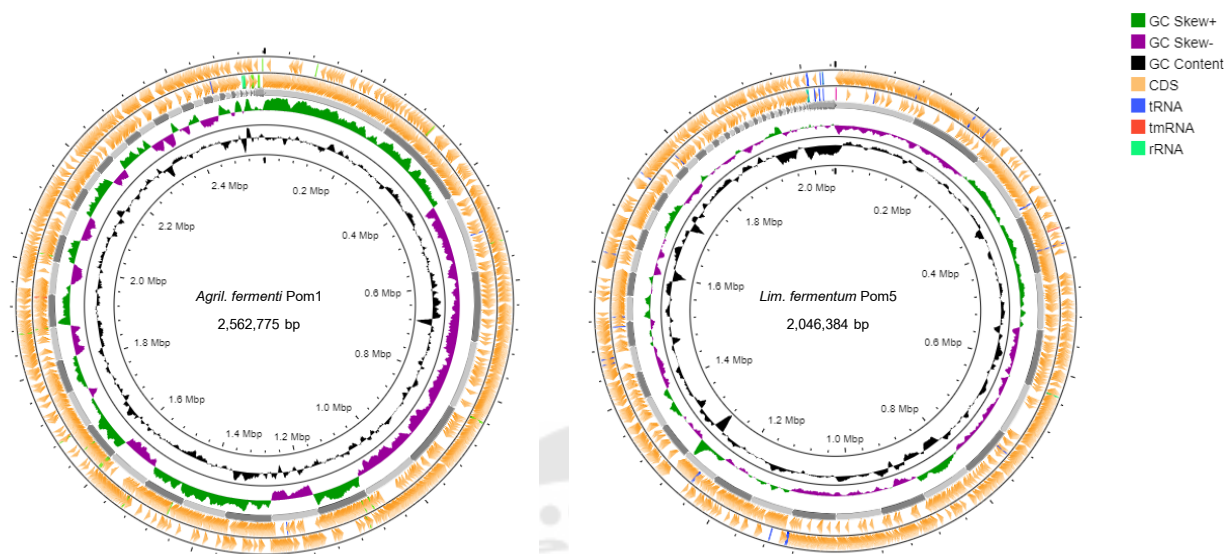
ภาพประกอบ 2 แผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ โดยตัวเลขที่ node แสดงระดับความเชื่อมั่น bootstrap (%) จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง และ scale bar แสดงอัตราการถูกแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์

5.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะจากลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก

จากผลการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะจากลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก *Agri. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 แสดงดังตาราง 7 โดยแผนที่จีโนมเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงดังภาพประกอบ 7

ตาราง 8 ลักษณะเฉพาะของจีโนมของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือก

ลักษณะเฉพาะของจีโนม	<i>Agri. fermenti</i> Pom1	<i>Lim. fermentum</i> Pom5
ขนาด (คู่เบส)	2,562,775	2,046,384
G + C content	40.2	52.0
N50 (คู่เบส)	83,936	72,163
Contigs	127	262
Plasmid	-	-
จำนวนพลาสมิด	-	-
บริเวณยีนต้านยาปฏิชีวนะ	-	-
บริเวณที่คาดว่าเป็น Prophage	3	3
บริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับ CRISPR	3	1
บริเวณยีนที่คาดว่าจะสร้างแบคทีเรียโอซิน	2	-
บริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างวิตามิน	2	2

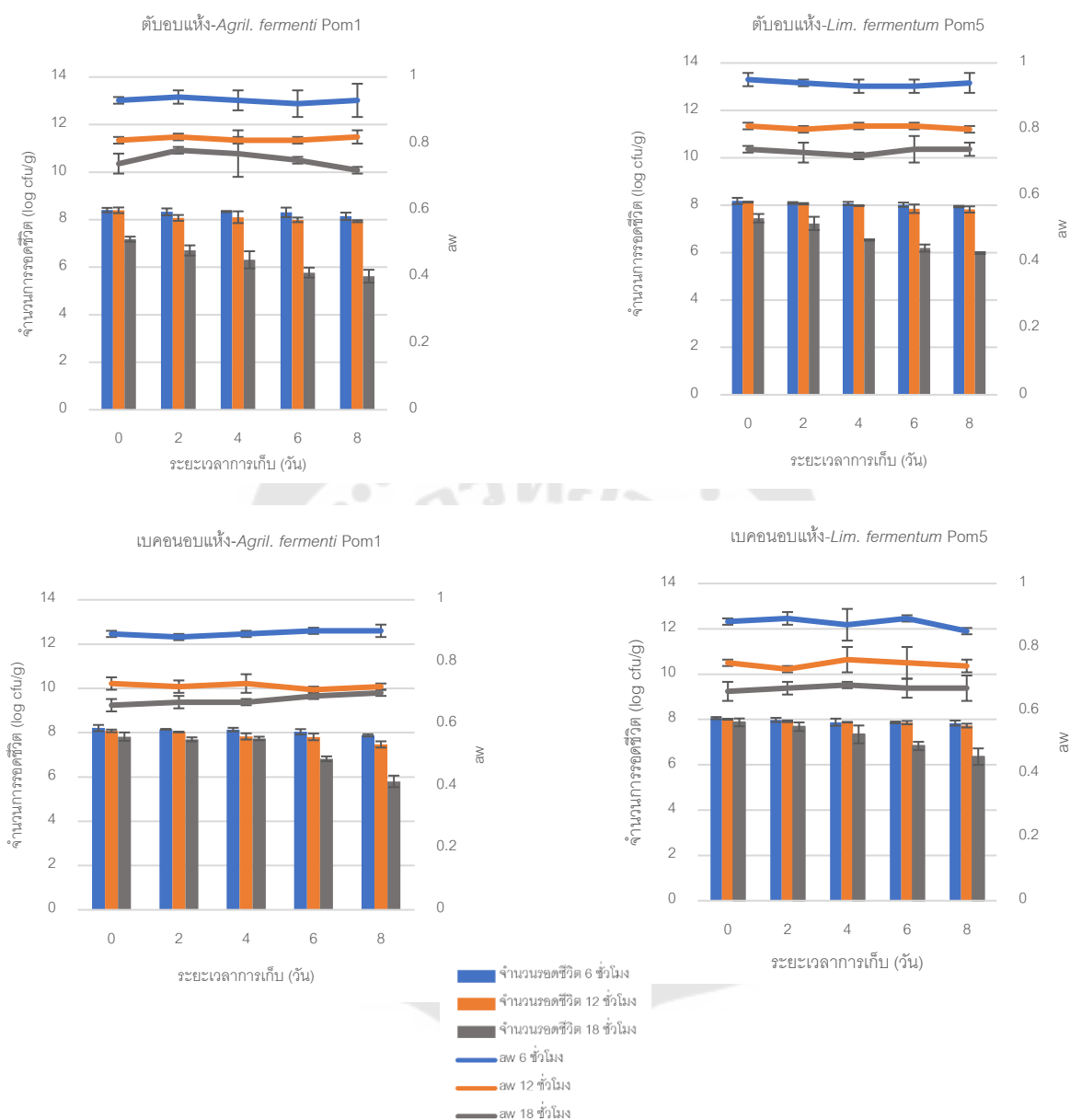


ภาพประกอบ 3 แผนที่จีโนมของเชื้อ *Agril. fermenti* Pom1 (ซ้าย) และ *Lim. fermentum* Pom5 (ขวา) โดยวงที่ 1 และ 2 ลูกศรสีส้มแสดงทิศทางการอ่าน forward และ reverse strand วงที่ 3 คือ GC skew วงที่ 4 คือ GC content วงที่ 5 ด้านในสุดคือตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ และสีแดงตำแหน่งในแผนที่คือ tRNA และ rRNA

จากผลการวิเคราะห์ยีนดื้อยาปฏิชีวนะโดยใช้ฐานข้อมูล Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) พบว่า ไม่พบยีนดื้อยาปฏิชีวนะและบริเวณยีนที่ก่อให้เกิดโรคในจีโนมของเชื้อ *Agril. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี E-test และเมื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่งพลาสมิดโดยใช้โปรแกรม PlasmidFinder พบว่า ไม่พบพลาสมิดในจีโนมของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์บริเวณที่คาดว่าเป็น Prophage โดยใช้โปรแกรม PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER) ยีนที่สร้างแบคทีริโอซินโดยใช้โปรแกรม BAGEL4 วิเคราะห์บริเวณยีนที่อาจก่อให้เกิดโรค โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล virulence factors database (VFDB) วิเคราะห์บริเวณของ Clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด พบบริเวณ prophage 3 บริเวณ และไม่พบบริเวณยีนที่ทำให้เกิดโรค โดยมีเพียงเชื้อ *Agril. fermenti* Pom1 ที่พบยีนสร้างแบคทีริโอซิน 2 ยีนได้แก่ sakacin_G_skgA2 และ amylocyclicin นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ยีนที่สร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย โดยใช้ฐานข้อมูล RAST server พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มียีนที่เกี่ยวข้องกับสร้างวิตามินบี 2 และไบโอติน 2 บริเวณ

6. ระยะเวลาในการอบขึ้นต้นและเบคอนที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบขึ้นต้นและเบคอนที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน และดูผลการรอดชีวิตของโพรไบโอติกพร้อมทั้งพิจารณาค่า a_w ต่ำสุดที่เชื้อโพรไบโอติกสามารถอยู่รอดได้มากกว่า 6 log cfu/g ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดของ FAO/WHO ให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกให้มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์ จากการทดลองพบว่า การอบต้นและเบคอนเคลือบด้วยเชื้อ *AgriL. fermenti* Pom1 ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีจำนวนการรอดชีวิตและค่า a_w แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บ 8 วัน โดยการอบต้นและเบคอนที่เวลา 18 ชั่วโมง ให้ค่า a_w ที่ต่ำที่สุดซึ่งอยู่ในช่วง 0.72-0.78 และ 0.66-0.70 ตามลำดับ แต่มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกน้อยกว่า 6 log cfu/g หลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังนั้นจึงเลือกการอบขึ้นต้นและเบคอนที่เวลา 12 ชั่วโมง เนื่องจากให้ค่า a_w ต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.81-0.82 และ 0.71-0.73 ตามลำดับ และมีจำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่า 6 log cfu/g ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา และจากทดลองเมื่อเคลือบขึ้นต้นและเบคอนด้วย *Lim. fermentum* Pom5 พบว่าการอบขึ้นต้นและเบคอนที่เวลา 18 ชั่วโมง มีค่า a_w ที่ต่ำที่สุดซึ่งอยู่ในช่วง 0.72-0.78 และ 0.66-0.68 ตามลำดับ แต่มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกน้อยกว่า 6 log cfu/g หลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 6 วัน ดังนั้นจึงเลือกการอบขึ้นต้นและเบคอนที่เวลา 12 ชั่วโมง เนื่องจากให้ค่า a_w ต่ำสุดและมีจำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่า 6 log cfu/g ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 จำนวนการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในชั้นดับและเบคอนอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน

หมายเหตุ; ผลการทดลองแสดงผลของการอบแห้งต่อจำนวนการรอดชีวิตของโปรไบโอติกและค่า a_w ในชั้นดับและเบคอนอบแห้ง โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลองสามซ้ำ

7. การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในชั้นดีบุกและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์

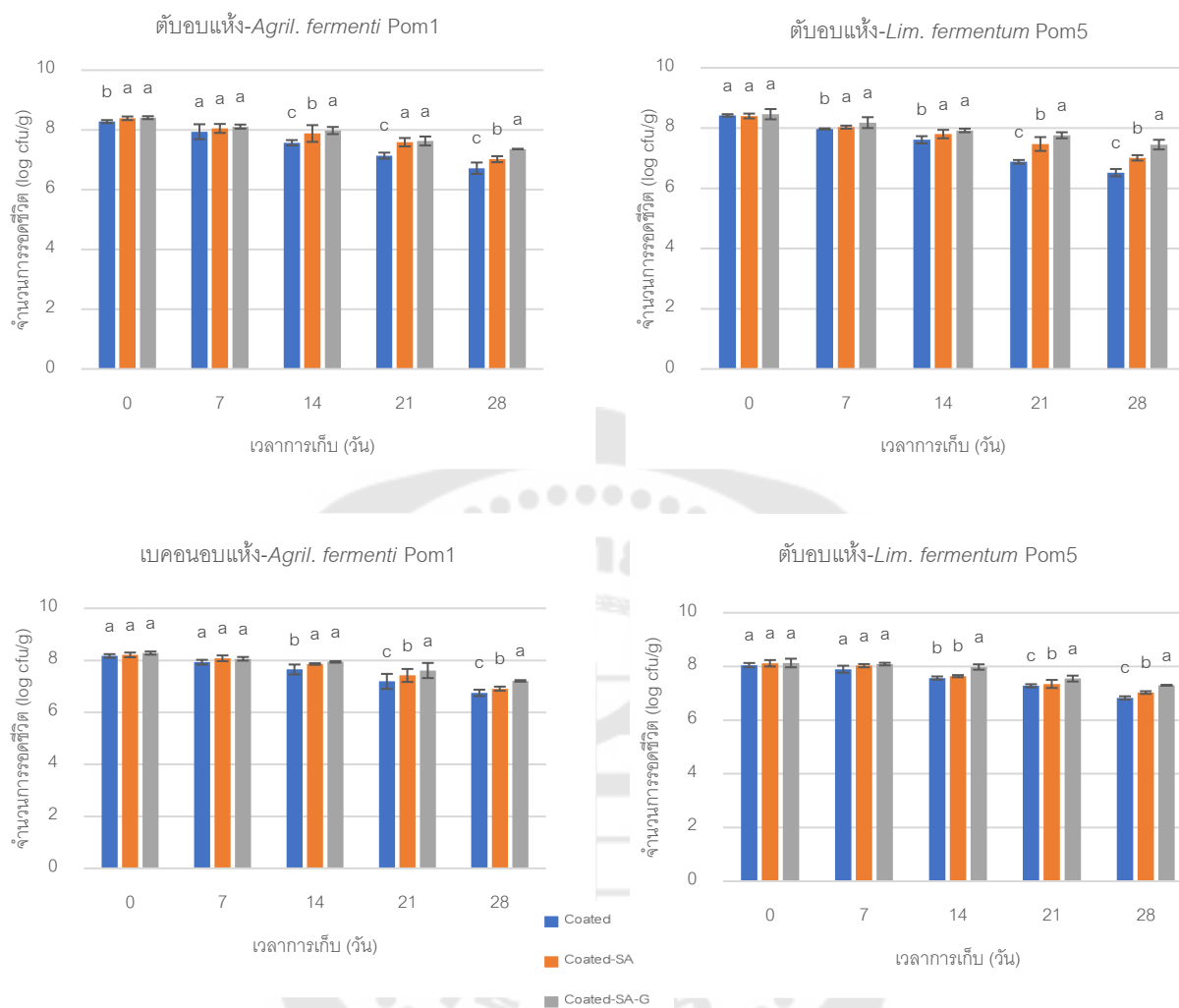
7.1 การนับจำนวนของโพรไบโอติก

7.1.1 การนับจำนวนโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์หลังจากการเก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นดีบุกและเบคอนใน 3 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว (Coated) ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไซเดียมอัลจิเนต (Coated-SA) และชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไซเดียมอัลจิเนตและกลีเซอรอล (Coated-SA-G) ผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา ชุดการทดลอง Coated-SA และ Coated-SA-G มีจำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสูงกว่าชุด Coated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และชุดการทดลอง Coated-SA-G มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากที่สุด ขณะที่ชุดการทดลอง Coated มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกน้อยที่สุด โดยทุกชุดการทดลองมีจำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่า $6 \log \text{cfu/g}$ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จากการทดลองยังพบว่า ชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบชั้นด้วยเชื้อ *Lim. fermentum* Pom5 มีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุด คือ $7.45 \pm 0.16 \log \text{cfu/g}$ (ภาพประกอบ 5)

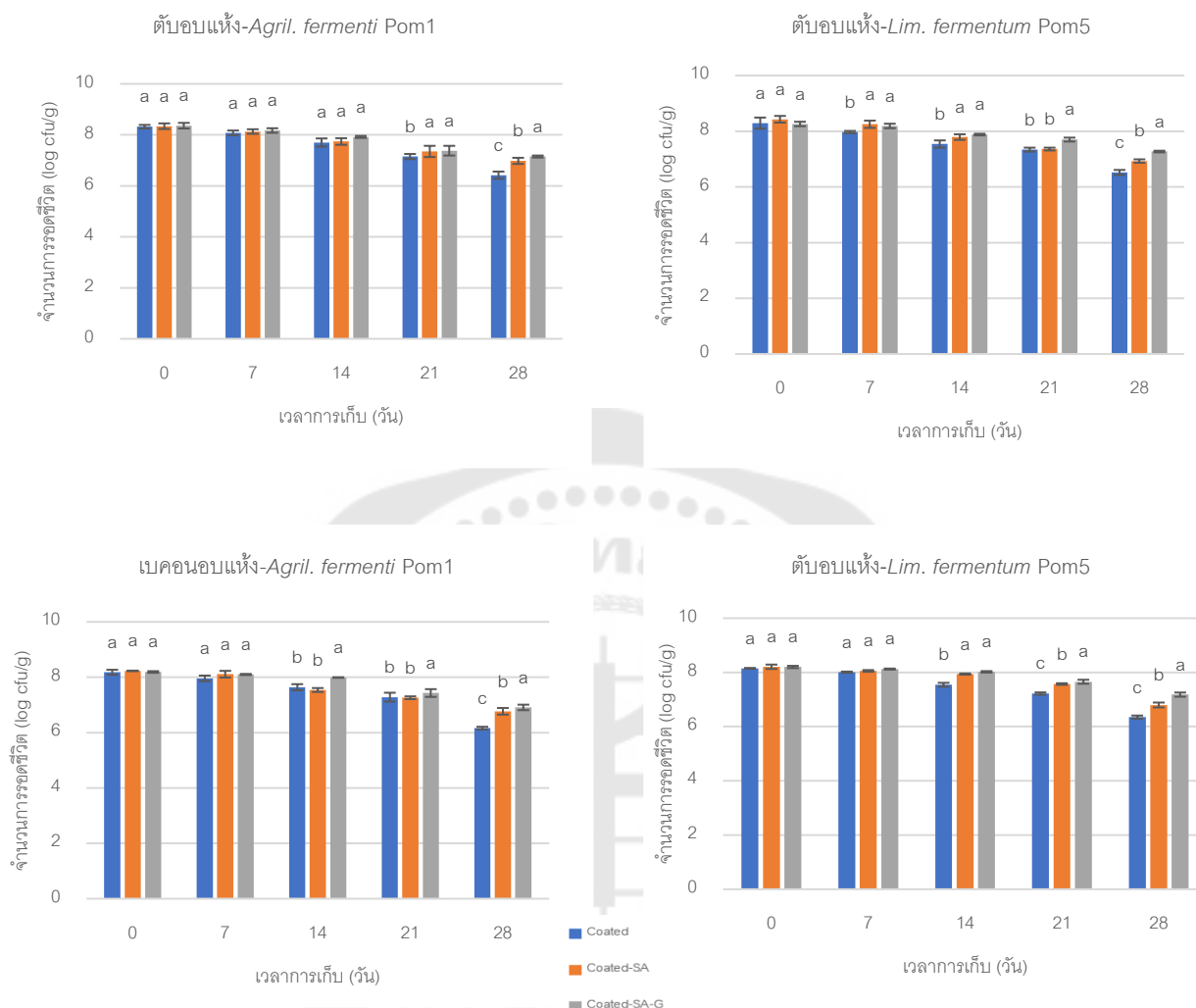
7.1.2 การนับจำนวนโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์หลังจากการเก็บอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกของชุดการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ จากการทดลองพบว่า ชุดการทดลอง Coated-SA-G มีจำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากที่สุด โดยมีจำนวนการรอดชีวิตมากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกทุกชุดการทดลองในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาพบว่า จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสสูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 5 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นดัดและเบคอนอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ Coated หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, Coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไซโตมัลลิจินิต และ Coated-SA-G หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไซโตมัลลิจินิตและกลีเซอรอล ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองในวันเดียวกัน วิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test



ภาพประกอบ 6 จำนวนการรอดชีวิตของไฟโรไบโอติกในชั้นตัมและเบคคอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ Coated หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยไฟโรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, Coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยไฟโรไบโอติกร่วมกับไซโตมัลลิจีนิต และ Coated-SA-G หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยไฟโรไบโอติกร่วมกับไซโตมัลลิจีนิตและกลีเซอรอล ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองในวันเดียวกัน วิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

7.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

7.2.1 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งที่มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน จึงต้องทำการตรวจหาปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยจากการศึกษาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในขึ้นต้นและเบคอนในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ในชุดการทดลอง Coated, Coated-SA และ Coated-SA-G และชุดควบคุมที่เคลือบด้วย peptone water เพียงอย่างเดียวไม่มีโพรไบโอติก (Control) พบว่า จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในวันที่ 0 ของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 2.10-2.31 log cfu/g โดยการเคลือบโพรไบโอติกในชุดการทดลอง Coated-SA-G ไม่ส่งผลทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control และหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 28 วัน จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 3.08-3.58 log cfu/g ซึ่งปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดยังไม่สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด (ตาราง 8)

7.2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน โดยของเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของชุดการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า ในวันที่ 0 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 2.10-2.33 log cfu/g โดยชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินตทั้ง 2 ชุดการทดลอง (Coated-SA และ Coated-SA-G) ไม่ส่งผลทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control และหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 28 วัน จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 3.20-3.81 log cfu/g ซึ่งปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดคงยังไม่สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด (ตาราง 9) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของทุกชุดการทดลองในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของทุกชุดการทดลองที่เก็บที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

7.3 การนับจำนวนยีสต์ ราและเชื้อ *Salmonella* ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาการตรวจนับจำนวนเชื้อยีสต์ ราและ *Salmonella* พบว่า ไม่พบปริมาณเชื้อยีสต์ ราและ *Salmonella* sp. ในชั้นต้นและเบคอนอบแห้งตลอดการเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน



ตาราง 9 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในขั้นตอนและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย *AgriL. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 ในระหว่างการผลิตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาเก็บ (วัน)	เบคอนแห้ง											
	สับเบแห้ง						เบคอนแช่แข็ง					
	จำนวนเชื้อ (log cfu/g)						จำนวนเชื้อ (log cfu/g)					
ในการเก็บ (วัน)	<i>AgriL. fermenti</i> Pom1			<i>Lim. fermentum</i> Pom5			<i>AgriL. fermenti</i> Pom1			<i>Lim. fermentum</i> Pom5		
	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA-G	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated-SA	Coated-SA-G
0	2.16±0.16 ^{ab}	2.26±0.11 ^{ab}	2.31±0.17 ^{ab}	2.31±0.03 ^{ab}	2.28±0.07 ^{ab}	2.37±0.05 ^{ab}	2.16±0.11 ^{ab}	2.22±0.19 ^{ab}	2.18±0.03 ^{ab}	2.14±0.16 ^{ab}	2.10±0.05 ^{ab}	2.27±0.10 ^{ab}
7	2.47±0.06 ^{ab}	2.54±0.07 ^{ab}	2.47±0.16 ^{ab}	2.55±0.06 ^{ab}	2.52±0.03 ^{ab}	2.44±0.09 ^{ab}	2.38±0.07 ^{ab}	2.53±0.14 ^{ab}	2.46±0.08 ^{ab}	2.43±0.06 ^{ab}	2.44±0.11 ^{ab}	2.39±0.08 ^{ab}
14	2.77±0.08 ^{ab}	2.88±0.10 ^{ab}	2.87±0.09 ^{ab}	2.90±0.14 ^{ab}	3.02±0.05 ^{ab}	2.92±0.04 ^{ab}	2.71±0.14 ^{ab}	2.73±0.09 ^{ab}	2.66±0.12 ^{ab}	2.65±0.18 ^{ab}	2.73±0.12 ^{ab}	2.59±0.02 ^{ab}
21	2.99±0.05 ^{ab}	3.10±0.04 ^{ab}	3.09±0.09 ^{ab}	3.17±0.05 ^{ab}	3.25±0.07 ^{ab}	3.11±0.06 ^{ab}	2.93±0.04 ^{ab}	3.04±0.12 ^{ab}	2.97±0.06 ^{ab}	3.05±0.03 ^{ab}	3.04±0.04 ^{ab}	2.97±0.05 ^{ab}
28	3.21±0.10 ^{ab}	3.20±0.10 ^{ab}	3.46±0.17 ^{ab}	3.58±0.14 ^{ab}	3.50±0.13 ^{ab}	3.29±0.12 ^{ab}	3.12±0.06 ^{ab}	3.10±0.04 ^{ab}	3.06±0.04 ^{ab}	3.10±0.11 ^{ab}	3.22±0.08 ^{ab}	3.13±0.14 ^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษรในเซลล์แสดงถึงการทดลองที่คล้ายคลึงกัน ไม่ใช้ตัวอักษรที่แตกต่างกันเพื่อแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในระหว่างการทดลองที่คล้ายคลึงกัน, coated-SA-G หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกและกรดแลคติก และ Control หมายถึง ชุดควบคุมที่เคลือบด้วย phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ± SD จากการทดลองสามซ้ำ สำหรับการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในแง่ของเวลาที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) ในแต่ละวัน นี้จะหมายถึงใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

ตาราง 10 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในขั้นต้นและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย *AgriL fermenti Pom1* และ *Lim. fermentum Pom5* ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

		เบคอนอบแห้ง									
		ต้นแบ้ง					จำนวนเชื้อ (log cfu/g)				
ระยะเวลาเก็บ (วัน)	ในการเก็บ (วัน)	AgriL fermenti Pom1					Lim. fermentum Pom5				
		Coated-SA-G		Coated-SA-G		Control	Coated-SA-G		Coated-SA-G		Control
		Coated	Coated-SA-G	Coated	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA-G	Coated	Coated-SA-G	Control
0		2.14±0.14 ^{ab}	2.29±0.15 ^{ab}	2.24±0.13 ^{ab}	2.18±0.11 ^{ab}	2.17±0.13 ^{ab}	2.33±0.14 ^{ab}	2.26±0.16 ^{ab}	2.19±0.13 ^{ab}	2.10±0.08 ^{ab}	2.18±0.14 ^{ab}
7		2.55±0.07 ^{abc}	2.57±0.19 ^{abc}	2.69±0.05 ^{abc}	2.64±0.16 ^{abc}	2.45±0.04 ^{abc}	2.63±0.10 ^{abc}	2.51±0.15 ^{abc}	2.48±0.20 ^{abc}	2.41±0.09 ^{abc}	2.35±0.09 ^{abc}
14		2.74±0.10 ^{cd}	2.88±0.06 ^{cd}	2.79±0.11 ^{cd}	2.80±0.10 ^{cd}	2.69±0.10 ^{cd}	2.94±0.15 ^{cd}	2.75±0.08 ^{cd}	2.80±0.07 ^{cd}	2.53±0.07 ^{cd}	2.51±0.13 ^{cd}
21		3.21±0.07 ^{cd}	3.39±0.16 ^{cd}	3.19±0.27 ^{cd}	3.14±0.07 ^{cd}	3.34±0.29 ^{cd}	3.51±0.06 ^{cd}	3.17±0.06 ^{cd}	3.09±0.01 ^{cd}	2.88±0.02 ^{cd}	2.66±0.15 ^{cd}
28		3.60±0.25 ^{cd}	3.81±0.07 ^{cd}	3.65±0.13 ^{cd}	3.72±0.10 ^{cd}	3.43±0.18 ^{cd}	3.71±0.15 ^{cd}	3.52±0.14 ^{cd}	3.74±0.03 ^{cd}	3.20±0.12 ^{cd}	3.27±0.03 ^{cd}

หมายเหตุ: ตัวอักษรใน column หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกและกรดลิกเซอร์ และ Control หมายถึง ชุดควบคุมที่เคลือบด้วย polyethylene glycol เพียงอย่างเดียวไม่มีโพรไบโอติก ผลการทดลองแสดงให้เห็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในใหญ่นิพจน์ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) ในคอลัมน์เดียวกัน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่พิมพ์เล็กในบรรทัดบนแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) ในแถวเดียวกัน วิเคราะห์โดยใช้ค่าความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

8. การวัดค่า a_w ในขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก

8.1 การวัดค่า a_w ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

ค่า a_w สามารถบอกถึงอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นสิ่งสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ซึ่งจากการศึกษาการวัดค่า a_w ของขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน พบว่า ค่า a_w ของขึ้นต้นและเบคอนทุกชุดการทดลองในวันที่ 0 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า a_w อยู่ในช่วง 0.80-0.81 และ 0.72-0.75 ตามลำดับ และหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 28 วัน ค่า a_w ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกชุดการทดลองเช่นกัน โดยค่า a_w อยู่ในช่วง 0.80-0.81 และ 0.72-0.74 ตามลำดับ (ตาราง 10)

8.2 การวัดค่า a_w ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาการวัดค่า a_w ของขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบค่า a_w ขึ้นต้นและเบคอนของชุดการทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ จากการทดลองพบว่า ค่า a_w ของขึ้นต้นและเบคอนทุกชุดการทดลองในวันที่ 0 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า a_w อยู่ในช่วง 0.80-0.82 และ 0.70-0.74 ตามลำดับ และหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 28 วัน ค่า a_w ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกชุดการทดลองเช่นกัน โดยอยู่ในช่วง 0.80-0.82 และ 0.72-0.73 ตามลำดับ (ตาราง 11)

ตาราง 11 ค่า water activity (aw) เปรียบเทียบและเปรียบเทียบที่เคลือบด้วย *AgriL fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom 5 ในระหว่างการผลิต
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

		เปรียบเทียบ									
		เปรียบเทียบ					เปรียบเทียบ				
ระยะเวลา		ค่า aw					ค่า aw				
ในการเก็บ (วัน)		<i>AgriL fermenti</i> Pom1					<i>Lim. fermentum</i> Pom5				
		<i>AgriL fermenti</i> Pom1					<i>Lim. fermentum</i> Pom5				
		Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA-G
0		0.81±0.01 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.73±0.03 ^{ab}	0.74±0.05 ^{ab}
8		0.81±0.02 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.73±0.02 ^{ab}	0.72±0.01 ^{ab}
14		0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.03 ^{ab}	0.72±0.01 ^{ab}	0.73±0.03 ^{ab}
21		0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.04 ^{ab}	0.72±0.01 ^{ab}	0.75±0.04 ^{ab}
28		0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.73±0.02 ^{ab}	0.74±0.02 ^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษร หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพลิแลกติกเพียงอย่างเดียว, coated-SA หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพลิแลกติกกับโพลิเอสเตอร์, coated-SA-G หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพลิแลกติกกับโพลิเอสเตอร์และโกลีติน และ Control หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วย peptone water เพียงอย่างเดียว ไม่ใส่โพลิแลกติก ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง อัตราการเจริญเติบโตในบรรจุภัณฑ์แตกต่างกันเล็กน้อย และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ติดในจำนวนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในแผนการวิเคราะห์ (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

ตาราง 12 ค่า water activity (a_w) ในขั้นตอนและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย AgriL fermenti Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 ในระหว่างการเก็บอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เบคอนอบแห้ง													
ค่า a_w													
AgriL fermenti Pom1													
Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated-SA-G	Control
0	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.82±0.03 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.82±0.02 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.79±0.01 ^{ab}	0.72±0.01 ^{ab}	0.71±0.01 ^{ab}	0.74±0.03 ^{ab}	0.73±0.01 ^{ab}
7	0.81±0.01 ^{ab}	0.82±0.02 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.82±0.02 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.82±0.02 ^{ab}	0.80±0.03 ^{ab}	0.83±0.01 ^{ab}	0.71±0.02 ^{ab}	0.73±0.03 ^{ab}	0.71±0.04 ^{ab}	0.73±0.02 ^{ab}	0.75±0.02 ^{ab}
14	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.80±0.02 ^{ab}	0.81±0.03 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.75±0.04 ^{ab}	0.73±0.02 ^{ab}	0.72±0.03 ^{ab}	0.73±0.01 ^{ab}	0.73±0.03 ^{ab}
21	0.81±0.02 ^{ab}	0.83±0.02 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.82±0.02 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.81±0.03 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.74±0.04 ^{ab}	0.74±0.03 ^{ab}	0.72±0.04 ^{ab}	0.73±0.01 ^{ab}	0.74±0.05 ^{ab}
28	0.81±0.01 ^{ab}	0.82±0.02 ^{ab}	0.80±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.81±0.01 ^{ab}	0.81±0.02 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.79±0.01 ^{ab}	0.72±0.01 ^{ab}	0.71±0.01 ^{ab}	0.73±0.01 ^{ab}	0.72±0.01 ^{ab}

30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: ตัวอักษร หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, coated-SA หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบโพรไบโอติกร่วมกับโกลดิเนชัน, coated-SA-G หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบโพรไบโอติกกับโกลดิเนชันและกลีเซอรอล และ Control หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วย propylene glycol ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ให้อยู่ในหน่วยที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ในกรณีเดียววัน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ในกรณีเดียววัน หรือการใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

9. การวัดค่าความชื้นในชั้นดัดและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยไฟโรไบโอติก

9.1 การวัดค่าความชื้นในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน พบว่าค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนอบแห้งในชุดการทดลอง Coated, Coated-SA และ Coated-SA-G และชุด Control ที่เคลือบด้วย peptone water เพียงอย่างเดียวไม่มีไฟโรไบโอติก มีค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนอยู่ในช่วง 11.50- 20.02% ในวันที่ 0 โดยการเคลือบชั้นดัดและเบคอนด้วยไฟโรไบโอติกและอัลจินตของชุดการทดลองทั้ง 3 ชุด ไม่ส่งผลทำให้ค่าความชื้นสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control และในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 12.85-20.65% (ตาราง 12)

9.2 การวัดค่าความชื้นในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการศึกษาค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า ค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 11.07-23.00% ในวันที่ 0 โดยเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ การเคลือบชั้นดัดและเบคอนด้วยไฟโรไบโอติกและอัลจินตของชุดการทดลองทั้ง 3 ชุด ไม่ส่งผลทำให้ค่าความชื้นสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control และในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาค่าความชื้นของชั้นดัดและเบคอนในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 10.94-21.52% (ตาราง 13)

ตาราง 14 แสดงผลค่าความชื้นในผลิตภัณฑ์ที่เก็บและเก็บคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย *AgriL. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 ในระหว่าง
การเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

		ต้นอบแห้ง				แปกรอบแห้ง			
ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)		ค่าความชื้น (%)				ค่าความชื้น (%)			
		<i>AgriL. fermenti</i> Pom1				<i>AgriL. fermenti</i> Pom1			
		<i>Coated-SA-G</i>		<i>Lim. fermentum</i> Pom5		<i>Coated-SA-G</i>		<i>Lim. fermentum</i> Pom5	
		Coated	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated	Coated-SA-G	Control	Coated-SA-G
0		20.29±0.05 ^{ab}	21.23±0.04 ^{ab}	20.17±0.01 ^a	19.77±0.03 ^{ab}	23.01±0.02 ^{ab}	20.65±0.05 ^{ab}	20.90±0.02 ^{ab}	20.70±0.04 ^{ab}
7		20.62±0.02 ^{ab}	21.03±0.03 ^{ab}	20.00±0.04 ^{ab}	19.72±0.02 ^{ab}	22.87±0.06 ^{ab}	20.80±0.03 ^{ab}	19.90±0.01 ^a	20.61±0.05 ^{ab}
14		20.31±0.03 ^{ab}	22.00±0.08 ^{ab}	20.61±0.04 ^{ab}	19.76±0.06 ^{ab}	20.71±0.02 ^{ab}	20.78±0.04 ^{ab}	21.93±0.02 ^{ab}	18.94±0.01 ^a
21		19.40±0.15 ^{ab}	19.43±0.02 ^{ab}	21.59±0.03 ^{ab}	21.76±0.02 ^{ab}	21.57±0.01 ^a	21.30±0.07 ^{ab}	18.66±0.04 ^{ab}	21.33±0.11 ^{ab}
28		19.36±0.02 ^{ab}	20.05±0.02 ^{ab}	20.03±0.02 ^{ab}	20.34±0.06 ^{ab}	20.46±0.02 ^{ab}	21.52±0.02 ^{ab}	21.02±0.03 ^{ab}	21.50±0.02 ^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษรใน column หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, *coated-SA-G* หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกและตัวเคลือบและเคลือบ และ Control หมายถึง ผลการอบแห้งที่เคลือบด้วย *coated-SA-G* เพียงอย่างเดียวในโพรไบโอติก ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษในหัวมุมแสดงถึงผลต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในคอลัมน์เดียวกัน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) ในแถวเดียวกัน ซึ่งค่าที่ได้มานี้เป็นการเปรียบเทียบระหว่าง *One-Way ANOVA*) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

10. การวัดค่า pH ในขึ้นต้นและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก

10.1 การวัดค่า pH ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการวัดค่า pH ของขึ้นเบคอนและตับอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบขึ้นต้นและเบคอนที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์เพียงอย่างเดียว โพรไบโอติกร่วมกับโซเดียมอัลจิเนต โพรไบโอติกร่วมกับโซเดียมอัลจิเนตและกลีเซอรอล และชุด Control ที่เคลือบด้วย peptone water พบว่า ในวันที่ 0 ของการเก็บรักษาค่า pH ของต้นและเบคอนในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 5.98-6.78 และ 5.98-6.76 ตามลำดับ โดยจากการทดลองการเคลือบโพรไบโอติกลงในขึ้นเบคอนและตับไม่ส่งผลทำให้ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control ที่เคลือบด้วย peptone water เพียงอย่างเดียว และในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาค่า pH ของต้นและเบคอนในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 6.17-6.94 และ 6.25-7.22 ตามลำดับ (ตาราง 14)

10.2 การวัดค่า pH ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

จากการวัดค่า pH ของขึ้นเบคอนและตับอบแห้งในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบค่า pH ขึ้นต้นและเบคอนของชุดการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า ในวันที่ 0 ของการเก็บรักษาค่า pH ของต้นและเบคอนในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 5.98-6.78 และ 5.98-6.76 ตามลำดับ โดยจากการทดลองการเคลือบโพรไบโอติกลงในขึ้นเบคอนและตับไม่ส่งผลทำให้ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control ที่เคลือบด้วย peptone water เพียงอย่างเดียว และในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาค่า pH ของต้นและเบคอนในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 6.26-7.21 ตามลำดับ (ตาราง 15)

ตาราง 15 ค่า pH ในขั้นตอนและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย *Agri. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom 5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สแตชัน	เบคอนแห้ง														
	สแตชันที่ 1						สแตชันที่ 2								
	Agri. ferment Pom1		Lim. fermentum Pom5		Lim. fermentum Pom6		Agri. ferment Pom1		Lim. fermentum Pom5		Lim. fermentum Pom6				
วันที่ เก็บ (วัน)	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control			
0	6.12±0.21 ^{abc}	6.44±0.25 ^{ab}	6.30±0.16 ^{abc}	5.98±0.11 ^{ab}	6.35±0.08 ^{ab}	6.76±0.04 ^{ab}	6.24±0.04 ^{ab}	6.28±0.15 ^{ab}	6.08±0.10 ^{ab}	6.73±0.16 ^{ab}	5.98±0.13 ^{ab}	6.76±0.11 ^{ab}	6.41±0.08 ^{ab}	6.53±0.08 ^{ab}	6.74±0.14 ^{ab}
7	6.16±0.17 ^{abc}	6.36±0.27 ^{ab}	6.31±0.29 ^{ab}	6.39±0.04 ^{ab}	6.76±0.22 ^{ab}	6.41±0.09 ^{ab}	6.15±0.12 ^{ab}	6.34±0.09 ^{ab}	6.81±0.17 ^{ab}	6.56±0.17 ^{abc}	6.33±0.06 ^{ab}	7.27±0.17 ^{ab}	5.84±0.11 ^{ab}	6.27±0.09 ^{ab}	6.63±0.03 ^{ab}
14	6.09±0.02 ^{ab}	6.34±0.13 ^{ab}	6.00±0.14 ^{ab}	6.37±0.06 ^{ab}	5.86±0.07 ^{ab}	6.81±0.03 ^{ab}	6.69±0.06 ^{ab}	6.86±0.04 ^{ab}	7.19±0.08 ^{ab}	6.59±0.23 ^{ab}	6.97±0.17 ^{ab}	6.86±0.16 ^{ab}	6.49±0.15 ^{ab}	7.16±0.11 ^{ab}	6.81±0.06 ^{ab}
21	6.25±0.01 ^{abc}	6.49±0.12 ^{ab}	6.66±0.11 ^{ab}	6.26±0.25 ^{ab}	6.39±0.06 ^{ab}	6.16±0.14 ^{ab}	6.52±0.05 ^{ab}	7.12±0.10 ^{ab}	7.00±0.19 ^{abc}	6.26±0.08 ^{ab}	6.57±0.26 ^{ab}	6.65±0.13 ^{ab}	6.60±0.11 ^{ab}	6.30±0.07 ^{ab}	6.31±0.03 ^{ab}
28	6.39±0.22 ^{ab}	6.37±0.16 ^{ab}	6.44±0.07 ^{ab}	6.24±0.19 ^{ab}	6.26±0.09 ^{ab}	6.41±0.08 ^{ab}	6.17±0.07 ^{ab}	6.94±0.09 ^{ab}	6.26±0.09 ^{ab}	6.66±0.17 ^{ab}	6.09±0.06 ^{ab}	6.52±0.17 ^{ab}	6.63±0.20 ^{ab}	6.25±0.06 ^{ab}	6.56±0.05 ^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษร ccoated หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, ccoated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับเชื้อแลคติกซอร์บ และ Control หมายถึง ชุดควบคุมที่เคลือบด้วย propionexvaster ที่ใช้อย่างเดียว ไม่ใช่โพรไบโอติก ผลการทดลองแสดงให้เห็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ สำหรับค่า pH ที่แสดงในตารางนี้ และตัวอักษรภาษาอังกฤษกลุ่มตัวอักษรเล็กในแนวทแยงแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแผนเสียงที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเสียง (One-way ANOVA) กลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

ตาราง 16 ค่า pH ในขั้นตอนและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย *AgriL fermentum* Pom 1 และ *Lim. fermentum* Pom 5 ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนแห้ง		ขั้นตอนแห้ง									
		ค่า pH									
ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)		AgriL fermentum Pom1					Lim. fermentum Pom5				
		Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA	Coated-SA-G	Control	Coated	Coated-SA-G
0		6.37±0.06 ^{ab}	7.14±0.16 ^{ab}	6.53±0.05 ^{ab}	6.65±0.13 ^{ab}	6.42±0.16 ^{ab}	6.79±0.06 ^{ab}	6.53±0.06 ^{ab}	6.51±0.04 ^{ab}	6.26±0.07 ^{ab}	6.44±0.12 ^{ab}
7		6.73±0.14 ^{ab}	6.29±0.07 ^{ab}	6.47±0.15 ^{ab}	6.13±0.17 ^{ab}	6.31±0.13 ^{ab}	6.58±0.09 ^{ab}	6.16±0.05 ^{ab}	6.53±0.08 ^{ab}	6.73±0.04 ^{ab}	6.01±0.02 ^{ab}
14		6.45±0.09 ^{ab}	6.96±0.07 ^{ab}	6.11±0.14 ^{ab}	6.72±0.07 ^{ab}	6.28±0.10 ^{ab}	6.50±0.02 ^{ab}	6.76±0.11 ^{ab}	6.55±0.04 ^{ab}	6.20±0.11 ^{ab}	7.04±0.10 ^{ab}
21		6.13±0.08 ^{ab}	6.57±0.16 ^{ab}	6.22±0.06 ^{ab}	6.20±0.12 ^{ab}	6.03±0.06 ^{ab}	7.23±0.09 ^{ab}	6.16±0.07 ^{ab}	6.70±0.11 ^{ab}	6.72±0.06 ^{ab}	7.17±0.11 ^{ab}
28		6.33±0.12 ^{ab}	6.62±0.03 ^{ab}	6.46±0.07 ^{ab}	6.67±0.06 ^{ab}	7.21±0.04 ^{ab}	6.94±0.07 ^{ab}	6.67±0.04 ^{ab}	6.38±0.12 ^{ab}	6.35±0.08 ^{ab}	6.74±0.09 ^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษรใน superscript หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, coated-SA หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกและกรดแลคติก, coated-SA-G หมายถึง ผลการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกกับโพรไบโอติกและกรดแลคติกและด้วย *peptone water* ที่เลี้ยงอย่างแอโรบิก ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ สำหรับค่าทางสถิติที่แตกต่างในแนวตั้งที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ในคอลัมน์เดียวกัน และสำหรับค่าทางสถิติที่แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแถวเดียวกัน จินตนาการโดยใช้ความแปรปรวนเดียว (One-way ANOVA) จัดกลุ่มและกล่าวถึงค่าเฉลี่ย

11. การวัดสีในชั้นต้นและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก

จากการนำชั้นต้นและเบคอนอบแห้งมาวิเคราะห์ค่าสี ผลการวัดค่าสี L^* (ค่าความสว่าง), a^* (ค่าสีแดง) และ b^* (ค่าสีเหลือง) พบว่า ชั้นต้นชุดการทดลอง Coated-SA และ Coated-SA-G มีค่าความสว่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control ซึ่งเห็นว่าการเคลือบชั้นต้นด้วยอัลจินเตมีผลทำให้ค่าความสว่างชั้นต้นเพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่าความสว่างอยู่ในช่วง 20.91-27.08 ในขณะที่ชุดการทดลอง Coated ไม่ส่งผลทำให้ค่าความสว่างเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเคลือบด้วยอัลจินเตไม่ส่งผลทำให้ค่าสีแดงและสีเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากการวิเคราะห์ค่าสีของชั้นเบคอนพบว่า ชั้นเบคอนชุดการทดลอง Coated-SA, Coated-SA-G และ Coated ไม่ส่งผลต่อค่าความสว่าง ค่าสีแดงและสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control ซึ่งจากผลการทดลองค่าของความสว่าง ค่าสีแดงและค่าสีเหลืองของเบคอนมีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกัน (ตาราง 16)



ตาราง 17 แสดงการวัดสีของเบคอนและตับอบแห้งที่เคลือบด้วยด้วย *AgriL. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom 5

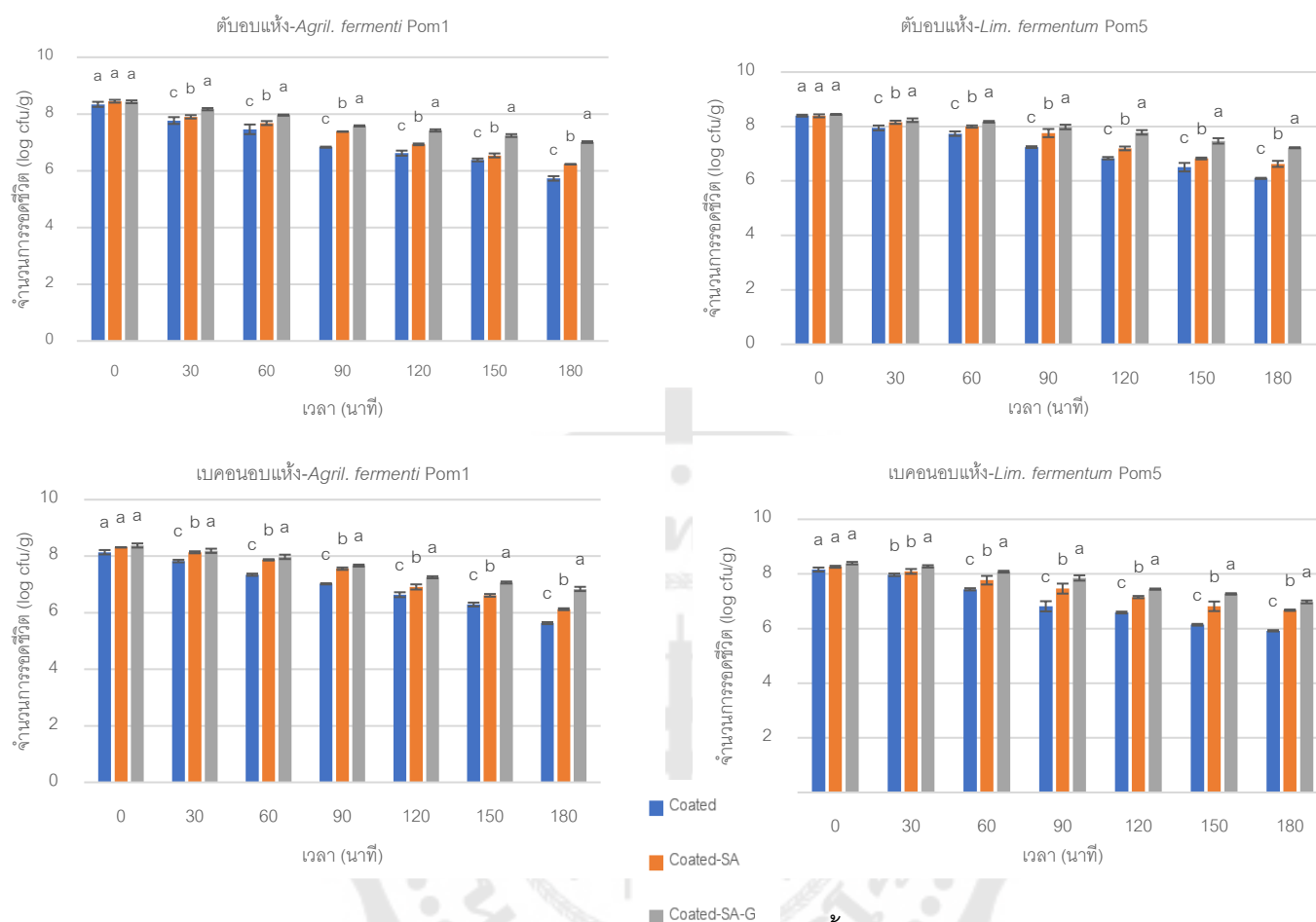
ตัวอย่าง	ตับอบแห้ง						เบคอนอบแห้ง					
	ค่าสี						ค่าสี					
	<i>AgriL. fermenti</i> Pom1						<i>Lim. fermentum</i> Pom5					
	L*	s*	b*	L*	s*	b*	L*	s*	b*	L*	s*	b*
Control	19.25±1.99 ^a	1.10±5.93 ^a	-0.43±7.99 ^a	19.71±3.02 ^a	2.99±5.20 ^a	3.09±6.35 ^a	36.36±5.59 ^b	3.38±2.97 ^a	10.79±7.49 ^a	35.50±5.35 ^a	8.16±14.89 ^a	10.95±3.68 ^a
Coated	20.16±5.17 ^a	2.23±5.53 ^b	-2.44±9.82 ^a	20.27±4.52 ^a	4.32±4.89 ^a	5.25±5.28 ^a	37.50±5.76 ^b	9.59±5.94 ^a	18.35±7.40 ^a	39.97±6.67 ^a	3.65±3.35 ^a	11.23±5.06 ^a
Coated-SA	22.63±5.13 ^b	6.17±9.38 ^a	4.07±6.30 ^a	20.91±5.37 ^a	1.53±8.66 ^a	3.31±10.79 ^a	33.14±4.52 ^a	6.13±2.27 ^a	10.81±2.95 ^b	36.76±10.02 ^a	6.86±8.10 ^b	3.55±6.34 ^a
Coated-SA-G	27.06±4.36 ^b	1.77±5.61 ^a	0.86±9.89 ^b	20.54±6.76 ^a	3.38±3.71 ^b	-0.50±5.22 ^a	29.56±6.56 ^a	8.11±3.46 ^b	6.19±6.85 ^a	32.34±7.63 ^a	6.04±3.73 ^a	7.73±4.81 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรใน code หมายถึง ผลการทดสอบที่เคลือบด้วยไฟฟราโมลิกที่เหมือนกันอย่างเดียว, code-d-SA หมายถึง ผลการทดสอบที่เคลือบด้วยไฟฟราโมลิกที่เหมือนกันในเชื้อเพลิงโมล, code-d-SA-G หมายถึง ผลการทดสอบที่เคลือบด้วยไฟฟราโมลิกที่เหมือนกันในเชื้อเพลิงโมลและเชื้อเพลิงซอร์บ และ Control หมายถึง ผลการทดสอบที่เคลือบด้วย papadone-gather เพียงอย่างเดียวไม่ใส่ไฟฟราโมลิก ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดสอบสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในบรรทัดที่ไม่ใช่เครื่องหมายแสดงทางสถิติ (<0.05) ในระดับเดียวกัน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแถวเดียวกัน หมายความว่าใช้ค่าตามแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

12. การศึกษาการอยู่รอดของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนภายใต้สภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลอง

12.1 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะจำลอง

การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในสภาวะกรดนั้น เพื่อจำลองสภาวะของกระเพาะอาหารของร่างกาย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกต้องทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะเพื่อทำให้สามารถเดินทางไปยังบริเวณเป้าหมายและให้ประโยชน์ต่อร่างกายได้ จากการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกต่อสภาวะในระบบกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2 เป็นเวลา 180 นาที พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาบ่มเพิ่มขึ้น โดยหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 180 นาที ทุกชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบตับและเบคอนด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าชุดการทดลอง Coated-SA และชุดการทดลอง Coated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจะเห็นได้ว่าชุดการทดลอง Coated มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกลดลงน้อยที่สุด โดยชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบตับด้วยโพรไบโอติก *Lim. fermentum* Pom5 มีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุด คือ $7.22 \pm 0.02 \log \text{ cfu/g}$ (ภาพประกอบ 7)



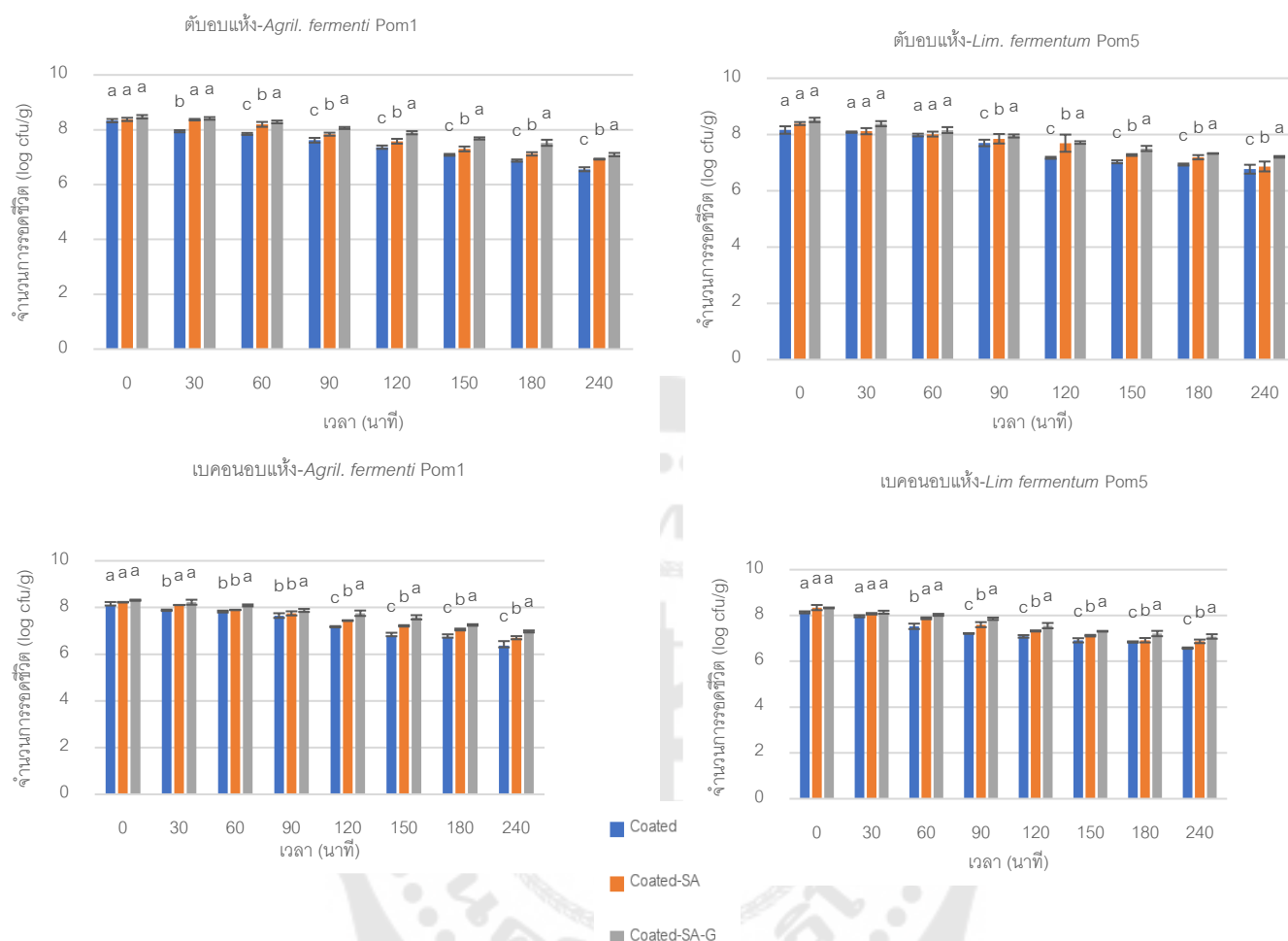
ภาพประกอบ 7 จำนวนการรอดชีวิตของเพอร์เมเชตในชั้นดับและเบคอนอบแห้งต่อสภาวะในกระเพาะจำลอง pH 2

หมายเหตุ สัญลักษณ์ Coated หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, Coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไซเดียมอัลจิเนต และ Coated-SA-G หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไซเดียมอัลจิเนตและกลีเซอรอล) ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองในวันเดียวกัน วิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

12.2 การยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลอง

จากการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกต่อสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลองที่ pH 6.5 เป็นเวลา 240 นาที พบว่า ชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าชุดการทดลอง Coated-SA และชุดการทดลอง Coated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจะเห็นได้ว่าชุดการทดลอง Coated มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนของโพรไบโอติกทุกชุดการทดลองมีจำนวนการรอดชีวิตมากกว่า 6 log cfu/g หลังจากบ่มเป็นเวลา 240 นาที แสดงให้เห็นความสามารถในการทนต่อเกลื่อน้ำดีของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก *Lim. fermentum* Pom5 มีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 7.21 ± 0.03 log cfu/g (ภาพประกอบ 8)



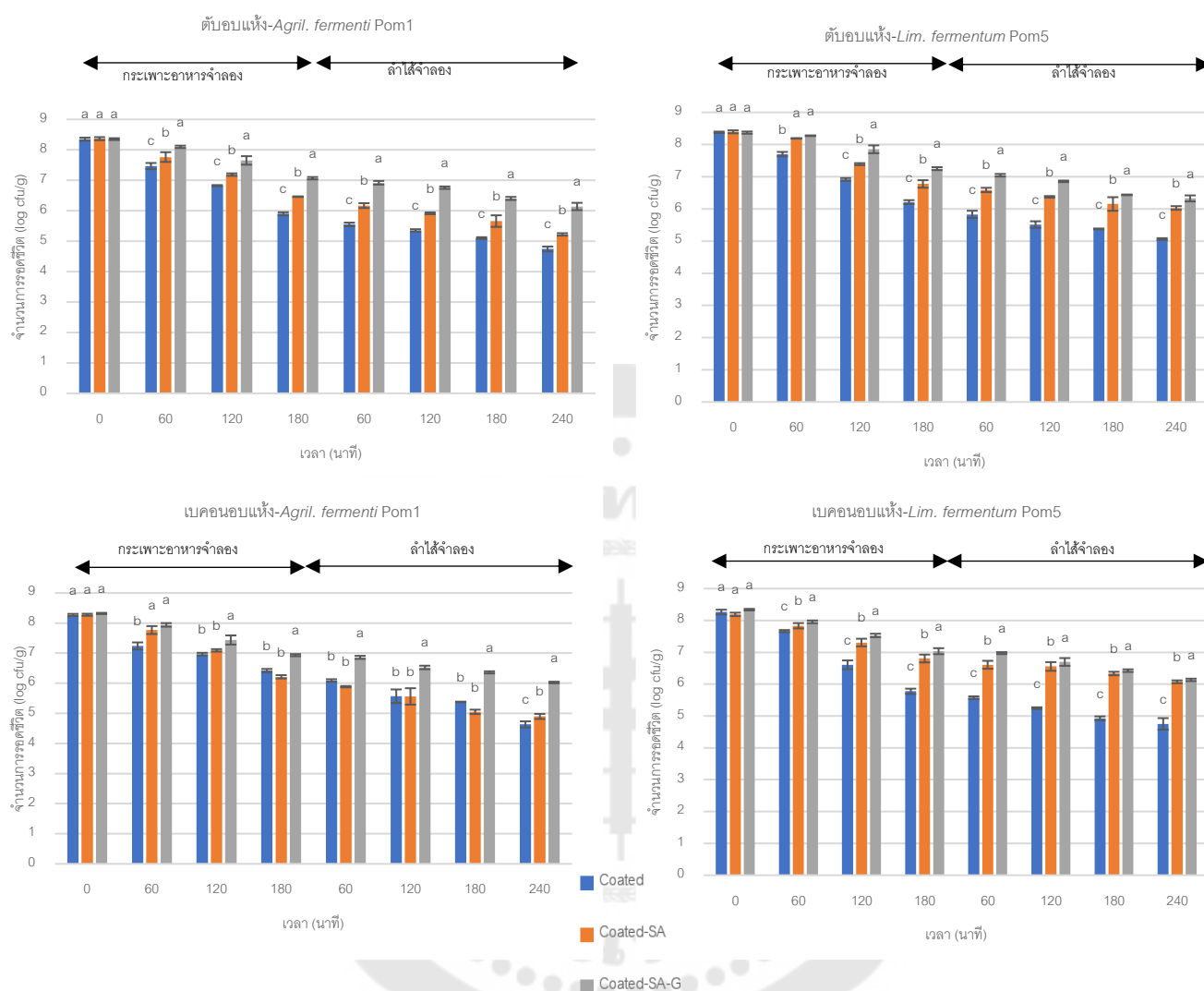


ภาพประกอบ 8 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นดีบุกและเบคอนอบแห้งต่อสภาวะน้ำย่อยในลำไส้จำลอง

หมายเหตุ; สัญลักษณ์ Coated หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, Coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไฮเดียมอัลจิเนต และ Coated-SA-G หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไฮเดียมอัลจิเนตและกลีเซอรอล) ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองในวันเดียวกัน วิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

12.3 การอยู่รอดของเชื้อในสภาวะทางเดินอาหารจำลองแบบต่อเนื่อง

จากการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองแบบต่อเนื่อง โดยบ่มในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง pH 2 เป็นเวลา 180 นาที จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะลำไส้จำลอง pH 6.5 เป็นเวลา 240 นาที พบว่า ชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าชุดการทดลอง Coated-SA และชุดการทดลอง Coated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และหลังจากสิ้นสุดระยะทางเดินอาหารจำลอง 420 นาที ชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก *Lim. fermentum* Pom5 มีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุด คือ $6.22 \pm 0.07 \log \text{cfu/g}$ ในขณะที่ชุดการทดลอง Coated-SA-G ที่เคลือบด้วย *Agil. fermenti* Pom1 มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกน้อยที่สุด คือ $4.63 \pm 0.10 \log \text{cfu/g}$ หลังจากสิ้นสุดระยะทางเดินอาหารจำลอง 420 นาที (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 จำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในชั้นตับและเบคอนอบแห้งต่อสภาวะทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง

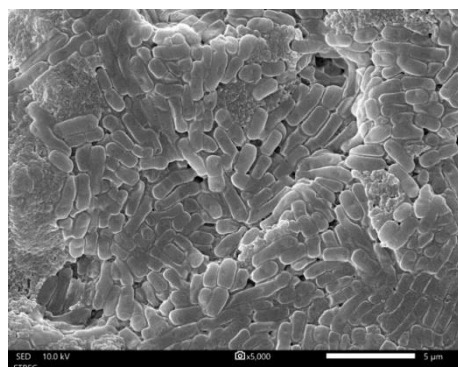
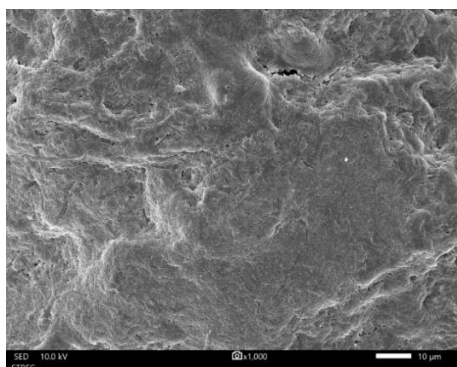
หมายเหตุ; สัญลักษณ์ Coated หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว, Coated-SA หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไฮโดรเจลและ Coated-SA-G หมายถึง ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไฮโดรเจลและกลีเซอรอล) ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองในวันเดียวกัน วิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) จัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย LSD test

13. การศึกษาการเกาะติดของโพรไบโอติกบนพื้นผิวชั้นดับและเบคอนอบแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

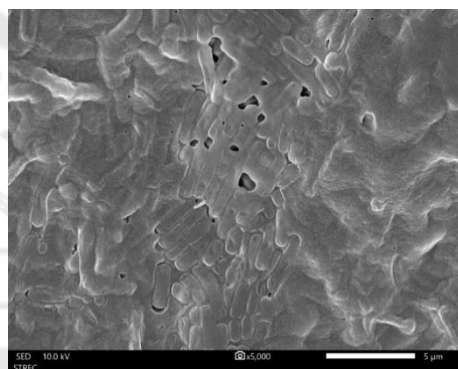
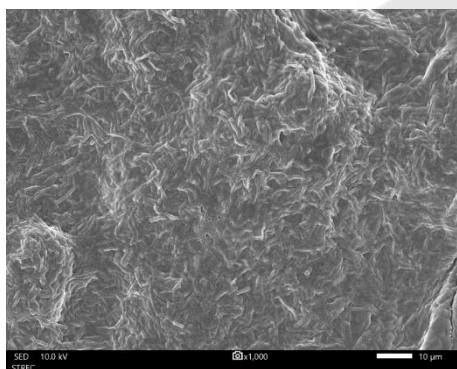
ในการศึกษานี้ได้นำโพรไบโอติก *Lim. fermentum* Pom5 ซึ่งมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุดมาศึกษาการเกาะติดบนพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า การเคลือบชั้นดับและเบคอนในชุดการทดลอง Coated-SA-G ส่งผลให้แผ่นฟิล์มมีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกันและไม่มีรอยร้าวหรือรอยแยก ซึ่งต่างจากชุดการทดลอง Coated-SA ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีช่องว่างและรอยต่อของฟิล์มบนพื้นผิวที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพประกอบ 10)



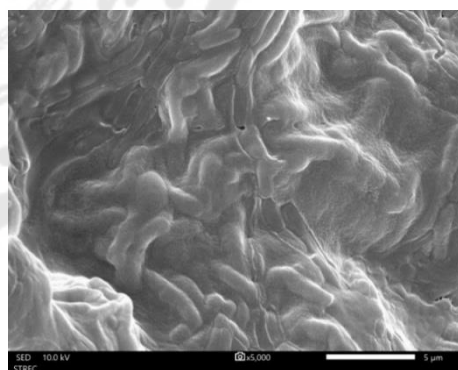
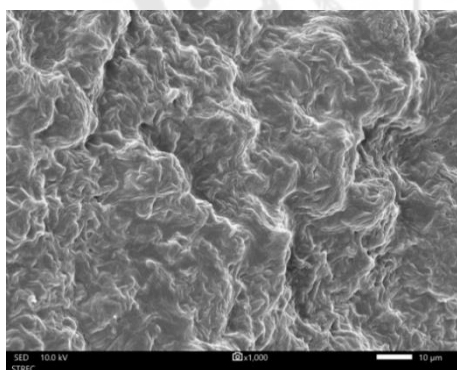
a)



b)

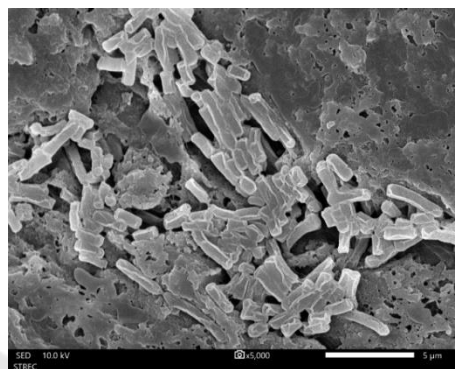
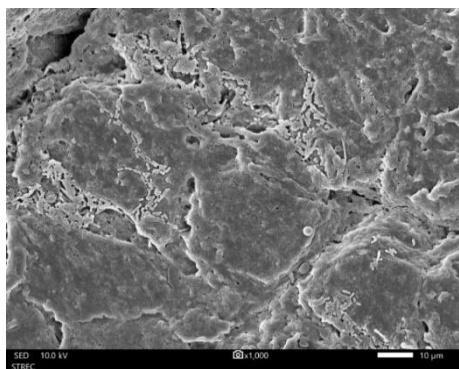


c)

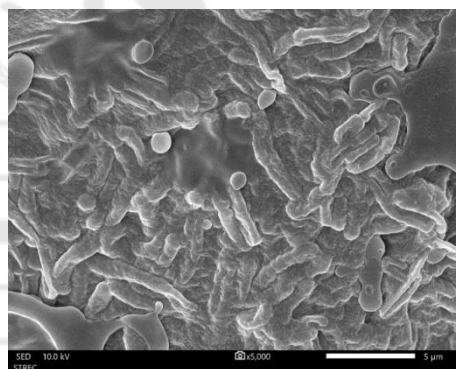
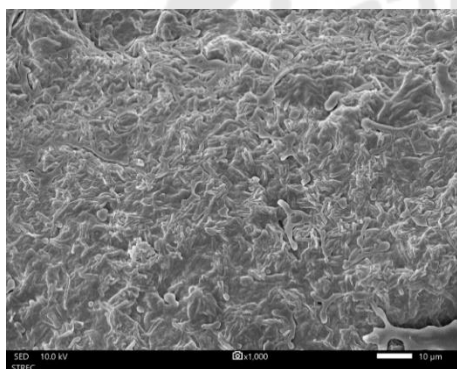


ภาพประกอบ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพื้นผิวตับอบแห้งที่เคลือบด้วย a) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated, b) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated-SA และ c) *Lim. fermentum* Pom5 ในชุดการทดลอง Coated-SA-G ภาพด้านซ้ายแสดงที่กำลังขยาย 1,000 เท่าและภาพด้านขวาแสดงที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

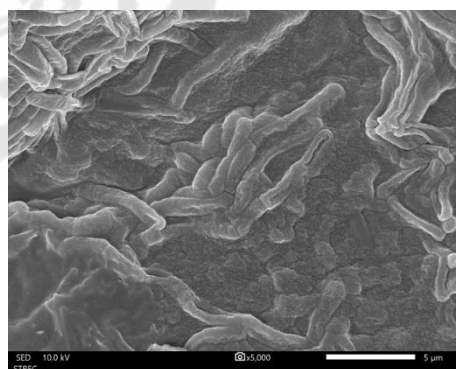
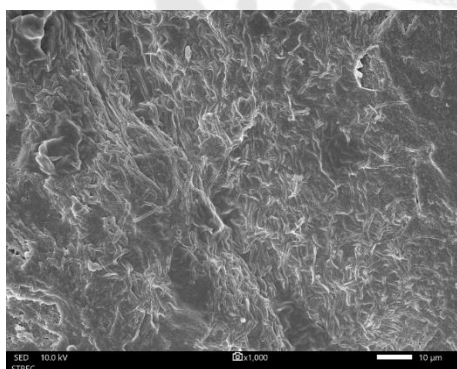
a)



b)



c)



ภาพประกอบ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพื้นผิวเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วย a) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated, b) *Lim. fermentum* Pom 5 ในชุดการทดลอง Coated-SA และ c) *Lim. fermentum* Pom5 ในชุดการทดลอง Coated-SA-G ภาพด้านซ้ายแสดงที่กำลังขยาย 1,000 เท่าและภาพด้านขวาแสดงที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีจำหน่ายทางการค้าทั้งหมดถูกออกแบบมาเพื่อมนุษย์และสัตว์จำพวกวัวควาย และมีการศึกษาน้อยมากที่แยกโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของสุนัข นอกจากนี้การพัฒนาลดผลิตภัณฑ์ประเภทขนมเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกยังมีรายงานไม่มากนักทั่วโลก ในงานวิจัยนี้จึงได้เริ่มผลิตขึ้นเบคอนและชิ้นดับอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก และโพรไบโอติกที่คัดเลือกจะมุ่งเน้นไปที่แบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากเป็นกลุ่มที่จัดว่าเป็น Generally Recognized as Safe (GRAS) หรือเป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย สามารถนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้นั้นแยกมาจากมูลสุนัขซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดในระบบทางเดินอาหารและเหมาะสมในการนำไปใช้พัฒนาลดผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อนำไปใช้ในสุนัข

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย ยามลักษณ์ (2566)⁽¹³⁵⁾ ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากตัวอย่างมูลของสุนัขจำนวน 12 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท โดยได้คัดเลือกเชื้อ 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Pom1 และไอโซเลท Pom5 มาศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก ซึ่งจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร จะต้องมีการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity) การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี (bile salt resistance) ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเมือกหรือเซลล์ผิวเยื่อของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ (adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell line) ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity) และการประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์⁽¹³⁶⁾ จากการศึกษาพบว่า เมื่อนำทั้ง 2 ไอโซเลทมาทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดที่ pH 2, 3, 4 และ 5 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถมีชีวิตรอดได้แม้ในการบ่มที่ pH เท่ากับ 2 และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15, 0.3 และ 1.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถรอดชีวิตได้แม้กระทั่งที่ปริมาณเกลือน้ำดีร้อยละ 1.0 ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทแยกมาจากทางเดินอาหารของสุนัขจึงสามารถทนต่อความเป็นกรดและเกลือน้ำดีได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัย Beasley และคณะ (2006)⁽¹³⁷⁾ ได้ทำการแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากอุจจาระของสุนัข ได้แก่

Lactobacillus mucosae LAB12 แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการทนกรดโดยการเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่มีค่า pH เท่ากับ 2, 4 และ 7 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถมีชีวิตรอดได้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2017)⁽¹³⁸⁾ ซึ่งได้รายงานไว้ว่า เมื่อนำเชื้อโพรไบโอติกที่แยกได้จากมูลสุนัขทั้ง 9 โยไซเลทมาทดสอบความทนกรดและเกลือ น้ำดีพบว่า ทุกโยไซเลทสามารถทนได้ดีที่ pH 4 และจะมีจำนวนลดลงตามค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ทุกโยไซเลทยังทนต่อเกลือ น้ำดีที่มีความเข้มข้น oxgall ร้อยละ 0.3 แต่จะลดลงเป็นอย่างมากที่ความเข้มข้น oxgall ร้อยละ 1.0

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่า เชื้อโไซเลท Pom1 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *E. coli* มากที่สุดเท่ากับ 11.22 และ 15.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp. ในขณะที่โไซเลท Pom5 สามารถยับยั้งเชื้อทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ทั้งนี้มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก กรดแลคติก, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน⁽¹³⁹⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อนำส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ไปปรับ pH ให้เป็น 6.0 แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ทั้ง 2 โไซเลทไม่สามารถยับยั้งเชื้อที่ทำการทดสอบได้ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเชื้อก่อโรคส่วนใหญ่เกิดจากการผลิตอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้น และเชื้อไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Adetoye และคณะ (2018)⁽¹⁴⁰⁾ ที่ได้แยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากอุจจาระของวัว และศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. และ *Klebsiella* spp. ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่ามีเชื้อ 88 โไซเลทที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และเมื่อนำส่วนผสมไปปรับ pH เป็น 6.2 พบว่าเชื้อทุกโยไซเลทไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่คัดแยกได้ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้เมื่อนำส่วนผสมของเชื้อที่คัดแยกได้ไปศึกษาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ด้วย High-performance liquid chromatography พบว่ามีองค์ประกอบของกรดแลคติกมากที่สุดเท่ากับ 81.11% ในขณะที่มีองค์ประกอบของกรดโพรพิโอนิกน้อยที่สุดเท่ากับ 5.61% และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในปริมาณสูงจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่สูงอีกด้วย

คุณสมบัติการเกาะติดกับเซลล์เยื่อเมือกและการเข้า colonization ที่ลำไส้ถือว่าเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ส่งเสริมให้โพรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนในลำไส้และกีดขวางการเข้าเกาะของเชื้อก่อโรค โดยการศึกษาคุณสมบัติการเกาะติดในระดับ *in vitro* มักใช้การศึกษาความไม่ชอบ

น้ำของพื้นผิวเซลล์ ค่าการเกาะกลุ่มกันเอง ค่าการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรค และการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ โดยเฉพาะเซลล์ Caco-2 หรือเซลล์ HT-29-MTX ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ชนิด colorectal adenocarcinoma⁽¹⁴¹⁾ โดยจากการศึกษาพบว่า เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลทมาศึกษาคุณสมบัติของพื้นผิวในส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เพื่อดูคุณสมบัติการยึดเกาะกับลำไส้เบื้องต้น พบว่า เชื้อไอโซเลท Pom1 เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์สูง (88.91%) ในขณะที่เชื้อไอโซเลท Pom5 มีเปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ต่ำ (34.89%) แต่เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ไลน์ Caco-2 พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมีอัตราการยึดเกาะที่สูงมากกว่า 85% ซึ่งไม่สอดคล้องกัน โดยจากก่อนหน้านี้ โดย Sidira และคณะ (2015)⁽¹⁴²⁾ ได้รายงานว่าคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่สูงอาจแสดงถึงการเกาะติดที่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า ค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่ต่ำอาจมีการยึดเกาะบนเซลล์ไลน์ที่สูง ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Krausova และคณะ (2019)⁽²⁷⁾ ที่รายงานเชื้อ *L. reuteri* E3M2 ซึ่งแยกจากอุจจาระเด็กทารก สามารถเข้าเกาะเซลล์ไลน์ได้ดี แต่มีค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์เพียง 9.1% ทั้งนี้กลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีหลายกลไก สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบจำเพาะ (receptor-specific bind) แบบใช้ประจุ และการจับกันของเซลล์กับตัวรับโดยการมีปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิดบนผนังเซลล์ เช่น collagen, fibrinogen และ vitronectin โดยโปรตีนเหล่านี้จะยึดเกาะกับเยื่อเมือกบนผนังลำไส้ได้⁽¹⁴³⁾ สำหรับการศึกษาความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า เชื้อไอโซเลท Pom1 และ Pom5 มีค่าการเกาะกลุ่มกันเองมากกว่า 50% และจากการศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. และ *B. cereus* พบว่า เชื้อไอโซเลท Pom1 และ Pom5 มีความสามารถในการเกาะกลุ่มการเชื้อก่อโรคมมากกว่า 50 % ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถยึดเกาะกลุ่มกันเองได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองนั้นยังเกี่ยวข้องกับความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเซลล์ และขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเซลล์ของโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์อีกด้วย นอกจากนี้คุณสมบัติการเกาะกลุ่มกันเองยังช่วยป้องกันเซลล์และทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะกันได้มากขึ้น โดยโพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองสูง เพื่อช่วยในการป้องกันเซลล์และช่วยยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ดียิ่งขึ้น และเป็นการป้องกันการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อการยึดเกาะผนังลำไส้ได้⁽¹⁴⁴⁾

คุณสมบัติหนึ่งของโพโรไบโอติกที่มักนำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อคือ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาพบว่าเชื้อไอโซเลท Pom1 และ Pom5 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ bile salts hydrolase ได้ โดยเอนไซม์ bile salts hydrolase ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในลำไส้จะช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอล กล่าวคือ เอนไซม์นี้จะไปย่อยที่พันธะเอไมด์ในส่วนของกรดอะมิโนที่เชื่อมกับเกลือน้ำดี (เกลือน้ำดีชนิดคอนจูเกต) ให้เป็นกรดอะมิโนไกลซีนหรือทอรีน และเกลือน้ำดีอิสระ (free bile salt) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้และบางส่วนจะตกตะกอนและขับออกทางอุจจาระ ร่างกายจึงต้องสร้างเกลือน้ำดีขึ้นมาทดแทน โดยการดึงคอเลสเตอรอลซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเกลือน้ำดีมาใช้มากขึ้น และทำให้ระดับของคอเลสเตอรอลที่สะสมในร่างกายลดลง⁽¹⁴⁵⁾

การประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพโรไบโอติกถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญก่อนนำโพโรไบโอติกไปใช้ โดยการประเมินความปลอดภัยที่นิยมใช้คือ โพโรไบโอติกต้องไม่สร้างสารประกอบเอมีน ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยทดสอบการสร้างสารประกอบเอมีนจะดูจากการสร้างเอนไซม์ decarboxylase ซึ่งจะเปลี่ยนกรดอะมิโนให้ได้เป็นสารประกอบเอมีน โดยมีรายงานว่าสารประกอบเอมีนที่มักตรวจสอบคือ histamine เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อร่างกายของโฮสต์ โดย histamine จะทำให้เกิดอาการแพ้ เช่น ผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสีย เป็นต้น การทดสอบมีหลักการคือ แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารและสร้างกรดทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ indicator เป็นสีเหลือง หลังจากน้ำตาลกลูโคสหมด เชื้อบางชนิดจะใช้กรดอะมิโน lysine, histidine, arginine และ ornithine ในอาหารโดยสร้างเอนไซม์ decarboxylase เกิดเป็นสารประกอบเอมีนและคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้สีของ indicator เปลี่ยนเป็นสีม่วง⁽⁵⁰⁾ โดยจากผลการศึกษาการสร้างสารประกอบเอมีนในการศึกษานี้พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ decarboxylase เพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโน lysine, histidine, arginine และ ornithine ไปเป็นสารประกอบเอมีน รวมทั้งไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียจะไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงในร่างกาย และไม่ส่งผลเสียเมื่อรับประทานเข้าไป จากการศึกษาความเป็นพิษของ cell free supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อเซลล์ไลน์ vero พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ vero ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Chimchang และคณะ (2016)⁽¹⁴⁶⁾ ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอุจจาระของเด็กแรกเกิด แล้วนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero พบว่าเชื้อไอโซเลท MSMC112-2 และ MSMC37-4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ในระดับเล็กน้อยปานกลาง ตามลำดับ สำหรับการประเมินความไวต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่

Ampicillin, Gentamicin, Erythromycin, Chloramphenicol และ Tetracycline พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด ซึ่งหากแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะอาจมีการส่งถ่ายยีนจากแบคทีเรียโพรไบโอติกไปสู่เชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่ไม่ดีต่อปฏิชีวนะจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ได้⁽¹⁴⁷⁾

ปัจจุบันคุณสมบัติที่ได้รับความสนใจในการศึกษาโพรไบโอติก คือคุณสมบัติในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารอนุมูลอิสระสามารถเข้าไปจับกับเซลล์แล้วทำให้เกิดความเสียหายนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์⁽¹⁴⁸⁾ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH assay) โดยพบว่าเชื้อ Pom1 และ Pom5 มีกิจกรรมการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 16.74% และ 32.23% ตามลำดับ โดยได้มีรายงานการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระโดยแบคทีเรียกรดแลคติกหลายฉบับ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Cai และคณะ (2022)⁽¹⁴⁹⁾ ที่ได้ศึกษาความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอุจจาระของเด็กทารก โดยวิธี DPPH assay พบว่าในส่วนไส้เชื้อ *B. longum* subsp. *infantis* BF66-2 มีกิจกรรมการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 25.68% รองลงมาคือเชื้อ *L. rhamnosus* GG เท่ากับ 11.44% และงานวิจัยของ Amaretti และคณะ (2013)⁽¹⁵⁰⁾ ที่รายงานว่าในระหว่างการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่ม Superoxide dismutase (SOD) ซึ่งสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *S. thermophilus*, *Lactobacillus* spp. และ *Lactococcus lactis* มีประสิทธิภาพในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า 31 % เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น ทั้ง 2 ไอโซเลท มาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท Pom1 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus* sp. strain CC-MHH1034 92% และไอโซเลท Pom 5 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus salivarius* strain HBUAS54044 99% จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ Pom1 ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ดังนั้นเพื่อระบุสปีชีส์เชื้อไอโซเลท Pom1 จึงนำเชื้อไปหาลำดับจีโนมทั้งหมดและใช้ข้อมูลบริเวณ 16 S rDNA มาวิเคราะห์เพื่อระบุสปีชีส์ พบว่า ไอโซเลท Pom1 มีความคล้ายคลึงกับ *Agilactobacillus fermenti* 99.83% และไอโซเลท Pom5 มีความคล้ายคลึงกับ *Limosilactobacillus fermentum* 100% (ตาราง 7)

การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของโพรไบโอติกที่คัดเลือกทั้ง 2 ไอโซเลทด้วยวิธี next generation sequencing พบว่า *Agil. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 มีขนาด

จีโนมเท่ากับ 2,562,775 และ 2,046,384 คู่เบส และมีค่า GC-content เท่ากับ 40.2 และ 52.0 % ตามลำดับ และเมื่อนำมาวิเคราะห์มีการตรวจพบยีนต่าง ๆ ดังนี้

- การวิเคราะห์ยีนดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Agri. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 พบว่า ไม่พบยีนดื้อยาปฏิชีวนะบนจีโนมของเชื้อ ซึ่งสอดคล้องการประเมินความไวต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ที่พบว่าเชื้อ 2 สายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด นอกจากนี้ไม่พบบริเวณที่คาดว่าเป็นพลาสมิดของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยการที่แบคทีเรียสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้นั้น เกิดจากการมียีนดื้อยาปฏิชีวนะอยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิดของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีความปลอดภัยสูงและไม่สามารถส่งถ่ายยีนดื้อยาไปยังเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ยีนก่อโรคของเชื้อจากการใช้ฐานข้อมูล VFDB พบว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่พบบริเวณยีนที่ก่อให้เกิดโรค

- การวิเคราะห์ตำแหน่ง prophage โดยใช้โปรแกรม PHASTER พบบริเวณ prophage ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยบริเวณ prophage นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายยีนดื้อยาปฏิชีวนะ และมีการรายงานว่ แบคทีเรียที่พบบริเวณที่เป็นพลาสมิด และ prophage อยู่บนจีโนมมีส่วนสำคัญทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย⁽⁵³⁾ และผลจากการวิเคราะห์บริเวณของ CRISPR) พบว่า เชื้อ *Agri. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 มีบริเวณ CRISPR 3 และ 1 บริเวณตามลำดับ โดยบริเวณดังกล่าวทำหน้าที่คล้ายภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการกำจัดดีเอ็นเอแปลกปลอมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย⁽¹⁵¹⁾

- การวิเคราะห์หาบริเวณยีนที่สร้างแบคทีริโอซิน พบยีนสร้างแบคทีริโอซิน 2 ยีน ได้แก่ sakacin_G_skg2 และ amylocyclicin ทั้งนี้มีรายงานว่ แบคทีเรียแลคติกมักมีการสร้าง sakacin หลายประเภท ได้แก่ A, G, K, P และ Q ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Listeria* sp. ได้⁽¹⁵²⁾ และจากงานวิจัยของ Scholz และคณะ (2014) พบว่า เชื้อ *Probiotic* *B. amyloliquefaciens* FZB42 มีการสร้างแบคทีริโอซิน amylocyclicin โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ⁽¹⁵³⁾

- การวิเคราะห์หาบริเวณยีนที่สร้างสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อโฮสต์ โดยใช้ฐานข้อมูล RAST server พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มียีนที่เกี่ยวข้องกับสร้างวิตามินบี 2 และไบโอติน 2 บริเวณ จากการรายงานของ Karaseva และคณะ (2023)⁽¹⁵⁴⁾ ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักดอง แล้วทำการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรีย จากนั้นวิเคราะห์หาบริเวณยีนที่สร้างสารเมตาบอไลต์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายโดยใช้ฐานข้อมูล RAST server พบว่าเชื้อ *L. plantarum* FCa3L มีบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับสร้าง biotin, thiamine และ folic acid

ซึ่งการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นประโยชน์เหล่านี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยนิยมนำไปเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักอาหารเพื่อสุขภาพ

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบความเป็นโพรไบโอติก มีความปลอดภัย และมีการจัดจำแนกโดยละเอียดแล้ว มาเคลือบลงบนชั้นตับและเบคอนสำหรับเป็นอาหารสุนัข สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือความอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยจำลองสุนัข ในระหว่างกระบวนการผลิต และจำนวนเชื้อที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา โดยจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร จะต้องมีความจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่ คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 6 log cfu ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้น รวมถึงคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (ความเป็นกรด-ด่าง) ทางกายภาพ (สี, ความชื้น และค่า a_w) ทั้งนี้ก่อนเริ่มพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบขึ้นตับและเบคอนที่สามารถคงความมีชีวิตของโพรไบโอติกไปสูงสุด โดยจากการศึกษาพบว่า การอบขึ้นตับและเบคอนที่เวลา 12 ชั่วโมง มีความเหมาะสม เนื่องจากให้ค่า a_w ต่ำสุด และมีจำนวนการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่า 6 log cfu/g ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา และพบว่าระยะเวลาการอบที่นานขึ้นถึงแม้ว่าจะทำให้ค่า a_w ในชั้นตับและเบคอนลดลง แต่ทำให้จำนวนของโพรไบโอติกลดลงด้วย โดยปัจจัยที่สำคัญต่อการอบแห้ง คือ ธรรมชาติของอาหาร ขนาดของผลิตภัณฑ์ และอุณหภูมิของอากาศ เป็นต้น⁽¹⁵⁵⁾ และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ขึ้นเบคอนและตับอบแห้งนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วันแล้วตรวจนับจำนวนการรอดชีวิต พบว่าในทุกชุดการทดลองเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่า 6 log cfu/g ตลอดเวลาการเก็บรักษา โดยการทดลองที่เคลือบขึ้นตับและเบคอนด้วยโพรไบโอติกร่วมกับไฮเดียมอัลจิเนตและกลีเซอรอล (Coated-SA-G) มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับงานวิจัย Valerion และคณะ (2020)⁽¹⁵⁶⁾ ได้ศึกษาการเคลือบแอปเปิ้ลด้วยโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 ร่วมกับฟิล์มเพคตินกินได้ แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เคลือบแอปเปิ้ลด้วยโพรไบโอติกร่วมกับเพคตินมีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าที่สุด (7.98 log cfu/g) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เคลือบด้วยเพคติน

เมื่อนำขึ้นผลิตภัณฑ์ขึ้นตับและเบคอนอบแห้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน แล้วนำมาตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์ ราและเชื้อ *Salmonella* sp. พบว่าจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดในอาหาร

สัณฐานวิทยาของประเทศไทย ($<6 \log \text{cfu/g}$) และไม่พบยีสต์ รา และเชื้อ *Salmonella* sp. ในผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เกณฑ์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ควรตรวจพบในอาหารสุนัขทำเหม็นขึ้นอยู่กับการชั่งน้ำหนักและมาตรฐานของอุตสาหกรรมอาหารแต่ละประเทศ⁽¹⁵⁷⁾

จากการศึกษา a_w ในชั้นดิบและเบคอนที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกพบว่า ค่า a_w ของชั้นดิบและเบคอนทุกชุดการทดลองในวันที่ 0 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเคลือบด้วยอัลจินตไม่ส่งผลทำให้ค่า a_w เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control โดยค่า a_w ในอาหารมีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งการปรับลดค่า a_w ของอาหารให้ต่ำลงเป็นวิธีการที่ใช้เพื่อถนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคที่อยู่ในอาหารได้ มีการรายงานว่าอาหารที่มีค่า a_w ที่ต่ำกว่า 0.85 สามารถลดการเจริญของราและเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดได้⁽¹⁵⁸⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อราและเชื้อก่อโรค *Salmonella* sp. ในผลิตภัณฑ์และจากการตรวจสอบค่า pH ของดิบและเบคอนอยู่ช่วงระหว่าง 5.98-6.84 และ 5.98-7.22 ตามลำดับ และค่าความชื้นของชั้นดิบและเบคอน 20.02-23.67 % และ 11.50-16.08% ตามลำดับ ซึ่งค่า a_w , pH และค่าความชื้นที่อยู่ในช่วงดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก สามารถรักษาปริมาณเชื้อให้คงอยู่มากกว่า $6 \log \text{cfu/g}$ ในระหว่างการเก็บและยังมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานอีกด้วย

เมื่อนำชั้นดิบและเบคอนมาตรวจสอบค่าทางกายภาพ โดยวัดค่าสีโดยใช้ระบบ L^* , a^* และ b^* พบว่า พบว่า ชั้นดิบชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินตและกลีเซอรอล ส่งผลให้ค่าความสว่างเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control ในขณะที่ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินตเพียงอย่างเดียวไม่ผลต่อค่าสีแดงและสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุด Control ในขณะที่ชั้นเบคอนชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินตและกลีเซอรอล ไม่ส่งผลทำให้ค่าความสว่างเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามจำเป็นในอนาคตต้องมีการทดสอบความชอบของผลิตภัณฑ์ และทดสอบความน่ากินของผลิตภัณฑ์จากสุนัข ก่อนนำไปผลิตทางการค้าต่อไป

จากการทดสอบการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะจำลอง และลำไส้จำลองทั้งแบบเดี่ยวและแบบต่อเนื่องพบว่า ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินตและกลีเซอรอล มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินตเพียงอย่างเดียว และชุดการทดลองที่ไม่เคลือบอัลจินตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับสภาวะในกระเพาะอาหารที่มีค่า pH ต่ำ และเอนไซม์เปปซินที่เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนจะให้แบคทีเรียเกิดการ

บาดเจ็บ จากนั้นเมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับสภาวะในลำไส้เล็กที่ประกอบด้วยเกลือน้ำดีทำให้เกิดการละลายไขมันและเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ส่งผลให้ส่วนประกอบในเซลล์รั่วไหลออกมาและทำให้เซลล์ตายในที่สุด โดยการเคลือบโพรไบโอติกด้วยอัลจินเตร่วมกับกลีเซอรอลสามารถป้องกันเซลล์แบคทีเรียไม่ให้สัมผัสกับน้ำย่อยโดยตรงทำให้เซลล์สามารถรอดชีวิตได้มากขึ้น⁽¹⁵⁹⁾ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ardabili และคณะ(2016)⁽¹⁶⁰⁾ ได้ทำการเคลือบอัลจินเตร่วมกับโพรไบโอติก *L. rhamnosus* GG ลงบนขนมปังแล้วทำการอบ จากนั้นนำไปทดสอบการรอดชีวิตในน้ำย่อยจำลองพบว่า ชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินเตมีการรอดชีวิตมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เคลือบด้วยอัลจินเตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Valerio และคณะ(2020)⁽¹⁵⁶⁾ ได้เคลือบฟิล์มเพคตินที่กินได้ร่วมกับโพรไบโอติก *L. paracasei* IMPC2.1 ลงแอปเปิ้ลแล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง จากนั้นทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตในน้ำย่อยจำลอง พบว่าชุดการทดลองที่เคลือบด้วยเพคติน มีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากกว่าชุดการทดลองที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว

เมื่อนำขึ้นต้บและขึ้นเบคอนที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกมาศึกษาการเกาะติดบนพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า การเคลือบขึ้นต้บและเบคอนในชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินเตและกลีเซอรอล ส่งผลให้แผ่นฟิล์มมีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกันและไม่มียอรั้วหรือรอยแยก ซึ่งต่างจากชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินเตเพียงอย่างเดียวซึ่งจะพบได้ว่ามีช่องว่างและรอยต่อของฟิล์มบนพื้นผิวที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งให้เห็นว่าชุดการทดลองที่เคลือบด้วยอัลจินเตและกลีเซอรอล สามารถปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีที่สุดเมื่อเจอกับสภาวะน้ำย่อยจำลองหรือสภาวะรุนแรงในระหว่างกระบวนการผลิต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasana และคณะ (2023)⁽¹⁶¹⁾ ได้ทำการเคลือบเม็ดอัลจินเตที่มีโพรไบโอติกร่วมกับไคโตซานแล้วนำมาศึกษาลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า เม็ดอัลจินเตที่เคลือบด้วยไคโตซานมีรอยแยกที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัลจินเตที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซานซึ่งมีรอยแยกและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกมากกว่า และเมื่อนำไปทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกในน้ำย่อยจำลองพบว่าชุดการทดลองที่เคลือบเม็ดอัลจินเตด้วยไคโตซานมีการรอดชีวิตของเชื้อมากกว่าการทดลองอื่น ๆ

จากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า *Agri. fermenti* Pom1 และ *Lim. fermentum* Pom5 มีศักยภาพในการเป็นโพรไบโอติก โดยมีความปลอดภัย มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อในลำไส้ได้ดี มีความสามารถในการสร้างสารต้านแบคทีเรียก่อโรค และเมื่อนำมาพัฒนาเป็น

ผลิตภัณฑ์ขึ้นเบคอนและตับอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติก ร่วมกับอัลจินตและกลีเซอรอลพบว่า เชื้อสามารถรอดชีวิตได้มากกว่า $6 \log \text{cfu/g}$ ตลอดระยะเวลาการเก็บที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน และเมื่อสัมผัสกับสภาวะน้ำย่อยจำลอง อีกทั้งยังมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ยังคงรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งมีผิวสัมผัสที่สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกให้ส่งผ่านไปถึงลำไส้ได้ ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก สามารถนำไปใช้ต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์ขึ้นตับและเบคอนอบแห้งที่เคลือบด้วยโพรไบโอติกสำหรับใช้เป็นอาหารสุนัขต่อไป



บรรณานุกรม

1. Rofe PC, Anderson RS. Food preference in domestic pets. *Proc Nutr Soc.* 1970;29(2):330-5.
2. Robertson ID. A survey of diets offered to dogs in metropolitan perth, western australia. *Australian Veterinary Journal.* 1996;73(1):31-2.
3. Markowiak-Kopeć P, Slizewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens.* 2018;10(1):1-20.
4. Hotel A. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prev.* 2001;5(1).
5. V. P. C. Convective drying of food materials: An overview with fundamental aspect, recent developments, and summary. *Heat Transf.* 2020;49(3):1281-313.
6. Gilson CD, Thomas A. Calcium alginate bead manufacture: With and without immobilised yeast. Drop formation at a two-fluid nozzle. *J Chem Technol Biotechnol.* 1995;62(3):227-32.
7. 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.
8. And CI, Kailasapathy K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *J Food Sci.* 2005;70(1):M18-M23.
9. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan--a review. *J Control Release.* 2006;114(1):1-14.
10. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol.* 2015;52(12):7577-87.
11. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 1965;147(3659):747-8.
12. Fuller R. Probiotics a critical review. Wymondham, UK: Horizon Scientific; 1999.

13. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
14. กนกภรณ์ ศรีแย้ม. การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตโปรไบโอติกบอซิลัสสำหรับไก่กระทุง [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าพระนครเหนือ; 2554.
15. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*. 1998;80 Suppl 1:S147-71.
16. Shewale R, Sawale P, Khedkar C, Singh A, Sawale P. Selection criteria for probiotics: A review. *Int J Probiotics Prebiotics*. 2014;9:17-22.
17. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2):393s-8s.
18. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):386s-92s.
19. Noriega L, Gueimonde M, Sánchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in bifidobacterium. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(1):79-86.
20. Ruiz L, Margolles A, Sánchez B. Bile resistance mechanisms in lactobacillus and bifidobacterium. *Front Microbiol*. 2013;4:396.
21. Sharif NM, Sreedevi B, Chaitanya RK, Sreenivasulu D. Isolation and screening of lactobacillus species from dogs for probiotic action. *Indian J Anim Res*. 2017;52:1739-44.
22. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;167(2):185-9.
23. Haeri A, Khodaii Z, Ghaderian SMH, Tabatabaei Panah AS, Akbarzadeh Najar R. Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to caco-2,

- hep-2, and t84 cell lines. *Ann Microbiol.* 2012;62(1):339-44.
24. Boot HJ, Kolen CP, van Noort JM, Pouwels PH. S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bacteriol.* 1993;175(19):6089-96.
 25. Klotz C, Goh YJ, O'Flaherty S, Barrangou R. S-layer associated proteins contribute to the adhesive and immunomodulatory properties of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):248.
 26. Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrsa V, Susković J. Importance of s-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 2005;98(2):285-92.
 27. Krausová G, Hyršlová I, Hynstová I. In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation.* 2019;5(4):100.
 28. 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.
 29. Hernandez-Hernandez O, Muthaiyan A, Moreno FJ, Montilla A, Sanz ML, Ricke SC. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiol.* 2012;30(2):355-61.
 30. Hm B, Bs R, Naika M, Batra HV, Murali HS. Screening for folate producing lactic acid bacteria from colostrum and characterization of their probiotic potential. *J Pure Appl Microbiol.* 2018;12:765-76.
 31. Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 2003;94(6):981-7.
 32. Topçu KC, Kaya M, Kaban G. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma. *LWT.* 2020;134:110216.
 33. Jose NM, Bunt CR, Hussain MA. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of *Lactobacilli* isolates from dairy food products and animal rumen

- contents. *Microorganisms*. 2015;3(2):198-212.
34. Twetman L, Larsen U, Fiehn NE, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(5):284-8.
 35. Choi A-R, Patra JK, Kim WJ, Kang S-S. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Front Microbiol*. 2018;9.
 36. Chen C-C, Lai C-C, Huang H-L, Huang W-Y, Toh H-S, Weng T-C, et al. Antimicrobial activity of lactobacillus species against carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Front Microbiol* 2019;10.
 37. Prabhurajeshwar C, Chandrakanth K. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clin Nutr Exp*. 2019;23:97-115.
 38. Russo P, Arena MP, Fiocco D, Capozzi V, Drider D, Spano G. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int J Food Microbiol*. 2017;247:48-54.
 39. Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci*. 2003;82(4):632-9.
 40. Surendran Nair M, Amalaradjou MA, Venkitanarayanan K. Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. *Adv Appl Microbiol*. 2017;98:1-29.
 41. Zhitnitsky D, Rose J, Lewinson O. The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Sci Rep*. 2017;7.
 42. Desniar, Rusmana I, Suwanto A, Mubarik NR. Organic acid produced by lactic acid bacteria from bekasam as food biopreservatives. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2020;414(1):012003.
 43. Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev*. 1990;7(1-2):149-63.
 44. Banks JG, Board RG, Sparks NH. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotechnol Appl Biochem*. 1986;8(2-3):103-47.

45. Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front Microbiol.* 2019;10.
46. Zacharof MP, Lovitt RW. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia.* 2012;2:50-6.
47. Li T, Teng D, Mao R, Hao Y, Wang X, Wang J. A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Food Research International.* 2020;136:109571.
48. Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, et al. Microbial characterization of probiotics--advisory report of the working group "8651 probiotics" of the belgian superior health council (shc). *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(8):1479-504. eng. 2013/06/25.
49. Gueimonde M, Sánchez B, de los Reyes-Gavilán C, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology.* 2013;4. English.
50. Priyadarshani WM, Rakshit S. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science & Technology.* 2011;46:2062-9.
51. Wei Y-X, Zhang Z-Y, Liu C, Malakar PK, Guo X-K. Safety assessment of bifidobacterium longum jdm301 based on complete genome sequences. *World J Gastroenterol.* 2012;18(5):479-88. eng.
52. Chokesajjawatee N, Santiyanont P, Chantarasakha K, Kocharin K, Thammarongtham C, Lertampaiporn S, et al. Safety assessment of a nham starter culture lactobacillus plantarum bcc9546 via whole-genome analysis. *Scientific Reports.* 2020;10(1):10241.
53. Wang Y, Liang Q, Lu B, Shen H, Liu S, Shi Y, et al. Whole-genome analysis of probiotic product isolates reveals the presence of genes related to antimicrobial resistance, virulence factors, and toxic metabolites, posing potential health risks. *BMC Genomics.* 2021;22(1):210.
54. Ranjha MMAN, Shafique B, Batool M, Kowalczewski PŁ, Shehzad Q, Usman M, et al.

- Nutritional and health potential of probiotics: A review. *Appl Sci*. 2021;11(23):11204.
55. Kirjavainen PV, Apostolou E, Salminen SJ, Isolauri E. New aspects of probiotics--a novel approach in the management of food allergy. *Allergy*. 1999;54(9):909-15.
 56. Herich R, Levkut M. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet Med*. 2002;47.
 57. Prisciandaro L, Geier M, Butler R, Cummins A, Howarth G. Probiotics and their derivatives as treatments for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(12):1906-14.
 58. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: Mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 1999;9(1):43-52.
 59. Goldin BR, Gorbach SL. Effect of lactobacillus acidophilus dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J Natl Cancer Inst*. 1980;64(2):263-5.
 60. Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C, et al. Milk fermented with yogurt cultures and lactobacillus casei compared with yogurt and gelled milk: Influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(1):111-7.
 61. Levri KM, Ketvertis K, Deramo M, Merenstein JH, D'Amico F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract*. 2005;54(7):613-20.
 62. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):421s-9s.
 63. Gu Q, Li P. Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. 2016.
 64. Liu Q, Yu Z, Tian F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microb Cell Factories*. 2020;19(1):23.
 65. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llrente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(2):160-74.
 66. Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions - a review. *Int J Med Microbiol*.

2010;300(1):57-62.

67. Oliveira G, González-Molero I. An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinol Nutr.* 2016;63(9):482-94.
68. Burca-Busaga CG, Betoret N, Seguí L, Betoret E, Barrera C. Survival of *Lactobacillus salivarius* cect 4063 and stability of antioxidant compounds in dried apple snacks as affected by the water activity, the addition of trehalose and high pressure homogenization. *Microorganisms.* 2020;8(8):1095.
69. Nava GM, Bielke LR, Callaway TR, Castañeda MP. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: The poultry experience. *Anim Health Res Rev.* 2005;6(1):105-18. eng. 2005/09/17.
70. Neves D, Banhazi T, Nääs I. Feeding behaviour of broiler chickens: A review on the biomechanical characteristics. *Rev Bras Cienc.* 2014;16:01-16.
71. Kelley RL, Park JS, O'Mahony L, Minikhiem D, Fix A. Safety and tolerance of dietary supplementation with a canine-derived probiotic (*Bifidobacterium animalis* strain ahc7) fed to growing dogs. *Vet Ther.* 2010;11(3):E1-14.
72. Sauter SN, Benyacoub J, Allenspach K, Gaschen F, Ontsouka E, Reuteler G, et al. Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2006;90(7-8):269-77.
73. Gómez-Gallego C, Junnila J, Männikkö S, Hämeenoja P, Valtonen E, Salminen S, et al. A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study. *Vet Microbiol.* 2016;197:122-8.
74. Vahjen W, Männer K. The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. And *Clostridium* spp. In faeces. *Arch Tierernähr.* 2003;57(3):229-33.
75. Biagi G, Cipollini I, Pompei A, Zaghini G, Matteuzzi D. Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Vet Microbiol.* 2007;124(1-2):160-5.
76. Smeets-Peeters M, Watson T, Minekus M, Havenaar R. A review of the physiology of

- the canine digestive tract related to the development of in vitro systems. *Nutrition Research Reviews*. 1998;11(1):45-69. 2007/12/14.
77. Deschamps C, Denis S, Delphine H, Zentek J, Priymenko N, Apper E, et al. In vitro models of the canine digestive tract as an alternative to in vivo assays: Advances and current challenges. 2022.
 78. Case LP, Daristotle L, Hayek MG, Raasch M. Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professionals. Elsevier Health Sciences; 2010.
 79. Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z, et al. Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11. English.
 80. Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(2):260-8.
 81. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J Nutr*. 2004;134(2):465-72.
 82. Giang HH, Viet TQ, Ogle B, Lindberg JE. Effects of different probiotic complexes of lactic acid bacteria on growth performance and gut environment of weaned piglets. *Livest Sci*. 2010;133(1):182-4.
 83. Trafalska E, Grzybowska K. [probiotics--an alternative for antibiotics?]. *Wiad Lek*. 2004;57(9-10):491-8.
 84. Higgins SE, Higgins JP, Wolfenden AD, Henderson SN, Torres-Rodriguez A, Tellez G, et al. Evaluation of a lactobacillus-based probiotic culture for the reduction of salmonella enteritidis in neonatal broiler chicks. *Poult Sci*. 2008;87(1):27-31.
 85. Zhou X, Wang Y, Gu Q, Li W. Effect of dietary probiotic, bacillus coagulans, on growth performance, chemical composition, and meat quality of guangxi yellow chicken. *Poult Sci*. 2010;89(3):588-93.
 86. Krehbiel C, Rust S, Zhang G, Gilliland S. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action 1,2. *J Anim Sci*. 2002;81.
 87. Ghazanfar S, Anjum M, Azim A, Ahmed I. Effects of dietary supplementation of yeast (*saccharomyces cerevisiae*) culture on growth performance, blood parameters,

- nutrient digestibility and fecal flora of dairy heifers. *J Anim Plant Sci.* 2015;25:53-9.
88. Muliterno MM, Rodrigues D, de Lima FS, Ida EI, Kurozawa LE. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. *LWT.* 2017;75:512-9.
 89. Sabarez HT. 4 - modelling of drying processes for food materials Bakalis S, Knoerzer K, Fryer PJ, editors. *Modeling food processing operations.* Werribee: Woodhead Publishing; 2015. 95-127.
 90. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Lett Appl Microbiol.* 2006;42(3):271-6.
 91. Sabarez HT. 14 - airborne ultrasound for convective drying intensification Knoerzer K, Juliano P, Smithers G, editors. *Innovative food processing technologies.* Werribee: Woodhead Publishing; 2016. 361-86.
 92. Putra RN, Ajiwiguna TA. Influence of air temperature and velocity for drying process. *Procedia Eng.* 2017;170:516-9.
 93. Argyropoulos D, Müllera J. Effect of convective drying on quality of lemon balm (*melissa officinalis* L.). *Procedia Food Sci.* 2011;1:1932-9.
 94. Bazyma L, Kutovoy VA. Vacuum drying and hybrid technologies. *Stewart Postharvest Rev.* 2005;1:1-4.
 95. Noorbakhsh R, Yaghmaee P, Durance T. Radiant energy under vacuum (rev) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks. *J Funct Foods.* 2013;5(3):1049-56.
 96. Kumar P, Mishra HN. Mango soy fortified set yoghurt: Effect of stabilizer addition on physicochemical, sensory and textural properties. *Food Chem.* 2004;87(4):501-7.
 97. Lee JS, Cha DS, Park HJ. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* Kfri 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7300-5.
 98. Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol.* 2017;8.
 99. Cui L, Niu L-y, Li D-j, Liu C-q, Liu Y-p, Liu C-j, et al. Effects of different drying methods

- on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks. *J Integr Agric.* 2018;17(1):247-55.
100. Havenaar R, Brink BT, Huis In 't Veld JHJ. Selection of strains for probiotic use Fuller R, editor. *Probiotics: The scientific basis.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1992. 209-24.
 101. Afzaal M, Saeed F, Hussain S, Mohamed AA, Alamri MS, Ahmad A, et al. Survival and storage stability of encapsulated probiotic under simulated digestion conditions and on dried apple snacks. *Food Sci Nutr.* 2020;8(10):5392-401.
 102. González-Forte L, Bruno E, Martino M. Application of coating on dog biscuits for extended survival of probiotic bacteria. *Anim Feed Sci Technol* 2014;195:76-84.
 103. Miranda JS, Costa BV, de Oliveira IV, de Lima DCN, Martins EMF, de Castro Leite Júnior BR, et al. Probiotic jelly candies enriched with native atlantic forest fruits and bacillus coagulans gbi-30 6086. *LWT.* 2020;126:109275.
 104. Espitia PJP, Batista RA, Azeredo HMC, Otoni CG. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Res Int.* 2016;90:42-52.
 105. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran J Biotechnol.* 2007;5(1):1-18.
 106. Steenson LR, Klaenhammer TR, Swaisgood HE. Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophages. *J Dairy Sci.* 1987;70(6):1121-7.
 107. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J.* 2003;13(1):3-13.
 108. 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.
 109. Nualkaekul S, Lenton D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated lactobacillus plantarum in pomegranate juice. *Carbohydr Polym.* 2012;90(3):1281-7.
 110. Huber K, Embuscado M. Edible films and coatings for food applications. Embuscado

- ME, Huber KC, editors. New York: Springer; 2009.
111. Wittaya T. Edible films and coatings: Characteristics and properties. *Int Food Res J*. 2008;15.
 112. Altamirano-Fortoul R, Moreno-Terrazas R, Quezada-Gallo A, Rosell CM. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocoll*. 2012;29(1):166-74.
 113. Soukoulis C, Yonekura L, Gan H-H, Behboudi-Jobbehdar S, Parmenter C, Fisk I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocoll*. 2014;39:231-42.
 114. Bambace MF, Alvarez MV, Moreira MdR. Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Res Int*. 2019;122:653-60.
 115. Korbekandi H, Mortazavian A, Iravani S. Technology and stability of probiotic in fermented milks containing probiotics and prebiotics. 2011.
 116. Karimi R, Mortazavian AM, Cruz AG. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. *Dairy Sci Technol* 2011;91:283-308.
 117. Godward G, Sultana K, Kailasapathy K, Peiris P, Arumugaswamy R, Reynolds N. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft*. 2000;55:441-5.
 118. Kailasapathy K, Sultana K. Survival and beta-d-galactosidase activity of encapsulated and free lactobacillus acidophilus and bifidobacterium lactis in ice-cream. *Aust J Dairy Technol*. 2003;58:223-7.
 119. Mortazavian A, KhosroKhaVar r, rastEgar h, Mortazaei G. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic doogh (iranian fermented milk drink). *Ital J Food Sci* 2010;1:98-104.
 120. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):365s-73s.
 121. Talwalkar A, Kailasapathy K. Metabolic and biochemical responses of probiotic

- bacteria to oxygen. J Dairy Sci. 2003;86(8):2537-46. eng. 2003/08/27.
122. Talwalkar A, Kailasapathy K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. Acidophilus* and *bifidobacterium* spp. Curr Issues Intest Microbiol. 2004;5:1-8.
 123. Akın MB, Akın MS, Kırmacı Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. Food Chem. 2007;104(1):93-9.
 124. Cousin MA. Review of modern food microbiology, 7th edition. J Food Sci Educ. 2006;5(4):62.
 125. Mugnier J, Jung G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. Appl Environ Microbiol. 1985;50(1):108-14.
 126. Weinbreck F, Bodnár I, Marco ML. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? Int J Food Microbiol. 2010;136(3):364-7.
 127. Yang SJ, Kim KT, Kim TY, Paik HD. Probiotic properties and antioxidant activities of *pediococcus pentosaceus* sc28 and *levilactobacillus brevis* ku15151 in fermented black gamju. Foods. 2020;9(9). eng. 2020/08/23.
 128. Efsa. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal. 2012;10.
 129. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Irwin N. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
 130. Akman PK, Uysal E, Ozkaya GU, Tornuk F, Durak MZ. Development of probiotic carrier dried apples for consumption as snack food with the impregnation of *lactobacillus paracasei*. LWT. 2019;103:60-8.
 131. Głogowski R, Hołda K, Wiczuk W, Hać-Szymańczuk E. Comprehensive microbiological evaluation of dry foods for growing dogs marketed in poland. Ann Wars Univ Life Sci-SGGW, Anim Sci. 2017;56:81.
 132. Quatrin A, Rampelotto C, Pauletto R, Maurer LH, Nichelle SM, Klein B, et al. Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*myrciaria*

- trunciflora) fruit peel during in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *J Funct Foods*. 2020;65:103714.
133. Ranadheera CS, Evans CA, Adams MC, Baines SK. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Res Int*. 2012;49(2):619-25.
134. Burca-Busaga CG, Betoret N, Seguí L, García-Hernández J, Hernández M, Barrera C. Antioxidants bioaccessibility and lactobacillus salivarius (cect 4063) survival following the in vitro digestion of vacuum impregnated apple slices: Effect of the drying technique, the addition of trehalose, and high-pressure homogenization. *Foods*. 2021;10(9):2155.
135. Foongsawat N, Sunthornthummas S, Nantavisai K, Surachat K, Rangsiruji A, Sarawaneeyaruk S, et al. Isolation, characterization, and comparative genomics of the novel potential probiotics from canine feces. *Food Sci Anim Resour*. 2023;43(4):685-702.
136. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร. 3 สิงหาคม พ.ศ. 2554. 21.
137. Beasley SS, Manninen TJK, Saris PEJ. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;101(1):131-8.
138. 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 Proteins*. 2017;9(3):262-77. eng. 2017/02/12.
139. Pridmore RD, Pittet A-C, Praplan F, Cavadini C. Hydrogen peroxide production by lactobacillus johnsonii ncc 533 and its role in anti-salmonella activity. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;283(2):210-5.
140. Adetoye A, Pinloche E, Adeniyi BA, Ayeni FA. Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):96. eng. 2018/09/01.
141. Kim JK, Shin EC, Park HG. Fructooligosaccharides decreased the ability of probiotic

- escherichia coli nissle 1917 to adhere to co-cultures of human intestinal cell lines. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 2015;58.
142. Sidira M, Kourkoutas Y, Kanellaki M, Charalampopoulos D. In vitro study on the cell adhesion ability of immobilized lactobacilli on natural supports. Food Res Int. 2015;76(Pt 3):532-9. eng. 2015/10/01.
 143. Peres CM, Alves M, Hernandez-Mendoza A, Moreira L, Silva S, Bronze MR, et al. Novel isolates of lactobacilli from fermented portuguese olive as potential probiotics. LWT - Food Science and Technology. 2014;59(1):234-46.
 144. Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. Res Microbiol. 2005;156(2):238-44. eng. 2005/03/08.
 145. Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Appl Environ Microbiol. 2006;72(3):1729-38. eng. 2006/03/07.
 146. Chimchang J, Theparee T, Wongein S, Trivirod T, Tanasupawa S, Taweechoatipatr M, et al. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria with anticancer properties. J Med Assoc Thai. 2016;99 Suppl 8:S70-s8. eng. 2016/11/01.
 147. Sharma C, Gulati S, Thakur N, Singh BP, Gupta S, Kaur S, et al. Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. 3 Biotech. 2017;7(1):53. eng. 2017/04/27.
 148. Aarti C, Khusro A, Varghese R, Arasu MV, Agastian P, Al-Dhabi NA, et al. In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of lactobacillus brevis strain lap2 isolated from hentak, a fermented fish product of north-east india. LWT. 2017;86:438-46.
 149. Cai J, Bai J, Luo B, Ni Y, Tian F, Yan W. In vitro evaluation of probiotic properties and antioxidant activities of bifidobacterium strains from infant feces in the uyghur population of northwestern china. Annals of Microbiology. 2022;72(1):14.
 150. Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: In vitro and in vivo activities. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(2):809-17. eng. 2012/07/14.

151. Horvath P, Barrangou R. Crispr/cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70. eng. 2010/01/09.
152. Yusuf M. Chapter 12 - natural antimicrobial agents for food biopreservation
Grumezescu AM, Holban AM, editors. Food packaging and preservation.
Academic Press; 2018. 409-38.
153. Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang Z, He Y, Dietel K, et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* fzb42. *J Bacteriol*. 2014;196(10):1842-52. eng. 2014/03/13.
154. Karaseva O, Ozhegov G, Khusnutdinova D, Siniagina M, Anisimova E, Akhatova F, et al. Whole genome sequencing of the novel probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* fca3l. *Microorganisms*. 2023;11(5). eng. 2023/06/15.
155. Calín-Sánchez Á, Lipan L, Cano-Lamadrid M, Kharaghani A, Masztalerz K, Carbonell-Barrachina Á A, et al. Comparison of traditional and novel drying techniques and its effect on quality of fruits, vegetables and aromatic herbs. *Foods*. 2020;9(9). eng. 2020/09/13.
156. Valerio F, Volpe MG, Santagata G, Boscaino F, Barbarisi C, Di Biase M, et al. The viability of probiotic *Lactobacillus paracasei* impc2.1 coating on apple slices during dehydration and simulated gastro-intestinal digestion. *Food Bioscience*. 2020;34:100533.
157. Kazimierska K, Biel W, Witkowicz R, Karakulska J, Stachurska X. Evaluation of nutritional value and microbiological safety in commercial dog food. *Vet Res Commun*. 2021;45(2-3):111-28. eng. 2021/04/28.
158. Majumdar A, Pradhan N, Sadasivan J, Acharya A, Ojha N, Babu S, et al. Chapter 5 - food degradation and foodborne diseases: A microbial approach Holban AM, Grumezescu AM, editors. Microbial contamination and food degradation. Academic Press; 2018. 109-48.
159. Huang Y, Adams MC. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int J Food Microbiol*. 2004;91(3):253-60. eng. 2004/02/27.

160. Seyedain-Ardabili M, Sharifan A, Tarzi BG. The production of synbiotic bread by microencapsulation. *Food Technol Biotechnol*. 2016;54(1):52-9. eng. 2016/12/03.
161. Parsana Y, Yadav M, Kumar S. Microencapsulation in the chitosan-coated alginate-inulin matrix of *limosilactobacillus reuteri* sw23 and *lactobacillus salivarius* rbl50 and their characterization. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2023;5:100285.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) broth หรือ 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 (สำหรับทำอาหาร MRS agar)	15	กรัม
Calcium carbonate (สำหรับทำอาหาร MRS agar+0.3% CaCO ₃)	3	กรัม

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่า
เชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Peptone water

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่า
เชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Buffer peptone water สำเร็จรูป (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

Peptone	10 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Disodium phosphate	3.5 กรัม
Dihydrogen potassium phosphate	1.5 กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar) สำเร็จรูป (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

Yeast extract	3 กรัม
L-Lysine	5 กรัม
Xylose	3.5 กรัม
Lactose	7.5 กรัม
Sucrose	7.5 กรัม
Sodium deoxycholate	2.50 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8 กรัม
Sodium thiosulphate	6.8 กรัม
Sodium Chloride	5 กรัม
Phenol red	0.08 กรัม
Agar	15 กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 56.68 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งอาหารละลายเข้ากัน (ไม่ต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อ)

5. อาหาร Rappaport Vassiliadis soya broth (RVS broth) สำเร็จรูป (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India)

Soya peptone	4.5 กรัม
Magnesium chloride hexahydrate	29 กรัม
Sodium chloride	8 กรัม

Dipotassium phosphate	0.4 กรัม
Monopotassium phosphate	0.6 กรัม
Malachite green	0.036 กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 42.53 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหาร Plate count agar (PCA)

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose (Glucose)	1 กรัม
Agar	15 กรัม

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA)

Dextrose (Glucose)	40 กรัม
Peptone	10 กรัม
Agar	15 กรัม

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหาร Decarboxylase medium

Decarboxylase base medium	9.02 กรัม
กรดอะมิโน 4 ชนิด (L-histidine, L-lysine, L-arginine และ L-ornithine)	5 กรัม

ชั่งอาหารตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-NaCl-EDTA

Tris-HCl	0.1 โมลาร์
EDTA	1 มิลลิโมลาร์
NaCl	20 มิลลิโมลาร์
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. Lysis buffer

0.5 M EDTA	1 มิลลิลิตร
Triton X-100	3 มิลลิลิตร
Tris-HCl	5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	250 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร

3. ไลโซไซม์ (lysozyme)

Lysozyme	50 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร

4. 10% sodium dodecyl sulfate

Sodium dodecyl sulfate	100 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายบัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl	0.1 โมลาร์
EDTA	1 มิลลิโมลาร์

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 2% sodium alginate

Sodium alginate	2 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. 0.05 M calcium chloride

Calcium chloride	0.056 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 0.85% sodium chloride

Sodium chloride	0.85 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Simulated gastric fluid pH 2

Pepsin (1,000 U/mg)	0.3 กรัม
---------------------	----------

NaCl

0.5 กรัม

ชั่ง NaCl ตามสูตรข้างต้นละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม pepsin ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เป็น 2 จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

10. Simulated intestinal fluid pH 8

Bile salt

0.3 กรัม

NaCl

0.5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันตามสูตรข้างต้น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

