การผลิตอาหารสัตว์ด้วย *Enterococcus faecium* A028 ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่

PRODUCTION OF ANIMAL FEED WITH *Enterococcus faecium* A028 ISOLATED FROM CHICKEN GASTROINTESTINAL TRACT

ศิรยาพร ฟักสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การผลิตอาหารสัตว์ด้วย *Enterococcus faecium* A028 ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่

ศิรยาพร ฟักสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตอาหารสัตว์ด้วย *Enterococcus faecium* A028 ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่ Production of Animal Feed with *Enterococcus faecium* A028 Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศิรยาพร ฟักสกุล
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อัษฎาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.
ปีการศึกษา	2560

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์กมลชัย ชะเอม, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อารณี โชติโก, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์จันทิมา ทีฆะ, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อัษฎาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ปร.ด.)
วันที่ 15 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2561

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตอาหารสัตว์ด้วย *Enterococcus faecium* A028 ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่ Production of Animal Feed with *Enterococcus faecium* A028 Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศิรยาพร ฟักสกุล
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อัษฎาวุธ อารีสิริสุข, Ph.D.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์จันทิมา ฑีฆะ, Ph.D.
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ คัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria, LAB) ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ LAB ในกากถั่วเหลืองโดยการหมักแบบแห้ง และเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิการอบแห้งและจลนศาสตร์การอบแห้งของกระบวนการอบแห้งด้วยลมร้อน ในขั้นแรกแบคทีเรียถูกคัดแยกจากทางเดินอาหารไก่ที่มีสุขภาพดี จากแบคทีเรียที่ถูกคัดแยกนี้ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต A028 A040 และ A046 คัดแยกได้จากลำไส้และ B015 และ B020 คัดแยกได้จากตับ แบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแสดงผลของการทดสอบคะตะเลสเป็นลบซึ่งเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของ LAB จากการนำ LABs นี้ไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ในหลอดทดลองในขั้นตอนต่อไป การมีชีวิตของ LAB ถูกทดสอบภายใต้น้ำย่อยจำลองในกระเพาะอาหารที่มีเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ความเข้มข้น 3 mg / mL ที่อุณหภูมิ 41^{O}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลต A028 และ A040 สามารถรอดชีวิตได้ภายใต้สภาวะจำลองนี้ ในขณะที่ไอโซเลต A046 B015 และ B020 ไม่สามารถรอดชีวิตได้ โดยไอโซเลต A028 และ A040 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 5.372 และ 5.146 log CFU / mL คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 65.97 และ 63.23 % ตามลำดับ นอกจากนี้ LAB ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีที่ 1.0 % (w / v) ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 และการทดสอบการย่อยสารอาหาร พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถย่อยโปรตีนได้ แต่ไม่มีความสามารถในการย่อยไขมันและแป้ง

นอกจากนี้ทุกไอโซเลต สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะเพนิซิลิน วี (penicillin V) เตตราไซคลีน (tetracycline) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) และสามารถต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Aeromonas* sp. ได้ นอกจากนี้ไอโซเลต A028 และ B015 ยังสามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ได้อีกด้วย เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ LAB ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *Enterococcus faecium* ทั้งหมด โดยมีความคล้ายคลึงมากกว่า 99 %

จากการทดสอบคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ในหลอดทดลอง การย่อยอาหาร ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคจึงคัดเลือก *E. faecium* A028 ซึ่งเป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพสำหรับศึกษาการหมักแบบแห้ง โดยใช้กากถั่วเหลืองและกากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นหลักของการหมักแบบแห้ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการมีชีวิตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของกากถั่วเหลืองต่อน้ำและความเข้มข้นของกากน้ำตาล โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 9.82 log CFU / g และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.677 h^{-1} เมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 5 % และอัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อน้ำที่ 1 ต่อ 1 เท่า

การอบแห้งด้วยลมร้อนถูกใช้เพื่อลดความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก โดยศึกษาผลของอุณหภูมิในการอบแห้งต่อความสามารถในการมีชีวิตของโพรไบโอติกส์และความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการอบแห้งทำให้ความชื้นลดลงอย่างรวดเร็ว จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *E. faecium* A028 ลดลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิการอบแห้งต่ำกว่า 50 ^{O}C และลดลงมากที่อุณหภูมิ 55 ^{O}C โดยที่อุณหภูมิ 50 ^{O}C จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *E. faecium* A028 ลดลงเล็กน้อยเหลือเท่ากับ 96.41 % และความชื้นลดลงต่ำกว่า 10 % และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 7 แบบถูกประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาจลนศาสตร์การอบแห้ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Modified Page เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดในการอธิบายจลนศาสตร์ของการอบแห้งกากถั่วเหลืองหมัก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9996 ยิ่งกว่านี้แบบจำลอง Modified Page ยังให้ค่ารากที่สองของความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (Root mean square error, *RMSE*) และค่าไคสแควร์ (Chi-square, X^2) น้อยที่สุด และค่าประสิทธิภาพการจำลองแบบ (Modeling efficiency, *EF*) เป็นแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

คำสำคัญ: โพรไบโอติกส์ กากถั่วเหลือง การหมักแบบแห้ง กระบวนการอบแห้งด้วยลมร้อน จลนศาสตร์ของการอบแห้ง

Thesis Title	Production of Animal Feed with *Enterococcus faecium* A028 Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract
Name – Surname	Miss Sirayaporn Faksakul
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Mr. Atsadawut Areesirisuk, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Miss Jantima Teeka, Ph.D.
Academic Year	2017

ABSTRACT

The aims of this study were to screen and select the lactic acid bacteria (LAB) having probiotic properties, study the appropriate condition for growing the selected LAB in soybean meal by solid-state fermentation, and study the effect of drying temperatures and kinetics of hot-air drying process. Firstly, bacteria were screened from the intestinal tract of healthy chicken. Among these bacteria, the isolate A028, A040, and A046 bacteria were screened from the intestine and B015 and B020 bacteria were screened from the liver. These bacteria were gram-positive bacteria and presented a negative result of catalase test which was the basic properties of a LAB. These LABs were further investigated on the in-vitro probiotic properties. The cell viability of LAB was determined under the simulated gastric juice containing 3 mg/mL pepsin at 41°C for 2 hours. Under this condition, the isolate A028 and A040 survived while isolate A046, B015, and B020 did not. The isolate A028 and A040 presented the viable cell number for 5.372 and 5.146 log CFU/mL with 65.97 and 63.23 % of survival, respectively. Moreover, these five isolates could tolerate 1.0 % (w/v) bile salt condition at pH 8.0. The nutrient digestions were investigated and found that all isolates could digest protein, but they had no ability to digest lipid and starch. In addition, all isolates could tolerant the penicillin V, tetracycline, and chloramphenicol and showed the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Aeromonas* sp. Moreover, the isolate A028 and B015 could inhibit

Salmonella typhimurium. Consequently, all isolates (A028, A040, A046, B015, and B020) were identified as *Enterococcus faecium* with over 99% identity.

According to the investigation of in vitro probiotic properties, nutrient digestion, antibiotic, and antimicrobial activity, *E. faecium* A028 was selected as the potential probiotic strain for studying solid state fermentation (SSF). Soybean meal (SBM) and molasses were used as the main substrate of SSF. The results showed that bacterial viability depended on the ratios of SBM-to-water and molasses concentration. The highest viable cell number of 9.82 log CFU/g and maximum specific growth rate of 0.677 1/h were obtained at 5% molasses and a 1:1 ratio of SBM-to-water.

Hot air-drying was used to decrease the moisture content of fermented soybean meal (FSBM). The effect of drying temperature on probiotic viability and moisture content was examined. Increasing the drying temperature resulted in a rapid decrease of the moisture content. The viable cell number of *E. faecium* A028 slightly decreased at drying temperatures lower than 50 °C and was greatly decreased at 55 °C. At 50°C, cell viability of *E. faecium* A028 was slightly decreased to 96.41% and the moisture content lowered than 10%. Seven mathematical models were further applied to study the drying kinetics. The results demonstrated that Modified Page model was the best fit model for explanation of FSBM drying kinetics, with a coefficient of determination (R^2) of 0.9996. Moreover, the Modified Page model provided the lowest root mean square error (*RSME*) and chi-square (X^2) and the highest modeling efficiency (*EF*).

Keywords:probiotics, soybean meal, solid state fermentation, hot air-drying process, drying kinetics

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ดีด้วยความกรุณาจาก ดร. อัษฎาวุธ อารีสิริสุข อาจารย์ที่ปรึกษาหลักในการทำวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ชี้แนะแนวทางแก้ปัญหาตลอดระยะเวลาการศึกษาไม่ว่าจะเป็นการสอนในเรื่องของทฤษฎีและการทำปฏิบัติการ รวมถึงสนับสนุนอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีในการทำการทดลองเป็นอย่างดีและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการปฏิบัติงาน รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.จันทิมา ฑีฆะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์และกรรมการสอบในครั้งนี้ที่ให้คำปรึกษาในระหว่างการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ ดร. อนันต์ บุญปาน ที่ให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา รวมทั้งให้คำแนะนำในการทำการทดลอง ชี้แนะวิธีแก้ปัญหาต่างๆ ในการศึกษารวมถึงการทดลองและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ ดร.กมลชัย ชะเอม ที่กรุณาเป็นประธานสอบในครั้งนี้และคอยให้คำชี้แนะเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ ดร. ดลนภา แก้วภา ที่คอยให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมาและขอขอบคุณ ดร. อารณี โชติโก ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ผู้ดำเนินการวิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมทั้งอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีต่างๆ ในการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุพจน์ และคุณแม่เกสร ฟักสกุล ผู้ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้เป็นอย่างดี อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีอย่างยิ่งตลอดเวลาจนทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ศิรยาพร ฟักสกุล

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย……(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……(5)
กิตติกรรมประกาศ……(7)
สารบัญ…… .(8)
สารบัญตาราง……(10)
สารบัญภาพ……(11)
บทที่ 1 บทนำ 12
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 12
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 13
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 14
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) 14
2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก 16
2.3 โพรไบโอติกส์ (Probiotics) 16
2.4 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก 18
2.5 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของ *E. faecium* 22
2.6 การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) 27
2.7 การอบแห้ง (Drying) 29
2.8 องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง 31
2.9 กากน้ำตาลและองค์ประกอบของกากน้ำตาล 33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 39
3.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ 39
3.2 วิธีการทดลอง 41

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 48
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ และตับไก่ 48
4.2 ทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ในหลอดทดลอง (*In vitro*) 49
4.3 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก 58
4.4 การระบุสายพันธุ์ LAB ที่คัดแยกได้โดยวิธีทางชีวโมเลกุล 60
4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ด้วยการหมักแบบแห้งในกากถั่วเหลือง 60
4.6 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองด้วยการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด 65
4.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *E. faecium* A028 67
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 79
บรรณนานุกรม 81
ภาคผนวก 93
ภาคผนวก ก 94
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 94
ภาคผนวก ข 98
สารเคมีและการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ 98
ภาคผนวก ค 100
ประกาศกระทรวงสาธารสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร 100

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล ……15

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและปริมาณธาตุอาหารของผลิตภัณฑ์จากกากน้ำตาลจากไม้……..34

ตารางที่ 3 ปริมาณแร่ธาตุในกากน้ำตาล……..……..……..……..……35

ตารางที่ 4 ปริมาณวิตามินในกากน้ำตาล…….....……..35

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบปริมาณพลังงานของกากน้ำตาลกับอาหารอื่น ๆ……...……36

ตารางที่ 6 การรอดชีวิตของ LAB ในสภาวะกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน ……...……..50

ตารางที่ 7 การรอดชีวิตของ LAB ในสภาวะความเป็นด่างพีเอช 8 ..……..……..……...51

ตารางที่ 8 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งของ LAB……..……53

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB……..……...55

ตารางที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตของ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลต…….……60

ตารางที่ 11 อัตราการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองที่สภาวะต่าง ๆ……....64

ตารางที่ 12 อัตราการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่หมักร่วมกับกากถั่วเหลืองในระดับขยายขนาด…….66

ตารางที่ 13 ค่าสัมประสิทธิ์การอบแห้งของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์……..…….....…..70

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การอบแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ……..…..71

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของเครื่องอบแห้งแบบถาดพลังงานความร้อนผสมผสาน 30

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีต่างๆ ของแบคทีเรียสร้างกรดโดยการย้อมแกรมแบคทีเรีย 49

ภาพที่ 3 ความสามารถในการย่อยโปรตีนของเชื้อ LAB 53

ภาพที่ 4 ลักษณะบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB ที่คัดแยก 56

ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS 59

ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองที่เติมกากน้ำตาล 5 % ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 61

ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่อัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล 1 ต่อ 1 เท่า ความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 0 5 และ 10 % (w/v) 62

ภาพที่ 8 การเจริญของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองที่สภาวะต่าง ๆ 63

ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่หมักร่วมกับกากถั่วเหลืองในระดับขยายขนาด 66

ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในกากถั่วเหลืองหมักที่อบแห้งด้วยอุณหภูมิต่าง ๆ 67

ภาพที่ 11 การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในระหว่างกระบวนการอบแห้ง 68

ภาพที่ 12 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Lewis 73

ภาพที่ 13 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Page 73

ภาพที่ 14 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Modified Page 74

ภาพที่ 15 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Parabolic 74

ภาพที่ 16 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Henderson and Pabis 75

ภาพที่ 17 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Logarithmic 75

ภาพที่ 18 การเลียนแบบด้วยแบบจำลอง Two - Term 76

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โพรไบโอติกส์เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะสามารถให้คุณประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ [1] หลักเกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่เป็นโพรไบโอติกส์ต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและในด้านเทคนิคของการผลิตต้องได้มาตรฐาน สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร สามารถยึดเกาะและอาศัยอยู่บริเวณเยื่อบุผิวลำไส้ สามารถต้านทานโรค สามารถย่อยสารอาหารได้ [2] มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินต้านจุลชีพ [3] นอกจากนั้นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ต้องสามารถทนต่อกระบวนการผลิตได้ โพรไบโอติกส์ที่ดีจะเน้นสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและความปลอดภัยของมนุษย์เป็นอันดับแรก [2] อาหารที่มีการเสริมโพรไบโอติกส์ เช่น Lactobacilli และ *Bacillus* spp. ได้รับการยืนยันว่ามีความสามารถในการรักษาหรือป้องกันโรคได้หลายโรคในมนุษย์และสัตว์ [4] โดยโพรไบโอติกส์ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก [5]

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่มีการสร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) มีรูปร่างหลากหลายทั้งที่เป็นรูปกลมและท่อน [6] พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติซึ่งมีความปลอดภัยสูงต่อคนและสัตว์ ยังมีความสามารถสร้างสารยับยั้งและทำลายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกส์สำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ [7] ในปัจจุบันมีรายงานการเกิดโรคของสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด ในสัตว์น้ำมีรายงานว่าในปลานิลมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnarae* ซึ่งก่อให้เกิดโรคคอลัมนาริส โดยมีสาเหตุมาจากความเครียดระหว่างการขนส่งและสภาพอากาศที่ร้อน ส่งผลให้ลำตัวมีสีด่างซีด มีเมือกมาก ส่วนครีบและเหงือกกร่อน [8] และยังพบลูกปลานิลเป็นโรค Epitheliocystis เมื่อมีการติดเชื้อรุนแรงอาจทำให้ปลาตายได้ [9] มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ [8] นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อวิบริโอ 6 ชนิด คือ *Vibrio fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. cholera* (non01) และ *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคขี้ขาวในกุ้งขาวแวนนาไม ทำให้กุ้งมีขนาดไม่สม่ำเสมอลำตัว

ตัวหลวมและตายในที่สุด [10] ในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกส์สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ส่งเสริมการเจริญของสัตว์น้ำ และลดการใช้ยาปฏิชีวนะ [7] การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์จึงได้รับความสนใจมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารไก่ ซึ่งเป็นแหล่งของแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ โดยในไก่เนื้อที่มีสุขภาพดีและไม่มีความเครียดจะมีความสมดุลระหว่างแบคทีเรียที่มีประโยชน์และไม่มีประโยชน์ ทำให้ไก่เนื้อเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด [11] จะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในด้านการเกษตรโดยใช้เป็นสารเสริมปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์ [6]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่ เพื่อศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์เบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบแห้งในกากถั่วเหลืองและศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งกากถั่วเหลืองหมัก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่

1.2.2 เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

1.2.3 ศึกษาการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์โดยการหมักแบบแห้งในกากถั่วเหลือง

1.2.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการอบแห้งกากถั่วเหลืองหมักด้วยตู้อบลมร้อน

1.2.5 เพื่อสร้างแบบจำลองการอบแห้งกากถั่วเหลือง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมได้ และสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมา โดยสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มตามผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น คือ กลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) และกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) โดยกลุ่มแรกนั้นแบคทีเรียจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หมักได้มากกว่า 95 % ผลิตกรดอะซิติก (Acetic acid) 5 % และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย สำหรับแบคทีเรียกลุ่มที่สองจะผลิตกรดแลคติกประมาณ 50 % และผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก (Formic acid) เอทธานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์รวมกันประมาณ 50 % [6] แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ [12] ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครม ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ บางชนิดสร้างเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (Porphyrin group) [12] มีรูปร่างแบบแท่ง กลม รวมถึงกึ่งแท่งกึ่งกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญและบางชนิดเจริญได้ในสภาพที่ไร้อากาศ [13] เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอาหารค่อนข้างซับซ้อนและมีความอุดมสมบูรณ์ (Complex and enrichment media) โดยจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจน แบคทีเรียจะเจริญได้ในอาหารที่มี Growth factor และมีวิตามิน เช่น ไบโอทิน (Biotin) หรือริโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง [6] เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในท่อของทางเดินอาหาร ช่องฟันและช่องคลอดของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม และยังพบทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในอาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่มต่าง ๆ และเครื่องในสัตว์ เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกถูกจัดเป็นกลุ่มที่สำคัญ 4 สกุล (Genus) ได้แก่ *Lactobacillus* *Leuconostoc* *Pediococcus* และ *Streptococcus* คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล แสดงในตารางที่ 1 ปัจจุบันมีการตรวจสอบระดับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecule) ต่าง ๆ ภายในเซลล์และวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์และลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรม โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิก ซึ่งใช้จัดจำแนกจุลินทรีย์ได้ถึงระดับ Species และ Subspecies โดยใช้เทคนิค

ขั้นสูงทางพันธุศาสตร์ การเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวมีความแม่นยำในการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็นสกุลต่าง ๆ ดังนี้ *Aerococcus Alloiococcus Bifidobacterium Carnobacterium Enterococcus Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Pediococcus Streptococcus Tetragenococcus Vagococcus* และ *Weissella* [6]

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล

คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	*Lactobacillus*	*Leuconostoc*	*Pediococcus*	*Streptococcus*
Growth at pH 8.0	ND	ND	+	ND
Growth at pH 9.6	-	-	+	+/-
Growth at NaCl 4 %	ND	ND	+	ND
Growth at NaCl 8 %	+/-	ND	+/-	ND
Growth at 45 ^{o}C	+	+	+	+/-
Growth at 50 ^{o}C	+/-	-	+/-	ND
Acid fromation	+	+	ND	+/-
Arabinose	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Maltose	+	ND	-	-
Raffinose	+	-	-	+/-
Ribose	+	-	ND	+/-
Sucrose	-	+/-	+/-	+/-
Trehalose	ND	+/-	-	+/-
Xylose	-	-	-	-
Aginine hydrolysis	+	-	-	+/-

ตารางที่ 1 (ต่อ) คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล

คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	*Lactobacillus*	*Lactobacillus*	*Pediococcus*	*Streptococcus*
Catalase activity	ND	ND	-	-

หมายเหตุ - คือไม่เกิดปฏิกิริยา + คือ เกิดปฏิกิริยา

+/- คือ ความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ ND คือไม่มีข้อมูล

ที่มา : Holt *et al*. [14]

2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis Micrococcus pyogenes Escherichia coli Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น และยังมีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่ส่งผลเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นด้วย ได้แก่

2.2.1 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นให้กลายเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ [6]

2.2.2 ไดอะซิติล (Diacetyl) เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมักและยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์อีกด้วย [6]

2.2.3 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว โดยผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดรวมทั้ง จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้อีกด้วย แบคเทอริโอซินจึงเป็นสารที่ได้รับความสนใจนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร [6]

2.2.4 รูทีริน (Reuterin) เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน ละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยแบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus reuterin* รูทีรินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โพรโทซัว และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ [6]

2.3 โพรไบโอติกส์ (Probiotics)

โพรไบโอติกส์เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ FAO และ WHO รายงานไว้ว่าเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตซึ่งถ้ามีจำนวนมากพอจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุขภาพได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้นิยมใช้กันทั่วโลกในด้านการ

ดูแลสุขภาพและในการบำบัดโรคบางชนิดโดยช่วยควบคุมการทำงานของระบบทางเดินอาหารที่ผิดปกติ เช่น โรคอุจจาระร่วง และช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่ดี รวมทั้งช่วยรักษาอาการของโรคภูมิแพ้ทั้งในเด็ก ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุอีกด้วย [15]

โพรไบโอติกส์มีผลต่อการทำงานในด้านต่าง ๆ ภายในระบบทางเดินอาหาร เช่น การย่อย การดูดซึมและการบีบตัวเคลื่อนไหวของระบบทางเดินอาหาร บทบาทที่สำคัญอีกประการคือ การหมักที่มีการสร้างกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acids, SCFA) ประกอบไปด้วยกรดไขมันที่ไม่ระเหย (Non-volatile fatty acids) ได้แก่พวก Lactate และกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acids) คือ Acetate Butyrate Proprionate และแอลกอฮอล์ ซึ่งจะให้พลังงาน 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ต้องใช้ Volatile SCFA เป็นตัวให้พลังงานเพื่อทำหน้าที่ในการดูดซึมน้ำและเกลือแร่จากของเหลวภายในโพรงลำไส้ จุลินทรีย์บางชนิดทำให้อาหารอยู่ในระบบทางเดินอาหารสั้นและลดน้ำย่อยบางชนิดที่อาจจะเป็นสารกระตุ้นให้เกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ [15] โพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ [15] โดยจะปล่อยสารออกมากระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ซึ่งมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ได้ เช่น Lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ในการสร้างเยื่อเมือกออกมาเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองต่อวัคซีนและการติดเชื้อโรค [15]

ในปัจจุบันเกษตรกรหันมาใช้โพรไบโอติกส์เสริมในอาหารสัตว์บกและสัตว์น้ำมากขึ้น เนื่องจากมีประโยชน์หลากหลายและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค Nimrat *et al.* [16] ทำการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวาโดยการใช้โพรไบโอติกส์ควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus subtilis* และ *Enterococcus* sp. เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโต กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ช่วยย่อยอาหาร (Trypsin และ Chymotrypsin) และมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา โดยมีการทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริมโพรไบโอติกส์พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกส์ในระยะเวลา 84 วัน มีน้ำหนัก (2.03 ± 0.29 กรัม) และการรอดชีวิต (71.91 ± 3.15 %) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ (1.53 ± 0.28 กรัม และ 65.20 ± 5.68 %) ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกส์สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin ทั้งกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกส์และกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากที่ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวากับ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 10 วัน พบว่าอัตราการตายของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวาที่

เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกส์เป็น 46.67 ± 1.44 % ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกว่ากลุ่มควบคุม (61.67 ± 6.29 %) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกส์ที่ใช้มีศักยภาพเพียงพอมีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะโพสลาวาภายใต้การทดลองในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวกุ้งกุลาดำและการเพิ่มประสิทธิภาพการรอดชีวิตโดยกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin และการลดอัตราการตายที่เกิดจากเชื้อ *V. harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้ ต่อมาได้มีรายงานการนำโพรไบโอติกส์ไปใช้ร่วมกับอาหารสัตว์ในหลากหลายรูปแบบโดย Seenivasan *et al*. [17] ได้ศึกษาถึงการใช้โพรไบโอติกส์ 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus sporogenes Bacillus subtilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการอยู่รอด การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งก้ามกรามระยะโพสลาวาโดยมีสูตรการให้อาหารดังนี้ *L. sporogenes* (4 %) *B. subtilis* (3 %) และ *S. cerevisiae* (4 %) ซึ่งได้นำมาผสมกับอาหารหลัก โดยให้กลุ่มควบคุมเป็นอาหารที่ไม่มีการเสริมโพรไบโอติกส์ หลังจากนั้นทำการเลี้ยงที่ 60 วัน พบว่ากุ้งก้ามกรามมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น น้ำหนักเพิ่มขึ้น และการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร เช่น โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น การเติม *S. cerevisiae* (4 %) ร่วมกับอาหารหลักพบว่ามีการเจริญเติบโตมากขึ้น Dong *et al*. [18] ได้ศึกษาการใช้ *Bacillus* เสริมในอาหารของกุ้งคุรุมะโดยทดสอบความสามารถในการปรับปรุงการเจริญเติบโตและความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิสูง โดยทำการเลี้ยงในระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งคุรุมะมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าเปอร์เซ็นต์ของ *Vibrio* ในลำไส้กุ้งคุรุมะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเติมโพรไบโอติกส์ลงไป และมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมถึง prophenoloxidase lysozyme cytosolic manganese superoxide dismutase และ hemocyanin subunit L ในกุ้งคุรุมะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มที่มีการเสริม *Bacillus* ผลการศึกษานี้พบว่า *Bacillus* สามารถนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากการเผาผลาญออกซิเจนไม่เพียงพอเนื่องจากความเครียดที่อุณหภูมิสูงและเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถปรับปรุงการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งคุรุมะในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงได้

2.4 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

Aswathy *et al.* [19] ศึกษาคุณลักษณะโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผักดอง แป้งเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นม แกะ และอุจจาระของมนุษย์ โดยทดสอบคุณลักษณะที่พึงประสงค์ของโพรไบโอติกส์ เช่น ความต้านทานต่อเกลือน้ำดี การทนเค็ม การรอดชีวิตในค่าพีเอชต่ำ ความ

ต้านทานต่อฟีนอลที่ความเข้มข้นต่ำ ทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรค และความไวต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin และ Erythromycin นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในมีการผลิตกรดโฟลิกและ Exopolysaccharide (EPS) จะถูกคัดเลือกไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลการทดลองพบว่าไอโซเลต CB2 (จากกะหล่ำปลี) และ SD2 (จากแป้งเปรี้ยว) มีการผลิตโฟเลตทั้งชนิดที่เป็น Extracellular และ Intracellular และยังพบว่าไอโซเลต MC-1 (จากโยเกิร์ต) และ W3 (จากเวย์) มีการผลิต EPS สูง โดยไอโซเลต MC - 1 มีการผลิตสูงถึง 8.79 ± 0.05 g / L

Lazado *et al* [20] ได้ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ GP21 และ GP12 ซึ่ง 2 สายพันธุ์เป็นโพรไบโอติกส์ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของปลา Atlantic Cod ผลการทดลองพบว่าโพรไบโอติกส์ GP21 (*Pseudomonas* Sp.) และ GP12 (*Psychrobacter* Sp.) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (*Vibrio anguillarum* และ *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) ที่พบในปลาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 2 ชนิดเป็นสายพันธุ์ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคในปลา และทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีได้และไม่ทำให้ปลาเสียชีวิตซึ่งยืนยันถึงความปลอดภัยของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกส์ได้

Alp and Aslim [21] ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความต้านทานต่อเกลือน้ำดีและสภาวะกรดกับการผลิต Exopolysaccharide (EPS) ของ *Bifidobacterium* spp. ที่แยกได้จากอุจจาระทารกและเต้านม โดยการศึกษาครั้งนี้สามารถแยก *Bifidobacterium* spp. จากอุจจาระทารกและเต้านมได้ 31 สายพันธุ์ พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Bifidobacterium Breve* (15 สายพันธุ์) *B. bifidum* (11 สายพันธุ์) *B. pseudocatenulatum* (3 สายพันธุ์) และ *B. longum* (2 สายพันธุ์) และ *Bifidobacterium* spp. มีการผลิต Exopolysaccharide (EPS) อยู่ในช่วง (38.00 - 97.64 mg / L) นอกจากนี้ยังพบว่า *Bifidobacterium* spp. มีความสามารถในการต้านทานต่อเกลือน้ำดีและสภาวะกรดได้

Sica *et al.* [22] ศึกษาคุณลักษณะโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำเค็มเพื่อการประยุกต์ใช้ในปลาเรนโบว์เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) และทำการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อค่าความเป็นกรดด่างและทนต่อเกลือน้ำดี โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์สามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้นที่ 10 % เวลาในการบ่ม 1.5 ชั่วโมงได้ และส่วนใหญ่จะสามารถรอดชีวิตที่พีเอช 3.0 เวลาบ่ม 1.5 ชั่วโมง โดยบางสายพันธุ์สามารถรอดชีวิตที่พีเอช 2.0

Musikasang *et al.* [23] ศึกษาถึงศักยภาพความเป็นโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากระบบการย่อยในทางเดินอาหารของไก่เนื้อและไก่พื้นเมืองของไทย โดยทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี ความสามารถในการย่อยแป้ง โปรตีน และไขมัน และการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 322 สายพันธุ์จากไก่เนื้อจำนวน 10 ตัวอย่างและ 226 สายพันธุ์จากไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 8 ตัวอย่าง โดยทดสอบความอดทนในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ที่พีเอช 2.5 ร่วมกับสภาวะที่มีเอนไซม์เพปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสภาวะจำลองในลำไส้ที่พีเอช 8.0 ที่มีเอนไซม์แพนคลีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำดีสดของไก่ 7 % เพื่อเลียนแบบสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหาร หลังจากทดสอบสภาวะดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ คือ KT3L20 KT2CR5 KT10L22 KT5S19 KT4S13 และ PM1L12 มีอัตราการอยู่รอดเท่ากับ 43.68 37.56 33.84 32.89 31.37 และ 27.19 % ตามลำดับ และมีแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน แต่ไม่มีความสามารถในการย่อยแป้งและไขมัน และยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella sp. Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* จำนวน 22 สายพันธุ์และได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterococcus faecalis* KT2L24 *Enterococcus durans* KT3L20 *Enterococcus faecium* KT4S13 *Pediococcus pentosaceus* KT3CE27 และ *Enterococcus faecium* KT8S16 เพื่อนำไปทดสอบการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ได้โดยการห่อหุ้ม

Sathyabama *et al.* [24] ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์จากอุจจาระของกลุ่มชนต่างๆ โดยคัดเลือกสายพันธุ์โพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพ ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนจำนวน 67 สายพันธุ์ และแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนจำนวน 38 สายพันธุ์ และการประเมินคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์พบว่ามีการรอดชีวิตที่ 75 - 97 % ในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี มีการเกาะติดผนังลำไส้สูง และเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรค พบว่าแบคทีเรียที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมจำลองในระบบทางเดินอาหารที่ดีที่สุด คือ *Staphylococcus succinus* MAbB4 และ *E. faecium* FIdM3

Shazali *et al.* [25]ได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอุจจาระของไก่มีความอดทนต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin Amoxicillin Chloramphenicol และ Ampicillin โดยมีความอดทนสูงกว่า Nalidixic acid Gentamycin Sulphamethoxazole Kanamycin และ Streptomycin อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสามารถนำไปใช้ในฟาร์มไก่เนื้อ

Yuksekdag *et al.* [26] ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารไก่ โดยพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในไก่ได้ และยังพบว่าแบคทีเรีย Lactobacilli สามารถผลิตกรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และ Exopolysaccharide ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 และ *L. acidophilus* BAZ29 มีความอดทนต่อความเป็นกรดสูงและน้ำดี มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ มีฤทธิ์ต้านจุลชีพสูง มีความสามารถในการรวมตัว และมีการผลิต EPS ซึ่งสามารถใช้เป็นโพรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงไก่ได้

Gu *et al.* [27] ได้ศึกษาโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ใหม่ *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 ที่แยกได้จากอุจจาระสุกรที่มีสุขภาพดี โดยพบว่า *B. coagulans* CGMCC 9551 สามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคสายพันธุ์หลัก ได้แก่ *Escherichia coli* O8 *Staphylococcus aureus Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis Streptococcus suis Listeria monocytogenes* และ *Pasteurella multocida* และยังพบว่า *B. coagulans* CGMCC 9551 มีความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ได้มากกว่าเชื้อ *B. subtilis* JT143 และ *L. acidophilus* LY24 ตามลำดับ อัตราการรอดชีวิตของ *B. coagulans* CGMCC 9551 ลดลงเพียง 20 % ที่มีเกลือน้ำดี 0.9 % (w / v) เวลา 4 ชั่วโมง ในส่วนของสภาวะความเป็นกรดพีเอช 2 เวลา 2 ชั่วโมง มีการรอดชีวิต 90.1 ± 3.5 % และไวต่อยาปฏิชีวนะ 15 ชนิดที่นิยมใช้ในงานด้านสัตวศาสตร์

คมแข และคณะ [28] ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่ พบว่า *L. salivarius* K4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เจริญได้ที่พีเอช 3 - 3.5 เจริญในน้ำดี ox-bile ที่ความเข้มข้นสูงถึง 12 % แต่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ได้ และเมื่อทดสอบกับสภาวะน้ำย่อยจำลองที่พีเอช 3 4 และ 7 สามารถมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะจำลองไปถึงลำไส้จำลองได้ และสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Gentamycin Kanamycin Nalidixic acid Neomycin Norfloxacin Oxolinic acid Tetracyclin Oxytetracyclin และ Streptomycin

อุดมลักษณ์ [29] ศึกษาผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรคติดเชื้อในปลานิล (Nile tilapia: *Oreochromis niloticus*) โดยเก็บตัวอย่างจากปลานิล ดิน และน้ำจากฟาร์มในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย จำนวน 16 แหล่ง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบ

คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์เบื้องต้นโดยผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้ปลานิลกินจนอิ่มเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าปลานิลมีขนาดและน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเสริมด้วย CR7-8 รวมทั้งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการแลกเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น

Seenivasan *et al.* [30] ได้ศึกษาอิทธิพลของโพรไบโอติกส์ต่อการรอดชีวิต การเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและประสิทธิภาพการใช้พลังงานของกุ้งก้ามกรามระยะโพสลาวา โดยทดลองให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 90 วัน ร่วมกับโพรไบโอติกส์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* ที่อัตราส่วนต่างๆ ผลการทดลองพบว่ากุ้งมีการรอดชีวิต น้ำหนักเพิ่มขึ้น มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารและประสิทธิภาพการสร้างโปรตีนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในอาหารที่ผสม *B. subtilis* และ *S. cerevisiae* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2.5 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ของ *E. faecium*

ในปัจจุบันการใช้โพรไบโอติกส์ร่วมกับอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์มีแนวโน้มที่แพร่หลายมากขึ้น ทั้งในระดับอุตสาหกรรมและเกษตรกรรายย่อย เนื่องจากโพรไบโอติกส์มีประโยชน์หลายด้านอย่างที่ทราบกันเป็นอย่างดีว่าโพรไบโอติกส์สามารถช่วยย่อยสารอาหารเพื่อให้สัตว์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ขนาดตัวใหญ่ขึ้น น้ำหนักมากขึ้น และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ได้อีกด้วย จึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดีขึ้นและขายได้ราคาสูง มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับประโยชน์ของโพรไบโอติกส์ต่อการผลิตสัตว์ออกมาเพื่อยืนยันถึงศักยภาพของโพรไบโอติกส์ที่สามารถใช้ร่วมกับการผลิตสัตว์ได้อย่างปลอดภัย ดังนี้

Pospíšková *et al.* [31] ทำการทดลองเกี่ยวกับโพรไบโอติกส์ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคในลำไส้ของสุกร ในงานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกส์ในระบบทางเดินอาหารของสุกร แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ให้อาหารที่เสริมโพรไบโอติกส์ *E. faecium* SF68 และกลุ่มที่ 2 ให้อาหารโดยไม่เสริมโพรไบโอติกส์ (กลุ่มทดลอง) เก็บตัวอย่างอุจจาระไปทดสอบ พบว่า ในกลุ่มที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส์มีจำนวน *E. coli* และ *Clostridium* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงข้อดีอย่างชัดเจนของการบริโภคอาหารเสริมด้วยโพรไบโอติกส์ ส่งผลให้ลดการเกิดโรคอุจจาระร่วงที่พบบ่อยในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

Bybee *et al.* [32] ศึกษาผลของ *E. faecium* SF68 ต่อโรคท้องร่วงในแมวและสุนัข ในการทดลองมีแมวทั้งหมด 217 ตัว และสุนัข 182 ตัว ทำการทดลอง 4 สัปดาห์ โดยมีกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมด้วยโพรไบโอติกส์และกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกส์ (กลุ่มควบคุม) ผลการทดลอง

พบว่าอาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส์ส่งผลให้โรคท้องร่วงในแมวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในสุนัขไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Hafsa *et al.* [33] ศึกษาศักยภาพโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ *E. faecium* และความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกจากลำไส้และอุจจาระไก่ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและระบุคุณสมบัติของ *Enterococcus* sp. ที่แยกจากลำไส้และอุจจาระไก่เพื่อคัดเลือกโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพ โดยแยกแบคทีเรียจากลำไส้และอุจจาระไก่ 30 ตัว ที่เลี้ยงจากฟาร์มเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า *Enterococcus* sp. มีการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.2 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสภาวะจำลองของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แบคทีเรียดังกล่าวมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *S. enteritidis* มีการระบุสายพันธุ์ว่าเป็น *E. faecium* จากการทดลองพบว่า *E. faecium* เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้ร่วมกับอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมด้านสุขภาพของสัตว์ได้เป็นอย่างดี

Simonová *et al.* [34] ทำการวิจัยเกี่ยวกับ *E. faecium* CCM7420 และผลต่อการย่อยอาหารของกระต่าย ผลการทดลองพบว่า กระต่ายมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากได้รับอาหารเสริมด้วย *E. faecium* CCM7420

Divyashri *et al.* [35] ศึกษาถึงคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ พบว่า *E. faecium* CFR 3003 มีการรอดชีวิตภายใต้สภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากสามารถทนต่อสภาวะกรดพีเอช 1.5 2.0 และ 3.0 สามารถรอดชีวิตที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.45 % และรอดชีวิตภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เพปซินและทริปซิน

Ghomrassi *et al.* [36] ศึกษาศักยภาพของ Enterococci ที่แยกจากปลาทะเลที่มีความต้านทานต่อแบคทีเรียแกรมลบ มีการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่ามี *E. faecium* จำนวน 13 ไอโซเลต และ *L. lactis* จำนวน 3 ไอโซเลต ผลการทดลองพบว่า *E. faecium* จำนวน 6 ไอโซเลต สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus parauberis* *Vagococcus* spp. และ *Carnobacterium maltaromaticum* และโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Flavobacterium frigidarium* *Vibrio pectenicida* *V. penaeicida* และ *Photobacterium damselae* โดยแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบแยกจากปลาที่เป็นโรค และมีการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี จากการทดลองแสดงถึงศักยภาพของ *E. faecium* ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกส์

Sarra *et al.* [37] แยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรีย Enterococci จากปลาตูนิเซีย โดยทำการศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอวัยวะภายในของปลาที่มีคุณสมบัติที่ดีและมีความปลอดภัย ซึ่งสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ คือ GM1 GM2 และ GM3 ระบุว่าเป็น *E. feacium* โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ มีการผลิตแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและยับยั้ง *Carnobacterium maltaromaticum* ที่เป็นเชื้อก่อโรคในปลา และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดดังนี้ ampicillin penicillin tetracycline และ gentamicin แต่มีความสามารถในการต้านทานต่อยา rifampicin การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถใช้เป็นโพรไบโอติกส์สำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตหรืออาจใช้เพื่อปรับปรุงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร

Barbosa *et al.* [38] ทำการคัดเลือก *E. faecium* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *E. faecium* 85 *E. faecium* 101 *E. faecium* 119 และ *E. faecium* 120 ที่แยกจากอาหารหมักของประเทศโปรตุเกส เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส์ ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ 65 ^{o}C โดย *E. faecium* 119 ไม่แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ในขณะที่ *E. faecium* 85 และ 101 ยับยั้ง *Listeria innocua* และ *E. faecium* DSMZ13590 โดย *E. faecium* 120 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ คือ *Listeria monocytogenes* 7946 *L. monocytogenes* 7947 *L. innocua* 2030c *L. innocua* NCTC11286 *E. faecium* DSMZ13590 *Enterococcus faecalis* ATCC29212 และ *Staphylococcus aureus* ATCC29213 จึงเลือก *E. faecium* 120 เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารเพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป

ÜNAL *et al.* [39] ทำการศึกษาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *E. faecium* และ *E. faecalis* ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของไก่เนื้อโดย Enterococci ที่แยกได้ส่วนใหญ่ คือ *E. faecium* (60.43 % จำนวน 142 ไอโซเลต) และ *E. faecalis* (33.62 % จำนวน 79 ไอโซเลต) และยังพบ *E. casseliflavus* (3.42 % จำนวน 8 ไอโซเลต) และ *E. gallinarum* (2.56 % จำนวน 6 ไอโซเลต) พบ Enterococci 88.90 % สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline และ 83.40 % มีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะ erythromycin โดยพบว่า *E. faecium* ร้อยละ 54.90 และ *E. colecalis* ร้อยละ 78.40 มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ชนิด

Lertworapreecha *et al.* [40] คัดเลือก *E. faecium* จำนวน 60 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพจากไก่พื้นเมืองในประเทศไทย โดยคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของไก่พื้นเมืองจำนวน 30 ตัวอย่าง ทุกสายพันธุ์ทำการทดสอบการทนกรดและน้ำดี โดย 15 สายพันธุ์มีการทนกรด สายพันธุ์ที่ดีที่สุด คือ EFMC17 EFMC21 EFMC24 EFMD25 EFMI47 และ EFMI49 มีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ EFMC21 EFMD30 EFMI47 และ EFMI49 สามารถรอดชีวิตจากสภาวะที่มีน้ำดีเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 15 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบการทนกรดได้ทำการทดสอบความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ ผลการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเกาะติดผนังลำไส้ สำหรับความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามี 7 สายพันธุ์ คือ EFMC17 EFMC21 EFMC24 EFMD29 EFMD30 EFMI46 และ EFMI49 มีประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์ EFC และทั้ง 7 สายพันธุ์มีความสามารถผลิตกรด แต่มีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ EFMC21 EFMD25 EFMI47 และ EFMI49 สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน จากผลการทดลองพบ 2 สายพันธุ์ คือ EFMI47 และ 49 มีศักยภาพในการใช้เป็นโพรไบโอติกส์

Saelim *et al.* [41] ศึกษาคุณสมบัติของ *E. faecium* CE5-1 ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารไก่พื้นเมืองในประเทศไทย และนำมาทดสอบศักยภาพการเป็นโพรไบโอติกส์ พบว่า *E. faecium* CE5-1 สามารถทนกรดพีเอช 3.0 หลังการบ่ม 2 ชั่วโมง และทนต่อน้ำดีไก่สด 7 % หลังการบ่ม 6 ชั่วโมง แต่ *E. faecium* CE5-1 มีการรอดชีวิตลดลงประมาณ 2 - 3 log CFU / ml หลังการบ่ม 2 ชั่วโมงที่พีเอช 2.5 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ คือ tetracycline erythromycin penicillin G และ vancomycin มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดที่เวลา 15 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง สามารถต้านทานเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 *Pediococcus pentosaceus* 3CE27 และ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157 ทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแต่ละสายพันธุ์ พบว่า *E. faecium* CE5-1 มีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่า *E. faecalis* VanB และ *E. gallinarum* VanC หลังจาก 12 ชั่วโมงในการทดสอบ ผลการทดลองพบว่าในอนาคตสามารถนำ *E. faecium* CE5-1 ไปใช้เป็นโพรไบโอติกส์สำหรับปศุสัตว์เพื่อควบคุมแบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ

Marcináková *et al.* [42] ศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ของสายพันธุ์ *E. faecium* EF9296 ที่แยกได้จากหญ้าหมัก สายพันธุ์นี้มีความไวต่อ ampicillin (10 ไมโครกรัม) erythromycin (15 ไมโครกรัม) tetracycline rifampicin และvancomycin (30 ไมโครกรัม) แต่มีความต้านทานต่อ kanamycin (30 ไมโครกรัม) *E. faecium* EF9296 สามารถเกาะติดผนังลำไส้ของมนุษย์และสุนัขได้เป็น

อย่างดี โดยเกาะติดผนังลำไส้ของมนุษย์เท่ากับ 5.5 log CFU / ml และสุนัขเท่ากับ 4.7 log CFU / ml และ *E. faecium* EF9296 สามารถต้านทานต่อน้ำดี แล้วยังสามารถผลิตสารคล้ายแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งสามารถยับยั้ง Enterococci และ *L. monocytogenes* โดย *E. faecium* EF9296 มีการเจริญคงที่ที่เวลา 8 ชั่วโมง ในอาหารเหลว Trypticase - soy เท่ากับ 11.57 ± 0.07 log CFU / ml และสามารถเจริญอยู่ในของเหลวภายในกระเพาะอาหารส่วนรูเมนได้ที่เวลา 10 ชั่วโมง เท่ากับ 9.25 ± 0.48 log CFU / ml นอกจากนี้ยังทำการศึกษาถึงความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Listeria* spp. ในของเหลวภายในกระเพาะอาหารส่วนรูเมน ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่า *E. faecium* EF9296 มีการตายเท่ากับ 0.40 log CFU / ml ที่เวลา 8 10 และ 12 ชั่วโมง มีการตายของ *E. faecium* EF9296 เท่ากับ 0.44 0.65 และ 0.62 log CFU / ml ตามลำดับ จากการทดลองสามารถนำ *E. faecium* EF9296 ไปใช้เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพในการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ *Listeria* spp.

Renye *et al.* [43] ศึกษาคุณลักษณะของ *E. faecium* และ *E. durans* ที่แยกได้จากชีสสไตล์สเปน ในการทดลองนี้ทำการแยก Enterococci จำนวน 33 ไอโซเลต พบ *E. faecium* จำนวน 5 ไอโซเลต และ *E. durans* จำนวน 1 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. โดย *E. faecium* จำนวน 2 ไอโซเลตสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin ต่ำ มี 3 ไอโซเลต สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline และ kanamycin สูง และมี 2 ไอโซเลต สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ erythromycin สูง

Yasar *et al.* [44] ศึกษาประสิทธิภาพของอาหารสัตว์เสริมโพรไบโอติกส์ *E. faecium* NCIMB 10415 *B. subtilis* ATCC PTA-6737 และ *S. cerevisiae* โดยทำการทดสอบในนกกระทาญี่ปุ่นอายุตั้งแต่ 2 ถึง 35 วัน มีการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ลงไปในอาหาร จากการทดลองพบว่านกกระทาที่ได้รับอาหารเสริมด้วยยีสต์โพรไบโอติกส์ กินอาหารมากขึ้นเมื่ออายุ 16 30 และ 37 วัน และมากกว่านกกระทาที่ได้รับอาหารไม่เสริมโพรไบโอติกส์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในอาหารที่เสริม *E. faecium* NCIMB 10415 และ *B. subtilis* ATCC PTA-6737 นกกระทากินอาหารใกล้เคียงกันเกือบตลอดช่วงของการให้อาหาร น้ำหนักตัว และการเพิ่มน้ำหนักของนกกระทาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโพรไบโอติกส์สูงกว่านกกระทาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมโพรไบโอติกส์ แต่นกกระทาที่เลี้ยงด้วยยีสต์มีน้ำหนักตัว และการเพิ่มน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมโพรไบโอติกส์เมื่ออายุ 9 16 และ 30 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมากกว่านกกระทาที่เสริมด้วย *B. subtilis* ATCC PTA-6737 เป็น

เวลา 30 วัน มีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ในนกกระทาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโพรไบโอติกส์สูงกว่านกกระทาในกลุ่มควบคุมที่อายุ 9 และ 16 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนกกระทามีอายุมากขึ้น ความแตกต่างของ FCR ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกส์ไม่มีความแตกต่างกัน ผลผลิตซากมีปริมาณสูงในนกกระทาที่ได้รับอาหารเสริมด้วย *E. faecium* NCIMB10415 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่านกกระทาที่เสริมด้วย *E. faecium* NCIMB10415 มีการเพิ่มน้ำหนักและช่วงของการย่อยอาหารที่มีประสิทธิภาพมากกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมโพรไบโอติกส์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองพบว่าการเสริม *E. faecium* NCIMB10415 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของนกกระทา

Chen *et al.* [45] ศึกษาการให้อาหารเสริมด้วย *E. faecium* SF68 ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและการย่อยสารอาหารของสุกร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการให้อาหารเสริมโพรไบโอติกส์ (*E. faecium* SF68) ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและการย่อยสารอาหารของสุกร ในการทดลองมีสุกรทั้งหมด 80 ตัว สุกรทั้งหมดมีน้ำหนักตัวเริ่มต้น 50.47 ± 2.13 kg ทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทดลอง 4 แบบ คือ อาหารกลุ่มควบคุม อาหารที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ 0.1 % (chlortetracycline) อาหารเสริมโพรไบโอติกส์ 0.1 % (*E. faecium* SF68) และอาหารเสริมโพรไบโอติกส์ 0.2 % (*E. faecium* SF68) ในช่วงสัปดาห์ที่ 0 - 4 การเสริมด้วยยาปฏิชีวนะหรือโพรไบโอติกส์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 4 - 8 การเสริมด้วยยาปฏิชีวนะและโพรไบโอติกส์มีแนวโน้มที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าการเสริมคุณค่าทางอาหารด้วย *E. faecium* SF68 สามารถเพิ่มการย่อยอาหารและลดการสะสมของแอมโมเนียไนโตรเจน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และกรดไขมันไม่อิ่มตัวของสุกร

2.6 การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF)

การหมักแบบแห้งมีตั้งแต่สมัยโบราณ กระบวนนี้ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักจะรู้จักเพียงบางประเทศเท่านั้น มีการใช้รา ยีสต์ และแบคทีเรียสำหรับการหมัก [46] การหมักแบบดั้งเดิมของกระบวนหมักแบบแห้งได้แก่ การหมักข้าวโดย *Aspergillus oryzae* เพื่อเริ่มกระบวนการโคจิ (koji) และหมัก *Penicillium roqueforti* สำหรับการผลิตชีส [47] การหมักแบบแห้งได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีประโยชน์หลายด้าน [46]

กระบวนการหมักแบบแห้งเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น การใช้ราในการหมักข้าวเหนียวเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และใช้ยีสต์ในการหมักข้าวบาร์เลย์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาล

เป็นแอลกอฮอล์ในการผลิตเบียร์ เป็นต้น หรืออาจจะใช้ของเหลือทิ้งทางการเกษตรจากโรงงานอุตสาหกรรมไปเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ เช่นใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ [46] การหมักแบบแห้งเป็นกระบวนการที่ใช้ของแข็ง ของเหลวและก๊าซในการหมัก ซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีประโยชน์อย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพ ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาการหมักแบบแห้งได้รับความสนใจอย่างมาก ทำให้มีการการพัฒนาอุตสาหกรรมชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากใช้พลังงานน้อยลงแต่ให้ผลผลิตสูงขึ้น การผลิตน้ำเสียลดลง ไม่มีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนแบคทีเรียและยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักแบบแห้งส่วนใหญ่จะใช้ของเสียหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร [48] ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบแห้งสามารถนำไปใช้กับอาหารสัตว์ การใช้งานทางด้านเชื้อเพลิง ทางด้านอาหาร อุตสาหกรรมเคมีและผลิตภัณฑ์ยา เป็นต้น [34, 35]

2.5.1 ความสำคัญของการหมักแบบแห้ง

การหมักแบบแห้งควบคุมด้วยปัจจัยหลายประการซึ่งมีความสำคัญต่อเทคนิคและการพัฒนากระบวนการในการผลิต [34, 36, 37] ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบแห้งได้แก่ การเลือกและคัดแยกจุลินทรีย์และคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักโดยทั่วไปส่วนมากเป็นราและยีสต์เนื่องจากมีความต้องการน้ำในการเจริญน้อยกว่าแบคทีเรีย โดยทั่วไปกระบวนการหมักแบบแห้งยังไม่ค่อยนิยมใช้แบคทีเรียในการหมัก [52, 53] แม้ว่าจะมีงานวิจัยหลายอย่างที่พิสูจน์ได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียสามารถนำมาใช้กับกระบวนการหมักแบบแห้งได้ดีก็ตาม [46] แต่การใช้ราและยีสต์ในกระบวนการหมักแบบแห้งก็ยังมีมากกว่า ราและยีสต์มีค่าน้ำอิสระต่ำ (a_w) ประมาณ 0.5 – 0.6 a_w โดยแบคทีเรียต้องการน้ำในการเจริญที่สูงกว่าราและยีสต์ ค่าน้ำอิสระของแบคทีเรียอยู่ที่ 0.8 – 0.9 a_w แบคทีเรียจึงไม่เหมาะสำหรับกระบวนการหมักแบบแห้ง อย่างไรก็ตามแนวคิดนี้อาจจะไม่ถูกต้องเสมอไป เนื่องจากปัจจุบันได้ใช้แบคทีเรียในการหมักแบบแห้งกันอย่างแพร่หลาย การเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ควรคำนึงถึงกับปัจจัยต่างๆ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ [48, 54, 55] ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้จุลินทรีย์ในการหมักแบบแห้ง ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง การเติมอากาศ ค่าน้ำอิสระและความชื้น โดยคุณสมบัติของวัตถุดิบ (ความหนา ความพรุน) ลักษณะของวัตถุดิบที่ใช้ ก็เป็นปัจจัยหนึ่งในการเลือกใช้จุลินทรีย์เช่นเดียวกัน [34, 42, 43] โดยความชื้นของวัตถุดิบและค่าน้ำอิสระของจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อกระบวนการหมักแบบแห้ง [46]

2.5.2 รูปแบบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในกระบวนการหมักแบบแห้ง

การออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักแบบแห้งมีนานกว่าสองทศวรรษแล้ว มีการออกแบบหลากหลายแบบขึ้นอยู่กับการใช้งาน และมีเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใหม่ทำขึ้นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง [46] การหมักขนาดใหญ่จะทำการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพหรือถังหมักชนิดต่างๆ เช่น ถังหมักแบบกวน (Stirred tank bioreactor) ถังหมักแบบอากาศลอยตัว (Airlift bioreactor) ถังหมักแบบลูพ (Loop bioreactor) ถังหมักแบบตรึง (immobilized bioreactor) หรือถังกลั่น กระบวนการหมักหลักๆ ได้แก่ การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) และการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

2.5.3 ผลิตภัณฑ์ของการหมักแบบแห้ง

การหมักแบบแห้ง คือการเพิ่มมูลค่าให้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากถั่วเหลือง เปลือกมะพร้าว รำข้าว ชานอ้อย เป็นต้น การผลิตผลิตภัณฑ์ให้มี มูลค่าเพิ่ม เช่น ยาปฏิชีวนะ เชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้พัฒนามาจากกระบวนการหมักแบบแห้ง [46]

2.7 การอบแห้ง (Drying)

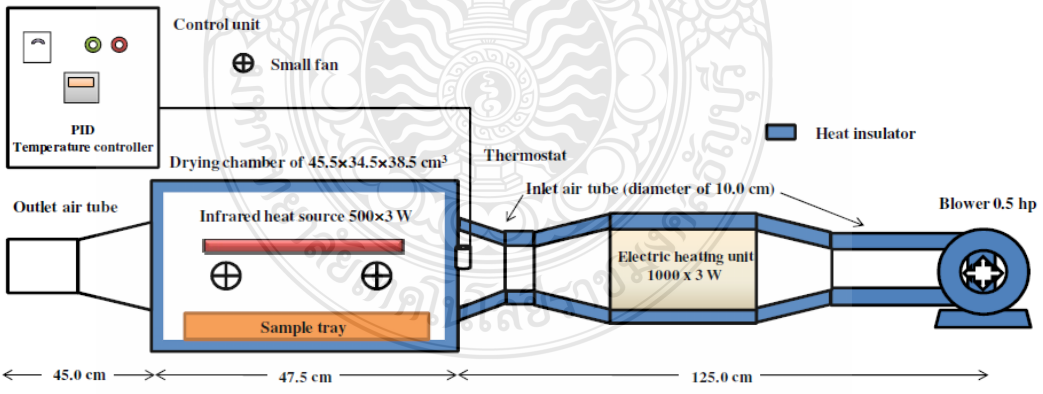
หลักการอบแห้งคือ นำความชื้นออกจากวัตถุดิบเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา เมื่อทำการอบแห้งวัตถุดิบเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์แล้วจะสามารถเก็บได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น โดยผลิตภัณฑ์นั้นจะไม่เกิดความเสียหายจากการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาอบแห้งแล้วจะไม่มีความชื้นเหลืออยู่หรืออาจจะเหลืออยู่น้อยมากจนจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญขึ้นได้ การอบแห้งเป็นการประหยัดเนื้อที่ในการเก็บรักษาอีกด้วย เนื่องจากการอบแห้งเป็นการดึงน้ำออกจากวัตถุดิบจึงทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงและน้ำหนักน้อยลง คุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลังการอบแห้งได้รับผลกระทบมาจากกระบวนการอบแห้ง ทำให้รสชาติ สี และกลิ่นที่เปลี่ยนแปลงไป มีการถ่ายเทความร้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกไปยังผิวหน้าของวัตถุดิบในระหว่างกระบวนการอบแห้งและการถ่ายเทมวลจากข้างในตู้อบไปยังผิวของวัตถุดิบเนื่องจากเป็นการถ่ายเทความชื้นสู่สิ่งแวดล้อม [58]

2.6.1 จลนพลศาสตร์การอบแห้ง (Drying kinetics)

การอบแห้งเป็นการถ่ายเทความร้อนไปยังวัตถุดิบที่มีความชื้นเพื่อไล่ความชื้นออกมาในรูปแบบของการระเหย ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการอบแห้งคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง ความชื้นสัมพัทธ์ อัตราการไหลของอากาศในระหว่างกระบวนการอบแห้ง และประสิทธิภาพของเครื่องอบแห้ง พฤติกรรมของการอบแห้งด้วยลมร้อนเป็นตัวกลางในการพาความชื้นออกจากตัววัตถุดิบ [58]

2.6.2 การอบแห้งวัตถุดิบชนิดต่างๆ

Tirawanichakul *et al.* [59] ศึกษาการอบแห้งของขนุนด้วยพลังงานความร้อนผสมผสานระหว่างรังสีอินฟราเรด ไมโครเวฟ และลมร้อน แสดงดังภาพที่ 1 โดยได้ทำการทดลองอบแห้งขนุนในช่วงอุณหภูมิ 40 - 60 ^{O}C ในทุกการทดลอง โดยขนุนมีค่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3 00 - 400 % มาตรฐานแห้ง หลังจากการอบแห้งค่าความชื้นของขนุนลดลงที่ 12 - 19 % มาตรฐานแห้ง จากการทดลองพบว่าอัตราการอบแห้งของขนุนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างกระบวนการอบแห้งเมื่อเทียบกับความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างขนุน มีการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการอบแห้งชั้นบางของขนุนพบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Modified Page Logarithmic และ Approximation of Diffusion เหมาะสมกับการอบแห้งแบบ 2 ขั้นตอนด้วยคลื่นไมโครเวฟกับลมร้อน การอบแห้งด้วยรังสีอินฟราเรด และการอบแห้งด้วยพลังงานความร้อนระหว่างรังสีอินฟราเรดร่วมกับลมร้อน ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของเครื่องอบแห้งแบบถาดพลังงานความร้อนผสมผสาน

ที่มา : Tirawanichakul *et al.* [59]

Nadee *et al.* [60] ศึกษาการอบแห้งของใบเตยด้วยรังสีอินฟราเรดร่วมกับลมร้อนและการอบแห้งด้วยลมร้อนเพียงอย่างเดียว ทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 - 65 ^{O}C ใช้กำลังของรังสีอินฟราเรดที่ 500 และ 1,000 W ความชื้นเริ่มต้นในการอบแห้งใบเตยและความชื้นสุดท้ายอยู่ที่ 400 - 600 % มาตรฐานแห้ง และ 8 - 12 % มาตรฐานแห้ง ตามลำดับ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งใบเตยด้วยรังสีอินฟราเรดที่กำลัง 1,000 W ร่วมกับลมร้อนและการอบแห้งด้วยลมร้อนเพียงย่างเดียวคือ แบบจำลองของ Logarithmic และแบบจำลองที่ใช้สำหรับการอบแห้งด้วยรังสีอินฟราเรดที่กำลัง 500 W ร่วมกับลมร้อนคือ แบบจำลองของ Page

Tirawanichakul *et al.* [61] ได้ทำการอบแห้งใบบัวบกที่อุณหภูมิ 50-70 ^{O}C ด้วยรังสีอินฟราเรดที่กำลัง 500 - 1,500 W โดยใบบัวบกสดที่นำมาทำการทดลองมีความชื้นเริ่มต้นที่ 600 % มาตรฐานแห้ง และความชื้นสุดท้ายที่ 20 % มาตรฐานแห้ง แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งใบบัวบกคือ สมการของ Midilli

Phosee *et al.* [62] ได้ทำการอบแห้งใบสะระแหน่ด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 65 และ 75 ^{O}C ใบสะระแหน่มีความชื้นเริ่มต้น 6.98 กรัมน้ำต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และความชื้นสุดท้ายหลังการอบแห้งที่ 0.064 กรัมน้ำต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งคือ สมการของ Midilli โดยมีค่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) สูงสุด ในขณะที่ค่ารากที่สองของความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (*RMSE*) และค่าไคสแคว์ (X^2) ต่ำสุด

2.8 องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลือง (Soybean meal) มีโปรตีน (Protein) กรดอะมิโน (Amino acid) และไนโตรเจน (Nitrogen) เป็นองค์ประกอบหลัก [63] และมีปริมาณไลซีนสูง ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ และรสชาติอร่อย ทำให้เป็นแหล่งโปรตีนที่ดีสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ [64] ในกากถั่วเหลืองยังมีสารประกอบที่สำคัญอย่างไอโซฟลาโวนส์ โดยไอโซฟลาโวนส์นั้นเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีการค้นพบว่าสามารถป้องกันความเสี่ยงต่อโรคกระดูกพรุน ไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองยังสามารถส่งเสริมความแข็งแรงในเพศหญิงได้ เนื่องจากในถั่วเหลืองมีสารสำคัญที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนในเพศหญิง [65] มีงานวิจัยพบว่าในสัตว์ปีกสามารถย่อยกากถั่วเหลืองได้ดี โดยจะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมาทำการย่อยสารอาหารจำพวกโปรตีน ส่งผลให้สัตว์มีการย่อยโปรตีนได้เร็ว ทำให้มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น กากถั่วเหลืองจึงเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [63] ในช่วงปี พ. ศ. 2550 ถึงปี พ.ศ. 2558 ได้มีการสุ่มตัวอย่าง

กากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากแหล่งที่มาของถั่วเหลือง โดยศึกษาถึงปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein) คุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลือง การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นหรือวัตถุแห้ง (Dry matter, DM) พบว่ากากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกาและบราซิลมีค่าโปรตีนรวมมากกว่ากากถั่วเหลืองจากประเทศอาร์เจนตินา มีค่าเท่ากับ 532 532 และ 517 g / kg ตามลำดับ กากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอาร์เจนตินามีปริมาณไลซีนมากกว่ากากถั่วเหลืองจากประเทศบราซิล มีค่าเท่ากับ 6.17 6.11 และ 6.07 % ตามลำดับ กากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกามีซูโครสมากกว่ากากถั่วเหลืองจากประเทศอาร์เจนตินาและบราซิล เท่ากับ 84 78 และ 64 g / kg และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตชนิดสแตคีโอส (Stachyose) เท่ากับ 64 57 และ 53 g / kg ตามลำดับ ปริมาณไฟเบอร์เท่ากับ 118 102 และ 90 g / kg และแรฟฟิโนส (Raffinose) เท่ากับ 16 14 และ 11 g / kg จากประเทศบลาซิล อาร์เจนตินา และสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ ในส่วนของปริมาณแร่ธาตุขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของกากถั่วเหลือง โดยกากถั่วเหลืองจากประเทศบราซิลมีธาตุเหล็ก (Fe) มากแต่มีแคลเซียม (Ca) น้อย มีธาตุฟอสฟอรัส (P) ธาตุโพแทสเซียม (K) มากกว่ากากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอาร์เจนตินา ตัวชี้วัดคุณภาพโปรตีนแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของกากถั่วเหลือง ค่ากิจกรรมยูริเอส (Urease activity) ของกากถั่วเหลืองจากประเทศอาร์เจนตินามีค่าต่ำสุด ความเสียหายที่เกิดจากความร้อน เช่น การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) หรือปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลมีค่าต่ำสุดในกากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกา องค์ประกอบทางเคมี คุณภาพโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองในแต่ละแหล่งที่มามีความแตกต่างกัน ที่ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากันกากถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกามีไฟเบอร์น้อย ซูโคสและไลซีนมาก [67] มีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของกากถั่วเหลืองด้วยการหมักแบบแห้งร่วมกับการใช้เชื้อผสม ดังนี้ *Streptococcus thermophiles* *Bacillus subtilis* MA139 และ *Saccharomyces cerevisiae* ผลการทดลองพบว่า กากถั่วเหลืองหมักผสมโพรไบโอติกส์ สามารถทำให้ลูกสุกรหย่านมมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น [64] กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่นิยมใช้มากที่สุดในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีโปรตีนสูงและต้นทุนต่ำ [68]

2.9 กากน้ำตาลและองค์ประกอบของกากน้ำตาล

กากน้ำตาลแบ่งออกเป็น 5 ประเภท ดังนี้ [69]

1.กากน้ำตาลจากอ้อย (Cane Molasses) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตหรือการกลั่นน้ำตาลซูโครสจากอ้อย

2.กากน้ำตาลหัวจากบีท (Beet Molasses) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลซูโครสจากหัวบีท

3.กากน้ำตาลจากส้ม (Citrus Molasses) เป็นกากน้ำตาลที่ได้จากเนื้อส้มแห้ง มีกลิ่นเฉพาะตัว

4.สารสกัดเฮมิเซลลูโลสหรือกากน้ำตาลจากไม้ (Hemicellulose Extract) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไม้

5.กากน้ำตาลจากแป้ง (Starch Molasses) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตแป้งที่ได้จากข้าวโพดหรือข้าวฟ่าง และธัญพืชต่าง ๆ

2.9.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

องค์ประกอบเฉลี่ยและปริมาณสารอาหารที่ได้จากกากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 2 3 และ 4 มักพบได้จากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมจำนวนมาก องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายขององค์ประกอบในกากน้ำตาลแต่ละชนิด องค์ประกอบเหล่านี้ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของดิน อุณหภูมิโดยรอบ ความชื้น ฤดูกาลผลิต ความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ การผลิตในโรงงานแปรรูป และตัวแปรการจัดเก็บ ดังนั้น ความแปรปรวนที่สำคัญอาจพบได้ในส่วนประกอบของสารอาหาร รส สี ความหนืด และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในวัตถุดิบแต่ละชนิด

บริกซ์ (Brix)ในทางการค้า กากน้ำตาลใช้คำว่า Brix เป็นตัวชี้วัดความถ่วงจำเพาะ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 แสดงถึงการประมาณปริมาณของแข็งทั้งหมด โดย Brix เป็นหน่วยที่ใช้บอกถึงความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลาย มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก (% w / w) ในกากน้ำตาลนอกเหนือจากน้ำตาลซูโครส ยังมีมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส แรฟฟิโนส และสารอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาลจำนวนมาก ดังนั้นค่า Brix สำหรับกากน้ำตาลจะแตกต่างกันอย่างมาก ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกากน้ำตาลแต่ละชนิด

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและปริมาณธาตุอาหารของผลิตภัณฑ์จากกากน้ำตาลจากไม้

องค์ประกอบ	อ้อย	บีท	ส้ม	สารสกัด	แป้ง
บริกซ์ (Brix)	79.5	79.5	71.0	65.0	78.0
ของแข็งทั้งหมด (%)	75.0	77.0	65.0	65.0	73.0
ความถ่วงจำเพาะ	1.41	0.41	1.36	1.32	1.40
น้ำตาลทั้งหมด (%)	46.0	48.0	45.0	55.0	50.0
โปรตีนรวม (%) (Crude protein)	3.0	6.0	4.0	0.5	0.4
คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (%) (Nitrogen free extract)	63.0	62.0	55.0	55.0	65.0
ไขมันทั้งหมด (%)	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0
ไฟเบอร์ทั้งหมด (%)	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
เถ้า (%)	8.1	8.7	6.0	5.0	6.0
แคลเซียม (%)	0.8	0.2	1.3	0.8	0.1
ฟอสฟอรัส (%)	0.08	0.03	0.15	0.05	0.2
โพแทสเซียม (%)	2.4	4.7	0.1	0.04	0.02
โซเดียม (%)	0.2	1.0	0.3	-	2.5
คลอรีน (%)	1.4	0.9	0.07	-	3.0
กำมะถัน (%)	0.5	0.5	0.17	-	0.05
พลังงาน (kcal/kg)					
- สุกร	2343	2320	2264	2231	-
-สัตว์ปีก	1962	1962	-	-	-

ที่มา : Curtin [69]

โดยกากน้ำตาลทุกประเภทมีปริมาณน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตสูงและคุณค่าทางอาหารของกากน้ำตาลประกอบด้วยสารเหล่านี้เป็นส่วนใหญ่ โรงงานน้ำตาลสามารถควบคุมปริมาณซูโครสที่สกัดได้และด้วยเหตุนี้ปริมาณน้ำตาลในกากน้ำตาลที่ผลิตในแต่ละประเทศจะแตกต่างกันไปตามเทคโนโลยีการผลิตที่ใช้ในกระบวนการ

แร่ธาตุ (Minerals) โดยทั่วไปปริมาณแร่ธาตุของกากน้ำตาลไม่ได้รับการพิจารณาในการกำหนดสูตรอาหารสำหรับสุกรและสัตว์ปีก เหตุผลที่ไม่มีการพิจารณา คือ ไม่พบข้อมูลการใช้

ประโยชน์ทางชีวภาพสำหรับแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ และค่าของแร่ธาตุภายในกากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่พบการรายงานอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับแหล่งพลังงานที่ใช้กันทั่วไป ธัญพืชส่วนใหญ่ ปริมาณแคลเซียมของกากน้ำตาลอ้อยและส้มมีค่าสูง แต่ปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ กากน้ำตาลอ้อยและบีทมีโพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม คลอรีนและกำมะถันสูงมาก การเปรียบเทียบเพิ่มเติมระหว่างกากน้ำตาลแสดงให้เห็นว่าโดยทั่วไป พบว่าแคลเซียม ฟอสฟอรัสและคลอรีนในกากน้ำตาลอ้อยสูงกว่ากากน้ำตาลบีท ในขณะที่กากน้ำตาลบีทมีโพแทสเซียมและโซเดียมสูงกว่า

ปริมาณแร่ธาตุที่พบในกากน้ำตาลอ้อย กากน้ำตาลบีทและกากน้ำตาลส้ม แสดงในตารางที่ 3 โดยกากน้ำตาลอ้อยและกากน้ำตาลส้มมีปริมาณทองแดง เหล็กและแมงกานีสสูงกว่ากากน้ำตาลบีท

ตารางที่ 3 ปริมาณแร่ธาตุในกากน้ำตาล

แร่ธาตุ	อ้อย	บีท	ส้ม
ทองแดง (mg/kg)	36	13	30
เหล็ก (mg/kg)	249	117	400
แมงกานีส (mg/kg)	35	10	20
สังกะสี (mg/kg)	13	40	-

ที่มา : Curtin [69]

วิตามิน (Vitamins) ปริมาณวิตามินของกากน้ำตาลอ้อย กากน้ำตาลบีทและกากน้ำตาลส้ม แสดงในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับธัญพืชต่าง ๆ ที่ใช้กันทั่วไป พบว่าปริมาณไบโอตินในกากน้ำตาลอ้อยและกากน้ำตาลหัวบีทมีค่าค่อนข้างสูง

ตารางที่ 4 ปริมาณวิตามินในกากน้ำตาล

วิตามิน	อ้อย	บีท	ส้ม
ไบโอติน (mg/kg)	0.36	0.46	-
โคลีน (mg/kg)	745.0	716.0	-
กรดแพนโทเธนิค(mg/kg)	21.0	7.0	10.0
ไรโบเฟลวินหรือวิตามินบี 2 (mg/kg)	1.8	1.4	11.0
ไทอามีนหรือ วิตามินบี1 (mg/kg)	0.9	-	-

ที่มา : Curtin [69]

พลังงาน (Energy) ในวัตถุดิบแต่ละชนิดมีการให้พลังงานที่แตกต่างกัน โดยในวัตถุดิบชนิดเดียวกันก็จะให้พลังงานในสุกรและสัตว์ปีกแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 5 จากตารางมีการเปรียบเทียบพลังที่ได้จากกากน้ำตาลอ้อยและกากน้ำตาลบีทกับธัญพืชชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโพด ข้าวโอ้ตและข้าวสาลี

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบปริมาณพลังงานของกากน้ำตาลกับอาหารอื่น ๆ

วัตถุดิบอาหารสัตว์	สุกร (kcal/kg)	สัตว์ปีก (kcal/kg)
กากน้ำตาลอ้อย	2343	1962
กากน้ำตาลบีท	2320	1962
ข้าวบาร์เล่ย์	2870	2640
ข้าวโพด	3325	3430
ข้าวโอ้ต	2668	2550
ข้าวสาลี	3220	2800

ที่มา : Curtin [69]

จากองค์ประกอบของกากน้ำตาลที่กล่าวข้างต้นจะเห็นว่าในกากน้ำตาลมีสารอาหารที่มีประโยชน์หลากหลายชนิดต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ จึงได้มีการศึกษาการนำกากน้ำตาลไปหมักร่วมกับโพรไบโอติกส์เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ดังนี้

Chiang *et al*. [70] ได้รายงานว่า *Lactobacillus johnsonii* x-1d-2 และ *Lactobacillus mucosae* x-4w-1 ที่แยกมาจากอุจจาระของลูกสุกร สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและต้านทานยาปฏิชีวนะ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ส่งผลให้ *L. johnsonii* x-1d-2 และ *L. mucosae* x-4w-1 เหมาะสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสัตว์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้กากถั่วเหลือง กากน้ำตาลและโซเดียมอะซิเตตเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. johnsonii* x-1d-2 และ *L. mucosae* x-4w-1 โดยทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งและผสมลงในอาหารของสุกรเพื่อนำไปให้ลูกสุกรที่เพิ่งหย่านม และยังศึกษาผลของ *L. johnsonii* x-1d-2 และ *L. mucosae* x-4w-1 ต่อความสามารถในการเจริญเติบโต ผลการทดลองพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *L. johnsonii* x-1d-2 และ *L. mucosae* x-4w-1 มีความสามารถในการเจริญเติบโตเท่ากับ 8.90 และ 9.30 log CFU / mL ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยกากถั่วเหลือง 5.5 % (w / v) กากน้ำตาล 1.0 % (w / v) และโซเดียมอะซิเตต

1.0 % (w / v) ส่งผลให้ต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง 96 % เมื่อเทียบกับการใช้อาหารสำเร็จ MRS จึงทำการให้อาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส์กับลูกสุกรหย่านมต่อไป พบว่ามีน้ำหนักตัว (weight gain) เพิ่มขึ้น การให้อาหารเสริมโพรไบโอติกส์สามารถเพิ่มจำนวนของ Lactobacilli และลดจำนวน *E. coli* ได้อย่างเห็นได้ชัดเมื่อทำการตรวจจุลินทรีย์ในอุจจาระของลูกสุกร การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *L. johnsonii* x-1d-2 และ *L. mucosae* x-4w-1 มีศักยภาพในการใช้เป็นสารเสริมอาหารในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร และแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีในกากถั่วเหลือง กากน้ำตาลและโซเดียมอะซิเตต

Cristina *et al.* [71] ศึกษาเกี่ยวกับไอศกรีมที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส์ จุดมุ่งหมายของงานวิจัยคือ ได้ไอศกรีมที่มีการเสริมโพรไบโอติกส์โดยใช้กากน้ำตาลเป็นพรีไบโอติกส์ จึงได้ศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์แต่ละสายพันธุ์ที่สามารถมีชีวิตอยู่ในไอศกรีม โดยทำการเตรียมไอศกรีมจำนวน 5 ตัวอย่างด้วยสูตรเดียวกันโดยใช้กากน้ำตาลเป็นสารให้ความหวาน ทำการเพาะเลี้ยงในโพรไบโอติกส์ที่แตกต่างกัน โดยโพรไบโอติกส์ที่ใช้มีดังนี้ *Lactobacillus plantarum Bifidobacterium infantis* 4BN *Lactobacillus casei* 4BN *Bifidobacterium breve* 4BN และสายพันธุ์ผสมของแบคทีเรียที่กล่าวมาทั้งหมด พบว่า *L. plantarum* มีอัตราการขยายตัวของเชื้อดีขึ้นและสายพันธุ์ผสมมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ในการศึกษานี้ยังพบว่ากากน้ำตาลเป็นตัวส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. platarum B.infantis L. casei* และ *B. breve* ได้ดีอีกด้วย

อภิเชษฐ และคณะ [72] ทำการศึกษาผลของกากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์สำหรับใช้เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 โดยใช้กากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์แทนการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ทำการแปรผันปริมาณกากน้ำตาลที่ 5 8 และ 11 % (w/v) และกากเซลล์ยีสต์ที่ 0.5 1.5 และ 2.5 % (w/v) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. acidophilus* TISTR1338 คือ กากน้ำตาลเข้มข้น 11 % (w/v) และกากเซลล์ยีสต์เข้มข้น 0.5 % (w/v) โดยพบว่า *L. acidophilus* TISTR 1338 สามารถมีชีวิตอยู่ได้เท่ากับ 9.330 log CFU / ml ที่การบ่มเป็นเวลา 22 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.39 ต่อชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าการใช้กากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์สามารถใช้แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกส์ได้เป็นอย่างดี เป็นการลดต้นทุนการผลิต และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

Ni *et al*. [73] ทำการศึกษา LAB และกากน้ำตาลต่อจำนวนจุลินทรีย์และคุณภาพการหมักของกากถั่วเหลือง พบว่าการเพิ่ม LAB และกากน้ำตาลจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ *Lactobacillus* และต้านทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridia* และ *Enterobacter* และพบว่าถั่วเหลืองหมักมีคุณภาพสูงขึ้น

Audisio *et al*. [74] ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินของ *E. faecium* พบว่า *E. faecium* CRL1385 สามารถเจริญเติบโตได้หากมีพรีไบโอติกส์ เช่น น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลทรายขาว และกากน้ำตาล แบคทีเรียสายพันธุ์ Enterococcus ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลทรายแดงหรือกากน้ำตาลสามารถยับยั้ง *Salmonella pullorum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในนก

Jian *et al*. [75] ทำการศึกษาผลของกากน้ำตาลต่อลักษณะการหมักของหญ้าที่หมักร่วมกับฟางข้าว การหมักผักผลไม้ท้องถิ่นร่วมกับหญ้าในตะวันออกเฉียงใต้ของจีน ทำการทดลองโดยชุดที่ 1 คือกลุ่มควบคุม ชุดที่ 2 คือกากน้ำตาลที่ 2.5 % ชุดที่ 3 กากน้ำตาลที่ 5 % ผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด - ด่างของการหมักผสมทั้งหมดลดลงเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่ทำการหมัก ยกเว้นการหมักสูตรควบคุม ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระหว่างการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าการหมักด้วยกากน้ำตาลที่ 2.5 % และกากน้ำตาลที่ 5 % ช่วยเพิ่มคุณภาพในการหมักได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

วัสดุ

1. ลำไส้ และตับไก่ ที่ฆ่าแล้วจากตลาดเหรียญทอง ตลาดสดในอำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

2. แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบคือ *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี *Salmonella typhimurium* จาก อาจารย์ ทรงพล จำดิษฐ์ อาจารย์ประจำสาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ธัญบุรี และ *Aeromonas* sp.

3. กากถั่วเหลือง (Soybean male)

4. กากน้ำตาล (Molasses)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- วุ้น (Agar) de man Rogosa and Sharpe (MRS)
- de man Rogosa and Sharpe (MRS)
- Nurtrition broth

6. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับโคโลนีแบคทีเรียที่มีการผลิตกรด Bromocresol purple
- สารเคมีสำหรับย้อมแกรมแบคทีเรีย ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 95 % Safranin Crystal violet และ สารละลาย Iodine
- กลีเซอรอล (Glycerol)
- เกล็ดไอโอดีน
- เกลือน้ำดีผง (Bile salt powder)
- เอนไซม์เพปซิน (Pepsin)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2)

- Skim milk

- Tributyrin

- Soluble starch

7. ยาปฏิชีวนะ

- Penicillin V

- Tetracycline

- Chloramphenicol

8. เอนไซม์

- เปปซิน (Pepsin)

อุปกรณ์

1. กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
2. กระบอกตวง (Cylinder)
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Compound microscope)
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
5. ขวดสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Glass bottle)
6. เครื่องชั่งแบบละเอียด 2 ตำแหน่ง (Precision balance)
7. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (Precision balance)
8. เครื่องตีปั่น (Stomacher)
9. เครื่องดูดจ่ายสาร (Dispenser)
10. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer genie2)
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Eutech pH 700)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
13. เครื่องอ่านไมโครเพลท (Biochrom EZ read 800)
14. จานเพาะเชื้อ (Petri dish sterile)
15. ตู้บ่มชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator)
16. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

17. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet, BSC)

18. ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

19. ไมโครปิเปต (Micropipette)

20. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

21. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

22. หลอดทดลอง (Tube)

23. หลอดไมโครทิว (Microtube)

24. 96 well microplate

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากทางเดินอาหารไก่

นำตัวอย่างส่วนลำไส้และตับของไก่ จำนวน 10 g ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปริมาตร 90 mL นำมาตีบดด้วยเครื่อง Stomacher นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางแบบ Ten-fold dilution ด้วยสารละลาย NaCl อีกครั้งในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาทำ Pour plate ในอาหาร MRS agar ที่เติม Bromocresol purple ลงไป 0.02 % นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญทั้งหมดจากลำไส้และตับและทำให้อาหาร MRS กลายเป็นสีเหลือง นำมาถ่ายลงในอาหาร MRS agar ใหม่จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทดสอบการเป็นแบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria, LAB) โดยย้อมสีแกรมแบคทีเรีย โดย LAB จะติดสีแกรมบวก และศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดย LAB ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและเก็บเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้ไว้ในอาหาร MRS broth ที่มีกลีเซอรอลอยู่ด้วยที่ -20 องศาเซลเซียส [76] เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 ทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน

นำเชื้อ LAB มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ LAB ที่เจริญใน MRS broth 1 mL ถ่ายลงใน microtube ปริมาตร 1.5 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ LAB ที่ ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ LAB ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % w/v นำมาทดสอบความสามารถในการทนกรดและเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) โดยเติม

สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % w/v ที่ปรับความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 2.5 3.0 และ 3.5 พร้อมกับเติมเอนไซม์ Pepsin (3 mg / mL) ลงไปในเซลล์ LAB ปริมาตร 1 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [76] และนำไปทำ pour plate ลงในอาหาร MRS agar ที่เติมอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ทำการนับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวนหาการรอดชีวิตของ LAB ต่อไป

3.2.3 ทดสอบความสามารถในการทนต่อด่างและเกลือน้ำดี

นำเชื้อ LAB มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ LAB ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้น 0 0.3 0.6 และ 1 % (w/v) ที่ปรับความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 8.0 จากนั้นตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยทำ pour plate ลงในอาหาร MRS agar ที่เติมอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น ทำการนับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวนหาการรอดชีวิตของ LAB ต่อไป โดยเลือกสายพันธุ์ LAB ที่ทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสุด [28]

3.2.4 ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

นำเชื้อ LAB มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบ

- ทดสอบการย่อยโปรตีน โดยหยดเชื้อ LAB ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 2 % Skim milk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ LAB [77]

- ทดสอบการย่อยไขมัน โดยหยดเชื้อ LAB ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 1 % Tributyrin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยไขมันจะเกิดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ LAB [77]

- ทดสอบการย่อยแป้ง โดยหยดเชื้อ LAB ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 2 % Soluble starch นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบการย่อยแป้งโดยการหยดไอโอดีน หากเกิดการย่อยแป้งไอโอดีนจะไม่เปลี่ยนสี [78]

3.2.5 ทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

นำยาปฏิชีวนะชนิด Penicillin V Tetracycline และ Chloramphenicol มาปรับความเข้มข้นโดยผสมกับอาหาร MRS broth ด้วยวิธี half-fold serial dilutions โดยผสมลงใน 96 well microplate ให้มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะอยู่ที่ 256 - 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาตรรวมในแต่ละหลุมเท่ากับ 180 ไมโครลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ LAB ที่เจริญในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมงปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่น (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (EZ Read 2000 Microplate Reader) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum inhibition concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC) โดยนำเชื้อ LAB จากหลุมที่ไม่พบการเจริญมา Streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่เติม indicator นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง [76]

3.2.6 ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB

ถ่ายเชื้อ LAB มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาหยดลงบนอาหาร MRS agar ที่เติมอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella typhimurium Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Aeromonas* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 % ปริมาตร 5 mL ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 ^{O}C ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี LAB เจริญอยู่และปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณใส (Clear zone) ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพร้อมวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง [7]

3.2.7 การคำนวณ

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/mL)}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น (log CFU/mL)}} \times 100$$

3.2.8 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก (Growth curve of lactic acid bacteria)

ทำการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เก็บตัวอย่างเป็นระยะ มาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีการ Pour plate ในอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับโคโลนีของเชื้อ LAB ที่เจริญบนอาหาร MRS agar ดูช่วงเวลาที่มีการเจริญชองเชื้อ LAB สูงสุด

3.2.9 การระบุสายพันธุ์ LAB ที่คัดแยกได้โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

นำ LAB ที่คัดแยกได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA เทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน Genbank ด้วยวิธี BLASTn ในเวปไซด์ https://www.ncbi.nlm.nih.gov (บริษัท Macrogen Inc.) ประเทศเกาหลีใต้

3.2.10 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *E. feacium* A028 ด้วยการหมักแบบแห้งในกากถั่วเหลือง

ทำการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *E. feacium* A028 ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่าย *E. feacium* A028 ใส่ลงในกากถั่วเหลืองที่ปลอดเชื้อปริมาณ 300 g ซึ่งแปรผันปริมาณกากน้ำตาลที่ 0 5 และ 10 % ความชื้น และกากถั่วเหลืองต่อปริมาณกากน้ำตาลเท่ากับ 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 โดยเติมกล้าเชื้อลงไป 10 % (v/w) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

3.2.11 ศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. feacium* A028 ในกากถั่วเหลืองด้วยการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด

นำสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.2.10 มาเตรียมกากถั่วเหลืองที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 3 kg จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ LAB ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.2.10 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง) ของ *E. feacium* A028

3.2.12 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการอบแห้งกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *E. feacium* A028

ทำการหมักกากถั่วเหลืองร่วมกับ *E. feacium* A028 ในสภาวะที่เหมาะสม นำมาอบแห้งในตู้อบลมร้อน (ความจุถาดโดยประมาณ 6.8 kg / m^2 กว้าง 0.45 m และยาว 0.65 m)โดยแปรผันอุณหภูมิที่ 45 50 และ 55 ^{O}C จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมงตลอดระยะเวลาการอบแห้งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ LAB ที่รอดชีวิต

3.2.13 การเก็บตัวอย่าง

ทำการผสมและเขย่ากากถั่วหมักในถุงให้เข้ากัน เพื่อให้องค์ประกอบของกากถั่วเหลืองหมักในถุงมีความสม่ำเสมอ จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างกระจายให้ทั่วบริเวณ นำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.14 จลนพลศาสตร์

- การหาอัตราส่วนความชื้น

ทำการหาอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมักของกระบวนการอบแห้งแสดงโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

MR คือ อัตราส่วนความชื้น โดยที่ M_0 M_t และ M_e คือความชื้นเริ่มต้น ($g_{water}/g_{dry\ basis}$), ความชื้นของเวลาในการอบแห้ง (t; $g_{water}/g_{dry\ basis}$) และความชื้นสัมพัทธ์ ($g_{water}/g_{dry\ basis}$) ตามลำดับ สมการ (1) สามารถปรับเปลี่ยนเป็นสมการที่ง่ายกว่าดังแสดงในสมการที่ (2) [79], [80]

$$MR = \frac{M_t}{M_0} \quad (2)$$

จากนั้นนำค่า *MR* ที่ได้มาคำนวณในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยนำค่าที่ได้จากการทดลองจริงมาเทียบกับค่าที่ได้จากการทำนายดูจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมที่สุดคือ สังเกตเส้นกราฟที่เข้ากันได้มากที่สุด โดยแทนค่าจากสมการที่ (3) ถึง (9) [67, 69] ซึ่งเป็นแบบจำลองที่สร้างขึ้นมาเพื่อทำนายการอบแห้งของวัตถุดิบชนิดต่างๆ ซึ่งใช้ฟังก์ชัน Solver ของโปรแกรม Microsoft Excel 2010 โดยใช้เทคนิคกำลังสองน้อยที่สุด (least squares technique) ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อการปรับเส้นโค้งให้เหมาะสมที่สุด

Lewis,	$MR = \exp(-kt)$	(3)
Page,	$MR = \exp(-kt^n)$	(4)
Modified page ,	$MR = \exp[- (kt)^n]$	(5)
Parabolic,	$MR = a+bt+ct^2$	(6)
Henderson and Pabis,	$MR = a \exp(-kt)$	(7)
Logarithmic,	$MR = a \exp(-kt) + c$	(8)
Two – Term,	$MR = a \exp(-k_0 t) + b \exp(-k_1 t)$	(9)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการอบแห้งที่เหมาะสมมีการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) sum of squares for error (SSE) ค่ารากที่สองของค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (*RMSE*) ประสิทธิภาพการสร้างแบบจำลอง (*EF*) chi-square (X^2) ในสมการ (10) ถึง (14)

$$R^2 = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^{N} \left(MR_{pre;i} - MR_{exp;i} \right)^2}{\sum_{i=1}^{N} \left(MR_{pre;i} - \overline{MR}_{exp} \right)^2} \right] \quad (10)$$

$$SSE = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(MR_{exp;i} - MR_{pre;i} \right)^2}{N} \quad (11)$$

$$RMSE = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left(MR_{pre;i} - MR_{exp;i} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

$$EF = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(MR_{exp;i} - MR_{exp;ave} \right)^2 - \sum_{i=1}^{N} \left(MR_{pre;i} - MR_{exp;i} \right)^2}{\sum_{i=1}^{N} \left(MR_{exp;i} - MR_{exp,ave} \right)^2} \quad (13)$$

$$X^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(MR_{pre;i} - MR_{exp;i} \right)^2}{N - n} \quad (14)$$

โดย $MR_{exp;I}$ คือค่าที่ได้จากการทดลองจริง $MR_{pre;I}$ คือค่าที่ได้จากการจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ $MR_{exp;ave}$ เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง และ N และ n เป็นจำนวนข้อมูลและค่าคงที่

- การวิเคราะห์

การรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์หลังการอบแห้งตรวจสอบโดยทำการ Pour plate ในอาหาร MRS agar ตามวิธีการของ [82] ทำการเจือจางตัวอย่างในระดับที่เหมาะสม โดยทำการ Pour plate ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานผลการทดลองโดยหน่วย colony forming units ต่อ gram (CFU/g)

3.2.15 การทดสอบค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวด้วยวิธี One-way analysis of variance (One – way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range comparison test โดยโปรแกรม SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

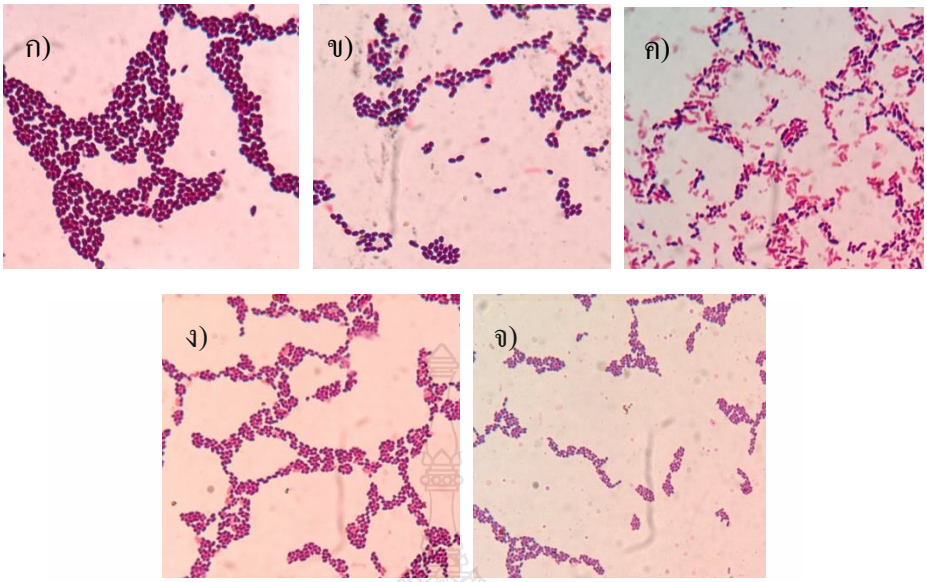
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ และตับไก่

จากการนำลำไส้ และตับไก่ที่มีสุขภาพดีตามท้องตลาดมาทำการแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรด ทำการคัดแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดแข็ง MRS ที่มี Bromocresol purple 0.02 % รวมอยู่ด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดได้ทั้งจากลำไส้ และตับไก่ โดยสังเกตการสร้างกรดของแบคทีเรียจากการดูบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเมื่อมีการเปลี่ยนสีจากสีน้ำตาลอมม่วงเป็นสีเหลืองรอบๆ โคโลนีที่มีการเจริญบนอาหารแข็ง MRS ซึ่งการเปลี่ยนสีนั้นเกิดจากการสร้างกรดของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือก จากนั้นทำการนับจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดจากที่แยกลำไส้ และตับไก่ จากการคัดแยกในครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสร้างกรดจากการสังเกตโคโลนีที่ทำปฏิกิริยากับ Bromocresol purple เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีแสดงว่าโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบริเวณนั้นมีการสร้างกรดขึ้น พบว่ามีแบคทีเรียที่สร้างกรดทั้งหมด 187 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนของลำไส้ไก่จำนวน 141 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนของตับไก่จำนวน 46 ไอโซเลต แบคทีเรียที่ทำการคัดแยกนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศน้อยและสังเกตพบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน คือโคโลนีมีสีขาวถึงเหลืองอ่อน มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ โดยจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดที่แยกจากลำไส้เท่ากับ 8.149 และตับไก่เท่ากับ 5.662 log CFU / g

จากนั้นนำแบคทีเรียสร้างกรดที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)โดยนำมาย้อมแกรมแบคทีเรีย เชื้อ LAB เมื่อย้อมแกรมแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะติดสีแกรมบวก อาจมีรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น รูปร่างกลม กลมกึ่งรี แท่งยาว แท่งสั้น เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2 โดย A028 มีลักษณะกลมกึ่งรี (ค่อนไปทางกลม) A040 มีลักษณะกลมกึ่งรี (กลมเล็กน้อย) A046 มีลักษณะวงรีเรียวยาวเล็กน้อย B015 มีลักษณะกลมกึ่งรีขนาดเล็ก และ B020 มีลักษณะกลมกึ่งรีขนาดเล็กมาก



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีต่างๆ ของแบคทีเรียสร้างกรดโดยการย้อมแกรมแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของ ก) A028 ข) A040 ค) A046 ง) B015 และ จ) B020

นำแบคทีเรียสร้างกรดแกรมบวกมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) โดยเชื้อ LAB จะไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ให้ผลเป็นลบทดสอบหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ลงบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย โดยสังเกตการเกิดฟอง หากไม่เกิดฟองแสดงว่าแบคทีเรียไอโซเลตนั้นมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นเชื้อ LAB ซึ่งเอนไซม์คะตะเลสพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งมนุษย์และสัตว์ รวมไปถึงพืชบางชนิด แม้กระทั่งแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสทำหน้าที่ป้องกันเซลล์โดยสามารถย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อาจมีผลกระทบต่อเซลล์ เอนไซม์คะตะเลสสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน ฟองก๊าซที่เห็นเกิดจากการสลายตัวของก๊าซออกซิเจนที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คะตะเลส [83] จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อ LAB มาทำการทดสอบการเป็นโพรไบโอติกส์โดยการทดสอบสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหาร ดังนี้

4.2 ทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ในหลอดทดลอง (*In vitro*)

4.2.1 ทดสอบความสามารถในการทนกรดและเอนไซม์เปปซิน

สุ่มตัวอย่างเชื้อ LAB ที่แยกได้จากลำไส้และตับไก่จำนวน 5 ไอโซเลต คือ A028 A040 A046 (แยกจากลำไส้ไก่) B015 และ B020 (แยกจากตับไก่) เมื่อนำเชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตมาทดสอบ

ความสามารถในการทนต่อกรดพีเอช 3.5 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 mg / mL ภายหลังการบ่ม 2 ชั่วโมง เชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลต มีการรอดชีวิตได้ดี โดยเชื้อ LAB ที่รอดชีวิตได้ดีที่สุด คือ A028 มีการรอดชีวิตเท่ากับ 8.110 log CFU / mL หรือคิดเป็นร้อยละ 99.59 แต่เมื่อนำ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตนี้มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดพีเอช 3.0 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 mg / mL ภายหลังการบ่ม 2 ชั่วโมง เชื้อ LAB สามารถรอดชีวิตได้ 4 ไอโซเลต มีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ คือ B015 โดยไอโซเลตที่รอดชีวิตได้ดีที่สุด คือ A028 มีการรอดชีวิตเท่ากับ 7.612 log CFU / mL หรือคิดเป็นร้อยละ 93.48 และเมื่อนำเชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตไปทดสอบที่พีเอช 2.5 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 mg / mL ภายหลังการบ่ม 2 ชั่วโมง เชื้อ LAB จากทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถรอดชีวิตได้เพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้น โดย 3 ไอโซเลตที่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ คือ A040 B015 และ B020 ซึ่งไอโซเลตที่รอดชีวิตได้ดีที่สุด คือ A028 มีการรอดชีวิตเท่ากับ 5.372 log CFU / mL คิดเป็นร้อยละ 65.97 ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การรอดชีวิตของ LAB ในสภาวะกรดร่วมกับเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ไอโซเลต	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น (log CFU / mL)	จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต (log CFU / mL)			อัตราการรอดชีวิต (%)		
		3.5	3.0	2.5	3.5	3.0	2.5
A028	8.143	8.110	7.612	5.372	99.59	93.48	65.97
A040	8.276	7.799	7.247	-	94.24	87.57	-
A046	8.139	7.875	7.591	5.146	96.76	93.27	63.23
B015	8.371	7.963	-	-	95.13	-	-
B020	8.303	7.919	5.863	-	95.38	70.61	-

"-" คือไม่พบการรอดชีวิต

ในกระเพาะอาหารไก่มีการสร้างกรดไฮโดรคลอริค (Hydrochoric acid) ทำให้ในกระเพาะอาหารไก่มีความเป็นกรดอยู่ที่พีเอช 2 - 5 โดยความเป็นกรดมากจะขึ้นอยู่กับอาหารที่รับประทานเข้าไป ไก่มีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกออกมาในกระเพาะอาหารเพื่อทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและช่วยให้เอนไซม์ในกระเพาะอาหารทำงานได้ง่าย โดยเอนไซม์ที่สัตว์หลั่งออกมานั้นจะสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดอยู่ที่พีเอช 2 - 3 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าว คือเอนไซม์เปปซิน นอกจากนี้กรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์เปปซินยังทำให้เกิดความเสียหายต่อแบคทีเรียแกรมบวกได้โดย

จะไปทำลายผนังเซลล์ทำให้ให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ ซึ่ง LAB เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งถูกทำลายภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดสูงและมีเอนไซม์เปปซินได้ ทำให้ LAB มีการรอดชีวิตลดลง [76] ดังนั้นการคัดเลือก LAB เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกส์ที่มีประสิทธิภาพ LAB นั้น ต้องมีความอดทนและสามารถมีชีวิตรอดได้ภายในกระเพาะอาหาร

4.2.2 ทดสอบความสามารถในการทนต่อด่างและเกลือน้ำดี

นำเชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตที่กล่าวข้างต้นมาทดสอบความสามารถในการทนต่อด่างที่พีเอช 8 และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3 0.6 และ 1.0 % (w/v) ภายหลังการบ่มนาน 18 ชั่วโมง เชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลต มีการรอดชีวิตได้ดี โดยเชื้อ LAB ที่รอดชีวิตได้ดีที่สุด คือ B015 มีการรอดชีวิตเท่ากับ 7.869 7.698 และ 7.672 log CFU / mL คิดเป็นร้อยละ 97.45 95.33 และ 95.10 ตามลำดับ รองลงมาเป็นไอโซเลต B020 และ A028 ในขณะที่ไอโซเลต A040 และ A046 มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน โดยมีการรอดชีวิตร้อยละ 69.39 และ 72.95 ตามลำดับ ที่ระดับเกลือน้ำดี 1.0 % (w/v) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การรอดชีวิตของ LAB ในสภาวะความเป็นด่างพีเอช 8 และความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.3 0.6 และ 1.0% หลังจากการบ่ม 18 ชั่วโมง

ไอโซเลต	จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น (log CFU / mL)	จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต (log CFU / mL)			อัตราการรอดชีวิต (%)		
		0.3%	0.6%	1.0%	0.3%	0.6%	1.0%
A028	8.086	6.792	6.707	6.235	84.00	82.95	77.11
A040	8.212	6.763	5.875	5.698	82.36	71.54	69.39
A046	8.053	6.623	6.004	5.875	82.24	74.56	72.95
B015	8.075	7.869	7.698	7.672	97.45	95.33	95.10
B020	8.181	7.556	7.127	7.107	92.36	87.12	86.87

โดยทั่วไปน้ำดีมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.5 - 8.0 มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองปนเขียว มีองค์ประกอบหลัก คือกรดน้ำดี (Bile acid) สารสีไบลิเวอดิน (Pigment biliverdin) ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) และคอลเลสเตอรอล (Cholesterol) ซึ่งน้ำดีมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยเกลือน้ำดี (Bile salts) ที่เป็นกรดน้ำดีชนิดหนึ่งสามารถเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

ของแบคทีเรียจนได้รับความเสียหายได้ซึ่งเกลือน้ำดีจะเข้าไปละลายไขมันในส่วนของฟอสโฟลิปิดที่เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยความเสียหายจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ต้องมีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี [76]

Pozza *et al*. [84] ได้ศึกษาคุณสมบัติของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกจากอุจจาระของทารก โดยศึกษาถึงความอดทนต่อสภาวะกดดันภายในระบบทางเดินอาหารของคนซึ่งทดสอบความทนต่อความเป็นกรดและความทนต่อเกลือน้ำดี ผลการทดลองพบว่าสามารถแยก *Lactobacillus* sp. ได้ 30 ไอโซเลตแต่มีเพียง 8 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อความเป็นกรดที่พีเอช 3.0 และสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3 % (w/v) ได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดที่ในระบบทางเดินอาหารได้ ซึ่งมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกส์ร่วมกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ Sahadeva *et al*. [85] ได้ศึกษาถึงการอยู่รอดของโพรไอโอติกส์ในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่างกันร่วมกับเกลือน้ำดีซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ โดยทำการคัดเลือกโพรไบโอติกส์จากนมยี่ห้อต่างๆ 5 ชนิดที่มีในประเทศมาเลเซีย พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถทนต่อค่าพีเอช 3.0 และ 7.2 ได้ โดยมีการรอดชีวิตที่ 6.60 - 9.04 log CFU / mL และมีแบคทีเรียที่แยกได้จาก 4 ตัวอย่างที่สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 % (w/v) ได้ และ Boke *et al.* [86] ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่แยกจากโยเกิร์ตพบว่า *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* มีความอดทนต่อค่าพีเอช 2.0 ได้ และพบว่า *S. thermophilus* มีความทนต่อเกลือน้ำดีมากกว่า *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* โดย *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* สามารถอดทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3 % (w/v) ได้อย่างมีนัยสำคัญ

4.2.3 ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

นำชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตที่กล่าวข้างต้นมาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถย่อยโปรตีนได้ในระดับที่ไม่ต่างกันมากนัก ซึ่งสังเกตจากความกว้างของวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) ของเชื้อ LAB ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มี Skim milk เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไอโซเลต A028 A040 A046 และ B015 มีขนาดความกว้างของบริเวณใสรอบโคโลนีใกล้เคียงกัน ส่วนไอโซเลต B020 มีขนาดความกว้างของวงใสรอบ

โคโลนีต่ำกว่า 4 ไอโซเลตข้างต้นเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 3 และพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตไม่มีความสามารถในการย่อยไขมันและแป้งได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 สอดคล้องกับงานวิจัยของ หทัยรัตน์ [76] ที่ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้ โดยใน 20 ไอโซเลตพบว่าเชื้อ LAB ที่สามารถย่อยโปรตีนได้มี 12 ไอโซเลต และไม่พบเชื้อ LAB ไอโซเลตใดที่สามารถย่อยไขมันและแป้งได้เลย

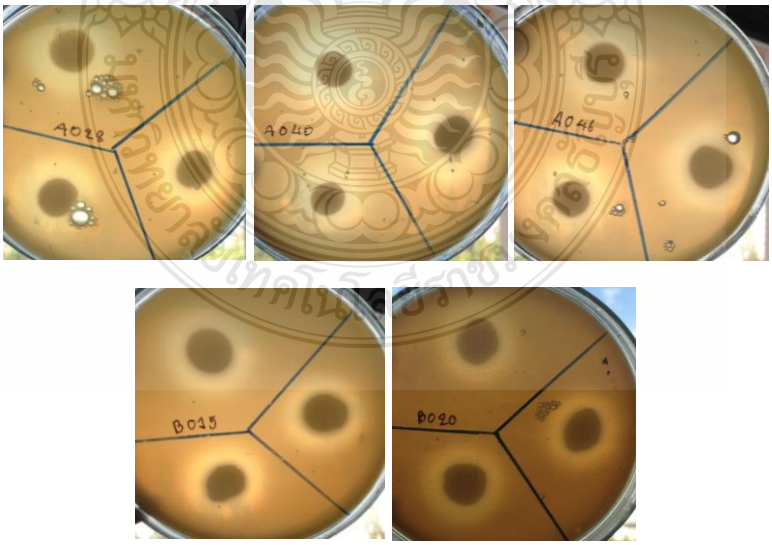
ตารางที่ 8 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้งของ LAB

ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย		
	โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
A028	+ (2.00)	-	-
A040	+ (2.26)	-	-
A046	+ (2.27)	-	-
B015	+ (2.06)	-	-
B020	+ (1.91)	-	-

“+” เกิดบริเวณใส

“-” ไม่เกิดบริเวณใส

ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี



ภาพที่ 3 ความสามารถในการย่อยโปรตีนของเชื้อ LAB ก) A028 ข) A040 ค) A046 ง) B015 และ จ) B020

เนื่องจากโพรไบโอติกส์เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นความสามารถในการย่อยสารอาหารจำพวกโปรตีนเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งของการเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดี เพราะโพรไบโอติกส์ที่ดีจะสามารถช่วยการย่อยสารอาหารของโฮสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ที่โพรไบโอติกส์นั้นอาศัยอยู่ได้ จากการศึกษาของภณิดาและคณะ [87] พบว่า LAB ที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ 42 ไอโซเลต สามารถย่อยแป้งได้ 4 ไอโซเลตและไม่มีไอโซเลตใดที่สามารถย่อยไขมันได้

4.2.4 การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตที่แยกได้มาทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ penicillin V tetracycline และ chloramphenicol โดยผสมกับอาหาร MRS broth ด้วยวิธี half-fold serial dilutions ผลการทดสอบพบว่าเชื้อ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดได้ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) อยู่ที่ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) อยู่ที่มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเป็นคุณสมบัติที่สำคัญคุณสมบัติหนึ่งของโพรไบโอติกส์ เนื่องจากบางครั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์มีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่เกิดขึ้นกับสัตว์หรืออาจมียาปฏิชีวนะผสมอยู่ในอาหารสัตว์ซึ่งอาจยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นหากโพรไบโอติกส์มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจะทำให้โพรไบโอติกส์อยู่รอดในทางเดินอาหารของสัตว์ได้ [76]

ภนิดา และคณะ [87]ทำการคัดเลือก LAB จากผัดสดและอาหารหมักดอง โดยนำ LAB มาทดสอบคุณสมบัติการโพรไบโอติกส์ต่างๆ เช่น การต้านต่อยาปฏิชีวนะของ LAB ที่คัดเลือกได้ พบว่าดื้อต่อยา polymycin vancomycin streptomycin gentamycin และ kanamycin และไวต่อการตองสนองต่อยา chloramphenicol erythromycin เมื่อทำการระบุสายพันธุ์ LAB ทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่า 4 ไอโซเลตเป็น *Lactobacillus fermentum* และ 2 ไอโซเลตเป็น *L. plantarum* มีการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์ที่อำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่โดย ณัฐธิดา และคณะ [88] ทำการสำรวจพบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่มีการเลี้ยงโคนม ไก่พื้นเมือง ไก่ไข่ สุกร โคเนื้อ และกระบือ เป็นสัตว์เศรษกิจ โดยพบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันโรค รักษาโรค และใช้เร่งการเติบโตให้กับสัตว์อีกด้วย

ซึ่งเกษตรกรไม่มีความรู้เกี่ยวกับยาปฏิชีวนะที่ถูกต้องจึงมีการใช้ในปริมาณมากทำให้เกิดผลกระทบจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ทำให้มีการตกค้างของยาในมูลสัตว์ และยังสามารถตกค้างสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ และผ่านมาสู่มนุษย์อีกด้วย เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับโพรไบโอติกส์ในอาหารสัตว์อาจทำให้โพรไบโอติกส์ไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ จึงจำเป็นต้องใช้โพรไบโอติกส์ที่มีคุณสมบัติในการต้านต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อให้โพรไบโอติกส์รอดชีวิตและทำงานในสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.2.5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB

นำ LAB มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Salmonella typhimurium Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Aeromonas* sp. ผลการทดลองไอโซเลต A028 และ B015 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 ชนิด ในขณะที่ไอโซเลต A040 A046 และ B020 ไม่สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้ และยังพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ LAB ใกล้เคียงกันเพราะให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งไม่ต่างกัน ดังตารางที่ 9 และภาพที่ 4

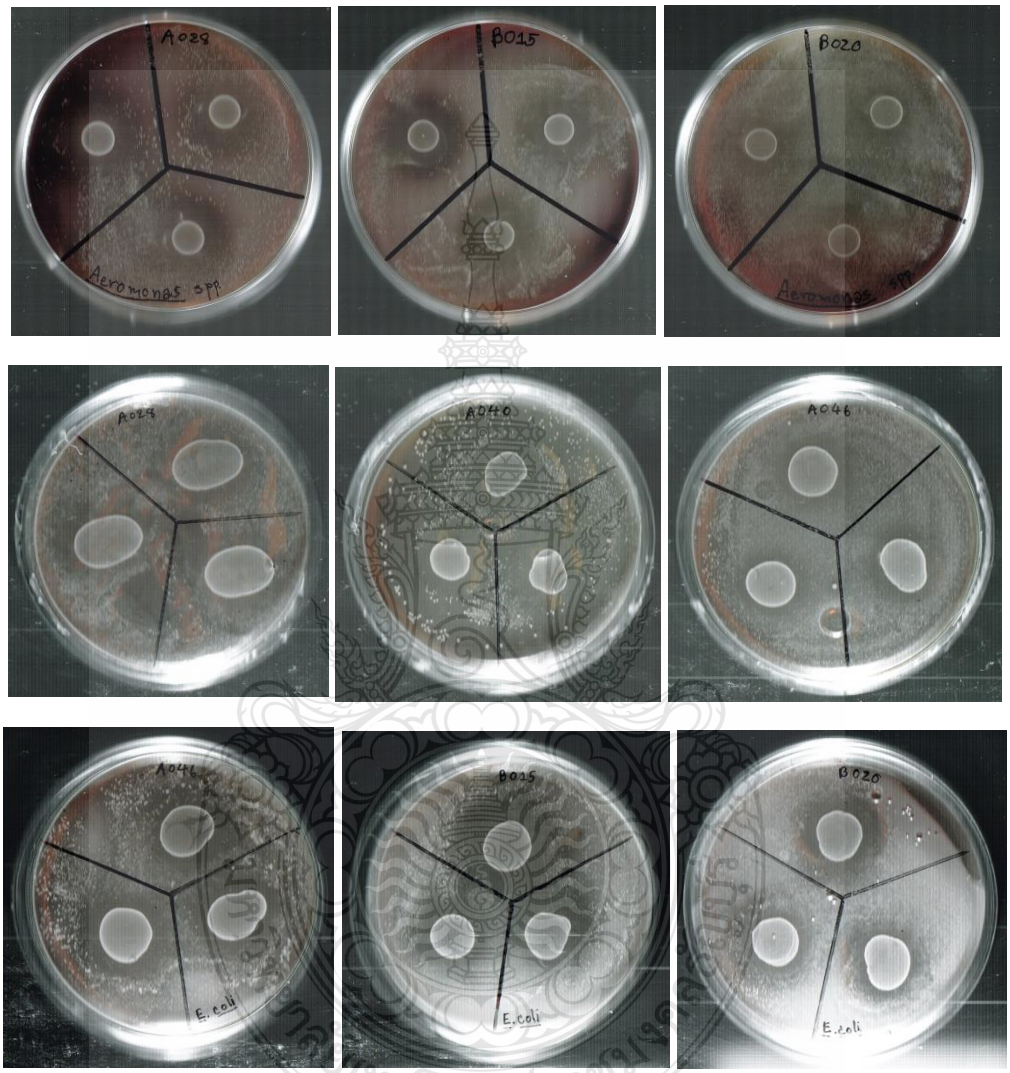
ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB

ไอโซเลต	การยับยั้งเชื้อก่อโรค*			
	S. aureus	*E. coli*	*S. typhimurium*	*Aeromonas* sp.
A028	+ (1.465)	+ (1.507)	+ (1.516)	+ (1.772)
A040	+ (1.780)	+ (1.546)	-	+ (1.800)
A046	+ (1.440)	+ (1.479)	-	+ (1.508)
B015	+ (1.451)	+ (1.514)	+ (1.699)	+ (2.219)
B020	+ (1.542)	+ (1.408)	-	+ (1.604)

* "+" เกิดบริเวณใส (ตัวเลขในวงเล็บคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (เซนติเมตร))
"-" ไม่เกิดบริเวณใส

โพรไบโอติกส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. มีหลายสายพันธุ์ Musikasang *et al.* [23] ทำการแยกโพรไบโอติกส์ โดยรายงานว่าสายพันธุ์ *E. faecium* KT4S13 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Salmonella* sp. Guo *et al.* [89] ทดสอบคุณสมบัติของ LAB ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* นอกจากนี้ Yuksekdag *et al.* [26] ได้ศึกษาโพรไบโอติกส์ในกลุ่ม

Lactobacilli ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella enteritidis* และภนิดา และคณะ [87] พบว่าโพรไบโอติกส์ที่แยกจากผักสดและอาหารดองสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella enterica*



ภาพที่ 4 ลักษณะบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB ที่คัดแยก

สอดคล้องกับงานวิจัยของหทัยรัตน์ [76] ซึ่งทดสอบความสามารถของเชื้อ LAB ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารไก่ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรีย LAB ที่คัดแยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ในขณะที่ Mezaini *et al.* [90] รายงานการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมว่าเชื้อ LAB *Lactococcus*

lactis L. bulgaricus และ *S. thermophiles* ที่แยกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Listeria innocua* และ *Bacillus cereus* ได้ นอกจากนี้ Guo *et al*. [89] ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ LAB ที่แยกได้จากลำไส้และอุจจาระสุกรเพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์และทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าเชื้อ LAB ที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้ และ Yuksekdag *et al*. [26] ได้ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *L. acidophilus L. delbrueckii ssp. Delbrueckii L. salivarius L. rhamnosus* และ *L. fermentum* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli Pseudomonas aeruginosa* และ *Shigella sonnei* ได้ นอกจากนี้เชื้อ *L. acidophilus L. delbrueckii* ssp. *Delbrueckii* และ *L. salivarius* สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *S. enteritidis* ได้ มีเชื้อ LAB 2 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Campylobacter jejuni* ได้คือ *L. acidophilus* และ *L. delbrueckii ssp. Delbrueckii* และมีเพียง *L. acidophilus* ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ Thankappan *et al.* [91] ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ LAB ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลายี่สกเทศโดยพบว่าเชื้อ LAB ที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ *B. subtilis B. aerophilus* และ *B. firmus* โดย LAB ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila A. enteropelogenes* และ *Providencia rettgeri* ได้ ในขณะที่ ภนิดา และคณะ [87] รายงานว่า LAB ที่แยกได้จากผักสดและอาหารหมัก สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus S. enterica E. coli* และ *S. aureus* ATCC25923 ได้

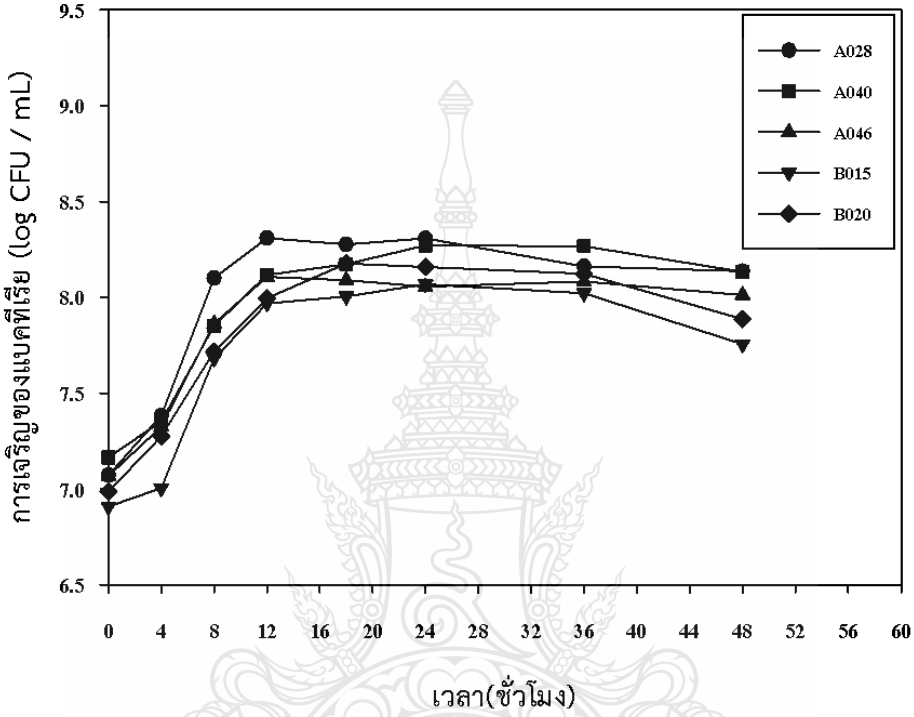
มีการแยก LAB จากอุจจาระของสุกรที่เลี้ยงในประเทศไทย โดย LAB ที่แยกได้นั้นแสดงถึงคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่ง LAB มีบทบาทสำคัญในด้านการส่งเสริมสุขภาพของสุกร ส่งผลให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และยังสามารถมีชีวิตอยู่ร่วมกับเชื้อโรคลำไส้ รวมไปถึงสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้กับสุกรได้อีกด้วย ซึ่งมีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อ LAB ที่แยกได้ 5 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum* 22F *L. plantarum* 25F *L. plantarum* 31F *Pediococcus acidilactici* 72N และ *Pediococcus pentosaceus* 77F ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้สุกร ได้แก่ *E. coli Salmonella choleraesuis* และ *S. suis* โดยพบว่า *L. plantarum* 22F และ 25F มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 77F และมีความสามารถในการลดน้ำตาลในเลือดของสุกร ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า LAB ที่คัดแยกได้นั้นมีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดี [92] และมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญ เนื่องจากโพรไบโอติกส์ในระบบทางเดินอาหารจะช่วยรักษาสมดุลของแบคทีเรียต่าง ๆ ให้ทำงานได้อย่างสมบูรณ์

ทำการคัดเลือก LAB จากการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นที่ดีในการเป็นโพรไบโอติกส์จากข้อ 4.2 จะเห็นว่า LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดแต่เอนไซม์เพปซินที่พีเอช 3.5 แต่เมื่อทำการทดสอบที่พีเอช 2.5 มีเพียง 2 ไอโซเลตที่นั้นที่รอดชีวิตโดย A028 รอดชีวิตได้ดีที่สุด คือ 65.97 % เมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลตมาทดสอบการทนต่อด่างและเกลือน้ำดีที่พีเอช 8 ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงสุดที่ 1.0 % พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถรอดชีวิตได้ดีแต่ที่รอดชีวิตได้สูงสุดคือ B015 และ B020 เนื่องจากทั้ง 2 ไอโซเลตถูกคัดแยกมาจากส่วนของตับไก่จึงมีความอดทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีและความเป็นด่างได้เป็นอย่างดี โดยไอโซเลตที่รอดชีวิตสูงสุดมีการรอดชีวิตถึง 95.10 % คือ B015 ทดสอบการย่อยสารอาหารจำพวกโปรตีน ไขมัน แป้ง พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถย่อยโปรตีนได้แต่ไม่สามารถย่อยไขมันและแป้งได้เลย จากการวัดความกว้างของโซนใสรอบโคโลนีพบว่าไอโซเลต A028 A040 A046 และ B015 มีความกว้างของบริเวณใสรอบโคโลนีในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกันส่วน B020 มีความกว้างของวงใสรอบโคโลนีน้อยที่สุด มีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่าไอโซเลต A028 และ B015 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด และยังพบว่าไอโซเลต A040 A046 และ B020 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. typhimurium* ได้ และทั้ง 5 ไอโซเลตยังสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้นมากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองซึ่งพบว่าไอโซเลต A028 มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดี จึงเลือกไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก (Growth of lactic acid of bacteria)

ผลการทดลอง (ภาพที่ 5) พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถเจริญเติบโตได้แตกต่างกัน โดย แบคทีเรียไอโซเลต A028 และ A046 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่เวลา 13 - 14 ชั่วโมง ไอโซเลต A040 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่เวลา 16 - 17 ชั่วโมง ไอโซเลต B015 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่เวลา 15 - 16 ชั่วโมง และไอโซเลต B020 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่เวลา 19 - 20 ชั่วโมง การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั่วไปมี 4 ระยะ ประกอบด้วย ระยะที่ 1 เรียกว่าระยะ Lag phase เป็นระยะแรกที่แบคทีเรียจะทำการปรับตัวเข้าสู่สภาพแวดล้อมใหม่เพื่อเตรียมตัวต่อการเจริญเติบโต ระยะที่ 2 เรียกว่าระยะ Log phase เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการใช้อาหารมากที่สุด และแบคทีเรียสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เป็นระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด ระยะที่ 3 เรียกว่าระยะ Stationary phase เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนมากที่สุดและคงที่ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนอีกถึงแม้จะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นก็

ตามแต่ไม่สามารถใช้อาหารได้อีกเนื่องจากอาหารถูกใช้หมดแล้ว ดังนั้นอัตราการเกิดจึงมีเท่ากับอัตราการตายของแบคทีเรียนั้นเอง และระยะที่ 4 เรียกว่าระยะ Death phase เป็นระยะที่แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากสารอาหารถูกใช้หมดหรือมีการสะสมของสารพิษสูง



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C ในสภาวะไร้อากาศ

ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ LAB ด้วยรูปแบบ (Model) ของ Barranyi and Roberts แสดงดังตารางที่ 10 พบว่า ไอโซเลต A028 A040 A046 B015 และ B020 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.131 0.087 0.102 0.102 และ 0.091 h^{-1} ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 8.240 8.213 8.071 7.970 และ 8.085 log CFU / g ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าไอโซเลต A028 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดและมีค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่น ๆ

ตารางที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตของ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลต

ไอโซเลต	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น (log CFU / g)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (log CFU / g)	R^2	SE of Fit
A028	7.003 ± 0.101	0.131 ± 0.021	8.240 ± 0.049	0.947	0.109
A040	7.109 ± 0.068	0.087 ± 0.011	8.213 ± 0.039	0.967	0.078
A046	7.016 ± 0.060	0.102 ± 0.012	8.071 ± 0.030	0.973	0.065
B015	6.800 ± 0.140	0.102 ± 0.025	7.970 ± 0.076	0.888	0.155
B020	6.959 ± 0.095	0.091 ± 0.016	8.085 ± 0.054	0.94	0.109

* คำนวณจากโปรแกรมมาตรฐาน DMfit จาก www.combase.cc โดยใช้รูปแบบสมการของ Barranyi and Roberts Model (no lag)

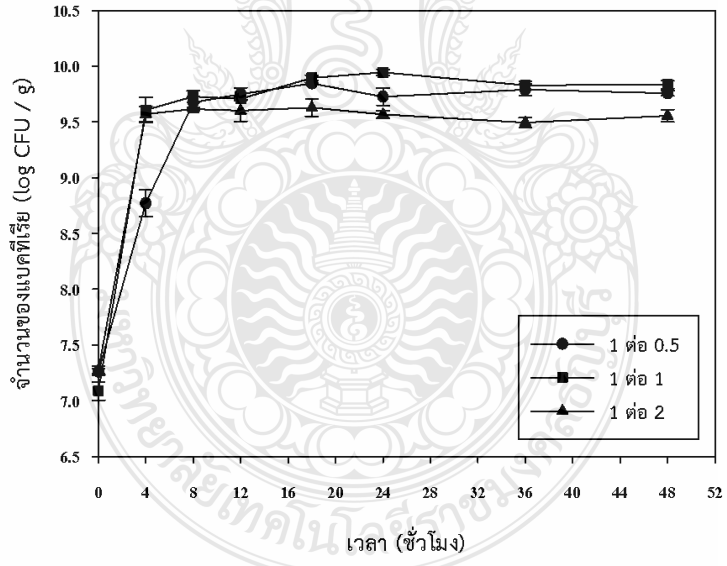
4.4 การระบุสายพันธุ์ LAB ที่คัดแยกได้โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลการระบุสายพันธุ์ของ LAB ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16s rDNA และการเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ด้วยวิธี BLASTn พบว่า LAB ทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ *Enterococcus faecium* โดยมีเปอร์เซ็นต์ Identification เท่ากับ 99 % โดยมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข ประกาศ ณ วันที่ 27 มิถุนายน 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในอาหาร ได้ระบุว่าต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งโพรไบโอติกส์ที่กระทรวงสาธารณสุขประกาศว่าสามารถใช้เป็นอาหารได้ มีจำนวน 23 สายพันธุ์ โดย *E. faecium* เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัย

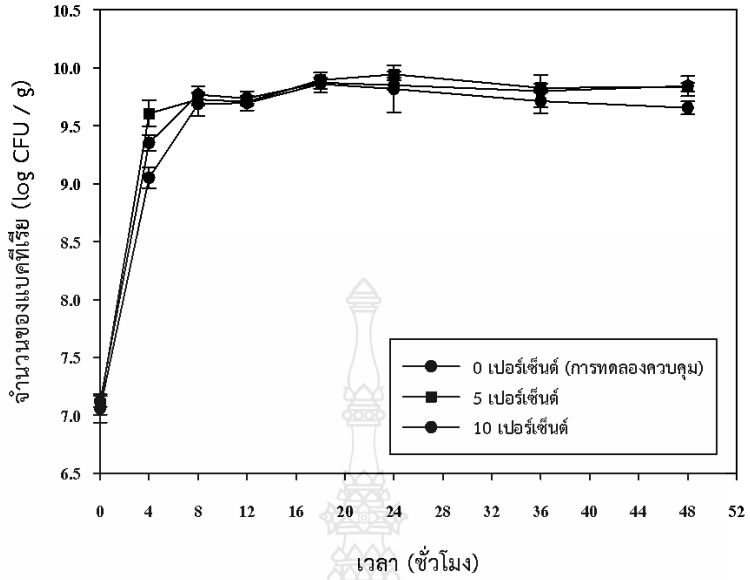
4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ด้วยการหมักแบบแห้งในกากถั่วเหลือง

ทำการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *E. faecium* A028 ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ใส่ลงในกากถั่วเหลืองที่ปลอดเชื้อปริมาณ 300 g โดยเติมกล้าเชื้อ

10 % และทำการทดลองในสภาวะที่ต่างกันดังนี้โดยแปรผันปริมาณกากน้ำตาลที่ 0 5 และ 10 % และปริมาณกากถั่วเหลืองต่อปริมาณน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 โดยเติมกล้าเชื้อลงไป 10 % (v/w) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 41 ^{O}C ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 6 โดยพบว่าการเจริญของ *E. feacium* A028 มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.374 0.671 และ 0.660 h^{-1} ที่ความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 9.763 9.822 และ 9.581 log CFU / g ที่ความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 ตามลำดับ ในภาพที่ 7 ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่อัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล 1 ต่อ 1 เท่า พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.571 0.671 และ 0.503 h^{-1} ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 0 5 และ 10 % (w/v) ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 9.812 9.822 9.739 log CFU / g ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 0 5 และ 10 % (w/v) ตามลำดับ



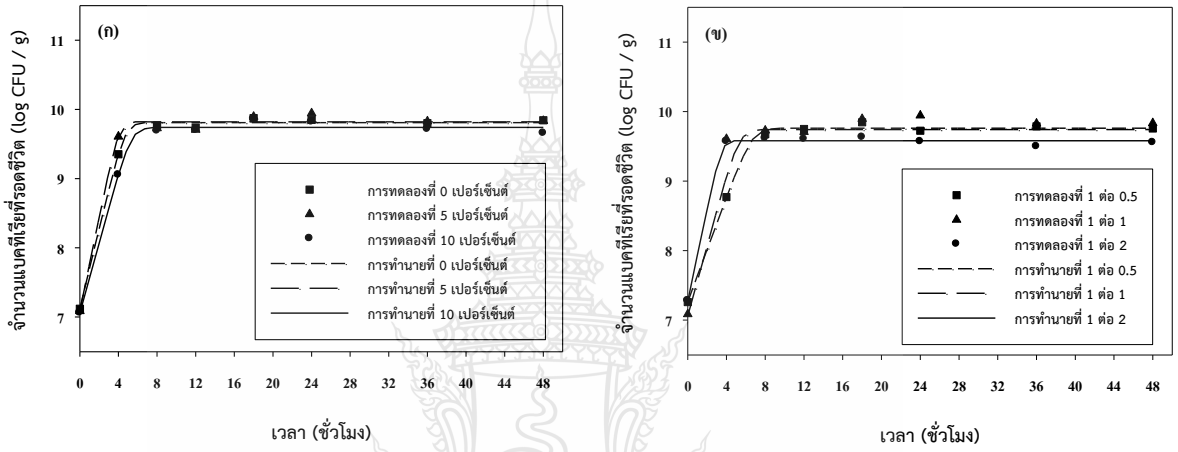
ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองที่เติมสารละลายกากน้ำตาล 5 % (w/v) ด้วยอัตราส่วน (กากถั่วเหลืองต่อสารละลาย) 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 ความเข้มข้นของกากน้ำตาล



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่อัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล 1 ต่อ 1 เท่า ซึ่งแปรผันความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 0 (การทดลองควบคุม) 5 และ 10 % (w/v)

ผลการศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลและอัตราส่วนของกากถั่วเหลืองต่อปริมาณสารละลายกากน้ำตาลที่อัตราส่วนต่างๆ แสดงในภาพที่ 8ก และตารางที่ 11 โพรไบโอติกส์ที่ใช้ในการหมักนี้มีค่ามากกว่า 9 log CFU / g ในทุกการทดลอง จากตารางจะเห็นว่าประสิทธิภาพการเจริญของโพรไบโอติกส์ที่หมักร่วมกับกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 0 และ 5 % ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$ แต่ที่กากน้ำตาล 10 % พบว่าการเจริญของ LAB A028 ลดลง เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ตารางที่ 11) พบว่าอัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล 1 ต่อ 1 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 5 % มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด (ตารางที่ 11) และผลของความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อปริมาณสารละลายกากน้ำตาล แสดงในภาพที่ 8ข และตารางที่ 11 ผลการทดลองพบว่าเมื่ออัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อปริมาณสารละลายกากน้ำตาลเพิ่มขึ้นจาก 1 ต่อ 0.5 เป็น 1 ต่อ 1 พบว่า A028 มีความสามารถในการเจริญเติบโตสูงขึ้น (จาก 9.77 เป็น 9.82 log CFU / g) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงขึ้น (จาก 0.37 เป็น 0.68 h^{-1}) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$ อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 เท่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการ

ทดลองทั้งหมดพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ในการหมักแบบแห้งด้วยกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 5 % และใช้อัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาลเท่ากับ 1ต่อ 1 เท่า ภายใต้สภาวะดังกล่าว A028 สามารถเจริญเติบโตและให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 9.82 log CFU / g และ 0.68 h^{-1} ตามลำดับ



ภาพที่ 8 การเจริญของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองที่สภาวะต่างๆ ภายใต้กระบวนการหมัก

(ก) ความเข้มข้นกากน้ำตาล

(ข) อัตราส่วนของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล

ตารางที่ 11 อัตราการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองที่สภาวะต่าง ๆ

สภาวะ	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น (log CFU / g)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (log CFU / g)	R^2	SE of Fit
ความเข้มข้นกากน้ำตาล					
0 %	7.120 ± 0.052	0.571 ± 0.021	9.812 ± 0.021	0.997	0.052
5 %	7.086 ± 0.092	0.671 ± 0.050	9.822 ± 0.037	0.991	0.092
10 %	7.058 ± 0.081	0.503 ± 0.030	9.739 ± 0.033	0.993	0.081
ความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาล					
1 ต่อ 0.5	7.265 ± 0.049	0.374 ± 0.017	9.763 ± 0.021	0.997	0.050
1 ต่อ 1	7.086 ± 0.092	0.671 ± 0.050	9.822 ± 0.037	0.991	0.092
1 ต่อ 2	7.274 ± 0.047	0.660 ± 0.027	9.581 ± 0.018	0.996	0.047

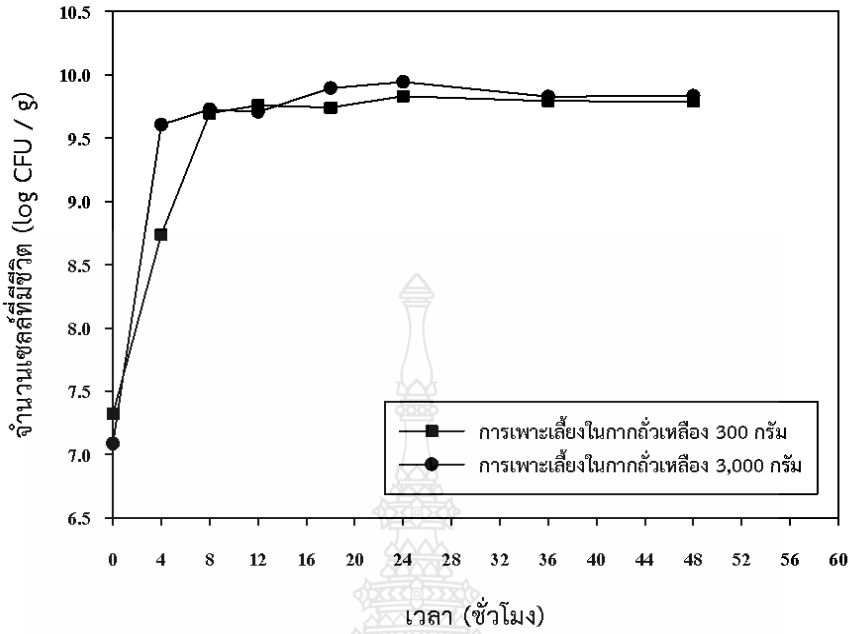
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ที่คัดเลือกได้ พบว่าปริมาณกากน้ำตาลและอัตราส่วนของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาลมีผลต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$ โดยพบว่าการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในกากน้ำตาลความเข้มข้นสูง (10 % w/v) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแบคทีเรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงกว่าอาจจะทำให้เกิดแรงดันออสโมซิสสูงภายในเซลล์ส่งผลให้เกิดภาวะขาดน้ำ ซึ่งส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของจุลินทรีย์ และทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลง [93] โดยกากน้ำตาลความเข้มข้น 5 % w/v ที่ความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาลที่ 1 ต่อ 1 เท่า มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแบคทีเรียสูงที่สุดเท่ากับ 0.671 h^{-1} และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมักมากที่สุดเท่ากับ 9.822 log CFU / g

สภาวะดังกล่าวจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสำหรับการหมักแบบแห้งของกากถั่วเหลืองร่วมกับโพรไบโอติกส์แบคทีเรีย *E. faecium* A028

ทั้งนี้จากการทบทวนรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลกระทบของความชื้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecium* ในการหมักแบบแห้ง อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยที่ผลต่อการรอดชีวิตของ LAB สายพันธุ์อื่น ๆ ในปี 2015 Rodríguez de Olmos *et al*. [94] ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207 และ *Bifidobacterium longum* CRL 849 โดยใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นของแข็งตั้งต้น พบว่าความชื้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดเท่ากับ 65 % โดยให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.23 และ 0.32 h^{-1} ตามลำดับ ในปี 2017 Rodríguez de Olmos *et al*. [82] ยังรายงานว่าการเพาะเลี้ยง LAB ในการหมักแบบแห้งโดยใช้กากถั่วเหลือง (soybean paste) เป็นวัตถุดิบ พบว่าการเพิ่มปริมาณความชื้นจาก 60 เป็น 80 % ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ *L. rhamnosus* ลดลงจาก 0.52 เป็น 0.44 h^{-1} เนื่องจากการหมักแบบแห้งในสภาวะที่มีความชื้นสูงจะทำให้ความพรุนของวัตถุดิบลดลงทำให้การแพร่กระจายของออกซิเจนลดลงด้วย ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความชื้นต่ำเกินไปความสามารถในการละลายของสารอาหารจะลดลงและทำให้น้ำระเหยออกจากวัตถุดิบได้อย่างรวดเร็ว [95] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้

4.6 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองด้วยการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด

ทำการหมักกากถั่วเหลืองแบบขยายขนาด (3,000 g) ผสม *E. faecium* A028 10 % โดยเติมกากน้ำตาล 5 % และมีความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อปริมาณกากน้ำตาลที่ 1 ต่อ 1 เท่า พบว่าโพรไบโอติกส์มีการเจริญที่ 9.778 log CFU / g (ภาพที่ 9) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ตารางที่ 12) 0.351 h^{-1} จะเห็นว่าที่ระดับขยายขนาด (3,000 g) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ จาก 0.671 (ที่ขนาด 300 g) ลดลงเท่ากับ 0.351 h^{-1} แสดงว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ช้าลงเมื่อเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาด เนื่องจากในระดับขยายขนาดมีการกระจายตัวของอุณหภูมิช้ากว่าขนาดเล็ก การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงช้าลง อย่างไรก็ตามพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดมีค่าเท่ากับ 9.778 log CFU / g ซึ่งไม่แตกต่างกันมากกับการหมักแบบแห้งของกากถั่วเหลืองที่ขนาด 300 g ที่มีค่าเท่ากับ 9.822 log CFU / g ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบขยายขนาด



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่หมักร่วมกับกากถั่วเหลืองในระดับขยายขนาด

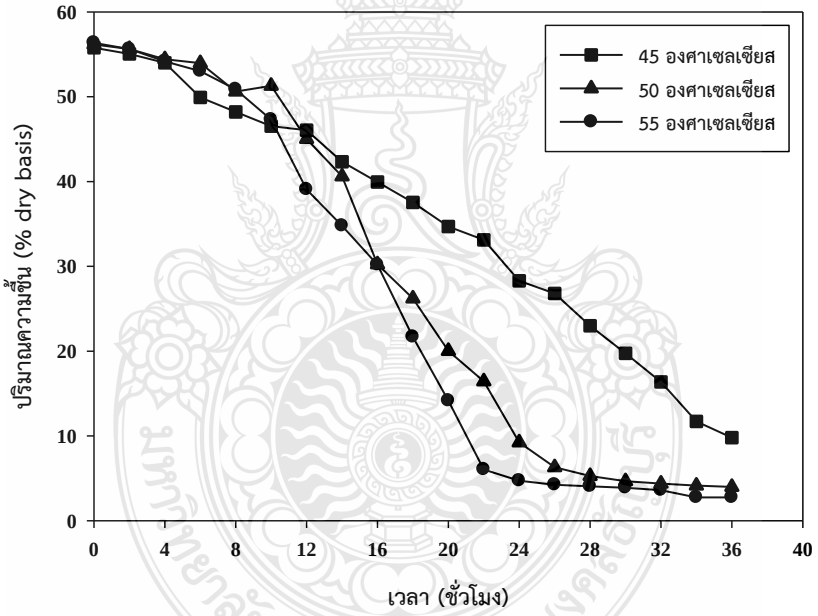
ตารางที่ 12 อัตราการเจริญเติบโตของ *E. faecium* A028 ที่หมักร่วมกับกากถั่วเหลืองในระดับขยายขนาดที่สภาวะต่างๆ ที่คำนวณจากโปรแกรม Combase โดยสมการของ Barranyi and Roberts Model (no lag)

ขนาดของการหมัก	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น (log CFU / g)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด (log CFU / g)	R^2	SE of Fit
300 g*	7.086 ± 0.092	0.671 ± 0.050	9.822 ± 0.037	0.991	0.092
3,000 g*	7.324 ± 0.033	0.351 ± 0.011	9.778 ± 0.014	0.999	0.034

*ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5 % (w/v) และความชื้นของกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาลที่ 1 ต่อ 1 เท่า

4.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งกากถั่วเหลืองที่หมักด้วย *E. faecium* A028

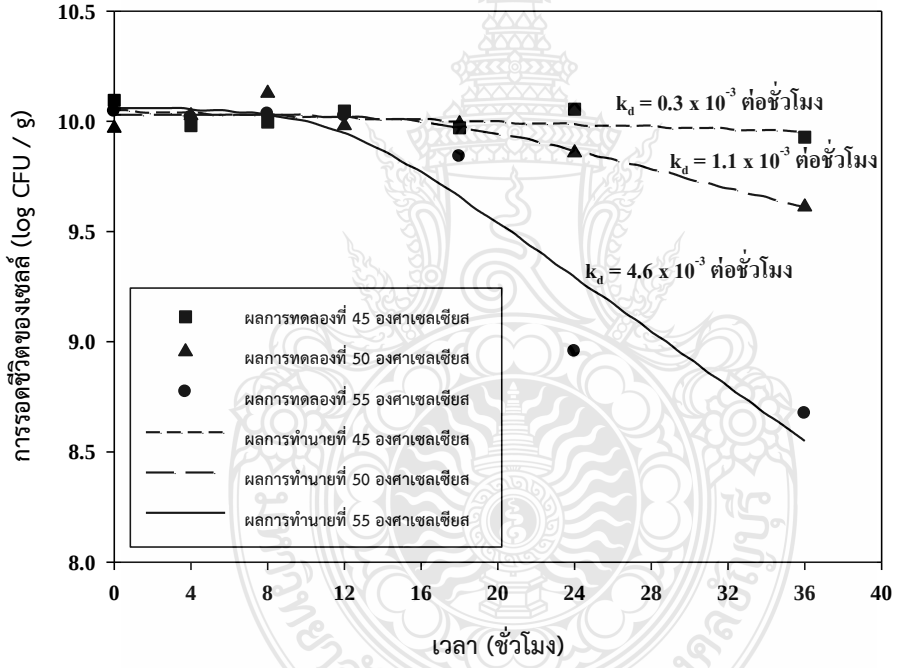
การศึกษาอุณหภูมิของกระบวนการอบแห้งด้วยลมร้อนที่มีผลต่อการลดลงของความชื้นในกากถั่วเหลืองหมักและการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ *E. faecium* A028 ทำโดยนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักแล้วมากระจายไปทั่วถาดและนำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 50 หรือ 55 ^{O}C ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 10 พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์และการลดลงของความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก โดยในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการอบแห้ง ปริมาณความชื้นในกากถั่วเหลืองหมักลดลงประมาณ 10 % ในทุกอุณหภูมิ หลังจากนั้นความชื้นจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยที่อุณหภูมิ 45 ^{O}C ความชื้นลดลงมาเท่ากับ 9.80 % ในเวลา 36 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 50 และ 55 ^{O}C ความชื้นลดลงมาต่ำกว่า 10 % ในเวลา 26 ชั่วโมง และ 22 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในกากถั่วเหลืองหมักที่อบแห้งด้วยอุณหภูมิต่างๆ

การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในระหว่างกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงดังภาพที่ 11 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นของ *E. faecium* A028 มีค่าประมาณ 10 log CFU / g เมื่ออบกากถั่วเหลืองหมักที่อุณหภูมิ 45 ^{O}C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรียรอดชีวิตเท่ากับ 98.34 % ในขณะที่การรอดชีวิตของแบคทีเรียลดลงเป็น 96.41 % และ 86.35 % เมื่ออบแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 55 ^{O}C ที่ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการตายจำเพาะของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 45 50

และ 55 ^{O}C เท่ากับ 0.003 0.022 และ 0.159 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งอัตราการตายจำเพาะของ *E. faecium* A028 เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการอบแห้งเพิ่มขึ้น กระบวนการอบแห้งด้วยลมร้อนเป็นกระบวนการที่ใช้ในการลดความชื้นของวัสดุเปียกทั่วไป [96] โดยผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิและระยะเวลาของกระบวนการอบแห้งมีผลต่ออัตราการอบแห้งของกากถั่วเหลืองหมัก เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งสูงขึ้น อัตราการอบแห้งจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของน้ำเกิดการระเหยสูง และโมเลกุลของน้ำภายในวัสดุจะเคลื่อนที่เร็วขึ้นระยะห่างระหว่างโมเลกุลของน้ำเพิ่มขึ้น เป็นการลดแรงกระทำระหว่างโมเลกุลในทางอ้อม ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิในการอบแห้งจึงทำให้อัตราการลดลงของความชื้นสูงขึ้น [68, 69]



ภาพที่ 11 การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในระหว่างกระบวนการอบแห้ง

อาหารสัตว์ที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันและเพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์ [99] จำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตเริ่มต้นในอาหารสัตว์ควรจะมีอย่างน้อย 6 log CFU / g เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียเดินทางผ่านทางเดินอาหารของสัตว์แบคทีเรียโพรไบโอติกส์จะมีชีวิตลดลง ดังนั้นจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ในอาหารสัตว์ควรมีอย่างเพียงพอเพื่อให้มีชีวิตรอดในทางเดินอาหารสัตว์ได้ [100] ผลการทดลองยังพบว่าอุณหภูมิในการอบแห้งส่งผลต่อการรอดชีวิต

ของ *E. faecium* A028 ในกากถั่วเหลืองหมัก โดย Wirunpan *et al.* [100] รายงานว่าอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการอบแห้งมีบทบาทสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของโพรไบโอติกส์ โดยที่อุณหภูมิสูงเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนในเซลล์โพรไบโอติกส์ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักจะถูกทำลายในระหว่างกระบวนการอบแห้งนี้ [101] ควรใช้เวลาในการอบแห้งน้อยที่สุดเพื่อลดการตายของโพรไบโอติกส์ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายหลังการอบแห้ง ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า *E. faecium* A028 มีชีวิตรอดได้มากกว่า 8.50 log CFU / g หลังจากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 ^{O}C ซึ่งสูงกว่าปริมาณขั้นต่ำที่ควรมีในอาหารสัตว์ในขณะที่อุณหภูมิ 45 และ 50 ^{O}C โพรไบโอติกส์มีการรอดชีวิตที่ 9.93 log CFU / g และ 9.61 log CFU / g ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรใช้ความร้อนในการอบแห้งอย่างเหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียโพรไบโอติกส์รอดชีวิตได้ในระดับที่เหมาะสม

ค่าสัมประสิทธิ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการอบแห้งกากถั่วเหลืองหมักแสดงดังตารางที่ 13 โดยการลดลงของอัตราส่วนความชื้น (*MR*) ถูกเลียนแบบโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการอบแห้งแบบต่างๆ (Lewis, Page, Modified Page, Parabolic, Henderson and Pabis, Logarithmic และ Two-Term) และใช้ค่ามีสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ค่า *SSE RMSE* X^2 และ *EF* ในตารางที่ 14 ในการประเมินประสิทธิภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ โดยแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพดีจะให้ค่า R^2 และ *EF* สูงสุด ในขณะที่ค่า *SSE RMSE* และ X^2 มีค่าต่ำสุด ซึ่งค่าทางสถิติเหล่านี้ใช้ในการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการอธิบายการทดลองของอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 13 ค่าสัมประสิทธิ์การอบแห้งของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกากถั่วเหลืองหมักที่อุณหภูมิอบแห้งต่างๆ

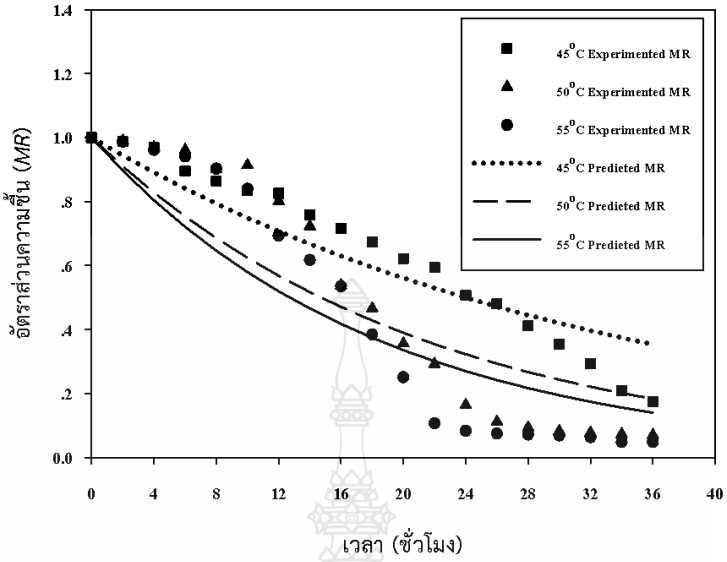
แบบจำลอง	อุณหภูมิ (°C)	พารามิเตอร์				
Lewis	45	k= 0.0288	R^2 = 0.9969			
	50	k= 0.0471	R^2 = 0.9908			
	55	k= 0.0545	R^2 = 0.9919			
Page	45	k= 0.0019	n= 1.8577	R^2 = 0.9996		
	50	k= 0.0003	n= 2.7010	R^2 = 0.9996		
	55	k= 0.0003	n= 2.7826	R^2 = 0.9996		
Modified	45	k= 0.0344	n= 1.8571	R^2 = 0.9996		
Page	50	k= 0.0497	n= 2.6994	R^2 = 0.9996		
	55	k= 0.0554	n= 2.7796	R^2 = 0.9996		
Parabolic	45	a= 1.0057	b= -0.0135	c = -0.0002	R^2 =0.9999	
	50	a= 1.1363	b= -0.0400	c = 0.0002	R^2 =0.9972	
	55	a= 1.1575	b= -0.0512	c = 0.0004	R^2 =0.9972	
Henderson	45	k= 0.0339	a= 1.1100	R^2 = 0.9978		
and Pabis	50	k= 0.0580	a= 1.2221	R^2 = 0.9937		
	55	k= 0.0661	a= 1.2222	R^2 = 0.9943		
Logarithmic	45	a= 21.9385	k= 0.0010	c= -20.8749	R^2 = 0.9995	
	50	a= 4.0780	k= 0.0095	c= -2.9499	R^2 = 0.9972	
	55	a= 2.1522	k= 0.0229	c= -1.0115	R^2 = 0.9969	
Two-Term	45	a= 0.6733	b= 0.4366	k_0= 0.0339	k_1= 0.0339	R^2 = 0.9978
	50	a= 1.1573	b= 0.0647	k_0= 0.0580	k_1= 0.0580	R^2 = 0.9937
	55	a= 0.8722	b= 0.3499	k_0= 0.0661	k_1= 0.0661	R^2 = 0.9943

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การอบแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ

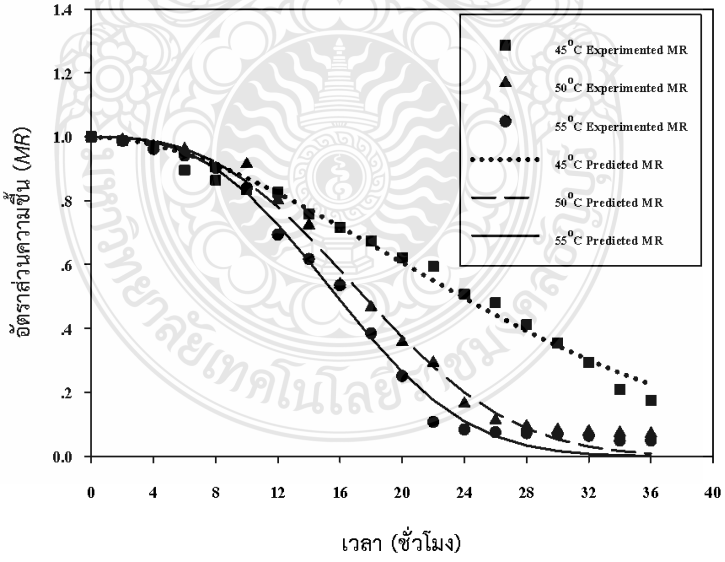
แบบจำลอง	อุณหภูมิ (°C)	*SSE*	*RMSE*	X^2	*EF*
Lewis	45	0.0075	0.0864	0.0070	0.9969
	50	0.0247	0.1572	0.0260	0.9910
	55	0.0241	0.1552	0.0250	0.9920
Page	45	0.0008	0.0292	0.0009	0.9996
	50	0.0011	0.0326	0.0011	0.9996
	55	0.0012	0.0341	0.0012	0.9996
Modified	45	0.0008	0.0292	0.0009	0.9996
Page	50	0.0010	0.0326	0.0011	0.9996
	55	0.0011	0.0341	0.0012	0.9996
Parabolic	45	0.0001	0.0126	0.0001	0.9999
	50	0.0076	0.0872	0.0080	0.9972
	55	0.0085	0.0921	0.0089	0.9972
Henderson	45	0.0053	0.0724	0.0050	0.9978
and Pabis	50	0.0172	0.1312	0.0181	0.9937
	55	0.0171	0.1308	0.0180	0.9943
Logarithmic	45	0.0010	0.0330	0.0011	0.9995
	50	0.0077	0.0878	0.0081	0.9972
	55	0.0091	0.0956	0.0096	0.9969
Two-Term	45	0.0052	0.0724	0.0055	0.9978
	50	0.0172	0.1312	0.0181	0.9937
	55	0.0171	0.1308	0.0180	0.9943

ผลการทดลองพบว่า ค่า R^2 *SSE* *RMSE* X^2 และ *EF* ของแบบจำลองการอบแห้งมีค่าตั้งแต่ 0.9908 ถึง 0.9999 0.0001 ถึง 0.0247 0.0126 ถึง 0.1572 0.0001 ถึง 0.0260 และ 0.9910 ถึง 0.9999 ตามลำดับ (ตารางที่ 13 และ 14) โดยจะเห็นว่าแบบจำลองของ Page และ Modified Page ให้ค่า R^2 และ *EF* สูงสุด และให้ค่า *RMSE* และ X^2 ต่ำสุด แต่เมื่อพิจารณาค่าคงที่ (k) จะเห็นว่าแบบจำลองของ Modified Page มีค่าคงที่ (k) ที่เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการอบแห้งมากขึ้น ในขณะที่แบบจำลองของ

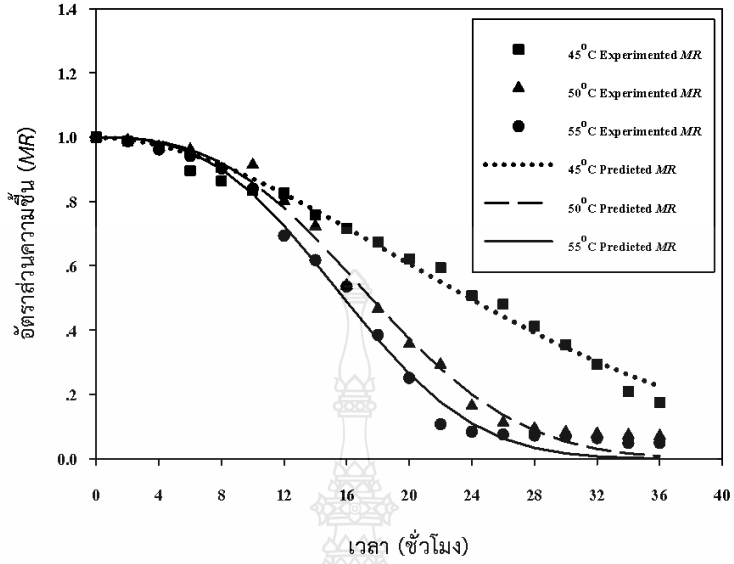
Page ค่าคงที่ (k) ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการอบแห้งแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองของ Modified Page มีความสอดคล้องกับผลการทดลองจริง จึงมีความเหมาะสมในการใช้ในการทำนายและอธิบายการอบแห้งของกากถั่วเหลืองหมัก ซึ่งสอดคล้องกับค่าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในระหว่างกระบวนการอบแห้ง เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศเพิ่มขึ้นที่การอบแห้งอุณหภูมิคงที่ จะส่งผลให้ระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้งผลิตภัณฑ์นานขึ้น เนื่องจากมีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศเพิ่มขึ้นทำให้ระหว่างอัตราส่วนความชื้นของผลิตภัณฑ์และลมร้อนมีความแตกต่างมากขึ้น ส่งผลให้การถ่ายเทมวลของผลิตภัณฑ์ที่อบแห้งนั้นช้าลง จึงต้องใช้เวลาในการอบแห้งนานขึ้นเพื่อระเหยความชื้นออกจากผลิตภัณฑ์ที่ทำการอบแห้ง ในทางกลับกันถ้าเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลให้เวลาในการอบแห้งลดลง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการอบแห้งที่ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศคงที่ เวลาที่ใช้ในการอบแห้งก็จะยิ่งน้อยลงเนื่องจากในช่วงที่อัตราการอบแห้งลดลงจะมีการถ่ายเทความร้อนเกิดขึ้นภายในผลิตภัณฑ์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการอบแห้งจึงส่งผลให้ความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างผลิตภัณฑ์ และลมร้อนที่ใช้ในการอบแห้งมีมากขึ้น ทำให้มีการถ่ายเทความร้อนได้ดีขึ้น [102] โดยการลดลงของอัตราส่วนความชื้นในระหว่างการอบแห้งแสดงดังภาพที่ 12 - 18 จะเห็นว่าแบบจำลองของ Lewis (ภาพที่ 12) Parabolic (ภาพที่ 15) Henderson and Pabis (ภาพที่ 16) Logarithmic (ภาพที่ 17) และ Two-Term (ภาพที่ 18) ที่ได้จากการทำนายไม่สัมพันธ์กับการทดลองจริงเนื่องจากมีค่า R^2 และ *EF* ต่ำกว่าแบบจำลองของ Page และ Modified Page ซึ่งค่า R^2 และ *EF* เป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีความเหมาะสมกับการทดลองจริง และแบบจำลองดังกล่าวข้างต้นยังมีค่า *SSE* *RMSE* และ X^2 สูงกว่าแบบจำลองของ Page และ Modified Page อีกด้วย ซึ่งค่าทางสถิติทั้ง 3 ค่าที่กล่าวมานี้จะต้องมีค่าน้อยที่สุด หรือเข้าใกล้ศูนย์มากที่สุดจึงจะใช้เป็นแบบจำลองที่เหมาะสม สังเกตจากกราฟของการทำนายจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับการทดลองจะเห็นว่าเส้นกราฟจะไปในทิศทางเดียวกันและมีบางช่วงที่เส้นกราฟทับกัน หมายความว่าแบบจำลองนั้นมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทำนายการอบแห้งกากถั่วเหลืองหมักต่อไป ผลการทดลองพบว่าค่า *MR* ที่ได้จากการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Modified Page มีความสอดคล้องกับผลการทดลองจริงมากกว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการอบแห้งแบบอื่นๆ



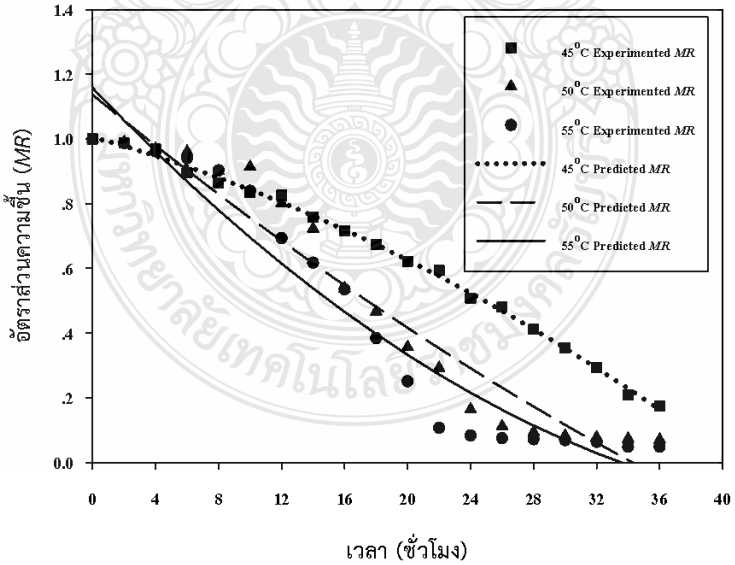
ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Lewis



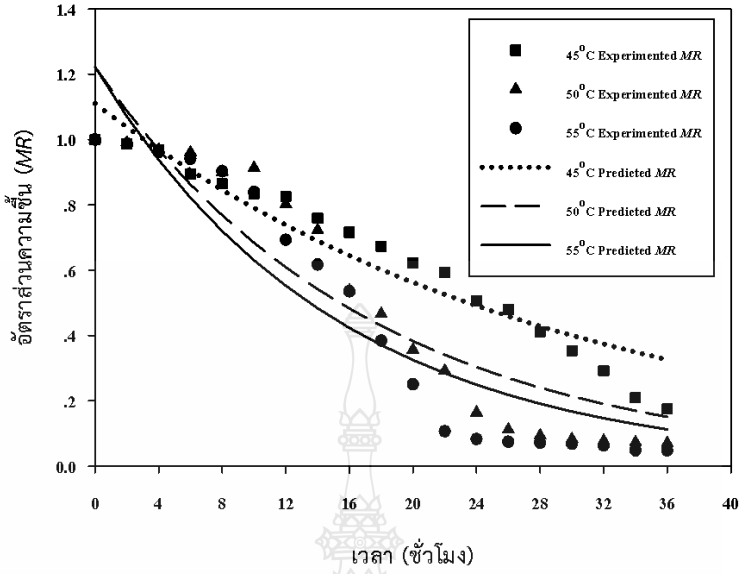
ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Page



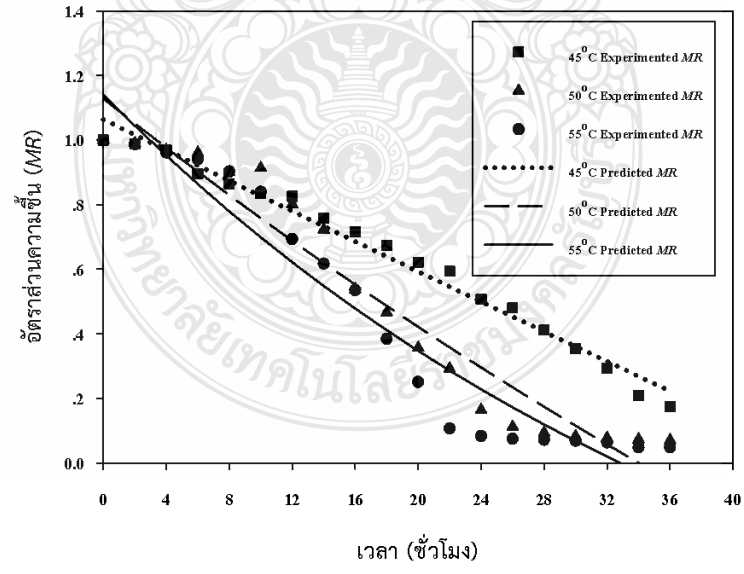
ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Modified Page



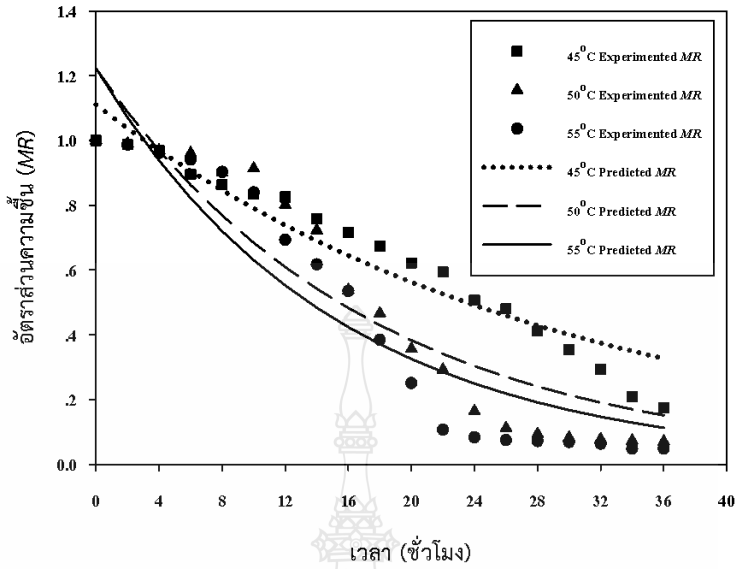
ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Parabolic



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Henderson and Pabis



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Logarithmic



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก และการเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Two-Term

ในงานวิจัยที่ผ่านมามีการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความชื้นของวัสดุที่มีน้ำสูง เช่น ถั่วพิสตาชีโอ [103] โกโก้ [104] และสเปียร์มินต์ [105] เพื่อให้สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการอบแห้งวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ [106] ในการศึกษาครั้งนี้ ค่า *MR* ของการทดลองจริงถูกเลียนแบบด้วยแบบจำลองของ Lewis Page Modified Page Parabolic Henderson and Pabis Logarithmic และ Two-Term โดยมีผลการเลียนแบบที่แตกต่างกันโดยพบว่าแบบจำลองของ Modified Page สามารถเลียนแบบการเปลี่ยนแปลงของค่า *MR* ได้มากที่สุดในทุกอุณหภูมิการอบแห้ง นอกจากนี้แบบจำลองยังอธิบายถึงค่าจลนพลศาสตร์การอบแห้งของกากถั่วเหลืองหมักได้อีกด้วย โดยมีงานวิจัยของ Ruiz *et al.* [107] ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความชื้นในข้าวโพดและธัญพืชที่อุณหภูมิต่างกัน (ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 30 - 80 %) และ Borah *et al.* [81] ยังพบว่าแบบจำลองของ Page เหมาะสมในการเลียนแบบกระบวนการอบแห้งของขมิ้นด้วยเครื่องอบแห้งที่ใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ โดยมีค่า R^2 ของเหง้าขมิ้นเท่ากับ 0.9911 และขมิ้นที่หั่นเป็นชิ้นเท่ากับ 0.9831 และค่า *SSE* เท่ากับ 0.0418 และ 0.0393 ของเหง้าขมิ้นและขมิ้นที่หั่นเป็นชิ้น ตามลำดับ ทำการทดลองที่อุณหภูมิในการอบแห้งอยู่ในช่วง 39 - 51 ^{O}C และมีอุณหภูมิแวดล้อมอยู่ในช่วง 25 - 28 ^{O}C ความชื้นจาก 78.65 % ลดลงเหลือ 6.36 % และ 5.50 % สำหรับตัวอย่างเหง้าขมิ้นและตัวอย่างขมิ้นที่หั่นเป็นชิ้นตามลำดับ ระยะเวลาในการอบแห้ง 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการอบแห้งวัตถุดิบทางการเกษตรอีก

หลายชนิด Bi *et al.* [79] ทำการการอบแห้งแอปเปิ้ลโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการอบแห้ง 4 แบบ ดังนี้ Page Parabolic Henderson and Pabis Modified Page และ Equation-ll ผลการทดลองพบว่าแบบจำลองของ Parabolic เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดในการอบแห้งชิ้นแอปเปิ้ล โดยมีค่า R^2 ระหว่าง 0.9803 และ 0.9933 ค่า *RMSE* ต่ำ ค่า *MBE* และ ค่า X^2 สูง Ceylan *et al.* [108] ทำการอบแห้งผลไม้เขตร้อน เช่น กีวี อะโวคาโด และกล้วยด้วยเครื่องอบแห้งแบบปั๊ม (Heat pump dryer) อุณหภูมิในการอบแห้งอยู่ที่ 40 ^{O}C ความชื้นเริ่มต้นของกีวี อะโวคาโด และกล้วยเท่ากับ 4.31 1.51 และ 4.71 กรัมน้ำต่อกรัมแห้ง เมื่อทำการอบแห้งที่เวลา 6 ชั่วโมงความชื้นสุดท้ายอยู่ที่ 0.75 0.35 และ 0.50 กรัมน้ำต่อกรัมแห้ง โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 6 แบบ ดังนี้ Newton Page Modified Page Henderson and Pabis Logarithmic model และ Wang and Singh พบว่าสมการของ Page ให้ค่า R^2 ที่ดีที่สุดสำหรับการอบแห้งอะโวคาโด มีค่าเท่ากับ 0.99982 และสมการของ Page ยังให้ค่า R^2 ที่ดีที่สุดในการอบแห้งกีวีและกล้วย และค่า *SEE* ต่ำสุด Hazbavi *et al.* [109] ทำการอบแห้งชิ้นแครอทที่กำลังไฟฟ้า 200 300 400 และ 500 W โดยความหนาของตัวอย่างอยู่ที่ 5 mm ทำการอบแห้งในเครื่องอบไมโครเวฟ เมื่อเพิ่มกำลังการอบแห้งจาก 200 - 500 W ระยะเวลาในการอบแห้งมีแนวโน้มที่ลดลงจาก 17.5 เป็น 9.5 นาที กระบวนการอบแห้งเกิดขึ้นในช่วงของเวลาที่ลดลง ผลการทดลองพบว่าแบบจำลองของ Midilli เป็นแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพฤติกรรมการอบแห้งของชิ้นแครอทหั่นบาง ๆ จากกำลังความร้อนที่ 200 300 400 และ 500 W มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 0.9999 0.9982 และ 0.9999 ตามลำดับ มีค่า *RMSE* เท่ากับ 0.0054 0.0094 0.0246 และ 0.0064 และค่า X^2 0.00003 0.0001 0.0007 และ 0.0001 ตามลำดับ Rahman *et al.* [98] ศึกษาจลนพลศาสตร์การอบแห้งเงาะ เนื่องจากเงาะเป็นผลไม้ตามฤดูกาลที่มีอายุการเก็บรักษาสั้น ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบของอุณหภูมิในการอบแห้งเงาะที่อุณหภูมิ 40 50 60 70 และ 80 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 5 แบบ ดังนี้ Lewis Page Handerson and Pabis Logarithmic และ Two - Term ค่าที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้งหมด คือ R^2 X^2 *SEE* และ *RMSE* ผลการทดลองพบว่า แบบจำลองของ Logarithmic เหมาะสมที่สุด Ashtiani *et al.* [110] ทำการวิเคราะห์ลักษณะการอบแห้งใบสะระแหน่และสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วยการอบแห้งด้วยลมร้อนร้อนและอินฟราเรด เพื่อหาวิธีการอบแห้งที่ดีที่สุด โดยใช้วิธีการอบแห้ง 2 วิธี คือ การอบแห้งด้วยลมร้อนและอินฟราเรด โดยการอบแห้งด้วยลมร้อนอุณหภูมิ 30 40 และ 50 ^{O}C และอินฟราเรดกำลังไฟฟ้า 1500 3000 และ 4500 W ในการทดลองนี้ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 3 แบบ คือ Lewis

Logarithmic และ Midilli เพื่ออธิบายการอบแห้งของใบสะระแหน่จากค่า X^2 *RMSE* และ R^2 พบว่า Logarithmic เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับการอบแห้งด้วยลมร้อนและแบบจำลอง Midilli สำหรับการอบแห้งแบบอินฟราเรด Elmizadeh *et al.* [111] เปรียบเทียบการอบแห้งของชิ้นควินซ์ (เป็นผลไม้ในประเทศแถบยุโรป รูปร่างคล้ายลูกแพร์หรือกีวี่ ผลเป็นสีเหลือง) ด้วยกระบวนการอบแห้งร่วมกับสนามไฟฟ้าและการอบแห้งด้วยลมร้อน การอบแห้งร่วมกับสนามไฟฟ้าเป็นวิธีใหม่ของการอบแห้งที่มีการใช้พลังงานต่ำซึ่งเป็นที่สนใจในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา ในการทดลองนี้ใช้แรงดันไฟฟ้าเท่ากับ 5 7 และ 9 kV และการอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 60 และ 70 ^{O}C จากการทดลองการอบแห้งด้วยลมร้อนเร็วกว่าการอบแห้งร่วมกับสนามไฟฟ้า ซึ่งการอบแห้งร่วมกับสนามไฟฟ้าใช้เวลาเป็น 2.05 เท่าของการอบแห้งด้วยลมร้อน Park *et al.* [112] ศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพของผงกิมจิที่ผลิตโดยการอบแห้งด้วยลมร้อนและแช่เยือกแข็ง มีการอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 60 และ 65 ^{O}C และแช่เยือกแข็งจนได้ความชื้นประมาณ 10 % ดัชนีการดูดซึมน้ำ (WAI) และดัชนีละลายน้ำ (WSI) ของผงกิมจิแห้งที่แช่เยือกแข็งมีค่าสูงกว่าผงกิมจิที่อบแห้งด้วยลมร้อน นอกจากนี้ค่าทางสถิติ *L* *a* และ *b* ของผงกิมจิที่อบแห้งด้วยลมร้อนมีค่าต่ำกว่าผงกิมจิที่แช่เยือกแข็ง ในระหว่างการอบแห้งด้วยลมร้อนการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการอบแห้ง การเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลสูงสุดพบในตัวอย่างที่แห้งที่อุณหภูมิ 65 ^{O}C โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Leuconostoc mesenteroides* และ *L. sakei* การอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งแสดงการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลต่ำกว่าการอบแห้งด้วยลมร้อน ในการประเมินทางประสาทสัมผัสพบว่าผงกิมจิที่ทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็งมีการยอมรับมากกว่าผงกิมจิที่อบแห้งด้วยลมร้อน ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งเหมาะสำหรับทำแห้งกิมจิผงเนื่องจากมีคุณภาพสูงกว่าการอบแห้งด้วยลมร้อน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์จากลำไส้และตับไก่สุขภาพดี พบว่ามีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น LAB มี 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต A028 A040 และ A046 ที่แยกจากลำไส้ไก่ และไอโซเลต B015 และ B020 ที่แยกจากตับไก่ เมื่อนำ LAB ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์ พบว่า LAB ไอโซเลตที่แยกจากลำไส้ไก่มีความสามารถในการรอดชีวิตและทนต่อสภาวะกรดจำลองในระบบทางเดินอาหารได้ โดยสามารถทนต่อความเป็นกรดที่พีเอช 2.5 3.0 และ 3.5 และมีเอนไซม์เปปซิน 3 mg / mL ได้ ซึ่งไอโซเลต A028 และ A046 สามารถรอดชีวิตได้ที่พีเอช 2.5 เท่ากับ 5.372 และ 5.146 log CFU / mL ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 65.97 และ 63.23 ตามลำดับ ในขณะที่ ไอโซเลต A040 B015 และ B020 ไม่สามารถรอดชีวิตได้ เมื่อนำ LAB ทั้ง 5 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการทนต่อด่างที่พีเอช 8 และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3 0.6 และ 1.0 % (w/v) พบว่าไอโซเลต B015 และ B020 รอดชีวิตที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (1.0 %) เท่ากับ 7.672 และ 7.107 log CFU / mL คิดเป็นร้อยละ 95.10 และ 86.87 ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต A028 A040 และ A046 ที่คัดแยกจากลำไส้มีการรอดชีวิตเท่ากับ 6.235 5.698 และ 5.875 log CFU / mL คิดเป็นร้อยละ 77.11 69.39 และ 72.95 ตามลำดับ ผลการทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถย่อยโปรตีนได้แต่ไม่สามารถย่อยไขมันและแป้งได้ นอกนั้นยังพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ penicillin V tetracycline และ chloramphenicol ได้โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC มากกว่า 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าไอโซเลต A028 และ B015 สามารถยับยั้ง *S. typhimurium E. coli S. aureus* และ *Aeromonas sp.* ในขณะที่ไอโซเลต A040 A046 และ B020 ไม่สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้ จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกส์พบว่าไอโซเลต A028 มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์มากที่สุดจึงคัดเลือก A028 (*E. faecium*) มาใช้ในการเพาะเลี้ยงในกากถั่วเหลือง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 แบบแห้งด้วยกากถั่วเหลือง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *E. faecium* A028 คือความเข้มข้นของกากน้ำตาล และอัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อสารละลายกากน้ำตาลเท่ากับ 5 % และ 1 ต่อ 1 ตามลำดับ โดยมีจำนวน LAB A028 เท่ากับ 9.820 log CFU / g

การอบแห้งกากถั่วเหลืองหมักด้วยตู้อบลมร้อน พบว่าอุณหภูมิในการอบแห้งมีผลต่อการลดลงของความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก เมื่ออุณหภูมิในการอบแห้งเพิ่มขึ้นความชื้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว และการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ที่อุณหภูมิ 45 50 และ 55 ^{O}C เท่ากับ 98.345 96.408 และ 86.360 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการอบแห้ง พบว่าแบบจำลองของ Page และ Modified Page ทั้ง 2 สมการมีความเหมาะสมในการเลียนแบบการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนความชื้นของกากถั่วเหลืองหมัก เนื่องจากให้ค่า R^2 (0.9996) และ *EF* สูงสุด และค่า *SSE* *RMSE* และ X^2 ต่ำสุด แต่เมื่อพิจารณาจากค่า k แล้วจะเห็นว่าแบบจำลองของ Page มีค่า k เท่ากับ 0.0019 0.0003 0.0003 ที่อุณหภูมิในการอบแห้ง 45 50 และ 55 ^{O}C ตามลำดับ และแบบจำลองของ Modified Page มีค่า k เท่ากับ 0.0344 0.0497 และ 0.0554 ที่อุณหภูมิในการอบแห้ง 45 50 และ 55 ^{O}C ตามลำดับ จึงเลือกแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Modified Page เนื่องจากค่า k มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการอบแห้งเพิ่มขึ้น หรือมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับอุณหภูมิมากกว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Page

บรรณานุกรม

[1] L. Sabikhi, R. Babu, D. K. Thompkinson and S. Kapila, "Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 3, no. 4, pp. 586–593, Aug. 2010.

[2] S. Pithva, S. Shekh, J. Dave and B. R. M. Vyas, "Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 173, no. 1, pp. 259–277, May 2014.

[3] Y. Wang, H. Zhang, L. Zhang, W. Liu, Y. Zhang, X. Zhang and T. Sun, "In vitro assessment of probiotic properties of *Bacillus* isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1369–1377, Aug. 2010.

[4] J. J. Ahire, K. P. Patil, B. L. Chaudhari and S. B. Chincholkar, "*Bacillus* spp. of human origin: a potential siderophoregenic probiotic bacteria," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 164, no. 3, pp. 386–400, Jun. 2011.

[5] W. H. Holzapfel, P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth and U. Schillinger, "Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, no. 2, p. 365s–373s, 2001.

[6] บุษกร อุตรภิชาติ, "มารู้จัก "แบคทีเรียกรดแลคติก" กันเถอะ," *วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ*, ปีที่ 2, ฉบับที่ 2, 2548.

[7] ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, "การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล," *การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร,* ครั้งที่ 1, 2555.

[8] ชนกันต์ จิตมนัส, "โรคปลานิล," *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร*, ปีที่ 11, ฉบับที่ 1, หน้า 75-86, 2556.

[9] เบญจพร สัมฤทธิเวช ปวีณา ทวีกิจการ ชลดา มีอนันต์ และเต็มดวง สมศิริ, "การรักษาโรค epitheliocystis ในลูกปลานิล," *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47*, หน้า 1-8, 17-20 มีนาคม, 2552.

[10] แก้วตา ลิ้มเฮง, "การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคขี้ขาวในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี," *แก่นเกษตร 43*, ฉบับพิเศษ 1, หน้า 581-587, 2558.

[11] S.M.L. Kabir, “The role of probiotics in the poultry industry,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, no. 8, pp. 3531–3546, Aug. 2009.

[12] L. Axelsson, “Lactic acid bacteria : Classification and physiology,” Marcel Dekker, New York, pp. 1–64, 1998.

[13] B.J. Wood and W.H. Holzapfel, “The Genera of Lactic Acid Bacteria,” *Chapman & Hall,* London , Melbourne, 1995.

[14] J.G. Holt, N.R. Kreig, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams, “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 9 th ed,” . *Williams & Wilkins . A Waverly Co. Baltimore,* London, 1994.

[15] สุภัจฉรา นพจินดา, “โพรไบโอติกส์กับการส่งเสริมสุขภาพ,” *วารสารพยาบาลทหารบก*, ปีที่ 15, ฉบับที่ 3, หน้า 430-435, กันยายน-ธันวาคม, 2557.

[16] S. Nimrat, P. Tanutpongpalin, K. Sritunyalucksana, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, “Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics,” *Aquac. Int.*, vol. 21, no. 3, pp. 655–666, Jun. 2013.

[17] C. Seenivasan, S. Radhakrishnan, T. Muralisankar and P. Saravana Bhavan, “Effects of probiotics on survival, growth and digestive enzymes activities in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879),” *Proc. Zool. Soc.*, vol. 69, no. 1, pp. 52–60, Jun. 2016.

[18] H. Dong, Y. Su, Y. Mao, X. You, S. Ding and J. Wang, “Dietary supplementation with *Bacillus* can improve the growth and survival of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* in high-temperature environments,” *Aquac. Int.*, vol. 22, no. 2, pp. 607–617, Apr. 2014.

[19] R.G. Aswathy, B. Ismail, R.P. John and K.M. Nampoothiri, “Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 151, no. 2–3, pp. 244–255, Dec. 2008.

[20] C.C. Lazado, C.M.A. Caipang, B. Rajan, M.F. Brinchmann and V. Kiron, “Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of atlantic cod,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 2, no. 2, pp. 126–134, Jun. 2010.

[21] G. Alp and B. Aslim, “Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk,” *Anaerobe*, vol. 16, no. 2, pp. 101–105, Apr. 2010.

[22] M.G. Sica, L.I. Brugnoni, P.L. Marucci and M.A. Cubitto, “Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum) farming,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 101, no. 4, pp. 869–879, May 2012.

[23] H. Musikasang, A. Tani, A. H-kittikun and S. Maneerat, “Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 8, pp. 1337–1345, Aug. 2009.

[24] S. Sathyabama, R. Vijayabharathi, P. Bruntha devi, M. Ranjith kumar and V. B. Priyadarisini, “Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups,” *J. Microbiol.*, vol. 50, no. 4, pp. 603–612, Aug. 2012.

[25] N. Shazali1, H.L. Foo, T.C. Loh, D.W. Choe and R.A. Rahim, “Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia,” *Bio Med Central*, vol. 6, no. 1, pp. 1-7 2014.

[26] Z.N. Yuksekdag, N. Sahin and B. Aslim, “In vitro evaluation of the suitability potential probiotic of lactobacilli isolates from the gastrointestinal tract of chicken,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 239, no. 2, pp. 313–320, Aug. 2014.

[27] S.B. Gu, L.N. Zhao, Y. Wu, S.C. Li, J.R. Sun, J.F. Huang and D.D. Li, “Potential probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 isolated from healthy piglet feces,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 6, pp. 851–863, Jun. 2015.

[28] คมแข พิลาสมบัติ นวลพรรณ งามยี่สุ่น และอดิศร เสาวภาวิวัฒน์, “การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่,” *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า,* ปีที่ 28, ฉบับที่ 2, หน้า 19-28, 2553.

[29] อุดมลักษณ์ สมพงษ์, “ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรคติดเชื้อ ในปลานิล (Nile tilapia: *Oreochromis niloticus*),” รายงานผลการวิจัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2556.

[30] C. Seenivasan, S. Radhakrishnan, R. Shanthi, T. Muralisankar and P.S. Bhavan, "Influence of probiotics on survival, growth, biochemical changes and energy utilization performance of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae," *Proc. Zool. Soc.*, vol. 68, no. 1, pp. 74–83, Jun. 2015.

[31] P. Pospíšková, G. Zorníková, M. Kolářová, Z. Sládek, T. Komprda and J. Geršiová, "Effect of probiotics in the pig nutrition on the pathogenic bacteria counts in the gut," *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.*, vol. 61, no. 6, pp. 1839–1843, 2013.

[32] S.N. Bybee, A.V. Scorza and M.R. Lappin, "Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter: probiotics and diarrhea," *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 25, no. 4, pp. 856–860, Jul. 2011.

[33] S.H.A. Hafsa, A. Mendonca, B. Brehm-Stecher, A.A. Hassan and S.A. Ibrahim, "Probiotic potential and antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* Isolated from Chicken Caecal and Fecal Samples," *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.*, vol. 9, no. 4, p. 350, 2015.

[34] M.P. Simonová, A. Lauková, L. Chrastinová, V. Strompfová, Š. Faix, Z. Vasilková, L. Ondruška, R. Jurcík and J. Rafay, "*Enterococcus faecium* CCM7420, bacteriocin PPB CCM7420 and their effect in the digestive tract of rabbits," *Czech J Anim Sci*, vol. 54, pp. 376–386, 2009.

[35] G. Divyashri, G. Krishna, Muralidhara and S.G. Prapulla, "Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: *in vitro* and *in vivo* evidence," *J. Med. Microbiol.*, vol. 64, no. 12, pp. 1527–1540, Dec. 2015.

[36] H. Ghomrassi, O.B. Braiek, Y. Choiset, T. Haertlé, K. Hani, J.M. Chobert and T. Ghrairi, "Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic gram-negative bacteria," *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 118, no. 1, pp. 31–43, Feb. 2016.

[37] M. Sarra, G. Taoufik, L.C. Patrick, B. Benjamin, F. Yannick and H. Khaled, "Isolation and characterization of Enterococci bacteriocinic strains from Tunisian fish viscera," *Food Nutr. Sci.*, vol. 04, no. 06, pp. 701–708, 2013.

[38] J. Barbosa, S. Borges and P. Teixeira, "Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 191, no. Supplement C, pp. 144–148, Nov. 2014.

[39] N. Ünal, S. Askar and M. Yildirim, "Antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from broiler cloacal samples," *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, vol. 41, pp. 199–203, 2017.

[40] N. Lertworapreecha, K. Poonsuk and T. Chalermchiakit, "Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the *in vitro* properties," *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 1, 2011.

[41] K. Saelim, N. Sohsomboon, S. Kaewsuwan and S. Maneerat, "Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci *in vitro*," *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 57, no. 11, pp. 529–539, 2012.

[42] M. Marcináková, M. Simonová and A. Lauková, "Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage," *Acta Vet. Brno*, vol. 73, no. 4, pp. 513–519, 2004.

[43] J.A. Renye, G.A. Somkuti, M. Paul and D.L. Van Hekken, "Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, no. 2, pp. 261–268, Feb. 2009.

[44] S. Yasar and M. A. Akıncı, "Efficacy of a feed probiotic bacteria (*Enterococcus faecium* NCIMB 10415), spore (*Bacillus subtilis* ATCC PTA-6737) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in Japanese quails," *Bull. UASVM*, vol. 71, no. 1, pp. 63–70, 2014.

[45] Y.J. Chen, B.J. Min, J.H. Cho, O.S. Kwon, K.S. Son, I.H. Kim and S. J. Kim, "Effects of dietary *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and faecal noxious gas content in finishing pigs," *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, vol. 19, no. 3, p. 406, 2006.

[46] J.A.V. Costa, H. Treichel, V. Kumar and A. Pandey, "Advances in solid-state fermentation," *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, pp. 1–17, 2018.

[47] S.S. Behera and R.C. Ray, "Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 86, pp. 656–669, May 2016.

[48] L. Thomas, C. Larroche and A. Pandey, "Current developments in solid-state fermentation," *Biochem. Eng. J.*, vol. 81, pp. 146–161, Dec. 2013.

[49] M.A. Ganaie, H. Soni, G.A. Naikoo, L.T.S. Oliveira, H.K. Rawat, P.K. Mehta and N. Narain "Screening of low cost agricultural wastes to maximize the fructosyltransferase production and its applicability in generation of fructooligosaccharides by solid state fermentation," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 118, pp. 19–26, Mar. 2017.

[50] A.A. Salim, S. Grbavcic, N. Šekuljica, A. Stefanovic, S.J. Tanaskovic, N. Lukovic and Z. Knezevic-Jugovic "Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods," *Bioresour. Technol.*, vol. 228, pp. 193–200, Mar. 2017.

[51] R.D. Divate, C.C. Wang, S.T. Chou, C.T. Chang, P.M. Wang, and Y.C. Chung, "Using wheat bran and soybean meal as solid state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 70, pp. 127–133, Jan. 2017.

[52] S. Gupta, M. Kapoor, K.K. Sharma, L.M. Nair and R.C. Kuhad, "Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 5, pp. 937–945, Mar. 2008.

[53] A.K. Mukherjee, H. Adhikari and S.K. Rai, "Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation," *Biochem. Eng. J.*, vol. 39, no. 2, pp. 353–361, Apr. 2008.

[54] A. Alfonzo, V. Urso, O. Corona, N. Francesca, G. Amato, L. Settanni and G.D. Miceli, "Development of a method for the direct fermentation of semolina by selected sourdough lactic acid bacteria," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 239, pp. 65–78, Dec. 2016.

[55] P. Li, W. Lin, X. Liu, X. Wang, X. Gan, L. Luo and W.T. Lin, "Effect of bioaugmented inoculation on microbiota dynamics during solid-state fermentation of Daqu starter using autochthonous of *Bacillus* , *Pediococcus* , *Wickerhamomyces* and *Saccharomycopsis*," *Food Microbiol.*, vol. 61, pp. 83–92, Feb. 2017.

[56] S. Nalini, R. Parthasarathi and V. Prabudoss, "Production and characterization of lipopeptide from *Bacillus cereus* SNAU01 under solid state fermentation and its potential application as anti-biofilm agent," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 5, pp. 123–132, Jan. 2016.

[57] N.I. Canabarro, C. Alessio, E.L. Foletto, R.C. Kuhn, W.L. Priamo and M.A. Mazutti, “Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor,” *Renew. Energy*, vol. 102, pp. 9–14, Mar. 2017.

[58] วิเชียร ดวงสีเสน, “การศึกษาการอบแห้งกากมันสาปะหลังโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบตะแกรงหมุน,” วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิศวกรรมเกษตรและอาหาร), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา, 2555.

[59] S. Tirawanichakul1, S. Lamaepae, Y. Tirawanichakul, “Combined infrared/microwave and hot air drying for jackfruit: kinetics, quality and sensory analysis,” *Burapha Sci. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 117-129, 2012.

[60] A. Nadee, Y. Tirawanichakul and S. Tirawanichakul, “Drying kinetics of pandanus leaf by infrared radiation combine hot air and hot air,” *Burapha Sci. J.*, vol. 17, no. 2, pp. 86-94, 2012.

[61] S. Tirawanichakul, S. Chanchiew and Y.Tirawanichakul, “Pennywort drying using infrared radiation: drying kinetics, energy consumption and quality aspect,” *KKU Res. J.*, vol. 18, no. 2, pp. 311-324, 2013.

[62] N. Phosee, P. Khongbutr, K. Uttamating and R. Assawarachan, “Effect of temperature on moisture ratio and color changes of mint leaves during hot air drying process,” *RMUTSB Acad. J.*, vol. 1, no. 2, pp. 103-114 , 2013.

[63] C. Stefanello, S.L. Vieira, H.V. Rios, C.T. Simões and J.O.B. Sorbara, “Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 221, pp. 267–273, Nov. 2016.

[64] Y. Wang, X.T. Liu, H.L. Wang, D.F. Li, X.S. Piao and W.Q. Lu, “Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digestibility of weanling pigs,” *Livest. Sci.*, vol. 170, pp. 91–99, Dec. 2014.

[65] T. Kumhom, A. Elkamel, P.L. Douglas, S. Douglas, S. Pongamphai and W. Teppaitoon, “Prediction of isoflavone extraction from soybean meal using supercritical carbon dioxide with cosolvents,” *Chem. Eng. J.*, vol. 172, no. 2–3, pp. 1023–1032, Aug. 2011.

[66] C.Y. Li, J.J. Lu, C.P. Wu and T.F. Lien, “Effects of probiotics and bremelain fermented soybean meal replacing fish meal on growth performance, nutrient retention and carcass traits of broilers,” *Livest. Sci.*, vol. 163, pp. 94–101, May 2014.

[67] P. García-Rebollar, L. Cámara, R.P. Lázaro, C. Dapoza, R. Pérez-Maldonado and G.G. Mateos, "Influence of the origin of the beans on the chemical composition and nutritive value of commercial soybean meals," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 221, pp. 245–261, Nov. 2016.

[68] J. Tian, K. Wang, X. Wang, H. Wen, H. Zhou, C. Liu, K. Mai and G. He, "Soybean saponin modulates nutrient sensing pathways and metabolism in zebrafish," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 257, pp. 246–254, Feb. 2018.

[69] Leo V. Curtin, "Molasses-general-considerations," *National Feed Ingredients Association,* West Des Moines*,* Iowa, 1983.

[70] M.L. Chiang, H.C. Chen, K.N. Chen, Y.C. Lin, Y.T. Lin and M.J. Chen, "Optimizing production of two potential probiotic Lactobacilli strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets," *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, vol. 28, no. 8, pp. 1163–1170, Apr. 2015.

[71] C. Cristina and S. Andreea, "Study on probiotic ice cream," *Bull. UASVM Food Sci. Technol.*, vol. 70, no. 1, pp. 38-44, 2013.

[72] อภิเชษฐ หมื่นอร่าม วิเชียร ลีลาวัชรมาศ และ ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์, "ผลของกากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติก, " การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49, หน้า 148-155, 1-4 กุมภาพันธ์, 2554.

[73] K. Ni, F. Wang, B. Zhu, J. Yang, G. Zhou, Y. Pan, Y. Tao and J. Zhong, "Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage," *Bioresour. Technol.*, vol. 238, pp. 706–715, Aug. 2017.

[74] M.C. Audisio, G. Oliver and M.C. Apella, "Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 63, no. 3, pp. 235–241, 2001.

[75] J. Wang, L. Chen, X.J. Yuan, G. Guo, J.F. Li, Y.F. Bai and T. Shao, "Effects of molasses on the fermentation characteristics of mixed silage prepared with rice straw, local vegetable by-products and alfalfa in Southeast China," *J. Integr. Agric.*, vol. 16, no. 3, pp. 664–670, Mar. 2017.

[76] หทัยรัตน์ มุสิกสังข์, “การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม,” วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา, 2551.

[77] J. Michael and J. Pelezar, “Hydrolysis of polysaccharide , protein and lipid.,” *Laboratory Exercises in Microbiology*, vol. 1995, pp. 126–188.

[78] S. Mitidieri, A.H. Souza Martinelli, A. Schrank and M.H. Vainstein, “Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations,” *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 10, pp. 1217–1224, Jul. 2006.

[79] J. Bi, A. Yang, X. Liu, X. Wu, Q. Chen, Q. Wang, J. Lv and X. Wang, “Effects of pretreatments on explosion puffing drying kinetics of apple chips,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 60, no. 2, Part 2, pp. 1136–1142, Mar. 2015.

[80] I. Doymaz and M. Pala, “The effects of dipping pretreatments on air-drying rates of the seedless grapes,” *J. Food Eng.*, vol. 52, no. 4, pp. 413–417, May 2002.

[81] A. Borah, K. Hazarika and S.M. Khayer, “Drying kinetics of whole and sliced turmeric rhizomes (*Curcuma longa* L.) in a solar conduction dryer,” *Inf. Process. Agric.*, vol. 2, no. 2, pp. 85–92, Sep. 2015.

[82] A. Rodríguez de Olmos, M.A. Correa Deza and M.S. Garro, “Selected Lactobacilli and bifidobacteria development in solid state fermentation using soybean paste,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 49, no. 1, pp. 62–69, Jan. 2017.

[83] T. Inanan, N. Tüzmen and F. Karipcin, “Oxime-functionalized cryogel disks for catalase immobilization,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 812–820, Jul. 2018.

[84] M. Soares dos Santos Pozza, L. Helena da Silva Miglioranza, J.E. Garcia, S.Garcia and P. C.Pozza, “Human gastrointestinal tract resistance of *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces,” *Ciências Agrárias, Londrina*, vol. 2011, pp. 1021–1032.

[85] R.P.K. Sahadeva, S.F. Leong, K.H Chua, C.H. Tan, H.Y. Chan, E.V. Tong, S.Y.W. Wong and H.K. Chan, “Survival of commercial probiotic strains to pH and bile,” *Int. Food Res. J.*, vol. 18, no. 4, pp. 1515-1522, 2011.

[86] H. Boke, B. Aslim and G. Alp, “The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria,” *Arch. Biol. Sci.*, vol. 62, no. 2, pp. 323–328, 2010.

[87] ภณิดา เกื้อสุวรรณ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ดวงพร คันธโชติ, “การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง,” *Graduate research conference*, 2014.

[88] ณัฐธิดา สุขสาย, ณัฐพร รัฐบารุง, พักตร์วิภา สุวรรณพรหม และ หทัยกาญจน์ เชาวนพูนผล, “การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์: กรณีศึกษาจังหวัดเชียงใหม่,” *วารสารเภสัชกรรมไทย*, ปีที่ 8 ฉบับที่ 2, 2559.

[89] X.H. Guo, J.M. Kim, H.M. Nam, S.Y. Park and J.M. Kim, “Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties,” *Anaerobe*, vol. 16, no. 4, pp. 321–326, Aug. 2010.

[90] A. Mezaini and A.D. Bouras, “Antibacterial activity and probiotic properties of some lactic acid bacteria isolated from dairy products,” *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 12, no. 20, 2013.

[91] B. Thankappan, D. Ramesh, S. Ramkumar, K. Natarajaseenivasan and K. Anbarasu, “Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita*-towards to identify novel probiotics against fish pathogens,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 175, no. 1, pp. 340–353, Jan. 2015.

[92] W. Sirichokchatchawan, P. Pupa, P. Praechansri, N. Am-In, S. Tanasupawat, P. Sonthayanon and N. Prapasarakul, “Autochthonous lactic acid bacteria isolated from pig faeces in Thailand show probiotic properties and antibacterial activity against enteric pathogenic bacteria,” *Microb. Pathog.*, vol. 119, pp. 208–215, Jun. 2018.

[93] J. Zuo, J. Zhan, C. Luo, B. Dong, F. Xing and D. Chen, “Characteristics and release property of polylactic acid/sodium monofluorophosphate microcapsules prepared by spray drying,” *Adv. Powder Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 2805–2811, Nov. 2017.

[94] A. Rodríguez de Olmos, E. Bru and M. S. Garro, “Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 196, no. Supplement C, pp. 16–23, Mar. 2015.

[95] B.K. Lonsane, N.P. Ghildyal, S. Budiatman, S.V. Ramakrishna, “Engineering aspects of solid state fermentation.,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 1985, no. 7, pp. 258–256.

[96] S.K. Chin, E.S. Siew and W.L. Soon, “Drying characteristics and quality evaluation of kiwi slices under hot air natural convective drying method.,” *Int. Food Res. J.*, vol. 22, no. 6, 2015.

[97] A. Jamali, M. Kouhila, L.A. Mohamed, A. Idlimam and A. Lamharrar, “Moisture adsorption–desorption isotherms of Citrus reticulata leaves at three temperatures,” *J. Food Eng.*, vol. 77, no. 1, pp. 71–78, Nov. 2006.

[98] S.N.F.S.A. Rahman, R. Wahid and N. A. Rahman, “Drying kinetics of nephelium lappaceum (rambutan) in a drying oven,” *Procedia - Soc. Behav. Sci.*, vol. 195, no. Supplement C, pp. 2734–2741, Jul. 2015.

[99] H.H. Musa, S.L. Wu, C.H. Zhu, H.I. Seri and G.Q. Zhu, “The potential benefits of probiotics in animal production and health,” *J Anim Vet Adv*, vol. 8, no. 2, pp. 313–321, 2009.

[100] M. Wirunpan, W. Savedboworn and P. Wanchaitanawong, “Survival and shelf life of *Lactobacillus lactis* 1464 in shrimp feed pellet after fluidized bed drying,” *Agric. Nat. Resour.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2016.

[101] E. Ananta, M. Volkert and D. Knorr, “Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG,” *Int. Dairy J.*, vol. 15, no. 4, pp. 399–409, Apr. 2005.

[102] พลรัชต์ บุญมี, “จลนพลศาสตร์การอบแห้งเนื้อสับปะรดแว่น,” วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิศวกรรมเครื่องกล), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2551.

[103] A. Midilli and H. Kucuk, “Mathematical modeling of thin layer drying of pistachio by using solar energy,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 44, no. 7, pp. 1111–1122, May 2003.

[104] C.L. Hii, C.L. Law and M. Cloke, “Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa,” *J. Food Eng.*, vol. 90, no. 2, pp. 191–198, Jan. 2009.

[105] M. Ayadi, S.B. Mabrouk, I. Zouari and A. Bellagi, “Kinetic study of the convective drying of spearmint,” *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2014.

[106] M. Danish, H. Jing, Z. Pin, L. Ziyang and Q. Pansheng, “A new drying kinetic model for sewage sludge drying in presence of CaO and NaClO,” *Appl. Therm. Eng.*, vol. 106, no. Supplement C, pp. 141–152, Aug. 2016.

[107] R.S. Ruiz, M.G. Vizcarra and C. Martínez, “Hydration of grain kernels and its effect on drying,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 7, pp. 1310–1316, Sep. 2008.

[108] I. Ceylan , M. Aktas and H. Dogan, “Mathematical modeling of drying characteristics of tropical fruits,” *Applied Thermal Engineering*, vol. 2007, no. 27, pp. 1931–1936.

[109] I. Hazbavi, S.H. Samadi and H. Khafaje, “Using of semi-empirical models and fick’s second low for mathematical modeling of mass transfer in thin layer drying of carrot slice,” *Global Journal of Science Frontier Research Biological Science*, vol. 2013, no. 13.

[110] S.H.M. Ashtiani, A. Salarikia and M.R. Golzarian, “Analyzing drying characteristics and modeling of thin layers of peppermint leaves under hot-air and infrared treatments,” *Information processing in agriculture*, vol. 4, pp. 128–139, 2017.

[111] A. Elmizadeh, M. Shahedi and N. Hamdami, “Comparison of electrohydrodynamic and hot-air drying of the quince slices,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 2017, no. 43, pp. 130–135.

[112] H.J. Park, Y. Lee and J.B. Eun, “Physicochemical characteristics of kimchi powder manufactured by hot air drying and freeze drying,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 5, pp. 193–198, Jan. 2016.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. MRS (de Man Rogosa and Sharp) broth

ประกอบด้วย

Dextrose	20	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 55.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. MRS (de Man Rogosa and Sharp) agar

ประกอบด้วย

Dextrose	20	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม

Agar	15	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ปริมาตร 55.15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient broth (NB)

ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม

ชั่ง Peptone 5 g และ Beef extract 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient agar (NA)

ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม

ชั่ง Peptone 5 กรัม Beef extract 3 กรัม และ Agar 15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Protein hydrolysis agar

ประกอบด้วย

MRS agar	900	มิลลิลิตร
Skim milk (20 เปอร์เซ็นต์)	100	มิลลิลิตร

ทำการเตรียม MRS agar ที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่นลงไป 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเตรียม Skim milk (20 %) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 110 ^{O}C ที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที รอให้ MRS agar และสารละลาย Skim milk (20 %) พออุ่นแล้วนำมาผสมให้เข้ากันเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีที่ปราศจากเชื้อ

6. Tributyrin agar

ประกอบด้วย

MRS agar	1000	มิลลิลิตร
Tributyrin	10	กรัม

ทำการเตรียม MRS agar 1000 มิลลิลิตร โดยเติม Tributyrin 10 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีที่ปราศจากเชื้อ

7. Starch agar

ประกอบด้วย

MRS agar	1000	มิลลิลิตร
Soluble starch	20	กรัม

ทำการเตรียม MRS agar 1000 มิลลิลิตร โดยเติม Soluble starch 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีที่ปราศจากเชื้อ

ภาคผนวก ข

สารเคมีและการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 %

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้ว ถ้าต้องการเตรียมเพื่อทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียให้นำมาใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เอนไซม์เปปซิน (Pepsin)

ชั่งเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน NaCl ความเข้มข้น 0.85 % พีเอช 2.5 3.0 และ 3.5 ที่ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน

3. เกลือน้ำดีสังเคราะห์ (Bile salt)

ชั่งเกลือน้ำดีสังเคราะห์ (Bile salt) 0.3 0.6 และ 1 กรัม ต่ออาหารเหลว MRS พีเอช 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Bromocresol purple

ชั่ง Bromocresol purple ปริมาตร 0.02 กรัม ต่ออาหารแข็ง MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121 ^{O}C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

ประกาศกระทรวงสาธารสุข

เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

โดยที่เป็นการสมควรกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก ให้เป็นไปอย่างถูกต้องเหมาะสม และปลอดภัยต่อการบริโภค

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ และมาตรา ๖ (๓) (๔) (๕) และ (๑๐) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. ๒๕๒๒ อันเป็นกฎหมายที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา ๒๙ ประกอบกับมาตรา ๓๓ มาตรา ๔๑ มาตรา ๔๓ และมาตรา ๔๕ ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข ออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ในประกาศนี้

“จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic)” หมายความว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ทั้งนี้ไม่รวมถึง

(๑) จุลินทรีย์ ที่ใช้เป็นสารชีวบำบัด (biotherapeutic agents)

(๒) จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganisms) ที่ไม่ใช้ในอาหาร

(๓) จุลินทรีย์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Microorganism, GMM)

(๔) จุลินทรีย์ บักเตรี แบคทีเรีย หรือยีสต์ ตามที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังต่อไปนี้

(๔.๑) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ ๑๔๔ (พ.ศ. ๒๕๓๕) เรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ลงวันที่ ๒ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๓๕ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๐๑) พ.ศ. ๒๕๔๙ เรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ ๔) ลงวันที่ ๒๘ กันยายน พ.ศ. ๒๕๔๙

(๔.๒) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ ๑๕๖ (พ.ศ. ๒๕๓๗) เรื่อง นมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก ลงวันที่ ๑๔ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๓๗

(๔.๓) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ ๑๕๗ (พ.ศ. ๒๕๓๗) เรื่อง อาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก ลงวันที่ ๑๔ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๓๗

(๔.๔) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ ๑๕๘ (พ.ศ. ๒๕๓๗) เรื่อง อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก ลงวันที่ ๑๔ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๓๗

(๔.๕) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๒๖๖) พ.ศ. ๒๕๔๕ เรื่อง นมปรุงแต่ง ลงวันที่ ๑๙ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๔๕

(๔.๖) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๒๖๗) พ.ศ. ๒๕๔๕ เรื่อง ผลิตภัณฑ์ของนม ลงวันที่ ๑๙ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๔๕

(๕) จุลินทรีย์ตามที่กำหนดไว้ในบัญชีแนบท้ายประกาศฉบับนี้ ที่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นตามความจำเป็นในกระบวนการผลิตอาหารและได้ปฏิบัติตามประกาศว่าด้วยเรื่องนั้น ๆ แล้ว

"การกล่าวอ้างทางสุขภาพ (Health Claim)" หมายความว่า การแสดงรูป รูปภาพ รอยประดิษฐ์ เครื่องหมาย เครื่องหมายการค้า หรือข้อความใด ๆ บนฉลาก ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ส่วนประกอบของอาหาร หรือสารอาหารซึ่งเกี่ยวข้องกับสุขภาพทั้งทางตรงและทางอ้อม แบ่งเป็น ๓ ลักษณะ ได้แก่

(๑) การกล่าวอ้างหน้าที่สารอาหาร (Nutrient function claim) หมายความว่า การแสดงสรรพคุณ หรือคุณประโยชน์เกี่ยวกับบทบาทของสารอาหารที่มีผลต่อสรีรวิทยาของร่างกาย เช่น การเจริญเติบโต การพัฒนา หรือการกระทำหน้าที่ตามปกติของร่างกาย ซึ่งผ่านการพิสูจน์และเป็นที่ยอมรับในทางวิชาการแล้ว เช่น แคลเซียมช่วยให้กระดูกและฟันแข็งแรง

(๒) การกล่าวอ้างหน้าที่อื่น (Other function claim) หมายความว่า การแสดง สรรพคุณ หรือคุณประโยชน์นอกเหนือจาก (๑) ของอาหารหรือส่วนประกอบของอาหารที่มีผลในทางเสริมสุขภาพอย่างเฉพาะเจาะจง (specific beneficial effects) หรือช่วยในการกระทำหน้าที่ให้ดียิ่งขึ้น (improvement of function) เช่น การกล่าวอ้างหน้าที่ส่วนประกอบของอาหารที่มีผลช่วยกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียม

(๓) การกล่าวอ้างการลดความเสี่ยงของการเกิดโรค (Reduction of disease risk claim) หมายความว่า การแสดงสรรพคุณ คุณประโยชน์ของอาหาร หรือส่วนประกอบของอาหาร ที่มีผลในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรค อาการ หรือสภาวะใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ (health-related condition) โดยเป็นการเปลี่ยนแปลงปัจจัยเสี่ยงหลัก (major risk factor) สำหรับโรคนั้น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ เช่น การกล่าวอ้างว่าอาหารที่มีแคลเซียมสูงมีผลช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคกระดูกพรุน

ข้อ ๒ อาหารที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องได้รับอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และต้องใช้จุลินทรีย์ตามที่กำหนดไว้ในบัญชีแนบท้ายประกาศฉบับนี้ และมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่ คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU ต่ออาหาร ๑ กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้น

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกอื่นนอกเหนือจากที่กำหนดไว้ในบัญชีแนบท้ายประกาศฉบับนี้ ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าต้องส่งมอบหลักฐานแสดงผลการประเมินความปลอดภัย และคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ตามหลักการใน Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, ปี ค.ศ. ๒๐๐๒ พร้อมรายละเอียดข้อมูลประกอบการยื่นขออนุญาต ดังนี้

(๑) การตรวจเอกลักษณ์ของสกุล (genus) ชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ด้วยวิธีการที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ทั้งทางลักษณะ (phenotype) และทางพันธุกรรม (genotype) และการเรียกชื่อ (nomenclature) ของจุลินทรีย์นั้นต้องเป็นชื่อที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและเป็นที่รู้ทั่วกัน ในทางวิทยาศาสตร์

(๒) การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

(๒.๑) การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity)

(๒.๒) การทนต่อสภาวะของเกลือน้ำดี (bile salt resistance)

(๒.๓) ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อมูก หรือ เซลล์ผิวเยื่อบุของมนุษย์หรือเซลล์ไลน์ (adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell line)

(๒.๔) ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity) และ

(๒.๕) คุณสมบัติอื่น ๆ (ถ้ามี) แล้วแต่กรณี

(๓) การประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์ โดยการทดสอบ นอกกาย (in vitro) หรือในสัตว์ (in vivo) และการศึกษาในมนุษย์ เพื่อประเมินความปลอดภัย และปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนี้

(๓.๑) การดื้อต่อสารปฏิชีวนะ

(๓.๒) การประเมินฤทธิ์ทางเมแทบอลิก เช่น การผลิตดี - แลกเทต (D-lactate) หรือการสลายเกลือน้ำดี เป็นต้น

(๓.๓) การประเมินผลข้างเคียงระหว่างการศึกษาในมนุษย์

(๓.๔) การเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์ที่ไม่พึงประสงค์ในผู้บริโภคหลังออกจำหน่ายในท้องตลาด

(๓.๕) การสร้างสารพิษ กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีการผลิตสารพิษ และ

(๓.๖) ฤทธิ์ทางฮีโมไลติก กรณีที่สายพันธุ์ที่ประเมินนั้นอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ ชนิดที่มีโอกาสทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

ข้อ ๓ การกล่าวอ้างทางสุขภาพสำหรับการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารต้องเป็นไปตามหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไข ดังนี้

(๑) ผู้ผลิต หรือผู้นำเข้าต้องแจ้งรายละเอียดของอาหารและส่วนประกอบของอาหารในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการกล่าวอ้างนั้นให้ครบถ้วนและเพียงพอ และต้องส่งมอบผลการศึกษาในมนุษย์อย่างน้อยจากสองสถาบัน เพื่อประกอบการพิจารณาประสิทธิผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อสุขภาพ ดังนี้

(๑.๑) การศึกษาในมนุษย์ที่มีการออกแบบอย่างดี (well design human intervention study) หรือ

(๑.๒) การศึกษาในมนุษย์ที่มีการออกแบบอื่น ๆ ที่เหมาะสมโดยมีจำนวน ตัวอย่างและผลการศึกษาเบื้องต้นที่เพียงพอที่จะพิจารณาประสิทธิผลของสายพันธุ์หรืออาหาร

การออกแบบการศึกษาในมนุษย์ตามข้อ (๑.๑) และข้อ (๑.๒) ต้องมีการออกแบบการศึกษาที่คำนึงถึงรายละเอียดดังต่อไปนี้

(ก) กลุ่มศึกษาต้องเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรเป้าหมายได้ (study groups that are representative of the target group)

(ข) กลุ่มควบคุม (control) ต้องเหมาะสม (appropriate control)

(ค) ช่วงระยะการได้รับสัมผัสที่เพียงพอและมีการติดตามเพื่อแสดงผลที่มุ่งหมายให้เกิดขึ้น (an adequate duration of exposure and follow up to demonstrate the intended effect)

(ง) การแสดงพื้นฐานการบริโภคอาหารและรูปแบบการใช้ชีวิตด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องของกลุ่มศึกษา (characterization of the study groups' background diet and other aspects of relevant of lifestyle)

(จ) ปริมาณของอาหารและส่วนประกอบของอาหารที่สอดคล้องกับรูปแบบการบริโภคที่มุ่งหมาย (an amount of the food or food component consistent with it intended pattern of consumption)

(ฉ) ประเภทและบริบทของอาหารที่ส่งผลต่อหน้าที่ของจุลินทรีย์ โพรไบโอติก (the influence of the food matrix and dietary context on the functional effect of the component)

(ช) การตรวจติดตามความเป็นไปตามข้อกำหนดในการบริโภคอาหารหรือส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ทดลองของกลุ่มศึกษา (monitoring of subjects' compliance concerning intake of food or food component under test)

(ซ) วิธีทางสถิติที่มีความหนักแน่นและเหมาะสมในการทดสอบสมมติฐาน (the statistical power to test the hypothesis)

ผลการศึกษาตามข้อ (๑.๑) และข้อ (๑.๒) ดังกล่าว อย่างน้อยต้องระบุตัวแปร หรือปัจจัยที่กำหนด (parameter) ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ชนิดและประเภทของอาหาร ขนาดหน่วยบริโภค ปริมาณของจุลินทรีย์โพรไบโอติก และระยะเวลาที่ทำให้เกิดผลตามความมุ่งหมายในการใช้ กรณีที่ผลการศึกษานั้นไม่สามารถวัดจุดสิ้นสุด (endpoint) โดยตรงได้ เนื่องจากผลกระทบต่อสุขภาพหรือ ประโยชน์หลักที่ต้องใช้เวลาเนิ่นนานจึงจะปรากฏให้เห็น ความเป็นไปได้หรือประเด็นทางจริยธรรม และข้อจำกัดทางทรัพยากร เช่น ค่าตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าใช้จ่ายสูง อาจใช้ตัวชี้วัด (markers) ที่เหมาะสมแทน โดยตัวชี้วัดดังกล่าวต้องมีความถูกต้องทางชีวภาพซึ่งสัมพันธ์ต่อผลลัพธ์สุดท้ายและความแปรผันภายในประชากรกลุ่มเป้าหมาย และต้องมีความถูกต้องทางวิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะ ของตัวชี้วัดนั้น

(๒) การกล่าวอ้างทางสุขภาพต้องพิสูจน์ได้ทางวิทยาศาสตร์ โดยคำนึงถึงความครบถ้วนสมบูรณ์ของข้อมูลและหลักฐานที่มีน้ำหนักเพียงพอในประเด็นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

(๒.๑) ผลที่ได้สอดคล้องกับผลจากหลักฐานหรือวิธีการอื่น

(๒.๒) ความถูกต้องตามวิธีการด้านเทคโนโลยีการอาหาร

(๒.๓) การเก็บตัวอย่างเป็นแบบสุ่มเลือก

(๒.๔) ความสัมพันธ์ด้านการตอบสนองระหว่างปริมาณอาหารหรือส่วนประกอบของอาหาร และผลทางสุขภาพที่เกี่ยวข้อง

(๒.๕) ความเป็นไปได้ทางชีวภาพ

(๓) เงื่อนไขการแสดงการกล่าวอ้างทางสุขภาพบนฉลาก ต้องเป็นดังนี้

การกล่าวอ้างทางสุขภาพต้องไม่ทำให้เข้าใจว่าการบริโภคอาหาร ส่วนประกอบของอาหาร หรือสารอาหารนั้น สามารถบำบัด บรรเทา รักษา หรือป้องกันโรคได้ และต้องแสดงข้อความเป็นภาษาไทย ด้วยขนาดตัวอักษรที่ใกล้เคียงกัน เห็นได้ง่าย อ่านได้ชัดเจน และอาจมีข้อความเป็นภาษาอื่นที่มีความหมายทำนองเดียวกันกับภาษาไทยแสดงไว้ด้วยก็ได้ และข้อความแสดงรายละเอียดดังต่อไปนี้

(๓.๑) ข้อความว่า “ผลิตภัณฑ์นี้ไม่ใช้สำหรับรักษา บำบัด บรรเทา หรือป้องกันโรค”

(๓.๒) สกุล (Genus) ชนิด (Species) และสายพันธุ์ (Strain) ของจุลินทรีย์ โพรไบโอติกที่เป็นส่วนผสม

(๓.๓) ปริมาณและช่วงระยะเวลาที่แนะนำให้บริโภคซึ่งให้ผลต่อสุขภาพตามกล่าวอ้าง

(๓.๔) ข้อความกล่าวอ้างทางสุขภาพ เช่น “จุลินทรีย์โพรไบโอติก” “โพรไบโอติก” หรือข้อความกล่าวอ้างอื่น

(๓.๕) ข้อแนะนำการใช้ และสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสม

(๓.๖) ช่องทางสำหรับให้ข้อมูลแก่ผู้บริโภค เช่น สถานที่ติดต่อ หมายเลข โทรศัพท์ หรือเว็บไซต์

ข้อ ๔ การแสดงฉลากของอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกให้เป็นไปตาม

(๑) ประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลาก

(๒) ประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลากโภชนาการ

(๓) ประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องของอาหารนั้น

ข้อ ๕ ให้ผู้ผลิตหรือนำเข้าอาหารตามข้อ ๒ อยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ ปฏิบัติให้เป็นไปตามประกาศฉบับนี้ภายในหนึ่งปีนับแต่วันที่ประกาศนี้มีผลใช้บังคับ และให้ใช้ฉลากเดิมที่เหลืออยู่ต่อไปได้แต่ไม่เกินหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้มีผลใช้บังคับ

ข้อ ๖ ประกาศฉบับนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๒๗ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๔
จุรินทร์ ลักษณวิศิษฏ์
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

บัญชีรายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหาร

แนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร

๑.	บาซิลลัส โคแอกกูแลน	*Bacillus coagulans*
๒.	บิฟิโดแบคทีเรียม อะโดเลสเซนทิส	*Bifidibacterium adolescentis*
๓.	บิฟิโดแบคทีเรียม อะนิมอลิส	*Bifidobacterium animalis*
๔.	บิฟิโดแบคทีเรียม บิฟิดัม	*Bifidobacterium bifidum*
๕.	บิฟิโดแบคทีเรียม เบรเว	*Bifidobacterium breve*
๖.	บิฟิโดแบคทีเรียม อินฟานทิส	*Bifidobacterium infantis*
๗.	บิฟิโดแบคทีเรียม แล็กทิส	*Bifidobacterium lactis*
๘.	บิฟิโดแบคทีเรียม ลองกัม	*Bifidobacterium longum*
๙.	บิฟิโดแบคทีเรียม ซูโดลองกัม	*Bifidobacterium pseudolongum*
๑๐.	เอ็นเทอโรค็อกคัส ดูแรน	*Enterococcus durans*
๑๑.	เอ็นเทอโรค็อกคัส เฟเซียม	*Enterococcus faecium*
๑๒.	แล็กโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส	*Lactobacillus acidophilus*
๑๓.	แล็กโทบาซิลลัส คริสปาทัส	*Lactobacillus crispatus*
๑๔.	แล็กโทบาซิลลัส แก็สเซอรี	*Lactobacillus gasseri*
๑๕.	แล็กโทบาซิลลัส จอห์นโซนอิ	*Lactobacillus johnsonii*
๑๖.	แล็กโทบาซิลลัส พาราคาเซอิ	*Lactobacillus paracasei*
๑๗.	แล็กโทบาซิลลัส รียูเทอรี	*Lactobacillus reuteri*
๑๘.	แล็กโทบาซิลลัส รามโนซัส	*Lactobacillus rhamnosus*
๑๙.	แล็กโทบาซิลลัส ซาลิวาเรียส	*Lactobacillus salivarius*
๒๐.	แล็กโทบาซิลลัส ซีอี	*Lactobacillus zeae*
๒๑.	โพรพิโอนิแบคทีเรียม อะราไบโนซัม	*Propionibacterium arabinosum*
๒๒.	สแตปฟิโลคอคคัส ไซน์ยูรี	*Staphylococcus sciuri*
๒๓.	แซ็กคาโรไมซีส เซรีวิซิอี สับสปีชีย์ บัวลาดิอิ	*Saccharomyces cerevisiae subsp. Boulardii*

อ้างอิงจาก Bulletin of the International Dairy Federation No.377/2002

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศิรยาพร ฟักสกุล
วันเดือนปีเกิด	12 พฤษภาคม พ.ศ. 2533
ที่อยู่	29/3 หมู่ 7 ต.โพธิ์ประสาท อ.ไพศาลี จ.นครสวรรค์ 60220
การศึกษา	ปริญญาตรี คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ประวัติการทำงาน	ตำแหน่ง Production supervisor บริษัท เอ็ม เอ็ม พี อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด พ.ศ. 2555
เบอร์โทรศัพท์	08-7161-2055
อีเมล์	sirayaporn_f@mail.rmutt.ac.th sirayaporn.n@gmail.com