

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุ

1. นมพาสเจอร์ไรส์ (อ.ส.ค. จังหวัดสุโขทัย)
2. น้ำมันดอกทานตะวัน (ยี่ห้อซิม)
3. อาหารผงสุกรสูตรพื้นฐานสำหรับหมูเล็ก (ศิริสมานฟาร์ม จังหวัดสุโขทัย)

กลุ่มตัวอย่าง

1. ลำไส้สุกร (โรงฆ่าสัตว์เทศบาลเมือง จังหวัดพิษณุโลก)
 2. ลูกสุกรหลังหย่านม จำนวน 84 ตัว อายุหย่านม 25 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 6.5 กิโลกรัม
- พันธุ์ผสมระหว่าง แลนด์เรซ x ลาร์จไวท์ x ดุรอค (ศิริสมานฟาร์ม จังหวัดสุโขทัย) แต่ละตัวทำการ
- นับหมายเลขที่ใบหู

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Shellab, USA)
2. ตู้ปลอดเชื้อ (Class II ABS 1800, UK)
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Metrohm 713, USA)
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CH30RF200, Japan)
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมกล้องถ่ายรูปอัตโนมัติ (Olympus BX43 และ Olympus DP21, Japan)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Specord 40, Germany)
7. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova 4340, USA)
8. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (Precisa 240A, Netherlands)
9. เครื่องชั่งแบบหยาบ 2 ตำแหน่ง (A&D Ek-610i, Japan)
10. หม้อนึ่งความดันไอ (HA-300 MW, USA)
11. ตู้อบลมร้อน (UM-Oven 120L, USA)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Rc 5c Plus, USA)

13. เครื่องอัดเม็ดอาหารขนาดใหญ่ที่มีกำลังการผลิต 800 กิโลกรัม/ชั่วโมง ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (Albert, Belgium)
14. เครื่องชั่งน้ำหนักสุกร
15. ตู้ดูดความชื้น (Sanplatec, Japan)
16. ชุดเครื่องย่อยโปรตีน (Gerhardt, Germany)
17. ชุดเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Gerhardt, Germany)
18. เครื่องสกัดไขมัน (Gerhardt, Germany)
19. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย (Gerhardt, Germany)
20. เตาเผาแก้ว (Crabолite, England)
21. ตู้ดูดควัน (Flexlab, England)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Micropipette (Pipetman, USA)
2. Micropipette tip 10, 200, 1000 μ l (Hycone plastics, USA)
3. Eppendorf 2 ml (Neptune, Mexico)
4. Pipette controller (Accumax HI430563, India)
5. Pipette sterile 1, 5, 10 ml (Corning, USA)
6. Centrifuge tube 15, 50, 250 ml (Corning, Mexico)
7. Pasteur pipette sterile 1 ml (Corning, USA)
8. Assay disc 0.6cm (MN 827ATD, Germany)
9. Hematocytometer (Boeco, Germany)
10. Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml (Precicolor HBG, Germany)
11. Volumetric flask 100 ml, 500 ml, 1000 ml (Fortuna, Germany)
12. Fritted glass crucible (ROBU H12, Germany)
13. Burette (Pyrex, USA)
14. Plate (Pyrex, USA)
15. Plastic plate (Hycone plastics, USA)
16. Erlenmeyer flask 50 ml, 250 ml (Pyrex, USA)
17. Beaker (Pyrex, USA)
18. Tube (Pyrex, USA)

19. Dropper
20. Loop
21. Spreader
22. ถุงไฟเบอร์ (Gerhardt, Germany)
23. สำลีพันก้านฆ่าเชื้อ
24. ตะเกียงแอลกอฮอล์
25. โกร่งบด
26. อุปกรณ์ป้ายหมายเลขที่ใบหูสุกร
27. กระบอกและเข็มฉีดยา
28. กระดาษกรอง (Whatman No.1, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. MRS broth (Hi-Media, India และ Merck, USA)
2. MRS agar (Hi-Media, India)
3. EMB agar (Hi-Media, India)
4. Carboxymethyl cellulose (CMC) (Fluka, Natherland)
5. Xylan from beechwood (Sigma, Germany)
6. Peptone water (Merck, USA)
7. Phosphate buffer saline (Sigma, USA)
8. 0.85% normal saline solution (A.N.B. Laboratories, Thailand)
9. Bromocresol Purple (Ajax, Australia)
10. Xanthan gum (Food grade) (Union Chemical, USA)
11. Gellan gum (Food grade) (CPKelco, USA)
12. Trypan blue (Sigma, USA)
13. Antibiotic disc (30 µg Tetracycline, 30 µg Chrolamphenical, 15 µg Erythromycin, 30 µg Kanamycin และ 30 µg Neomycin) (Oxoid, UK)
14. 10% Enrofloxacin (โนวา เมดิซีน จำกัด, ประเทศไทย)
15. Potencil® (Amoxicilin 10 g และ Colistin sulphate 25 g) (Virbac, France)
16. Pepsin (Sigma # P-7000, USA)
17. Pancreatin (Sigma # P-7545, USA)

18. Bile extract (Sigma # B-8631, USA)
19. NaCl (Ajax, Australia)
20. CaCl_2 (Unilab, Australia)
21. NaOH (Merck, Germany)
22. HCl (RCI Labscan, Thailand)
23. TiO_2 (LOBA, India)
24. CH_3COOH (RCI Labscan, Thailand)
25. H_2SO_4 (RCI Labscan, Thailand)
26. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Univar, USA)
27. K_2SO_4 (Fisher, UK)
28. H_3BO_3 (Merck, Germany)
29. H_2O_2 (Fisher, UK)
30. Petroleum ether (Panreac, E.U.)

วิธีการวิจัย

1. การคัดแยก คัดเลือก และจำแนกจุลินทรีย์

1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตภัณฑ์ (ดัดแปลงวิธีจาก ภัทราวดี ณ สงขลา, 2549; จำริญ มณีวรรณ, มงคล ถิรบุญยานนท์ และกิตติพงษ์ ทิพย์ะ, 2553)

1.1.1 นำลำไส้สุกรสดจากโรงฆ่าสัตว์เทศบาลเมือง จังหวัดพิษณุโลก มาแยกส่วนของลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และมูลในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (ภาพ 8)

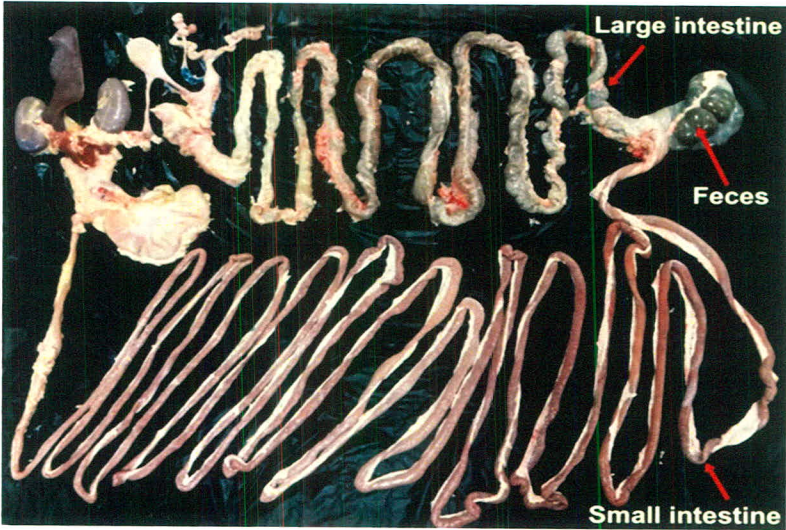
1.1.2 สุ่มตัดเนื้อเยื่อผิวหนังด้านในของลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 กรัม และสุมน้ำมูลส่วนต้นในลำไส้ใหญ่ ประมาณ 1 กรัม มาแช่ในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.1.3 บั่นด้วย Vortex นาน 15 นาที แล้วนำส่วนของสารละลายด้านบน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสูตร MRS agar (Hi-Media, India) ที่เติม Bromocresol purple (Ajax, Australia) 0.004%

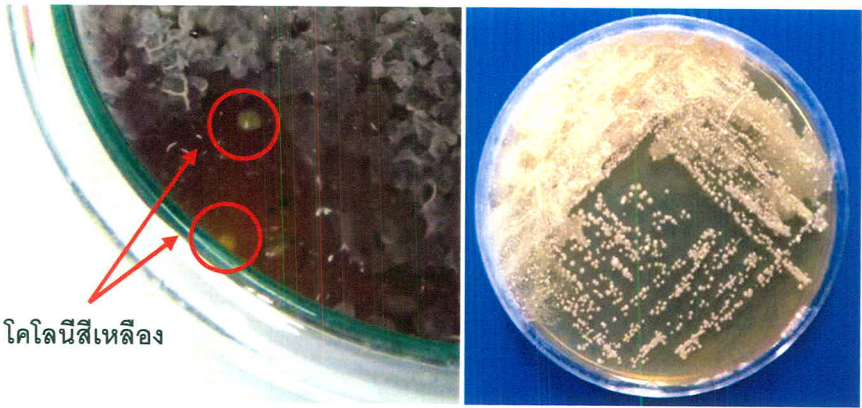
1.1.4 นำจานเลี้ยงไปวางไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

1.1.5 แยกโคโลนีสีเหลืองของแบคทีเรียไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Cross streak (ภาพ 9)

1.1.6 เก็บเชื้อไว้บน MRS agar slant ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในขั้นตอนต่อไป



ภาพ 8 ลำไส้ของสุกรขุน



ภาพ 9 การแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียโคโลนีสีเหลืองโดยวิธี Cross streak

1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

1.2.1 การทนอุณหภูมิสูง (ดัดแปลงวิธีจากรุ่งโรจน์ ศรีรักษา และคณะ, 2555)

1) นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำเพาะ MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง

2) นำมาเกลี่ยบนหน้าอาหารแข็ง MRS agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80°C, 85°C, 90°C และ 95°C นาน 1-1.5 ชั่วโมง

3) หลังจากนั้นจึงนำมาบ่มต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

4) ตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงแล้วแยกเก็บไว้บนอาหารแข็ง MRS agar slant ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในขั้นตอนต่อไป

1.2.2 การทนต่อสภาวะความเป็นกรด (ดัดแปลงวิธีจาก Guo, Kim and

Nam, 2010; Raghavendra and Halami, 2009)

1) นำแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำเพาะ MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นเชื้อตั้งต้น (inoculums)

2) นำเชื้อตั้งต้น 10% มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth ที่ถูกปรับ pH ด้วย 6 N HCl ให้มีค่า pH 1, 2, 3 และ 4

3) นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 3 และ 5 ชั่วโมง

4) นำมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ตรวจสอบผลโดย

OD₆₆₀ 0.0500-0.2000 คือ ทนกรดได้ในระดับน้อยที่สุด

OD₆₆₀ 0.2001-0.5000 คือ ทนกรดได้ในระดับปานกลาง

OD₆₆₀ 0.5001-2.0000 คือ ทนกรดได้ในระดับมากที่สุด

5) นำเซลล์แขวนลอยไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง MRS (Hi-Media, India) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติอุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียที่เกิดขึ้นและแยกเก็บไว้บนอาหารแข็ง MRS agar slant ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในขั้นตอนต่อไป

1.2.3 การต้านทานยาปฏิชีวนะ (ดัดแปลงวิธีจากวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ, 2550)

1) นำแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะกรด (pH 1-4 นาน 3-5 ชั่วโมง) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำเพาะ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

2) ปิเปตเชื้อตั้งต้น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนหน้าอาหารแข็ง MRS แล้วป้าย (swab) เชื้อจนทั่วหน้าอาหารแข็ง MRS ให้แห้ง

3) วางแผ่นยาปฏิชีวนะดังต่อไปนี้ลงบนหน้าอาหารแข็ง MRS (ข้อ 2)) จานละ 1 ชนิด จำนวน 3 แผ่นต่อจาน ใช้ 3 จานต่อตัวอย่างทดสอบ

แผ่นยาปฏิชีวนะ 30 µg Tetracycline, 30 µg Neomycin, 15 µg Erythromycin, 30 µg Kanamycin และ 30 µg Chloramphenicol (Oxiid, UK)

หยดยาปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซิน 10% (โนวา เมดิซีน จำกัด, ประเทศไทย) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษตาปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว

หยดยาปฏิชีวนะ Potencil® (Virbac, France) ที่มีส่วนผสมคือ 0.1% Amoxicilin และ 0.1% Colistin sulphate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษตาปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว

4) นำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบและบันทึกการต้านทานยาปฏิชีวนะโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส เทียบกับตาราง 5

5) บ่มเชื้อต่อเนื่องนาน 46-54 ชั่วโมง พร้อมสังเกตและบันทึกผลลักษณะการต้านทานยาปฏิชีวนะ

ตาราง 5 เส้นผ่าศูนย์กลางการต้านทานยาปฏิชีวนะ (Inhibition zone diameter of antibiotics)

Antibiotics disc	Disk potency	Inhibition zone diameter to nearest (mm)		
		Resistant (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)
Tetracycline	(30 µg)	≤11	12 - 14	≥ 15
Chloramphenical	(30 µg)	≤12	13 - 17	≥ 18
Erythromycin	(15 µg)	≤13	14 - 22	≥ 23
Kanamycin	(30 µg)	≤13	14 - 17	≥ 18
Neomycin	(30 µg)	≤13	14 - 15	≥ 18
10% Enrofloxacin	40 µl	≤15	6 - 20	≥ 21
0.1 % Amoxicilin	10 µl	≤19	-	≥ 20
0.1 % Colistin sulphate	10 µl	≤10	-	≥ 11

หมายเหตุ: R* คือ การต้านทานยาปฏิชีวนะโดยโคไลนีของแบคทีเรียขึ้นบนรอย Inhibition zone

ที่มา: ดัดแปลงจาก Oxoid Ltd, UK

1.2.4 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช (Non-Starch polysaccharide; NSP)

1) นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดสอบยาปฏิชีวนะมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำเพาะ MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อนำไปหยดลงบนกระดาษตาปลาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ต่อแผ่น

2) วางแผ่นเชื้อแบคทีเรียลงบนหน้าอาหารแข็งสูตรต่างๆ ดังนี้
อาหารสูตร Carboxymethyl Cellulose agar; CMC agar สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ดัดแปลงวิธีจากทิพวรรณ แดงสวน, 2553)

อาหารสูตร Xylan agar สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคแลนเนส (ดัดแปลงวิธีจากสิรินันท์ ชมพูแสง, 2550)

อาหารสูตร Xylan agar ผสมรำข้าว สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์
เฮมิเซลลูเลส (ดัดแปลงวิธีจากมานิสา บุพตา, 2551)

3) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

4) ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โดยการย้อมด้วยสี 0.1% Congo red บน
จานอาหารเลี้ยงแผ่นเชื้อ ทิ้งไว้นาน 15 นาที

5) เทสารละลาย 1% NaCl ให้ท่วมหน้าอาหารแข็ง แล้วเทออกจากนั้น
นำมาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีเหลืองใสโดยใช้เกณฑ์ดังนี้

เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส:

5.00-14.99 มิลลิเมตร คือผลิตเอนไซม์ NSP น้อยที่สุด

15.00-28.99 มิลลิเมตร คือผลิตเอนไซม์ NSP ปานกลาง

29.00-40.00 มิลลิเมตร คือผลิตเอนไซม์ NSP มากที่สุด

วิธีการเตรียมสีย้อม 0.1% Congo red

ละลายสี Congo red (Labchem, Ajax) 1 กรัม ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับ
ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เป็น 1 ลิตร แล้วจึงนำมากรองด้วยกระดาษกรองใส่ในขวดสีชา เก็บรักษา
ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

1.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

3.1 การจำแนกแกรมแบคทีเรีย

ทำการย้อมสีแกรมด้วยชุดย้อมแกรม (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เพื่อจำแนก
แบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

3.2 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

ใช้วิธีการหาลำดับของยีนส่วน 16s rRNA ความยาวประมาณ
1.3 kb ด้วย universal primers คือ 518F (5' CCAGCAGCCGCGTAATACG 3') และ 800R
(5' TACCAGGGTATCTAATCC3') แล้วจึงนำผลที่ได้เข้าโปรแกรม Blast เพื่อเปรียบเทียบความ
เหมือนและความต่างของลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน genebank database โดยบริษัท
Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี

2. การตรึงเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติก

วิธีการเพาะเลี้ยงและเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์

1. เตรียมอาหาร MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเหลว MRS ประมาณ 1-2 ลูป (loop)
2. นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นเชื้อตั้งต้น
3. นำเชื้อตั้งต้นมาป้าย (swab) ให้ทั่วบนหน้าอาหารแข็งสูตร MRS แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง
4. เก็บเซลล์ออกจากหน้าอาหารแข็งสูตร MRS และล้างเซลล์ด้วย peptone water 2-3 ครั้ง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที

วิธีการเตรียม Peptone water

ละลาย peptone water (Merck, Germany) 25.1 กรัม ลงในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เป็น 1 ลิตร แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

วิธีการเตรียมสารละลายโปรตีนนมย่อยสลาย (Milk protein hydrolysate; MPH) (ดัดแปลงวิธีจาก Chaijamrus and Sumpradit, 2012)

1. ผสมนมพาสเจอร์ไรท์กับสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียผลิตภัณฑ์นมในอัตราส่วน 1 กิโลกรัม: 100 กรัม ตามลำดับ
2. หมักนมในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 37°C นาน 40 ชั่วโมง หรือจนส่วนของสารละลาย (whey) มี pH 4.1-4.5
3. แยกส่วนสารละลายที่มีโปรตีนนมละลายอยู่ (whey) ออกจากส่วนของแข็งที่โปรตีนนมจับกันเป็นก้อน (curd) หลังจากนั้นนำ curd 28% ผสมกับ whey 72% ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นละเอียด นาน 5 นาที
4. นำของผสมในข้อ 3 มาย่อยด้วยสารละลายต่างโดยปรับค่า pH เป็น 9.0 ด้วย 10N NaOH ที่อุณหภูมิ 60°C ใช้ความเร็วในการปั่นกวน 1400 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH เป็น 6.8-7.0 ด้วย 10N CH₃COOH
5. นำโปรตีนไฮโดรไลเสทในข้อ 4 ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

2.1 วิธีเตรียมเซลล์แบบไมโครเอนแคปซูเลชัน (ดัดแปลงวิธีจาก Chaijamrus and Sumpradit, 2012)

2.1.1 ผสม Milk protein hydrolysate (MPH) กับตะกอนเซลล์แบคทีเรีย โปรไบโอติก อัตราส่วน 7.5 กรัม: 1 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ จากนั้นกวนผสมกัน นาน 2 นาที

2.1.2 เติมสารละลาย 0.5% (w/v) xanthan gum และ/หรือสารละลาย 0.25% (w/v) gellan gum อย่างละ 3.75 กรัม (ตาราง 6) จากนั้นกวนผสมกัน นาน 2 นาที

2.1.3 เติมสารละลาย 10% CaCl₂ ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ในของผสม ข้อ 2.1.2 ปั่นให้เข้ากันโดยใช้ vortex

2.1.4 เทของผสมทั้งหมดลงในน้ำมันดอกทานตะวัน ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ใน ปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 70°C ปั่นจนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 70°C ความเร็ว 1400 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

2.1.5 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงดูดแยกสารแขวนลอยของเซลล์ตรึง (encapsulated cell suspension) ส่วนบนที่ระดับความสูงจากก้นปีกเกอร์ 0.5 เซนติเมตร

2.1.6 ตั้งสารแขวนลอยของเซลล์ตรึง ข้อ 2.1.5 ในตู้เย็นข้ามคืนจนกระทั่งตะกอนของเซลล์ตรึง (encapsulated cell pellet) ตกอยู่ก้นปีกเกอร์หมดจึงดูดแยกน้ำมันออก เพื่อนำ ตะกอนเซลล์ตรึงไปผสมกับอาหารสุกรพื้นฐาน

ตาราง 6 องค์ประกอบของผนังแคปซูล (โปรตีน-พอลิแซ็กคาไรด์คอมเพล็กซ์) สำหรับการตรึงเซลล์

กลุ่มที่	โปรตีน-พอลิแซ็กคาไรด์คอมเพล็กซ์
1	Milk Protein Hydrolysate (MPH)
2	MPH + 0.5 % (w/v) xanthan gum (1:1)
3	MPH + 0.25 % (w/v) gellan gum (1:1)
4	MPH + 0.5 % (w/v) xanthan gum + 0.25 % (w/v) gellan gum (1:0.5:0.5)

2.2 การศึกษาลักษณะแคปซูลที่ได้จากการตรึงเซลล์

นำสารแขวนลอยของเซลล์ตรึงที่ได้ไปส่องดูลักษณะแคปซูลพร้อมทั้งวัดเส้นผ่าศูนย์กลางแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พร้อมทั้งถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพอัตโนมัติที่ต่ออยู่กับกล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX43 และ Olympus DP21)

2.3 วิธีการทดสอบประสิทธิภาพผนังไมโครแคปซูล

2.3.1 นำสารแขวนลอยของเซลล์ตรึง ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

2.3.2 นำมาบดด้วยโกร่ง เขย่าด้วย vortex และการสั่นด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) นาน 2, 4 หรือ 6 นาที จนกว่าผนังเซลล์ตรึงแตกหมด 100%

2.3.3 บันทึกเวลาที่ผนังแคปซูลของเซลล์ตรึงแตกทั้งหมด 100% แล้วจึงนับเซลล์เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตภายหลังการทำผนังไมโครแคปซูลแตก

2.4 ประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงต่อการรอดชีวิตในระบบน้ำย่อยจำลองของสุกร (ดัดแปลงจาก Papagianni and Anastasiadou, 2009)

2.4.1 นำสารแขวนลอยของเซลล์ตรึง (encapsulated cellsuspension) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำย่อยกระเพาะอาหาร (simulated gastric juice; SGJ) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 75 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง

2.4.2 เติมน้ำย่อยลำไส้เล็ก (simulated intestinal juice; SIJ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 75 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง

2.4.3 แบ่งเก็บตัวอย่างสารแขวนลอยของเซลล์ตรึงทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง เพื่อนับเซลล์ที่รอดชีวิตบนแผ่น hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เทียบกับเซลล์อิสระภายใต้สภาวะเดียวกัน

วิธีการเตรียมน้ำย่อยจำลองของสุกร (ดัดแปลงจาก Papagianni and Anastasiadou, 2009)

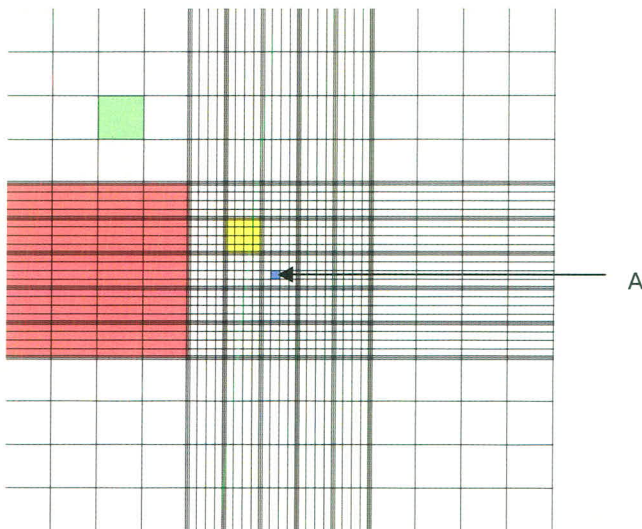
1. น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Simulated gastric juice; SGJ) ละลายเอนไซม์ Pepsin (Sigma#P-7000, USA) น้ำหนัก 0.3 กรัม ในสารละลาย 0.2% NaCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 0.2% NaCl ให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปปรับค่า pH ให้เป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

2. น้ำย่อยในลำไส้เล็ก (Simulated intestinal juice; SIJ) ละลายเอนไซม์ Pancreatin (Sigma#P-7545, USA) น้ำหนัก 1 กรัม และ Bile extract (Sigma#B-8631, USA) น้ำหนัก 4.5 กรัม ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) (Sigma#P4417, USA) จากนั้น

ปรับปริมาตรด้วย PBS ให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปปรับค่า pH ให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์

วิธีการนับเซลล์แบคทีเรีย (Papagianni and Anastasiadou, 2009)

1. ย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue เพื่อสังเกตการณ์มีชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย (โดยถ้าแบคทีเรียติดสีน้ำเงินของ trypan blue แสดงว่าเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต เพราะเซลล์ไม่มีกระบวนการเมตาบอลิซึมสำหรับการขับสีออกจากเซลล์) ในอัตราส่วน เซลล์ 80 ไมโครลิตร: trypan blue 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปผสมด้วย vortex ให้เข้ากัน
2. หยดสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมสีแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนพื้นที่ตารางของแผ่น hemacytometer แล้วปิดด้วยแผ่นกระจก cover slip (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ)
3. นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ติดสีย้อมของ trypan blue ที่อยู่ในช่องพื้นที่ตาราง A (ภาพ 10) ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยจะนับทั้งหมด 30 ช่อง ภายในเวลา 5 นาที ทำ 3 ซ้ำ ต่อตัวอย่าง
4. เมื่อนับครบ 30 ช่อง แล้วนำจำนวนเซลล์ที่นับได้มารวมกัน เพื่อนำไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร



ภาพ 10 ตารางสีน้ำเงินที่มีขนาดเล็กที่สุด (A) บนแผ่น hemacytometer มีปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.5 การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของแบคทีเรียโปรไบโอติก

2.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (inoculums) ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS agar slant จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำเชื้อแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง

2.5.2 นำกล้าเชื้อ 10% (จากข้อ 2.5.1) มาถ่ายลงในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที

2.5.3 เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอย (จากข้อ 2.5.2) หลังเพาะเลี้ยงทุก 4 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง (0, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง) นำมาวัดค่าความขุ่น ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) โดยถ้าค่าที่วัดได้เกิน 1.000 ให้ทำการเจือจาง (dilution) ก่อน แล้วนำไปวัดใหม่

2.5.4 บันทึกค่า OD_{660} สำหรับคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อชั่วโมงของแบคทีเรียแต่ละชนิดและเวลาหาค่าของการเจริญเติบโตเซลล์

3. การผลิตอาหารเสริมโปรไบโอติกสำหรับสุกรขนาดเล็ก

3.1 การอัดเม็ดอาหารสุกร

3.1.1 นำเซลล์ตรึงโปรไบโอติก 2.33×10^{12} เซลล์ ผสมกับอาหารผงสูตรพื้นฐานสำหรับสุกรน้ำหนัก 600 กิโลกรัม ด้วยเครื่องผสมอาหารทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อนับเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกก่อนการอัดเม็ดเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตภายหลังการอัดเม็ดอาหาร

3.1.2 นำอาหารผงผสมแบคทีเรียโปรไบโอติกในข้อ 3.1.1 เข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารสัตว์กำลังการผลิตประมาณ 800 กิโลกรัมต่อชั่วโมง ที่สภาวะอุณหภูมิ 80°C นาน 30 วินาที แบบไม่คลุกไอน้ำ ปฏิบัติการ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.1.3 อาหารอัดเม็ดที่ได้มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 3 มิลลิเมตร และมีปริมาณโปรไบโอติกแบคทีเรียความเข้มข้น 3×10^6 เซลล์ต่ออาหารสุกร 1 กรัม น้ำหนักแห้ง

3.2 การศึกษาอายุการเก็บรักษาโปรไบโอติกแบคทีเรียในรูปอาหารอัดเม็ด

3.2.1 สุ่มอาหารอัดเม็ดเสริมโปรไบโอติกในกระสอบที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C) นาน 1 กรัม นำมาบดให้ละเอียดแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.2.2 ดูดสารละลายเจือจาง (ที่ได้จากข้อ 3.2.1) ประมาณ 1 มิลลิลิตร มาบดด้วยโกร่ง นาน 2 นาที

3.2.3 ย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue แล้วนับเซลล์บนแผ่น hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400 เท่าทุกสัปดาห์ เพื่อหาครึ่งชีวิต (half-life) ของเซลล์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารอัดเม็ด

4. การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเสริมโปรไบโอติกในการเลี้ยงสุกร

4.1 การวางแผนการทดลอง

จัดการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์(Completely Randomized Design; CRD) ทดสอบประสิทธิภาพอาหารเสริมโปรไบโอติกในการเลี้ยงสุกร โดยใช้สุกรพันธุ์ผสมระหว่าง พันธุ์แลนด์เรซ x ลาร์จไวท์ x ดุรอค ระยะหลังหย่านม (ภาพ 11) อายุ 25 วัน จำนวน 84 ตัว ทำการสุ่มเพื่อแบ่งเป็น 4 กลุ่ม เลี้ยงแบบคอก (ภาพ 12) คอกละ 21 ตัว (21 ขี้) แต่ละตัวทำการป้อนหมายเลขที่ใบหู (ภาพ 13) ใช้เวลาในการเลี้ยง นาน 42 วัน ณ ฟาร์มเกษตรกรแบบเปิด จังหวัดสุโขทัย (ศิริสมานฟาร์ม) โดยจะสุ่มให้สุกรได้รับอาหารทดลอง 4 สูตร โดยให้โปรไบโอติกความเข้มข้น 3×10^6 เซลล์ต่ออาหารสุกร 1 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามรูปแบบการทดลองดังนี้ (ตาราง 7)

ตาราง 7 แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพอาหารเสริมโปรไบโอติกในการเลี้ยงสุกร

กลุ่มทดลอง	ลักษณะอาหาร	ส่วนผสมของอาหาร		
		สูตรพื้นฐาน	โปรไบโอติก	ยาปฏิชีวนะ*
คอก 1	อาหารอัดเม็ด	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
คอก 2	อาหารผง	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
คอก 3 (ควบคุม 1)	อาหารผง	ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่
คอก 4 (ควบคุม 2)	อาหารผง	ใช่	ไม่ใช่	ใช่

หมายเหตุ: * Colistin (polymyxin E), Amoxicillin and Baci



ภาพ 11 ลูกสุกรพันธุ์ผสม (พันธุ์แลนด์เรซ x ลาร์จไวท์ x ดุร็อค) ระยะหลังหย่านม



ภาพ 12 ลักษณะคอกที่ใช้เลี้ยงลูกสุกรระยะหลังหย่านม



ภาพ 13 เบอ์หูของลูกสุกรหลังหย่านม

ตาราง 8 ส่วนประกอบวัตถุดิบอาหารในสูตรอาหารทดลอง (ศิริสมานฟาร์ม จังหวัดสุโขทัย)

วัตถุดิบอาหาร	สูตรอาหารอัดเม็ด เสริมโปรไบโอติก (%)	สูตรอาหารผง เสริมโปรไบโอติก (%)	สูตรอาหาร ควบคุม (%)	สูตรอาหารผง ผสมยาปฏิชีวนะ (%)
ปลายข้าว	51.3	51.3	51.3	51.3
น้ำมันถั่วเหลือง	3.5	3.5	3.5	3.5
กากถั่วเหลือง 44 %	2	2	2	2
ถั่วอบไขมันเต็ม	15	15	15	15
ปลาป่น 54 %	1.5	1.5	1.5	1.5
แอล-ไลซีน	0.4	0.4	0.4	0.4
ดีแอล-เมทไธโอนีน	0.4	0.4	0.4	0.4
แอล-ทรีโอนีน	0.2	0.2	0.2	0.2
โมโนไคแคลเซียม	1.7	1.7	1.7	1.7
ฟอสเฟต P21				
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.9	0.9	0.9	0.9
เกลือ	0.2	0.2	0.2	0.2
Premix	1	1	1	1
Denkalac	5	5	5	5
Nulklo spray	5	5	5	5
โมโนแพท	1.6	1.6	1.6	1.6
โปรตีนถั่วโปร	10	10	10	10
บาซี	-	-	-	0.1
ยาโคลิสติน	-	-	-	0.1
ยาออกซาลิน	-	-	-	0.1
โปรไบโอติกแบคทีเรีย				
	3x10 ⁶ เซลล์/อาหาร 1 g	3x10 ⁶ เซลล์/อาหาร 1 g	-	-

ตาราง 9 คุณค่าทางโภชนาในสูตรอาหาร (ศิริสมานฟาร์ม จังหวัดสุโขทัย)

โภชนะ	ค่าที่คำนวณได้
พลังงาน	3,594.26 Cal/Kg
โปรตีน	20.21 %
ไขมัน	8.99 %
เยื่อใย	2.04 %
แคลเซียม	1.01 %
ฟอสฟอรัสรวม	0.76 %
ฟอสฟอรัสที่ใช้ได้ในสุกร	0.50 %
เกลือ	0.30 %
ไลซีน	1.37 %
เมทไธโอนีนและซีสทีน	0.83 %
เมทไธโอนีน	0.67 %

หมายเหตุ: คำนวณจากโปรแกรม FeedLIVE 1.5

4.2 การเก็บข้อมูลและวิธีการคำนวณ

4.2.1 วัดการเจริญเติบโตของสุกรโดยการชั่งน้ำหนักสุกรเริ่มทดลองและในแต่ละสัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ภาพ 14(A)) และบันทึกปริมาณอาหารที่กิน (ปริมาณอาหารที่สุกรกินทั้งหมด) เพื่อใช้ในการคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และประสิทธิภาพการใช้อาหารของสุกรแต่ละกลุ่ม ดังนี้

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก

=

ปริมาณอาหารที่กิน (กก./ตัว/วัน)

อัตราการเจริญเติบโต (กก./ตัว/วัน)

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (%)

=

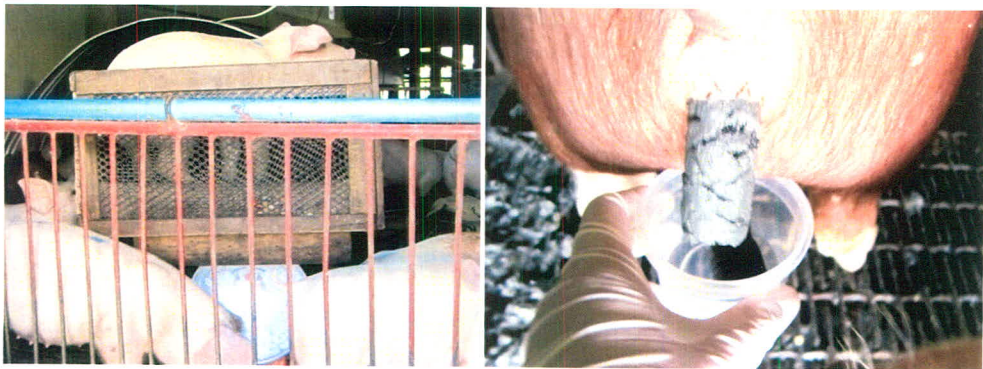
อัตราการเจริญเติบโต (กก./ตัว/วัน)

ปริมาณอาหารที่กิน (กก./ตัว/วัน)

X 100

4.2.2 ให้อาหารทดลองที่ผสม 0.5% Titaniumdioxide (TiO₂) เพื่อเป็น indigestible marker (วันดี ทาตระกูล, ทินกร ทาตระกูล และกุลยาภัทร์ วุฒิจาริ, 2555) ให้สุกรกินเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน ในช่วงสัปดาห์ที่ 5 ของการทดลองเลี้ยงสุกรอนุบาลแล้วจึงเก็บมูลสุกรที่มีสีเทาเงินของ TiO₂ วันละ 2 ครั้ง หลังการให้อาหาร (ภาพ 14 (B)) จนมูลสุกรไม่มีสีเทาเงินนำมูลสุกรไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ทันที เพื่อยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาค่าการย่อยได้ของโภชนะ คือ โปรตีน ไขมัน และเยื่อใย (ภาคผนวก ก ข้อ 2-5) โดยใช้สูตรดังนี้

$$100 - \left[100 \times \frac{\% \text{ TiO}_2 \text{ ในอาหาร}}{\% \text{ TiO}_2 \text{ ในมูลสุกร}} \times \frac{\% \text{ โภชนะในมูลสุกร}}{\% \text{ โภชนะในอาหาร}} \right]$$



ภาพ 14 (A) การชั่งน้ำหนักลูกสุกรทุกตัวทุกสัปดาห์ (B) การเก็บมูลสุกร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

แผนการทดลองแบบ CRD นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ 99%