



ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านมจากสไปรูลิน่าหมัก



อดิศักดิ์ คงแก้ว

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสัตวศาสตร์  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร



ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านมาจากสไปรูลิน่าหมัก



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสัตวศาสตร์  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านมจากสไปรูลิน่าหมัก"

ของ อติศักดิ์ คงแก้ว

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

### คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณพร ทะพิงค์แก)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วินิตี ทาตระกูล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ เจริญสุข)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงศ์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรภัทร หวันเหลี่ยม)

อนุมัติ

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านมจากสไปรูลิน่าหมัก
ผู้วิจัย	อดิศักดิ์ คงแก้ว
ประธานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วันดี ทาตระกุล
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ เจริญสุข ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงศ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาสัตวศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
คำสำคัญ	สไปรูลิน่าหมัก สัตตฐานวิทยาลัย าระบบภูมิคุ้มกัน สุกรหย่านม

### บทคัดย่อ

การเลี้ยงสุกรในปัจจุบันมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงวิถีการเลี้ยง เช่น โรคอุบัติใหม่ การจัดการ รวมถึงการเลือกบริโภคเนื้อสุกรที่ไม่มียาปฏิชีวนะตกค้าง สำหรับสไปรูลิน่าจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจต่อการใช้เป็นอาหารเสริมในสุกร แต่เนื่องจากปัจจัยด้านต้นทุน และคุณสมบัติบางประการ เช่น ผนังเซลล์ที่หนา ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของเยื่อใย ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเสริมในอาหารสุกรวัยอ่อน การหมักสไปรูลิน่าจึงเป็นทางเลือกสำหรับเพิ่มศักยภาพของสไปรูลิน่า ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าให้มีต้นทุนต่ำ ขั้นตอนการหมักสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มคุณค่าทางอาหารเพื่อเป็นต้นแบบการผลิตสารเสริมสไปรูลิน่าหมัก และศึกษาระดับการเสริมสไปรูลิน่าหมักที่ในอาหารสุกรต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต สุขภาพในระบบทางเดินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันของสุกรหย่านม แบ่งงานทดลองเป็น 3 ส่วน การศึกษาแรก เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าโดยใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกร 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อรวมน้ำเสีย (Center tank pond) บ่อไบโอแก๊ส (Bio-gas pond) และบ่อผึ่ง (Oxidation pond) ในอัตราส่วน 0, 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ต่อการทดแทนสูตรอาหารซารุค (Zarrouk Medium) โดยวางแผนการทดลองแบบสมสมบูรณ Completely randomized design (CRD) ประเมินอัตราการเจริญเติบโต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และองค์ประกอบทางเคมี ทำการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าในหน่วยการผลิตขนาดกลางที่ได้มาตรฐาน เพื่อนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสมของผลการทดลองที่ 1 นำไปการศึกษาในการทดลองที่ 2 ที่วางแผนการทดลองแบบ 4 X 4 factorial หมักสไปรูลิน่าด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 โดยมีปัจจัยแรก คือ ปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ใช้ 0, 2, 3 และ 4% ต่อปริมาณสไปรูลิน่าและตัวทำละลาย ส่วนปัจจัยที่สอง ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่ 0, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมัก องค์ประกอบทางเคมี สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

และทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งจำลองหน่วยผลิตขนาดกลางเพื่อเป็นต้นแบบสไปรูลิน่าหมักในภาคอุตสาหกรรม การศึกษาที่ 3 ศึกษาในสุกรหย่านมเพศผู้ อายุ  $21 \pm 0.5$  วัน น้ำหนัก  $5.8 \pm 0.5$  กิโลกรัม จำนวน 48 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 8 ซ้ำ ๆ 1 ตัว ประกอบด้วยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control; CON) กลุ่มที่ 2 เสริมยาปฏิชีวนะ (Control+ antibiotic; CAN) และกลุ่มสไปรูลิน่าหมัก (Fermented Spirulina; FSP) ในระดับ 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มการทดลองด้านสมรรถภาพการเจริญเติบโต ลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้ และการแสดงออกของไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40 ซึ่งเป็นยีนที่ตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันโรค และศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์ดังกล่าวต่อวัคซีนปาก และเท้าเปื่อยสุกร และวัคซีน Porcine Circovirus (PCV) จากเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลาง และม้าม

ผลจากการศึกษาการทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยอินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกร จากบ่อไบโอแก๊สที่ระดับการทดแทน 80 เปอร์เซ็นต์ได้ค่าประเมินประสิทธิภาพผลลัมฤทธิ์ 85 เปอร์เซ็นต์ โดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ความหนาแน่นของเซลล์ คลอโรฟิลล์ เอ แครโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน โพรตีน ไขมัน มวลสไปรูลิน่า และต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มชุดการทดลองอื่น ๆ อีกทั้งเมื่อพิจารณาต้นทุนการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าด้วยน้ำบ่อไบโอแก๊สสามารถผลิตได้ในต้นทุนต่ำเพียง 141.05 บาทต่อกิโลกรัม โดยที่มีองค์ประกอบทางเคมี เช่น โปรตีน 51.13% และพลังงาน (GE) 338.6 kcal/100g กรดอะมิโนจำเป็นที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น ไลซีน เมไทโอนีน ทรีโอนีน และ ทริฟโตเฟน (1151, 1209, 392 และ <20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ) รวมถึงกรดไขมันประกอบด้วย แกมมาไลโนเลนิก แอซิด กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่หลายคู่, โอเมก้า 6 และ โอเมก้า 9 (0.05, 0.15, 146.13 และ 29.8 กรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ)

ผลการศึกษาที่สอง ประสิทธิภาพการหมักพบว่า การรอดชีวิต  $5.60 \log \text{ cfu/ml}$  ของ *L. plantarum* TISTR 2075 หลังการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าช่วงเวลาอื่น ๆ ของการหมัก ( $P < 0.05$ ) ระยะเวลาการหมัก 48-72 ชั่วโมง มีปริมาณ Total Phenolic Content (TPC) สูงกว่ากลุ่มอื่น ( $P < 0.05$ ) โดยไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ใช้ ( $P < 0.05$ ) การหมัก 36, 48 และ 72 ชั่วโมง มีปริมาณ ค่า Antioxidant potential capacity (APC) สูงกว่ากลุ่มที่เริ่มต้นหมัก ( $P < 0.05$ ) ปริมาณ *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อการหมัก 4% ตรวจพบปริมาณ APC สูงสุด ( $P < 0.05$ ) และมีปริมาณมากที่สุด ของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ แครโรทีนอยด์ เบต้า-แคโรทีน เพอร์เซ็นต์โพลีแซคคาไรด์ และโปรตีน ที่ระยะเวลาหมัก (36 และ 48), (36 และ 72), 48, 72 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และ

ปริมาณ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ใช้ในการหมัก 4 และ 3-4% มีปริมาณแคโรทีนอยด์ และโพลีแซคคาไรด์ มากที่สุด ( $P<0.05$ ) สรุปได้ว่าการหมักสไปรูลิน่าด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ในปริมาณ 4% เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นปริมาณเชื้อที่ใช้ และระยะเวลาของการหมักที่ดีที่สุดต่อปริมาณสารประกอบทางชีวภาพและโภชนะของสไปรูลิน่าหมัก นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน และพลังงาน ลดลงหลังจากการหมัก (9.23% และ 10.43 Kcal/100g ตามลำดับ ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นลดลงหลังจากการหมักเฉลี่ย 27.74 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นลดลงหลังจากการหมักเฉลี่ย 15.97 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น กรดแอสปาร์ติก และ กรดกลูตามิก เพิ่มขึ้น 35.66 และ 29.92 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ปริมาณกรดไขมันชนิดอิ่มตัวเช่น กรดปาล์มิติก 48.49 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดลิโนเลนิกอัลฟา กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่หลายคู่ ไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันชนิดโอเมก้า 6 และ 9 เพิ่มขึ้นหลังจากการหมัก (59.10, 53.13, 54.77, 53.53 และ 55.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

ผลของการเสริม FSP ในระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารสุกรอนุบาลแสดงผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสุกร เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกลุ่มกรดอะมิโนที่มีรสชาดขมซึ่งเป็นผลต่อรสชาติ ส่งผลต่อปริมาณการกินอาหารลดลงเมื่อเสริมที่ระดับดังกล่าว ส่วนกลุ่มที่เสริม FSP 5, 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัม อัตราการเจริญเติบโตของสุกรไม่แตกต่างกันกับกลุ่ม CON และกลุ่ม CAN ( $P<0.05$ ) แต่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ ส่วนการเสริม FSP 15 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร สามารถลดอัตราการเกิดท้องเสียในสุกรหย่านมได้ แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม CAN ( $P<0.05$ ) ลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนต้น ความลึกของคริปต์ (Crypt dept; CD) ในกลุ่มที่เสริม FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร มีแนวโน้มใกล้เคียงกับการเสริม FSP 15 กรัมต่อกิโลกรัม ( $P<0.05$ ) การเสริม FSP 20 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร ส่งผลให้ความสูงของวิลลัส (Villus height; VH) และ พื้นที่ของวิลไล (Villous area; VSA) มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริม FSP 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร แต่ต่ำกว่ากลุ่ม CAN ส่วนการเสริม FSP 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหารสัดส่วนของวิลลัสและคริปต์ (VH:CD) สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ( $P<0.05$ ) สำหรับลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนกลางต่อการเสริม FSP 15 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร ส่งผลให้ VH, VH:CD, VW และ VSA สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ( $P<0.05$ ) ส่วน VW, VSA และ CD มีค่าต่ำสุดในกลุ่ม CAN ( $P<0.05$ ) และการเสริม FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหารทำให้ VH:CD และ VW มีแนวโน้มใกล้เคียงกับที่ระดับการเสริม FSP 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร ( $P<0.05$ ) และลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนปลายการเสริม FSP 15 กรัมต่อกิโลกรัมพบว่า VH และ VSA ของกลุ่ม CON สูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น และ VSA ของกลุ่มที่เสริม CAN, FSP 5, 10 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหารใกล้เคียงกับกลุ่ม CAN ( $P<0.05$ ) ส่วน CD ต่ำที่สุดในกลุ่มที่เสริม FSP 15 กรัมต่อ

กิโลกรัม เมื่อพิจารณาจากสมรรถภาพการเจริญเติบโตของสุกรกับสัณฐานวิทยาแล้วการเสริมที่ระดับ 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมให้ผลเชิงบวก และสามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-12(p40) เปรียบเทียบกับ Cyclophilin A โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมด้วยประเมินการตอบสนองต่อวัคซีนปากและเท้าเปื่อยสุกร และวัคซีน Porcine Circovirus (PCV) จากเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลางพบว่า IL-1 $\beta$  ของกลุ่มที่เสริม FSP 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  ของกลุ่มที่เสริม FSP 20 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วน IL-12(p40) ของ CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และ กลุ่มที่เสริม FSP 5-15 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วนเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลางพบว่า IL-1 $\beta$  ของกลุ่มที่เสริม FSP 5, 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  ของ CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON ( $P < 0.05$ ) ส่วน IL-12(p40) ของกลุ่มที่เสริม FSP 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และกลุ่มที่เสริม FSP 20 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON ( $P < 0.05$ ) สำหรับการฉีดวัคซีน FMD และ PCV2 ของสุกรช่วง 28 วันหลังจากหย่านมศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ และ FSP พบว่า TNF- $\alpha$ , IL-12(p40) และ IL-1 $\beta$  กลุ่มของยีนเหล่านี้แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม และสูงขึ้นตามลำดับของระดับการเสริม FSP ที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลาง จึงจัดไซโตไคน์เหล่านี้เป็น Pro-inflammatory cytokines ที่สามารถยับยั้งการเกิดการอักเสบ และกระตุ้นการดำเนินสิ่งแปลกปลอม จากนั้นปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากการทำงานของแอนติเจน และส่งเสริมการกระจายวัคซีนไปยังเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าการแสดงออกของ TNF- $\alpha$  ในกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON และกลุ่มที่เสริม FSP 5-20 กรัมต่อกิโลกรัม ( $P < 0.05$ ) เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงช่วงก่อนและหลัง 3 วันของการฉีดวัคซีนในสุกรไม่ควรผสมยาปฏิชีวนะลงในอาหาร เนื่องจากการแสดงออกของไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าปกติจะมีส่วนในการก่อกวนการทำงานของวัคซีน

ดังนั้นการใช้ประโยชน์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่มีต้นทุนต่ำด้วยการทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส ฟาร์มสุกรในการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นนำไปเพิ่มคุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบชีวเคมีโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก แล้วผ่านกรรมวิธีที่เหมาะสมต่อการเป็นสารเสริมอาหารในสุกรช่วงหย่านม สามารถนำไปเสริมที่ระดับ 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม หรือ 1-1.5% ในอาหารสุกรช่วงหย่านม ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต แต่ให้ผลดีต่อสุขภาพทางเดินอาหาร ลดอัตราการเกิดท้องเสีย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และส่งเสริมการทำงานของวัคซีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ





<b>Title</b>	FEED SUPPLEMENT PRODUCTS FOR IMMUNOMODULATION IN WEANING PIGS FROM FERMENTED SPIRULINA
<b>Author</b>	ADISAK KONGKEAW
<b>Advisor</b>	Associate Professor Wandee Tartrakoon, Ph.D.
<b>Co-Advisor</b>	Assistant Professor Rangsun Charoensook, Ph.D. Assistant Professor Wittaya Tawong , Ph.D.
<b>Academic Paper</b>	Thesis M.S. in Animal Science - (Type A2), Naresuan University, 2020
<b>Keywords</b>	Fermented spirulina Intestinal morphology Immune system Weaning pig

### ABSTRACT

Many factors currently contribute to changes in farming and management, such as emerging diseases, meaning the importance of choosing to consume pork without antibiotic residues has increased. Therefore, spirulina is an interesting alternative, used as a supplement in pig feed. However, the cost factor and spirulina cell wall thickness, which consists of a group of fibers, make it in unsuitable for supplementing feeds intended for young pigs. The fermentation process for spirulina is an alternative to increasing the potential of spirulina. Therefore, this study aimed to study the low-cost cultivation of spirulina. The process of fermenting spirulina with an appropriate microorganism may be suitable for nutritional enrichment to be a prototype for fermented spirulina (FSP) production as feed supplements for weaned pigs. The trial was divided into three parts. The first experiment strived to cultivate spirulina using organic matter from pig farm wastewater in three sources including center tank ponds, bio-gas ponds, and oxidation ponds. They were replaced in Zarrouk Medium at ratios of 0, 40, 60, and 80 percent using Complete Randomized Design (CRD) to assess algae growth rate, bioactive substances, and chemical composition. After that, the spirulina was cultured in a standard, medium-sized production unit, and then cultured according to the suitable conditions. The spirulina obtained from the first experiment was used

in the second experiment, which designed the 4 X 4 factorial experiments. Spirulina was fermented with *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 with the first factor being the quantity of *L. plantarum* TISTR 2075 of 0, 2, 3, and 4% per spirulina volume and solvent. The second factor was the duration for fermentation, which lasted for 0, 36, 48 and 72 hours. The optimal ratios for fermentation efficiency, chemical composition, biological compounds, and antioxidant activity were evaluated. It was also simulated as a medium-sized production unit in order to be a prototype for industrial fermentation spirulina. In the third experiment, a total of 48 (Duroc x Large White x Landrace) pigs were weaned at 21±0.5 days of age and divided into six experimental groups, Each group contained one pig per replication as follows: 1) control group (CON) fed basal diet; 2) control group fed the basal diet supplemented with an antibiotic (CAN); 3) to 6) experimental groups fed the basal diet supplemented with 5, 10, 15 and 20 g. of FSP per kg of feed, respectively. The growth performance, intestinal morphology, cytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40 gene expression, and the response of these cytokines to FMD and Porcine Circovirus (PCV) vaccine in the tissues of the intestines and spleen of the experimental pigs were evaluated.

As a result of the initial study, 85 percent of the performance was found from the cultivation of spirulina by substituting 80 % of Zarrouk's Medium with organic matter from the pig farms' biogas ponds. It was evaluated based on changes in pH, optical density (OD), chlorophyll *a*, carotenoid, phycocyanin, carbohydrate, protein, fat, biomass, and algae culture costs, especially biological compounds and protein, which were the highest compared to other groups. Besides, the lowest cost was found to be only 141.05 Baht per kilogram considering the cost of spirulina cultivation in this group. The produced spirulina contained chemical elements including 51.13 % protein, gross energy 3386 kcal/kg, essential amino acids such as lysine, methionine, threonine, and tryptophan (1151, 1209, 392, and <20 mg per 100 grams respectively), as well as fatty acids containing gamma-linolenic acid, omega-6 and Omega 9 polyunsaturated fatty acids (0.05, 0.15, 146.13 and 29.80 g per 100

grams, respectively)

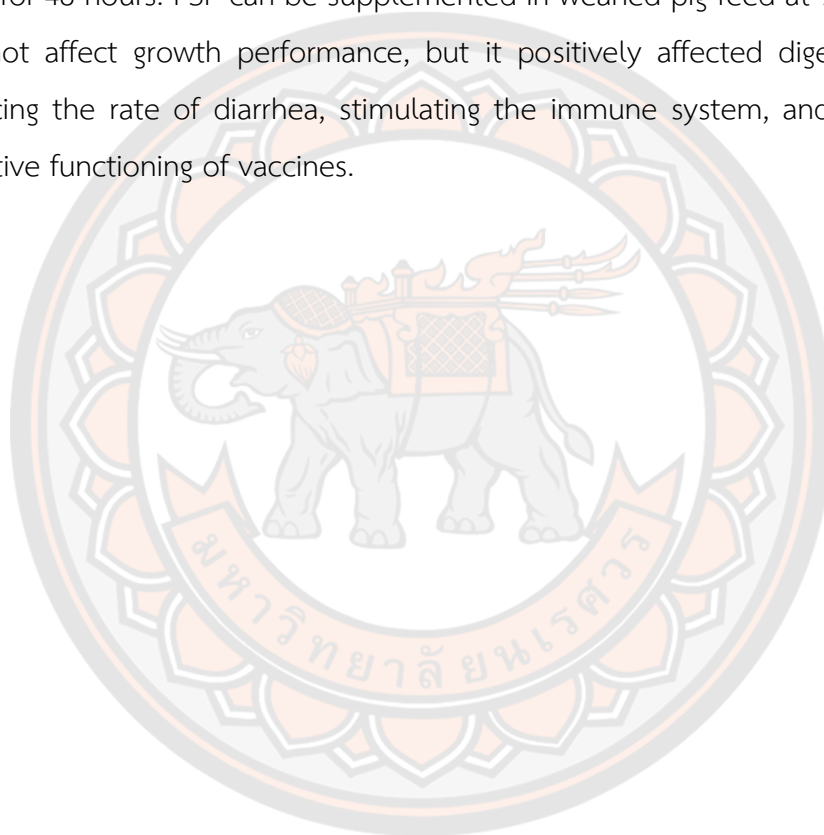
For spirulina fermentation efficiency in the second experiment, it was found that the survival after 72 hours of fermentation of *L. plantarum* TISTR 2075 was 5.60 log CFU/ml, much more significant than other fermentation periods ( $P < 0.05$ ). Total Phenolic Content (TPC) was more significant than other groups ( $P < 0.05$ ) at a fermentation period of 48-72 hours, regardless of the amount of *L. plantarum* TISTR 2075 used ( $P < 0.05$ ). Fermentation with *L. plantarum* TISTR 2075 for 36, 48 and 72 hours had a higher Antioxidant Potential Capacity (APC) value than the group that started fermentation ( $P < 0.05$ ). The largest APC ( $P < 0.05$ ) was found when using the 4% *L. plantarum* TISTR 2075 dose. The largest percentages ( $P < 0.05$ ) of chlorophyll *a*, carotenoid, beta-carotene, polysaccharides, and protein were found at fermentation periods of (36 and 48), (36 and 72), 48, 72, and 48 hours, respectively. Moreover, *L. Plantarum* TISTR 2075 used in fermentation 4 and 3-4% contains the highest amounts of carotenoids and polysaccharides ( $P < 0.05$ ). Therefore, it can be concluded that the fermentation of spirulina with 4% *L. Plantarum* TISTR 2075 for 48-hour fermentation period was the best fermentation condition for the biological and nutritional compounds of fermented spirulina (FSP).

The effects of FSP supplementation at 20 g/kg in weaning pig diet had a negative effect on growth efficiency due to the increase in the group of amino acids with a bitter taste. The effects of feed intake on pigs decreased when supplementing FSP at such levels. FSP supplements 5, 10, and 15 g/kg diet, the growth rate of pigs was no different to CON and CAN group. However, feed efficiency was higher than that of the CAN group ( $P < 0.05$ ). The supplement of FSP 15 g/kg diet could reduce the incidence of diarrhea in weaned pigs with no difference from the CAN group (22.52 and 19.05 %) ( $P < 0.05$ ). Small intestine morphology showed the lowest duodenal crypt depth (CD) in the group of pigs fed the diet supplemented FSP 15 g/kg and the best of villous height: crypt depth (VH: CD) was found in the group of pigs fed the diet supplemented FSP 10 and 15 g/kg ( $P < 0.05$ ). For the morphological

characteristics of jejunum, when the pigs fed a diet supplemented FSP 15 g/kg, it resulted in the VH, VH: CD, Villous wide (VW), and Villous surface area (VSA) with the best values ( $P<0.05$ ). The lowest CD and the best VH: CD was found in the ileum of the pig fed a diet supplemented with FSP 15 g/kg ( $P<0.05$ ). Considering the growth performance of pigs, including intestinal morphology, the supplementation of FSP at 10-15 g/kg diet had a positive effect and may be substituted for antibiotics. The results were consistent with the results of the study of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , and IL-12(P40) gene expression compared to Cyclophilin A in the jejunum and spleen tissue using RT-PCR techniques, including assessing the response of those genes to Foot and Mouth Disease and Porcine Circovirus (PCV) vaccines. There was a higher expression of IL-1 $\beta$  from jejunum tissue of the pig fed diet supplemented FSP 10-15 g/kg than the CON ( $P<0.05$ ). On the other hand, the expression of IL-12(p40) was lower than the CON group ( $P<0.05$ ). However, it was found from the CAN group to be expressed higher than the CON group ( $P<0.05$ ). As well the expression of the TNF- $\alpha$  of the pig in CAN group was higher than the CON group ( $P<0.05$ ). As for expression in the spleen tissue of pigs, the group supplemented FSP 5, 15 and 20 g/kg in the diet had higher IL-1 $\beta$  gene expression than the CON group ( $P<0.05$ ), including the expression of the TNF- $\alpha$  of CAN pigs, which was higher than the CON group ( $P<0.05$ ). The expression of the gene IL-12(p40) in the spleen of the pig fed diet supplemented FSP 10-20 g/kg higher than CON group ( $P<0.05$ ). The cytokine responds in pig spleen tissues after FMD and PCV2 vaccination 28 days after weaning. The treatment comparison between groups that supplement antibiotics, FSP and CON group, the expression of TNF- $\alpha$ , IL-12 (p40), and IL-1 $\beta$  of the FSP supplemented group was higher than that of the CON group and was higher with higher FSP supplementation levels. The expression of IL-12 (p40) for the FSP supplement group 10-20 g / kg was higher than the CON ( $P<0.05$ ) and was also higher than that of the CAN and FSP 5 g / kg group. This indicates that supplementing FSP10-20 g/kg promotes the distribution of the vaccine to tissues or organs involved in the immune system. It was also found that the expression of TNF- $\alpha$  in the CAN group was higher than that of the CON group and the group that supplemented FSP by 5-20 g/kg ( $P<0.05$ ). Thus, the pre-and

post-3-day period of vaccination in pigs should not be mixed with antibiotics in the diet. Due to the higher than normal expression of cytokines in the immune system, it is used against vaccines functioning.

The cultivation of low-cost spirulina was achieved by replacing 80% of Zarrouk Medium with wastewater from biogas ponds located at pig farms. After that, fermentation of the spirulina was achieved with 4% *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 for 48 hours. FSP can be supplemented in weaned pig feed at 10-15 g per kg. It did not affect growth performance, but it positively affected digestive health by reducing the rate of diarrhea, stimulating the immune system, and promoting the effective functioning of vaccines.



## ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ รศ.ดร. วันดี ทาตระกูล ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศส่วสละเวลาอันมีค่ามาเป็นທີ່ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณคณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อันประกอบด้วย ผศ.ดร. รังสรรค์ เจริญสุข และ ผศ.ดร. วิทยา ทาวงค์ และ ผศ.ดร. นรภัทร หวันเหลี่ยม กรรมการสอบโครงร่าง และสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อีกทั้ง รศ.ดร. วรณพร ทะพิงค์แก รองคณบดีและอาจารย์ประจำสาขาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ให้ข้อชี้แนะและให้คำปรึกษาจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ฟาร์มสุกรพันธุ์เขาน้ำสุด บมจ.เบทาโกรเกษตรอุตสาหกรรม เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์น้ำเสียจากฟาร์มสุกรเพื่อใช้เป็นอินทรีย์วัตถุทดแทนสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนาในการทำวิจัย และ Lactobacillus plantarum TISTR 2075 ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พร้อมกันนี้ขอขอบพระคุณ บมจ. เว็ทอินเตอร์ บิสซิเนส ร่วมกับ โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ภายใต้การดำเนินการของ สกสว. สนับสนุนทุนแก่ผู้วิจัยฯ และสรรคสร้างนวัตกรรมผลิตภัณฑ์สารเสริมภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านมจากสไปรูลีนา จนได้รางวัลการนำเสนอนวัตกรรมดีเด่นจากการประกวดนวัตกรรมจากวิทยานิพนธ์และการค้นคว้าอิสระ และรับรางวัลนำเสนอดีเด่นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์ในงานประชุมวิชาการแก่นเกษตรกร ขอขอบพระคุณ บมจ. พีทีอาร์ อาหารสัตว์ อำนวยความสะดวกจัดหาสุกรหย่านมเพื่อนำมาวิจัยฯ และ บมจ. ออกต้าเมมโมเรียล สนับสนุน Mycotoxin binder และ Pellet binder เพื่อใช้สำหรับผสมอาหารอัดเม็ด ซึ่งเป็นอาหารใช้สำหรับในการทดลอง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ นิสิตปริญญาตรี และนิสิตปริญญาโท สาขาสัตวศาสตร์ฯ และสาขาวิทยาศาสตร์การประมง สนับสนุนและช่วยเหลืองานวิจัยในด้านต่าง ๆ เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้ที่มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า สามารถเป็นต้นแบบกระบวนการสรรคสร้างนวัตกรรมสารเสริมอาหารในสุกรหย่านมที่สามารถใช้ได้จริงในภาคอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย

อดิศักดิ์ คงแก้ว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
ประกาศคุณูปการ.....	ฐ
สารบัญ.....	๗
สารบัญตาราง.....	ด
สารบัญภาพ.....	น
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.4 ตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย.....	4
1.5 ระยะเวลาการทำวิจัยโครงการวิจัย.....	4
1.6 สถานที่ใช้สำหรับการวิจัย.....	5
1.7 สมมติฐานของการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 สาหร่ายสไปรูลิน่า <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> .....	6
2.2 ลักษณะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า.....	10
2.3 การหมัก (Fermentation).....	11
2.4 คุณสมบัติของพรีไบโอติกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	18



2.5 ระบบภูมิคุ้มกัน.....	23
2.6 อวัยวะในระบบภูมิคุ้มกัน .....	28
2.7 สรีระวิทยาและสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กของสุกร .....	31
2.8 ไซโตไคน์ (Cytokine) .....	34
2.9 การใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-Time PCR) ต่อการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านม.....	39
2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างไซโตไคน์และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านม .....	40
2.11 การศึกษาการเสริมสาหร่ายสไปรูลินาในสัตว์และคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน.....	42
2.12 ปัจจัยความเครียดที่มีผลต่อสุขภาพ และการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันของสุกรหย่านม.....	46
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	50
3.1 การทดลองที่ 1 ต้นแบบกรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา ( <i>Spirulina platensis</i> ) ที่เหมาะสมโดยใช้ของเหลือจากฟาร์มสุกรเป็นอินทรีย์วัตถุทดแทนสูตรอาหารซารุค .....	50
3.2 การทดลองที่ 2 การวิจัยต้นแบบการผลิต ผลิตภัณฑ์สไปรูลินา โดยการศึกษาวิธีการหมักสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria).....	56
3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ SP ในสุกรหลังหย่านม.....	64
3.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาลำไส้.....	71
3.5 วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน .....	73
3.6 เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกระดับการเสริม FSP ในอาหารสุกรหย่านม .....	75
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	77

4.1	ต้นแบบกรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิना (Spirulina platensis) ที่เหมาะสม โดยใช้ของเหลือจากฟาร์มสุกรเป็นอินทรีย์วัตถุทดแทนสูตรอาหารซารุค.....	77
4.2	ผลการศึกษา การวิจัยต้นแบบการผลิต ผลิตภัณฑ์สไปรูลิना โดยการศึกษาวิธีการ หมักสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) .....	96
4.3	ผลการศึกษาการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ FSP ในสุกรหลังหย่านม .....	111
4.4	ผลการศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ และ IL-12p40 ในเนื้อเยื่อ ม้าม (spleen) และลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) ด้วยเทคนิค quantitative PCR (qPCR).....	119
บทที่ 5	บทสรุป .....	124
5.1	อภิปรายผล.....	124
5.2	สรุปผลการวิจัย.....	155
5.3	ข้อเสนอแนะ.....	156
บรรณานุกรม	.....	158
ภาคผนวก	.....	159
อภิธานศัพท์	.....	211
ประวัติผู้วิจัย	.....	216

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 Chemical composition of spirulina.....	8
ตาราง 2 Vitamin and mineral composition of spirulina .....	9
ตาราง 3 Amino acid composition of spirulina.....	9
ตาราง 4 Vitamin and mineral composition of spirulina .....	10
ตาราง 5 Inhibition zone of Lactobacillus sp. using agar well diffusion method (mean* ± SE) .....	16
ตาราง 6 The ratio of waste-water from CT, biogas or Oxidation Pond: Algae Stock : Stock Zm .....	53
ตาราง 7 The ratio of modified Zarrouk's medium used following Table 6.....	53
ตาราง 8 Composition and nutritive values of the experimental diets of weaning pig .....	69
ตาราง 9 The sequence of primers used in this study .....	76
ตาราง 10 Changing pH content in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond.....	77
ตาราง 11 Changing pH content in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond .....	78
ตาราง 12 Changing pH content in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium waste water farm with oxidation pond.....	79
ตาราง 13 Changing of OD value in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond .....	80

ตาราง 14 Changing of OD value in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond .....	81
ตาราง 15 Changing of OD value in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond with oxidation pond .....	82
ตาราง 16 Changing of chlorophyll a content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond.....	83
ตาราง 17 Changing of chlorophyll a content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond.....	84
ตาราง 18 Changing of chlorophyll, a content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with bio-gas pond. with waste water farm oxidation pond.....	85
ตาราง 19 Changing of carotenoid content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond.....	86
ตาราง 20 Changing of carotenoid content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond.....	88
ตาราง 21 Changing of carotenoid content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm oxidation pond.....	88
ตาราง 22 Changing of carbohydrate content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm.....	89
ตาราง 23 Composition of Phycocyanin (PC), Allophycocyanin (APC) and Phycoerythrin (PE) (mg/g) in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond.....	90
ตาราง 24 Composition of protein and fat (%) in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond ..	91

ตาราง 25 Composition of spirulina Bio mass (g) in different cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond ..92

ตาราง 26 Composition of costs (bath/kg) spirulina cultures in different cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond.....92

ตาราง 27 Performance percentages and conidian comparison of each parameter .....93

ตาราง 28 Essential amino acid and Fatty acids composition in spirulina culture produced in the large scale (1000L).....95

ตาราง 29 The effect of Lactobacillus plantarum TISTR 2075 concentration and fermentation period for spirulina fermentation on antioxidant efficiency and nutritional composition<sup>1</sup> ..... 105

ตาราง 30 The effect of Lactobacillus plantarum TISTR 2075 concentration and fermentation period for spirulina fermentation on antioxidant efficiency and nutritional composition<sup>2</sup>. ..... 106

ตาราง 31 Performance percentages and the comparison of the confidence for each parameter of fermentation period and % L. plantarum TISTR 2075 107

ตาราง 32 Chemical composition of spirulina (SP) and fermented spirulina (FSP).... 109

ตาราง 33 Amino acids profile (mg/100g) of spirulina (SP) and fermented spirulina (FSP) ..... 109

ตาราง 34 Fatty acids composition (g/100g) of spirulina (SP) and fermented spirulina (FSP)..... 110

ตาราง 35 Pathogenic test in spirulina and fermented spirulina ..... 111

ตาราง 36 Effect of fermented spirulina (FSP) supplementation on growth performance of weaned pigs ..... 114

ตาราง 37 Effect of fermented spirulina (FSP) supplementation on Small intestinal histomorphology of weaned pigs.....	117
ตาราง 38 Effect of relative normalized expression of cytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ and IL-12 p40) in Jejunum and spleen tissue of weaning pig.....	121
ตาราง 39 Gustatory responsiveness of pigs to L-amino acids and predominant hedonic response in humans and Pig .....	142
ตาราง 40 Concentration level of gallic acid (ppm) .....	180
ตาราง 41 Standards Gallic acid at the absorbance with UV-Vis Spectrophoto- .....	181
ตาราง 42 Concentration level of L-ascorbic acid ( $\mu$ g/ml) .....	183
ตาราง 43 Standard L-ascorbic acid at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 695 nm .....	185
ตาราง 44 Beta-carotene standard solution in volume 10 ml.....	189
ตาราง 45 Standard Beta-carotene solution concentration 20 $\mu$ g/ml at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 450 nm.....	190
ตาราง 46 Glucose standard solution at concentrations of 10, 20, 40, 50 and 80 mg / L.....	192
ตาราง 47 Standards D Glucose at the absorbance with Spectrophotometer 490 nm.....	193
ตาราง 48 Standard D-glucose at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 490 nm.....	194
ตาราง 49 Concentration of Bovine serum albumin solution (mg/ml).....	196
ตาราง 50 Standard Bovine serum albumin (BSA) solution concentration 1000 ( $\mu$ g/ml) at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 750 nm.....	197

ตาราง 51 Comparison of different mean to relative normalized expression between the experimental group and the control group..... 198

ตาราง 52 Program preparation of intestine of Tissue Processor (1 Tank :1 jar) use time 15 hours..... 203



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 Spirulina platensis.....	6
ภาพ 2 Algae cell structure (Chlorella, Nannochloropsis, Arthrospira and Scenedesmus)	8
ภาพ 3 Lactic acid production with microbial fermentation.....	13
ภาพ 4 The correlation curve of L. plantarum ATCC 8014 and lactic acid content over fermentation time .....	15
ภาพ 5 The pH change per fermentation from 6.48 to 4.43 within 16 hours .....	15
ภาพ 6 Structure of spirulina .....	17
ภาพ 7 Changes in gut microbes associated with inflammation in the high-fat diet group. and low-fiber compared to the group who received a supplement that had low fat, high fiber to change the production of short-chain fatty acids and the prevention of intestinal inflammation .....	19
ภาพ 8 Mechanism of action of prebiotics in the digestive tract.....	20
ภาพ 9 Pig immunity development graph .....	25
ภาพ 10 The spleen and tissue arrangement are white pulp and red pulp.....	29
ภาพ 11 Initiation of the immune response in the gut: antigens are taken up by microfold (M)-cells and process to the subepithelial dome (SED)-resident dendritic cells (DCs) in Peyer's patches. T-follicular helper (TFH) cells interact with B-cells and follicular dendritic cell (FDC) thus forming a germinal center. Antigen specific plasma cells and memory B-cells are generated and migrate through the blood and mesenteric lymph nodes.....	31
ภาพ 12 The anatomy of the small intestine. (a), (b) the surface area of the intestinal wall (c) Villus and (d) Gastrointestinal mucosal cells and microvillus.....	33



<p>           ภาพ 13 Mechanisms of intestinal barrier dysfunction induced by production stressors in pigs.....         </p>	<p>47</p>
<p>           ภาพ 14 Impact of early weaning on the developmental trajectory of gastrointestinal (GI) barrier function.....         </p>	<p>48</p>
<p>           ภาพ 15 Center tank pond (A), Bio-gas pond (B) Oxidation Pond (C) and Experimental ponds .....         </p>	<p>52</p>
<p>           ภาพ 16 Experimental method of spirulina fermentation with <i>L. plantarum</i> TISTR 2075.....         </p>	<p>63</p>
<p>           ภาพ 17 Intestinal morphology measurement.....         </p>	<p>72</p>
<p>           ภาพ 18 The relationship between lactic acid (%), fermentation period and pH changes during spirulina fermentation process.....         </p>	<p>97</p>
<p>           ภาพ 19 Chlorophyll a content in spirulina during fermentation period compared with chlorophyll a content in spirulina before fermentation .....         </p>	<p>101</p>
<p>           ภาพ 20 Carotenoid content in spirulina during fermentation period compared with carotenoid content in spirulina before fermentation .....         </p>	<p>101</p>
<p>           ภาพ 21 Polysaccharide content in spirulina during fermentation period compared with polysaccharide content in spirulina before fermentation.....         </p>	<p>104</p>
<p>           ภาพ 22 Protein content in spirulina during fermentation period compared with polysaccharide content in spirulina before fermentation.....         </p>	<p>104</p>
<p>           ภาพ 23 The effect of the FSP supplementation on the relative mRNA expression of IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-12p40 in jejunum tissue.....         </p>	<p>122</p>
<p>           ภาพ 24 The relative mRNA expression of IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-12p40 in jejunum tissue of pig fed diet FSP supplementation .....         </p>	<p>122</p>

ฅฅ 25 The effect of the FSP supplementation the relative mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 in spleen tissue .....	123
ฅฅ 26 The relative mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 in spleen tissue of pig fed diet FSP supplementation .....	123
ฅฅ 27 Changing percentage in the score card of fermented evaluation .....	138
ฅฅ 28 Performance percentages and comparison conditions of each parameter in weaning pig fed diet supplemented with fermented spirulina (FSP).....	152
ฅฅ 29 Hypothesized mechanism of immunomodulation.....	154
ฅฅ 30 Relationship between absorbance and Gallic acid with UV-Vis Spectrophotometer 720 nm. ....	182
ฅฅ 31 Relationship between absorbance and L-ascorbic acid with UV-Vis Spectrophotometer 695 nm .....	185
ฅฅ 32 Relationship between absorbance and Beta-carotene solution concentration 20 $\mu$ g/ml with UV-Vis Spectrophotometer 450 nm .....	191
ฅฅ 33 Relationship between absorbance and carbohydrate level (D-Glucose) with spectrophotometer 490 nm.....	193
ฅฅ 34 Relationship between absorbance and D-glucose concentration.....	194
ฅฅ 35 Relationship between absorbance and Bovine serum albumin (BSA) solution concentration 1000 $\mu$ g/ml with UV-Vis Spectrophotometer 750 nm.....	196

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาของปัญหา

ความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์ ที่ใส่ใจในคุณภาพ และความปลอดภัยของเนื้อสุกรมากขึ้น ส่งผลทำให้ปศุสัตว์มาถึงยุคที่ต้องลดการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างจริงจังในท่ามกลางการระบาดของโรคของสุกรมากขึ้น สำหรับปศุสัตว์ด้านสุกร ในภาคธุรกิจการผลิตสุกรทั้งเอกชนรายใหญ่ และรายย่อย ต่างต้องการลดต้นทุนด้านอาหาร ด้านยาปฏิชีวนะ เพื่อหวังผลกำไรจากเลี้ยงสุกร และผลิตเนื้อสุกรที่ปลอดภัยและมีคุณภาพ ซึ่งเป็นเหตุผลให้บริษัทที่จัดจำหน่ายเวชภัณฑ์ สารเสริมในอาหารสัตว์ มีความต้องการผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพการผลิตสุกร อีกทั้งสามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ดีขึ้น เพื่อลดโอกาสการเกิดโรค ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบันเป็นการใช้สารเสริมที่เป็นผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบจากธรรมชาติ เสริมในระดับที่เหมาะสม มีคุณสมบัติพิเศษในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน อีกทั้งสามารถเป็นแหล่งโภชนาหลักที่ช่วยเสริมสร้างความสมดุลของสารอาหารให้กับสุกร สำหรับสารเสริมในงานวิจัยนี้มีแนวคิดเพื่อแก้ไขปัญหาผลกระทบจากกระบวนการหย่านมของลูกสุกรที่อายุ 21 วัน ซึ่งเป็นระบบการเลี้ยง การจัดการปกติของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรของประเทศไทยในปัจจุบัน การหย่านมเป็นหนึ่งในเหตุการณ์ที่ส่งผลต่อความเครียดของสุกร (Xu et al., 2017) โดยเฉพาะการจัดการลูกสุกรหย่านมใหม่ในช่วงสัปดาห์แรก (Weanling pigs) มีการเปลี่ยนแปลงโภชนาจากนม อาหารเหลว และอาหารเม็ด ความเครียดจากการถูกพรากจากแม่ เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นพร้อมกับภูมิคุ้มกัน และระบบการย่อยอาหารยังไม่สมบูรณ์ และพฤติกรรมทางสังคม ส่งผลให้สุกรมีอาการท้องร่วงหลังหย่านมก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากในอุตสาหกรรมสุกร (Jayaraman et al., 2017) ซึ่งส่งผลต่อการทำงานลดลงของเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้เล็ก (Patil et al., 2015) นอกจากนี้สุกรที่หย่านมใหม่ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์โดยเฉพาะช่วงอายุ 3-4 สัปดาห์เป็นช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรค เนื่องจากเป็นช่วงที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ ฉะนั้นมักมีการดูแลอย่างพิเศษ รวมถึงการสร้างภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนจะเป็นช่วงนี้เช่นกัน (Chen et al., 2017) ผู้เลี้ยงสุกรจะต้องให้ความสำคัญในการจัดการทุกด้านที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะการจัดการด้านอาหาร และด้านสภาพแวดล้อม เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมทำให้เกิดความเครียด และส่งผลต่อเนื่องต่อปริมาณการกินอาหารลดลง สมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สุกรจะถ่ายเหลว หรือแม้กระทั่งการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร มีผลต่ออัตราการตายที่สูงขึ้น หรือไม่ก็เกิดการแคระแกร็น เลี้ยงต่อได้แต่ก็เจริญเติบโต

ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวเรียกว่า lag-phase หรือสภาวะ set-back โดยสรุปปัจจัยที่กล่าวมานั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสมดุลการย่อยและการดูดซึมสารอาหารของสุกรในช่วงวัยอ่อนยังไม่สมบูรณ์มากนัก สุกรต้องได้รับโภชนาที่ใกล้เคียงกับนมของแม่สุกรก่อนปรับมาเป็นอาหารเม็ดและปรับระดับตามความต้องการอย่างเหมาะสม (Aumaitre et al., 1995) ร่วมด้วยความสมบูรณ์และฟังก์ชันการทำงานของลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้ ต่อการเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกัน มักเกิดจากการหย่านมก่อนกำหนดซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตในระยะยาว และส่งผลโดยตรงต่อสมดุลเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร มูลเหตุจากข้างต้นผู้เลี้ยงสุกรต้องใช้ยาปฏิชีวนะต่อการควบคุมการติดเชื้อก่อโรคของสุกรช่วงหย่านม และจะส่งผลต่อเนื่องถึงการเกิดเชื้อดื้อยาในจุลินทรีย์ของระบบทางเดินอาหารมนุษย์ (Larivière et al., 2018) สำหรับทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพต่อการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะหรือการลดสัดส่วนการใช้ โดยการเสริมโปรไบโอติกสารเสริมภูมิคุ้มกันในอาหารของสุกร ซึ่งมีประโยชน์ช่วยส่งเสริมความสมดุลของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ โดยเฉพาะโปรไบโอติกจากกลุ่มของ *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในการผลิตสุกรเนื่องจากการหย่านมจะลดความสมบูรณ์ของแลคโตบาซิลัสภายในลำไส้ (Dowarah et al., 2017) นอกจากนี้การเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระดับที่เหมาะสมจะช่วยปรับปรุงสุขภาพของลำไส้ เช่น *L. plantarum* PFM 105 และ *L. plantarum* CAM6 สามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสุกรหย่านมได้ โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และคุณสมบัติทางชีวเคมีในเลือด และระดับ IgA (Betancur et al., 2020) สำหรับผลเชิงลบถ้าหากพบว่าสุกรมีอาการท้องเสียหลังจากการหย่านมมักเกิดจากความผิดปกติของจุลินทรีย์ในลำไส้ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียอย่างเฉียบพลัน อาจต่อเนื่องจนส่งผลกระทบต่อปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยลดลง การเจริญเติบโตช้ากว่ามาตรฐานของอายุ (Campbell et al., 2013) โดยทั่วไปแล้วการเกิดอาการท้องเสียมักเกิดจากการติดเชื้อ *enterotoxigenic Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* (Da Rosa et al., 2015) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาสารเสริมที่เหมาะสมสำหรับสุกรระยะหลังหย่านม ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อสัตว์ คุ่มค่าทางเศรษฐกิจต่อผู้เลี้ยงสัตว์ รวมถึงสะดวกการใช้ Chaiklahan และคณะ (2010) รายงานว่าสาหร่ายสไปรูลิน่า สามารถช่วยเพิ่มกากและปรับสภาพของอุจจาระสุกรให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพราะสไปรูลิน่ามีระดับโปรตีนสูงถึง 50-70% ของน้ำหนักแห้ง มีไซยาโนแบคทีเรียชนิดกินได้ และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายสูง มีการศึกษาการเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าปริมาณ 2% ในอาหารสุกรหลังหย่านม 14-28 วัน ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม ( $P < 0.05$ ) และการเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารสุกรหลังหย่านม 0-42 วันหลังจากหย่านม มีแนวโน้มของอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม (Grinstead et al., 2000) แต่ยังไม่มียางานการเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ผ่านกระบวนการหมักต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกัน

ของสุกรอนุบาล โดยทั่วไปแล้วกลไกทางสรีรวิทยาของสัตว์เอนไซม์การย่อยอาหาร หรือระบบการทำงานของทางเดินอาหารของสุกรที่หย่านมใหม่ยังไม่สมบูรณ์ที่จะสามารถย่อยอาหารที่มีคุณสมบัติเยื่อใยสูง ซึ่งสไปรูลินามีผนังเซลล์หนา สุกรวัยอ่อนจึงไม่สามารถใช้ประโยชน์ของคุณค่าทางอาหารของสไปรูลินาได้หมด อีกทั้งการนำสาหร่ายสไปรูลินามาใช้ในอาหารสัตว์ ยังมีข้อจำกัดด้านต้นทุนการผลิต ผู้วิจัยต้องการคิดค้นกระบวนการเพาะเลี้ยง และแปรรูปสไปรูลินาให้มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร เพิ่มผลกำไรจากการลดอัตราการตาย และสร้างรายได้ให้เกษตรกรไทยที่มีอาชีพเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ทำการศึกษาการนำผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายสไปรูลินาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำที่ผ่านการบำบัดจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรมาใช้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตแล้วนำสไปรูลินาที่ได้มาผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์เพิ่มคุณค่าทางอาหาร ผ่านขั้นตอนกรรมวิธีที่มีมาตรฐานในการแปรรูป โดยที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และไวรัส ต่อจากนั้นศึกษาปริมาณการเสริมในอาหารของสุกรช่วงหย่านมที่ระดับเหมาะสมต่อการส่งเสริม ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และความสมบูรณ์ของระบบทางเดินอาหาร โดยตรวจสอบจากสัญญาณวิทยาลัยและระดับภูมิคุ้มกัน อีกทั้งสามารถนำผลการวิจัยในครั้งนี้ ไปส่งเสริมเพื่อสร้างอาชีพให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรมีรายได้เสริมจากการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา และไปต่อยอดการประยุกต์ต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมการผลิตสุกรให้แพร่หลายมากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาให้มีต้นทุนต่ำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเสริมในอาหารสุกรช่วงหย่านม

1.2.2 เพื่อศึกษาขั้นตอนการหมักสาหร่ายสไปรูลินาด้วยจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร กระบวนการแปรรูปที่เหมาะสม และความปลอดภัยตามคุณสมบัติของอาหารเสริมในสัตว์

1.2.3 เพื่อศึกษาการเสริมสาหร่ายสไปรูลินาที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ในระดับที่เหมาะสม ในอาหารสุกรอนุบาลต่อดัชนีประสิทธิภาพการเลี้ยงในด้านต่าง ๆ และสุขภาพในระบบทางเดินอาหารของสุกรหย่านม

## 1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 แหล่งของน้ำเสียจากฟาร์มสุกร 3 แหล่ง ดังต่อไปนี้

1) น้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย (Center tank pond; CT) คือ น้ำเสียจากโรงเรือนเลี้ยงสุกรยังไม่ผ่านกระบวนการหมัก

2) น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส (Bio-gas pond; Bio-gas) คือ น้ำเสียจากโรงเรือนเลี้ยงสุกรที่ผ่านการกรองตะกอนออกและผ่านการหมักแบบไร้ออกซิเจนประมาณ 45 วัน

3) น้ำเสียจากบ่อฝั่ม (Oxidation Pond; OP) คือ น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส น้ำส่วนที่ถูกแยกกากออกจะต้องผ่านระบบบำบัดน้ำเสียเป็นระบบที่อาศัยกระบวนการทางธรรมชาติเป็นตัวช่วย โดยใช้กระบวนการย่อยสลายในการเจริญเติบโต มากกว่า 75 วัน ที่นำมาใช้ทดแทนสูตรอาหารซารุคที่ระดับต่าง ๆ

1.3.2 หมักสาหร่ายสไปรูลิनाที่ผ่านการเพาะเลี้ยงข้อ 1) ด้วยแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* TISTR 2075

1.3.3 ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ FSP เพื่อเป็นอาหารเสริมในสุกรหลังจากหย่านม 3-7 สัปดาห์

#### 1.4 ตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1.4.1 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ระดับการทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากฟาร์มสุกร ปริมาณแบคทีเรียแลคติก และระยะเวลาในการหมัก และระดับการเสริมพรีไบโอติกที่ได้จากสไปรูลิनाหมัก (FSP) เสริมในอาหารสุกรช่วงระยะหย่านมที่ระดับ 0 (CON), 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ (CAN)

1.4.2 ตัวแปรตาม ได้แก่ ต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิना, ปริมาณเชื้อแลคติก และระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมต่อการสลายชั้นเยื่อหุ้มของสาหร่ายสไปรูลิना และระดับของคุณค่าทางอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่เหมาะสมใช้ในสัตว์วัยอ่อน, อัตราการเจริญเติบโตของสุกร, ปริมาณอาหารที่สุกรกินต่อตัวต่อวัน, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก, ประสิทธิภาพการใช้อาหาร, อัตราการเกิดท้องเสีย, ลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของสุกรที่อายุ 49-52 วัน และระดับการตอบสนองของยีนภูมิคุ้มกัน

#### 1.5 ระยะเวลาการทำวิจัยโครงการวิจัย

ได้รับการสนับสนุน จากบริษัท เว็ท อินเตอร์ บิสิเนส จำกัด ร่วมกับ โครงการพัฒนานักวิจัย และงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ภายใต้การดำเนินการของ สกสว. ระหว่างวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2563 ถึงวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2564

## 1.6 สถานที่ใช้สำหรับการวิจัยฯ

1.6.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในโรงเรือนระบบปิด ควบคุมการระบาดอากาศและปริมาณแสงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง สาขาวิชาประมง ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.6.2 การหมักสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรียแลคติก ใช้ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ สาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.6.3 ทดสอบการเสริม FSP หรือ สารเสริมกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากสไปรูลิน่าที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยกรดแลคติกโดยการเสริมในอาหารสุกรช่วงหย่านม ประกอบสูตรอาหาร ผสมอัดเม็ด การการุณยฆาต ณ ตึกเอนกประสงค์ และหน่วยทดสอบอาหารสุกร โรงเรือนอนุบาล สถานีปฏิบัติการและฝึกอบรมบึงราชนก คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.6.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน ใช้ห้องปฏิบัติการกลาง 2202 ห้องปฏิบัติการกลาง ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ด้านกายภาพ (Animal Feed Physical Laboratory) สาขาวิชาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ และสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านนวัตกรรม การเกษตรและปศุสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

## 1.7 สมมติฐานของการวิจัย

1.7.1 สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าต้นทุนต่ำโดยใช้น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทดแทนสูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย Modified Zarrouk's medium ที่ระดับสูงสุด เพื่อลดต้นทุนการผลิตสไปรูลิน่า

1.7.2 การหมักของจุลินทรีย์ ขึ้นตอน เวลา ที่เหมาะสมระหว่างสไปรูลิน่า และแบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหาร และลดปัจจัยบางประการที่ถูกลูกสุกรย่อย และใช้ประโยชน์สาหร่ายสไปรูลิน่าได้

1.7.3 ระดับที่เหมาะสมของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ผ่านกระบวนการหมัก สามารถนำไปเสริมในอาหารสุกรอนุบาลส่งผลดีต่อดัชนีประสิทธิภาพในด้านต่าง ๆ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สาหร่ายสไปรูลิना *Arthrospira (Spirulina) platensis*

สไปรูลินา (Spirulina) มีความหมายว่า “เกลียว” เนื่องจากมีเส้นสาย (Filament) ที่ขดเป็นเกลียว สไปรูลินาจัดอยู่ในกลุ่ม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ ช่วยในการสังเคราะห์แสง หรือเรียกได้ว่าเป็นแบคทีเรีย ประเภท Cyanobacteria เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตพวก prokaryote คือ นิวเคลียสไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ อีกทั้งเซลล์สไปรูลินามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-12 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง ของเกลียว (Helix) ตั้งแต่ 35-50 ไมโครเมตร เซลล์สาหร่ายยังมีลักษณะที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Prokaryote) กระจุกตัวอยู่ทั่วไปในเซลล์ ทำให้รงควัตถุกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์เป็นผนังหลายชั้น มีองค์ประกอบของสารมิวโคโปรตีน (Mucoprotein) และเพคติน (Pectin) โดยผนังเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane) และเยื่อพลาสมา (Plasma membrane) ที่มีชั้นของเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) แทรกอยู่ระหว่างเยื่อทั้งสอง และมีเยื่อไทลาคอยด์ (Thylakoid membrane) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง และเป็นแหล่งที่พบสารสี หรือ รงควัตถุสังเคราะห์แสงต่างๆ เช่น Chlorophyll *a*, Carotenoids , Phycocyanin และ Allophycocyanin มี Gas vacuole ขนาดใหญ่ อยู่ภายใน ไซโตพลาสซึม ทำให้สาหร่ายสามารถลอยตัวได้ดี (จงกล พรมยะ และ ขจรเกียรติ แซ่ตัน, 2548)



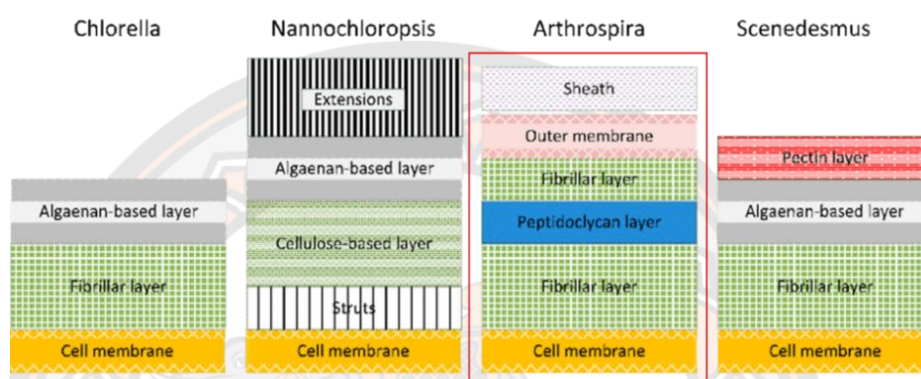
ภาพ 1 Spirulina platensis



สาหร่ายสไปรูลิน่าอุดมไปด้วยโปรตีน เป็นทางเลือกใหม่ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดแทน ถั่วเหลืองได้ อย่างเช่นในประเทศแถบยุโรปต่างหันมาให้ความสนใจเพราะจัดเป็นแหล่งโปรตีนที่มีความยั่งยืน พึ่งตนเองได้มากขึ้นโดยการผลิตชีวมวลที่มีโปรตีนสูงแทน เนื่องจากการขาดแคลนพื้นที่เพาะปลูกพืช หรือพื้นที่มีจำกัดมากขึ้น ดังนั้นการผลิตสาหร่ายสามารถหลีกเลี่ยงการแข่งขันกับการเพาะปลูกพืชอาหารทั่วไปได้ อีกทั้งสาหร่ายสามารถสังเคราะห์อาหารได้โดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ (photo-autotrophs) ในการเจริญเติบโต (Taelman et al., 2013) ซึ่งขึ้นอยู่กับสารอาหารอนินทรีย์วัตถุ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซึ่งมีมากในน้ำเสีย จากอุตสาหกรรม และฟาร์มปศุสัตว์ จากรายงานของ Li et al. (2008) และ Zhang et al. (2013) พบว่าสาหร่ายมีความสามารถในการจับพลังงานแสงอาทิตย์ มีประสิทธิภาพสูงกว่าพืชที่ปลูกบนที่ดิน ซึ่งหมายถึงการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งพบมากที่สุดที่ในก๊าซเรือนกระจก 10-50 เท่า นอกจากนี้สาหร่ายสามารถใช้น้ำและธาตุอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ 10-1000 เท่า เมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตของพืช นำไปสู่การเจริญเติบโตเร็วกว่าพืชอย่างมีนัยสำคัญ (Wang et al., 2008) อย่างไรก็ตามผลผลิตของสาหร่ายเมื่อคำนวณเป็นหน่วยกิโลกรัมต่อตารางเมตรต่อปี อาจจะต่ำกว่าพืชที่ปลูกบนดินเนื่องจากสาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ต่ำ (Kirchman et al., 2012) แต่สาหร่ายเป็นแหล่งของชีวมวลที่มีความอุดมสมบูรณ์มาก ประกอบด้วยคุณค่าทางโภชนาการระดับสูง เช่น โปรตีน (52%) คาร์โบไฮเดรต (23%) และไขมัน (23%) มีกรดไขมันจำเป็นโอเมกา 3 และ 6 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acids; PUFAs) แร่ธาตุ แคลโรทีนอยด์ และวิตามิน (Becker, 2004; Borowitzka, & Moheimani, 2013; Croft et al., 2005; Ward, & Singh, 2005) แต่สาหร่ายบางสายพันธุ์ เช่น *Chlorella*, *Scenedesmus* และ *Spirulina* มีประโยชน์ต่อสุขภาพของสัตว์ เช่น การปรับปรุงในระบบภูมิคุ้มกัน ความสมบูรณ์พันธุ์ มีผลดีต่อสุขภาพสัตว์ (จงกล พรหมยะ, และขจรเกียรติ แซ่ตัน, 2548)

เนื่องจากสไปรูลิน่ามีผนังเซลล์ค่อนข้างทนทานเพราะเคลือบด้วย polysaccharide (Scholz et al., 2014) การย่อยอาหารในร่างกายของสัตว์จะต้องสลายองค์ประกอบของเซลล์ (Sheth, เยื่อหุ้มชั้นนอก, ชั้น Fibrillar1, ชั้น Peptidocycan และ peptidoglycan ระหว่างชั้น fibrillar 1,2 (Kroger et al., 2018) สาหร่ายสไปรูลิน่าซึ่งมีโปรตีนประมาณ 65% (จงกล และขจรเกียรติ, 2548) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนในถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนเพียง 37% (NRC, 2012) สำหรับกรดไขมันในสาหร่ายสไปรูลิน่าประกอบด้วย แกมมาไลโนเลนิก แอซิด (Gamma Linolenic Acid) เป็นกรดไขมันจำเป็นชนิดหนึ่ง ในกลุ่มโอเมกา 6 (Omega-6 Fatty Acid) ซึ่งจัดเป็นกรดไขมันที่จำเป็น เนื่องจากร่างกายสร้างเองไม่ได้ โดยที่ต้องสร้างจากกรดไขมันที่จำเป็นคือ ไลโนเลอิก แอซิด (Linoleic Acid หรือ LA) มีบทบาทสำคัญในเมแทบอลิซึมของไขมัน จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของ ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้คุณสมบัติช่วยลดไขมันในเลือด สาหร่ายสไปรูลิน่ายังมีวิตามินเอ อยู่ในปริมาณมาก

ซึ่งอยู่ในรูปของเบต้า-แคโรทีน มีบทบาทสำคัญต่อการการลดอนุมูลอิสระ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้รงควัตถุในสาหร่ายสไปรูลิน่า ยังประกอบด้วยสีเขียวของคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) เบต้า-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) และแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) มีงานวิจัยหลายเรื่องพิสูจน์ว่า คลอโรฟิลล์ หรืออนุพันธ์ มีผลต่อ การเจริญของแบคทีเรีย และสัตว์ ต่อการเผาผลาญอาหาร การหายใจ กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง การทำงานของฮอร์โมน และการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (Scholz et al., 2014)



ภาพ 2 Algae cell structure (Chlorella, Nannochloropsis, Arthrospira and Senedesmus)

ที่มา: Adapted from Kroger et al., 2018

ตาราง 1 Chemical composition of spirulina

Items	Amount	Unit
Moisture	4-9	% DM
Fat (Mojonnier extraction)	4-16	% DM
Protein (N x 6.25)	60-70	% DM
Ash	3-11	% DM
Carbohydrates (total)	14-19	% DM
Energy	1,504.0	KJ/100g
Crude fiber	3-7	% DM

ที่มา: Habib et al., 2008; Mata et al., 2010; Sajilata et al., 2008

**ตาราง 2** Vitamin and mineral composition of spirulina

Items	Amount	Unit
Vitamins		
$\beta$ -Carotene	140,000	ug/100 g
Total carotenoids	1,700	mg/kg
Provitamin A	2,330,000	IU kg <sup>-1</sup>
Thiamine (B1)	34-50	mg/kg
B2	30-46	mg/kg
Niacin (B3)	130-150	mg/kg
B6	5-8	mg/kg
B12	1.5-2.0	mg/kg
Folate	0.50	mg/kg
Minerals		
Magnesium	3,300	mg/kg
Phosphate	13,000	mg/kg
Potassium	26,000	mg/kg
Sodium	22,000	mg/kg

ที่มา: Habib et al., 2008; Mata et al., 2010; Sajilata et al., 2008

**ตาราง 3** Amino acid composition of spirulina

Items	Amount	Unit
Lysine	2.60-4.63	% DM
Phenylalanine	2.60-4.10	% DM
Tyrosine	2.60-3.42	% DM
Leucine	5.90-8.37	% DM
Methionine	1.30-2.75	% DM
Glutamic acid	7.04-7.30	% DM
Aspartic acid	5.20-6.00	% DM

ที่มา: Habib et al., 2008; Mata et al., 2010; Sajilata et al., 2008

ตาราง 4 Vitamin and mineral composition of spirulina

Items	Amount	Unit
Vitamins		
$\beta$ -Carotene	140,000	ug/100 g
Total carotenoids	1,700	mg/kg
Provitamin A	2,330,000	IU kg <sup>-1</sup>
Thiamine (B1)	34-50	mg/kg
B2	30-46	mg/kg
Niacin (B3)	130-150	mg/kg
B6	5-8	mg/kg
B12	1.5-2.0	mg/kg
Folate	0.50	mg/kg
Minerals		
Magnesium	3,300	mg/kg
Phosphate	13,000	mg/kg
Potassium	26,000	mg/kg
Sodium	22,000	mg/kg

ที่มา : Habib et al., 2008; Mata et al., 2010; Sajilata et al., 2008

## 2.2 ลักษณะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

สาหร่ายสไปรูลิน่ามีปัจจัยต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง 9.5-10.5 อุณหภูมิ น้ำ 25-30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงเหมาะสมอยู่ที่ 1,000 – 8,000 ลักซ์ โดยทั่วไปนิยมเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเลี้ยงสาหร่ายซารูค (Zarrouk's medium) หรือ สูตรปุ๋ยเคมีอื่น ๆ จึงทำให้มีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง เช่น การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารปลาเศรษฐกิจ ปลาสวยงาม กุ้ง ไก่ สุกร หรือ แม้แต่การนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ ด้วยอิทธิพลของราคาขาย และต้นทุนการผลิตมีอิทธิพลต่อความนิยมในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากปริมาณการใช้ในตลาด ยังไม่แพร่หลาย รวมถึงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่ามีความยุ่งยาก ซับซ้อน แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อเป็นอาหารสัตว์นั้น ไม่มีความยุ่งยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับนำไปใช้ในคน เพราะไม่จำเป็นต้องจัดการหรือดูแลมากนัก ที่สำคัญในการเพาะเลี้ยง เกษตรกรหรือผู้ประกอบการสามารถลดต้นทุนให้ต่ำลง ได้โดยการ

นำอินทรีย์วัตถุจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำจากอุตสาหกรรม และฟาร์มปศุสัตว์ ซึ่งมีอินทรีย์วัตถุสูงเพื่อทดแทนการใช้สุตรอาหารเคมี โดยนำมาประยุกต์ ทั้งนี้เพียงควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต (จกกล พรมยะ, และคณะ 2535) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย พบว่า สาหร่ายสไปรูลินาที่เพาะเลี้ยงด้วยสุตรอาหารต้นทุนต่ำมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และคุณค่าทางโภชนาการที่ไม่แตกต่างกันมากนักกับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยสุตรซารุค หรือสุตรปุ๋ยเคมี (Ahsan et al., 2008) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสุตรอาหารต้นทุนต่ำให้เป็นแนวทางในการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาต่อไปได้ในอนาคต

### 2.3 การหมัก (Fermentation)

การหมักในด้านของชีวเคมี หมายถึงกระบวนการที่สารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต ถูกย่อยสลายให้ได้พลังงาน โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับการรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เช่น ออกซิเจน ปฏิกริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นบางส่วนให้ได้พลังงานจาก ATP เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานที่ได้จากปฏิกริยาที่มีตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเข้ามาเกี่ยวข้องสารประกอบต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างมาก ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละชนิดและเกิดจากปฏิกริยาที่แตกต่างกันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ การหมักสามารถเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นกรดแลคติก ซึ่งควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค อีกทั้งยังส่งเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นมิตรกับระบบทางเดินอาหาร และปลดปล่อยสารที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ เช่น วิตามินและเอนไซม์ นอกจากนี้การผลิตอาหารตามมาตรฐาน มักมีกระบวนการที่มากเกินไป เพื่อเป็นการถนอมอาหาร จนทำให้คุณค่าของเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ถูกทำลาย แต่สำหรับข้อดีของอาหารหมัก สามารถช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ เช่น เคมเป้ จะมีปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 30 จากถั่วเหลืองซึ่งเดิมมีประมาณ 0.15 ไมโครกรัมต่อกรัมเพิ่มขึ้นเป็น 5 ไมโครกรัมต่อกรัม เป็นต้น

โดยสรุปกระบวนการหมัก คือ การปลดปล่อยพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม โดยใช้ไพรูเวตจากไกลโคลิซิสเป็นสารตั้งต้น ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักจะมีการสร้าง  $NAD^+$  ขึ้นมาใหม่ แต่จะไม่มีการสร้าง ATP เพิ่มอีก ดังนั้นการสลายกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจนจึงสร้าง ATP ได้เพียง 2 โมเลกุล จากไกลโคลิซิสเท่านั้น อีกทั้งยังมีแบคทีเรียบางชนิด เช่น แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) สามารถสลายสารอาหารโดยไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้เกิดกรดแลคติก จุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีประโยชน์ในการหมักหรือผลิตอาหารบางชนิด เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เต้าหู้ยี้ การดองผักและผลไม้ต่าง ๆ เป็นต้น (Niccolai et al., 2018)

### 2.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

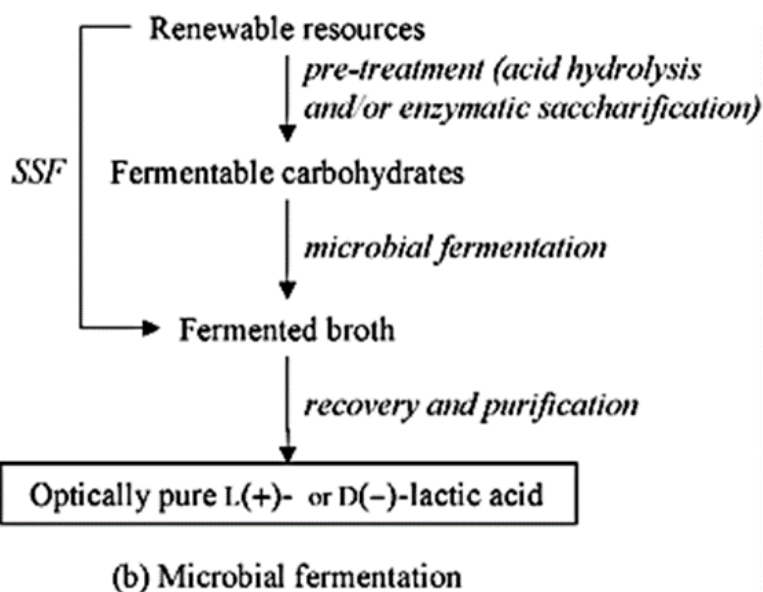
แบคทีเรียกรดแลคติก หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส และให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมัก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ทนต่อสภาวะความเป็นกรด โดยมีลักษณะรูปร่างกลม และแบ่งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ บางชนิดต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (Reddy et al., 2008) แบคทีเรียกรดแลคติกมีความต้องการธาตุอาหารที่ซับซ้อนเพื่อใช้ในการเจริญ และเพิ่มจำนวน ดังนั้นสามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในอาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์จากนม หรือแม้กระทั่งภายในร่างกาย เช่น ช่องปาก ระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น (วรวิวรรณ บุญสมปอง, 2557) การศึกษาทางลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวภาพ ลักษณะองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้พบลักษณะที่มีความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสกุล ซึ่งสามารถจำแนกได้ทั้งหมด 12 สกุล ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* และ *Vagococcus* (Axelsson, 1998) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการหมัก คือ การหมักแบบ Homofermentation และการหมักแบบ Heterofermentation (Eiteman and Ramalingam, 2015)

1) การหมักแบบ Homofermentation เป็นการหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway) โดยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) จะเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลคติก ซึ่งน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วจะได้กรดแลคติก 2 โมล

2) กระบวนการหมักแบบ Heterofermentation เป็นการหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่ผ่านวิถี Phosphoketolase (PK pathway) หรือ 6-phosphogluconate pathway (6-PG pathway) โดยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอนเท่ากับ 5 อะตอม จากนั้นเอนไซม์ Phosphoketolase จะแตกน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เป็น Acetyl-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ต่อมา Glyceraldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท และได้กรดแลคติกเช่นเดียวกับกับวิถีไกลโคไลซิส ส่วน Acetyl-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลหรือกรดอะซิติก ซึ่งน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วจะได้กรดแลคติก 1 โมล เอทานอล หรือกรดอะซิติก 1 โมล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล

2.3.2 การผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทำให้ได้กรดแลคติกในรูปแบบของ D-lactic acid, L-lactic acid หรือ D/L-lactic acid ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ นอกจากนี้ยังสามารถนำแหล่งพลังงานทางเลือก คือ วัตถุดิบทางการเกษตร หรือ วัตถุดิบที่เหลือ

จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตได้ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส เวียกาน้ำตาล แป้งข้าวโพด หรือ แม้กระทั่ง กลุ่มของสาหร่ายสามารถเป็นอาหารของจุลินทรีย์ต่อการหมักกรดแลคติก โดยจุลินทรีย์มีขั้นตอนการสังเคราะห์กรดแลคติกดัง ภาพ 3.



ภาพ 3 Lactic acid production with microbial fermentation

ที่มา: Adapted from Wee et al., 2006

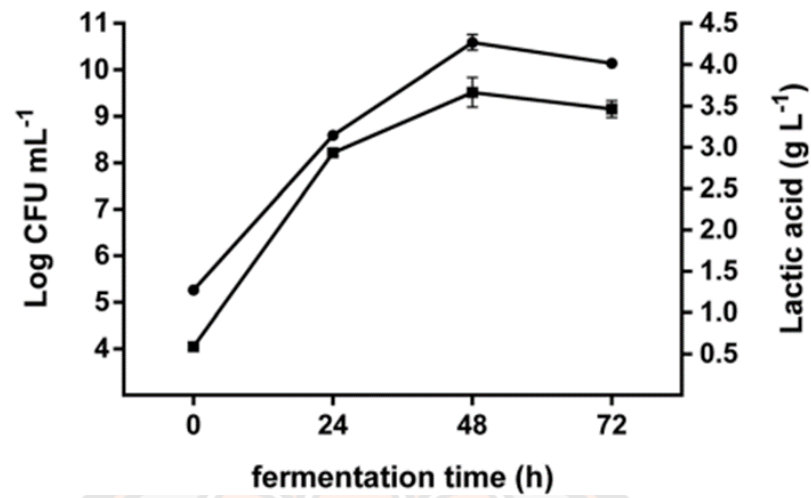
### 2.3.3 การเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมต่อการหมักสไปรูลิน่า

การเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการหมักสไปรูลิน่า เพื่อเป็นต้นแบบอาหารเสริมสำหรับสุกรวัยอ่อน ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ เบต้า-กลูแคน (Beta-Glucans) และสารรงควัตถุจากสาหร่ายสไปรูลิน่า เป็นส่วนหนึ่ง สารประเภทโพลีแซคคาไรด์ คล้ายๆ กับคาร์โบไฮเดรต เกิดจากน้ำตาลกลูโคส มาเรียงต่อกัน จึงมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำ และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ โดยที่สุกรวัยอ่อนหรือหย่านมใหม่ระบบทางเดินอาหารยังพัฒนาไม่เต็มที่ ซึ่งมีข้อจำกัดการใช้เอนไซม์ย่อยเบต้า-กลูแคน หรือผนังเซลล์ได้ แต่แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้สามารถย่อย และใช้ประโยชน์จากเบต้า-กลูแคนได้ จึงจัดว่า เบต้า-กลูแคน และสารรงควัตถุจากสไปรูลิน่า เป็นสารพรีไบโอติกส์ คือ เป็นอาหารของแบคทีเรียในลำไส้ โดยแบคทีเรียจะย่อยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ให้เป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น กรดบิวไทริก (Butyric acid) Lapsiri et al. (2012) ได้อ้างว่า *Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียที่

สามารถผลิตกรดแลคติก ในกระบวนการหมักสำหรับนำไปรูลิน่าได้ และ *L. plantarum* สายพันธุ์ TISTR 2075 สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างได้ (2-9) มีอัตราการรอดชีวิต 85 % หลังจากอบแห้งแบบสเปรย์ ทนต่อความร้อนถึง 65°C เป็นเวลา 30 นาทีโดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 % และทนต่อความเข้มข้นของน้ำดีของสุกร (0.05-0.3%) โดยมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Enterobacter sp.* (Balasingham et al., 2017; Bhunia, 2008) ; Lapsiri et al., 2011) มี การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากของเหลือทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย ถั่วอัลฟัลฟา รำข้าวสาลี ชั่งข้าวโพด ฟางข้าวสาลี และกากถั่วเหลือง โดยการอบแห้งแล้วบดให้มีขนาดเล็ก แล้วใช้ใน กระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus plantarum* พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* ได้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดจากกากถั่วเหลืองที่ 44 กรัมต่อ กากถั่วเหลือง 100 กรัม ส่วนเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ได้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดจากกากอัลฟัลฟา คือ 46 กรัมต่อ กากอัลฟัลฟา 100 กรัม สอดคล้องกับ Niccolai et al. (2018) รายงานการใช้ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ ATCC 8014 ต่อการทดสอบการหมักสไปรูลิน่า เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก พบว่ากรดแลคติกเพิ่มโดยมีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์และ ระยะเวลาของการหมัก (ภาพ 4) ซึ่งหลังจากการหมักพบว่าสไปรูลิน่ามีความสามารถในการย่อยได้ใน หลอดทดลอง 4.4% และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น 79% และตรวจพบสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้น 98%

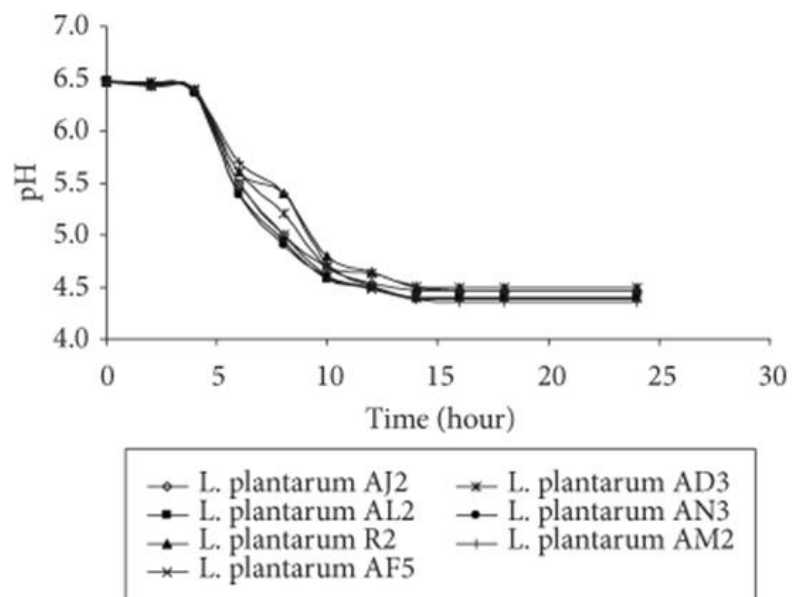
Behera et al. (2019) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม *L. plantarum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยอาหาร MRS agar เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และถูกบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เวลา 48 ชั่วโมง ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่อระยะเวลา ในการหมัก ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง โดยเฉพาะที่ระดับ pH 3.9 ภายใน 24 ชั่วโมง ส่งเสริมทำให้มีปริมาณของกรดแลคติก(L+) มากขึ้น สอดคล้องกับ Balasingham และคณะ (2017) ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ *Lactobacillus sp.* ด้วยการทดสอบหา บริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ของ *L. plantarum* สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่า *L. acidophilus* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 5 และ ตาราง 5





ภาพ 4 The correlation curve of *L. plantarum* ATCC 8014 and lactic acid content over fermentation time

ที่มา: Nicolai et al., 2018



ภาพ 5 The pH change per fermentation from 6.48 to 4.43 within 16 hours

ที่มา: Behera et al., 2018

ตาราง 5 Inhibition zone of *Lactobacillus* sp. using agar well diffusion method  
(mean\*  $\pm$  SE)

Probiotic organisms	Inhibition zone against	
	<i>Escherichai coli</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	18.00 <sup>b</sup> $\pm$ 0.58	18.33 <sup>a</sup> $\pm$ 0.33
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.59	18.00 <sup>b</sup> $\pm$ 0.58

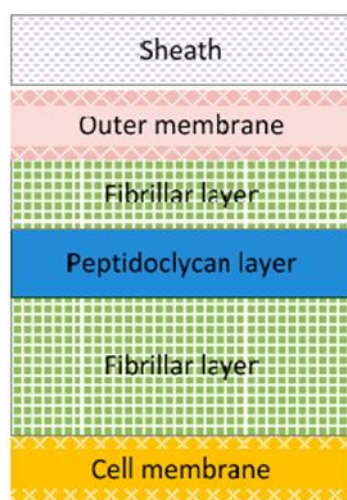
**Note:** \* Mean of six observations. Means bearing different superscripts within a column differ significantly ( $P < 0.05$ )  
SE: Standard error

ที่มา: Balasingham et al., 2017

2.3.4 การใช้จุลินทรีย์ในการหมักเพื่อส่งเสริมให้เกิดการผลิตกรดแลคติกในการย่อยสลาย  
ชั้นผนังเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า

การใช้จุลินทรีย์ในการหมักเพื่อส่งเสริมให้เกิดการผลิตกรดแลคติกในการย่อยสลาย  
ชั้นผนังเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่าชั้น Sheth, Outer membrane, Fibrillar layer1, Peptidocyan  
layer ซึ่งกำหนดปริมาณของแบคทีเรียแลคติก และระยะเวลาในการหมัก ไม่ให้ทำลายหรือย่อยผนัง  
เซลล์ชั้น Fibrillar layer2 เนื่องจากชั้นนี้จะประกอบไปด้วย กลุ่มของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ  
องค์ประกอบทางเคมีที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโน เบต้า-กลูแคน เป็นต้น (Kroger  
et al., 2018) ซึ่งล้วนมีประโยชน์ต่อร่างกายและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมถึงการปรับสมดุลของ  
จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร พัฒนาเซลล์ในเยื่อบุผิวลำไส้ ทำให้สัตว์สุขภาพดี มีอัตราการ  
เจริญเติบโต และมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้น (สุทิตา เข้มผะกา, 2563) ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ  
กลุ่มสารประกอบชีวเคมีภายในชั้นเซลล์ของสไปรูลิน่าจัดเป็นพรีไบโอติก เนื่องด้วยบทบาทของพรีไบ  
โอติกในทางเดินอาหารสัตว์ต่อระบบทางเดินอาหารส่วนต้น ส่วนใหญ่จะทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ใน  
ทางเดินอาหาร เพิ่มระยะเวลาให้อาหารอยู่ทางเดินอาหารนานขึ้น ลดการดูดซึมจุลโคส และลดระดับ  
น้ำตาลในเลือด ช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ และสามารถกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนชนิดแพปไทด์  
ในลำไส้ ส่วนทางเดินอาหารส่วนท้าย มักเป็นแหล่งสารอาหารจำพวกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เป็นสาร

ตั้งต้นสำหรับการหมักการย่อยของจุลินทรีย์ ซึ่งผลของการหมักย่อยคือ กรดไขมันสายสั้น สามารถกระตุ้นการหมักย่อยน้ำตาล อีกทั้งยังสามารถปรับสภาวะความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารต่อการกำจัดแบคทีเรียที่เป็นโทษ เพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุลำไส้ และยังสามารถกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนชนิดเพปไทด์ในทางเดินอาหารส่วนท้ายได้ด้วยเช่นกัน (Gaggia et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามชั้นของ peptidoglycan เป็นชั้นที่มีความแข็งแรงแทรกอยู่ระหว่าง fibrillar layer 1, 2 และเคลือบด้วยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (Scholz et al., 2014) ดังแสดงในภาพ 6.



ภาพ 6 Structure of spirulina

ที่มา: Adapted from Kroger et al., 2018

เพื่อตรวจเช็คประสิทธิภาพการทำลายหรือย่อยชั้นเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องตรวจวัดปริมาณของเบต้า-กลูเคน เบต้า-แคโรทีน กลุ่มของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะโครงสร้างของสาหร่าย (Niccolai et al., 2018) (ภาพ 6) ซึ่งเป็นการศึกษาการสลายชั้นเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เป็นอาหารเสริมให้สุกรวัยอ่อน โดยกำหนดให้การหมักเป็นส่วนหนึ่งเตรียมสไปรูลิน่าให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซึมสารอาหารที่ประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง ภายใต้สภาวะของระบบการย่อยอาหารของสุกรที่มีการพัฒนาระบบการย่อย และดูดซึมสารอาหารไม่สมบูรณ์ (Moesser et al., 2017)

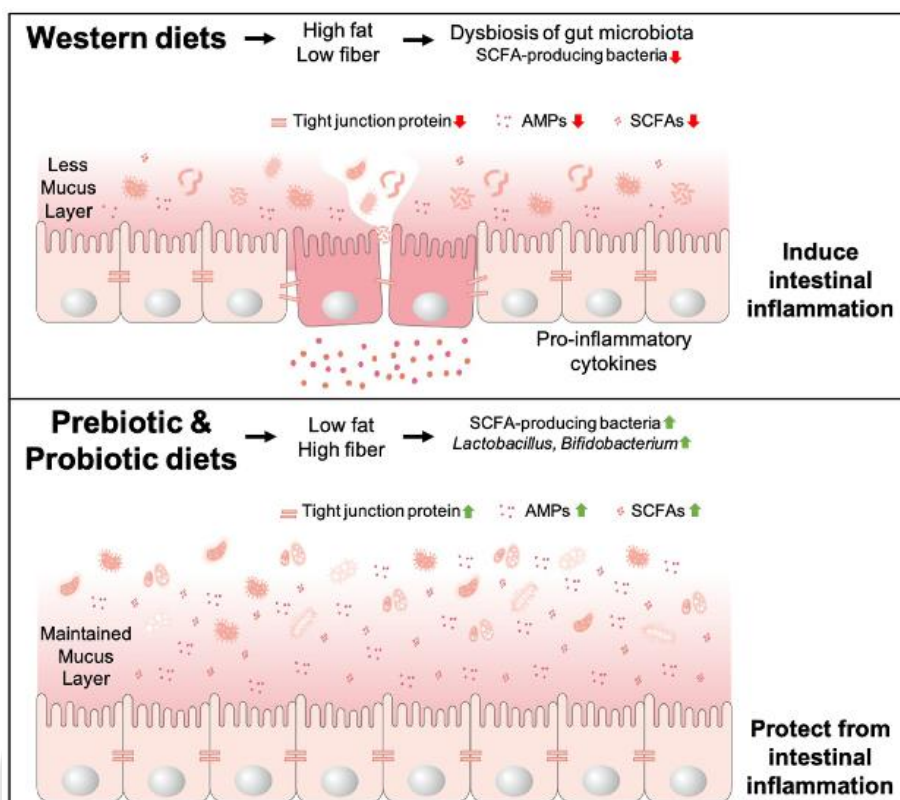
### 2.3.5 ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการหมัก

ค่า pH เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติก การควบคุม pH มีหลายวิธีไม่ว่าจะเป็นการควบคุมค่า pH เริ่มต้น หรือการควบคุมด้วยเบสโดยการไตรเตรต เมื่อมีการผลิตกรดแลคติกที่มากขึ้น ความเป็นกรดสูงขึ้น การควบคุมค่า pH จึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อลดผลเสียต่อ

การทำงานของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปมักใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH<sub>4</sub>OH) แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO<sub>3</sub>) หรือ "กรดซิตริก" หรือ "กรดมะนาว" (Citric acid) เป็นต้น เป็นสารควบคุมและปรับระดับ pH (วรวิวรรณ บุญสมปอง, 2557) ส่วนอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งเช่นกัน ซึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และมีผลต่อกรดแลคติก โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมี อุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไป Idris & Suzana (2006) รายงานว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยต่อการ เจริญเติบโตของเชื้อโดยพบว่าเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเป็นอุณหภูมิที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 28.73 กรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำตาลกลูโคสจากเปลือกสัปะรด 31.3 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับ Niccolai et al. (2018) ทำการ หมักสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วย *L. plantarum* สายพันธุ์ 8014 หมักแบบ Heterofermentative บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 24 ชั่วโมงสามารถผลิตกรดแลคติก  $2.93 \pm 0.02$  กรัมต่อลิตร และที่ 48 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลคติกได้  $3.67 \pm 0.18$  กรัมต่อลิตร

## 2.4 คุณสมบัติของพรีไบโอติกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.4.1 พรีไบโอติก หรืออาหารเสริมชีวณะ คือ ส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารแต่เป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ (host) หรือ เจ้าบ้าน โดยการเลือก กระตุ้นการเจริญเติบโต ส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร และสามารถ ปรับปรุงสุขภาพของโฮสต์ได้ ซึ่งสำหรับสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกร พรีไบโอติกมีบทบาทสำคัญ สำหรับจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยเป็นสารตั้งต้นหรือเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนที่ดีให้กับ จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ ช่วยส่งเสริม การผลิตกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติก ช่วยปรับปรุงสุขภาพของลำไส้ผ่านสมดุลจุลินทรีย์ และ ป้องกันเชื้อโรคจากอาหารในระบบทางเดินอาหาร (Adhikari & kirm, 2017; Bhunia, 2008; Kim et al., 2019) อย่างไรก็ตามคุณลักษณะของพรีไบโอติก ยังคงมีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ครอบคลุมมากขึ้น เนื่องจากมีอีกหลายกลุ่มที่มีคุณสมบัติคล้ายพรีไบโอติกซึ่งสามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้ เช่น สารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-polysaccharides, NSP) หรือใยอาหารที่มีคุณสมบัติ ถูกหมักย่อยได้โดยจุลินทรีย์ เช่น เบต้ากลูแคน (bata-glucans) เซลลูโลส (cellulose) ไชแลน (xylan) และอะราบินโนไชแลน (arabinoxylan) เป็นต้น โดยทั่วไปมีคุณสมบัติพื้นฐานของพรีไบโอติก ได้จะต้องมีสารอาหารเพียงพอต่อโฮสต์ และจะต้องไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของ โฮสต์ (สุทิตา เข้มพะกา, 2563; Bhunia, 2008; Ricke, 2018)

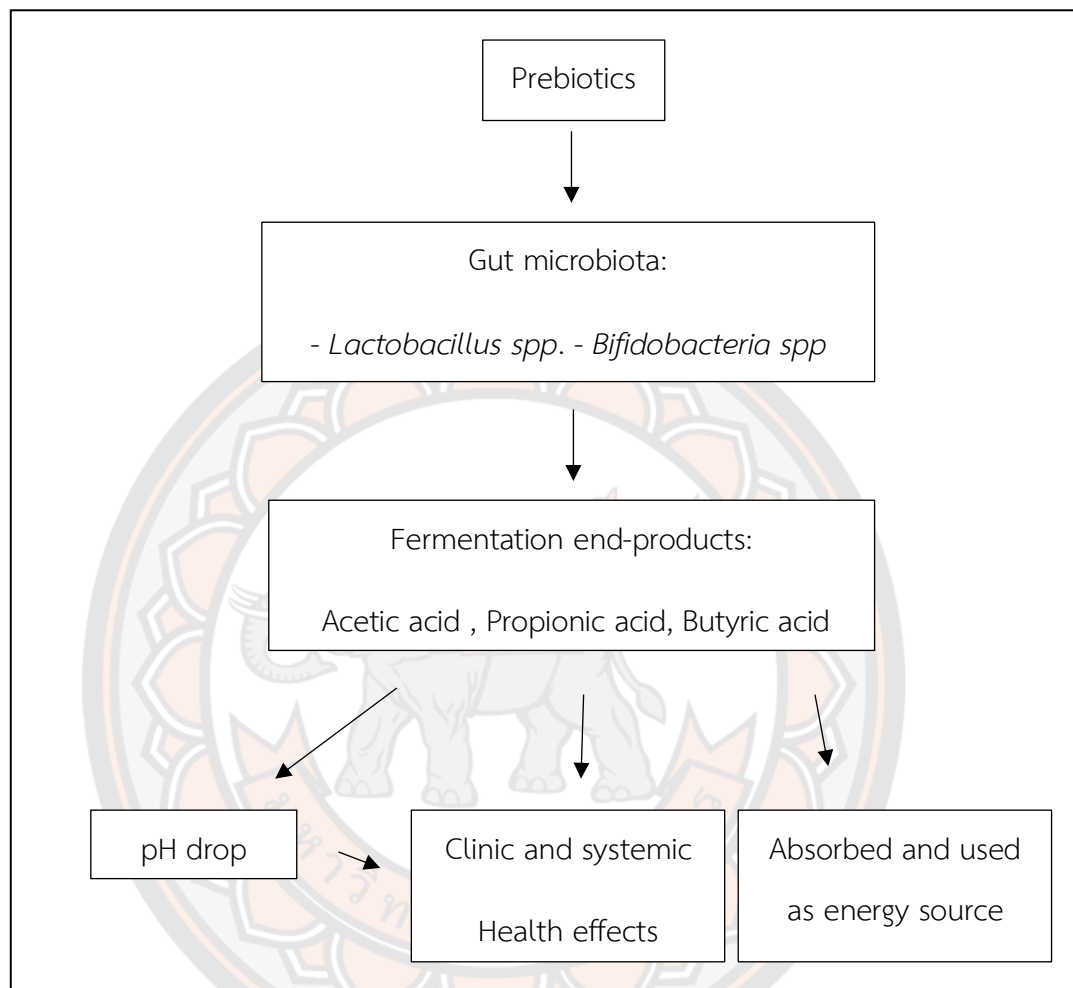


ภาพ 7 Changes in gut microbes associated with inflammation in the high-fat diet group. and low-fiber compared to the group who received a supplement that had low fat, high fiber to change the production of short-chain fatty acids and the prevention of intestinal inflammation

Source: Lobionda et al., 2019

สำหรับกลไกการทำงานของพรีไบโอติกส่วนใหญ่จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนท้ายจะหมักย่อยพรีไบโอติกได้เป็นสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรค พัฒนาเซลล์ในเยื่อบุลำไส้ ทำให้สัตว์มีสุขภาพดี มีอัตราการเจริญเติบโต ให้ผลผลิต และมีประสิทธิภาพการใช้อาหารได้ดียิ่งขึ้น (สุทิตา เข้มพะกา, 2563; Ricke et al., 2020) ซึ่งจุลินทรีย์บางกลุ่มที่ได้จากกระบวนการหมักสามารถผลิตเอมไซม์เพื่อย่อยและใช้ประโยชน์จากพรีไบโอติกได้ เช่น จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus spp.* และ *Bifidobacteria spp.* หรือจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ผลิตกรดแลกติก เป็นต้น (Bhunja, 2008 ; Ricke, 2018) โดยสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากการหมักย่อย เช่น กรดไขมันสายสั้น และกรดแลกติก จะช่วยลด pH ในลำไส้ซึ่งมีอิทธิพลต่อการควบคุม

สมดุลจุลินทรีย์ และส่งเสริมสุขภาพลำไส้ของสัตว์ตั้งแสดงกลไกของบทบาทของพรีไบโอติกและโปรไบโอติกในภาพ 7 (Guerreiro et al., 2018)



ภาพ 8 Mechanism of action of prebiotics in the digestive tract

ที่มา: Adapted from Guerreiro et al., 2018

เนื่องจากกรดไขมันสายสั้นที่เกิดจากการหมักในระบบทางเดินอาหารส่วนปลายของสัตว์สามารถส่งผลทางอ้อมต่อการแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *E-coli* และ *salmonella spp.* เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 อีกทั้งกรดไขมันสายสั้นสามารถซึมผ่านเซลล์และเปลี่ยนเป็นประจุบวกและในเซลล์จุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เซลล์ขาดสมดุล และกรดไขมันสายสั้นยังสามารถเป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก จะถูกดูดซึมผ่านเยื่อบุผิวลำไส้โดยกระบวนการแพร่ผ่านแบบไม่ใช้พลังงาน

(Passive diffusion) โดยมีรายงานว่าเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้จะใช้กรดบิวทีริกเป็นแหล่งพลังงานถึง 60-70% ของความต้องการพลังงานทั้งหมด ช่วยส่งเสริมการพัฒนาวิลไล (villi) และเซลล์คริป (Crypt) เพิ่มพื้นที่ในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร และส่งผลให้สัตว์มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้น (Hooper et al., 2002) นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์กอบเลท (goblet cell) ที่ทำหน้าที่สร้างเยื่อเมือกบนผนังลำไส้ จึงสามารถป้องกันการติดเชื้อในทางเดินอาหาร ป้องกันการอักเสบ ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ รวมถึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค (สุทิสสา เข้มพะกา, 2563) ซึ่งกลไกการทำงานของพรีไบโอติกและบทบาทของกรดไขมันสายสั้นที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ดังแสดงในภาพ 8

#### 2.4.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อมีชีวิต เช่น สัตว์ สารออกฤทธิ์ที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น ฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อต่าง ๆ สารนั้นจะต้องไม่มีผลในทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียง โดยปกติแล้วร่างกายมีกลไกในการป้องกันโดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายแต่ยังไม่เพียงพอ และขีดจำกัดประกอบด้วยเมื่ออายุของสัตว์เพิ่มมากขึ้น ร่างกายจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง จึงควรได้รับจากภายนอกโดยการรับประทาน (สุริยา ทุดปอ และจิตรา สิงห์ทอง, 2560) เช่น สารไฟโตเจนนิค (Phytochemicals) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นต้น สามารถตรวจพบได้ในพืชตระกูลส้ม กลุ่มเห็ดเหี่ยว สาหร่ายสาหร่ายน้ำ สมุนไพร สารสกัดจากพืช เป็นต้น เมื่อผสมลงในอาหารสัตว์จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ โดยสารประกอบเฉพาะสารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบของคาร์บอนและออกซิเจน มีฤทธิ์ต่อการลดการอักเสบ ขยายหลอดเลือด ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (สุทิสสา เข้มพะกา, 2563) และสารประกอบฟีนอลิก จะเข้าไปทำลายแบคทีเรียก่อโรค ชัดขวางแรงกระตุ้นโปรตอน การไหลอิเล็กตรอน การลำเลียงสารเข้าออกเซลล์ และการแข็งตัวขององค์ประกอบเซลล์ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระ จะมีคุณสมบัติด้านการอักเสบ และยับยั้งการเกิดเซลล์ตายภายในอวัยวะหลังจากการติดเชื้อ สามารถพบได้ในกลุ่ม ของแคโรทีนอยด์ วิตามิน เอ วิตามิน อี วิตามิน ซี และแร่ธาตุ เป็นต้น เหล่านี้มีความสามารถในการทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (free radical) โดยการให้ไฮโดรเจนและอิเล็กตรอน (Jiang & Xiong, 2016) ซึ่งโดยปกติแล้วร่างกายสัตว์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ต่าง ๆ โดยมีสาเหตุจากสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดจากโมเลกุลของออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุดเพียงตัวเดียวทำให้โมเลกุลไม่เสถียร จึงมักทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารอื่น ที่อยู่ใกล้เคียงโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อรับอิเล็กตรอนมาทำให้โมเลกุลมีความเสถียรมากขึ้น โมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปก็จะเกิดสภาวะไม่เสถียรขึ้นอีก ทำให้ต้องดึงอิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงต่อไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ส่งผลให้

โครงสร้างของเซลล์เสียหาย ในธรรมชาติร่างกายจะมีการสร้างกลไกในการจำกัดอนุมูลอิสระอยู่แล้ว ด้วยสารต่าง ๆ เช่น วิตามิน อี สารเบต้าแคโรทีน ซึ่งสามารถลดสารอนุมูลอิสระที่เยื่อผนังเซลล์ ตามปกติร่างกายมีความเครียดสูงจะเกิดสารอนุมูลอิสระในปริมาณที่มากเกินไปกว่าความสามารถในการกำจัด ส่งผลให้สัตว์อ่อนแอ และไวต่อการติดเชื้อโรค ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของการเลี้ยง และความหนาแน่น ซึ่งเป็นปัจจัยต่อความเครียด สุขภาพของสัตว์ ด้วยเหตุนี้ในการผลิตอาหารสัตว์จำเป็นต้องเพิ่มสารเสริมต่าง ๆ ในการชดเชยการเกิดสภาวะอนุมูลอิสระ กลุ่มของสารเสริมบางชนิดยังมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกด้วย (สุทิตา เข้มพะกา, 2563; อดิศักดิ์ คงแก้ว และคณะ, 2563) โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีกลไกในการต้านอักเสบ ผ่านกลไกการป้องกันตัวเองจากการได้รับสิ่งแปลกปลอม โดยสรุปสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น *superoxide Dismutase (SOD)*, *Catalase (CAT)* และ *Glutathione peroxidase (GPx)* อีกทั้งกระตุ้นการทำงานของ NF-KB ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Taranu et al., 2014)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายกลุ่มล้วนมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ และหน้าที่ต่างกัน แต่สำหรับบทบาทการกระตุ้นการกินอาหาร และส่งเสริมหน้าที่การทำงานของลำไส้ เช่น เพิ่มระยะเวลาให้อาหารอยู่ในทางเดินอาหารนานขึ้น เพิ่มการคัดหลั่งเอนไซม์ และกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร การกระตุ้นการกินอาหารจะส่งผลดีต่อสมรรถนะการผลิตของสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์กระเพาะเดี่ยว ซึ่งมีข้อจำกัดด้านปริมาณของเยื่อใยในอาหาร และความต้องการสารอาหารที่สูงในอายุน้อยและลดล้นตามลำดับของอายุสัตว์ โดยทั่วไปแล้วความอยากกินอาหารของสัตว์เกิดจากการทำงานร่วมกันของระบบประสาท ทั้งกลิ่น รสชาติ เป็นต้น ร่วมด้วยกับการจัดการกระตุ้นอาหาร และความสดใหม่ของอาหาร เมื่อสัตว์ได้รับสารเสริมที่มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพ จะส่งเสริมการทำงานของลำไส้เป็นอีกแนวทางหนึ่งจะทำให้สัตว์มีสุขภาพลำไส้ดีขึ้น มีการพัฒนาลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้ (gut morphology) เกิดการย่อย และการดูดซึมสารอาหารดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถเพิ่มการหลั่งเอนไซม์เพปซิน ทริปซิลิน ไลเปส และอะไมเลส มีบทบาทในกระตุ้นการหลั่งเยื่อเมือกในลำไส้ ซึ่งสอดคล้องกับ Lindemann และคณะ (1986) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำย่อยในระบบอาหารของสุกรที่เยื่อเมือกกระเพาะอาหาร มีเอนไซม์โปรตีเอส ส่วนในตับอ่อนมี ทริปซิน ไคโมทริปซิน อะไมเลส และไลเปส สำหรับตับอ่อนมีความสัมพันธ์กับอายุสุกร โดยปกติสุกรจะมี ไลเปส และ ไคโมทริปซิน จากตับอ่อน หลังจากการทดสอบในสุกรหย่านม อะไมเลส ทริปซิน และ โปรตีเอส เพิ่มขึ้นขึ้นอยู่กับระดับโภชนา การกระตุ้นการกิน อายุและน้ำหนักของสุกร ดังนั้นในช่วงสุกรหย่านมใหม่การให้สารเสริมที่มีกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์ประเภทไม่ละลายน้ำ จะช่วยเกิดการชะลอการเคลื่อนที่อาหารในระบบทางเดินอาหารช้าลง กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระช่วยปรับสมดุลของเอนไซม์ย่อยในระบบทางเดินอาหาร และดูดซึมโภชนาได้ดีมากยิ่งขึ้น



อีกทั้งช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารป้องกันการติดเชื้อโรค และลดการเกิดท้องเสีย (Falka et al., 2020)

## 2.5 ระบบภูมิคุ้มกัน

ภูมิคุ้มกัน (Immune) หมายถึง ระบบทางสรีรวิทยาที่ทำให้สัตว์มีความสามารถต่อการจดจำต่อสิ่งแปลกปลอม และทำให้สิ่งแปลกปลอมนั้นถูกทำให้หมดสภาพลง (Neutralization) หรือขับสิ่งแปลกปลอมออก หรือทำลายสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอมนั้นขับออกมา (โสมทนต์ วงศ์สว่าง, 2538) ช่วยทำให้ร่างกายมีความต้านทานจากจุลชีพที่เรียกว่า แอนติบอดี (Antibody) เช่น ไวรัส และปรสิตได้ และยังเป็นปฏิกิริยาในการต่อต้านอนุภาคจากสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งจุลินทรีย์และสารชีวโมเลกุล เช่น โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) และเซลล์ผิดปกติของร่างกายหรือเนื้องอก โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติทางร่างกาย (Abbars et al., 1994) ซึ่งลักษณะการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกลักษณะการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ตามความจำเพาะเจาะจงในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งมีความแตกต่างกันดังนี้ (ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, 2556)

### 2.5.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific defense mechanism)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เป็นกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายแบบไม่จำเพาะเจาะจง มีความสามารถในการป้องกันหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมไม่สูงนัก อาจกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น ระบบภูมิคุ้มกันนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ พันธุกรรม ฮอโมน และภาวะโภชนาการของแต่ละบุคคล ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะของกลไกการทำงานได้เป็น 3 แบบ คือ การป้องกันทางกายวิภาค (anatomical barrier) การป้องกันโดยสารเคมีในร่างกาย (chemical factor) และการป้องกันโดยการสะกดกลืนกิน (phagocytosis) สำหรับเชิงระดับเซลล์ อินเตอร์เฟอรอน (Interferon; IFN) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีความสำคัญในการขัดขวางการแบ่งตัวของไวรัส จึงช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ อินเตอร์เฟอรอนจะถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในร่างกายจากการรับเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียบางชนิด และ เซลล์เอ็นเค (natural killer cell; NK cell) เป็นเซลล์กลุ่ม Lymphocyte สร้างขึ้นจากเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งอยู่ในไขกระดูก โดยเซลล์นี้เจริญเต็มที่ได้ในกระแสเลือด ไขกระดูก และม้าม เซลล์ชนิดนี้จะมีหน้าที่ทำลายเซลล์เนื้องอก (tumor cell) และเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส สำหรับระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) เป็นระบบที่ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนมากกว่า 20 ชนิดในซีรัมหรือน้ำเลือด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะถูกกระตุ้นจากการรวมตัวของแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen antibody complex) เกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยงอย่างต่อเนื่องและมีกระบวนการที่ซับซ้อน ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่สามารถเข้าจับตัวกับผิวของเชื้อโรค หรือแอนติเจนก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่และรูปร่าง จนทำให้เซลล์เสีย

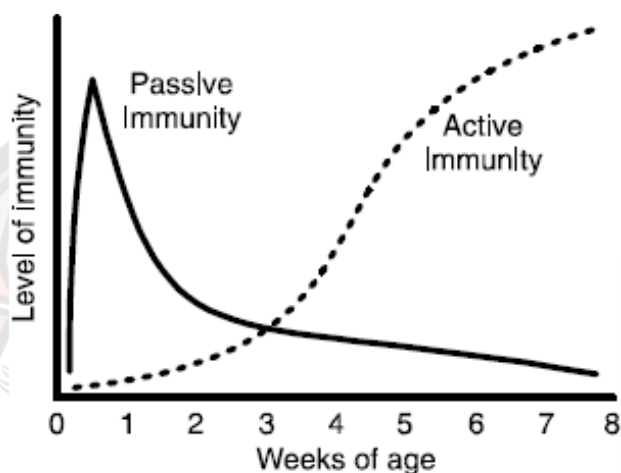
สภาพและตายในที่สุด การเกิดระบบคอมพลีเมนต์นี้ ได้แก่ การอักเสบ (inflammation) และสภาวะช็อก (anaphylaxis) เป็นต้น (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

### 2.5.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (specific defense mechanism)

Adaptive immune system หรือ acquired immune เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific immune system) ต่อชนิดของเชื้อโรค มีการจดจำเชื้อโรคที่เข้ามาตั้งแต่ครั้งแรก และการตอบสนองครั้งต่อไปจะรุนแรงขึ้น การเกิดการตอบสนองแบบ acquired เรียกว่า adaptive เพราะเป็นการเตรียมร่างกายให้ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ต่อสู้กับเชื้อโรคที่จะเข้ามาในภายหลัง เมื่อเชื้อโรคเข้ามาภายในร่างกายก็จะพยายามกำจัดเชื้อโรคเหล่านั้นทันที (autoimmunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้เป็นพื้นฐานของการทำวัคซีน ถ้าหากเชื้อโรคสามารถผ่านด่านแรกหรือผ่านระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immune เข้ามา เซลล์ต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันจะพยายามกำจัดเชื้อโรคเหล่านั้นให้ออกไปพ้นจากร่างกาย เซลล์เหล่านี้เจริญเติบโตมาจาก stem cell อันเป็นเซลล์ในไขกระดูก ซึ่งเติบโตแปรสภาพ (differentiate) ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เมื่อเซลล์เหล่านี้โตเต็มที่แล้วจึงออกมาสู่กระแสเลือด ล่องลอยไปอยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกายตามหน้าที่เฉพาะตัวแตกต่างกัน เช่น

- 1) Granulocyte เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีหน้าที่กินเชื้อโรคในกระแสเลือดและเก็บกินซากที่เกิดจากการทำลายเชื้อโรค granule มากมายในเซลล์ ส่วนใหญ่อยู่ในกระแสเลือด
- 2) Monocyte เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนน้อยในกระแสเลือด
- 3) Macrophage เป็น monocyte ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ กระจายอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ เมื่อกิน antigen เข้าไปแล้ว จะทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell (APC) คือส่งสัญญาณจาก antigen ต่อมาให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte เพื่อรับหน้าที่ต่อไป
- 4) Lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญใน adaptive immune มีอยู่ประมาณ 20-40% ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells) ซึ่งประกอบไปด้วย T และ B lymphocyte โดยที่ T lymphocytes ผลิตจาก bone marrow ไปที่เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (thymus) และพัฒนาเป็น T cell ดังนั้น T cell จึงเป็นเซลล์ที่ผลิตจาก thymus เริ่มทำงานเมื่อได้รับสัญญาณจาก APC เป็นการตอบสนองผ่านการทำงานของเซลล์ เรียกว่า cell-mediated immune responses ส่วน B lymphocytes ผลิตจาก stem cell ของ bone marrow เมื่อสัมผัสกับ antigen แล้ว จะเปลี่ยนไปเป็น plasma cell มีหน้าที่ผลิตภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity คือภูมิคุ้มกัน (antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อนั้น ซึ่งมีประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อโรคและการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) สำหรับลูกสุกรหย่านมมีระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่พบว่า มีระดับสูงสุดที่วันแรกหลังจากคลอด แต่หลังจากนั้นระดับของภูมิคุ้มกันเริ่มลดลง โดย

จากการศึกษาพบว่า การลดลงของระดับภูมิคุ้มกันนี้จะเริ่มเกิดขึ้นที่อายุ 3 สัปดาห์หลังจากคลอด (ภาพ 9) ซึ่งการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่ขึ้นอยู่กับระดับของภูมิคุ้มกันที่ลูกสุกรได้รับมา โดยการที่ลูกสุกรได้รับภูมิคุ้มกันมาจากแม่สุกร ในระดับสูงตั้งแต่ต้น ระดับภูมิคุ้มกันจะสามารถคงอยู่ในร่างกายลูกสุกรได้นานกว่าปกติ ซึ่งเป็นผลดีต่อตัวลูกสุกร อย่างไรก็ตามภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากแม่สุกรสามารถป้องกันโรคให้แก่ลูกสุกรเพียงระยะหนึ่งเท่านั้น ลูกสุกรจึงจำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันขึ้นเองโดยการทำวัคซีน ในช่วงอายุที่เหมาะสมต่อไป (Varley, & Wiseman. 2001)



ภาพ 9 Pig immunity development graph

ที่มา: Cattle, 2009

ความสัมพันธ์ระหว่างภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับสิ่งแปลกปลอม โดยทั้ง 2 ระบบนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการตอบสนองต่อการกระตุ้น โดยใช้เวลา 4-7 วันในการ primary response ส่วน Innate นั้นใช้ระยะเวลาสั้นกว่า สำหรับความจำเพาะ (Specificity) ความหลากหลาย (Diversity) และความจำ (memory) ของ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับสิ่งแปลกปลอมนั้นมีมากกว่า ส่วนการทำงานของภูมิคุ้มกันภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ต่อเชื้อที่เข้ามาในร่างกายจะมี Phagocytes จำพวก แมคโครฟาจ โมโนไซต์ นิวโตรฟิล Nk cell dendritic cells ชนิดของเซลล์ที่กล่าวมานั้นคือกลุ่ม T cell และ B cell อย่างไรก็ตามระบบการรับรู้และการตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยการใช้ receptor และวิธีการรับรู้ โดยภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด จะใช้ receptor ที่มีอยู่บนเซลล์ เช่น phagocytes ในการรับรู้ส่วนประกอบทางเคมีของเชื้อโรค หรือโครงสร้างโมเลกุลที่ประกอบกันเป็นตัวเชื้อโรค เรียกว่า Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการดำรงชีวิต และมัก

เปลี่ยนแปลงไม่ได้ ดังนั้นเชื้อโรคต่าง ๆ จึงกลายพันธุ์เพื่อที่จะหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้ง่าย เพราะตัวรับการตอบสนอง ของ adaptive immunity สามารถรับรู้รูปร่างกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวก็ จะทำให้รูปร่างหรือโครงสร้างเปลี่ยนไปจน receptor ไม่รู้จักสำหรับการควบคุมหรือกระตุ้นให้เกิด Adaptive Immune Responses โดย Innate Immunity เนื่องจาก receptor (T, B cell receptor) สามารถรับรู้แอนติเจนได้มากโดยจะถูกสร้างแบบสุ่มสลับการเรียงตัวของ T cell receptor gene หรือ Immunoglobulin gene ดังนั้นจึงสามารถรับรู้แอนติเจนได้ทุกอย่างไม่ว่าจะเป็นเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอม โดยต่างกันว่า PAMPs ดังนั้น Innate immunity จึงเป็นด่านแรก โดยมีหน้าที่รับรู้ว่ามีเชื้อโรคเข้ามาในร่างกายก่อน แล้วจะกระตุ้นและควบคุมให้ระบบ adaptive เกิดตอบสนองเฉพาะต่อเชื้อโรค เนื่องจากขบวนการที่ Innate immunity ควบคุมการทำงานของระบบ adaptive ดังกล่าวก็เพื่อต้องการให้ T helper cell ที่จำเพาะกับเชื้อโรคเท่านั้นไปกระตุ้นส่วนอื่นของ adaptive immunity ต่อไป ดังนั้นการรับรู้จำเพาะจุลชีพของ Innate immunity system จึงเป็นการควบคุมให้เกิดการตอบสนองของ adaptive immunity system หรือ Innate immunity system อาจมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งหมด (อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2551)

### 2.5.3 เซลล์และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

เซลล์และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายจะมีการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมซึ่งหมายถึงภาวะภูมิคุ้มกัน บทบาทสำคัญของระบบภูมิคุ้มกัน คือการทำงานของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสโลหิต โดยผ่านอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่กระจายอยู่ทั่วร่างกาย อีกทั้งระบบภูมิคุ้มกันจะมีการพัฒนาการและการจำแนกชนิดของลิมโฟไซต์ มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก ประกอบด้วย heterochromatin อัดแน่นมี cytoplasm บางๆ อยู่รอบนิวเคลียสซึ่งประกอบด้วย mitochondria, ribosomes และ lysosomes อยู่กระจัดกระจายเซลล์เหล่านี้จะอยู่ในระยะพัก ไม่เคยรับรู้แอนติเจนมาก่อน เมื่อถูกแอนติเจนหรือไซโตไคน์กระตุ้นก็จะมีขนาดใหญ่ขึ้น มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-15 มิลลิเมตร ซึ่งมี cytoplasm และ organelles ต่าง ๆ มากกว่าลิมโฟไซต์ปกติ เรียกว่า lymphoblasts ซึ่งมีเพียง 2% ของลิมโฟไซต์ทั้งหมดในเลือด สามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเป็น effector cells มีอายุสั้น 2-3 สัปดาห์ ทำหน้าที่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น plasma cell เป็น effector cell ของ B lymphocyte ทำหน้าที่สร้างแอนติเจน cytokine-secreting T helper cell และ antigen-activated T cytotoxic lymphocyte เป็น effector cell ของ T lymphocyte บางส่วนจะเจริญไปเป็น memory cell ที่สามารถจำแอนติเจนที่มากระตุ้น และมีหน้าที่รับผิดชอบต่อการตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดเดิมในครั้งด้วย memory cell มีรูปร่างเหมือนลิมโฟไซต์ปกติ แต่ต่างกันที่การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ สามารถจำแนกลิมโฟไซต์ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ B lymphocytes, T lymphocytes และ Natural killer cell (NK, null or non-T non- B cell)

1) B Lymphocytes เซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็น B Lymphocytes จะโคจรผ่านไป ยัง lymphoid tissue เรียกว่า bursa of fabricius คือ ไช้กระดูก ตับ และ เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (lymphoid tissue) บริเวณทางเดินอาหาร ซึ่งเซลล์ต่าง ๆ เข้ามาในเนื้อเยื่อของสัตว์ ผิวเซลล์จะรับรู้ และจับกับแอนติเจนเมื่อ native B Lymphocytes พบกับแอนติเจนครั้งแรกจะถูกจับโดย membrane-bound immunoglobulin; (mlg) และเกิดการกระตุ้น ทำให้เซลล์แบ่งตัวอย่าง รวดเร็วกลายเป็น plasma cell และ memory B cell ซึ่งเป็น plasma cells จะสร้างและปล่อย แอนติบอดีออกมานอกเซลล์ และไม่พบ mlg บนผิวเซลล์หรืออาจพบน้อยมาก ซึ่ง plasma cell เป็น เซลล์ระยะสุดท้ายคือจะไม่แบ่งตัวต่อไป ดังนั้นหน้าที่สำคัญคือการสร้างแอนติบอดีโดยแต่ละเซลล์ สามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด ในส่วนแรกคือ B-1 cell สร้างขึ้นในช่วงแรกของการพัฒนาจาก stem cells ช่วงที่ยังเป็นตัวอ่อน เจริญนอกไขกระดูกพบมากในช่องปอดและช่องท้อง เพื่อตอบสนองต่อจุลชีพหรือสารพิษ ต่าง ๆ ที่ผ่านเข้าทางผนังของลำไส้ และพบบ้างใน secondary lymphoid tissues เช่น ต่อมน้ำเหลือง และม้าม อีกทั้งยังสามารถตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต และ ลิพิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จุลชีพ โดยไม่ต้องการ T cell ช่วยในการตอบสนองต่อแอนติเจน คือเป็น T-independent เพื่อสร้างแอนติบอดีชนิด IgM เป็นส่วนใหญ่ในส่วน IgA พบได้เล็กน้อย และ ส่วนที่ 2 คือ B-2 cells (conventional B cells) พัฒนาในไขกระดูก คือ ถูกสร้างหลังจาก B-1 cells และมีปริมาณมากกว่า พบใน secondary lymphoid organs จะแสดง m IgM และ m IgD ที่ผิว ของเซลล์ สามารถจับและตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์ หรือโปรตีน รับผิดชอบต่อการสร้าง แอนติบอดีชนิด IgG, IgA และ IgE โดยที่ B-2 cells ต้องการ T helper ( $T_H$ ) cells ช่วยตอบสนองต่อ แอนติเจน คือ T-dependent (T-D) และกลายเป็น memory cell

2) T lymphocytes จะถูกสร้างในไขกระดูก และโคจรเข้าไปอยู่ในต่อมไทมัส เริ่มมี การพัฒนาในชั้น cortex และ medulla จนเจริญเป็น mature T lymphocytes ที่มี T cell receptor (TCR) เป็นที่จับแอนติเจน CD3, CD4, CD8 บนผิวเซลล์ ออกสู่กระแสโลหิตและต่อมน้ำเหลือง เพื่อทำหน้าที่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป TCR จะรับรู้แอนติเจนที่เป็นชิ้นส่วนของโปรตีน หรือ peptide fragment ที่ติดอยู่กับ โมเลกุลหลักของ histocompatibility complex (MHC) molecule บนผิวของเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน เซลล์ไวรัส เมื่อ T lymphocytes ถูกกระตุ้นจะ กลายเป็น effector cell ที่มีอายุสั้นทำหน้าที่ต่อไป และตายเมื่อแอนติเจนถูกกำจัดออก บางส่วนก็จะ กลายเป็น memory cell แล้วเคลื่อนไปอยู่ตามที่ต่าง ๆ เพื่อทำหน้าที่เมื่อเกิด secondary immune response เช่นเดียวกับ B lymphocytes สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ชนิดที่ 1 คือ Helper T cell ( $T_H$ ) มีโมเลกุลของ CD4 อยู่บนผิว หรือเรียกว่า  $CD4^+$  T lymphocytes รับรู้ peptide Ag ที่ถูก นำเสนอร่วมกับ MHC class II ที่ปรากฏบนผิวของ APCs เมื่อถูกกระตุ้นจะแบ่งตัวออกเพิ่มจำนวน เป็น effector cell หลัง โปรตีน เช่น ไซโตไคน์หลายชนิดไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ เช่น

ช่วย B lymphocytes สร้างแอนติบอดีในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น phagocytes และแมคโคฟาจในระบบย่อยทำลายจุลชีพต่าง ๆ พบประมาณ 50-70% ของลิมโฟไซต์ทั้งหมด Helper T cell สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดขึ้นอยู่กับไซโตไคน์ที่สร้างหลังจากการถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน คือ  $T_H1$  จะสร้าง IL-2, Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) และ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ทำหน้าที่ในการตอบสนองทาง CMI (cell-mediated immune response; CMIR หรือ cell-mediated immunity; CMI) คือช่วยทำให้เกิดภาวะอักเสบโดยการกระตุ้นแมคโคฟาจ นอกจากนี้ยังชักนำ B cells ให้เกิด Ig class switching เป็น IgG ส่วนชนิดที่ 2 คือ  $T_H2$  ทำหน้าที่สร้าง IL4, IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นกลุ่มไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ช่วยการตอบสนองของ humeral mediated immune response; (HMI) คือการกระตุ้น B cells ในการสร้างแอนติบอดี และชักนำให้เกิด Ig class switching เป็น IgG, IgA และ IgE ซึ่ง  $T_H1$  และ  $T_H2$  จะควบคุมการทำงานของกันและกัน โดยฝ่ายหนึ่งจะกวดการทำงานของอีกฝ่ายหนึ่งเพื่อให้เกิดภาวะการตอบสนองที่สมดุล

3) Natural Killer (NK) Cells มีประมาณ 5-15% ของลิมโฟไซต์ในกระแสเลือด และอวัยวะในระบบน้ำเหลือง เป็นลิมโฟไซต์ที่ไม่แสดงลักษณะ T และ B cells คือ ไม่มี T-cell receptor (TCR) และไม่มีอิมมูโนโกลบูลินที่ผิวสำหรับจับแอนติเจน จึงเรียกว่า non-T non-B หรือ null cell ลักษณะเป็นลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ และมี (แกรนูล) granule เป็นจำนวนมากอยู่ใน cytoplasm จึงเรียกว่า large granular lymphocytes ต้นกำเนิดของ NK cells ซึ่งเจริญมาจากไขกระดูก และสามารถพบได้ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั่วร่างกาย หน้าสำคัญคือสามารถรับรู้และฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และทำลายเซลล์แปลกปลอมโดยไม่จำเพาะเจาะจง และไม่ต้องการ Major histocompatibility complex (MHC) บริเวณที่เป็นที่ตั้งของกลุ่มยีนที่นำเสนอแอนติเจนซึ่งเหมือนกับ Cytotoxic T lymphocytes (CTL) และ natural killer (NK) cells จึงเป็นเซลล์หนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันโดยแต่กำเนิด (Innate immunity) และสามารถตอบสนองต่อไซโตไคน์ต่าง ๆ เช่น IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 และ IL-12 ซึ่งจะกระตุ้นให้เพิ่มฤทธิ์ในการทำลาย โดยเพิ่มสารต่าง ๆ ใน granule (กาญจนา อุสุวรรณทิม, 2560; อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2551)

## 2.6 อวัยวะในระบบภูมิคุ้มกัน

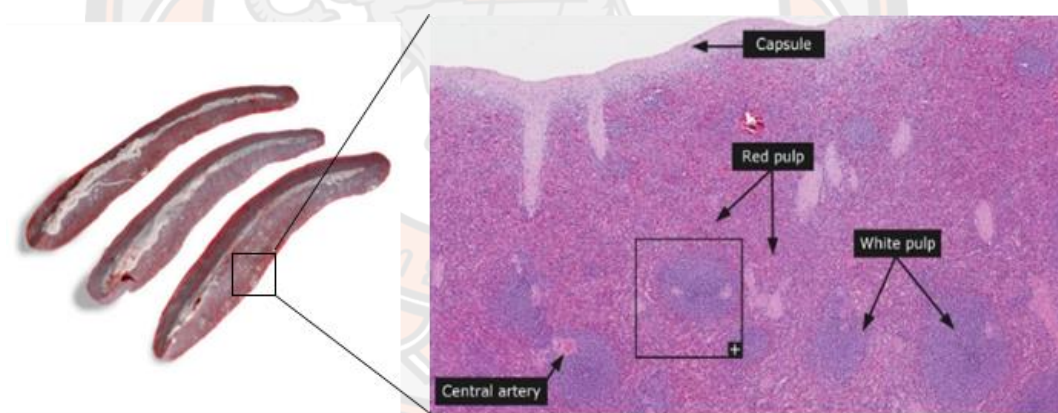
เนื้อเยื่อในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของตัวชีวิตด้านสุขภาพประกอบด้วย 2 อวัยวะที่เด่นชัด คือ ม้าม และเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้เล็ก (กาญจนา อุสุวรรณทิม, 2560; อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2551)

2.6.1 ม้าม (Spleen) เป็น peripheral lymphoid organ ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่บริเวณทางด้านซ้ายส่วนบนของบริเวณของช่องท้องทำหน้าที่ดักจับแอนติเจนในกระแสเลือดที่ผ่านมาทาง

เส้นเลือดแดงภายในม้ามมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ต่าง ๆ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ white pulp และ red pulp

1) White pulp จะรายล้อมอยู่รอบแขนงของ splenic artery ภายในประกอบด้วย ลิมโฟไซต์อยู่เป็นจำนวนมาก T lymphocyte จะเรียงตัวรอบๆ เส้นเลือดเรียกว่า periarteriolar lymphoid sheath (PALS) ซึ่งภายในมีแมคโครฟาจ และ B lymphocyte หุ้มอยู่ บริเวณนั้นสามารถเปลี่ยนเป็น secondary lymphoid follicles หรือ germinal center โดยเมื่อถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจน และกลายเป็น plasma cell ปล่อยแอนติบอดีออกมา

2) Red pulp ประกอบด้วยกลุ่มของเม็ดเลือดแดง, sinusoids, แมคโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และ plasma cell อยู่จำนวนน้อยซึ่งเป็นบริเวณที่มีการทำลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุ หรือมีความผิดปกติ ซึ่งการทำงานของม้ามเกิดจาก blood-borne antigen ถูกจับโดย interdigitating dendritic cell และการกระตุ้นการทำงานของ T และ B cell บริเวณ PALS จากนั้นเซลล์ถูกกระตุ้นการเคลื่อนไปใน lymphoid follicles และทำให้เกิด secondary lymphoid follicles ตามมาเช่นเดียวกับต่อมน้ำเหลือง



ภาพ 10 The spleen and tissue arrangement are white pulp and red pulp

ที่มา: Adapted from Borie et al., 2016; กาญจนา อุสุวรรณทิม, 2560; อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2551

### 2.6.2 ลำไส้ (Intestine)

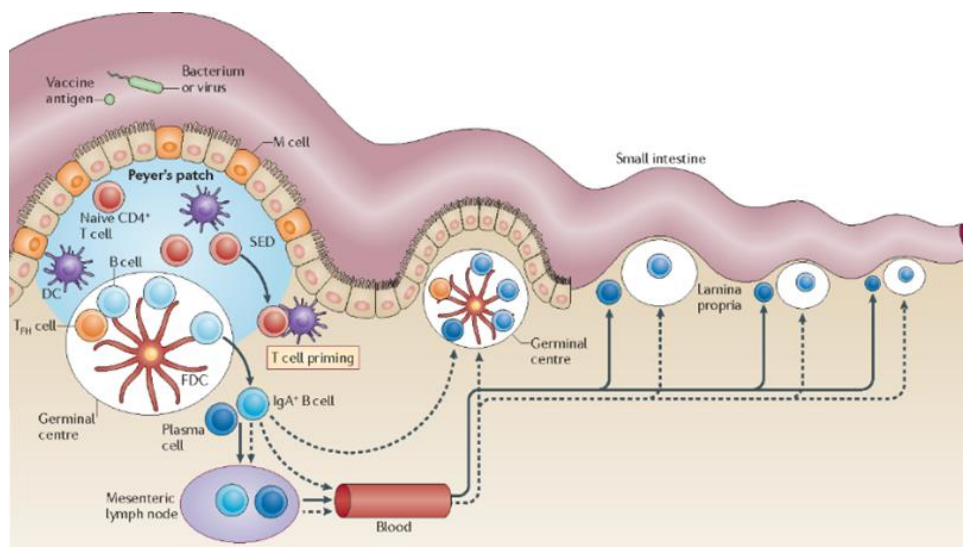
ลักษณะทางกายภาพของลำไส้เล็กและระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร หรือ Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) หรือ เป็นกลุ่มของ lymphoid

tissues ที่เรียงอยู่ตาม เยื่อของท่อทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และท่อทางเดินปัสสาวะ โครงสร้างของ lymphoid tissues เหล่านี้มีความแตกต่างกันได้มาก ตั้งแต่ที่มีระเบียบแน่นอน เช่น lymphoid cells บริเวณ lamina propria ของ intestinal villi เป็นต้น แบ่งกลุ่มของ MALT ได้ เป็น nasal-associated lymphoid tissue (NALT) ประกอบด้วย pharyngeal และต่อมทอนซิล gut-associated lymphoid tissue (GALT) ประกอบด้วย Peyer's patches, lamina propria และ ไส้ติ่ง (อรวัตติ หาญวิวัฒน์วงศ์, 2551) และยังมีสารคัดหลั่งของเหลวออกปกคลุมเพื่อป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ เช่น ไลโซไซม์ (Lysozyme) อินเตอร์เฟอรอน (Interferon) และคอมพลีเมนต์ (Complement) ทำหน้าที่ชะล้างเชื้อโรคต่าง ๆ โดยที่ไลโซไซม์ได้แก่ น้ำลาย น้ำเมือก (Mucous secretion) สามารถย่อยชิ้นเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย อินเตอร์เฟอรอนเป็นกลุ่มโปรตีน สร้างโดยเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส สามารถกระตุ้นเซลล์ข้างเคียงให้ต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัส ส่วนคอมพลีเมนต์เป็นกลุ่มโปรตีนในเลือดซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน สามารถถูกกระตุ้นโดยองค์ประกอบต่าง ๆ (ไพศาล ศิทธิกรกุล, 2548) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เป็นการจับกินของฟาโกไซต (Phagocytic barrier) เป็นแนวป้องกันของร่างกายที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจับกินเชื้อโรคและสารต่าง ๆ โดยกระบวนการเอนโดไซโทซิส (endocytosis) และฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ซึ่งเมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายเม็ดเลือดขาวหลายชนิด จะถูกดึงดูดมายังบริเวณเนื้อเยื่อถูกทำลายเพื่อจับกินสิ่งที่คุกคามในร่างกาย เช่นเซลล์บางชนิดที่ทำหน้าที่ฟาโกไซโทซิส ได้แก่ โมโนไซต์ (monocyte) นิวโทรฟิล (neutrophil) และแมคโครฟาจ (macrophage) โดยสารที่ถูกจับกินเข้าสู่ฟาโกโซม (phagosome) และเชื่อมรวมกันกับไลโซโซม ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ย่อยสลาย เช่น โปรตีเอส (protease) นิวคลีเอส (nuclease) และไลเปส (lipase) ร่วมตัวกับการตอบสนองโดยการอักเสบ (Inflammatory Response) เมื่อเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อเกิดจากบาดแผลหรือการรุกรานของจุลินทรีย์ สามารถชักนำให้เกิดลำดับขั้นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ เรียกว่าการตอบสนองโดยการอักเสบ ซึ่งจะมีผลต่อวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การแยกแยะสิ่งแปลกปลอม (foreign or nonself) ได้ดังแสดงในภาพ 11.

ความสามารถนี้ทำให้มีการพัฒนาหน้าที่ในกระบวนการฟาโกไซโทซิส และย่อยสลายสารต่าง ๆ โดยเซลล์ สำหรับการปรับสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสุกร เมื่อสัตว์กินอาหารเข้าไปในระบบทางย่อยอาหารบริเวณต่อมทอนซิลจะประกอบด้วยลิมโฟไซต์ แมคโครฟาจ และแกรนูโลไซต์ ซึ่ง B cell จะรวมอยู่เป็น follicles เช่นเดียวกับที่พบในต่อมน้ำเหลือง ทำหน้าที่ดักจับแอนติเจนที่ผ่านทางช่องปาก ซึ่งเซลล์เยื่อเมือกที่กระจายอยู่บน Mucosa-associated lymphatic tissues (MALT) ทำหน้าที่สำคัญในการนำเสนอแอนติเจน โดยป้อนทาง M cell ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อเมือกที่มีลักษณะพิเศษคือ ค่อนข้างแบนกว่าเซลล์ปกติ ไม่มี Villi และบริเวณด้าน basolateral membrane จะมีรอยหว่า (pocket) ซึ่งเป็นที่อยู่ของ B cell, T cell และแมคโครฟาจ เมื่อแอนติเจน



เข้ามาในบริเวณทางเดินอาหารจะถูก endocytosis โดย M cell แล้วปล่อยออกทาง basolateral membrane ซึ่ง เซลล์ลิมโฟยด์ (lymphoid cells) อยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น ส่วน plasma cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ผ่านมาจาก M cell จะหลั่ง secretory IgA ได้ อย่างไรก็ตาม M cell อาจเป็นทางเข้าของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้เช่นกัน (กาญจนา อุสุวรรณทิม, 2560; อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์, 2551)



ภาพ 11 Initiation of the immune response in the gut: antigens are taken up by microfold (M)-cells and process to the subepithelial dome (SED)-resident dendritic cells (DCs) in Peyer's patches. T-follicular helper (TFH) cells interact with B-cells and follicular dendritic cell (FDC) thus forming a germinal center. Antigen specific plasma cells and memory B-cells are generated and migrate through the blood and mesenteric lymph nodes.

ที่มา: Borie et al., 2016

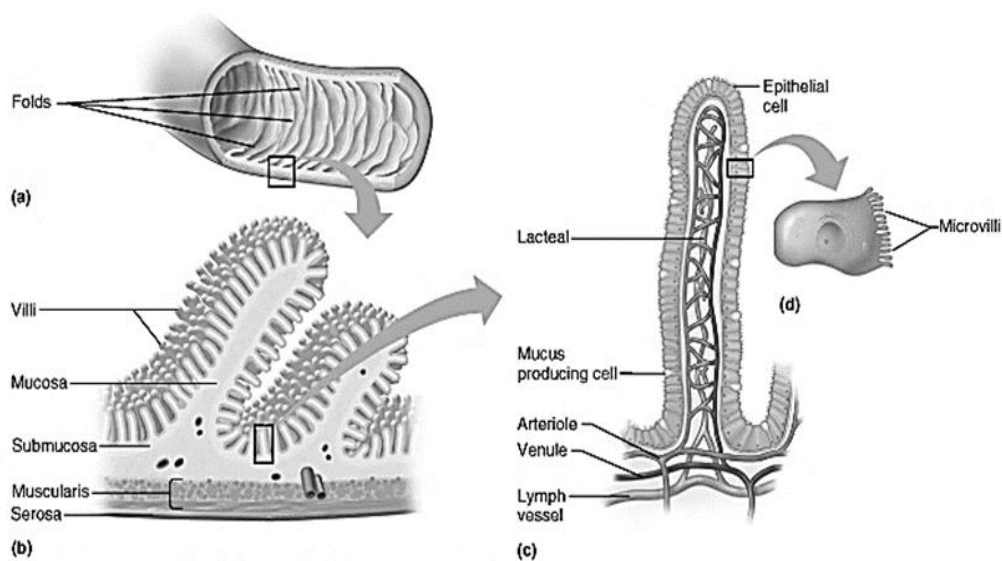
## 2.7 สรีระวิทยาและสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กของสุกร

### 2.7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของลำไส้เล็ก

ลำไส้เล็กทำหน้าที่ในการย่อยหลังเอ็นไซม์ หลังสารคัดหลั่ง และดูดซึมสารอาหาร โดยปกติสุกรเมื่อแรกเกิดมีความยาวประมาณ 2 เมตร ความจุประมาณ 72 มิลลิลิตร หลังจากหย่านม ความยาวเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าคือ 6.5 เมตร และมีความจุเพิ่มประมาณ 9 เท่า เป็น 650 มิลลิลิตร สำหรับสุกรโตเต็มวัยยาวประมาณ 16-21 เมตร และความจุประมาณ 20 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ

น้ำหนักตัวแล้ว สุกกระยะดูคนมีน้ำหนักของลำไส้เล็กประมาณ 4-5% ของน้ำหนักตัว และลดลงเหลือประมาณ 1.5% ของน้ำหนักตัวของสุกรโตเต็มวัย โดยทั่วไปแล้วลำไส้สุกรแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ยาวประมาณ 4-4.5% ของความยาวทั้งหมด ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) เป็นส่วนที่มีความยาวมากที่สุดคือประมาณ 88-91% ของความยาวทั้งหมด และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ยาวประมาณ 4-5% ของความยาวทั้งหมด ทางเดินอาหารจะมีการพัฒนามากในช่วง 3 เดือนแรกหลังคลอด ทั้งเยื่อทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบประสาทของผนังทางเดินอาหาร (enteric nervous system) ทั้งนี้ยังเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม การเจริญของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร และปัจจัยเกี่ยวกับนมและนม น้ำเหลือง เป็นต้น (Moeser et al., 2017)

ลำไส้เล็กประกอบด้วยผนังทั้งหมด 4 ชั้น เรียงจากด้านนอกไปด้านใน คือ serosa layer, muscular layer, submucosa layer และ mucosa layer โดยชั้น serosa layer เป็นผนังชั้นนอกสุดของลำไส้ มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นเลือดและเส้นประสาทมาหล่อเลี้ยง ถัดมาเป็นชั้น muscular layer ประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อด้านนอกเป็นแนวตามยาว (longitudinal muscle) และชั้นในเป็นชั้นกล้ามเนื้อตามขวาง (circular muscle) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนตัวของลำไส้ ชั้นต่อมาคือชั้น submucosa layer เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นเลือด น้ำเหลือง และเส้นประสาท ส่วนผนังชั้นในสุดคือชั้น mucosa layer แบ่งเป็นชั้นย่อย ๆ อีก 3 ชั้น ด้านนอกสุดคือชั้น Muscularis mucosae ถัดมาเป็นชั้น lamina propria มีเส้นเลือด น้ำเหลือง เซลล์เม็ดเลือดขาว และต่อมน้ำเหลือง ส่วนชั้นในสุดคือชั้น epithelial layer เป็นชั้นที่มี enterocytes เรียงเป็นชั้นเดียว มีลักษณะคล้ายนิ้วมือยื่นออกไปภายในลำไส้ เรียกส่วนนี้ว่า วิลไล (villi) ที่ปลายของวิลไล มีลักษณะเป็นขนเส้นเล็ก ๆ เรียกว่าไมโครวิลไล (microvilli) ที่ฐานของวิลไลจะมีส่วนที่เว้าลึกลงไป เรียกว่า คริปต์ (crypt of lieberkuhn) ทำหน้าที่สร้างสารคัดหลั่งเช่น ฮอริโมน เอ็นไซม์ เป็นต้น และยังเป็นที่อยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ดังแสดงใน ภาพ 12. ลักษณะกายวิภาคของลำไส้เล็กมีรูปร่างและความลึกของคริปต์ รูปร่างและความสูงของวิลไล และจำนวนของ goblet cell เป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของลำไส้ รูปร่างของวิลไลแบ่งออกเป็น 5 แบบคือ รูปลิ้น (tongue-shaped) รูปนิ้วมือ (finger-shaped) รูปใบไม้ (leaf-shaped) ridged-shaped และ convoluted shape เซลล์เยื่อผนังลำไส้ (epithelial cell) เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด (enterocyte หรือ stem cell) ที่อยู่บริเวณคริปต์ สุกกระยะดูคนจะมีรอบการผลิตเซลล์เยื่อบุลำไส้ประมาณ 7 วัน แต่สำหรับสุกรโตเต็มวัยจะมีรอบการผลิตเซลล์ประมาณ 2-3 วัน (Ginneken et al., 2002)



ภาพ 12 The anatomy of the small intestine. (a), (b) the surface area of the intestinal wall (c) Villus and (d) Gastrointestinal mucosal cells and microvilli

ที่มา: adapted from: Ginneken et al., 2002

### 2.7.2 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในช่วงการหย่านม

การพัฒนาเยื่อทางเดินอาหารอย่างสมบูรณ์จะเกิดขึ้นเมื่อสุกรมีอายุประมาณ 10-12 สัปดาห์ แต่ในปัจจุบันมีการหย่านมที่เร็วขึ้น เพื่อเพิ่มรอบการผลิตให้กับแม่สุกร หลังหย่านมสุกรจะเผชิญกับความเครียดจากการรวมกลุ่มทางสังคม การเปลี่ยนสภาพแวดล้อม และการเปลี่ยนอาหาร โดยสามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับสุกรหลังจากหย่านมออกได้เป็น 2 ระยะคือ acute phase และ regenerate phase ช่วง acute phase เกิดในระยะสัปดาห์แรกหลังหย่านม เป็นระยะที่สุกรมีการกินอาหารลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของระบบทางเดินอาหาร อันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ และการเปลี่ยนแปลงอาหารในทันที ทำให้สุกรเกิดความเครียดและส่งผลกระทบต่อกรกินของสุกร (Pluske & Williams, 1996) จากรายงานของ Brooks et al. (2001) พบว่าประมาณ 10% ของสุกรที่หย่านมเมื่ออายุ 28 วัน จะกินอาหารน้อยมากในช่วง 48 ชั่วโมงหลังการหย่านม ส่งผลให้ความสูงของวิลโลลดลงประมาณ 75% เมื่อเทียบกับก่อนหย่านม การที่วิลโลหดสั้นหรือฝ่อนั้นเกิดจากการหลุดลอกของเซลล์เยื่อทางเดินอาหารในอัตราที่สูงกว่าการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทน การดูดซึมสารอาหารลดลง มีสารอาหารเหลือไปถึงทางเดิน

อาหารส่วนท้ายมากขึ้น เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และเพิ่มโอกาสของการเกิดอาการท้องเสียหลังหย่านม (post-weaning diarrhea) (Molist et al., 2014) ระยะที่สอง (regenerate phase) คือ ช่วง 7-15 วันหลังการหย่านม สุกรมีการปรับตัวต่ออาหารมากขึ้นเป็นลำดับ สามารถสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของมวลของลำไส้เล็กส่วนกลาง น้ำหนักของตับอ่อนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้เห็นถึงการฟื้นฟูการทำงานของเอนไซม์ที่เข้าสู่สภาวะปกติ (Montagne et al., 2007)

ช่วงหลังการหย่านมมักจะเกิดการหลุดลอกของเยื่อผนังลำไส้ ทำให้ความยาวของวิลไล ลดลงและเพิ่มความลึกของคริปต์ นอกจากนี้ยังพบการฝ่อตัวของวิลไล ซึ่งเกิดจากการเจริญทดแทนไม่ทันต่อการหลุดลอกของเยื่อบุทางเดินอาหาร (Pluske et al., 1997) การหย่านมเมื่อสุกรอายุ 21 วัน วิลไลจะลดลงประมาณ 75% (เมื่อเทียบกับความสูงวิลไลก่อนหย่านม) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังการหย่านม และหลังจากนั้นประมาณ 5-8 วันหลังหย่านม วิลไลจะค่อยๆ เพิ่มความยาวขึ้น โดยวันที่ 5 หลังการหย่านมความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริปต์ (VH:CD) ของลำไส้เล็กอยู่ที่ประมาณ 1.5-2.0 :1 เท่านั้น (Hampson, 1986) สุกรหลังการหย่านมมักพบการเข้าทำลายจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากการลดลงของเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างโดย brush border ในลำไส้เล็กทำหน้าที่ขจัดสารพิษที่สร้างโดยแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ยังพบความบกพร่องของสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็ก เซลล์ผนังลำไส้ทำหน้าที่คัดเลือกโมเลกุลของสารอาหารที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์และกระแสเลือด ในขณะที่เดียวกันก็ป้องกันไม่ให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแอนติเจนเข้าสู่เซลล์ได้ โดยด้านบนของเซลล์ผนังลำไส้จะมีชั้นเยื่อเมือกที่ปกคลุมอยู่ ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงปกป้องเซลล์ผนังลำไส้จากกรดที่หลังจากกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น (Kim et al., 2012) สารอาหารที่สัตัวย่อยและดูดซึมไม่หมดส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดอาการที่เรียกรวมว่าอาการท้องเสียหลังหย่านม (post-weaning diarrhea)

## 2.8 ไซโตไคน์ (Cytokine)

ไซโตไคน์เป็นสารในระบบภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการสื่อสารระหว่างเซลล์ให้ทำงานร่วมกัน ไซโตไคน์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน อีกทั้งไซโตไคน์เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนขนาดของโมเลกุลเล็ก และมีชื่อเรียกตามเซลล์ที่สร้าง เช่น สร้างมาจาก lymphocyte เรียกว่า lymphokine ขณะเดียวกันถ้าหากสร้างมาจากโมโนไซต์เรียกว่า monokine สร้างมาจากเม็ดเลือดขาวเรียกว่า interleukin ขณะที่ไซโตไคน์ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์อื่นเรียกว่า chemokine สำหรับการทำงานของไซโตไคน์จำเป็นต้องมีตัวรับ เรียกว่า Cytokine receptor ที่จำเพาะเหมาะสมจึงจะสามารถออกฤทธิ์ส่งสัญญาณเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลง ลักษณะการทำงานของไซโตไคน์มี 3 แบบ คือ หลั่งออกจากเซลล์ชนิดเดียวกันกับเซลล์ที่ไซโตไคน์ออกฤทธิ์ เรียกว่า autocrine หลั่งจากเซลล์หนึ่งแล้วออกฤทธิ์กับเซลล์ข้างเคียง เรียกว่า paracrine และการหลั่งจากเซลล์หนึ่งแล้วไปออกฤทธิ์กับเซลล์ที่อยู่ไกลออกไป เรียกว่า endocrine นอกจากนี้พบว่าไซโตไคน์มีลักษณะของการทำงานหลายรูปแบบดังต่อไปนี้ (กาญจนา อุสุวรรณทิม, 2560)

2.8.1 Pleiotropy เป็นคุณสมบัติของไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 1 อย่าง เช่น interleukin 4 ที่สร้างมาจาก CD4+ มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิด IgE class switching ของ B cell และมีฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็น TH2

2.8.2 Redundancy เป็นคุณสมบัติของไซโตไคน์ต่างชนิดกันแต่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนกัน เช่น IL-2 และ IL-4 มีฤทธิ์ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ B cell

2.8.3 Synergy เป็นคุณสมบัติของไซโตไคน์ต่างชนิดกันแต่มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่งเสริมกัน เช่น Interferon (IFN)- $\gamma$  และ tumor necrotic factor (TNF) กระตุ้นให้มีการแสดงออก MHC class I ในเซลล์ต่าง ๆ

2.8.4 Antagonism เป็นคุณสมบัติของไซโตไคน์ต่างชนิดกันที่มีฤทธิ์ตรงกันข้าม เช่น IFN- $\gamma$  ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ แต่ IL-4 จะทำหน้าที่ลดการทำงานของแมคโครฟาจ ไซโตไคน์จึงเป็นโมเลกุลขนาดเล็กของเปปไทด์ที่มีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการทำงานของภูมิคุ้มกัน และการอักเสบ การตอบสนอง แต่มักพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว และแมคโครฟาจ จะแสดงบทบาทหน้าที่ได้อย่างชัดเจน ซึ่งกลุ่มของเซลล์เหล่านี้มีหน้าที่ส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน กลุ่มของไซโตไคน์ สร้างจากแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพ โดยผ่านทาง Toll-like receptors (TLR) ของแมคโครฟาจ จึงจัดได้ว่าหน้าที่ของไซโตไคน์นั้นคือ เป็นตัวติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันและทำให้เกิดการอักเสบ โดยจะทำงานจะต้องอาศัยตัวรับ (cytokine receptor) ที่จำเพาะเหมาะสมซึ่งอยู่บนเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายจึงจะทำให้เกิดการกระตุ้นส่งสัญญาณให้เซลล์ทำหน้าที่ได้อย่างเหมาะสม ตัวรับดังกล่าวประกอบด้วย 3 ส่วน คือ Extracellular domain เป็นส่วนรับที่อยู่ส่วนนอกของผิวเซลล์ Transmembrane เป็นตัวรับที่แทรกอยู่ในเซลล์เมมเบรน และ Intracellular domain เป็นตัวรับที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งทั้ง 3 ส่วนมีความสำคัญต่อการส่งสัญญาณของไซโตไคน์ผ่านเส้นทางการส่งสัญญาณสู่นิวเคลียสของเซลล์ เนื่องจากไซโตไคน์ส่วนที่ถูกสร้างจากแมคโครฟาจร่วมกับตัวรับ ในกรณีที่มีการกระตุ้นแมคโครฟาจมาก จำนวนไซโตไคน์ก็มากพอที่จะออกฤทธิ์ในที่ไกลออกไปได้ ดังนั้นในการตอบสนองของร่างกายเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเกิดขึ้น พบว่าในระยะแรกของการติดเชื้อภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดจะทำหน้าที่ต่อสู้กับไวรัสก่อนโดยใช้แมคโครฟาจจะหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ เช่น TNF- $\alpha$ ,

IFN- $\alpha$  และ IL-12 ออกมาเพื่อกระตุ้นเซลล์ให้แบ่งตัว และยับยั้งการเจริญของไวรัสโดย NK cell จะทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ จากนั้นการตอบสนองแบบจำเพาะเจาะจง (adaptive immune response) เกิดขึ้น ส่วนโปรตีนในระบบน้ำเหลืองสามารถตอบสนองต่อเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันแบบธรรมชาติ (Innate immunity) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ที่มาจากตับ ในการกระตุ้นของไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , IL-1 และ IL-6 เป็นต้น กิจกรรมเหล่านี้เกิดขึ้นที่บริเวณเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial cells) เยื่อบุผนังหลอดเลือด (Endothelial) และไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) ซึ่งเป็นแหล่งและเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของไซโตไคน์ สอดคล้องกับการทำงานของลำไส้ที่จะมีการขัดขวางโดยลักษณะทางกายภาพเพื่อช่วยป้องกันสารพิษ และเชื้อโรคเข้าสู่เยื่อบุบริเวณลำไส้ และระบบไหลเวียนเลือด แต่ถ้าหากตรวจคุณสมบัติของป้อมปราการแรกที่สำคัญนั้นคือเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ที่ทำหน้าที่ในการเฝ้าบ้าน และควบคุมการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อเซลล์ได้รับเชื้อโรคหรือสภาวะไม่เหมาะสม หรือเกิดการอักเสบ (Inflammation) ซึ่งเป็น physiologic response ของ Innate immunity ในการตอบสนองต่อเชื้อโรคที่สามารถผ่านด่านของผิวหรือเยื่อบุต่าง ๆ การอักเสบในรูปแบบเฉียบพลัน และการอักเสบรูปแบบเรื้อรังอาจทำให้เกิดโรค ซึ่งมักเห็นลักษณะอาการบวม แดง ร้อน มีบาดแผล หรืออาจเลวร้ายถึงมีสารหลั่ง (mediators) และจะมีการซึมออกของน้ำเหลือง และเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจเข้ามาจับเชื้อโรคที่เข้ามาทางบาดแผล โดยเม็ดเลือดขาวจะถูกกระตุ้นจากการจับกินเชื้อโรคและหลั่งไซโตไคน์ออกมาทำให้เกิดการอักเสบ โดยโปรตีนที่ออกฤทธิ์เพื่อช่วยทำลายเชื้อโรคได้แก่ไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 ถูกสร้างขึ้นมาส่งผลให้เกิดการตอบสนองเช่นทำให้หลอดเลือดขยายตัว ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อการกระตุ้นแมคโครฟาจ และ NK cell (กาญจนา อุสุวรรณทิม, 2560) จนทำให้เซลล์เหล่านั้นสามารถส่งสัญญาณโดยการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านการผลิตไซโตไคน์และเปิดใช้งานนิวโทรฟิล แมคโครฟาจ T-Cell และ B-Cell จะส่งสัญญาณให้ transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), IL-1 และ IL-6 ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุลำไส้ซึ่งจะสามารถพบเห็นเป็นเมือกในเซลล์เยื่อบุผิวเพื่อปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน อีกทั้งไซโตไคน์กลุ่มของ IL-8, IL-1 และ TNF- $\alpha$  ก็แสดงออกหลังจากการเกิดอักเสบที่บริเวณลำไส้ การเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกันไม่ใช่เพียงแค่ลำไส้อย่างเดียว รวมถึงในระบบเลือดด้วย อีกทั้งความสัมพันธ์ของ IL-1 ต่อเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเลือดและเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อสุกรได้รับความเครียดจากกิจกรรมหย่านม และการปรับเปลี่ยนทางโภชนาของอาหาร ซึ่งมีผลโดยรวมทั้งการผิดปกติของลำไส้ซึ่งสามารถตรวจ IL-10 และ IL-4 เมื่อสัตว์ได้รับโปรไบโอติก (Isolauri et al., 2001) ต่อการเสริมโปรไบโอติกและพรีไบโอติกที่ระดับเหมาะสมจะไปสนับสนุนระดับของ CD4+ (helper) CD8- และ T-Cell ใน Peyer's Patches ซึ่งอยู่บริเวณต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ด้านบนของลำไส้เล็กซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตเป็นอย่างมาก ต่อมนี่มี

ความสำคัญต่อการย่อยอาหาร และการผลิตเม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ให้แก่ เครือข่ายของระบบน้ำเหลือง อีกทั้งยังผลิตเอนไซม์ Chyle (ของเหลวคล้ายนมที่ย่อยแล้วในลำไส้เล็กซึ่งจะไหลไปสู่เส้นเลือดดำ) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักของต่าง การไหลอย่างต่อเนื่องของเอนไซม์ Chyle เป็นของเหลวในร่างกายที่มีความชุ่มชื้น ซึ่งประกอบด้วยน้ำเหลืองและไขมันอิมัลชันหรือกรดไขมันอิสระ เมื่อเข้าสู่ระบบย่อยอาหาร จะมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ส่วนการมีกรดหรือของเสียที่ได้จากการรวมตัวของกรดในอาหารที่มากเกินไปจะมีผลเชิงลบต่อสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะความสมบูรณ์ของอวัยวะต่อมน้ำเหลืองของลำไส้ (Peyer's Patches) เช่น เยื่อเมือกบริเวณลำไส้ของลำไส้เล็กส่วนปลาย ซึ่งสอดคล้องกับ Duncker และคณะ (2006) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสุกรต่อประสิทธิภาพการใช้โปรไบโอติกและพรีไบโอติก มีผลเพียงเล็กน้อยในการกระจายของเซลล์ภูมิคุ้มกันในบริเวณเยื่อเมือกในลำไส้ของสุกร

#### 2.8.4 หน้าที่ของไซโตไคน์ สามารถแบ่งออกได้ 5 กลุ่ม ได้ดังต่อไปนี้

1) ไซโตไคน์ที่ออกฤทธิ์ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจง เช่น IL-1, TNF (tumor necrotic factor), Type1 interferon และ IL-6

2) ไซโตไคน์ที่ออกฤทธิ์ต่อ lymphocyte ให้เจริญเติบโต กระตุ้นการทำงาน และการเปลี่ยนแปลง ตัวอย่างเช่น

2.1) IL-2 สร้างจาก T cell และกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ ได้แก่ B cell, T cell และ NK cell

2.2) IL-4 สร้างจาก TH2 cell มีหน้าที่กระตุ้นให้ B cell เกิด class switching ของ IgE และส่งเสริมกระตุ้นการทำงานของ B cell และการเปลี่ยนแปลงการพัฒนาของ TH2 นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ แมคโครฟาจ โดยไปลดฤทธิ์ของ IFN- $\gamma$  ที่กระตุ้นแมคโครฟาจ

2.3) IL-10 หลั่งมาจาก regulatory T cell ทำหน้าที่ ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T cell ยับยั้งการทำหน้าที่ของแมคโครฟาจ และ transforming growth factor-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ทำให้การตอบสนองต่อการเกิดอักเสบ จะไปลดการแสดงออกของ Th1 กระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการอยู่รอดของ B-cell และการผลิตแอนติบอดี อีกทั้งสามารถส่งเสริมการทำงานของ NK-KB ต่อกิจกรรมการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมภูมิคุ้มกัน

2.4) IL-12 สร้างมาจากหลายเซลล์ เช่น แมคโครฟาจ เดนดริตริก (dendritly cells) และฟาโกไซต์ สามารถกระตุ้น NK cell และ T cell เปลี่ยนเป็น TH1 และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ T-cell และจะไปช่วยกระตุ้นการผลิต IFN- $\gamma$  ยังสามารถส่งเสริม

ประสิทธิภาพกิจกรรมของ NK - Cell และ CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes แล้วยังมีความเชื่อมโยงกับ IL-2 อีกด้วย

3) ไซโตไคน์ที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์อักเสบอื่น เช่น IFN- $\gamma$  ที่กระตุ้นการทำงานของ macrophage ส่วน IL-5 กระตุ้นการทำงานของ eosinophil และ TNF ร่วมด้วยกับ lymphotoxin ทำให้เกิดการอักเสบเฉียบพลัน โดยกระตุ้นที่ neutrophil และ เซลล์บุผนังหลอดเลือดมีภูมิคุ้มกันลดลง

4) ไซโตไคน์ที่ออกฤทธิ์ต่อการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว หรืออาจเรียกว่า Chemokine

5) ไซโตไคน์ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือด สร้างจาก lymphocyte หรือเซลล์ค้ำจุนโครงสร้าง (stromal cell) เรียก cytokine กลุ่มนี้ว่า Colony-stimulating factors (CSF)

## 2.8.2 คุณสมบัติทั่วไปของ cytokine

1) ไซโตไคน์ชนิดเดียวกัน อาจสร้างจากเซลล์หลายชนิด เช่น IL-1 สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและ fibroblast

2) ไซโตไคน์มีการทำงานแบบ Pleiotropic คือ cytokine ชนิดหนึ่ง อาจออกฤทธิ์ได้หลายอย่างในเซลล์ที่ต่างกัน เช่น IL-2 มีฤทธิ์ให้ T cell เจริญเติบโตและยังออกฤทธิ์ต่อ B cell ให้เติบโตและเปลี่ยนแปลงนอกจากนี้พบว่า cytokine ต่างชนิดกันสามารถออกฤทธิ์เหมือนกัน หรือคาบเกี่ยวกันได้ เรียกคุณสมบัตินี้ว่า Redundant

3) ไซโตไคน์ออกฤทธิ์ได้ 3 แบบ คือ

3.1) Autocrine effect: IL-2 ที่สร้างจาก T cell สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของตัวเองได้ Paracrine effect: IL-7 ที่สร้างจากไขกระดูก และเซลล์ค้ำจุนในต่อม thymus มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดของ B cell ในไขกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดของ T cell ในต่อม thymus เจริญเติบโตได้ตามลำดับ

3.2) Endocrine effect: IL-1 และ TNF ที่ออกฤทธิ์ให้เกิดไข้ในระยะการอักเสบเฉียบพลัน

4) Cytokine ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายก็ต่อเมื่อมี receptor ที่จำเพาะเท่านั้น โดยที่ IL-2 จะกระตุ้นการทำงานของ T cell ได้ก็ต่อเมื่อจับกับ IL-2 receptor เท่านั้น ดังนั้น antibody ที่จำเพาะต่อ IL-2 receptor สามารถปิดกั้น IL-2 receptor และป้องกันการทำงานที่พึงประสงค์ของ T-cell ได้



## 2.9 การใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-Time PCR) ต่อการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านม

เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Quantitative real-time polymerase chain reaction ; qRT-PCR) จัดเป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเร่งปฏิกิริยากับยีนที่ต้องการเปรียบเทียบ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบทางชีววิทยาเนื่องจากสามารถตรวจจับและหาปริมาณของลำดับกรดนิวคลีอิกเฉพาะในปริมาณที่น้อย ซึ่งเครื่องมือสามารถแสดงออกของยีนได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งจุดประสงค์เพื่อนำ RNA ที่ถูกแปลงเป็น cDNA แล้วทำให้บริสุทธิ์สำหรับวิเคราะห์ qRT-PCR สั้น ๆ เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของยีนเป้าหมายซึ่งได้ตรวจสอบลำดับเบสผ่าน GenBank mRNA สำหรับ *Sus scrofa* จากการศึกษาการเสริม *Agrimonia procera* (AP) ในลูกสุกร Gräber et al. (2014) ที่ระดับ 0.56 กรัมต่อกิโลกรัมเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิค qRT-PCR สามารถช่วยลดความอุดมสมบูรณ์ของ mRNA ของ TNF- $\alpha$  ต่อการตอบสนอง lipopolysaccharides (LPS) พบแนวโน้มการปลดปล่อย TNF- $\alpha$  ต่ำลงจากยีนเป้าหมาย ( $P = 0.067$ ) อีกทั้ง mRNA ของ IL-1 $\beta$  ลดลง ( $P < 0.05$ ) ขณะที่ IL-10 ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง ต่อการตอบสนอง LPS ส่วน Pie et al. (2003) ได้ศึกษาผลของการหย่านมต่อการเชื่อมโยงการควบคุมการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกิดการอักเสบในลำไส้ของลูกสุกร พบว่าไซโตไคน์มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกัน แต่ก็ยังมีส่วนช่วยรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อบุลำไส้ ซึ่งเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหันเห็นการเปลี่ยนแปลงปัจจัยด้านอาหารและสิ่งแวดล้อมต่อสัญญาณวิทยาลำไส้ โดยมีช่วงเวลา 0, 1, 2, 5 และ 8 วันหลังจากหย่านมโดยใช้ RT-PCR ต่อการตอบสนองแบบเฉียบพลันในช่วง 0-2 วัน หลังจากหย่านม พบการตอบสนองของ IL-1, IL-6, และ TNF-messenger RNA (mRNA) เพิ่มขึ้น ส่วนช่วง 2 และ 8 วันมีการแสดงออกของ IL-1, IL-6 ส่วน IL-12 p40 และ IL-18 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งเป็นการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกิดการอักเสบในลำไส้ลดลงเมื่อ 8 วันหลังจากหย่านมโดยเปรียบเทียบ Cyclophilin ใช้เป็น housekeeping genes สำหรับกิจกรรมหย่านมของสุกรหลังจากที่จะการได้รับเชื้อและเกิดการอักเสบ ยีนดังกล่าวจะลดลงหลังจากวันที่ 2 ของการหย่านมเนื่องจากการเนื้อเยื่อลำไส้ลดการเกิดอักเสบ สอดคล้องกับ McCracken et al. (1995) พบว่าการแสดงออกของ IL-1 เพิ่มขึ้นทุกส่วนของลำไส้เนื่องจากความเครียดจากการหย่านมเป็นสิ่งที่กระตุ้นจำเพาะเจาะจง หรือแม้กระทั่งการทดสอบการตอบสนองต่อแบคทีเรียพบว่า IL-1, IL-6 และ TNF- mRNA ขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อปล่อยให้สัตว์มีการปรับตัวยีนเหล่านี้ก็จะค่อย ๆ ลดลงซึ่งสะท้อนว่าสัตว์มีการปรับตัวหลังจากได้รับเชื้อและตอบสนองต่อการทำงาน การเกิดสภาวะอักเสบ หรือแม้กระทั่งการทดสอบ การปนเปื้อน deoxynivalenol (DON) ในข้าวสาลี วัตถุประสงค์อาหารสุกร มีผลต่อปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตลดลง ส่วนการ

แสดงออกของไซโตไคน์หลังจากที่ได้รับ 24 วัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของยีน IL-1, IL-6, IL-10, TNF, TLR-4 และ IL-8 ที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย แต่ยีน Claudins 2 เพิ่มขึ้นที่ลำไส้เล็กส่วนปลายเมื่อสุกรได้รับ ข้าวสาลีปนเปื้อนที่ระดับสูงสุด 0.20 – 0.40 ppm เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่โดยภาพรวมการปนเปื้อนของ DON ไม่มีผลต่อลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของสุกร (Pasternak et al., 2018) สำหรับการทดสอบ lipopolysaccharide (LPS) ต่อการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IFN- $\alpha$  และ IL-10 ต่อปัจจัยการกระตุ้น GM-CSF เป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว และปัจจัยการเจริญเติบโตของสุกร 5 วันหลังคลอด 40 วัน และ 120 วันหลังจากหย่านม หลังจากที่ได้รับ LPS 24 และ 24 ชั่วโมง พบว่า IFN- $\alpha$  มีการแสดงออกส่วนใหญ่ในลูกสุกรแรกคลอดและหลังหย่านม แต่การแสดงออกของ Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) สูงในช่วงแรกคลอด และหย่านม โดยเฉพาะที่ 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกของ IL-2 ในทุกอายุสุกร (Islam et al., 2013)

## 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างไซโตไคน์และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรหย่านม

McLamb และคณะ (2013) ได้อธิบายสารชักนำของการเกิดการอักเสบ ที่ได้มาจากเซลล์ของกลุ่มไซโตไคน์ ที่ไม่มีอยู่เดิมภายในเซลล์ ต้องสร้างขึ้นใหม่ เป็นสารพวก polypeptides พบสร้างในเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ lymphocyte และ macrophage สาร ไซโตไคน์ ที่สำคัญได้แก่ IL-1, TNF- $\alpha$  และ IL-8 ไซโตไคน์ เหล่านี้ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น และกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวตัวอื่น เช่น neutrophil และ lymphocyte และมีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบ โดยเฉพาะต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด ในการช่วยสร้างเซลล์ชนิดหนึ่งที่อยู่บน cell surface เกี่ยวข้องกับการผูกพันกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ (adhesion molecules) เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะติดกับผนังหลอดเลือด ช่วยสร้างไซโตไคน์ และ growth factors ตัวอื่น ๆ อีกทั้งยังช่วยการสร้างสารเอโคซานอยด์ (eicosanoids) และ NO (nitric oxide) นอกจากนี้ยังเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาของเซลล์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว ของเซลล์ fibroblasts และทำให้เกิดอาการทางคลินิกอื่น ๆ เมื่อเกิดการอักเสบ เช่น ไข้ เป็นต้น ทั้งนี้จากการทดลองของสุกรที่หย่านมเร็วที่ 16 และ 18 วัน ต่อการตอบสนองในการรับเชื้ออีโคไล เมื่อเทียบกับสุกรที่หย่านม 20 วัน โดยมีการศึกษาการตอบสนองต่อการเกิดการอักเสบที่ลำไส้เล็กของสุกรหย่านมกลุ่ม Cytokines ของ IL-6 และ IL-8 ตรวจพบในกลุ่มที่หย่านมปกติ ส่วนระดับของ TNF พบในเยื่อบุลำไส้ของสุกรที่หย่านมเร็ว สำหรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันเชื้อโรคโดยการอักเสบ เมื่อมีการติดเชื้อในระยะเวลานานจะเกิดการตอบสนองโดยธรรมชาติจะมีการเปิดการใช้งานของเยื่อบุผิวและเซลล์ภูมิคุ้มกัน เช่น mast cells (Malaviya et al., 1994; McLachlan et al., 2003) แมคโครเฟจ (macrophages) และ dendritic cells

(Qian et al., 2012) ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการอักเสบอย่างรวดเร็วสามารถตรวจพบกลุ่มของไซโตไคน์ เช่น IL-6, IL-8 และ TNF- $\alpha$  โดยมีสื่อกลาง เช่น prostaglandins, leukotrienes ในเนื้อเยื่อโดยรอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการติดเชื้อและการเกิดการอักเสบนั้นเป็นกลไกของการต่อต้านการติดเชื้อ เป็นรูปแบบการทำงานของภูมิคุ้มกันโดยการตอบสนองโดยธรรมชาติ อีกทั้งกลุ่มของ IL-6 และ IL-8 ยังสามารถพบได้ในลำไส้ โดยที่บทบาทของไซโตไคน์ มีหน้าที่ป้องกันและกำจัดแบคทีเรียและการรอดชีวิตของโฮสต์ โดยเฉพาะ แมคโครฟาจ, endothelial cells, B cells และ mast cells ผลผลิตจากการตอบสนองของ IL-6 ในทางกลับกันยังสามารถช่วยให้จุลินทรีย์อื่น ๆ อยู่รอดในขณะที่ในระบบทางเดินอาหารมีการติดเชื้อ ดังนั้นการศึกษาบทบาทการป้องกันการติดเชื้อของ IL-6 และ IL-8 พบว่าไซโตไคน์ นี้ตอบสนองต่อการเกิดการอักเสบของเซลล์โดยการกระตุ้นด้วยเชื้ออีโคไล ด้วยการทำงานร่วมกันเพิ่มการอักเสบในลำไส้ อีกทั้งระดับของ TNF สูงขึ้นในกลุ่มของสุกรที่หย่านมเร็ว ส่วนในสุกรกลุ่มที่มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ แล้วมักไม่ตรวจสามารถตรวจพบ TNF- $\alpha$  โดยระดับและชนิดของแบคทีเรียที่ได้รับนั้นจะมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่วมกับสุกรได้มีการจดจำแบคทีเรียต่อการติดเชื้อโดยระบบภูมิคุ้มกันแบบธรรมชาติมักไม่พบกลุ่มของ IL-6 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ ที่ถูกผลิตโดยเซลล์หลายชนิดรวมทั้งแมคโครฟาจที่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด อีกทั้งกระบวนการหย่านมมักจะเกิดความเครียดทำให้สุกรติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายยิ่งขึ้นหรือการฉีดวัคซีนสามารถตรวจพบระดับของ Cytokines เช่น IL-6, IL-8 และ TNF สูงขึ้นในระดับที่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาหลายงานพบว่าการเพิ่มหรือลด ของการตอบสนองของไซโตไคน์หรือยีนของสุกรหย่านมใหม่ และหลังจากการทำวัคซีนนั้นเกิดจากการตอบสนองและการแทรกซึมของนิวโทรฟิล ร่วมด้วยผลกระทบต่อกิจกรรมการหย่านมยังมีสภาวะความเครียดแล้วส่งผลจากการเสื่อมสภาพของเซลล์ อาจมีส่วนทำให้ระดับของ TNF สูงเช่นกัน ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายเซลล์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในระบบทางเดินอาหารทำให้เซลล์เกิดการเสื่อมสภาพและเกิดการติดเชื้อเรื้อรัง (Smith et al., 2010) แต่สำหรับสุกรที่ได้รับเชื้อและเกิดการอักเสบหรือแผลที่กระเพาะอาหารจะตรวจพบระดับของไซโตไคน์ IL-8 และ IL-1 ในสุกรอายุ 2-3 เดือน และเมื่อสุกรมีอายุมากขึ้น 6-8 เดือน การแสดงออกของ IL-8, IL-17A และ IFN- $\gamma$  ลดลง ซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ (Witte et al., 2017) จากการทดลองการตอบสนองของไซโตไคน์ ในลำไส้ หลังจากการกรอกปาก lipopolysaccharide (LPS) จาก *E. coli* (0 ถึง 0.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ของอาหาร) ในสุกรหย่านม Parra และคณะ (2013) พบว่า การอักเสบหลังจากการกระตุ้นด้วย *E. coli* ในลูกสุกรหย่านมอายุ 21 วัน น้ำหนัก  $6.5 \pm 0.5$  กิโลกรัม โดยการการุณฆาตที่ 1, 5, 7 และ 10 วัน หลังจากหย่านม และเก็บชิ้นส่วนของลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) เพื่อนำไปสกัดตรวจสอบการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันตรวจพบกลุ่มของไซโตไคน์ ที่ตอบสนองต่อการเกิดสภาวะอักเสบและการเกิดท้องเสีย เช่น IL-8, IL-18 และ

TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) ซึ่งพบว่าเกิดการเกิดอาการท้องเสียสามารถพบได้ในช่วงวันที่ 5 หลังจากการกรอก และเมื่อวันที่ 10 พบอัตราการเกิดท้องเสียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกว่าสิ้นสุดการทดลองของสุกรที่ได้รับ LPS และสามารถตรวจพบ NF-KB, IL-8 และ IL-18 ได้ตั้งแต่วันแรกของการกรอก ถึง วันที่ 5 หลังจากหย่านม ( $P < 0.01$ ) และเมื่อเข้าช่วง 5-10 วันเป็นช่วงการฟื้นตัวของอาการท้องเสียของสุกร อีกทั้งเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของไซโตไคน์สามารถตรวจพบได้สูงสุดที่ลำไส้ส่วนเล็กส่วนกลาง (jejunum) ( $P < 0.01$ ) อีกทั้งตรวจพบ TNF- $\alpha$  ในลำไส้เล็กส่วนต้น (Duodenum) มีการแสดงออกน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และปลาย (ileum) ซึ่งสอดคล้องกับ McLamb et al. (2013) ศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์ เกิดจากความผิดปกติในลำไส้ของสุกรช่วงหย่านม ซึ่งเกี่ยวเนื่องด้วยกับสภาวะความเครียดและการติดเชื้อในลำไส้ร่วมด้วยและสุกรจะแสดงอาการท้องเสียหลังจากได้รับผลกระทบเหล่านี้ อีกทั้งอิทธิพลของกิจกรรมการหย่านมมีความเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกกลุ่มของไซโตไคน์ ที่มีผลต่อการเกิดการอักเสบในลำไส้ของสุกรซึ่งสอดคล้องกับ Pie et al. (2004) ได้สรุปไว้ว่า ไซโตไคน์มีบทบาทที่สำคัญในการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกัน แต่ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่เกี่ยวข้อง และการเปลี่ยนแปลงกลุ่มของไซโตไคน์ บริเวณลำไส้ของสุกรเกิดสุกรเกิดปัจจัยด้านอาหาร และสิ่งแวดล้อม ซึ่งนำไปสู่การปรับเปลี่ยนและการปรับตัวของสัณฐานวิทยา รวมถึงการทำงานของลำไส้ จากการศึกษาที่มีกลุ่มของไซโตไคน์ ได้แก่ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40 และ IL-18 ที่สุกรอายุ 28 วัน โดยกำหนดเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 5 และ 8 วัน หลังจากหย่านม พบว่ากิจกรรมการหย่านมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาลำไส้ ซึ่งจากการศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์บริเวณลำไส้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการตอบสนองอย่างเฉียบพลันในช่วงต้น (1-2 วันแรก หลังจากหย่านม) IL-1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  จะเพิ่มขึ้น โดยที่การควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ พบว่า IL-1 mRNA นั้นเกิดขึ้นในพื้นที่ส่วนใหญ่ของลำไส้ ในขณะที่ IL-6 และ TNF - mRNA เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนโดยเฉพาะในลำไส้ หลังจากสุกรฟื้นตัวจากความเครียดและเริ่มกินอาหารได้มากขึ้น ระดับของ IL-1, IL-6, และ TNF- mRNA กลับมาปกติ แต่ยกเว้น TNF- mRNA ที่ยังคงอยู่ต่อเนื่องไปจนถึง ส่วนที่สองของการตอบสนอง ซึ่งยังสามารถตรวจพบระดับการเปลี่ยนแปลงของ IL-12 subunit p40 (IL-12p40) และ IL-18 mRNA

### 2.11 การศึกษาการเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าในสัตว์และคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน

การศึกษากการทดแทนโปรตีนถั่วเหลืองในปริมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ ด้วย *Arthrospira maxima*, *A. platensis* และ *C. vulgaris* พบว่าเหมาะสมไม่ส่งผลเสียใด ๆ ต่อสุกร (Gatrell et al., 2014) ซึ่งพบว่ากระบวนการผลิตอาหารสัตว์มีบทบาทสำคัญต่อการใช้ประโยชน์ของสไปรูลิน่าใน

อาหารสุกร การใช้สไปรูลิनाในรูปแบบอาหารอัดเม็ดทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง แต่ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญโตสุกรถ้าใช้ในรูปผง (Grinstead et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมสไปรูลิनाช่วยเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์สุกร ช่วยเพิ่มการเคลื่อนไหวของอสุจิและยืดระยะเวลาการเก็บรักษา (Granaci et al., 2007) ช่วยสร้างพอลลิคัล ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน และ ระดับของโกรท ฮอร์โมนในสุกรจนถึงสุกรสาวเตรียมทดแทน (Grigorova et al., 2017) อีกทั้งการเสริมสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *L. digitata* ช่วยเพิ่มน้ำหนักสุกรได้ 10% รวมทั้งช่วยเพิ่มความเข้มข้นของไอโอดีนในเนื้อเยื่อของสุกรได้ถึง 45% (He et al., 2002) เช่นเดียวกัน รวมทั้งเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของสุกร (Dierick et al., 2017) อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยังตรงกันข้ามกับ Reilly et al. (2008) ที่รายงานไว้ว่าสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Laminaria hyperborean* และ *L. digitata* ทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของสุกรลดลง

Hayashi et al. (1994) ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันของสไปรูลิनाเสริมในอาหารหนู (mice) ผลที่ได้คือ 1) หนู (mice) ที่กินสไปรูลินาแสดงการเพิ่มจำนวน antibody-producing cells ในม้าม ซึ่งเป็นการตอบสนองขั้นต้นต่อ sheep red blood cells 2) เปอร์เซนต์ของเซลล์ phagocytic เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ในระบบทางเดินอาหารที่ได้จากเก็บตัวอย่างจากช่องท้องของหนูที่รับอาหารสไปรูลินา 3) การเพิ่มขึ้นของ Conavalin (Con a) หรือ phytohemagglutinin (PHA) ที่เซลล์ม้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) 4) การเสริมสารสกัดสไปรูลินาในน้ำร้อนในหนูทำให้เพิ่มขึ้นของ IL-1 อีกทั้งสไปรูลินาและสารสกัด สามารถปรับปรุงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผ่านการเหนี่ยวนำหน้าที่ของ macrophage, phagocytosis, และผลผลิต IL-1

มีการศึกษารูปแบบการใช้ที่แตกต่างกันไป Qureshi et al. (1995) ได้ ศึกษาการเพาะเลี้ยง saphead explicated macrophage ด้วยสารสกัดสไปรูลินา 10-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 1-16 ชั่วโมง พบว่า 1) Spirulina-treated macrophages แสดงการเพิ่มขึ้นของการแพร่กระจายและลักษณะเป็นช่องว่าง และพบพิษน้อยที่สุด 2) อัตราร้อยละของ phagocytic macrophages สำหรับเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cells; SRBC) และจำนวนเฉลี่ยของ internalized SRBC สูงขึ้นใน Spirulina-treated macrophages เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 3) ในของเหลวใสของอาหารเลี้ยง Spirulina-treated macrophages ประกอบไปด้วย ปัจจัยที่มีศักยภาพที่คล้ายกันในการเกิดปฏิกิริยาที่สร้างโดย macrophages หลังจากให้ โฟพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) รวมทั้งมีการศึกษาในไก่ ที่เสริมสไปรูลินาในระดับ 1,000 ppm สรุปได้ว่าการเสริมสไปรูลินาช่วยปรับปรุงการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-Mediated Immune Response) ในไก่ได้ นอกจากนี้ยังศึกษาการเสริมสไปรูลินาในระดับ 1,000 ppm ในอาหารไก่พันธุ์เล็กฮอร์น

แสดงจำนวนที่ลดลงของแบคทีเรียในระบบไหลเวียนเลือดและม้ามหลังจากฉีด *E-coli* ภายในระยะเวลา 30 นาที (Qureshi, & Ali, 1996; Qureshi et al., 1995b) ผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้อธิบายเพิ่มเติมโดย Qureshi et al. (1995a) เป็นการพัฒนากิจกรรมของเซลล์ phagocytic ต่อการลดลงของแบคทีเรียที่ทำงานในเนื้อเยื่อม้าม เมื่อเวลาผ่านไปการขึ้นของผลศักยภาพของภูมิคุ้มกันของสารประกอบเฉพาะในอาหารต่อเซลล์ในระบบโมโนนิวเคลียร์ฟาโกไซท์ (mononuclear phagocyte system) เป็นเครือข่ายของแมกโครฟาจ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายเม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อที่ตายแล้วของร่างกาย และทำลายจุลินทรีย์ที่แปลกปลอม ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย และปรสิต เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของ macrophages สอดคล้องกับงานทดลอง Isobe et al. (1995) ได้มีการเสริมสไปรูลิน่าในไก่ โดยที่กลุ่มเสริมสไปรูลิน่าในระดับสูง 10,000 ppm เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 ppm พบว่าแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดง (Antirad blood cell antibody titers) สูงกว่า เนื่องจากการเสริมสไปรูลิน่าสามารถตอบสนองการ phagocytic ให้มีศักยภาพสูง มากกว่ากลุ่มควบคุม และกิจกรรมของเซลล์ NK-Cell ที่สูงกว่าเช่นกัน สอดคล้องกับ Qureshi, & Ali (1996) ได้สรุปว่าการเสริมสไปรูลิน่าในระดับ 10,000 ppm อาจเพิ่มศักยภาพในการต้านทานโรคในไก่ได้

เนื่องจากปัจจัยด้านต้นทุนการผลิต มีส่วนทำให้งานวิจัยการเสริมสไปรูลิน่าในสุกรในปัจจุบันมีน้อย จึงสามารถสรุปประเด็นวัตถุประสงค์ของการเสริมได้ 2 ประเด็น สำหรับประเด็นแรกคือ ด้านเจริญเติบโตในสุกรหย่านมลูกผสมที่เลี้ยงด้วยสหารายสไปรูลิน่าในระดับ 1.5% และ 3% ของอาหาร มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับ Grinstead et al. (2000) ได้ศึกษาการเสริมสหารายสไปรูลิน่าในอาหารสุกรหย่านมส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) ลดลง ในขณะที่เดียวกันการเสริมรูปแบบรายมื้อทำให้ ADG สูงขึ้นกลุ่มที่เสริมสหารายสไปรูลิน่าที่ระดับ 2% ทำให้ ADG สูงกว่ากลุ่มควบคุม ในช่วง 14-18 วันหลังจากหย่านม และสำหรับด้านที่สองคือ อัตราการเจริญพันธุ์ของสุกร จากการศึกษาของ Granaci (2007) ในสุกรพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วย BloR (สารสกัดจากสหารายสไปรูลิน่า) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรต่อวัน ทำให้ปริมาณน้ำเชื้อ และอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

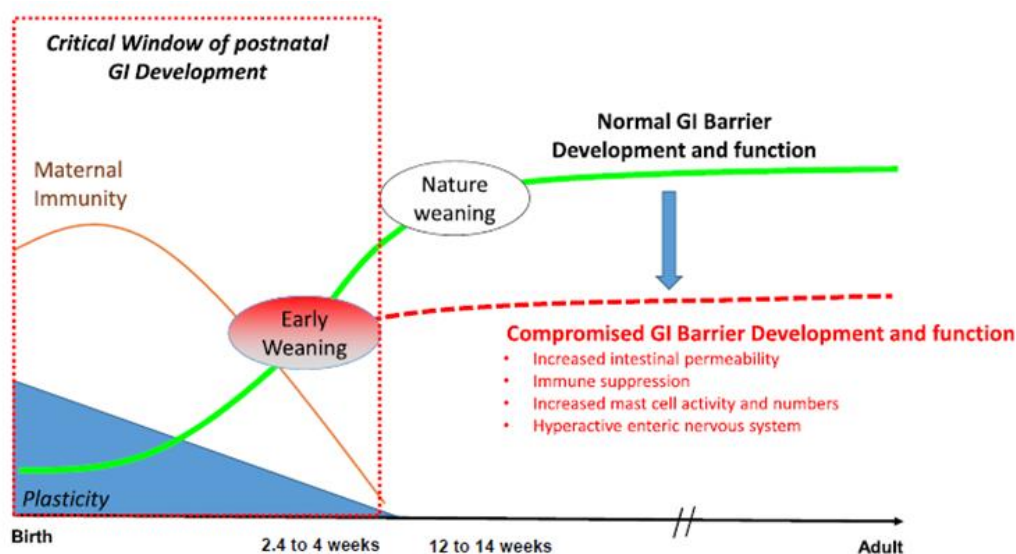
Mao et al. (2000) ศึกษาผลจากสไปรูลิน่าต่อการเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันในคนผลจากสไปรูลิน่า โดยใช้ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) พบว่าสไปรูลิน่าสามารถกระตุ้นการหลั่งของ IL-1 $\beta$ , IL-4, และ IFN- $\gamma$  ประมาณ 2.0, 3.3, และ 13.6 ครั้ง ตามลำดับ เมื่อเทียบกับระดับพื้นฐานปกติ ดังนั้นสไปรูลิน่า อาจทำให้เกิดการป้องกันที่แข็งแกร่งกับเชื้อโรคในเซลล์ และปรสิต เช่นเดียวกับ Saeki et al. (2000) ศึกษาใช้สารสกัดด้วยน้ำร้อนจากสไปรูลิน่าในคน เพื่อปรับภูมิคุ้มกัน หลังจากดื่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่ากิจกรรมของ IFN- $\gamma$  และ NK cell activities เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้สไปรูลิน่ายังช่วยลดอาการภูมิแพ้ ลดการเกิดเนื้องอก (Kim et al., 1998)

ช่วยเพิ่ม IgA ใน lymphoid cells ในหนู โดยเฉพาะในม้าม และ mesenteric lymph node ของหนูที่กระตุ้นด้วยแอนติเจน (Hayashi et al.,1998) รวมทั้งกระตุ้น ระดับ IgA ในน้ำลายของคน (Ishii et al., 1999) และการเสริมสไปรูลิน่าสามารถเพิ่มขึ้นของการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพิ่มขึ้น รวมทั้งการปรับปรุงการผลิตแอนติบอดี (Hayashi et al.,1994) โดยการหลั่ง cytokine ต่อจากนั้นจะมีการตอบสนองของ T-Cell และการกระตุ้นการทำงานของ NK-cell (Hirahashi et al., 2002) สอดคล้องกับการกรอกปากด้วยสารสกัดจากน้ำร้อนของสไปรูลิน่าสามารถกระตุ้น NK- Cell ได้ และร่างกายสามารถผลิต IFN- $\gamma$  เมื่อได้รับสไปรูลิน่า ยังมีผลต่อการเหนี่ยวนำ NK-Cell ต่อการกระตุ้น Rae-1-positive cell killing ในหนู และสไปรูลิน่าสามารถช่วยในการชะลอการเจริญเติบโตของเนื้องอกในหนูได้ ส่งเสริมการต่อต้านการเกิดเนื้องอกในหนูขึ้นอยู่กับ MyD88 ไม่ใช่ส่วนของ adaptor TICAM-1 (TRIF) โดยที่สไปรูลิน่ากระตุ้นการเปิดใช้งาน NK MyD88 ที่ไม่ซ้ำกันผ่านการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่เยื่อจึงเป็นการรักษาภูมิคุ้มกันที่เป็นไปได้ของ BCG-Cell wall skeleton (CWS) ร่วมกับสารสกัดจากสไปรูลิน่า (Akao et al., 2009) รวมถึงการศึกษาการนำสารสกัด Immulina จากสไปรูลิน่ามาใช้ในคนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน Nielsen et al. (2010) ทดสอบสารสกัดทางการค้าจากสไปรูลิน่าต่อศักยภาพในการกระตุ้น THP-1 monocytes และ CD4+ T cells ในหลอดทดลอง ทดสอบศักยภาพของหน้าที่ทางด้านภูมิคุ้มกันในหนู พบว่ามีศักยภาพด้านกลไกของ NK cell เมื่อให้ Immulina ในระยะเวลา 7 วัน ดังนั้นเพื่อความเข้าใจถึงผลของ Immulina ที่มีต่อกลไกของ NK cell จึงได้มีการศึกษาในคนที่สุขภาพดีโดยให้ Immulina ในปริมาณ 400 มิลลิกรัมต่อวัน ภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของ NK cell และ T-cell marker perforin เพิ่มขึ้น 75% หลังจากได้รับ อีกทั้งการศึกษาทดลองในสุกรระยะรุ่น น้ำหนัก 12.30-32.40 กิโลกรัม โดยใช้ระยะเวลาทดลอง 47 วัน เสริมสไปรูลิน่า 2 และ 3 กรัมต่อตัวต่อวันในอาหาร พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ 12.50% และ 24.25% เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 14.25% และที่สำคัญจากการตรวจสอบค่าเลือดพบค่า เม็ดเลือดขาว (erythrocytes) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) สูงขึ้น 15% และ 13% ตามลำดับในสุกรที่เสริมสไปรูลิน่า 3 กรัมต่อตัวต่อวัน และมีสุกรป่วยต่ำกว่า (2.40 และ 2.13%) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริมสไปรูลิน่ามีอัตราการป่วยเท่ากับ 5.40% (Nedeva et al., 2014) ตามรายงานที่รวบรวมไว้ข้างต้น การค้นพบของการศึกษามีความสำคัญในบริบทของการแทรกแซงการรักษาธรรมชาติและโภชนาการในการป้องกันการติดเชื้อโดยสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเฉพาะเจาะจง ที่พบในการศึกษาเหล่านั้น เป็นปรากฏการณ์แรกของการป้องกันเชื้อโรค ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันจึงมีข้อดีระยะยาวในการป้องกันร่างกาย

## 2.12 ปัจจัยความเครียดที่มีผลต่อสุขภาพ และการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันของสุกรหย่านม

ปัจจัยที่มักก่อให้เกิดความเครียดในสุกรมีหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ การจัดการ การเคลื่อนย้าย การจับบังคับ พฤติกรรมทางสังคม การเปลี่ยนแปลงโภชนาแต่ละช่วงอายุ เป็นต้น ล้วนมีส่วนส่งเสริมให้สุกรเกิดสภาวะเครียด พบว่ากลไกการสังหารหรือสมองต่อการตอบสนองต่อปัจจัยเหล่านี้ ส่งผลโดยตรงต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจัดเป็นสมองส่วนที่สองมีความเกี่ยวข้องเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร หรือแม้กระทั่งการได้รับเชื้อจนเกิดสภาวะท้องเสียรุนแรง ซึ่งมักเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น สภาพแวดล้อม และกระบวนการจัดการที่มีผลทั้งทางตรง และทางอ้อม เกี่ยวข้องกับอัตราการมีชีวิตอยู่ของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เกี่ยวข้องกับการจัดการการควบคุมสภาวะความเครียด แต่อย่างไรก็ตามสุขภาพสุกรเมื่อพิจารณาจากความสมบูรณ์ของเยื่อบุผิวในระบบทางเดินอาหาร สามารถบ่งบอกการรอดของโฮสต์ การขนส่งสารน้ำ อิเล็กโทรไลต์ และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์ โดยการพัฒนาและการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกภายในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีกลไกที่ซับซ้อน (Backhed et al., 2005; Honda and Littman, 2016; Kelly et al., 2015; Moeser et al., 2017) โดยทั่วไปแล้วคุณสมบัติของเยื่อบุผิวภายในระบบทางเดินอาหาร การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวมีผลโดยตรงต่อโฮสต์ สภาวะความเป็นกรดต่าง และความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร เป็นส่วนที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันและระบบประสาทลำไส้ ความสำคัญเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันโรค ซึ่งเรียกกลไกนี้ว่า การสร้างอุปสรรคการซึมผ่านไทต์จังก์ชัน (Tight junctions) หรือ occluding junctions เป็นเซลล์โปรตีนต่อการทำงานทั่วไปมีหน้าที่ในการป้องกันการรั่วไหล ซึ่งประกอบด้วย เยื่อบุระหว่างเซลล์ ภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ โปรตีนเหล่านี้ได้แก่ zonula occludens, occludin และ claudins (Moeser et al., 2017) หรือแม้กระทั่งความสามารถในการควบคุมการหลั่งไอออนและของเหลว ถือเป็นกลไกที่สำคัญในการกำจัดเชื้อโรคเพื่อตอบสนองต่อความเครียดและติดเชื้อโรค และทำให้เกิดสภาวะท้องเสียของสุกร (Moeser, & Blikslager, 2007) เซลล์ภูมิคุ้มกัน และโครงสร้างของระบบน้ำเหลืองภายในลำไส้เป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย เมื่อพิจารณาจากสภาพแวดล้อมการทำงานของแอนติเจน จะถูกควบคุม และกระตุ้นผ่านกลไกการป้องกันอย่างต่อเนื่อง เช่นการอักเสบอย่างต่อเนื่อง เป็นส่วนหนึ่งของการสร้างสารแอนติเจน เพื่อให้กลไกการทำงาน การควบคุม และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสภาวะที่ปกติ จะต้องควบคุมปัจจัยด้านความเครียด อาหาร การจัดการ และสิ่งแวดล้อมเพื่อไม่ให้เกิดความผิดปกติจนเกิดการอักเสบดังแสดงในภาพ 13.



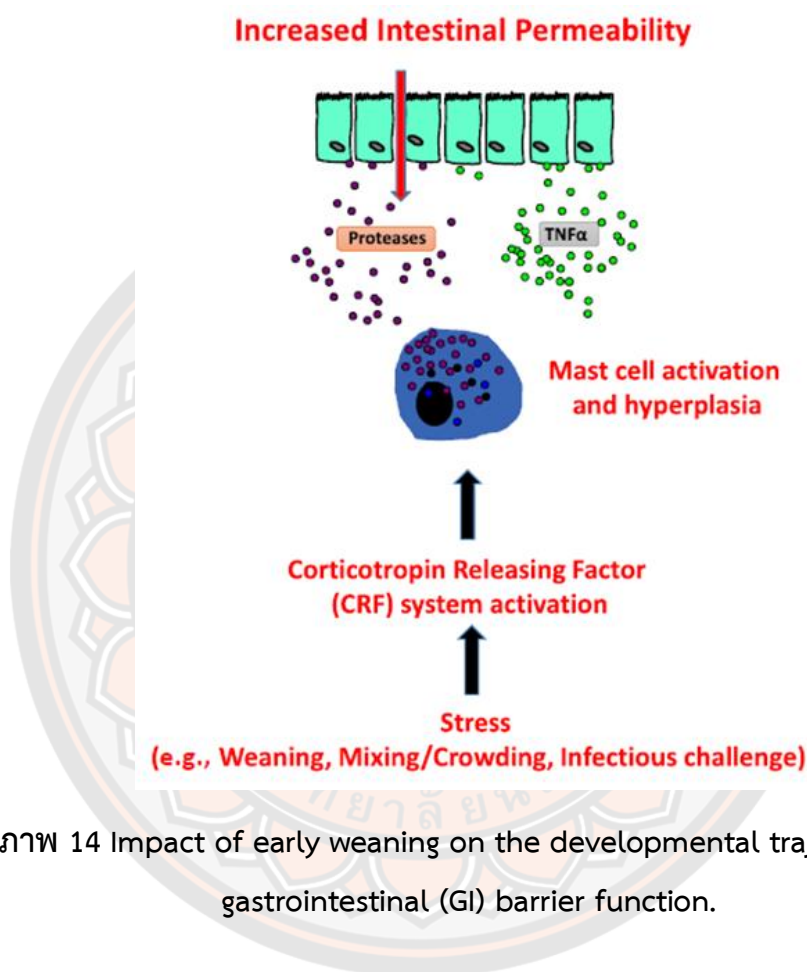


ภาพ 13 Mechanisms of intestinal barrier dysfunction induced by production stressors in pigs

ที่มา: Adapted from Moeser et al., 2017

การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร หรือ Microbiota เกิดขึ้นหลังจากสุกรคลอด พบว่าจะมีการสร้างกำแพงเยื่อผิวอย่างรวดเร็ว ภายใน 2-3 สัปดาห์แรก ทำให้ลดการซึมผ่าน กระบวนการนี้เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันผิวสัมผัสของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน (Mackey et al., 2016; Patel et al., 2012) ซึ่งการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้หลังคลอดของสุกร และหลังจากหย่านมเป็นช่วงที่กำลังพัฒนา และการตั้งรกรากของจุลินทรีย์บริเวณเยื่อระบบทางเดินอาหาร ในช่วงนั้นน้ำเหลืองและแอนติเจนมีโอกาสที่จะผ่านเข้าได้อย่างรวดเร็ว (ภาพ 13) นอกจากนี้เยื่อผิวลำไส้สามารถจัดการปัจจัยภายในและภายนอก เพิ่มเติมการทำหน้าที่ยับยั้งการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น Immunoglobulin A เป็นต้น ซึ่งในช่วงแรกนมจากแม่ยังสามารถให้ไซโตไคน์ต้านการอักเสบ รวมถึงควบคุมการแสดงออกของ Toll like receptor (TLR) ที่ตอบสนองในการเกิดการอักเสบ (Newburg & Walker, 2006) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลง พัฒนาของเยื่อระบบทางเดินอาหารได้รับอิทธิพลจาก การขนส่ง การเคลื่อนย้าย การต่อสู้จากพฤติกรรมกำจัดลำดับทางสังคม การฉีดวัคซีน และอายุหย่านม เป็นปัจจัยต่อการเกิดโรค เนื่องจากช่วงนี้เป็นช่วงที่ระดับภูมิคุ้มกันลดลงหลังจากคลอด ฉะนั้นจะต้องควบคุมปัจจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นเพื่อควบคุมการพัฒนาเยื่อผิวระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบประสาท เนื่องจากช่วงอายุหย่านม 15-28 วัน ส่วนใหญ่จะต้องเน้นเป็นพิเศษในช่วง 1-2 สัปดาห์หลังจากหย่านม จะส่งผลเชิงบวกต่อสุขภาพลำไส้ และการทำงานของลำไส้ในหน้าที่ระบบย่อย และดูดซึมโภชนาการในระยะยาว อีกทั้งยังพบว่าอายุหย่านมที่ 2

สัปดาห์ หรืออายุเพิ่มขึ้นจะลดการซึมผ่านของลำไส้ (Moeser and Blikslager, 2007; Smith et al., 2010) เมื่อระดับภูมิคุ้มกันสุก ลดลง มักพบว่าสุกรที่อายุ 15-16 สัปดาห์ มีอุบัติการณ์ทางคลินิกเพิ่มขึ้น เช่น อาการท้องร่วง และการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากความสามารถในการซึมผ่านของลำไส้ลดลงเมื่อเทียบกับช่วงหย่านมใหม่ (McLamb et al., 2013)



ภาพ 14 Impact of early weaning on the developmental trajectory of gastrointestinal (GI) barrier function.

ที่มา: Adapted from Moeser et al., 2017

จากการประเมินเยื่อเมือกของสุกรหย่านมก่อนกำหนดที่ 14 วัน แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของ IL-6, IL-8 และนิวโทรฟิล มีผลต่อการยับยั้งการติดเชื้อ *E-coli* เมื่อเทียบกับกลุ่มที่หย่านมปกติที่ 21 วัน อีกทั้งยังพบว่าความเข้มข้นของเซลล์โดยเฉพาะลิมโฟไซต์สูงขึ้นในสุกรที่หย่านม 21 วัน เมื่อสุกรอายุ 37 วัน พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เหล่านี้เป็นผลต่อการตอบสนองต่อความเครียด (Davis et al., 2006) และการทำงานของระบบประสาท cholinergic ในการปรับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการเกิดท้องเสียจากสารคัดหลั่งและเยื่อผิวลำไส้ ซึ่งระบบประสาทดังกล่าวไม่สามารถควบคุมได้ในช่วงหย่านมระยะแรก (Dhawan et al., 2012) ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าผลกระทบ

ที่เกี่ยวข้องกับการหย่านม มีแนวทางปฏิบัติให้เหมาะสมต่อการจัดการเชิงพาณิชย์ไม่ควรหย่านมเร็วกว่าอายุหย่านมที่เหมาะสมอายุหย่านมที่เหมาะสมประมาณ 25-28 วัน จะช่วยลดปัจจัยการพัฒนาเยื่อใยระบบทางเดินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันลำไส้ อีกทั้งยังสามารถลดการเกิดการบาดเจ็บ การติดเชื้อ และการอักเสบในระบบทางเดินอาหาร ที่มีโอกาสเกิดอาการท้องเสีย



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้แบ่งการวิจัยออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ต้นแบบกรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ที่เหมาะสมโดยใช้ของเหลวจากฟาร์มสุกรเป็นอินทรีย์วัตถุทดแทนสูตรอาหารซารุค

การทดลองที่ 2 การวิจัยต้นแบบการผลิต ผลิตภัณฑ์สไปรูลินา โดยการศึกษาวิธีการหมักสไปรูลินาด้วยแบคทีเรียแลคติก (*Lactic acid bacteria*; LAB)

การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ FSP ในสุกรหลังหย่านม

**3.1 การทดลองที่ 1 ต้นแบบกรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ที่เหมาะสมโดยใช้ของเหลวจากฟาร์มสุกรเป็นอินทรีย์วัตถุทดแทนสูตรอาหารซารุค**

#### อุปกรณ์สารเคมี

- 1) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Visible Spectrophotometer) ยี่ห้อ V-5100 (HD1707003) รุ่น AC85/260V, 60/500Hz, 3.15A
- 2) เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบลำแสงคู่ (UV-Visible Double Beam Spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1800
- 3) เครื่องปั่นเหวี่ยง M-Universal รุ่น 102MU/2-56
- 4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Metter toledo รุ่น ME104
- 5) กระจกทรงสารเคมี 10, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 6) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 7) ขวดดูแรน ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 8) คิวเวทท์แก้ว
- 9) หลอด(พลาสติก)เซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร
- 10) ไมโครปิเปต ขนาด 1000 ไมโครลิตร
- 11) อ่างควบคุมอุณหภูมิ

## สารเคมี

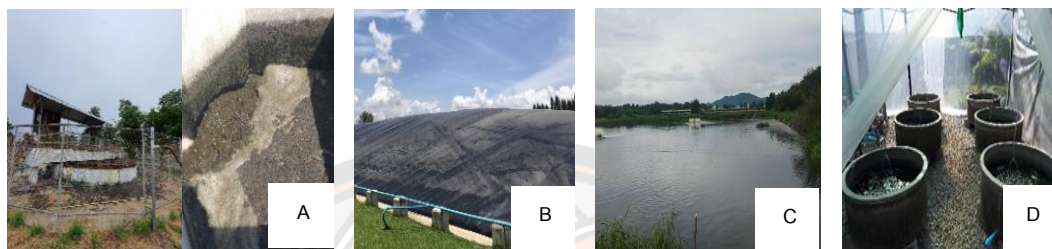
- 1) กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 2) กรดซัลฟิวริก 98 เปอร์เซ็นต์ ( $H_2SO_4$ )
- 3) ปุ๋ยเคมี N:P:K สูตร 15:15:15
- 4) สารประกอบฟีนอล ( $C_6H_5OH$ )
- 5) เอทานอล (Ethanol 95%)
- 6) โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum albumin; BSA)
- 7) โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $NaHCO_3$ )
- 8) โซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ )
- 10) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ( $KNaC_4H_4O_6$ )
- 11) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 12) ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )
- 13) Folin-Ciocalteu Phenol reagent

สำหรับการนำอินทรีย์วัตถุจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาทดแทนสูตรอาหาร modified Zarrouk's medium (Zm) เป็นแนวคิดในการการสร้างต้นแบบกรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) โดยมีวัตถุประสงค์ต่อการลดต้นทุน ยั่งยืนคุณค่าทางโภชนาการ ประกอบกับองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสไปรูลินา มีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

3.1.1 การเตรียม stock สาหร่ายสไปรูลินาในสูตรอาหาร Zm โดยสูตร modified Zm มีส่วนประกอบของ  $NaHCO_3$  6 กรัม/ลิตร  $K_2HPO_4$  0.5 กรัมต่อลิตร  $NaNO_3$  1.5 กรัมต่อลิตร และ N:P:K (16:16:16) 0.6 กรัมต่อ/ลิตร ปรับ pH  $10 \pm 0.5$  โดยใช้สาร NaOH 6N ทำการเพาะเลี้ยงในขวดโหลขนาด 5 ลิตรในอัตราส่วนของน้ำเสีย อาหารเลี้ยงเชื้อ และหัวสาหร่ายสไปรูลินา (ตาราง 6-7)

3.1.2 การเตรียมน้ำเสียจากฟาร์มสุกร ได้รับการอนุเคราะห์น้ำเสียจาก ฟาร์มสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ เขาน้ำสุต บริษัท เบทาโกร จำกัด มหาชน จังหวัดพิษณุโลก โดยกำหนด 3 แหล่งน้ำของระบบบำบัดน้ำเสีย ดังต่อไปนี้ 1. น้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย (Center tank pond ; CT) คือ น้ำเสียจากโรงเรือนเลี้ยงสุกรยังไม่ผ่านกระบวนการหมัก (ภาพ 15A) 2. น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส (Bio-gas pond; Bio-gas) คือ น้ำเสียจากโรงเรือนเลี้ยงสุกรที่ผ่านการกรองตะกอนออกและผ่านการหมักแบบไร้ออกซิเจน ประมาณ 45 วัน (ภาพ 15B) และ 3. น้ำเสียจากบ่อฝัง (Oxidation Pond; OP) คือ น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส น้ำส่วนที่ถูกละลายออกและผ่านระบบบำบัดน้ำเสียด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ

มากกว่า 75 วัน (ภาพ 15C) ก่อนการทดลองน้ำเสียทั้ง 3 แหล่งทำการกรองตะกอนน้ำโดยใช้ถุงกรอง แพลงก์ตอน ขนาดความถี่ตาข่าย 80 ไมครอน ตามด้วย 60 ไมครอน นำไปพักในบ่อซีเมนต์ 2 สัปดาห์ แล้วฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) ปริมาณ 0.2 กรัมต่อน้ำหมัก 1 ลิตร 24 ชั่วโมง พร้อมด้วยเปิดออกซิเจนเพื่อไล่ออกซิเจน (Frobose et al., 2015; Tech Manual Excerpt, 2020)



ภาพ 15 Center tank pond (A), Bio-gas pond (B) Oxidation Pond (C) and Experimental ponds

ออกแบบการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าพร้อมกันทั้ง 4 ระดับของการทดแทนสูตรอาหาร Medium Zm ด้วยน้ำเสียจาก 3 แหล่งน้ำในฟาร์มสุกร โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในโรงเรือนระบบปิด ดัดแปลงจากที่ Promya et al. (2018) โดยใช้สูตรอาหาร Medium Zm แบบปรับปรุง (จกมล พรมยะ และคณะ, 2535) ทดแทนด้วยน้ำเสียในระดับที่ต่างกันซึ่งแต่ละแหล่งน้ำเสียจะมี 4 ระดับการทดแทน 0 (CON), 40, 60 และ 80% ตามลำดับ แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ ทดลองในภาชนะพลาสติกใสขนาด 5 ลิตร ปรับปริมาณสุทธิ 4 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)  $10 \pm 0.5$  และสัดส่วนหัวเชื้อสาหร่ายสไปรูลิน่า 20% ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) เริ่มต้น 0.3 กลางวันให้รับแสงจากธรรมชาติ ส่วนกลางคืนให้แสงจากหลอดนีออน ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความชื้นไม่ให้เกิน 85% และอุณหภูมิภายในโรงเรือนไม่ให้เกิน 39 องศาเซลเซียส ตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตทุก ๆ 3 วัน โดยการวัดความหนาแน่นของเซลล์ (Optical Density; OD) เพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าให้ได้ค่า OD มากกว่าเท่ากับ 1.0 เป็นต้นไป ตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) (จกมล พรมยะ และคณะ, 2535) เมื่อครบ 24 วัน เก็บสไปรูลิน่าโดยการกรองด้วยถุงกรองแพลงก์ตอน ขนาด 80 และ 60 ไมครอน ล้างน้ำให้สะอาดและตากแดด 24 ชั่วโมงจนกว่าจะแห้ง ตรวจวัดปริมาณ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin; PC), ไฟโคอีริทริน (Phycocrythrin; APC), อัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin; PE) ตามสมการของ Bennett

และ Bogorad (1973) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (Dubois et al., 1956) วิเคราะห์โปรตีน และไขมัน (AOAC, 2010) รวมถึงต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่อหน่วยกิโลกรัม

**ตาราง 6 The ratio of waste-water from CT, biogas or Oxidation Pond: Algae**

**Stock : Stock Zm**

Trt	Spirulina (L)	Stock Zm (L)	waste water (L)	Total (L)
T1 (0%)	1.4	2.6	0	4
T2 (40%)	1.4	1.56	1.04	4
T3 (60%)	1.4	1.04	1.56	4
T4 (80%)	1.4	0.52	2.08	4

**Note:** OD 556 nm of Algae Stock = 0.857

**ตาราง 7 The ratio of modified Zarrouk's medium used following Table 6**

Chemical	2.6 liter	1.56 liter	1.04 liter	0.52 liter
NaHCO <sub>3</sub>	15.6 g	9.36 g	6.24 g	3.12 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.30 g	0.78 g	0.52 g	0.26 g
NaNO <sub>3</sub>	3.90 g	2.34 g	1.56 g	0.78 g
N:P:K	1.56 g	0.94 g	0.62 g	0.31 g

3.1.3 ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า โรงเรือนกลางแจ้ง ดัดแปลงจากที่ Promya et al. (2018) วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) มี 3 แหล่งน้ำ แบ่งเป็น 4 ระดับการทดแทนสูตรอาหารซารูก 0, 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงสาหร่ายในภาชนะใสขนาด 5 ลิตร ปรับปริมาณให้ได้ 4 ลิตร เพื่อนำมาทดสอบวัดมวลชีวภาพ และการเจริญเติบโตของสาหร่าย เพื่อคำนวณหาต้นทุนการเลี้ยง ตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต องค์ประกอบทางเคมีที่เหมาะสม

3.1.4 ทำการวัดค่าดังต่อไปนี้ ทุก ๆ 3 วัน ตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะกายภาพของสาหร่าย ทำการวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ (Optical Density; OD) วัดด้วยเครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 560 nm จาก OD เริ่มต้นอยู่ที่ 0.3 โดยเลี้ยงสไปรูลิน่าให้ได้ค่า OD มากกว่าเท่ากับ 1.0 เป็นต้นไป จะต้องปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วย NaOH 6 N โดยการปรับค่า PH ให้ได้  $10 \pm 0.5$

3.1.5 ตรวจสอบบรควัตถุของไซยาโนแบคทีเรียทุก ๆ 3 วัน โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) กรองตัวอย่างสาหร่าย 2 ml โดยใช้ชุดเครื่องกรองแรงดัน ผ่านกระดาษกรอง GF/C นำกระดาษกรองที่มีสาหร่ายสไปรูลิน่าลงในหลอด centrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร

2) เติม methanol 99.9% ปริมาณ 2 ml แล้วนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที โดยสังเกตการหลุดออกสาหร่ายที่ติดอยู่บนแผ่นกระดาษ แล้วนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียสในที่มืด

3) นำหลอด centrifuge ขนาด 2 ml (ข้อ 2) ไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 15 นาที โดยนำส่วนใสไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 461, 650 และ 665 นาโนเมตรและคำนวณปริมาณบรควัตถุของสาหร่ายของทุก 3 วัน และทุกหน่วยการทดลอง โดยมีสูตรดังต่อไปนี้

คลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) =  $(16.5 \times A_{665}) - (8.5 \times A_{650}) \dots$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คาโรทีนอยด์ (Carotenoid) =  $(A_{461} - (0.046 \times A_{665})) \times 4 \dots$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.1.6 ศึกษาการเจริญเติบโตหลังจากที่เลี้ยงสาหร่ายในอัตราส่วนที่กำหนดไว้ข้างต้น ครบ 24 วัน เพื่อตรวจสอบในรูปแบบของกราฟอัตราการเจริญเติบโตโดยใช้ดัชนีบรควัตถุในการเปรียบเทียบ จากนั้นเก็บเกี่ยวสาหร่ายสไปรูลิน่าในภาชนะเลี้ยง โดยที่ทุกครั้งจะมีการควบคุมอุณหภูมิ pH และแสง และเมื่อครบ 24 วัน โดยใช้ผ้ากรองละเอียดขนาด 60 ไมครอน กรองและล้างน้ำจนสะอาดสำหรับการเก็บเกี่ยวสาหร่ายสไปรูลิน่า

3.1.7 นำสาหร่ายสไปรูลิน่าแห้งสดตากแดด ไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวณผลผลิตสาหร่ายรูปแห้ง (air day) นำมาวิเคราะห์ปริมาณไฟโคไซยานิน ตามสมการของ Bebelt & boyorad (1973) โดยชั่งสาหร่ายสไปรูลิน่าแห้งที่บดละเอียด 0.01 กรัม ใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 2 ml ใส่สารละลาย Phosphate buffer PH 7 (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตามวิธี ของ Gomori, 1955 อ้างโดย Perrin & Dempsey, 1974) ทำการสกัดบรควัตถุให้ออกจากเซลล์ โดยการนำไปแช่เย็น -20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำไปเข้าคลื่นอัลตราโซนิค 30 นาที นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 , 615 และ 652 นาโนเมตร ตามสมการ



PC =  $[A615 - 0.474(A652)] / 5.34$  ..... ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

APC =  $[A652 - 0.208(A615)] / 5.09$  ..... ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

PE =  $[A562 - 0.849(APC)] / 9.62$  ..... ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

หมายเหตุ    PC    คือ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin)  
                   APC    คือ ไฟโคอีริทริน (Phycocrythrin)  
                   PE    คือ อัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin)

3.1.8 ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยนำสาหร่ายแห้ง และบดละเอียด ตรวจสอบปริมาณคาร์โบไฮเดรต ซึ่งตัวอย่างสไปรูลิน่า 10 มิลลิกรัม ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วย 2.5N กรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดเกลือ (hydrochloric acid) นำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 95 องศาเซลเซียส 60 นาที นำไปตรวจวัดคาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธี Dubois et al. (1956) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการ hydrolysis 0.2 มิลลิตร เติม 5% phenol 1 มิลลิลิตร และ เติมกรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) 5 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นนำไป ต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 25 องศาเซลเซียส 30 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3.1.9 วิเคราะห์โปรตีน และไขมัน ด้วยวิธี พรอกซิเมท อนาไลซิส (Proximate analysis)

3.1.10 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต ต่อตันชีวีตข้างต้น เพื่อนำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 100 ลิตร โดยมีกำลังผลิตต่อรอบการผลิตที่ 1000 ลิตร ในโรงเรือนเพาะเลี้ยงสาหร่ายระบบปิด (ภาพ 15D) เก็บสาหร่ายและตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ องค์ประกอบของไขมัน และกรดอะมิโน ผลิตสาหร่าย 80 กิโลกรัมแห้ง เพื่อนำไปใช้ศึกษาในการทดลองที่ 2 (การหมัก) และ การศึกษาที่ 3 (การเสริมสไปรูลิน่าหมักในอาหารสุกรหย่านม) โดยปกติการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิ น่าขนาด 1,000 ลิตรสามารถเลี้ยงเป็นสาหร่ายสด 10 กิโลกรัม และเมื่อทำให้แห้งจะเหลือ 1 กิโลกรัม (จنگล พรมยะ และคณะ 2553; Torzillo et al., 1986; Dineshkumar et al., 2016)

### 3.2 การทดลองที่ 2 การวิจัยต้นแบบการผลิต ผลิตภัณฑ์สไปรูลินา โดยการศึกษาวิธีการหมักสไปรูลินาด้วยแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

#### อุปกรณ์

- 1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV-Visible แบบลำแสงคู่ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1800
- 2) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Dynamica รุ่น Velocity14 R
- 3) ตู้อบลมร้อนขนาด 240 ลิตร ยี่ห้อ JSR รุ่น JSOF-400T
- 4) ตู้บ่มเชื้อขนาด 50 ลิตร ยี่ห้อ Daihan Scientific รุ่น WIG-50
- 5) เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Dynamica รุ่น Velocity14 R
- 6) เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) model UB-5, Denver Instrument, Germany
- 7) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler-Toledo
- 8) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น ME3002
- 9) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำขนาด 58 ลิตร (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SX-500
- 10) เครื่องบดสมุนไพร ขนาดตะแกรง 1 มิลลิเมตร
- 11) ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อระดับสอง
- 12) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิขนาด 14 ลิตร ยี่ห้อ Memmert Germany รุ่น WB14
- 13) อ่างน้ำระบบอัลตราโซนิก
- 14) ภาตสแตนเลส ขนาด 60x40 เซนติเมตร
- 15) Analytical balance
- 16) Autopipette 100, 200, 500, 1000 ไมโครลิตร
- 17) Beaker 80 มิลลิลิตร
- 18) Beaker 100 มิลลิลิตร
- 19) Beaker 250 มิลลิลิตร
- 20) Beaker 500 มิลลิลิตร
- 21) Buchner funnel
- 22) Burette clamp
- 23) Centrifuge tube 2, 15, 50 มิลลิลิตร
- 24) Cylinder 10, 25, 50, 100, 250, และ 1000 มิลลิลิตร

- 25) Cuvetteแก้ว และพลาสติก
- 26) Erlenmeyer flask 250 ml
- 27) Filtering paper
- 28) Hotplate & Stirrer
- 29) Laboratory Bottle
- 30) Micropipette
- 31) Pipette 500 ไมโครลิตร 1000 ไมโครลิตร และ 5 มิลลิลิตร
- 32) plate
- 33) Ring support
- 34) Suction flask
- 35) Silicon tube
- 36) Tips pipette
- 37) Vacuum pump
- 38) Tip tube 250 และ 1000 มิลลิลิตร
- 39) Volumetric flask

#### สารเคมี

- 1) Acetone / RCI Labscan
- 2) Ammonium Molybdate 99% / KemAus
- 3) D-glucose / KemAus
- 4) Dichloromethane / RCI
- 5) Diethyl ether / RCI Labscan
- 6) Labscan Ethanol 95% / RCI Labscan
- 7) Folin & Ciocalteus Phenol (FCR) Reagent AR / SRI
- 8) Gallic Acid (3,4,5,-Trihydroxy benzoic acid) / SRI
- 9) Hexane / RCI Labscan
- 10) Hydrochloric acid 37 % / RCI Labscan
- 11) L-Ascorbic Acid 99.5 % / LOBA CHEMIE PVT. LTD.
- 12) Lactic Acid / LOBA CHEMIE PVT. LTD.
- 13) Methanol 99% / RCI Labscan

- 14) Phenol Detached Crystals 99.5% / Loba
- 15) Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) / KemAus
- 16) Sulfuric acid 98 % / RCI Labscan
- 17) Sodium hydroxide / RCI Labscan
- 18) Trisodium orthophosphate 12-hydrate 98.0%  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . / KemAus
- 19) 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) / SRI

### สารละลาย

- 1) Ammonium molybdate 4 มิลลิโมล
- 2) D-glucose 100 มิลลิกรัม
- 3) DPPH 0.1 มิลลิโมล
- 4) Sodium hydroxide 0.1 โนมอล
- 5) L-ascorbic acid 1000 กรัม/ลิตร
- 6) Phenolphthalein / KemAus
- 7) Potassium hydroxide phthalate 0.1 โนมอล
- 8) Potassium hydroxide (KOH) / KemAus
- 9) Phosphate buffer
- 10) Reagent solution 1: 1: 1 ( Sodium phosphate 25 mM, Ammonium molybdate 4 mM, Sulfuric acid 600 mM)
- 11) Sodium phosphate 25 มิลลิโมล
- 12) Sulfuric acid 600 มิลลิโมล

การหมักสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 มีขั้นตอนต่อไปนี้

3.2.1 การเตรียมและเพิ่มปริมาณแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นทำการเลี้ยง *L. plantarum* TISTR 2075 ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เลี้ยงในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม ควบคุมพีเอชประมาณ 5.5 ซึ่ง พีเอชช่วงนี้สามารถผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (conjugated linoleic acid, CLA) ได้สูงถึง 103.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth โดยใช้ 1 loop ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ

ตลอดเวลา วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับค่าให้ได้  $1.0 \pm 0.1$  แล้วถ่ายเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้ได้เซลล์จุลินทรีย์ในช่วง late exponential phase จากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย 200 mM PBS buffer (pH 7.5) จำนวน 2 ครั้ง จุลินทรีย์ที่ผ่านการสร้างจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

### 1) อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร de Man Rogosa Sharp (MRS) 1 ลิตร ประกอบด้วย  $C_6H_{12}O_6$  20 กรัม beef extract 10 กรัม meat peptone 10 กรัม yeast extract 5 กรัม  $C_2H_3NaO_2$  5 กรัม  $Na_2HPO_3$  2 กรัม  $C_6H_{17}N_3O_7$  2 กรัม Tween 80.1 กรัม  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 กรัม และ  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารแข็งชนิด MRS จำนวน 5 จานเพาะเชื้อต่อหนึ่งไอโซเลต เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นชะโคลนของ *L. plantarum* ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งด้วยอาหารเหลว MRS ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บสารแขวนลอยเซลล์ที่ล้างด้วยน้ำเกลือ 0.5% และแบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเตรียมกล้าเชื้อต่อไป

2) การหาค่า standard curve ของปริมาณจุลินทรีย์ โดยใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ  $6-7 \log CFU/mL^{-1}$  มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1) นำเชื้อจุลินทรีย์มาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา นาน 48 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อจากนั้นนำเชื้อ โคลนเดี่ยว มาใส่ใน MRS broth 5 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศา นาน 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อ

2.2) นำเชื้อที่บ่มมา centrifugation 5000 รอบ 10 นาที ล้าง เซลล์จุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ

2.3) นำเซลล์จุลินทรีย์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น และนำมาวัดค่า OD 660 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าดูดกลืนแสง 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 และ 1.3

2.4) นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการวัดค่า OD มาเลี้ยงเชื้อด้วย MRS agar เพื่อหา standard curve ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยให้ค่ากราฟมาตรฐาน (standard curve) จุลินทรีย์ *L. plantarum* ที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ  $6-7 \log CFU/mL^{-1}$

3.2.2 วางแผนการทดลอง โดยการนำสไปรูลินามาหมักแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมไว้โดยหมักแบบ Co- culture semi-solid fermentation จัดการทดลองเป็นแบบ 2 X 2 factorial ซึ่งการทดลองแบบแฟคทอเรียลจะขึ้นอยู่กับจำนวนแฟคเตอร์ของการทดลอง และวิธีการสุ่มเป็นหลักในการทดลองที่ประกอบด้วย 2 แฟคเตอร์ใน CRD จะมีแบบพุ่มดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

เมื่อ  $Y_{ijk}$  = ค่าสังเกตในลักษณะที่ศึกษา

$\mu$  = ค่าเฉลี่ยของประชากรในลักษณะที่ศึกษา

$\alpha_i$  = ผลจากปัจจัยที่ 1 ที่ประกอบด้วย  $i$  ระดับ

$\beta_j$  = ผลจากปัจจัยที่ 2 ที่ประกอบด้วย  $j$  ระดับ

$(\alpha\beta)_{ij}$  = ผลจาก ผลร่วม ของแฟคเตอร์ A ที่  $i$  และแฟคเตอร์ B ที่  $j$

$\epsilon_{ijk}$  = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ซ้ำที่  $k$  ของแฟคเตอร์ A ที่  $i$  และแฟคเตอร์ B ที่  $j$

มีการกระจายแบบปกติเป็นอิสระ มีค่าเฉลี่ยเป็น 0 และความแปรปรวนเป็น  $\sigma$

โดยกำหนดให้แต่ละชุดการทดลองของการหมัก เดิมแบคทีเรียแลคติก ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ทั้งหมด 4 ทริตเมนต์ ดังแสดงในภาพ 16 ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียแลคติก 0, 2, 3 และ 4 %

ปัจจัยที่ 2 กำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก แต่ละทริตเมนต์ให้สไปรูลิน่า แบ่งออก 0, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (Niccolai et al., 2018)

1) ถ้ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเหลว de Man Rogosa Sharpe (MRS) จนมีความเข้มข้นเท่ากับ ความเข้มข้นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ (McFarland)  $0.5$  เทียบเท่ากับ  $10^7$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

2) ออกแบบการหมักซึ่งสอดคล้องกับ Nicolai et al. (2018) ; Castro et al. (2019) โดยใช้ *L. plantarum* ในการหมักสไปรูลิน่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์โดยเริ่มต้นที่  $6-7 \log$  ใช้สไปรูลิน่า 40 กรัมและปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 150 มิลลิลิตร อีกทั้งปรับระดับความเป็นกรดต่าง เพื่อให้เหมาะสมต่อ เลี้ยง *L. plantarum* TISTR 2075 โดยเติมสารละลาย Citric acid 8 โนมอล (256.19 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร) ปริมาณ 7 มิลลิลิตร

### 3.2.3 ขั้นตอนการหมัก

1) นำสาหร่ายสไปรูลิनाที่ผ่านเพาะเลี้ยงด้วยการทดแทนอาหารสูตรมาตรฐานด้วยน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียฟาร์มสุกร บดให้ละเอียดขนาด 1 มิลลิเมตร หมักด้วยวิธี Co-culture semi-solid fermentation ด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นำสไปรูลินาปริมาณ 50 กรัม บรรจุลงในขวดรีเอเจนต์ทดลองแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร (แต่ละทริตเมนต์ทำ 3 ซ้ำ) ปรับด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรสุทธิ 150 มิลลิลิตร แล้วปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลาย Citric acid 8 โนมอล ปริมาณ 7 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2) ถ่ายแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้น  $10^7$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 1, 2.5 และ 5% หรือ 0, 1.5, 3.75, และ 7.5 มิลลิลิตรตามลำดับ ลงในขวดรีเอเจนต์ทดลองแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยที่กำหนดให้เก็บตัวอย่างในส่วนสาหร่าย และของเหลวทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

4) หลังจากการหมักในอาหารเหลวจากกระบวนการหมัก นำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจากแต่ละการทดลองมากรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน (Whatman) เบอร์ 1 จะได้ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นของเหลว และสาหร่าย

5) ตรวจสอบส่วนที่เป็นของเหลว ค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่อง pH meter (pH meter model UB-5, Denver Instrument, Germany) และปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก โดยในการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างด้วยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช โดยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ที่ผ่านการปรับเทียบค่าโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4.01 และ 7.00 ส่วนการตรวจสอบปริมาณกรดโดยรวมตรวจสอบโดยการไทเทรต (total titratable acidity, TTA) ด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ ฟีนอล์ฟทาลิน เป็นตัวบ่งชี้ เพื่อนำค่าความเป็นกรดและเวลาที่ใช้ในการหมักที่เปลี่ยนไปจะส่งผลต่อความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ผลิตขึ้น (นิตยา ผาคำ, 2553) สำหรับการตรวจวัดปริมาณกรดแลคติกโดยการคำนวณจากปริมาณกรดโดยรวมโดยใช้วิธีของ (AOAC., 1990) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นเก็บข้อมูลแล้วสรุปกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลา (Period) ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของกรดแลคติก ปริมาณกรดแลคติก (Lactic acid; g/L) และ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนหลังจากการหมักของทุกช่วงเวลาที่ได้กำหนดไว้ (Total LAB; log CFU/mL) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

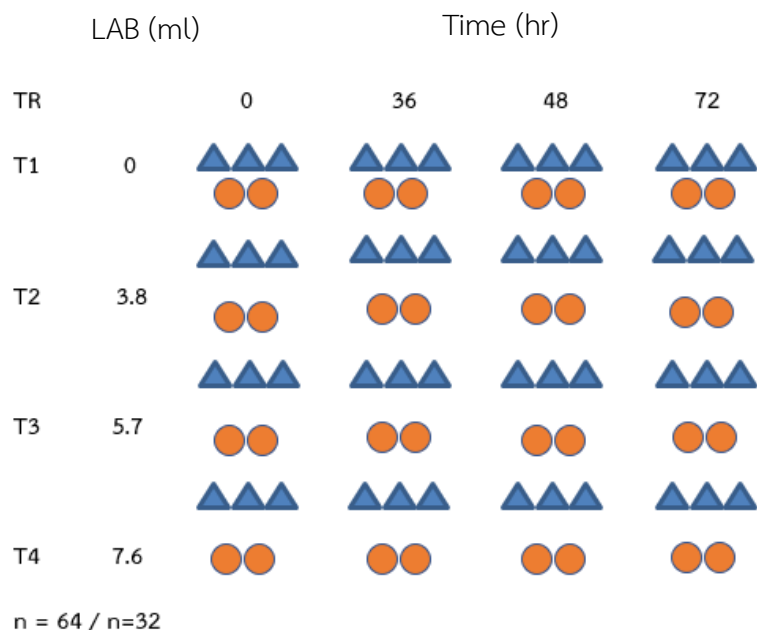
ดัดแปลงวิธีการจาก (Castro et al., 2019; Abdullakassim et al., 2008) และ การทดสอบ Antioxidant potential capacity ดัดแปลงวิธีการจาก (Niccolai et al., 2018)

6) การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ และการคงเหลือของเชื้อ *L. plantarum* โดยที่กำหนดการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ 3 รูปแบบ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของเซลล์ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งได้จากการนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากการหมักมาทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ค่าความขุ่นของเซลล์หาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density ; OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ส่วนปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหาได้โดยใช้เทคนิค count all colony forming units (CFU) ทำการวัดค่าต่าง ๆ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

7) อบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 7 ชั่วโมง และตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ดังต่อไปนี้ Total Phenolic content (TPC) และทดสอบ Antioxidant potential capacity ดัดแปลงจาก Niccolai et al. (2018) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ดัดแปลงจาก Castro et al. (2019) วิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water soluble carbohydrates, WSC) โดยใช้ phenol sulphuric acid method ตามวิธีของ Dubois et al. (1956) การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll-*a*) และการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Wintermans, & De Mots, 1965) การวิเคราะห์ปริมาณ เบต้าแคโรทีน จากสารละลายโปรตีน (เสาวลักษณ์ เรืองอ่อน และ ศักดิ์ศรี แสนยาเจริญกุล 2560; ปวันรัตน์ และคณะ 2557) การวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) (Albalasmeh et al., 2013) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry et al., 1951) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยการใช้วิธีการวิเคราะห์แบบประมาณ (Proximate analysis) (AOAC, 1990) ซึ่งวิเคราะห์วัตถุดิบแห้งโดยเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 100±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, วิเคราะห์โปรตีนหยาบ (Crude protein, CP) โดยเครื่อง Kjeltac auto analyzer, วิเคราะห์ไขมัน (Ether extract, EE) โดยเครื่อง Soxhlet auto analyser, เถ้า (Ash) โดยการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนเยื่อใยหยาบ (Crude fibre, CF) ค่าพลังงานรวม (Gross Energy; GE) และวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมัน และกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังจากการหมัก วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One way ANOVA โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.17 วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test การทดลองดังกล่าวใช้สถานที่และห้องปฏิบัติการ ของคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

8) นำกระบวนการผลิตต้นแบบ มาใช้ในการผลิต FSP เพื่อใช้ในการทดลองที่ 3 ต่อไป





ภาพ 16 Experimental method of spirulina fermentation with *L. plantarum* TISTR

2075

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ▲ สามเหลี่ยมเป็นชุดการทดลองที่หมักเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อครบตาม ช่วงระยะเวลาของการหมักจะต้องแยกน้ำเพื่อตรวจสอบปริมาณกรดแลคติก ความเป็นกรด-ด่าง และองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ วงกลม ● เป็นชุดการทดลองที่หมักครบตามช่วงระยะเวลาของการหมักที่กำหนดไว้ จะตรวจวัด ความเป็นกรด-ด่าง แล้วนำไปอบด้วยอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสไปรูลิना และปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* 2075 เริ่มต้น  $5.72 \times 10^{11}$  โดยเจือจางเชื้อที่  $10^7$  ลงในขวดทดลองตามระดับ 0, 3.8, 5.7 และ 7.6 มิลลิลิตร หรือ 0, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณจากความเข้มข้นและปริมาณของสต็อก *L. plantarum* 2075)

### 3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ SP ในสุกรหลังหย่านม

#### อุปกรณ์

- 1) โรงเรือนสุกรอนุบาล ที่ประกอบด้วย ระบบบำบัดน้ำฟาร์มสุกร ระบบควบคุมการเข้าออกฟาร์ม และป้องกันโรคฟาร์มสุกร และระบบฆ่าเชื้อ และเครื่องพ่นหมอกฆ่าเชื้อบุคคล
- 2) คอกเลี้ยงสุกรขนาด 1x2 เมตร จำนวน 44 คอก
- 3) เครื่องผสมอาหาร อัตโนมัติ ดูดความชื้น แบบกึ่งอัตโนมัติ
- 4) ตาชั่งดิจิตอลขนาด 5 ความละเอียด 0.01 กรัม , 25 และ 100 กิโลกรัม ความละเอียด 0.05 กรัม (ผ่านการตรวจเช็คมาตรฐานเครื่องชั่งเพื่องานวิจัยหมายเลข 1803134827:M18-2562A จาก Microtech Calibration laboratory; ปทุมธานี)
- 5) ถังอาหารกึ่งอัตโนมัติสแตนเลส (รูปแบบแนวนอน) ความจุ 50 กิโลกรัม ประกอบด้วยช่องเข้ากินอาหาร 4 ช่อง
- 6) สุกรหย่านม ลูกผสมสายพันธุ์ (ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดุรอด)
- 7) ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Octamux A.C.) 500 กรัม (Colistin 400 x 106 IU+Amoxycilin 100 กรัม/กิโลกรัม) สำหรับผสมในอาหารกลุ่มทดลอง CAN
- 8) เทอร์โมมิเตอร์ดิจิตอล ตรวจวัดอุณหภูมิ และความชื้น (Hygro-Thermometers) เครื่องมือตรวจวัด Water quality tester for pool and spa (Risepro®)
- 9) ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด และเตียงผ่าตัด
- 10) เครื่อง Automatic tissue processor (Modek ATP140 Amoss; Australia)
- 11) เครื่องไมโครโทม (Microtome) (Simi-Aotomatic Rotary Microtome AEM450 Amos; Australia)
- 12) กล้องจุลทรรศน์ OPTIKA รุ่น B-383PLi (OPTIKA, Italy)
- 13) เครื่อง PCR Biometra TOne Thermal Cyler (Analytik Jena AG; Germany)
- 14) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Biometra TOne Thermal Cyler (Analytik Jena AG; Germany)
- 15) เครื่อง nanodrop (Nano-300 micro- Spectrophotometer รุ่น ALLSHENG )
- 16) เครื่อง Centrifuge (MPW; M-Universal, 102MU/2-56)
- 17) เครื่อง DUO View (Clever Sctentific Ltd.)

- 18) เครื่อง CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd. From California USA)

### สารเคมี

- 1) น้ำยาฆ่าเชื้อบุคคล และอุปกรณ์
- 2) ยาฆ่าแมลงภายในโรงเรือน
- 3) ปุ๋ยชีวภาพควบคุมศัตรูพาหะบริเวณจุดวางอาหาร จุดเก็บวัสดุติดอาหารสัตว์ และรอบ ๆ โรงเรือนเลี้ยงสัตว์
- 4) ยาซึม Atropine sulfate
- 5) ยาซึมและยาสลบ Xylazine (X-Lazine)
- 6) ยาสลบ Ketamine (Zoletil)
- 7) สีย้อมเนื้อเยื่อ Haematoxilin และ Eosin
- 8) Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- 9) Tissue lysis buffer
- 10) Isopropanol
- 11) Ethanol 75%
- 12) 5x iScript RT Supermix
- 13) One PCR TM Ultra ( MB208-0100)
- 14) Primers (Forward และ Reverse primer) บริษัท Bio Basic Inc
- 15) ddH<sub>2</sub>O (UltraPure Distilled Water)
- 16) Safeview
- 17) Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Life Science, USA), 10 mM specific Primers

### 3.3.1 สัตว์ทดลองและการจัดกลุ่มทดลอง

ทดลองในสุกรลูกผสมหลังหย่านม (ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดุรอก) อายุ 21±1 วัน น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 5.88 กิโลกรัม จำนวน 48 ตัว จากฟาร์มสุกรพันธุ์ พีทีอาร์ ฟาร์มมิ่ง อินดัสเทรียล จำกัด 229 หมู่ 2 ตำบลตาคลี อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ ในเครือของ บริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) เข้ามาเลี้ยงทดลองในโรงเรือนอนุบาล โรงเรือนระบบปิดควบคุมการระบายอากาศด้วยพัดลมดูดอากาศ และปรับอุณหภูมิแบบระเหยไอน้ำ (Evaporative Cooling

System หรือ Evap) ณ โรงเรือนวิจัยสุกร สถานีวิจัยและฝึกอบรมปึงราชชนก คณะเกษตรศาสตร์ฯ ม.นเรศวร โดยการสุ่มสุกรจำนวน 48 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 8 ซ้ำละ 1 ตัว โดยใช้สุกรเพศเมีย วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เลี้ยงสุกรบนกรง ขนาด 1x2 เมตร กรงละ 1 ตัว ทั้งหมด 6 กลุ่ม กลุ่มละ 8 กรง เป็นเวลา 28 วัน หรือ 4 สัปดาห์ สุกรจะได้รับอาหารและน้ำเต็มที กลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารสูตรสุกรอนุบาล ที่มีโภชนะตามความต้องการของสุกร (NRC, 2012) ดังแสดงในตาราง 8 โดยอาหารที่ผสมไว้ให้สุกรกินจะผสมไว้ไม่เกิน 7 วัน ถ้าสุกรกินไม่หมดต้องทำการผสมใหม่ จากปัจจัยบางประการเพื่อกำหนดจำนวนกลุ่มทดลอง (Treatment) และจำนวนซ้ำที่ใช้ในการทดลอง

1) ความแปรปรวนของลักษณะ ถ้าลักษณะที่จะศึกษามีค่า C.V. (Coefficient of variation) สูงจะต้องใช้จำนวนซ้ำมาก เนื่องจากลักษณะนั้นมีความแปรปรวนมาก เพื่อให้ผลที่ได้แน่นอนจะต้องใช้จำนวนซ้ำมากกว่าลักษณะที่มี C.V. ต่ำ

2) จำนวนกลุ่มการทดลอง กำหนดให้จำนวนกลุ่มทดลองมีผลต่อทำให้มีดีกรีอิสระ (Degrees of freedom) หรือ df และค่า df ใช้เพื่อประมาณค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลอง ซึ่งโดยทั่วไปดีกรีอิสระของความคลาดเคลื่อน (error) ไม่ควรน้อยกว่า 9 ทั้งนี้ทั้งนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะสัตว์ที่ใช้ในการทดลองด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อกำหนดว่า df ของความคลาดเคลื่อน (r-1) เมื่อโครงการวิจัยมีจำนวน 6 กลุ่มทดลอง จะมี df ของความคลาดเคลื่อนเท่ากับ t(r-1) เมื่อกำหนดให้ ตัวแปร t คือจำนวนกลุ่มทดลองทดลอง (Treatment) และ ตัวแปร r คือจำนวนซ้ำ ดังนั้น การทดลองนี้ จะมีค่า  $df = 42$

3) สุ่มสุกรแต่ละกลุ่มให้ได้รับอาหารทดลอง 1 ใน 6 ชนิด ได้แก่

อาหารควบคุม (Control; CON) ประกอบด้วยวัตถุดิบหลัก ได้แก่ ข้าวโพด-ปลาย ข้าว-กากถั่วเหลือง

อาหารชนิดที่ 2 CON + (antibiotic Octamux A.C. ; Colistin  $400 \times 10^6$  IU + Amoxicilin 100 กรัม/กิโลกรัม) คำแนะนำการใช้ 3 กิโลกรัมต่ออาหาร 1 ตัน (CAN)

อาหารชนิดที่ 3-6 คืออาหาร CON + FSP (1-4) ที่ระดับ 5, 10, 15 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ

หมายเหตุ FSP ได้จากการหมักสไปรูลินาด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในช่วงระยะเวลาและปริมาณของเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2

4) การจัดการด้านภูมิคุ้มกันโรคในสุกร ทำวัคซีนตามกำหนดในสุกรได้แก่ อหิวาต์สุกร ไมโครพลาสมาสุกร เซอร์โคไวรัส และวัคซีนสุดท้ายโดยเฉพาะ ปากและเท้าเปื่อย ทำฉีดก่อนการการุณฆาต 3 วัน เพื่อศึกษาการกระตุ้น และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์จากเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลาง และม้าม

5) บันทึกน้ำหนักเมื่อเริ่มต้นทดลอง น้ำหนักเพิ่มทุก ๆ 2 สัปดาห์และน้ำหนักสุดท้ายของการทดลอง รวมทั้งปริมาณอาหารที่สุกรกินแต่ละวัน อาหารตกหล่น และอาหารที่มีความชื้นเพื่อทำการคำนวณหาสมรรถภาพการผลิตต่าง ๆ รวมทั้ง ข้อมูลทางเศรษฐกิจ เช่น ต้นทุนค่าอาหารต่อน้ำหนักสุกรที่เพิ่มขึ้น 1 กก. การวิเคราะห์ข้อมูล ที่ได้จากการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel & Torrie, 1980)

### 3.3.2 ลำดับและขั้นตอนการทดลองและเก็บข้อมูล

1) ทำการชั่งน้ำหนักลูกสุกรหย่านมอายุ  $21 \pm 0.5$  วัน น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ  $5.8 \pm 0.5$  กิโลกรัม และ ใช้ระยะเวลาเลี้ยง 4 สัปดาห์ (สิ้นสุดการทดลอง) และชั่งปริมาณอาหารที่กินทุกสัปดาห์ เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราการเจริญเติบโต (Average daily gain: ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed conversion ratio: FCR) และอัตราการกินได้ต่อวันเฉลี่ย (Average daily feed intake: ADFI) จัดบันทึกจำนวนลูกสุกรที่ป่วยและตายในระหว่างการทดลองเพื่อคำนวณอัตราการป่วยและอัตราการตาย

2) ตรวจเช็ค อุณหภูมิและความชื้นด้วยเครื่อง Hygro-Thermometers รวมทั้งควบคุมอุณหภูมิในโรงเรือน  $27-32^{\circ}\text{C}$  ความชื้นไม่เกิน 80% โดยมี Hygro-Thermometers ในการตรวจวัดทั้งอุณหภูมิ ปัจจุบัน สูงสุด ต่ำสุด แต่ละวัน และความชื้นสัมพัทธ์ภายในอากาศของโรงเรือนเลี้ยงสุกร อย่างน้อย 2 ครั้งต่อวัน เวลา 7:00 น. และ 13:00 น. ถ้ามีความผิดปกติ ต้องปรับพัดลมและการหมุนเวียนของน้ำ ให้เหมาะสมต่ออายุของสุกร โดยพิจารณาจากมาตรฐานค่าการระบายอากาศของสุกรอนุบาลตามอายุดังต่อไปนี้

สุกรอายุสุกร 3-4 สัปดาห์ อุณหภูมิเป้าหมาย  $30-34^{\circ}\text{C}$ , ความเร็วลม 0.3-0.8 เมตร/วินาที  
 สุกรอายุสุกร 5-6 สัปดาห์ อุณหภูมิเป้าหมาย  $30-32^{\circ}\text{C}$ , ความเร็วลม 0.4 – 1.0 เมตร/วินาที  
 สุกรอายุสุกร 7-8 สัปดาห์ อุณหภูมิเป้าหมาย  $29-30^{\circ}\text{C}$ , ความเร็วลม 0.5-1.2 เมตร/วินาที

3) ตรวจสอบพฤติกรรมโดยทั่วไป สำหรับสัตว์ที่เลี้ยงขังเดี่ยว ดูพฤติกรรม การตอบสนองต่อผู้เลี้ยงเมื่อเข้าไปให้อาหาร ว่ามีพฤติกรรมกระตือรือร้น หรือซึม รวมทั้งตรวจสภาพทั่วไปของร่างกายสัตว์ เพื่อดูร่องรอยการบาดเจ็บ

4) ตรวจสอบการกินอาหาร การกินน้ำ โดยมีโปรแกรมตรวจสอบและปรับปรุงคุณภาพน้ำดื่มของสุกรทุกสัปดาห์ (ตรวจสอบ pH และประมาณคลอรีน ของน้ำดื่มสุกร ถังน้ำพักน้ำ และน้ำจากนิปีเปลน้ำ) เพื่อปรับคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อความต้องการของสุกร (PH = 6.5-8.5/ คลอรีนอิสระคงเหลือ (Residual Free Chlorine) กำหนดให้มีที่ปลายเส้นท่อ 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยใช้เครื่องมือตรวจวัด Water quality tester for pool and spa (Risepro®)

5) ประเมินสถานการณ์การเกิดท้องเสียของลูกสุกรวันละ 2 ครั้ง เวลา 7:00 และ 18:00 น. ซึ่งก่อนให้อาหารลูกสุกรจะสังเกต และตรวจสอบการท้องเสียและสีของมูลลูกสุกรโดยใช้ผู้เลี้ยง 1 คนเท่านั้น เป็นผู้ให้คะแนนตลอดการทดลอง ซึ่งได้มีตัวอย่างรูปภาพลักษณะของอุจจาระแต่ละคะแนนเป็นตัวอย่งให้ผู้เลี้ยงหรือผู้ตรวจสอบลักษณะมูล (Kyriakis et al., 2003; ศรธรรม ทองดี และคณะ 2562) โดยการให้คะแนนสำหรับรูปร่าง และลักษณะมูลลูกสุกร (Shape) จาก 1 ถึง 5 มีดังต่อไปนี้

คะแนน 5 อุจจาระมีลักษณะเนื้อก้อนดีมาก ๆ มีการคงรูป และเป็นพวง

คะแนน 4 อุจจาระมีลักษณะเนื้อก้อนดี มีการคงรูปค่อนข้างดี

คะแนน 3 อุจจาระมีลักษณะเนื้อก้อนค่อนข้างต่ำ มีการคงรูปปานกลาง

คะแนน 2 อุจจาระมีลักษณะเนื้อก้อนต่ำ คงรูปไม่ดี ค่อนข้างเหลว

คะแนน 1 อุจจาระมีลักษณะเหลว และเป็นน้ำ

โดย คะแนนต่ำกว่า 3 ถือเป็นสุกรท้องเสีย นำข้อมูลที่บันทึกไว้มาคำนวณค่าการเกิดท้องเสียเป็นเปอร์เซ็นต์

อัตราการเกิดท้องเสีย (diarrhea incidence, %) =

$$\frac{\text{จำนวนคอกที่ท้องเสียในกลุ่มการทดลอง (0-28 วัน)}}{\text{จำนวนคอกทั้งหมดในกลุ่มการทดลอง} \times 28 \text{ วัน}} \times 100$$

**ตาราง 8** Composition and nutritive values of the experimental diets of weaning pig

Ingredients	CON	CAN	FSP+1	FSP+2	FSP+3	FSP+4
Broken rice	28.6	28.3	28.1	27.6	27.1	26.6
Crushed corn	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1
Skim milk	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Soybean meal ; CP 44%	35.5	35.5	35.5	35.5	35.5	35.5
Rice bran	5	5	5	5	5	5
FSP	0	0	0.5	1	1.5	2
Soybean oil	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Lysine -HCL	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
DL-Met	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
P-18 (P:18%)	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
CaCo3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
NaCl	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Threonine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Premix <sup>1</sup>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mycotoxin binder	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Pellet binder	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Antibiotic <sup>2</sup>	0	0.3	0	0	0	0
<b>Calculated chemical composition</b>						
Dry matter <sup>3</sup>	92.15	90.50	92.20	92.78	88.28	89.36
Ash <sup>3</sup>	6.10	5.99	6.21	6.18	5.98	6.03
Crude fiber <sup>3</sup>	3.27	3.04	3.29	3.30	3.36	3.38
Crude Fat <sup>3</sup>	6.00	5.90	6.01	6.05	5.75	5.82
Protein <sup>3</sup>	23.25	22.83	23.26	23.41	22.27	22.55
Energy (GE) <sup>4</sup>	3773	3685	3756	3757	3623	3655

<sup>1</sup> Premix provided the following per kg of complete diets: Vitamin A 50,000 IU, Vitamin E 100 IU, Vitamin D3 10,000 IU, Vitamin K3 8.0 mg, Vitamin B1 6.0 mg, Vitamin B2 16.0 mg, Vitamin B6 10.0 mg, Vitamin B12 0.08 mg, Pantothenic acid 50 mg, Niacin 80.0 mg, Folic acid 2.0 mg, Biotin 0.30 mg, Vitamin C 0.3 mg, Selenium 0.5 mg, Ferrous 360.0 mg, Manganese 100.0 mg, Zinc 300.0 mg, Copper 320.0 mg, Cobalt 1.6 mg and Iodine 3.0 mg

<sup>2</sup> antibiotic (Octamux A.C. ; Colistin 400x 106 IU+ Amoxycilin 100g/kg) Ues 3 kg/ton , <sup>3</sup> g/100g , <sup>4</sup> kcal/1kg

6) ทำการการุณยฆาต ลูกสุกรหลังจากที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ 28 วัน กลุ่มละ 3 ตัว รวม 18 ตัว โดยเลือกจากสุกรที่มีน้ำหนักใกล้เคียงน้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลอง (Treatment) (ลัดดา, 2556) โดยมีขั้นตอนการวางยาสลบและมาตรฐานการการุณยฆาตดังต่อไปนี้

6.1) การทำให้สุกรซึม โดยจับสุกรหรือบังคับสุกร เพื่อฉีดยาให้มีอาการซึมโดยการใช้ Xylazine 20 มิลลิกรัม (มีชื่อทางการค้าว่า X-Lazine) โดยใช้ขนาด 0.25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสุกร 1 กิโลกรัม หรือ 5 ซีซี/ตัว และ Atropine sulfate 1 มิลลิกรัม ขนาดยาที่ใช้ 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสุกร หรือ 4 ซีซี/ตัว ผสมกันแล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection; IM) บริเวณหลังใบหู ใช้เข็มขนาด 21G x 1 (0.8 x 25 มม.) สุกรจะแสดงอาการเซื่องซึม พร้อมทั้งมีการหย่อนตัวลงของกล้ามเนื้อ และระดับความเจ็บปวดที่น้อยลง จะสามารถทำให้สุกรไม่ตื่น ซึ่งจะส่งผลดีต่อการทำฉีดยาสลบเข้าทางเส้นเลือดดำบริเวณใบหู (IV) โดยวางสุกรบนแท่นวางประเภทที่ขาไม่สัมผัสพื้น เพื่อลดการเคลื่อนไหว รอประมาณ 5-10 นาที (American Veterinary Medical Association, 2013) เพื่อการุณยฆาต

6.2) การการุณยฆาต หลังจากการทำให้สุกรซึม ลดการตอบสนองต่อการจับและบังคับ พร้อมทั้งสังเกตอาการหรือพฤติกรรมของสุกรร่วม เพื่อพิจารณาการฉีดยา Xylazine 20 mg (X-Lazine) ใช้ขนาด 0.33 mg/kg หรือ 6.5 ซีซีต่อตัว และ ตามด้วย Ketamine (Dissociative drug) หรือ มีชื่อทางการค้า Zoletil โดยใช้ขนาด 0.075 mg/kg หรือ 1-1.5 ซีซี ผสมกับน้ำกลั่น ให้ได้ 5 ซีซี ฉีดเข้าที่เส้นเลือดดำ (Intravenous vein injection; IV) ที่เส้นเลือดบริเวณใบหูลูกสุกร (Main ear arteried avoid) โดยใช้เข็มขนาด 23G x 1 (0.6 x 25)

6.3) การเก็บชิ้นส่วน ลำไส้ และม้าม จากสุกรหลังจากเปิดบริเวณช่องท้อง โดยเลือกสุกรที่ต้องการทำการุณยฆาตที่น้ำหนัก  $16 \pm 0.5$  กิโลกรัม เพื่อศึกษาลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ส่วนเนื้อเยื่อม้าม และลำไส้เล็กส่วนกลาง จากสัตว์จำนวน 18 ตัวอย่าง ตรวจสอบการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-12p40 นำค่า Cycle threshold (CT) ที่ได้มาคำนวณเพื่อวิเคราะห์การแสดงของยีนสูตร Relative normalized expression  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ที่ปริมาณสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ cyclophilin A

หมายเหตุ ได้รับการแนะนำขั้นตอนการการุณยฆาตจากสัตวแพทย์ผู้ชำนาญการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. นิรันดร์ เอกศิริ อาจารย์ประจำสาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร สัตว์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และได้ผ่านการพิจารณาขั้นตอนการปฏิบัติ เลี้ยงสัตว์ และใช้สัตว์ในการวิจัย จากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่โครงการ NU-AG610506 เลขที่เอกสารรับรอง 6101011 วันที่รับรอง 26 พฤศจิกายน 2561 ถึง 26 พฤศจิกายน 2564 ร่วม



ด้วยได้ผ่านการตรวจประเมินหน่วยวิจัยโภชนะสุกรอนุบาล และตรวจสอบขั้นตอนการวิจัยฯ ตามมาตรฐานการใช้สัตว์เพื่อการวิจัยฯ จากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ โดยมี รองศาสตราจารย์ ดร. รัตติมา จีนาพงษา เป็นประธานกรรมการตรวจสอบในครั้งนี้ด้วย

### 3.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาลำไส้

เก็บตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ส่วนกลาง (jejunum) และส่วนปลาย (ilium) ให้มีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร สำหรับนำไปวัดค่าความสูงวิลไล ความลึกของครีป ความกว้างของวิลไล พื้นที่ของวิลไล และสัดส่วนของความสูงวิลไลต่อความลึกของเซลล์ครีป ขั้นตอนการสัณฐานวิทยาของลำไส้และตัวอย่างของม้ามเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน โดยการเก็บตัวอย่างจะทำเมื่อสุกรสลบทำการผ่าท้องแล้วเก็บลำไส้ดังต่อไปนี้

- 1) ลำไส้เล็กส่วนต้นเริ่มจากส่วนที่ต่อออกมาจากกระเพาะไปจนถึงส่วนที่มีท่อน้ำดีเปิดเข้าสู่ลำไส้ตรงบริเวณสิ้นสุดท่วงของลำไส้ส่วนต้นจะเก็บตัวอย่างห่างจากกระเพาะอาหาร 20-40 เซนติเมตร
- 2) ลำไส้เล็กส่วนกลาง เริ่มจากส่วนปลายของลำไส้เล็กส่วนต้น 200 เซนติเมตร
- 3) ลำไส้เล็กส่วนปลาย เริ่มจากปลายสุดของลำไส้เล็กส่วนกลางไปจนถึงส่วนสุดท้ายของลำไส้บริเวณจุดเชื่อมต่อของลำไส้ใหญ่ ทำการเก็บตัวอย่างที่บริเวณก่อนถึงลำไส้ใหญ่ประมาณ 40 เซนติเมตร

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค (Histology) โดยนำไปชิ้นส่วนของลำไส้ทั้ง 3 ส่วนไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่อง Automatic tissue processor (Model ATP140 Amoss; Australia) ตามวิธีการของ สุรรัตน์ สุรงค์ และคณะ (2555) แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโทม (Microtome) (Semi-Aotomatic Rotary Microtome AEM450 Amos; Australia) ให้เนื้อเยื่อมีความหนาขนาด 4-5 ไมโครเมตร จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาติดกับกระจกสไลด์ไปย้อมสี โดยสีที่ใช้ คือ ฮีมาทอกซาลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) ด้วยเครื่องย้อมสไลด์อัตโนมัตินำกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีเสร็จแล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (Objective10X) ตามวิธีการของ Hartke และคณะ (2005) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของความสูงวิลไล โดยวัดจากปลายของวิลไล ถึงฐานของวิลไล (Hedemann et al., 2006) และความกว้างของวิลไล (วัดที่ความสูงครึ่งหนึ่งของวิลไล) รวมถึงหาพื้นที่ของวิลไล (คำนวณจากความกว้างของวิลไลคูณความยาวของวิลไล) ตามวิธีของ Geyra และคณะ (2001) สำหรับการวัดความลึกของเซลล์ครีปวัดจากเยื่อรองรับฐาน (Basement membrane) ถึงส่วนปลายของเซลล์ครีป

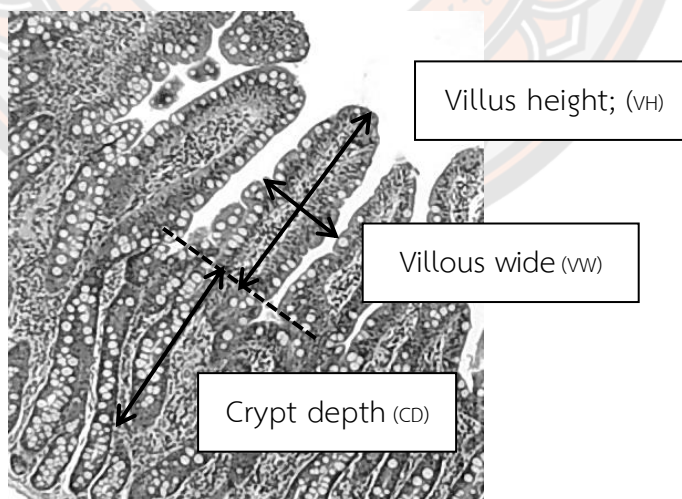
(Crypt mouth) และคำนวณหาสัดส่วนของความยาววิลไลต่อความลึกของเซลล์คริป ตามวิธีของ กระสินธ์ นพรัตน์ไมตรี (2551)

3.4.2 ขั้นตอนการศึกษาสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วน นำตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากขวดแก้วฝาปิดโดยรักษาสภาพด้วย Formalin buffer 10% ตัดด้วยมีดผ่าตัดแนวขวางยาว 1 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น บรรจุลงบล็อก แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) และนำไปฝังในพาราฟิน จากนั้นนำไปตัดตามแนวขวาง ความหนา 5  $\mu\text{m}$  และย้อมด้วยสี haematoxilin และ eosin จากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ OPTIKA รุ่น B-383PLi (OPTIKA, Italy) ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า วัดความสูงของวิลไล (Villus height; VH) ความกว้างของวิลไล (Villous wide; VW;  $\mu\text{m}$ ) ความลึกของคริป (Crypt depth: CD) ดังแสดงในภาพ 17 จากนั้นนำมาคำนวณหาสัดส่วนความสูงของวิลไลต่อความลึกของคริป (VH:CD) และพื้นที่ผิวของวิลไล (villus surface area, VSA) คำนวณโดยใช้สูตรของ Swiech และคณะ (2016) ดังนี้

$$VSA = (\pi * mh * h) + \pi (1/2 * mh)^2$$

เมื่อ mh = ความกว้างของวิลไล (วัดที่กึ่งกลางของความสูง)

h = ความสูงของวิลไล



ภาพ 17 Intestinal morphology measurement

### 3.5 วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน

การศึกษาการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันโดยการเก็บลำไส้เล็กส่วนกลาง และชิ้นส่วนของม้ามเพื่อสกัด RNA ขนาด 1-2 มิลลิเมตร ใส่ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิเมตร ที่มี RNA lather ปริมาตร 500 ไมโครลิตร รักษาสภาพของชิ้นเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40 และ Cyclophilin A โดยนำมาสกัด RNA วัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง nanodrop (Nano-300 micro-Spectrophometer รุ่น ALLSHENG ) ที่ความยาวคลื่น A260 RNA ที่ได้จากการสกัดจะถูกใช้เป็นแม่แบบ (Template) ในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription – PCR (RT-PCR) เพื่อให้สาย RNA จำลองตัวเป็น DNA โดยนำไปเข้าเครื่อง PCR Biometra TOne Thermal Cycler (Analytik Jena AG; Germany) นำ cDNA ไปเพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR โดยการใช้ primers ที่จำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา

#### 3.5.1 การสกัด RNA จาก เนื้อเยื่อม้าม และลำไส้

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อม้าม และส่วนของลำไส้ขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Homogenization หรือเติม tissue lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกันด้วยปิเปตตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จากนั้นใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็ก ซึ่งการตัดจะช่วยเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วนำไป Vertex เติม Chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าด้วยมือเบาๆ กลับไป-มา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนของเหลวใสชั้นบน (supernatant) ประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ tube ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนส่วนล่างติดมาด้วย เติมสารละลาย Isopropanol อัตราส่วน 1 : 1 (RNA : Isopropanol) นำไป centrifuge 12,000 rpm นาน 15 นาที แล้วเท Isopropanol ส่วนด้านบนทิ้งให้เห็นตะกอนขาวขุ่น จากนั้นเติม 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิตร เปิดฝา tube ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาที หรือ จนกว่าจะได้ตะกอนจะใส เติม DEPC water (DNase/RNase free water) ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที และ วัดค่าความเข้มข้นบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop (Nano-300 micro-Spectrophometer รุ่น ALLSHENG )

#### 3.5.2 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription – PCR

การสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription – PCR ทำโดยเริ่มต้นจากปริมาณ RNA ตั้งต้น 0.5 ไมโครกรัม ใส่ลงในส่วนผสมของ 5x iScript RT Supermix ผสมกับ Nuclease free water (DEPS) ด้วยอัตราส่วน iScript RT Supermic 6 ไมโครลิตร RNA

template (1 ug – 1pg) 3 ไมโครลิตร Nuclease free water (DEPS) 21 ไมโครลิตร ปริมาณสุทธิ 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR ซึ่งเป็นเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Biometra TOne Thermal Cycler (Analytik Jena AG; Germany) โดยใช้ Master mix 15 ไมโครลิตร จาก 5 ไมโครลิตร RNA เพื่อทำการ Reverse transcription reaction ซึ่งกำหนดปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

- 1) Priming 5 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส
- 2) Reverse transcription 20 นาที ที่ 46 องศาเซลเซียส
- 3) RT inactivation 1 นาที ที่ 95 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างที่ทำการเพิ่มปริมาณ RNA แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 4 เดือน จากนั้นตรวจเช็คความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop (Nano-300 micro- Spectrophotometer รุ่น ALLSHENG ) ซึ่งจากเดิมที่เป็น RNA จะมีความเข้มข้นประมาณ 500 ng/ul เมื่อผ่านกระบวนการสกัด cDNA จะมีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าโดยประมาณ  $1000 \pm 100$  ng/ul

### 3.5.3 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค End-point PCR

นำ cDNA ไปเพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40 และ Cyclophilin A โดยใส่ลงในส่วนผสม OnePCR™ Ultra (No MB208-0100) ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตร, 10 mM specific Primers (Forward และ Reverse primer) จาก บริษัท Bio Basic Inc ปริมาณ 1 ไมโครลิตร DNA template 1 ไมโครลิตร ddH<sub>2</sub>O (UltraPure Distilled Water) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ซึ่งเป็นเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Biometra TOne Thermal Cycler (Analytik Jena AG; Germany) โดยกำหนดสภาวะที่ประกอบไปด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 3.30 นาที แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA เป็นจำนวน 33 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ตามอุณหภูมิของแต่ละ primer นาน 1 นาที, Entensis 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, ตามด้วย Final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และสิ้นสุดสภาวะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลของปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ที่ผสมด้วย Safeview ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ดูผ่านเครื่อง DUO View (Cleaver Scientific Ltd.) เพื่อตรวจวัดอุณหภูมิ จำนวนรอบของการเพิ่มปริมาณ cDNA และเปรียบเทียบขนาดของ primer ต่อการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR จากผลพบว่าไซโตไคน์ TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  มีข้อผิดพลาดจากการออกแบบ primer จึงเลือก TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , และ IL-12p40 สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ภูมิคุ้มกันโดยเปรียบเทียบ Cyclophilin A ซึ่งเป็น housekeeping genes

3.5.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR นำ cDNA ไปเพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40 และ Cyclophilin A โดยใส่ลงในส่วนผสมของ Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Life Science, USA), 10 mM specific Primers ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd. From California USA) โดยกำหนดสถานะที่ประกอบไปด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA เป็นจำนวน 45x2 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, อุณหภูมิของแต่ละ primer ในตาราง 9 นาน 10 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 10 วินาที แล้วทำการเพิ่มอุณหภูมิทีละ 4 องศาเซลเซียส/วินาที โดยเริ่มจาก 95 องศาเซลเซียส 5 วินาที 65 องศาเซลเซียส 1 นาที และไปจนถึง 97 องศาเซลเซียส (Melting curve) และสิ้นสุดสถานะที่ 40 องศาเซลเซียส 10 วินาที นำค่า Cycle threshold (CT) ที่ได้มาคำนวณ เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , และ IL-12p40 ด้วยสูตร Relative normalized expression  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ที่ปริมาณสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน cyclophilin A แสดงค่าเป็นจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (target gene) ในชิ้นส่วนเนื้อเยื่อม้าม และลำไส้เล็กส่วนปลายของสุกรหย่านม โดยอาศัยการคำนวณการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกเป็นจำนวนเท่าของยีนเป้าหมายจากตัวอย่าง ม้าม และลำไส้ที่ได้เสริมยาปฏิชีวนะ และ FSP กับยีนเป้าหมายจากตัวอย่างที่อยู่ในสภาวะปกติ (housekeeping genes) ที่จัดเป็นตัวสอบเทียบ หรือ calibrator ซึ่งสามารถวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเพิ่มขยายของยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิงมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ดังต่อไปนี้

$$Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{normal}} = \Delta Ct$$

$$\Delta Ct_{\text{target gene}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}} = \Delta\Delta Ct$$

$$\text{Relative normalized expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.6 เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกระดับการเสริม FSP ในอาหารสุกรหย่านม

การเลือกจากผลการตอบสนองของสุกรที่ส่งผลให้ตัวชี้วัดที่ดีที่สุด แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ

- 3.6.1 ด้านประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และปริมาณการกินอาหารและประสิทธิภาพการใช้อาหาร
- 3.6.2 อัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายและอัตราการเกิดท้องเสีย
- 3.6.3 ลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของลำไส้เล็กส่วนต้น กลาง และปลาย
- 3.6.4 ตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

**ตาราง 9 The sequence of primers used in this study**

Genes	Primer sequence (5' to 3')		Product length (bp)	T <sub>m</sub> Annealing (°C)	Cycles <sup>1</sup>	
	Forward	Reverse			Intestine	Spleen
<i>IL-10</i>	GCC TTC GGC CCA GTG AA	AGA GAC CCG GTC AGC AAC AA	71 bp	ND*	ND*	ND*
<i>IFN-γ</i>	TCT AAC CTA AGA AAG CGG AAG AGA A	TTG CAG GCA GGA TGA CAA TTA	81 bp	ND*	ND*	ND*
<i>TNF-α</i>	ATC GGC CCC CAG AAG GAA GAG	GAT GGC AGA GAG GAG GTT GAC	351 bp	56	26.42	28.01
<i>IL-1 β</i> ,	AA AGG GGA CTT GAA GAG AG	CTG CTT GAG AGG TGC TGA TGT	285 bp	54	28.43	26.47
<i>IL-12p40</i>	GAT GCT GGC CAG TAC ACC	TCC AGC AGC ACC TCA ATG	377 bp	54	27.81	23.62
Cyclophilin A	TAA CCC CAC CGT CTT CTT	TGC CAT CCA ACC ACT CAG	369 bp	50	23.98	23.30

**ที่มา:** Adapted from Heim et al., 2014; Petrov et al., 2014; Raja and Hemaiswarya, 2010; Petrov et al., 2014; Dozois et al., 1997; Pie et al., 2003

\* ND: Non detection; <sup>1</sup> Average CT from Quantitative Real-Time PCR

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ต้นแบบกรรมวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ที่เหมาะสมโดยใช้ของเหลวจากฟาร์มสุกรเป็นอินทรีย์วัตถุทดแทนสูตรอาหารซารูก

การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ต่อการเลี้ยงสไปรูลินาของสาหร่ายสไปรูลินาที่ทดแทนสูตรอาหารซารูกด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย (ตาราง 10) ตั้งแต่ช่วงของการเพาะเลี้ยงวันที่ 6 เป็นต้นไปพบว่าระดับการทดแทนที่ 60 และ 80 % ทำให้สไปรูลินาหยุดการเจริญเติบโตซึ่งเกิดจากความขุ่นของน้ำร่วมด้วยปริมาณแอมโมเนียที่สูงเป็นอิทธิพลทำให้ลดการสังเคราะห์ของสไปรูลินา

ตาราง 10 Changing pH content in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond

Time/Trt	pH				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	9.98±0.073 <sup>b</sup>	10.01±0.089 <sup>b</sup>	10.024±0.03 <sup>ab</sup>	10.096±0.02 <sup>a</sup>	0.016	0.050
3	10.18±0.024	10.02±0.072	9.712±0.46	9.654±0.47	0.084	0.070
6	10.35±0.061 <sup>a</sup>	10.07±0.085 <sup>b</sup>	9.908±0.07 <sup>c</sup>	9.746±0.03 <sup>d</sup>	0.053	< 0.001
9	10.38±0.039	10.36±0.184	-	-	ND	ND
12	10.39±0.093	10.59±0.244	-	-	ND	ND
15	10.41±0.080	10.67±0.274	-	-	ND	ND
18	10.46±0.135	10.76±0.545	-	-	ND	ND
21	10.55±0.181	10.84±0.478	-	-	ND	ND
24	10.49±0.093	10.62±0.245	-	-	ND	ND

Note: <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

ND : Non detection, - : The experimental data could not be collected because spirulina stopped growing.

การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ต่อการเลี้ยงสไปรูลิน่าของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส (ตาราง 11) ช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 3 วันกลุ่มที่ทดแทน 40, 60 และ 80% ระดับ pH เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันและมีค่า pH สูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) และวันที่ 9 ระดับการทดแทน 80% ตรวจวัด pH สูงกว่ากลุ่มการทดแทนอื่น ๆ อีกทั้งตลอดการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 12-24 วัน ค่า pH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**ตาราง 11** Changing pH content in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond

Time/Trt	pH				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	9.62±0.007 <sup>d</sup>	9.72±0.022 <sup>c</sup>	9.86±0.011 <sup>b</sup>	9.97±0.007 <sup>a</sup>	0.030	< 0.001
3	9.98±0.047 <sup>b</sup>	10.10±0.032 <sup>a</sup>	10.08±0.056 <sup>a</sup>	10.14±0.044 <sup>a</sup>	0.016	< 0.001
6	10.25±0.083	10.32±0.098	10.38±0.175	10.43±0.244	0.037	0.352
9	10.61±0.140	10.56±0.179	10.55±0.237	10.43±0.164	0.093	< 0.001
12	10.83±0.319	10.72±0.244	10.93±0.696	10.99±0.352	0.093	0.783
15	10.75±0.244	10.75±0.195	10.55±0.163	10.83±0.335	0.055	0.347
18	10.91±0.266	10.63±0.166	10.92±0.243	11.03±0.310	0.107	0.633
21	10.90±0.295	10.75±0.215	10.92±0.504	10.68±0.379	0.078	0.675
24	10.65±0.129	10.64±0.226	10.53±0.164	10.41±0.151	0.041	0.139

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ต่อการเลี้ยงสไปรูลิน่าของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อฝัง (ตาราง 12) ช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วันกลุ่มที่ทดแทน 60% ระดับ pH เพิ่มขึ้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และที่ 18 วัน ค่า pH ของที่ระดับการทดแทน 40% เพิ่มขึ้น 11.08 มีความแตกต่างจากกลุ่มการทดแทนระดับอื่น ( $P < 0.05$ )



ตาราง 12 Changing pH content in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium waste water farm with oxidation pond

Time/Trt	pH				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	9.94±0.018 <sup>d</sup>	10.07±0.023 <sup>c</sup>	10.04±0.019 <sup>b</sup>	10.21±0.008 <sup>a</sup>	0.022	< 0.001
3	10.21±0.031	10.26±0.073	10.24±0.055	10.24±0.079	0.014	0.641
6	10.29±0.029	10.52±0.180	10.42±0.146	10.35±0.114	0.033	0.075
9	10.60±0.172	10.67±0.252	10.80±0.358	10.57±0.196	0.056	0.481
12	10.81±0.306	11.30±0.434	11.14±0.390	10.87±0.371	0.09	0.188
15	10.74±0.196 <sup>b</sup>	10.94±0.182 <sup>ab</sup>	11.14±0.248 <sup>a</sup>	10.71±0.135 <sup>b</sup>	0.056	0.012
18	10.73±0.150 <sup>b</sup>	11.08±0.236 <sup>a</sup>	10.59±0.217 <sup>b</sup>	10.54±0.194 <sup>b</sup>	0.064	0.003
21	10.68±0.287	11.24±0.315	10.98±0.576	10.65±0.303	0.097	0.095
24	10.68±0.287	11.24±0.315	10.98±0.576	10.65±0.303	0.097	0.095

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

อิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ต่อการเลี้ยงสไปรูลินาของสาหร่ายสไปรูลินาที่ทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากฟาร์มสุกร สืบเนื่องด้วยระดับ pH มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตสไปรูลินา ซึ่งระดับของ pH ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงนั้นอยู่ที่  $10 \pm 0.5$  ดังนั้นสามารถสังเกตได้ว่าน้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย (Table 10) ตั้งแต่ช่วงของการเพาะเลี้ยงวันที่ 6 เป็นต้นไปพบว่าระดับการทดแทนที่ 60 และ 80% ทำให้สไปรูลินาหยุดการเจริญเติบโตซึ่งเกิดจากความขุ่นของน้ำทำให้ลดการสังเคราะห์แสงของสไปรูลินา ส่วนการทดแทนสูตรอาหารซารุคจากบ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝังที่ระดับ 40, 60 และ 80% ไม่ได้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH อีกทั้งเมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพ เช่น สีของสาหร่าย สีน้ำ กลิ่น ไม่มีความแตกต่างกัน สรุปได้ว่าการทดลองทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยอินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกร ในบ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝัง ที่ระดับสูงสุด 80% ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 13 Changing of OD value in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond

Time/Trt	OD				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	0.318±0.02 <sup>b</sup>	0.371±0.03 <sup>b</sup>	0.395±0.03 <sup>b</sup>	0.508±0.15 <sup>a</sup>	0.022	< 0.001
3	0.411±0.02 <sup>a</sup>	0.288±0.11 <sup>b</sup>	0.107±0.00 <sup>c</sup>	0.105±0.01 <sup>c</sup>	0.032	< 0.001
6	0.457±0.09 <sup>a</sup>	0.344±0.15 <sup>a</sup>	0.073±0.01 <sup>b</sup>	0.073±0.02 <sup>b</sup>	0.042	< 0.001
9	0.570±0.02	0.567±0.16	-	-	ND	ND
12	0.667±0.08	0.860±0.15	-	-	ND	ND
15	0.779±0.15	0.975±0.19	-	-	ND	ND
18	0.839±0.09	1.166±0.07	-	-	ND	ND
21	0.856±0.16	1.260±0.23	-	-	ND	ND
24	0.953±0.11	1.478±0.23	-	-	ND	ND

**Note:** <sup>b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ ); ND : Non detection; - : The experimental data could not be collected because spirulina stopped growing.

การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นการวัดความหนาแน่นของเซลล์ (Optical Density; OD) ของสาหร่ายสไปรูลิน่า วัดด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร การทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสียที่พบว่าที่ระดับการทดแทน 40% ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่มีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เป็นดัชนีชี้วัดได้ว่ามีความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายอยู่ในภาวะเลี้ยงหนาแน่น แต่กลุ่มที่ทดแทน 60 และ 80% ที่วันที่ 6 การตรวจวัดค่า OD ค่อยๆ ลดต่ำลง และที่วันที่ 9 สาหร่ายสไปรูลิน่าหยุดการเจริญเติบโต (ตาราง 13) สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายสไปรูลิน่าของการทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อไปโอแก๊สพบว่าที่ระดับการทดแทน 80% วันที่ 15 ค่า OD ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารซารุค 100% ซึ่งโดยปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟ และรอบการเพิ่มขึ้นของเซลล์สไปรูลิน่าจะอยู่ที่ 14 วัน อีกทั้งเมื่อเพาะเลี้ยงถึง 24 วันสาหร่ายสไปรูลิน่ายังมีสารอาหารหรืออินทรีย์วัตถุใช้เพื่อเจริญเติบโตต่อได้ (ตาราง 14)

ค่าการดูดกลืนแสงของการเลี้ยงสปิรูลิน่าที่ทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยน้ำเสียจากบ่อฝังที่ระดับการทดแทน 40, 60 และ 80% พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสามารถใช้น้ำเสียจากบ่อฝังทดแทนสูตรอาหารซารูคได้มากถึง 80% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตาราง 15) เมื่อสังเกตค่า OD ของวันแรกของทุก ๆ แหล่งน้ำพบว่าค่าการเพิ่มขึ้นของระดับการทดแทนด้วยน้ำเสียจะมีค่า OD สูงกว่ากลุ่มควบคุมและระดับการทดแทนอื่น ๆ สืบเนื่องจากสีของน้ำเสียส่งผลต่อการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่เมื่อเพาะเลี้ยงไปเพียง 3-6 วันสาหร่ายมีการใช้สารอาหาร หรืออินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียเพื่อการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายสปิรูลิน่า พบว่าปัจจัยเรื่องสีของน้ำนั้นไม่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้จากความหนาแน่นของเซลล์ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer สรุปได้ว่าการใช้น้ำจากบ่อไบโอแก๊สทดแทนสูตรอาหารซารูคที่ระดับ 80% ต่อความหนาแน่นของเซลล์มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ทดแทนที่ระดับ 0, 40 และ 60% ( $P < 0.05$ )

**ตาราง 14** Changing of OD value in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond

Time/Trt	OD				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	0.596±0.07 <sup>c</sup>	0.479±0.01 <sup>d</sup>	0.717±0.02 <sup>b</sup>	0.818±0.02 <sup>a</sup>	0.030	< 0.001
3	0.533±0.03 <sup>b</sup>	0.659±0.07 <sup>a</sup>	0.732±0.10 <sup>a</sup>	0.761±0.08 <sup>a</sup>	0.025	< 0.001
6	0.836±0.11	0.884±0.13	0.906±0.13	0.983±0.19	0.031	0.461
9	0.957±0.12	0.860±0.18	0.983±0.15	1.047±0.17	0.035	0.320
12	1.362±0.21	1.206±0.30	1.255±0.21	1.364±0.31	0.056	0.722
15	1.440±0.31 <sup>a</sup>	1.006±0.184 <sup>b</sup>	0.983±0.23 <sup>b</sup>	1.533±0.42 <sup>a</sup>	0.083	0.017
18	1.542±0.73	1.582±0.620	1.535±0.40	1.591±0.44	0.115	0.998
21	1.568±0.62	1.684±0.439	1.864±0.57	1.704±0.65	0.120	0.879
24	1.574±0.15	1.301±0.708	1.681±0.26	1.938±0.47	0.106	0.204

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

ตาราง 15 Changing of OD value in spirulina cultures replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond with oxidation pond

Time/Trt	OD				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	0.323±0.03 <sup>b</sup>	0.574±0.21 <sup>a</sup>	0.399±0.02 <sup>b</sup>	0.413±0.02 <sup>b</sup>	0.031	0.017
3	0.440±0.02	0.445±0.05	0.453±0.03	0.417±0.02	0.007	0.371
6	0.552±0.05	0.543±0.04	0.580±0.05	0.521±0.04	0.010	0.305
9	0.650±0.15	0.661±0.15	0.676±0.09	0.567±0.09	0.026	0.517
12	0.876±0.16	0.654±0.21	0.815±0.23	0.721±0.16	0.043	0.304
15	0.992±0.22	1.063±0.18	0.926±0.17	0.887±0.20	0.042	0.521
18	1.004±0.28	1.107±0.34	1.159±0.08	1.164±0.35	0.059	0.790
21	1.292±0.20	1.239±0.29	1.290±0.32	1.041±0.40	0.068	0.556
24	1.388±0.24	1.327±0.22	1.338±0.16	1.226±0.33	0.052	0.769

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

การเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินาจากการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) ของการเลี้ยงสไปรูลินาที่ทดแทนสูตรอาหารซารูกด้วยน้ำบ่อรวมน้ำเสีย บ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝัง โดยการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งรงควัตถุดังกล่าวทำหน้าที่เป็นโมเลกุลรับพลังงานจากแสง และนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสร้างพลังงานเคมีต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อสร้างสารอินทรีย์ เช่น น้ำตาล และนำไปใช้เพื่อการดำรงชีวิตของสาหร่าย ดังนั้นการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ เอ เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสไปรูลินา ผลจากการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ สาหร่ายสไปรูลินาพบว่า กลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสียเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 วันกลุ่มที่ทดแทนที่ระดับ 60-80% ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ น้อยกว่ากลุ่มที่ทดแทน 40% และกลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารูกในการเพาะเลี้ยง ( $P < 0.05$ ) และหลังจากวันที่ 9 สาหร่ายของกลุ่มดังกล่าวจะหยุดการเจริญเติบโต ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สามารถบ่งบอกถึงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสไปรูลินาได้ (ตาราง 16 )

ตาราง 16 Changing of chlorophyll *a* content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond

Time/Trt	Chlorophyll <i>a</i> (µg/ml)				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	2.693 <sup>c</sup>	2.677 <sup>c</sup>	3.345 <sup>b</sup>	3.665 <sup>a</sup>	0.128	< 0.001
3	3.476 <sup>a</sup>	2.399 <sup>b</sup>	0.888 <sup>c</sup>	0.878 <sup>c</sup>	0.330	< 0.001
6	3.864 <sup>a</sup>	2.907 <sup>b</sup>	0.605 <sup>c</sup>	0.610 <sup>c</sup>	0.431	< 0.001
9	4.111	4.089	-	-	ND	ND
12	6.627	6.410	-	-	ND	ND
15	5.803	8.072	-	-	ND	ND
18	6.254	9.649	-	-	ND	ND
21	6.385	8.444	-	-	ND	ND
24	7.887	8.485	-	-	ND	ND

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ ); ND : Non detection, - : The experimental data could not be collected because spirulina stopped growing

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในเซลล์สาหร่ายสไปรูลินาจากการเพาะเลี้ยงด้วยการทดแทนสารอาหารสูตรอาหารซารูคด้วยอินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สที่ระดับการทดแทน 80% พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงกว่ากลุ่มการทดแทน 40 60 และกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และทุก 3 วันที่ทำการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ของกลุ่มการทดแทนดังกล่าว มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ตาราง 17) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดแทนน้ำเสียจากบ่อฝิ่ง ในวันที่ 9 ของการทดลอง ระดับการทดแทนที่ 60% ตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ได้ค่าที่สูงกว่ากลุ่มการทดแทนอื่น ๆ ( $P < 0.05$ ) และเมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายในรอบ 12-15 วัน ระดับการทดแทน 40% และกลุ่มควบคุม มีค่าใกล้เคียงกัน และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงกว่ากลุ่มการทดแทน 60 และ 80% ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 18) แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่ตรวจวัดได้นั้นมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่แทนด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส

ตาราง 17 Changing of chlorophyll a content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond

Time/Trt	Chlorophyll a ( $\mu\text{g/ml}$ )				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	2.952 <sup>b</sup>	2.641 <sup>b</sup>	3.908 <sup>a</sup>	3.809 <sup>a</sup>	0.138	< 0.001
3	4.0099	4.1831	4.8191	3.3785	0.276	0.345
6	3.862 <sup>ab</sup>	3.084 <sup>c</sup>	3.202 <sup>bc</sup>	3.938 <sup>a</sup>	0.136	0.031
9	6.104 <sup>b</sup>	6.091 <sup>b</sup>	7.715 <sup>ab</sup>	8.298 <sup>a</sup>	0.381	0.015
12	3.923 <sup>c</sup>	4.897 <sup>bc</sup>	6.630 <sup>a</sup>	5.709 <sup>ab</sup>	0.317	0.007
15	3.471 <sup>b</sup>	3.066 <sup>b</sup>	4.655 <sup>ab</sup>	6.502 <sup>a</sup>	0.443	0.014
18	4.257 <sup>c</sup>	5.160 <sup>bc</sup>	6.413 <sup>ab</sup>	7.509 <sup>a</sup>	0.406	0.012
21	5.6234	5.2349	7.2693	7.6679	0.454	0.150
24	4.122 <sup>c</sup>	5.781 <sup>bc</sup>	7.965 <sup>ab</sup>	9.517 <sup>a</sup>	0.597	0.001

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

การเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ของการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าที่ทดแทนสูตรอาหารซารุค ด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย บ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝัง ซึ่งแหล่งน้ำเหล่านี้มีอินทรีย์วัตถุมากพอให้สาหร่ายสไปรูลิน่าใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องการตรวจวัดปริมาณรงควัตถุที่สำคัญอีกชนิดคือ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุที่มักพบว่าเป็นสาร สีเหลือง ส้ม แดง และส้ม-แดง ซึ่งพบทั่วไปในพืช และกลุ่มของสาหร่าย ทำหน้าที่ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงรวมถึงการทำงานร่วมกับ คลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียว ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์ เพื่อการสังเคราะห์แสง และช่วยการเจริญเติบโตของสไปรูลิน่า จากการทดลองทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย ตั้งแต่วันที่ 6 ที่ระดับ 60-80 % ปริมาณแคโรทีนอยด์มีค่าต่ำกว่าที่ระดับการทดแทน 40% และกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) แต่วันที่ 9 เป็นต้นไปของกลุ่มการทดแทนดังกล่าว สาหร่ายสไปรูลิน่าหยุดการเจริญเติบโต อีกทั้งที่ระดับการทดแทน 40% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตาราง 19)

ตาราง 18 Changing of chlorophyll, a content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with bio-gas pond. with waste water farm oxidation pond

Time/Trt	Chlorophyll a ( $\mu\text{g/ml}$ )				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	2.734 <sup>b</sup>	1.426 <sup>c</sup>	0.440 <sup>d</sup>	3.724 <sup>a</sup>	0.377	< 0.001
3	3.724 <sup>c</sup>	3.766 <sup>b</sup>	3.839 <sup>a</sup>	3.529 <sup>d</sup>	0.035	< 0.001
6	3.978 <sup>b</sup>	3.918 <sup>c</sup>	4.183 <sup>a</sup>	3.756 <sup>d</sup>	0.046	< 0.001
9	4.688 <sup>c</sup>	4.767 <sup>b</sup>	4.875 <sup>a</sup>	4.092 <sup>d</sup>	0.092	< 0.001
12	6.526 <sup>a</sup>	4.873 <sup>d</sup>	6.074 <sup>b</sup>	5.378 <sup>c</sup>	0.191	< 0.001
15	8.210 <sup>b</sup>	8.797 <sup>a</sup>	7.661 <sup>c</sup>	7.339 <sup>d</sup>	0.167	< 0.001
18	8.310 <sup>d</sup>	9.160 <sup>c</sup>	9.595 <sup>b</sup>	9.630 <sup>a</sup>	0.160	< 0.001
21	8.665 <sup>a</sup>	8.306 <sup>d</sup>	8.647 <sup>a</sup>	8.620 <sup>b</sup>	0.044	< 0.001
24	9.304 <sup>a</sup>	8.901 <sup>c</sup>	8.966 <sup>b</sup>	8.219 <sup>d</sup>	0.119	< 0.001

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

การเปลี่ยนแปลงปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เลี้ยงด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส ของวันแรกถึงวันที่ 9 กลุ่มทดลองที่ทดแทนสูตรอาหารซารุค 60 และ 80% มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่ากลุ่มที่ทดแทน 40% และกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) แต่หลังจากวันที่ 9 – 24 ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 20) เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อฝิ่งที่ระดับการทดแทน 60% ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่ากลุ่มการทดแทน 0, 40 และ 80% อย่างต่อเนื่องตลอด ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 21) แต่มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่ทดแทน 80% ด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณการเปลี่ยนแปลงของแคโรทีนอยด์หลังต่อการทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยอินทรียัตถุจากแหล่งน้ำเสียสามารถทดแทนด้วยสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สได้มากถึง 80% โดยที่ไม่ส่งผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ และการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่า (ตาราง 20)

ตาราง 19 Changing of carotenoid content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank pond

Time/Trt	Carotenoid ( $\mu\text{g/ml}$ )				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	0.922 <sup>d</sup>	1.057 <sup>b</sup>	0.982 <sup>c</sup>	1.447 <sup>a</sup>	0.128	< 0.001
3	1.020 <sup>a</sup>	0.634 <sup>b</sup>	0.235 <sup>c</sup>	0.232 <sup>c</sup>	0.330	< 0.001
6	1.134 <sup>a</sup>	0.853 <sup>b</sup>	0.160 <sup>c</sup>	0.161 <sup>c</sup>	0.431	< 0.001
9	1.623	1.614	-	-	ND	ND
12	1.899	2.456	-	-	ND	ND
15	2.224	2.832	-	-	ND	ND
18	2.396	3.385	-	-	ND	ND
21	2.447	3.822	-	-	ND	ND
24	2.767	4.485	-	-	ND	ND

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินาจากการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานิน ไฟโคอีริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน ของการเลี้ยงสไปรูลินาที่ทดแทนสูตรอาหารซารุค ด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย บ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝัง ประเมินโดยการตรวจวัดดัชนีชีวิตทั้ง 3 อย่างพบว่า น้ำจากบ่อรวมน้ำเสียทดแทนที่ระดับ 40% น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สทดแทนที่ระดับ 40, 60 และ 80% สามารถแทนใช้เป็นอินทรีย์วัตถุเพื่อใช้ในหารทดแทนสูตรอาหารซารุคได้เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลง ของไฟโคไซยานิน ไฟโคอีริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ใช้สูตรอาหารซารุค 100% และน้ำเสียจากบ่อฝังทุกๆ ระดับการทดแทน ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 23) หลังจากการเก็บเกี่ยวสาหร่ายสไปรูลินาโดยการทำให้แห้งโดยใช้แสงแดด 12-24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความเป็นไปได้ของการทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยอินทรีย์วัตถุจากน้ำเสีย สรุปได้ว่าสามารถทดแทนน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สได้มากถึง 80%

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหาร โดยใช้วิธีวิเคราะห์โดยประมาณ (Proximate analysis) (AOAC, 2010) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงระดับของโภชนาของสาหร่ายสไปรูลินา จากการศึกษการเจริญเติบโตของสไปรูลินาและประสิทธิภาพการทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียของ



ฟาร์มสุกร สามารถพิจารณาพร้อมกับดัชนีชี้วัดของคาร์โบไฮเดรตใช้วิธีการตรวจวัด Dubois และคณะ (1956) โดยการเทียบกับสารละลายมาตรฐาน D-glucose ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 เมื่อมีสมการ  $y = 306.16x - 6.2642$  ;  $R^2 = 0.9633$  การทดแทนน้ำเสียจากฟาร์มสุกรบ่อไบโอแก๊สที่ระดับการทดแทน 40 และ 80% มีค่าเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตสูงและใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารุคใช้เลี้ยงเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (66.973, 62.115 และ 62.728 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย 40% และน้ำจากบ่อไบโอแก๊ส 60% แต่กลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำจากบ่อฝั่มทุกระดับมีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และ บ่อไบโอแก๊ส 40% และ 80% ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 24) และเมื่อเปรียบเทียบระดับของโปรตีนของกลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝั่มระดับ 80% มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงกว่า กลุ่มควบคุม (40, 38.75 และ 26.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อีกทั้งยังสอดคล้องกับระดับของเปอร์เซ็นต์ไขมันของกลุ่มที่ใช้น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สที่ระดับการทดแทน 60 - 80 % มีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมควบคุม (51 และ 59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ตาราง 24) ดังนั้นปริมาณโภชนะของสไปรูลิน่า คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ต่อประสิทธิภาพการทดแทนน้ำเสียในอาหารสูตรซารุคนี้กลุ่มการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สสามารถทดแทนอาหารซารุคได้ถึง 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อปริมาณองค์ประกอบทางเคมี อีกทั้งยังสามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้เพิ่มมากยิ่งขึ้นด้วย

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่า เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทดแทนน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อเป็นแหล่งอินทรีย์วัตถุต่อการทดแทนในสูตรอาหารซารุค เมื่อเปรียบเทียบดัชนีชี้วัดของ มวลสาหร่ายแห้ง (Bio mass SP; g) และต้นทุนการเลี้ยงใน (ตาราง 25 และ 26) สำหรับการทดแทนน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สที่ระดับ 40 และ 80% ได้มวลสาหร่ายแห้งสูงกว่ากลุ่มที่ทดแทน 80 % ด้วยน้ำเสียจากบ่อบำบัด (3.819, 4.205 และ 2.199 กรัมต่อ 4 ลิตร ตามลำดับ) ( $P < 0.05$ ) และต้นทุนการเลี้ยงสาหร่ายต่อน้ำหนักแห้งของกลุ่มที่ทดแทน 80% น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สมีต้นทุนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารุค อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (141.053 และ 812.884 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ))

ตาราง 20 Changing of carotenoid content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm bio-gas pond

Time/Trt	Carotenoid ( $\mu\text{g/ml}$ )				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	2.952 <sup>b</sup>	2.641 <sup>b</sup>	3.908 <sup>a</sup>	3.809 <sup>a</sup>	0.138	< 0.001
3	1.035 <sup>b</sup>	0.961 <sup>b</sup>	1.362 <sup>a</sup>	1.433 <sup>a</sup>	0.050	< 0.001
6	1.196	1.206	1.394 <sup>a</sup>	1.483 <sup>a</sup>	0.036	< 0.001
9	1.742	1.609	1.841	2.013	0.071	0.234
12	2.011	1.936	2.001	2.312	0.088	0.467
15	2.433	2.083	2.006	2.919	0.162	0.171
18	2.882	3.322	3.021	3.627	0.248	0.752
21	3.095	2.964	3.287	3.303	0.235	0.957
24	2.488	2.578	2.910	3.521	0.205	0.284

Note: <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

ตาราง 21 Changing of carotenoid content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm oxidation pond

Time/Trt	Carotenoid ( $\mu\text{g/ml}$ )				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
0	1.426 <sup>b</sup>	1.635 <sup>a</sup>	0.990 <sup>d</sup>	1.025 <sup>c</sup>	0.082	< 0.001
3	1.093 <sup>c</sup>	1.105 <sup>b</sup>	1.127 <sup>a</sup>	1.036 <sup>d</sup>	0.010	< 0.001
6	1.57 <sup>b</sup>	1.547 <sup>c</sup>	1.651 <sup>a</sup>	1.483 <sup>d</sup>	0.018	< 0.001
9	1.851 <sup>c</sup>	1.882 <sup>b</sup>	1.925 <sup>a</sup>	1.615 <sup>d</sup>	0.036	< 0.001
12	2.500 <sup>a</sup>	1.867 <sup>d</sup>	2.327 <sup>b</sup>	2.061 <sup>c</sup>	0.073	< 0.001
15	2.880 <sup>b</sup>	3.086 <sup>a</sup>	2.687 <sup>c</sup>	2.574 <sup>d</sup>	0.059	< 0.001

ตาราง 21 (continue)

Time/Trt	Carotenoid ( $\mu\text{g/ml}$ )				SEM	P-value
	control	40%	60%	80%		
18	2.915 <sup>d</sup>	3.214 <sup>c</sup>	3.587 <sup>a</sup>	3.378 <sup>b</sup>	0.074	< 0.001
21	3.999 <sup>a</sup>	3.833 <sup>b</sup>	3.990 <sup>a</sup>	3.023 <sup>c</sup>	0.121	< 0.001
24	4.294 <sup>a</sup>	4.108 <sup>c</sup>	4.138 <sup>b</sup>	3.793 <sup>d</sup>	0.055	< 0.001

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

ตาราง 22 Changing of carbohydrate content in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm

Treatment	Carbohydrate (%)	SEM	P-value
control	62.728 <sup>a</sup>	3.69	< 0.001
CT40%	27.933 <sup>c</sup>	5.46	< 0.001
Biogas40%	66.973 <sup>a</sup>	3.59	< 0.001
Biogas60%	43.894 <sup>b</sup>	4.24	< 0.001
Biogas80%	62.115 <sup>a</sup>	2.67	< 0.001
OP40%	56.304 <sup>ab</sup>	2.70	< 0.001
OP60%	55.590 <sup>ab</sup>	5.23	< 0.001
OP80%	56.590 <sup>ab</sup>	3.65	< 0.001

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ ) note: Control : Zm 100%; CT 40%: Zm+ Center tank pond 40%; Biogas 40%: Zm+ Bio-gas pond 40%; Biogas 60%: Zm+ Bio-gas pond60%; Biogas80%: Zm+ Bio-gas pond80%; OP 40%: Zm+ Oxidation pond40%; OP 60%: Zm+ Oxidation pond60%; OP 80%: Zm+ Oxidation pond 80%

ตารางที่ 23 Composition of Phycocyanin (PC), Allophycocyanin (APC) and Phycoerythrin (PE) (mg/g) in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond

Treatment	PC		APC		PE		SEM				P-value			
	(mg/g)		(mg/g)		(mg/g)		PC SP	APC SP	PE SP	PC SP	APC SP	PE SP	PC SP	APC SP
control	12.041±1.70 <sup>b</sup>	13.296±4.36 <sup>c</sup>	10.930±1.11 <sup>b</sup>	0.539	1.378	0.352	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
CT40%	24.847±11.64 <sup>a</sup>	32.058±17.82 <sup>a</sup>	22.842±11.19 <sup>a</sup>	3.681	5.636	3.538	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Biogas40%	27.984±8.03 <sup>a</sup>	31.614±10.62 <sup>a</sup>	27.314±6.85 <sup>a</sup>	2.540	3.358	2.166	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Biogas60%	24.972±4.60 <sup>a</sup>	25.429±5.32 <sup>ab</sup>	21.140±3.78 <sup>a</sup>	1.455	1.683	1.195	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Biogas80%	28.632±10.18 <sup>a</sup>	34.604±21.57 <sup>a</sup>	26.509±11.66 <sup>a</sup>	3.221	6.821	3.687	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
OP40%	14.165±7.32 <sup>b</sup>	15.022±8.62 <sup>ac</sup>	12.371±6.00 <sup>b</sup>	2.314	2.727	1.897	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
OP60%	16.259±5.06 <sup>b</sup>	19.771±6.76 <sup>ac</sup>	13.839±4.80 <sup>b</sup>	1.601	2.138	1.517	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
OP80%	13.075±5.74 <sup>b</sup>	13.099±6.34 <sup>c</sup>	10.020±13.46 <sup>b</sup>	1.815	2.004	1.093	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

Control : Zm 100%; CT40%: Zm+ Center tank pond 40%; Biogas40%: Zm+ Bio-gas pond40%; Biogas60%: Zm+ Bio-gas pond60%; Biogas80%: Zm+ Bio-gas pond80%; OP40%: Zm+ Oxidation pond40%; OP60%: Zm+ Oxidation pond60%; OP80%: Zm+ Oxidation pond80%

ตาราง 24 Composition of protein and fat (%) in spirulina cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond

Treatment	Protein (%)	Fat (%)
control	26.12	<b>59.00</b>
CT40%	37.68	36.00
Biogas40%	29.34	23.00
Biogas60%	31.37	<b>51.00</b>
Biogas80%	<b>40.00</b>	43.00
OP40%	30.94	8.00
OP60%	33.03	27.00
OP80%	<b>38.75</b>	19.00

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ ); protein and fat use Proximate analysis; Control : Zm 100%; CT 40%: Zm + Center tank pond 40%; Biogas 40%: Zm + Bio-gas pond 40%; Biogas 60%: Zm + Bio-gas pond 60%; Biogas 80%: Zm + Bio-gas pond 80%; OP 40%: Zm + Oxidation pond 40%; OP 60%: Zm + Oxidation pond 60%; OP 80%: Zm + Oxidation pond 80%

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่า เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทดแทนน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อเป็นแหล่งอินทรีย์วัตถุต่อการทดแทนในสูตรอาหารซารุค เมื่อเปรียบเทียบดัชนีชี้วัดของ มวลสาหร่ายแห้ง (Bio mass SP; g) และต้นทุนการเลี้ยงใน (ตาราง 25 และ 26) สำหรับการทดแทนน้ำเสียจากบ่อไบโแกสที่ระดับ 40 และ 80% ได้มวลสาหร่ายแห้งสูงกว่ากลุ่มที่ทดแทน 80 % ด้วยน้ำเสียจากบ่อบำบัด (3.819, 4.205 และ 2.199 กรัมต่อ4ลิตร ตามลำดับ) ( $P < 0.05$ ) และต้นทุนการเลี้ยงสาหร่ายต่อน้ำหนักแห้งของกลุ่มที่ทดแทน 80 % น้ำเสียจากบ่อไบโแกสมีต้นทุนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารุค อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (141.053 และ 812.884 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) ( $P < 0.05$ )

ตาราง 25 Composition of spirulina Bio mass (g) in different cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond

Treatment	Bio mass SP (g/4 L)	SEM	P-value
control	3.347 <sup>abc</sup>	0.180	< 0.001
CT40%	2.365 <sup>bc</sup>	0.327	< 0.001
Biogas40%	<b>3.819<sup>a</sup></b>	0.377	< 0.001
Biogas60%	3.147 <sup>abc</sup>	0.337	< 0.001
Biogas80%	<b>4.205<sup>a</sup></b>	0.629	< 0.001
OP40%	3.450 <sup>ab</sup>	0.387	< 0.001
OP60%	3.446 <sup>ab</sup>	0.338	< 0.001
OP80%	<b>2.199<sup>c</sup></b>	0.234	< 0.001

**Note:** <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ ) Control : Zm 100%; CT40%: Zm + Center tank pond 40%; Biogas 40%: Zm + Bio-gas pond 40%; Biogas 60%: Zm+ Bio-gas pond 60%; Biogas 80%: Zm + Bio-gas pond 80%; OP 40%: Zm + Oxidation pond40%; OP 60%: Zm + Oxidation pond 60%; OP 80%: Zm + Oxidation pond 80%

ตาราง 26 Composition of costs (bath/kg) spirulina cultures in different cultures that replaced Zarrouk's medium with waste water farm center tank, bio-gas and oxidation pond

Treatment	Cost SP (bath/kg)	SEM	P-value
control	<b>812.884<sup>a</sup></b>	42.401	< 0.001
CT40%	<b>723.813<sup>a</sup></b>	79.322	< 0.001
Biogas40%	439.959 <sup>bc</sup>	46.823	< 0.001
Biogas60%	360.330 <sup>bc</sup>	40.349	< 0.001

ตาราง 26 (continue)

Treatment	Cost SP (bath/kg)	SEM	P-value
Biogas80%	<b>141.053<sup>d</sup></b>	21.709	< 0.001
OP40%	492.530 <sup>b</sup>	58.420	< 0.001
OP60%	325.471 <sup>bcd</sup>	31.227	< 0.001
OP80%	255.546 <sup>cd</sup>	24.025	< 0.001

Note: <sup>a, b, c, d</sup> Means with different superscript along the row are significantly different ( $P < 0.05$ )

ตาราง 27 Performance percentages and conidian comparison of each parameter

Scorecard	criterion (%)	control	CT (%)				OP (%)			Bio-gas (%)		
			40%	40%	60%	80%	40%	60%	80%	40%	60%	80%
pH	1			1	1							1
optical density (OD)	3											3
Chlorophyll A	7					7	7			7		7
Carotenoid	7							7				
Phycocyanin	8	8							8	8		8
Carbohydrate	8	8							8			8
Protein	8											8
Fat	8	8								8		
Bio mass	20								20			20
Cost SP	30											30
100%		24	0	1	15	7	36	23				85

จากตาราง 27 แสดงดัชนีชี้วัดที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าโดยการใช้ คะแนนน้ำหนักที่ได้จากการเปรียบเทียบ โดยการให้น้ำหนักคะแนนของแต่ละดัชนีชี้วัดจาก ความสำคัญจากมากไปหาน้อย คือ ต้นทุนการเพาะเลี้ยง (Cost SP), มวลของสาหร่ายหลังการเก็บเกี่ยว (Bio mass SP) ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฟโคไซยานิน แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิวส์ เอ ความหนาแน่นของเซลล์โดยการตรวจวัดการดูดกลืนแสง และ pH (30, 20, 8, 8, 8, 8, 7, 7, 3 และ 1 ต่อ การเปรียบเทียบความเข้มข้นแต่ละดัชนีชี้วัด 100 เปอร์เซ็นต์) สามารถสรุปได้ว่า การทดแทนน้ำเสีย 80% จากบ่อไบโอแก๊ส (Bio-gas) จากฟาร์มสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ สามารถทดแทนสูตรอาหารซารุคได้ เมื่อเปรียบเทียบกับดัชนีชี้วัดข้างต้นซึ่งได้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของกลุ่มที่ทดแทนน้ำเสีย 80% จากบ่อไบโอแก๊ส (Bio-gas) ที่ระดับ 85 % ดังนั้นสามารถจะใช้สาหร่ายจากการเลี้ยงดังกล่าวนำไปทดลอง ประสิทธิภาพการหมักสำหรับการทดลอง 2 และ 3 ต่อไป

จากนั้นได้จำลองการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดกลางในโรงเรือนเพาะเลี้ยงประเภทปิด ต้นแบบ ขนาด 1000 ลิตรในวงบ่อซีเมนต์จากสูตรที่ดีที่สุด โดยควบคุมปัจจัยอุณหภูมิ และความชื้น นำสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตรวจองค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีโปรตีน 51.13% และพลังงาน (GE) 3386 kcal/kg กรดอะมิโนที่จำเป็นดังแสดง Table 28 เช่น Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan, Valine (2281, 10207, 8591, 1151, 1209, 6674, 392, <20 และ 8868 mg/100g ตามลำดับ) รวมถึงกรดไขมัน ประกอบด้วย gamma-Linolenic acid, Polyunsaturated Fatty acid, Omega 6 และ Omega 9 (0.05, 0.15, 146.13 และ 29.8 g/100g ตามลำดับ) มีค่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Habib et al. (2008), Mata et al. (2010), Sajilata et al. (2008). ร่วมด้วยกับการทดสอบการตกค้าง ของจุลินทรีย์ Coliform bacteria มีค่าน้อยกว่า 2.2 MPN/g และไม่พบ *E-Coli* และ *Salmonella* spp.



ตาราง 28 Essential amino acid and Fatty acids composition in spirulina culture produced in the large scale (1000L)

Biochemical composition	Amount	Unit	Essential amino acid	mg/100g	Fatty acids analysis	g/100g
Dry matter <sup>1</sup>	90.55	g*100g	Histidine	2281	Palmitic acid (C16:0)	0.17
Ash <sup>1</sup>	10.45	g*100g	Isoleucine	10207	Saturated fat	0.22
Crude fiber <sup>2</sup>	0.56	g*100g	Leucine	8591	cis-9-Oleic acid (C18:1n9c)	0.03
Crude Fat <sup>1</sup>	3.88	g*100g	Lysine	1151	cis-9,12-Linoleic acid (C18:2n6)	0.09
Protein <sup>1</sup>	51.13	g*100g	Methionine	1209	gamma-Linolenic acid (C18:3n6)	0.05
Energy (GE) <sup>3</sup>	338.60	Kcal/100g	Phenylalanine	6674	Polyunsaturated Fatty acid	0.15
Chlorophyll a <sup>4</sup>	348.62	mg/ml	Threonine	392	Unsaturated fat	0.19
Carotenoid <sup>4</sup>	113.67	mg/ml	Tryptophan	<20	Omega 6	146.13
Polysaccharide <sup>5</sup>	10.2	%	Valine	8868	Omega 9	29.8

**Note:** <sup>1</sup>Dry matter, Ash, Crude Fat, Protein : AOAC, (2019), <sup>2</sup> Crude fiber: AOAC, (2010), <sup>3</sup>Energy: AOAC, (1993) <sup>4</sup>จางกล พรมยง และคณะ, (2535), <sup>5</sup> Dubois et al, (1956), Essential amino acid Amino: AOAC, (2000), Fatty acids analysis: AOAC, (2012)

## 4.2 ผลการศึกษา การวิจัยต้นแบบการผลิต ผลิตภัณฑ์สไปรูลินา โดยการศึกษาวิธีการหมักสไปรูลินาด้วยแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)

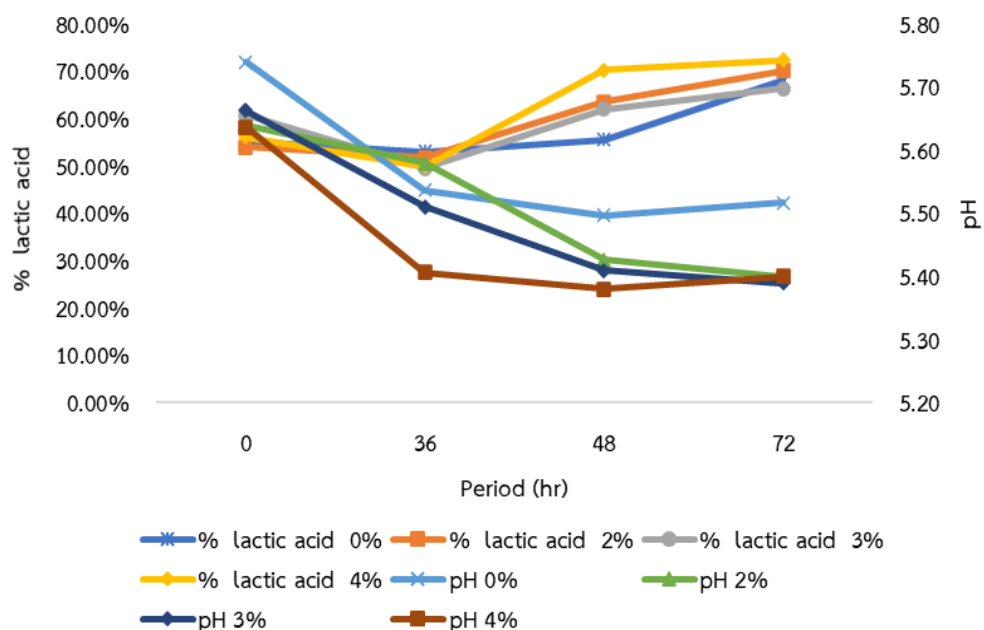
กำหนดปัจจัยสำหรับการศึกษา 2 ปัจจัย ดังนี้

- ปัจจัยที่ 1) แต่ละทริตเมนต์หมักสไปรูลินาด้วยแบคทีเรียแลคติก 0, 2, 3 และ 4 %  
 ปัจจัยที่ 2) กำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ที่ 0, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ  
 (Niccolai et al., 2018)

การหมักสไปรูลินาด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อช่วงเวลาและระดับปริมาณของเชื้อที่ใช้ในการหมัก เมื่อตรวจสอบการรอดชีวิตเชื้อ (log cfu/ml) พบว่าหลังการหมัก 72 ชั่วโมง การรอดชีวิตเชื้อสูงกว่าช่วงเวลาอื่น ๆ ( $P < 0.05$ ) และสอดคล้องกับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ 2-4% สูงกว่า 0% ( $P < 0.05$ ) อีกทั้งระยะเวลาและปริมาณเชื้อที่ใช้ในการหมักมีความสัมพันธ์ระหว่างกันเชิงปฏิกริยา ร่วมกัน (interaction) จึงเห็นได้ว่าสไปรูลินาสามารถเป็นสารตั้งต้นของการหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ได้ อีกทั้งเมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณกรดแลคติกจากของเหลวในกระบวนการหมัก ปริมาณของ *L. plantarum* ไม่มีผลต่อปริมาณของกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น แต่ระยะเวลาของการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงกว่าที่ 0 และ 36 ชั่วโมง (ตาราง 29) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า pH ที่ลดลง ( $P < 0.05$ )

จากตาราง 18 แสดงผลเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในสไปรูลินาที่ผ่านการหมักในปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 แตกต่างกัน ต่อระยะเวลาในการหมัก โดยดัดแปลงขั้นตอนจาก AOAC (1990) พบว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของกรดแลคติก แต่ในทางกลับกัน ระยะเวลาของการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของกรดแลคติกสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาในการหมัก 0 และ 36 ชั่วโมง เนื่องจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมักเป็นช่วงที่เรียกว่าเรียก Log phase (Logarithmic phase หรือ Exponential phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ส่งผลทำให้ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง จะใช้เวลาเท่าๆ กัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้ อย่างมากและรวดเร็ว เมื่อเข้าถึง 72 ชั่วโมงการหมักอยู่ในช่วงคงที่ (Stationary phase) ระยะที่ จุลินทรีย์จะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการ ขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม จึงไม่ควรหมักสไปรูลินา มากกว่า 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 29) สรุปได้ว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ และช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

นั้นมีความสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสังเกตได้จากเมื่อระดับปริมาณของจุลินทรีย์สูงขึ้น ส่งผลต่อระดับของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงขึ้น อาจจะทำให้จุลินทรีย์ใช้อาหารและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย เพื่อไม่ให้คุณค่าทางอาหารของสไปรูลิน่าต่ำลง สามารถสรุประยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม คือ 48 ชั่วโมง



ภาพ 18 The relationship between lactic acid (%), fermentation period and pH changes during spirulina fermentation process

การตรวจวัดระดับ pH ของหมักสไปรูลิน่าด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 จะต้องควบคุม pH ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยปรับค่า pH ของสไปรูลิน่าผงที่ถูกละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเติมสารละลาย Citric acid 8 Normal ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ให้มีค่า pH เริ่มต้น  $5.5 \pm 0.5$  ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการหมักด้วยเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 เป็นแนวทางใหม่ ที่เหมาะสมสำหรับการปรับค่าระดับ pH ในสารละลายที่ต้องการหมักเพื่อสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมได้ โดยที่ไม่มีสารเคมีตกค้าง เมื่อผ่านระยะเวลาการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าค่า pH ลดลงซึ่งแตกต่างจากชั่วโมงที่ 36 และ 0 ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 28) และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 มีผลต่อค่า pH เนื่องจากกลุ่มที่ใช้เชื้อที่ 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ระดับของ pH ต่ำลงแตกต่างจากกลุ่ม 0% ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 29)

จากตาราง 30 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสไปรูลิน่าที่ผ่านการหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อระยะเวลาในการหมัก พบว่าปริมาณของเชื้อมีผลต่อความหนาแน่นของเซลล์ที่วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งกลุ่มทดลองที่มีระดับของ *L. plantarum* TISTR 2075 4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลทำให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่หมักด้วย 0, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) รวมถึงมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่นของเซลล์ และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ประเมินด้วยวิธี Standard plate counts (SPC) ต่อระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 และระยะเวลาในการหมัก สรุปได้ว่าค่าการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยโคโลนีที่นับได้ซึ่งจะปรากฏให้เห็นเป็นโคโลนี (colony forming units: CFU) โดยใช้เทคนิค pour plated มีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของเซลล์ที่ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้สามารถประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 ได้โดยวิธีวัดความหนาแน่นของเซลล์ซึ่งสามารถลดขั้นตอนการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดียิ่งขึ้นเพราะเนื่องจากจะต้องผลิตให้ได้มวลของสไปรูลิน่าหมักเพียงต่อการนำไปทดสอบในการเสริมในอาหารสุกร

สารประกอบฟีนอล (total phenolic compounds; TPC) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด รวมถึงกลุ่มของสาหร่าย ที่มีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) รวมถึงสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีโครงสร้างอย่างง่าย คล้ายกับกรดฟีนอลิก (phenolic acids) โดยใช้สารละลาย gallic acid เป็นมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าช่วงระยะเวลาการหมัก 48-72 ชั่วโมง มี TPC สูงกว่ากลุ่มอื่น ( $P < 0.05$ )

การทดสอบหาคักยภาพของการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant potential capacity; APC) หรืออาจเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สารละลาย L-ascorbic acid เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นมาตรฐานเพื่อใช้เทียบกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร เมื่อ  $y = 0.0036x - 0.0156$ ;  $R^2 = 0.9894$  ดัดแปลงขั้นตอนการวิเคราะห์จาก Niccolai et al. (2018) อย่างไรก็ตามกระบวนการและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีผลต่อปริมาณสารต้านออกซิเดชัน จึงออกแบบการตรวจสอบในสาหร่ายสไปรูลิน่าทั้งหมด 3 ส่วน

**ส่วนที่แรก** คือ สไปรูลิน่าอบพร้อมน้ำหมักอบแห้งโดยใช้อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

**ส่วนที่สอง** คือ สไปรูลิน่าหมักแยกน้ำหมักอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

**ส่วนที่สาม** คือ ส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 44 ขนาด 110 มิลลิเมตร กรองอย่างน้อย 2-3 ครั้ง

จากตาราง 29 ปริมาณสารต้านออกซิเดชันของส่วนที่ 1 พบว่าช่วงเวลาของการหมัก 36, 48 และ 72 ชั่วโมงมีปริมาณ APC สูงกว่ากลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) ( $P < 0.05$ ) (1277.833, 1409.986, 1293.944 และ 795.611  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 4 เพอร์เซ็นต์ พบว่าตรวจวัดปริมาณ APC สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระดับปริมาณของเชื้อ 0, 2 และ 3 เพอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) 1368.944, 1286.861, 1039.222 และ 1082.347 ( $\mu\text{g/ml}$ ) ตามลำดับ

สำหรับการตรวจสอบสไปรูลินาหมักของส่วนที่ 2 นั้นพบว่าปริมาณ APC ค่อนข้างสูงเทียบเท่ากับส่วนแรกแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และส่วนที่ 3 APC ค่อนข้างต่ำและไม่สัมพันธ์กับสมมุติฐานที่วางไว้ (ตาราง 30) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อการหมักนั้นสรุปได้ว่า ระดับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ 4 เพอร์เซ็นต์ และช่วงเวลาการหมักตั้งแต่ 36-72 ชั่วโมงมีผลต่อการตรวจวัดปริมาณ APC

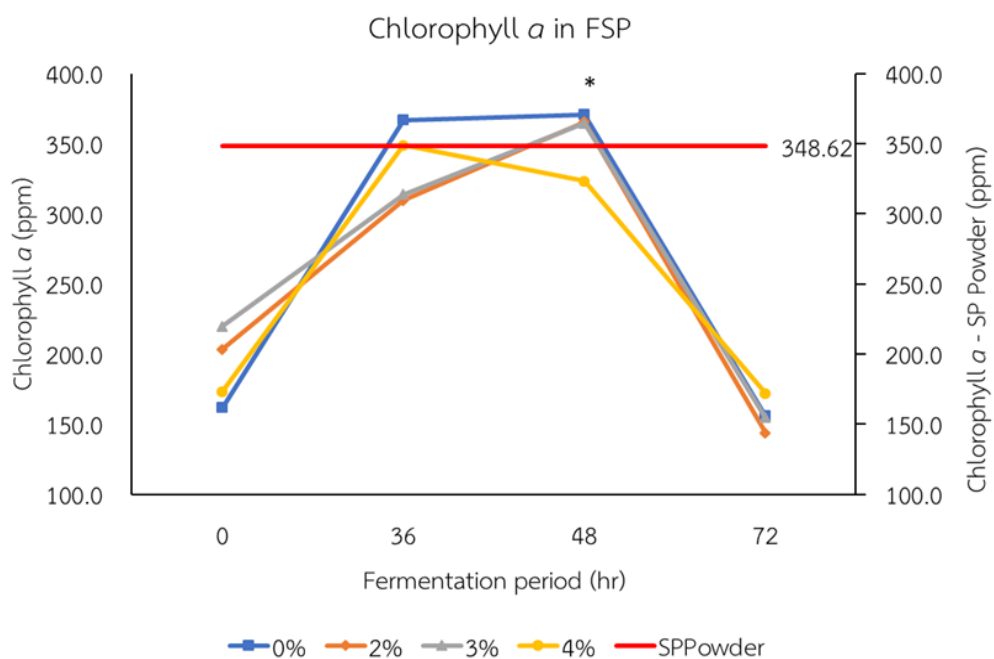
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาทางเคมี (bioactive screening based on chemical reaction) ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วจะเกิดสีของสารละลายสีม่วง และจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับ DPPH เข้มข้น 1 มิลลิโมล ละลายในเมทานอล 95.0 เพอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยา จากตาราง 29 เพอร์เซ็นต์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของส่วนที่ 1 พบว่าระยะเวลา ระดับปริมาณของเชื้อที่ใช้หมัก และอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง มีผลต่อประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยที่เฉพาะระยะเวลาเริ่มต้นของการหมัก มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) และกลุ่มทดลองที่ใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (26.250, 30.010 และ 19.146 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และสอดคล้องกับการใช้ระดับ 3 และ 4 เพอร์เซ็นต์ของปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 การทดสอบการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระดับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ 2 เพอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) (31.595, 35.100 และ 28.211 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

สำหรับผลของการทดสอบการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระส่วนที่ 2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในทางกลับกันการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารน้ำหรือส่วนที่ 3 การใช้ระยะเวลาในการหมักถึง 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับกลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) (54.950 และ 55.057 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม การทดสอบการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาหมัก 36 และ 48 ชั่วโมง (45.845 และ 53.755 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

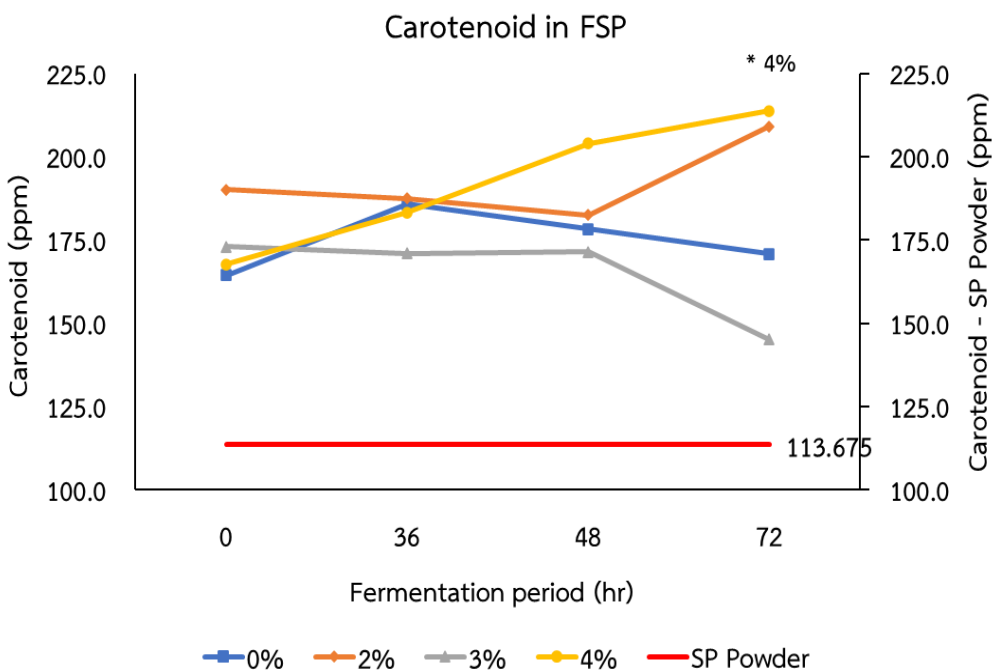
( $P < 0.05$ ) ส่วนระดับปริมาณเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 ผลจากการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นไม่แตกต่างกัน ( $P < 0.05$ ) ระยะเวลาของการหมัก 72 ชั่วโมง และระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ระดับ 3 และ 4 เพอร์เซ็นต์มีทิศทางเชิงบวกที่จะส่งผลให้สไปรูลิน่าหมักมีการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (ตาราง 30)

คลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) เป็นรงควัตถุที่มักพบสูงในสไปรูลิน่า และยังเป็นสารประกอบในกลุ่มของสารออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในสไปรูลิน่าหมักนั้นเป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญ เพื่อใช้พิจารณาการเลือกใช้ระยะเวลาและระดับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการหมักที่เหมาะสม โดยวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร จากการตรวจวัดสไปรูลิน่าที่อบแห้งพร้อมน้ำ ใช้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ของกลุ่มที่หมัก 36 และ 48 ชั่วโมง (333.345 และ 355.06) มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากกว่าและแตกต่างกับกลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) และ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (199.86 และ 158.57) แต่สำหรับระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 นั้นไม่แตกต่างกัน ( $P < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสไปรูลิน่าหลังจากอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที ก่อนเตรียมกระบวนการหมัก ตรวจวัดคลอโรฟิลล์ เอ (ภาพ 19 และตาราง 29) สามารถวัดได้ 348.62 ppm และช่วงระยะเวลาของการหมักที่ 36 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่ตรวจวัดได้นั้นสูงกว่าสไปรูลิน่าที่ยังไม่ได้เข้ากระบวนการหมัก

การเปรียบเทียบระดับการเปลี่ยนแปลงของแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ในสไปรูลิน่าก่อนหมัก และหลังหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อระยะเวลาในการหมัก พบว่าการใช้ระยะเวลาการหมัก 36 และ 72 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่ส่งผลทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์มากกว่ากลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) และ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก 4 เพอร์เซ็นต์ส่งผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาการหมัก 0 36 และ 48 ( $P < 0.05$ ) ซึ่งตรวจวัดในสไปรูลิน่าหลังจากการหมัก ( $P < 0.05$ ) โดยไม่แตกต่างกับเมื่อใช้เชื้อ 3% ในการหมัก (ภาพ 20 และตาราง 30)



ภาพ 19 Chlorophyll a content in spirulina during fermentation period compared with chlorophyll a content in spirulina before fermentation



ภาพ 20 Carotenoid content in spirulina during fermentation period compared with carotenoid content in spirulina before fermentation

จากผลการทดสอบปริมาณสารคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll *a*) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นสารประกอบในกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่สำคัญ ดังนั้นดัชนีชี้วัดเหล่านี้จึงมีความสำคัญ เพื่อใช้พิจารณาการเลือกใช้ระยะเวลาและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการหมักที่เหมาะสม สำหรับกลุ่มที่ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 และ 48 ชั่วโมงมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงกว่าและแตกต่างกับกลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) และหมัก 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) ปริมาณของ *L.plantarum* TISTR 2075 นั้นไม่มีผลต่อปริมาณ คลอโรฟิลล์ เอ ( $P < 0.05$ ) แต่มีผลต่อปริมาณ แคโรทีนอยด์ ( $P < 0.05$ ) โดยปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก 4% ตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้ค่าสูงสุด

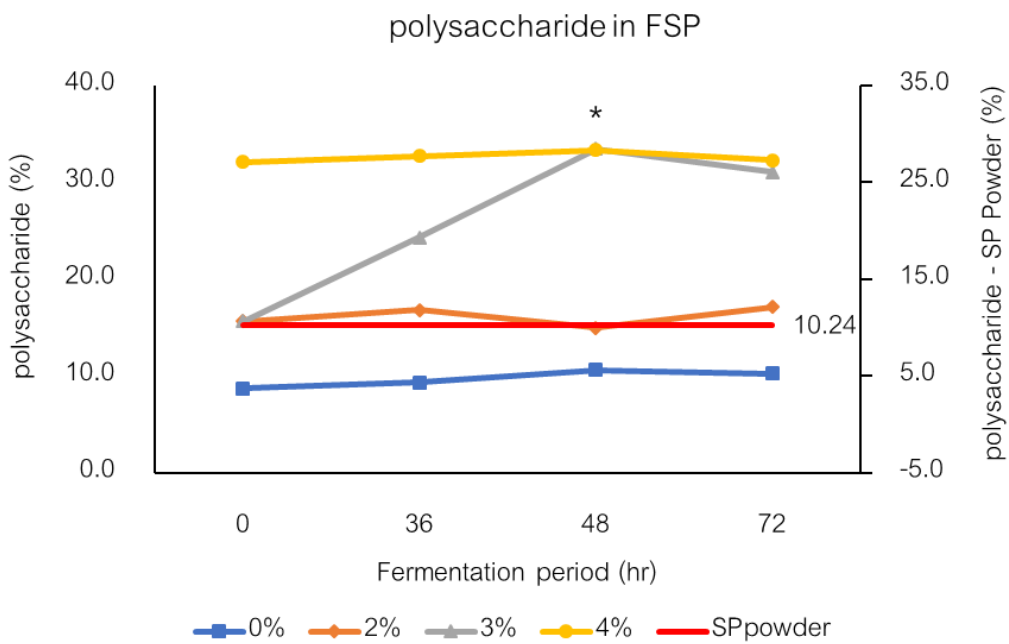
การตรวจสอบปริมาณเบต้า-แคโรทีน ในสไปรูลิनाหมัก โดยวิธีที่ตัดแปลงขั้นตอนการตรวจวัดจาก ปริณรัตน์ วิหงส์ และคณะ (2557) ใช้สารละลายมาตรฐาน Beta-carotene เป็นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ 450 นาโนเมตร เมื่อ  $y = 0.0416x + 0.0075$  ;  $R^2 = 0.9842$  พบว่าการใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง (1.263 ppm) และสูงกว่ากลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) และหมัก 36 ชั่วโมง (0.967 และ 0.884 ppm) ( $P < 0.05$ ) สำหรับกลุ่มที่ไม่ใช้เชื้อ และใช้เชื้อระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ระดับ 2 เปอร์เซ็นต์ (1.122 และ 1.088 ppm) ปริมาณเบต้า-แคโรทีน สูงกว่าและแตกต่างจากกลุ่มที่ใช้เชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์หมัก (0.948 ppm) แต่สำหรับกลุ่มที่ใช้ *L. plantarum* TISTR 2075 3 เปอร์เซ็นต์ในการหมักมีแนวโน้มมีปริมาณเบต้า-แคโรทีนสูงกว่ากลุ่มที่ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.051 ppm) ( $P < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อปริมาณเบต้า-แคโรทีน ที่ระดับเชื้อ 2-3 เปอร์เซ็นต์ และใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงมีผลเชิงบวกต่อปริมาณเบต้า-แคโรทีน

การตรวจสอบโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ของสไปรูลิनाหมักโดยใช้สารละลายมาตรฐาน D-glucose ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นมาตรฐาน ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เมื่อ  $y = 0.0091x + 0.0492$ ;  $R^2 = 0.987$  สำหรับการทดลองดังกล่าวตรวจสอบ 2 ส่วน ส่วนแรกดังแสดงผลในตาราง (ตาราง 29) สไปรูลิनाหมักอบแห้งพร้อมน้ำหมัก ใช้อุณหภูมิในการอบแห้ง 85 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 72 ชั่วโมงส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์โพลีแซคคาไรด์สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง), 36 และ 48 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (32.585, 9.707, 16.104 และ 26.095 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ในการหมักสไปรูลินานั้นส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์ โพลีแซคคาไรด์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่หมัก (0 ชั่วโมง) และ หมักเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) (23.071, 22.677, 17.988 และ 20.755 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

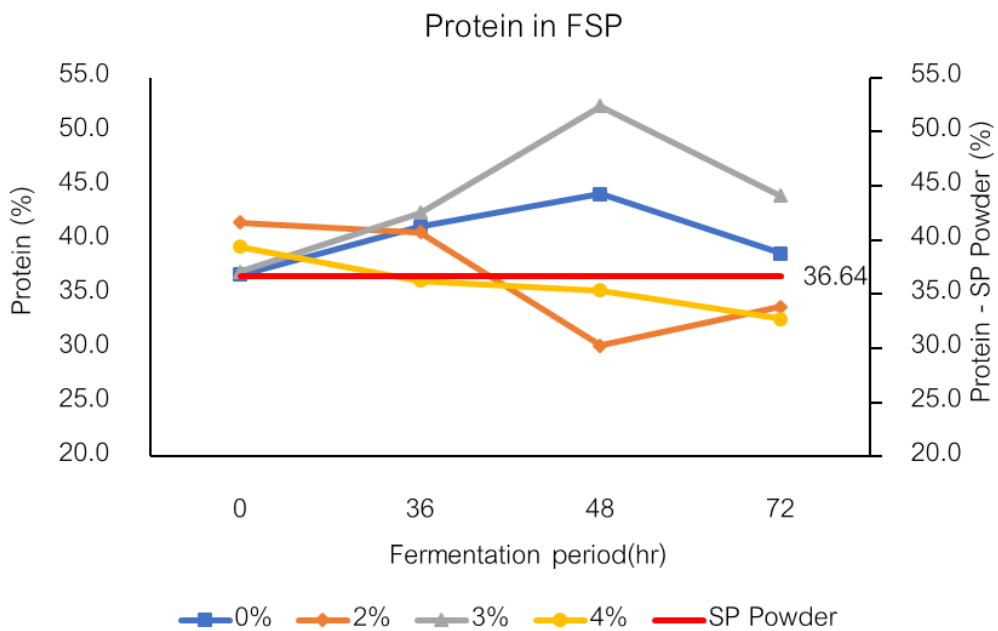


สำหรับส่วนที่ 2 ผลดังแสดงในตาราง 30 ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์โพลีแซคคาไรด์ของสไปรูลิनाส่วนที่แยกน้ำออก แล้วนำไปอบแห้ง 65 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ช่วงเวลาในการหมักและระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ไม่แตกต่างกัน ( $P \geq 0.05$ ) และเมื่อนำปริมาณสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ของสไปรูลิनाหลังจากอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที ก่อนเตรียมกระบวนการหมัก ตรวจวัดเปอร์เซ็นต์โพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 10.237 มาเปรียบเทียบกับสไปรูลิनाที่หมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ระดับ 3 และ 4 % รวมทั้งการใช้เวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมง สามารถตรวจวัดปริมาณโพลีแซคคาไรด์ได้มากกว่าสไปรูลิनाที่ยังไม่ผ่านการหมัก ซึ่งสรุปได้ว่าความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อสไปรูลิनाไม่เกี่ยวข้องกับการสลายผนังเซลล์ แต่การใช้จุลินทรีย์ในการหมักที่ระดับ 4% ส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมภายในภาชนะ การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกซึ่งมีผลต่อการสลายชั้นเซลล์ของสไปรูลิना ที่ระยะเวลาของการหมัก 48 ชั่วโมงสามารถตรวจวัดปริมาณของสารประกอบโพลีแซคคาไรด์มากกว่าก่อนหมัก 31 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพ 21 ที่แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ก่อนหมักและหลังหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อระยะเวลาในการหมัก

ผลของการหมักสไปรูลินำด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนหลังจากการหมักนั้น ด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry, 1951) ใช้สารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นมาตรฐาน นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เมื่อ  $y = 0.0006x + 0.1063$ ;  $R^2 = 0.9908$  แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ใช้เชื้อ ส่วนแรก สไปรูลินำหมักที่อบพร้อมน้ำหมักที่ระยะเวลาของการหมัก 48 ชั่วโมงสามารถตรวจวัดระดับโปรตีนได้สูงกว่าการหมัก 36 และ 72 ชั่วโมง (43.991, 36.596 และ 35.909) ส่วนกลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง) มีแนวโน้มระดับโปรตีนสูงใกล้เคียงกับกลุ่ม 48 ชั่วโมง อีกทั้งระยะเวลาในการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง มีความสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ใช้ในการหมัก ส่วนที่ 2 สไปรูลินำอบแยกน้ำหมัก ปัจจัยของระดับของปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการหมักและระดับโปรตีน แต่ระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมงส่งผลต่อระดับของโปรตีนสูงกว่ากลุ่มที่ยังไม่หมัก (0 ชั่วโมง), กลุ่มที่หมัก 36 และ 48 ชั่วโมง (41.70, 36.131, 31.880 และ 29.615 ตามลำดับ) ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 22.



ภาพ 21 Polysaccharide content in spirulina during fermentation period compared with polysaccharide content in spirulina before fermentation



ภาพ 22 Protein content in spirulina during fermentation period compared with polysaccharide content in spirulina before fermentation

ตาราง 29 The effect of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 concentration and fermentation period for spirulina fermentation on antioxidant efficiency and nutritional composition<sup>1</sup>

Index	Period (hr) <sup>A</sup>					% <i>L. plantarum</i> 2075 <sup>B</sup>				SEM	A	B	AB
	0	36	48	72	0%	2%	3%	4%					
<i>L. Plantarum</i> 2075 (log cfu/ml)	4.78 <sup>c</sup>	5.32 <sup>b</sup>	5.50 <sup>ab</sup>	5.61 <sup>a</sup>	0.00 <sup>z</sup>	7.01 <sup>x</sup>	7.06 <sup>x</sup>	7.13 <sup>x</sup>	0.150	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
pH	5.67 <sup>a</sup>	5.51 <sup>b</sup>	5.43 <sup>c</sup>	5.43 <sup>c</sup>	5.57 <sup>x</sup>	5.51 <sup>y</sup>	5.49 <sup>y</sup>	5.45 <sup>y</sup>	0.043	< 0.001	0.005	0.005	0.672
Lactic acid (%)	55.52 <sup>b</sup>	51.06 <sup>b</sup>	62.87 <sup>a</sup>	67.17 <sup>a</sup>	57.97	59.85	57.81	60.98	4.757	< 0.001	0.743	0.743	0.370
TPC (%)	72.27 <sup>b</sup>	71.79 <sup>b</sup>	105.00	101.50 <sup>a</sup>	85.79	85.25	90.27	89.25	3.424	< 0.001	0.104	0.104	0.345
APC ( $\mu$ g/ml) <sup>1</sup>	795.61 <sup>b</sup>	1277.83 <sup>a</sup>	1409.99 <sup>a</sup>	1293.94 <sup>a</sup>	1286.86 <sup>xy</sup>	1039.22 <sup>z</sup>	1082.35 <sup>xy</sup>	1368.94 <sup>x</sup>	144.974	< 0.001	0.014	0.014	0.437
ADA-DPPH (%) <sup>1</sup>	56.67 <sup>a</sup>	19.15 <sup>c</sup>	26.25 <sup>bc</sup>	30.01 <sup>b</sup>	37.17 <sup>x</sup>	28.21 <sup>z</sup>	31.59 <sup>xy</sup>	35.10 <sup>xy</sup>	5.093	< 0.001	0.106	0.106	0.007
Chlorophyll A (ppm) <sup>1</sup>	199.86 <sup>b</sup>	333.34 <sup>a</sup>	355.06 <sup>a</sup>	158.57 <sup>c</sup>	263.84	265.52	263.19	254.28	17.847	< 0.001	0.811	0.811	0.007
Carotenoid (ppm) <sup>1</sup>	178.88 <sup>b</sup>	193.70 <sup>a</sup>	170.27 <sup>b</sup>	192.57 <sup>a</sup>	178.09 <sup>y</sup>	181.52 <sup>y</sup>	184.28 <sup>xy</sup>	191.54 <sup>x</sup>	3.704	< 0.001	0.028	0.028	< 0.001
Beta-carotene (ppm) <sup>1</sup>	0.96 <sup>c</sup>	0.88 <sup>c</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.10 <sup>b</sup>	1.12 <sup>x</sup>	1.09 <sup>x</sup>	1.05 <sup>xy</sup>	0.95 <sup>y</sup>	0.046	< 0.001	0.057	0.057	0.007
Polysaccharide (%) <sup>1</sup>	9.71 <sup>c</sup>	16.10 <sup>b</sup>	26.09 <sup>b</sup>	32.58 <sup>a</sup>	17.99 <sup>z</sup>	20.75 <sup>y</sup>	23.07 <sup>x</sup>	22.68 <sup>x</sup>	1.320	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Protein (%) <sup>1</sup>	40.23 <sup>ab</sup>	36.60 <sup>b</sup>	43.99 <sup>a</sup>	35.91 <sup>b</sup>	38.68	40.15	40.55	37.34	1.589	0.003	0.473	0.473	0.015

ตาราง 30 The effect of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 concentration and fermentation period for spirulina fermentation on antioxidant efficiency and nutritional composition<sup>2</sup>.

Index	Period (hr)A				% <i>L. plantarum</i> 2075B				SEM	A	B	AB
	0	36	48	72	0%	2%	3%	4%				
optical density ; OD	0.57 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.30b <sup>c</sup>	0.27 <sup>c</sup>	0.36 <sup>y</sup>	0.34 <sup>y</sup>	0.34 <sup>y</sup>	0.44 <sup>x</sup>	0.41	< 0.001	0.003	0.098
APC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>2</sup>	1311.72	1353.11	1324.50	1391.72	1358.39	1302.56	1398.67	1321.44	144.883	0.867	0.794	0.814
APC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>3</sup>	28.23 <sup>a</sup>	20.86 <sup>b</sup>	21.49 <sup>b</sup>	20.59 <sup>b</sup>	24.48	21.91	20.59	24.20	3.258	0.012	0.304	0.158
ADA-DPPH (%) <sup>2</sup>	13.47	15.67	16.64	17.14	15.76	15.18	15.03	16.95	5.093	0.549	0.887	0.197
ADA-DPPH (%) <sup>3</sup>	55.06 <sup>a</sup>	45.84 <sup>b</sup>	53.75 <sup>ab</sup>	54.95 <sup>a</sup>	51.52	53.39	55.23	49.46	5.372	0.081	0.486	0.466
Polysaccharide (%) <sup>2</sup>	12.03	10.05	10.98	10.59	11.32	10.77	10.83	10.73	0.489	0.053	0.810	0.065
Protein (%) <sup>2</sup>	29.61 <sup>c</sup>	31.88 <sup>c</sup>	36.13 <sup>b</sup>	41.71 <sup>a</sup>	34.57	32.39	36.21	36.16	2.718	> 0.001	0.178	0.013

**Note:** <sup>a, b, c</sup> Means with different superscript within the same row are significantly different of fermentation period ( $P \leq 0.05$ )

<sup>x, y, z</sup> Means with different superscript within the same row are significantly different of % *L. plantarum* 2075 ( $P \leq 0.05$ ). <sup>1</sup> Dry

fermented spirulina including with liquid. <sup>2</sup> Dry fermented spirulina including without fermented liquid. and <sup>3</sup> liquid from Spirulina fermentation process. A: Fermentation period; B: % *L. plantarum* 2075. Total Phenolic Content: TPC, Antioxidant potential capacity: APC, Antioxidant activity on DPPH reaction: ADA-DPPH.

ตาราง 31 Performance percentages and the comparison of the confidence for each parameter of fermentation period and % *L. plantarum* TISTR 2075

Scorecard	criterion (%)	Fermentation period (hr)				% <i>L. plantarum</i> 2075			
		0	36	48	72	0	2	3	4
		Log (cfu/ml)	2		1	2		2	2
pH	2		2	2		2	2	2	
Optical density ; OD	2	2						2	
Lactic acid	5			5	5				
Total Phenolic Content (TPC)	6			6	6				
Antioxidant potential capacity	13		13	13	13	6.5		13	
Antioxidant activity on DPPH reaction	8	8				8	4	4	
Chlorophyll $\alpha$	10		10	10					
Beta-carotene	13			13		13	13	6.5	
Carotenoid	13		13		13		6.5	13	
Polysaccharide	13				13		13	13	
Protein	13	6.5		13					
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>16.5</b>	<b>36</b>	<b>63</b>	<b>54</b>	<b>27.5</b>	<b>17</b>	<b>34</b>	<b>49</b>

**Note:** Criterion percentage is the result from the comparative index assessment using selected the highest indicators score, which ablated from statistical analysis.

การสรุปเปรียบเทียบระยะเวลาการหมัก และปริมาณของเชื้อต่อประสิทธิภาพของการหมัก (ตาราง 31) โดยกำหนดเปอร์เซ็นต์ Criterion คือ ผลสัมฤทธิ์ต่อการประเมินเปรียบเทียบดัชนีชี้วัด โดยเลือกจากคะแนนสูงสุดของตัวชี้วัดที่กำหนดตามความสำคัญ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนคะแนนผลสัมฤทธิ์ครึ่งหนึ่งของคะแนนทั้งหมดนั้นเป็นการประเมินความสัมพันธ์ที่มีแนวโน้มเชิงบวก ระหว่างระยะเวลาในการหมักและสัดส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมัก ซึ่งแบ่งออกเป็นสามกลุ่มเรียงตามลำดับความสำคัญต่อวัตถุประสงค์ของการหมักสไปรูลิน่า คือ องค์ประกอบของโภชนะ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และดัชนีชี้วัดด้านการหมัก โดยมีสัดส่วนดังต่อไปนี้ 62, 27 และ 11% ตามลำดับสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการหมัก หลังจากการหมักโดยใช้ปริมาณเชื้อ 4% และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 48 ชั่วโมง เพื่อลดปัจจัยบางประการต่อการที่จะมีผลการใช้ประโยชน์สไปรูลิน่าในสัตว์วัยอ่อน พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของสัดส่วนคะแนนที่ระบุข้างต้นอยู่ที่ 63 และ 49% ตามลำดับ

จากระดับการทดสอบข้างต้นเพื่อนำไปเพิ่มขนาดการผลิตเป็นขนาดกลางโดยระดับปริมาณ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 4% ที่ใช้ในการหมักพร้อมด้วยระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อจำลองการผลิตในภาคอุตสาหกรรมนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางโภชนะ (Chemical composition analysis) (ตาราง 32) พบว่า โปรตีน และพลังงาน ลดลงหลังจากการหมัก (9.23% และ 10.43 kcal/100g) ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (Amino acid profile) หลังจากการหมัก ได้แก่ Alanine, Glutamic acid, Histidine, Isoleucine, Leucine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine และ Valine ลดลง (ตาราง 33) แต่ในทางกลับกันกรดไขมัน โดยเฉพาะ Polyunsaturated fatty acid และ Unsaturated fat เพิ่มขึ้น อีกทั้ง Omega 6 และ 9 ของสไปรูลิน่าหลังจากการหมักตามระยะเวลาที่เหมาะสมนั้นมีค่าสูงขึ้น (168.3 และ 37.13 g/100g) (ตาราง 34)

ตาราง 32 Chemical composition of spirulina (SP) and fermented spirulina (FSP)

Item	SP	FSP	Differences
Dry matter <sup>1</sup>	90.55	84.64	-5.91
Ash <sup>1</sup>	10.45	9.31	-1.14
Crude fiber <sup>2</sup>	0.56	0.74	0.18
Crude Fat <sup>1</sup>	3.88	5.57	1.69
Protein <sup>1</sup>	51.13	41.90	-9.23
Energy (GE) <sup>3</sup>	3386	3292	-94.30

**Note:** <sup>1</sup>Dry matter, Ash, Crude Fat, Protein: AOAC (2019) (g\*100g); <sup>2</sup> Crude fiber: AOAC (2010) (g\*100g); <sup>3</sup>Energy: Journal of AOAC INTERNATIONAL;1993.p.106 (kcal/1kg)

ตาราง 33 Amino acids profile (mg/100g) of spirulina (SP) and fermented spirulina (FSP)

Item	SP	FSP	Differences
<b>Essential amino acid</b>			
Histidine	2281	1499	-782
Isoleucine	10207	7298	-2909
Leucine	8591	6159	-2432
Lysine	1151	878	-273
Methionine	1209	747	-462
Phenylalanine	6674	4601	-2073
Threonine	392	378	-14
Tryptophan	<20	<20	0
Valine	8868	5826	-3042
<b>Non-essential amino acid</b>			
Alanine	1576	1345	-231
Aspartic acid	738	1147	409

## ตาราง 33 (ต่อ)

Item	SP	FSP	Differences
Cystine	<20	<20	0
Glutamic acid	3242	4626	1384
Glycine	763	661	-102
Hydroxylysine	<20	<20	0
Hydroxyproline	<20	<20	0
Proline	555	508	-47
Serine	364	352	-12
Tyrosine	6743	4082	-2661

**Note:** Amino acids profile analysis In house method based on AOAC official Method 994.12,988.15 (2000) Detected by GC-MS

## ตาราง 34 Fatty acids composition (g/100g) of spirulina (SP) and fermented spirulina (FSP)

Item	SP	FSP	Differences
Lauric acid (C12:0)	ND	0.01	0.01
Lauric acid (C12:0)	ND	0.01	0.01
Palmitic acid (C16:0)	0.17	0.33	0.16
Palmitoleic acid(C16:1n7)	ND	0.02	0.02
Stearic acid (C18:0)	0.03	0.04	0.01
Saturated fat	0.22	0.4	0.18
cis-9-Oleic acid (C18:1n9c)	0.03	0.07	0.04
Monounsaturated fatty acid	0.04	0.1	0.06
cis-9,12-Linoleic acid (C18:2n6)	0.09	0.22	0.13
gamma-Linolenic acid (C18:3n6)	0.05	0.08	0.03
Polyunsaturated Fatty acid	0.15	0.32	0.17



ตาราง 34 (continue)

Item	SP	FSP	Differences
Unsaturated fat	0.19	0.42	0.23
Omega 6	146.13	314.47	168.34
Omega 9	29.8	66.93	37.13

**Note:** Fatty acids analysis In house method TE-CH-208 bases on AOAC (2012)

996.06

ตาราง 35 Pathogenic test in spirulina and fermented spirulina

Correlation on Test	Test result	method
Coliform bacteria	< 2.2 MPN/g	BAM 2013,Ch.4
<i>Escherichia coli</i> (E.coli)	ND	BAM 2013,Ch.4
<i>Salmonella spp.</i>	ND	ISO 65975/Cor1:2004

**Note:** ND = Not detect

#### 4.3 ผลการศึกษาการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ FSP ในสุกรหลังหย่านม

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และอัตราการเกิดท้องเสียของสุกรหย่านม หลังจากการเสริมผลิตภัณฑ์สไปรูลิน่าหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 (การทดลองที่2) เพื่อทำลายผนังเซลล์ของสไปรูลิน่าที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำเสียบ่อบำบัดไบโอแก๊สจากฟาร์มสุกร ที่ระดับทดแทนสูตรอาหารซารุค 80 เปอร์เซนต์ (การทดลองที่1) ซึ่งกระบวนการหมักจะมีกรดแลคติกจากเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 ทำหน้าที่ในการทำลายชั้นผนังเซลล์ของสไปรูลิน่า เพื่อให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในชั้นผนังเซลล์สไปรูลิน่าออกมาในระดับที่เหมาะสม และเป็นการเตรียมผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสมต่อการใช้ในสุกรวัยอ่อน เพื่อเป็นต้นแบบการผลิตและนำสารเสริมดังกล่าวไปทดสอบระดับการเสริมที่เหมาะสมต่อสมรรถภาพการผลิต การตอบสนองต่อลักษณะสัญญาณวิธาลำไส้ สุขภาพ และการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องภูมิคุ้มกัน โดยออกแบบการทดลองเป็น 6 กลุ่มการทดลอง

กำหนดให้ กลุ่มที่ 1 คือ อาหารควบคุม (CON) ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มทดลองแบบลบ และกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ (CAN) (antibiotic Octamux A.C. ; Colistin 400x 10<sup>6</sup> IU + Amoxycilin 100 กรัม/กิโลกรัม) จัดเป็นตัวแทนของกลุ่มทดลองแบบบวก เปรียบเทียบกับระดับการเสริมสารเสริมภูมิคุ้มกันจากสไปรูลิน่าหมัก โดยมีระดับของเสริม (FSP) 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ หรือ 0.5, 1, 1.5 และ 2% ในสูตรอาหาร โดยใช้สุกรหย่านมอายุ 21±0.5 วัน น้ำหนักหย่านม 5.8±0.5 กิโลกรัม ให้กินอาหารทดลองจำนวน 28 วัน ผลจากการทดลองพบว่าที่ระดับการเสริม 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารส่งผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ย ต่ำกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ( $P<0.05$ ) และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกลุ่มที่เสริมที่ระดับดังกล่าวสูงกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระดับ 5, 10 และ 15 กรัมต่ออาหารกิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างกันกับสูตรอาหารควบคุมและอาหารที่เสริมยาปฏิชีวนะ แต่มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตโดยรวมสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สไปรูลิน่าหมักที่ระดับสูงสุด ซึ่งสรุปเบื้องต้นได้ว่าการเสริมสไปรูลิน่าหมัก (FSP) ที่ระดับ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้นส่งผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสุกรหย่านม เมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราการเกิดท้องเสียในสุกรพบว่ากลุ่มที่เสริม 15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการเกิดท้องเสียน้อยกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ( $P<0.05$ ) การเกิดท้องเสียของสัปดาห์แรกหลังจากหย่านม กลุ่มที่เสริมระดับ 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีอัตราการเกิดท้องเสียน้อยกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ร่วมด้วยกับการบันทึกคะแนนมูลของสุกรโดยการบันทึกทรายคอก ลักษณะการถ่ายเหลวพบลักษณะมูลที่บ่งบอกถึงการเกิดอาการท้องเสียที่และการติดเชื้อแบคทีเรียค้อยข้างน้อย จึงสรุปได้ว่าการเสริมสไปรูลิน่าหมักนั้นไม่ส่งผลเชิงลบหรือเสี่ยงต่อการเกิดท้องเสีย อย่างไรก็ตามจะต้องศึกษาเชิงลึกถึงการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และสัณฐานวิทยาของลำไส้ เพื่อพิจารณาเลือกระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในสุกรหย่านมต่อไป (ตาราง 36)

การประเมินสัณฐานวิทยาลำไส้ประกอบด้วยความสูงของวิลลัส (Villus height; VH;  $\mu\text{m}$ ) ความกว้างของวิลลัส (Villous wide; VW;  $\mu\text{m}$ ) พื้นที่ของวิลลัส (Villous surface area; VSA;  $\text{mm}^2$ ) ความลึกของคริปต์ (Cryptal depth; CD;  $\mu\text{m}$ ) และอัตราส่วนของวิลลัสต่อความลึกของคริปต์ (Villous height : crypt depth; VH:CD) เป็นดัชนีชี้วัดด้านความสมบูรณ์ของลำไส้ สุขภาพลำไส้ และประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารในระบบทางเดินอาหารนำไปใช้ เปลี่ยนเป็นโภชนะต่อการเจริญเติบโต และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสุกรหลังจากหย่านม จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้เล็กของสุกรช่วงหย่านมต่อการเสริม FSP ในส่วนของลำไส้เล็กส่วนต้น (Duodenum) ที่ระดับ FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัม CD มีแนวโน้มที่ระดับ 15 กรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสูงสุด ( $P<0.05$ ) ระดับการเสริม FSP 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม VH:CD สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ๆ

และ VH, VW และ VSA นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) สำหรับลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็ก ส่วนกลาง (Jejunum) การเสริม FSP ที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัม VH และ VSA มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริม 15 กรัมต่อกิโลกรัม แต่การเสริมในระดับนี้ส่งเสริมให้ VH, VH:CD, VW และ VSA สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นเช่นกัน ( $P < 0.05$ ) ส่วน CD ต่ำในกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ ( $P < 0.05$ ) สำหรับที่ระดับการเสริม FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัม VH:CD และ VW มีแนวโน้มใกล้เคียงกับที่ระดับการเสริม FSP 15 - 20 กรัมต่อกิโลกรัม ( $P < 0.05$ ) ส่วนลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนปลาย VH และ VSA ของกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ๆ ส่วน CD ต่ำสุดในกลุ่มที่เสริม FSP 15 กรัมต่อกิโลกรัม ในทางกลับกันที่ระดับการเสริม FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัม CD มีค่าสูงสุด ( $P < 0.05$ ) และกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริม FSP ระดับ 15 กรัมต่อกิโลกรัม ( $P < 0.05$ ) และ VH:CD ของกลุ่มอาหารควบคุมและใช้ยาปฏิชีวนะมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริมระดับ 15 กรัมต่อกิโลกรัม ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กต่อการเสริม FSP ในระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้อาหารควบคุม และกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ ร่วมพิจารณาจากสมรรถภาพการเจริญเติบโตของสุกรกับสัญญาณวิทยาลำไส้เน้นการเสริมที่ระดับ 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมให้ผลเชิงบวก สามารถสรุปได้ว่าการเสริม FSP สามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ (ตาราง 37)

ตาราง 36 Effect of fermented spirulina (FSP) supplementation on growth performance of weaned pigs

Items	Treatment							SEM	P-value
	CON	CAN*	FSP1	FSP2	FSP3	FSP4	FSP4		
Number of pig	8	8	8	8	8	8	8		
Initial weight, kg	5.89	5.85	5.88	5.88	5.90	5.90	6.37	0.09	0.511
Body weight at 14 day ,kg	9.75	9.07	9.66	9.63	9.70	9.70	9.21	0.14	0.657
Body weight at 28 day, kg	16.04	15.57	15.58	15.67	15.54	15.54	14.74	0.20	0.593
Weight gain, kg									
0-14 day	3.80 <sup>a</sup>	3.22 <sup>ab</sup>	3.78 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	3.80 <sup>a</sup>	3.80 <sup>a</sup>	2.84 <sup>b</sup>	0.11	0.037
14-28 day	6.29 <sup>ab</sup>	6.50 <sup>a</sup>	5.92 <sup>ab</sup>	6.04 <sup>ab</sup>	5.84 <sup>ab</sup>	5.84 <sup>ab</sup>	5.53 <sup>b</sup>	0.11	0.012
0-28 day	10.15 <sup>a</sup>	9.72 <sup>a</sup>	9.70 <sup>a</sup>	9.79 <sup>a</sup>	9.64 <sup>a</sup>	9.64 <sup>a</sup>	8.37 <sup>b</sup>	0.16	0.037
Average Daily Gain (ADG, g)									
0-14 day	275.82 <sup>a</sup>	229.94 <sup>ab</sup>	270.05 <sup>a</sup>	267.58 <sup>a</sup>	271.37 <sup>a</sup>	271.37 <sup>a</sup>	203.02 <sup>b</sup>	7.99	0.037
14-28 day	449.18 <sup>ab</sup>	464.56 <sup>a</sup>	423.08 <sup>ab</sup>	431.59 <sup>ab</sup>	417.03 <sup>ab</sup>	417.03 <sup>ab</sup>	395.05 <sup>b</sup>	7.86	0.012
0-28 day	362.50 <sup>a</sup>	347.25 <sup>a</sup>	346.57 <sup>a</sup>	350.96 <sup>a</sup>	344.20 <sup>a</sup>	344.20 <sup>a</sup>	299.04 <sup>b</sup>	5.85	0.034

ตาราง 36 (continue)

Items	Treatment					SEM	P-value	
	CON	CAN*	FSP1	FSP2	FSP3			FSP4
Average Daily Feed intake (ADFI, g)								
0-14 day	295.85 <sup>a</sup>	282.84 <sup>a</sup>	299.90 <sup>a</sup>	310.36 <sup>a</sup>	287.34 <sup>a</sup>	234.94 <sup>b</sup>	6.46	0.026
14-28 day	880.11 <sup>a</sup>	873.29 <sup>a</sup>	821.16 <sup>ab</sup>	826.45 <sup>ab</sup>	784.71 <sup>ab</sup>	736.96 <sup>b</sup>	13.55	<0.001
0-28 day	587.99 <sup>a</sup>	578.07 <sup>a</sup>	560.53 <sup>a</sup>	568.40 <sup>a</sup>	536.03 <sup>a</sup>	463.88 <sup>b</sup>	10.14	<0.001
Feed efficiency (%FE)								
0-14 day	0.91 <sup>a</sup>	0.79 <sup>b</sup>	0.88 <sup>ab</sup>	0.85 <sup>ab</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.88 <sup>ab</sup>	0.013	0.039
14-28 day	0.51	0.53	0.52	0.52	0.54	0.54	0.052	0.631
0-28 day	0.61 <sup>ab</sup>	0.59 <sup>b</sup>	0.62 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>ab</sup>	0.64 <sup>ab</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.067	0.110

**Note:** <sup>a,b</sup> Means within a row with different lowercase letters show significant differ ( $P \leq 0.05$ )

CON = Control diet, CAN = CON + Antibiotic, FSP 1-4 = Control diet supplemented with fermented spirulina at 5 (FSP1), 10 (FSP2), 15 (FSP3) and 20 (FSP4) g/kg diet, respectively. \* antibiotic (Octamux A.C. ; Colistin 400x 106 IU+Amoxicillin 100g /kg) Ues 3 kg/ton.

ตาราง 36 (continue)

Items	Treatment							SEM	P-value
	CON	CAN*	FSP1	FSP2	FSP3	FSP4			
Total number of pigs	7	7	7	7	7	7	7		
Pig diarrhea score									
0-14 day	0.65	0.67	0.44	0.72	0.57	0.56	0.05	0.647	
14-28 day	0.07	0.14	0.14	0.22	0.10	1.20	0.17	0.357	
0-28 day	0.36	0.41	0.29	0.48	0.34	0.88	0.08	0.343	
% Diarrhea									
0-14 day	29.05 <sup>a</sup>	30.95 <sup>a</sup>	20.48 <sup>b</sup>	33.81 <sup>a</sup>	20.95 <sup>b</sup>	26.19 <sup>ab</sup>	2.14	0.032	
14-28 day	3.57 <sup>b</sup>	7.14 <sup>b</sup>	7.65 <sup>b</sup>	11.22 <sup>a</sup>	5.10 <sup>b</sup>	9.18 <sup>a</sup>	1.47	0.033	
0-28 day	16.31 <sup>ab</sup>	19.05 <sup>a</sup>	14.07 <sup>b</sup>	22.52 <sup>a</sup>	13.03 <sup>b</sup>	17.69 <sup>b</sup>	1.47	0.026	

**Note:** <sup>a,b</sup> Means within a row with different lowercase letters show significant differ ( $P \leq 0.05$ )

CON = Control diet, CAN = CON + Antibiotic, FSP 1-4 = Control diet supplemented with fermented spirulina at 5 (FSP1), 10 (FSP2), 15 (FSP3) and 20 (FSP4) g/kg diet, respectively. \* antibiotic (Octamux A.C. ; Colistin 400x10<sup>6</sup> IU+Amoxicillin 100g/kg) Ues 3 kg/ton.

ตาราง 37 Effect of fermented spirulina (FSP) supplementation on Small intestinal histomorphology of weaned pigs

Small intestinal histomorphology	CON	CAN*	FSP1	FSP2	FSP3	FSP4	SEM	P-value
Duodenum								
Villous height ( $\mu\text{m}$ )	599.16	552.39	608.06	582.78	583.66	547.30	10.08	0.449
Villous wide ( $\mu\text{m}$ )	169.84	173.84	179.55	186.59	179.51	168.47	2.93	0.499
Villous surface area ( $\text{mm}^2$ )	342.87	326.94	369.41	369.07	356.75	313.22	9.94	0.515
Cryptal depth ( $\mu\text{m}$ )	313.75 <sup>ab</sup>	332.01 <sup>a</sup>	305.00 <sup>ab</sup>	228.17 <sup>cd</sup>	210.00 <sup>d</sup>	271.82 <sup>bc</sup>	10.52	0.000
Villous height : crypt depth	1.97 <sup>bc</sup>	1.70 <sup>c</sup>	2.06 <sup>b</sup>	2.63 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>	2.12 <sup>b</sup>	0.09	0.000
Jejunum								
Villous height ( $\mu\text{m}$ )	581.43 <sup>bc</sup>	483.02 <sup>d</sup>	521.10 <sup>cd</sup>	552.97 <sup>bcd</sup>	676.25 <sup>a</sup>	614.87 <sup>ab</sup>	14.484	0.000
Villous wide ( $\mu\text{m}$ )	142.16 <sup>bc</sup>	130.13 <sup>c</sup>	156.26 <sup>ab</sup>	156.83 <sup>ab</sup>	167.85 <sup>a</sup>	163.07 <sup>a</sup>	3.233	0.001
Villous surface area ( $\text{mm}^2$ )	275.33 <sup>bc</sup>	212.89 <sup>c</sup>	275.38 <sup>bc</sup>	295.34 <sup>b</sup>	379.52 <sup>a</sup>	335.69 <sup>ab</sup>	12.291	0.000
Cryptal depth ( $\mu\text{m}$ )	213.59 <sup>b</sup>	187.38 <sup>c</sup>	217.82 <sup>b</sup>	217.68 <sup>b</sup>	250.34 <sup>a</sup>	216.48 <sup>b</sup>	4.651	0.002
Villous height : crypt depth	2.80 <sup>a</sup>	2.60 <sup>ab</sup>	2.39 <sup>b</sup>	2.63 <sup>ab</sup>	2.76 <sup>a</sup>	2.90 <sup>a</sup>	0.049	0.034

**Note:** <sup>a,b</sup> Means within a row with different lowercase letters show significant differ ( $P \leq 0.05$ )

CON = Control diet, CAN = CON + Antibiotic, FSP 1-4 = Control diet supplemented with fermented spirulina at 5 (FSP1), 10 (FSP2), 15 (FSP3) and 20 (FSP4) g/kg diet, respectively. \* antibiotic (Octamux A.C. ; Colistin 400x 106 IU + Amoxycilin 100g /kg) Ues 3 kg/ton.

ตาราง 37 (continue)

Small intestinal histomorphology	CON	CAN*	FSP1	FSP2	FSP3	FSP4	SEM	P-value
Ileum								
Villous height ( $\mu\text{m}$ )	540.20 <sup>a</sup>	464.54 <sup>b</sup>	485.81 <sup>b</sup>	489.95 <sup>b</sup>	464.89 <sup>b</sup>	460.30 <sup>b</sup>	7.065	0.002
Villous wide ( $\mu\text{m}$ )	149.39	147.18	154.48	141.19	136.03	156.21	2.676	0.221
Villous surface area ( $\text{mm}^2$ )	271.65 <sup>a</sup>	231.55 <sup>ab</sup>	254.87 <sup>ab</sup>	233.45 <sup>ab</sup>	213.23 <sup>b</sup>	245.12 <sup>ab</sup>	5.929	0.050
Cryptal depth ( $\mu\text{m}$ )	231.74 <sup>ab</sup>	201.16 <sup>cd</sup>	228.34 <sup>abc</sup>	247.31 <sup>a</sup>	193.12 <sup>d</sup>	210.39 <sup>bcd</sup>	4.989	0.005
Villous height : crypt depth	2.36 <sup>ab</sup>	2.40 <sup>ab</sup>	2.18 <sup>bc</sup>	2.07 <sup>c</sup>	2.47 <sup>a</sup>	2.22 <sup>abc</sup>	0.042	0.035

**Note:** <sup>a,b</sup> Means within a row with different lowercase letters show significant differ ( $P \leq 0.05$ )

CON = Control diet, CAN = CON + Antibiotic, FSP 1-4 = Control diet supplemented with fermented spirulina at 5 (FSP1), 10 (FSP2), 15 (FSP3) and 20 (FSP4) g/kg diet, respectively. \* antibiotic (Octamux A.C.; Colistin 400x 106 IU+Amoxycilin 100g /kg) Ues 3 kg/ton.



#### 4.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ และ IL-12p40 ในเนื้อเยื่อม้าม (spleen) และลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) ด้วยเทคนิค quantitative PCR (qPCR)

จากคุณสมบัติส่วนของงานวิจัยคาดว่า การเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกในสุกรหย่านม มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังเป็นอาหารของจุลินทรีย์หรือโปรไบโอติกภายในระบบทางเดินอาหารของสุกรได้ จากการประเมินการเปลี่ยนแปลงไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของสุกร โดยการศึกษาการตอบสนองต่อสภาวะอักเสบภายในเซลล์ และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารส่วนปลาย จากการศึกษาจากการทดลองที่ 3 โดยการตรวจสอบการตอบสนองของไซโตไคน์ ซึ่งพบว่าสารเสริมชนิดนี้สามารถยับยั้งการเกิดสภาวะอักเสบ (anti-inflammatory) หรือ การเกิดสภาวะอักเสบ (proinflammatory cytokines) เนื่องจากไซโตไคน์จะการตอบสนองในระดับต่ำถึงกลางในสภาวะปกติ ฉะนั้นเพื่อต้องการศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  และ IL-12p40 ในเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลาง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ร่างกายดูดซึมโภชนาที่ดีที่สุด และบริเวณนี้เป็นจุดที่ร่างกายมีการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในและภายนอกด้วยการใช้สารสื่อทางระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนม้าม เป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยตรง โดยทั่วไปสภาวะที่มีการติดเชื้อ Cytokines ที่หลั่งออกมาจะอยู่ในกลุ่มของ IL-1, TNF และ IFN สภาวะนี้จะมีประโยชน์ต่อเนื้อเยื่อของต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Gut Associated Lymphoid Tissues ; GALT) และสมดุลของภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือก (Mucosal immunity) บริเวณผิวหนังลำไส้ หรือ แม้กระทั่งการตอบสนองของ IL-10 และ IL12p40 ในม้าม เมื่อสุกรติดเชื้อแบคทีเรีย หรือไวรัสเข้าไปในกระแสเลือด ปัจจัยที่กล่าวมานั้นมีความเกี่ยวข้องและเชื่อมโยงกันระหว่างสารเมือกบริเวณผิวหนังลำไส้ และเซลล์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์และตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ที่จำเพาะเจาะจงต่อการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ เช่น การเพิ่มขึ้นความสูงของวิลโลส ลดความลึกของคริปต์ และเพิ่มจำนวนกอบเลตเซลล์ (goblet cell) ต่อวิลลัส (Villus) ซึ่งการศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  และ IL-12p40 โดยใช้เทคนิค quantitative PCR (qPCR) วิเคราะห์การแสดงออกของไซโตไคน์ด้วยสูตร Relative normalized expression  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  เปรียบเทียบกับควบคุมที่กำหนดให้มีค่าเท่ากับ 1 ต่อระดับปริมาณการแสดงออกของไซโตไคน์ Cyclophilin A ซึ่งเป็นยีนประจำถิ่น หรือ housekeeping genes แสดงผลใน ตาราง 38 และ 50 การแสดงออกของไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-12(p40) เมื่อเปรียบเทียบกับ Cyclophilin A โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมด้วยการประเมินการตอบสนองต่อวัคซีนปาก และทำเปื่อยสุกร และวัคซีน Porcine Circovirus (PCV) จากเนื้อเยื่อ

ลำไส้เล็กส่วนกลาง และม้าม พบว่า IL-1 $\beta$  ของกลุ่มการทดลองที่เสริม FSP 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม (FSP2-3) แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) TNF- $\alpha$  ของกลุ่มที่เสริม FSP 20 กรัมต่อกิโลกรัม (FSP4) แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม (CON) ( $P<0.05$ ) ส่วน IL-12(p40) ของ กลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ (CAN) แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) และ กลุ่มเสริม FSP 5, 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัม (FSP1-3) แสดงออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 23 และ 24 ส่วนเนื้อเยื่อม้ามพบว่า IL-1 $\beta$  ของกลุ่ม FSP1, 3 และ 4 แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) TNF- $\alpha$  ของกลุ่ม CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON ( $P<0.05$ ) ส่วน IL-12(p40) ของกลุ่ม FSP2-3 แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) และกลุ่ม FSP4 แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON ( $P<0.05$ ) สำหรับการฉีดวัคซีน FMD ซีโรไทป์ (O และ A) (ครั้งที่ 1) และ PCV2 ของสุกรช่วง 28 วันหลังจากหย่านมศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เสริม CAN และ FSP พบว่า TNF- $\alpha$ , IL-12(p40) และ IL-1 $\beta$  แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม และสูงขึ้นตามลำดับของระดับการเสริม FSP ของเนื้อเยื่อม้าม จึงจัดไซโตไคน์เหล่านี้เป็น Pro-inflammatory cytokines ที่สามารถกระตุ้นการดำเนินสิ่งแปลกปลอม ยับยั้งการเกิดการอักเสบ จากนั้นปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันจากการกระตุ้นการทำงานของแอนติเจน และกระจายวัคซีนไปยังเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม สำหรับการแสดงออกของ TNF- $\alpha$  ในกลุ่ม CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON และ FSP1-4 ( $P<0.05$ ) เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงช่วงก่อนและหลัง 3 วันของการฉีดวัคซีนในสุกรไม่ควรผสมยาปฏิชีวนะลงในอาหาร เนื่องจากการแสดงออกของไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าปกติจะมีส่วนในการกดทับการทำงานของวัคซีน ดังแสดงในภาพ 25 และ 26

ตารางที่ 38 Effect of relative normalized expression of cytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-12 p40) in Jejunum and spleen tissue of weaning pig

Cytokine	Tissue	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	T-test (2- $\Delta\Delta$ Ct)*					
		CON	CAN	FSP1	FSP2	FSP3	FSP4		T2xT1	T3xT1	T4xT1	T5xT1	T6xT1	
IL-1 $\beta$	Jejunum	1	5.15	2.05	4.98	4.23	0.88	0.562	0.096	0.315	<b>0.023</b>	<b>0.012</b>	0.652	
	spleen	1	0.56	0.36	3.12	5.16	5.42	0.586	0.083	<b>0.000</b>	0.080	<b>0.000</b>	0.129	
TNF- $\alpha$	Jejunum	1	2.48	3.30	1.38	2.21	3.52	0.425	0.218	0.293	0.387	0.211	<b>0.001</b>	
	spleen	1	5.12	1.78	2.94	3.92	4.77	0.639	<b>0.025</b>	0.208	0.319	0.173	0.119	
IL-12 p40	Jejunum	1	0.306	0.144	0.130	0.162	1.036	0.111	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.946	
	spleen	1	2.570	2.140	2.967	3.770	6.232	0.402	0.135	0.090	<b>0.047</b>	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	

**Note:** \* Independent T-Test of confidence interval percentages 90, 95 and 99.9% use specified values T2xT1, T3xT1, T4xT1, T5xT1 and T6xT1

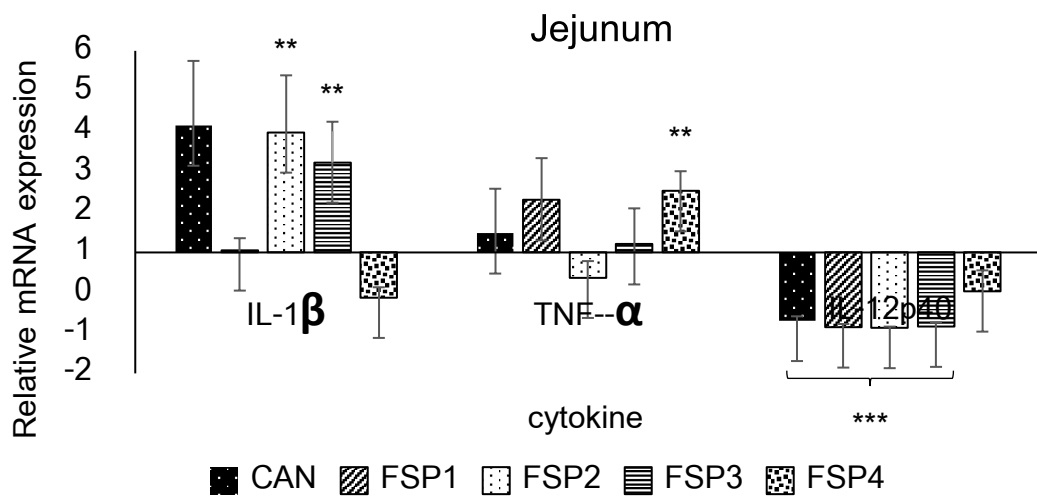


Figure 23 The effect of the FSP supplementation on the relative mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 in jejunum tissue

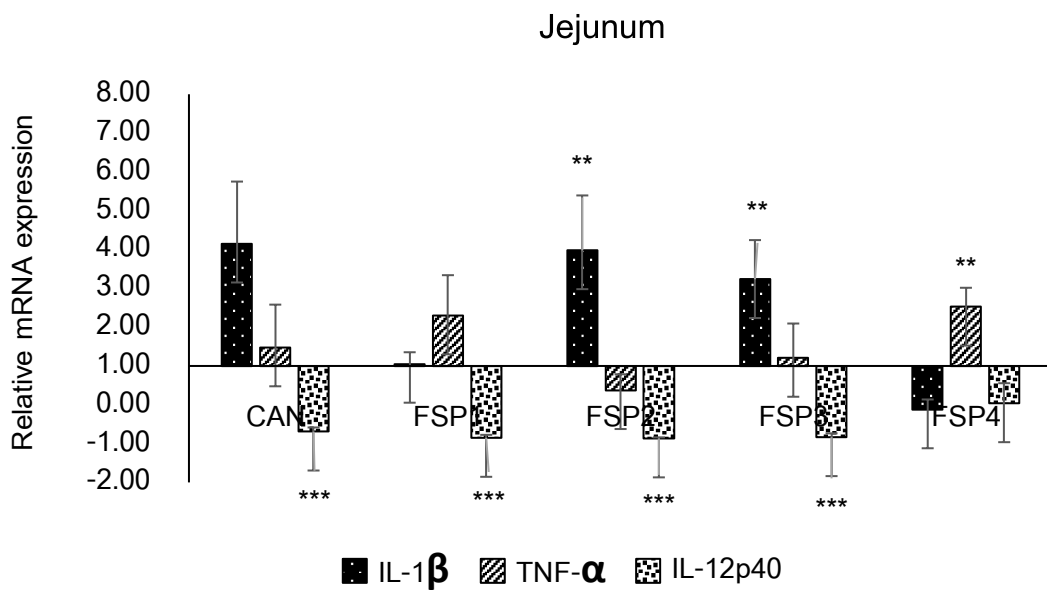
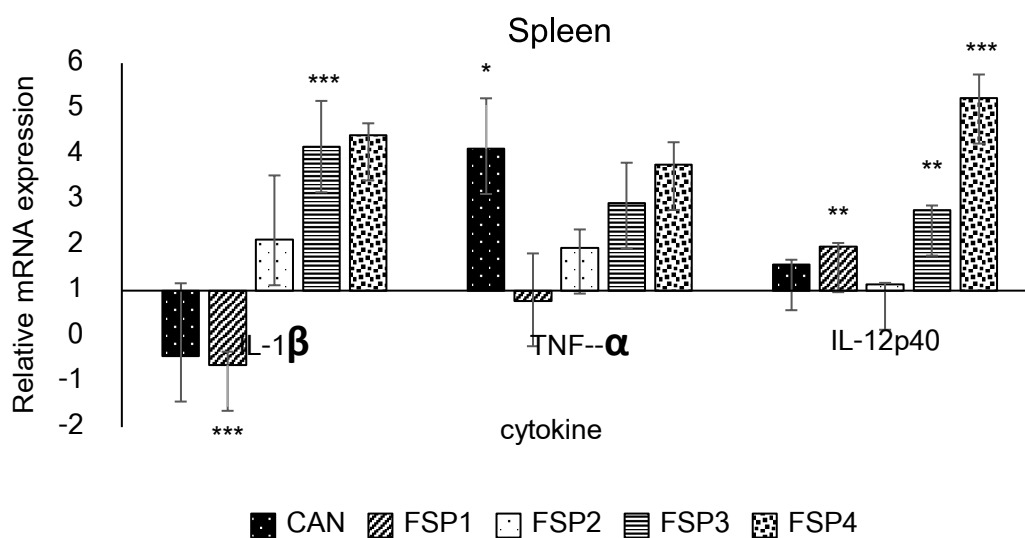
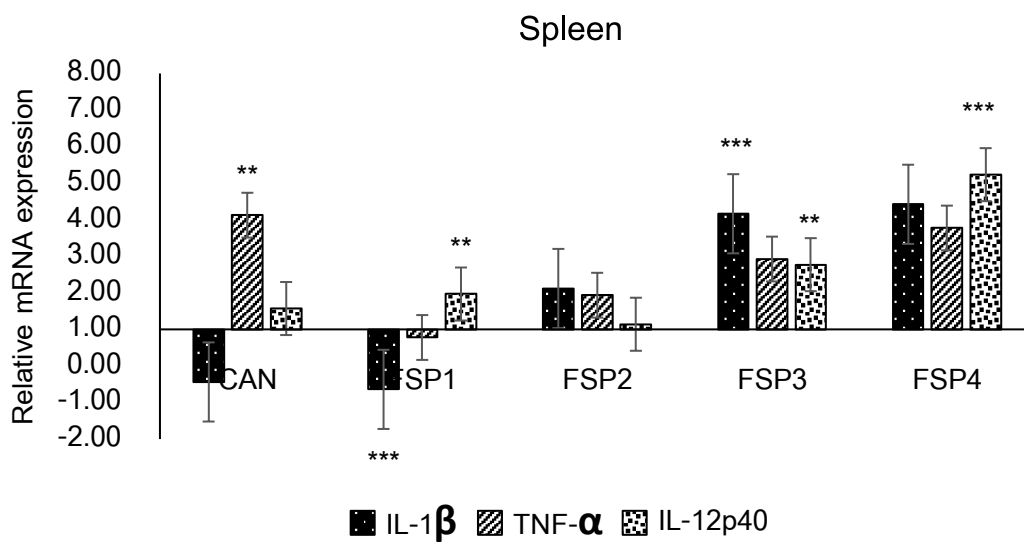


Figure 24 The relative mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 in jejunum tissue of pig fed diet FSP supplementation

Note: \*\*\*\* Comparison of different men to relative normalized expression between experiment group and the control group. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ )



ภาพ 25 The effect of the FSP supplementation the relative mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 in spleen tissue



ภาพ 26 The relative mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 in spleen tissue of pig fed diet FSP supplementation

Note: \*\*\*\* Comparison of different men to relative normalized expression between experiment group and the control group. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ )

## บทที่ 5

### บทสรุป

#### 5.1 อภิปรายผล

5.1.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนาต่อการใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกรทดแทนการใช้สูตรอาหารสูตรซารูก (Zarrouk's medium)

การใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกรเพื่อทดแทนสูตรอาหารซารูกสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยการทดแทนน้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย บ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝัง ประเภทของแหล่งน้ำมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับค่าเป็นกรด-ด่าง โดยทั่วไประดับของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนามีค่าเท่ากับ  $10 \pm 0.1$  เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 3 วัน การใช้น้ำเสียจากฟาร์มสุกรเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างสูงถึง  $10.5 \pm 0.4$  ซึ่งสูงกว่าการทดลองการใช้น้ำหมักเศษเหลือข้าวโพดอาหารสัตว์กำหนดอยู่ที่  $10 \pm 0.1$  สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนา (ณัฐพร จันทรฉาย และ จุฑารัตน์ สนธิรอด, 2561) แต่แตกต่างกับการใช้น้ำเสียจากฟาร์มสุกรเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Phormidium sp.* พบว่าระดับการใช้น้ำเสียที่สูงถึง 80 และ 100% ส่งผลให้ค่า pH เพิ่มขึ้น 0.9 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ 0% โดยที่การเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำของชุดการทดลองที่เลี้ยงทดแทนด้วยน้ำเสียฟาร์มสุกรดังกล่าวเกิดจากกระบวนการการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย จะต้องใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำเสียเมื่อใช้หมดจะเกิดกระบวนการ Buffer system ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบความเป็นต่างจากไบคาร์บอน มาเป็นคาร์บอเนต และไฮดรอกไซด์ ตามลำดับ และการนำไนเตรทและไนไตรท์เข้าสู่เซลล์ของสาหร่ายโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในน้ำเพิ่มสูงขึ้น (สามารถ พิงเจริญ, 2550) สอดคล้องกับ อารง ประเสริฐรติ (2539) ได้สรุปว่าน้ำจากบ่อ CT มีปริมาณแอมโมเนียสูงถึง 302 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากงานทดลองนี้ได้เลือกการฆ่าเชื้อน้ำเสียฟาร์มสุกรด้วยวิธีการกรอง พักน้ำ และใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) ซึ่งทำให้ผลปริมาณแอมโมเนียและค่าเป็นกรด-ด่างของน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยไม่สอดคล้องกับการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต้มหรือใช้ความร้อน (จงกล พรมยะ และคณะ, 2535) อาจส่งผลต่อปริมาณแอมโมเนียส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสไปรูลีนา ซึ่งสารอาหารที่มีอยู่ในน้ำเสีย และมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ แอมโมเนีย ไนเตรท และไนเตรท โดยแอมโมเนียจะถูก

สาหร่ายนำไปใช้ก่อน ไนเตรท ส่วนไนเตรทสาหร่ายต้องการในปริมาณน้อย หรืออาจไม่ใช้เลย สำหรับ ไนเตรทนั้นสาหร่ายนำไปใช้โดยการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ และแอมโมเนียเป็นส่วนสุดท้ายที่สามารถจะนำไปใช้ได้ (จกกล พรมยะ และขจรเกียรติ แซ่ตัน. 2548) เนื่องจากแอมโมเนียจะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นไนเตรทผ่านปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ซึ่งสภาวะดังกล่าวของน้ำบ่อ CT มีปริมาณแอมโมเนียมากเกินไป น้ำจากแหล่งดังกล่าวจึงไม่เอื้อทำให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น ทำให้สาหร่ายในชุดการทดลองของการทดแทน 60 และ 80% จากน้ำบ่อ CT หยุดการเจริญเติบโตตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับผลการทดลองของ อารัง ประเสริฐโรติ (2539) ที่ทำการศึกษากการบำบัดน้ำเสียจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลสุกรโดยใช้สาหร่าย *Chlorella* sp พบว่าทุกชุดการทดลองค่า pH เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 8.5-11.3 สอดคล้องกับงานวิจัย จกกล พรมยะ และคณะ (2543 และ 2552) รายงานว่าสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลสุกรมีแอมโมเนียตลอดการทดลอง 0.05-71.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของไนเตรทตลอดการทดลองมีค่าเท่ากับ 0.01-1.51 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสไปรูลิน่า เมื่อนำน้ำเสียจากทั้ง 3 แหล่งมาทดแทนการใช้สูตรอาหารซารูคจะส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างในน้ำสูงขึ้นสรุปได้ว่าการทดลองทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยสารอินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกร ในบ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝัง ระดับการทดแทนที่ระดับสูงสุด 80% ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

5.1.2 การเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ (Optical Density; OD) ของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกรทดแทนการใช้สูตรอาหารสูตรซารูค (Zarrouk's medium)

การตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ในน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสียของกลุ่มที่ทดแทน 60 และ 80% ไม่สามารถตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์ได้เนื่องจากตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลองสาหร่ายสไปรูลิน่าหยุดการเจริญเติบโต ส่วนกลุ่มที่ ทดแทน 40% การตรวจวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนน้ำเสียจากบ่อฝังที่ระดับการทดแทน 40, 60 และ 80% พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสามารถใช้น้ำเสียจากบ่อฝังทดแทนสูตรอาหารซารูคได้มากถึง 80% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการใช้น้ำจากบ่อไบโอแก๊สทดแทนสูตรอาหารซารูคที่ระดับ 80% ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นของเซลล์ แต่มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ทดแทนที่ระดับ 0, 40 และ 60% ( $P < 0.05$ ) โดยการใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า 0-24 วัน พบว่าค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ตาราง 13 และ 15) ร่วมด้วยกับการ

เจริญเติบโตของสาหร่ายที่เพิ่มขึ้น โดยเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งสรุปได้ว่าการตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์จากน้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยการทดแทนน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝั่ม สามารถเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าให้เจริญเติบโตได้ถึง 24 วัน โดยที่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นดัชนีวัดการเจริญเติบโตและความสัมพันธ์ของความหนาแน่นของเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่ายอีกด้วยซึ่งสอดคล้องกับ ญัฐพร จันท์ฉาย และ จุฑารัตน์ สนธิรอด, (2561)

5.1.3 การเปลี่ยนแปลงคลอโรฟิลล์ เอ และ แคโรทีนอยด์ ของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกรทดแทนการใช้สูตรอาหารซารุค (Zarrouk's medium)

การตรวจวัดปริมาณรงควัตถุที่สำคัญคือ แคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่เป็นสาร สีเหลือง ส้ม แดง และส้ม-แดง ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช และกลุ่มของสาหร่าย ทำหน้าที่ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสง รวมถึงทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียว ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์ เพื่อการสังเคราะห์แสงและช่วยการเจริญเติบโตของสไปรูลิน่าจากการทดลองไม่การทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย ตั้งแต่วันที่ 6 ที่ระดับ 60-80 % ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และ แคโรทีนอยด์มีค่าต่ำกว่าที่ระดับการทดแทน 40% และกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) แต่วันที่ 9 เป็นต้นไปของกลุ่มการทดแทนดังกล่าว สาหร่ายสไปรูลิน่าหยุดการเจริญเติบโต ซึ่งจากการศึกษาของ สามารถ พิงเจริญ (2550) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในน้ำเสียจากฟาร์มสุกร พบว่าความเข้มข้นของน้ำเสียจากการทดแทน 20% หลังจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเริ่มต้น 39.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 3.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งลดลง 71% ในวันที่ 18 ส่วนชุดการทดแทน 60% มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 98 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยลดลงมาถึง 73 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ส่วนชุดการทดแทน 80% มีค่าแอมโมเนียเริ่มต้น 103 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 41 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดลงถึง 62 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 สำหรับการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย บ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝั่ม ต่อการทดแทนสูตรอาหารซารุค แหล่งน้ำเหล่านี้มีอินทรีย์วัตถุมากพอให้สาหร่ายสไปรูลิน่าใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ จากการตรวจวัดน้ำเสียจากบ่อหมักน้ำทิ้งฟาร์มเลี้ยงสุกรวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากบ่อรวมน้ำเสีย, บ่อไบโอแก๊ส และ บ่อฝั่ม ตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัส (199.58, 22.85, 22.62 mg/l) แอมโมเนีย (11.94, 1.20, 7.41 mg/l) ไนโตรเจน (0.30, 43.91, 45.55 mg/l) ไนเตรท (0.15, 18.65, 14.48 mg/l) และสภาพต่างร่วม (Alkaline; mg/l as CaCO<sub>3</sub>) 1892, 192, 932) ตามลำดับ (ฐิติมา บุญเกิด และฐิติชญา วงศ์ปิงค์ (2561) โดยสอดคล้องกับ สามารถ พิงเจริญ (2550) ได้สรุปสารอาหารในน้ำเสียฟาร์มสุกร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โปแทสเซียม ในรูปของ ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO<sub>3</sub>-N) ฮอโรฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (PO<sub>4</sub>-P) และแอมโมเนีย-ไนโตรเจน



(NH<sub>3</sub>-N) อยู่ที่ 29.5-52, 250-380 และ 162-302 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาข้อมูลดังกล่าว การทดแทนน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูงสาหร่ายสไปรูลิน่าไม่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียได้ในช่วงแรก ยิ่งไปกว่านั้นในน้ำที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่ามีปริมาณแอมโมเนียสูงมากส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย ร่วมด้วยสภาวะความเป็นกรด-ด่างสูง

การตรวจวัดการเจริญเติบโตสไปรูลิน่าในน้ำจากบ่อรวมน้ำเสียทดแทนสูตรอาหารซารุคที่ระดับ 60 และ 80% น้ำแหล่งนี้ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการหมักในระบบบำบัดน้ำเสีย ของระบบหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนฟาร์มสุกร เพื่อดึงเอาก๊าซมีเทนไปใช้ผลิตพลังงานไฟฟ้า โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 45 วัน แหล่งน้ำเสียนี้มีปริมาณแอมโมเนีย 302 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสภาวะดังกล่าวของน้ำบ่อรวมน้ำเสียไม่ได้เอื้อให้เกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันได้ดีกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ซึ่งเกิดจากระดับความเป็นกรด-ด่างสูง และแอมโมเนียที่อยู่ในรูปของแอมโมเนียอิสระที่สามารถสูญเสียไปจากระบบในรูปแบบก๊าซได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นเกิดจากการใช้น้ำเสียที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตสาหร่ายสไปรูลิน่า เวลาผ่านไปเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นจะช่วยให้เกิดปฏิกิริยา และบดบังแสงกันเองของเซลล์สาหร่ายและปริมาณสารอาหารที่อยู่ในน้ำเสียเริ่มลดลง จนเป็นปัจจัยส่งเสริมให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ ในสภาวะของแหล่งอินทรีย์วัตถุที่มีแอมโมเนียในระดับกลางอีกทั้งที่ระดับการทดแทน 40% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เลี้ยงด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส ของวันแรกถึงวันที่ 9 กลุ่มทดลองที่ทดแทนสูตรอาหารซารุค 60 และ 80% ค่าสูงกว่ากลุ่มที่ทดแทน 40% และกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) แต่หลังจากวันที่ 9 ถึง 24 ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับการทดแทนสูตรอาหารซารุคด้วยน้ำเสียจากบ่อฝิ่งที่ระดับการทดแทน 40% สรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ ในน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส และน้ำจากบ่อฝิ่ง สามารถทดแทนสูตรอาหารซารุคได้มากถึง 80% โดยที่ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของวันที่ 24 ในกลุ่มที่ใช้น้ำจากบ่อไบโอแก๊ส ระดับการทดแทน 80% มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ 9.517 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทดแทน 40 และ 60% มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ 4.122, 5.781 และ 7.965 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

5.1.4 การเปลี่ยนแปลงไฟโคไซยานิน, ไฟโคอิทริน และอัลโลไฟโคไซยานินของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสียฟาร์มสุกรทดแทนการใช้สูตรอาหารสูตรซารุค

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน หรือไซยาโนแบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรแคริโอต (prokaryote) จัดอยู่ในดิวิชัน “Cyanophycophyta” มีคุณลักษณะและคุณสมบัติหลายประการ แตกต่างไปจากสาหร่ายอื่น ๆ เช่น รังควัตถุไม่ได้อยู่ในพลาสทิก แต่จะกระจายอยู่ทั่วไปใน

ไซโตพลาสซึม (กาญจนกาซัน ลีวมโนมนต์, 2527) สาหร่ายที่อยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีการสะสมอาหารในรูปไกลโคเจนภายในเซลล์ ประกอบด้วยรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ ซึ่งทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสง (วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) และไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins, PBPs) ยึดอยู่บริเวณผนังด้านนอกของไทลาคอยด์ ทำหน้าที่ในการเก็บแสงที่สาหร่ายเพื่อนำไปใช้สำหรับการสังเคราะห์แสง ไฟโคบิลิโปรตีน เป็นโมเลกุลที่ละลายน้ำได้ เกิดจากการรวมกันของ ซี-ไฟโคไซยานิน, แอลโลไฟโคไซยานิน, ซี-ไฟโคอิริทริน และไฟโคอิริโทรไซยานิน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณไฟโคไซยานินตามธรรมชาติของสาหร่ายแต่ละชนิดมีปริมาณไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุของสาหร่าย ความเข้มแสง คุณภาพ และเงื่อนไขการเจริญเติบโต เช่น ในสาหร่าย *Arthrospira (Spirulina) platensis* หรือสาหร่ายสไปรูลินามีไฟโคไซยานินคิดเป็นร้อยละ 40 ของโปรตีน (Ajayan et al., 2012) จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินาจากการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานิน, ไฟโคอิริทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน ของการเพาะเลี้ยงสไปรูลินาที่ทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย บ่อไบโอแก๊ส และบ่อฝิ่ง จากฟาร์มสุกร ประเมินโดยการตรวจวัดดัชนีชี้วัดทั้ง 3 อย่างพบว่า ระดับ 40% การทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สที่ระดับ 40, 60 และ 80% เพื่อใช้เป็นอินทรีย์วัตถุพบว่าการเปลี่ยนแปลง ของไฟโคไซยานิน, ไฟโคอิริทริน, และอัลโลไฟโคไซยานิน สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ใช้สูตรอาหารซารูค 100% และน้ำเสียจากบ่อฝิ่งทุก ๆ ระดับการทดแทน ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 23) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ajayan et al. (2012) ได้ทดสอบระดับความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินาภายใต้สภาวะระดับไนโตรเจน พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าสามารถทดแทนน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สได้มากถึง 80% ซึ่งเป็นปริมาณการทดแทนที่พอที่จะสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูลินา

5.1.5 การเปลี่ยนแปลง คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) โปรตีน (Protein) ไขมัน (Fat) มวลของสาหร่าย (Bio mass) และ ต้นทุน ของสาหร่ายสไปรูลินาจากการใช้อินทรีย์วัตถุจากน้ำเสีย ฟาร์มสุกรทดแทนการใช้สูตรอาหารสูตรซารูค (Zarrouk's medium)

คาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ มีทั้งที่เป็นโครงสร้างในเซลล์ อยู่ในเมือรระหว่างเซลล์ เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และที่เก็บสะสมไว้ โดยที่คาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึม และเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในกระบวนการหายใจ สำหรับคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายมีปริมาณร้อยละ 4-80 ของน้ำหนักแห้ง ประเภทของคาร์โบไฮเดรตที่พบในสาหร่ายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตมี 45-55% ในสาหร่ายสไปรูลินา หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยระดับน้ำเสีย (ขานี ด้วงเทพ และคณะ 2554; เอกธิตาทองเต็จ, 2553) การทดแทนสูตรอาหารซารูคด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊ส ของฟาร์มสุกรที่ระดับการ

ทดแทน 40 และ 80% มีค่าอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับกลุ่มทดลองที่สูตรอาหารซารุคใช้เลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (66.973, 62.115 และ 62.728 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำเสียจากบ่อรวมน้ำเสีย 40% และน้ำบ่อไปโอแก๊ส 60% แต่กลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำจากบ่อฝั่งทุกระดับมีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ( $P \leq 0.05$ ) (ตาราง 22) และการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนของสาหร่าย ส่วนใหญ่สะสมอยู่กับสารประกอบจำพวกกลีโคโปรตีน เนื่องจากสไปรูลิน่ามีชั้นเซลล์ที่หนา จัดเป็นพวกมิวโคโปรตีน (mucoprotein) อีกทั้งคุณภาพของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความสมดุลในปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็น และความยากง่ายในการย่อย โดยเฉพาะรงควัตถุอีกชนิดหนึ่งคือ ไฟโคไซยานิน ที่เป็นรงควัตถุที่มีความบริสุทธิ์สูงเป็นส่วนหนึ่งของกรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ ระดับของโปรตีนของกลุ่มที่ทดแทนด้วยน้ำเสียจากบ่อไปโอแก๊ส และบ่อฝั่งระดับ 80% เปอร์เซ็นต์มีโปรตีนสูงกว่า กลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารุคเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า (40, 38.75 และ 26.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อีกทั้งยังสอดคล้องกับระดับเปอร์เซ็นต์ไขมัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ประมาณร้อยละ 80 โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมัน GLA หรือ กรดแกมมาลิโนลิติก (gamma-linolenic acid) เป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรม ซึ่งสาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถตรวจพบ GLA ได้สูงสุด 8-32 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด หรือ คิดเป็น 0.3-1.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อีกทั้งสภาวะการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ทำให้ปริมาณกรดไขมันและ GLA สูงขึ้น เช่น อุณหภูมิเพาะเลี้ยงควรอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส หรือแม้กระทั่งการเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสงสูง ช่วงของการเลี้ยงในระยะ Exponential phase จะมีกรดไขมัน GLA สูงกว่า Stationary phase เป็นต้น นอกจากนี้การปรับสภาวะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ GLA ยังมีการใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายอีกด้วย (เพ็ญรัตน์ หงส์วิทยากร และโฉมยง ไชยอุบล, 2546) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในกลุ่มทดลองที่ใช้น้ำเสียจากบ่อไปโอแก๊สที่ระดับการทดแทน 60 - 80 % มีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารุค (51 และ 59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) (ตาราง 24) ดังนั้นปริมาณโภชนะของสไปรูลิน่า คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ต่อประสิทธิภาพการทดแทนอาหารสูตรซารุคในกลุ่มการทดลองที่ใช้น้ำเสียจากบ่อไปโอแก๊สสามารถทดแทนอาหารซารุคได้ถึง 60 - 80% ไม่มีผลต่อปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ยังสามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้เพิ่มมากยิ่งขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสไปรูลิน่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหารกลุ่มไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในน้ำเสียด้วย (เอกธิดา ทองเต็จ, 2553) เมื่อเปรียบเทียบดัชนีชี้วัดของ มวลสาหร่ายแห้ง (Bio mass SP; g) และต้นทุนการเลี้ยงใน ตาราง 25-26 สำหรับการทดแทนน้ำเสียจากบ่อไปโอแก๊สที่ระดับ 60 และ 80% ได้มวลสาหร่ายแห้งสูงกว่ากลุ่มที่ทดแทนด้วยสูตรอาหารซารุค 40 % ด้วยน้ำเสียจากบ่อไปโอแก๊ส (3.819, 4.205 และ 2.199 กรัม ตามลำดับ) ( $P < 0.05$ ) ต่อปริมาณน้ำสุทธิที่ใช้เพาะเลี้ยง 4 ลิตร และต้นทุนการเลี้ยง

สาหร่ายต่อน้ำหนักแห้งของกลุ่มที่ทดแทน 80 % และการใช้น้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สมีต้นทุนต่ำกว่า กลุ่มควบคุมที่ใช้สูตรอาหารซารุค (141.053 และ 812.884 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งต่ำกว่าการใช้น้ำทิ้งจากโรงอาหารที่ระดับการทดลอง 100% มีต้นทุนผันแปร 276.6 บาทต่อกิโลกรัม (จกกล พรหมยะ และ ศิริเพ็ญ ตรีชัยยาพร, 2535) จากการทดลองตรวจสอบคุณสมบัติชีวเคมีของ สาหร่ายสไปรูลิน่าที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำเสียจากบ่อไบโอแก๊สโดยที่ทดแทนสูตรอาหารซารุค 80% จาก ต้นแบบการผลิตขนาด 1000 ลิตร ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Habib et al. (2008), Mata et al. (2010), Sajilata et al. (2008) อีกทั้งปริมาณ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และสารประกอบ พอลิแซ็กคาไรด์ (348.62, 113.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10.2% ตามลำดับ) สอดคล้องกับ การศึกษาประสิทธิภาพการหมักสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรียแลคติก (อดิศักดิ์ คงแก้ว และคณะ, 2563) จากดัชนีชี้วัดที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่ามาให้คะแนนเปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพและการเปรียบเทียบความเชื่อมั่นแต่ละดัชนีชี้วัดจาก 100 เปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่า การ ทดแทนน้ำเสีย 80% น้ำเสียจากฟาร์มสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ที่จากบ่อไบโอแก๊ส โดยเปรียบเทียบกับดัชนีชี้วัด ได้แก่ pH ความหนาแน่นของเซลล์ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน อัลโลไฟ โคไซยานิน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน มวลสาหร่ายแห้ง และ ต้นทุนการเลี้ยงสาหร่าย ได้ เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของดัชนีชี้วัดที่ระดับ 85% การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยน้ำเสียจากฟาร์มสุกร เพื่อเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ควรคำนึงถึงระดับแอมโมเนียของน้ำเสีย และควบคุมระยะเวลาใส่ ออกซิเจนเพื่อขับแอมโมเนียให้มากที่สุดก่อนนำไปเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่า

#### 5.1.6 ประสิทธิภาพการหมักสไปรูลิน่าด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อช่วงเวลาและ ระดับปริมาณของเชื้อที่ใช้ในการหมัก

จากการเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. (2015) พบว่าแบคทีเรียแลคติก (LAB) ในสุกรเป็นทางเลือก สำหรับการทดแทนการให้อาหารปฏิชีวนะ โดยเฉพาะ *Lactobacillus species*, *Bifidobacterium spp*, *Bacillus spp*. มีความสามารถในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อโรคในระบบทางเดิน อาหาร และจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งส่งผลดีต่อสุขภาพสุกรรวมถึงกลไกการแข่งขันของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษและ ประโยชน์ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นโปรไบโอติกสำหรับสุกรหย่านม รวมถึงแม่สุกรด้วยเช่นกัน ซึ่ง ในระหว่างการหย่านมลูกสุกร จะต้องเจอกับสภาวะความเครียด จากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมใหม่ พบว่าการใช้กลุ่มของแบคทีเรียจำพวก *E. faecium*, *L. acidophilus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *L. plantarum* ผสมในอาหารเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้อาหารปฏิชีวนะ พบว่าสุกรมีการเจริญเติบโต ดีกว่า และตอบสนองต่อสภาวะเครียด รวมถึงควบคุมระดับภูมิคุ้มกัน ข้อมูลดังกล่าวมีผลต่อการเลือก กลุ่มของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการหมักสไปรูลิน่าแล้วไม่ส่งผลต่อตัวสัตว์

Lapsiri et al. (2012) *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกในกระบวนการหมักสำหรับโปรลิน่าได้ และ *L. plantarum* TISTR 2075 สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างได้กว้างถึง 2-9 มีอัตราการรอดชีวิต 85 % หลังจากทำให้แห้งแบบสเปรย์ ทนต่อความร้อนถึง 65°C เป็นเวลา 30 นาทีโดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80% และทนต่อความเข้มข้นของน้ำดีของสุกร และมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Enterobacter sp.* (Balasingham et al., 2017; Lapsiri et al., 2011; Sreenath et al., 2001) การใช้ *Lactobacillus plantarum* หมักกากอัลฟัลฟา รำข้าวสาลี ชั่งข้าวโพด ฟางข้าวสาลี และกากถั่วเหลือง ได้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดจากการหมักกากอัลฟัลฟา คือ 46 กรัมต่อ 100 กรัมกากอัลฟัลฟา สอดคล้องกับ Niccolai et al. (2018) รายงานการใช้ *L. plantarum* ATCC 8014 ต่อการทดสอบการหมักสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรีย *L. plantarum* ATCC 8014 เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก การตรวจสอบว่าการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเพิ่มความสามารถการย่อยได้ในหลอดทดลองเพิ่มขึ้น 4.4% และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *A. platensis* ต่อการควบคุมการเกิดอนุมูลอิสระและการทดสอบเปรียบเทียบกับสารละลายฟีนอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากการหมัก 79% และ 32% ตามลำดับ จากการเลือก *L. plantarum* TISTR 2075 หมักสำหรับสไปรูลิน่าด้วยปัจจัยของช่วงระยะเวลา และปริมาณของจุลินทรีย์ต่อการหมักเมื่อตรวจสอบการรอดชีวิต *L. plantarum* TISTR 2075 (log cfu/ml) พบว่าหลังการหมัก 72 ชั่วโมง การรอดชีวิตของ *L. Plantarum* สูงกว่าช่วงเวลาอื่น ๆ ( $P < 0.05$ ) และสอดคล้องกับการใช้ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ 2-4% ( $P < 0.05$ ) และความสัมพันธ์ที่มีปฏิกริยายาร่วมกันระหว่างระยะเวลาและปริมาณเชื้อที่ใช้ในการหมัก จึงเห็นได้ว่าสไปรูลิน่าสามารถเป็นสารตั้งต้นของการหมักด้วย *L. plantarum* TISTR 2075 ได้ร่วมด้วยเมื่อพิจารณาปริมาณกรดแลคติกจากของเหลวในกระบวนการหมัก ปริมาณของ *L. plantarum* ไม่มีผลต่อปริมาณของกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น แต่ระยะเวลาของการหมัก 48 และ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงกว่ากลุ่มที่ยังไม่เกิดการหมัก และ 36 ชั่วโมง อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์กับค่า pH ที่ลดลง ( $P < 0.05$ ) เมื่อตรวจสอบระดับการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds; TPC) เป็นสารที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติพืชหลายชนิด รวมถึงกลุ่มของสาหร่ายที่มีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีโครงสร้างอย่างง่าย คล้ายกับกรดฟีนอลิก ซึ่งช่วงระยะเวลาการหมัก 48-72 ชั่วโมง มี TPC มากกว่ากลุ่มอื่น ( $P < 0.05$ ) สำหรับปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant potential capacity; APC) หรือเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระ พบว่าช่วงเวลาของการหมัก 36, 48 และ 72 ชั่วโมง มี APC สูงกว่ากลุ่มที่เริ่มต้นหมัก (ชั่วโมง 0) ( $P < 0.05$ ) โดยปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 4% พบว่าปริมาณ APC สูงที่สุด ( $P < 0.05$ ) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นสารที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตต่อคน สัตว์ หรือ พืช ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจง และทำให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุด เพื่อให้แน่ใจว่า

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบนั้น สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเปิดการสูญเสียอิเล็กตรอน และเสถียรภาพของเซลล์ ของแต่ละเนื้อเยื่อในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ จะต้องตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูลิหน้าหมัก ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl) พบว่าระยะเวลาเริ่มต้นของการหมักมีค่า DPPH สูงกว่า 36,48 และ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) เนื่องปัจจัยของสัดส่วนของปริมาณกรดแลคติก และความร้อนจากการอบฆ่าเชื้อ รวมถึงการอบแห้งหลังจากการหมักมีอิทธิพลต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH แต่ปริมาณ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 3 และ 4% มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระดับ 2% ( $P < 0.05$ ) จากผลการทดลองปริมาณสารคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ เป็นสารประกอบในกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่ตรวจ ดัชนีชี้วัดดังกล่าวมีความสำคัญ เพื่อใช้พิจารณาการเลือกใช้ระยะเวลาและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการหมักที่เหมาะสม ต่อการทำลายผนังเซลล์ในชั้นของ peptidoglycan เป็นชั้นที่มีความแข็งแรงโดยที่อยู่ชั้นระหว่างชั้น fibrillar layer 1,2 และเคลือบด้วยโพลีแซคคาไรด์ (Scholz et al., 2014) ให้มีความเหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมัก ต่อการใช้ประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของสุกรวัยอ่อนได้ ซึ่งการตรวจวัด สารคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ เป็นส่วนหนึ่งของการตรวจสอบทางอ้อมต่อการเปลี่ยนแปลงของโภชนะ สำหรับกลุ่มที่ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 และ 48 ชั่วโมงมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากกว่าและแตกต่างกับกลุ่มที่ใช้เริ่มต้นการหมัก และ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก 4% ตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด ( $P < 0.05$ ) แต่ไม่แตกต่างกับเมื่อใช้เชื้อ 3% ในการหมัก จากการทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์นั้นมีความสอดคล้องกับช่วงเวลาของการหมักที่ 36-48 ชั่วโมง และปริมาณแบคทีเรียแลคติก 4% ซึ่งให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* TISTR 2075 ช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสม เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อและปริมาณของกรดแลคติกมีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับงานศึกษาของ Niccolai et al. (2018) ระยะเวลาของการหมักสไปรูลิน่า 48 ชั่วโมงด้วยกลุ่มของ *L. Plantarum* ช่วงระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมที่สุด และเมื่อเข้าสู่ช่วง 72 ชั่วโมงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลคติก และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักมีทิศทางลดลง

คลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุที่มักพบในสไปรูลิน่า และยังเป็นสารประกอบในกลุ่มของสารประกอบสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สำคัญตั้งนั้นการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในสไปรูลิน่าหมักนั้นเป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญ พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสไปรูลิน่าที่อบแห้งพร้อมน้ำ ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสนาน 6 ชั่วโมง ของกลุ่มที่ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 และ 48 ชั่วโมง (333.35 และ 355.06) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มีปริมาณมากกว่าและแตกต่างกับกลุ่มที่ยังไม่เริ่มหมัก และ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (199.86 และ 158.57) แต่สำหรับระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 นั้นไม่แตกต่างกัน ( $P < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ ก่อนเตรียมกระบวนการ

หมัก ตรวจวัดคลอโรฟิลล์ เอ สามารถวัดได้ 348.62 ppm และสารแคโรทีนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการดูดซับพลังงานกระตุ้นจาก Singlet oxygen ซึ่งเป็นโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลอิสระหรือ อิเลคตรอนเดี่ยว ที่มีลักษณะชอบน้ำและว่องไวต่อปฏิกิริยา กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระจากสไปรูลิน่าทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโมเลกุลแคโรทีนอยด์แทนที่จะไปทำลายโมเลกุลหรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีส่วนป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลูโกโซที่เกิดจากการสลายกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่สามารถเร่งการเสื่อมสลายของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทั่วไปแล้วในสิ่งมีชีวิตที่มีการสันดาปโดยใช้ออกซิเจน (Aerobic metabolism) จะมีอนุมูลอิสระที่มีอิเลคตรอนไม่ครบคู่ (free radical) รวมทั้งอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species; ROS) เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา เช่น ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และเพอร์ออกไซด์ (peroxides) ซึ่งสารเหล่านี้มีความจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาของร่างกายในการดำรงชีวิต อย่างไรก็ตามถ้ามีปริมาณของอนุมูลอิสระมากเกินไปก็อาจเกิดอันตราย เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเซลล์ในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือ ดีเอ็นเอ โดยการไปดึงหรือรับออกซิเจนจากสารชีวโมเลกุลนั้น ๆ ซึ่งสภาวะเช่นนี้มีผลทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ เรียกว่า (Oxidative damage) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดโรคต่าง ๆ ในร่างกาย สำหรับปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ ROS จากนั้นมีผลต่อความสมดุลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อมีความไม่สมดุลดังกล่าวจะส่งผลต่อการลดการแสดงออกโปรตีนในลำไส้สุกร (Pinton et al., 2012) ซึ่งเกิดจากความแตกต่างและความสมดุลการสังเคราะห์โมเลกุลของเซลล์ ไขมัน โปรตีน และการเกิดออกซิเดชันในเซลล์ ดังนั้นเพื่อป้องกันลดการเกิดออกซิเดชันดังกล่าว ร่างกายจะต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระต่าง เช่น Superoxide dismutase, Catalase และ Peroxidase และโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างสารเหล่านั้นได้เพียงพอเพื่อปรับสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถรับสารต้านอนุมูลอิสระได้จากอาหาร หรือ สารเสริมอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่เป็นอันตราย หรือ ทำลายปฏิกิริยาออกซิเดชัน อีกทั้งสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของ แคโรทีนอยด์ เบต้าแคโรทีน เป็นโปรออกซิแดนท์ (Prooxidant) ที่มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำลดการเกิดสภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (Oxidative stress) (วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และมารุจ ลิ้มปะวัฒน์, 2553) สามารถตรวจสอบปริมาณ malondialdehyde (MDA) ในเลือดเป็นผลจากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) เป็นการเสื่อมสภาพของลิพิดจากกระบวนการออกซิเดชัน ที่อนุมูลอิสระดึง อิเล็กตรอนจากลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้เซลล์เสียหาย เกิดบ่อขุมที่สุดกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่หลายคู่ ดังนั้นถ้าตรวจแล้วพบว่า MDA น้อยหมายถึงระดับความเครียดจากออกซิเดชันลดลง แต่ในทางกลับกันสภาวะเหล่านี้มีทิศทางลบซึ่งเกิดจากการได้รับสารพิษหรือการปนเปื้อนในอาหาร เป็นต้น จากการ

ตรวจสอบปริมาณแคโรทีนอยด์ ในสไปรูลิน่าที่ผ่านการหมักเมื่อใช้ระยะเวลาการหมัก 36 และ 72 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่ยังไม่ทำให้เกิดการหมัก และ 72 ชั่วโมง (193.70 และ 192.57 ppm) ( $P < 0.05$ ) และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก 4 เปอร์เซ็นต์ (181.52 และ 191.54 ppm) ส่งผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์มากกว่ากลุ่มที่ยังไม่ได้หมัก และ 48 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ )

เบต้า-แคโรทีน เป็นรงควัตถุที่พบได้น้อยในสไปรูลิน่า แต่เบต้า-แคโรทีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบได้ในธรรมชาติ เป็นสารที่พบในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชผักที่มีสีเหลืองส้ม ส้มแดง และแดง เช่น แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ รวมไปถึงสาหร่าย แบคทีเรียและยีสต์บางชนิด (Sakagami et al., 2010) แคโรทีนอยด์จะเป็นรงควัตถุสำคัญในการสังเคราะห์แสง ช่วยดูดซับและรับพลังงาน ในขณะที่เดียวกันก็ป้องกันอันตรายที่จะเกิดจากพลังงานส่วนเกินจากแสง อีกทั้งดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์แสง (Miller et al., 2010) แคโรทีนอยด์ มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ตลอดจนช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Rao et al., 2007) สำหรับการตรวจสอบปริมาณเบต้า-แคโรทีนในสไปรูลิน่าหมัก พบว่าการใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง (1.263 ppm) มากกว่ากลุ่มที่ยังไม่ได้หมัก และ 36 ชั่วโมง (0.967 และ 0.884 ppm) ( $P < 0.05$ ) สำหรับระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ระดับ 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (1.122 และ 1.088 ppm) ปริมาณเบต้า แคโรทีนที่ตรวจวัดได้มีค่ามากกว่า ส่วนระดับการใช้ 3% มีแนวโน้มใกล้เคียงกันกับระดับการใช้ดังกล่าว (1.051 ppm) แต่มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ใช้ระดับปริมาณเชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์ (0.948 ppm) ( $P < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาปริมาณของ เบต้า แคโรทีน ร่วมด้วยกับกลุ่มของวิตามินที่มีอยู่ในสาหร่ายสไปรูลิน่ามีความสามารถต่อการส่งเสริมการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน โดยทั่วไปแล้วเบต้า แคโรทีนในธรรมชาติหรือแม้ในสไปรูลิน่ามีเพียงพอต่อความต้องการ โดยเฉพาะคนที่เป็นมะเร็งที่ได้รับสไปรูลิน่า 4 กรัมสามารถตรวจพบเบต้า-แคโรทีนได้มากถึง 6 มิลลิกรัม จากรายงานวิจัยพบว่าการได้รับในปริมาณนี้สามารถช่วยลดปัจจัยความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง และลดการเกิดเซลล์ตายภายในร่างกายได้ (Ahsan et al., 2008) จากความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และระดับปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ต่อปริมาณเบต้า แคโรทีน ที่ระดับแบคทีเรียกรดแลคติก 2-3 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ให้ผลเชิงบวกต่อปริมาณเบต้า-แคโรทีน ถึงแม้เบต้า-แคโรทีนจะเป็นรงควัตถุที่พบน้อยในสไปรูลิน่า อย่างไรก็ตามก็ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแคโรทีนอยด์ (Sakagami et al., 2010) รวมถึงยังเป็นสารประกอบในกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 32.56% ซึ่งมีค่าที่สูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นที่ระยะเวลาที่หมัก 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) และกลุ่มที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติก 3 และ 4% ตรวจสอบกลุ่มของสารประกอบโพลีแซคคาไรด์สูงสุด (23.07 และ 22.68%) ( $P < 0.05$ )



จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และสารออกฤทธิ์ชีวภาพ พบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการหมักที่ 48 ชั่วโมง และปริมาณเชื้อ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 4% ต่อการหมักนั้น เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงบวก สอดคล้องกับ Kroger et al. (2018) และ Niccolai et al. (2019) เนื่องจากช่วงนี้เรียกว่า Log phase แต่ถ้าหลังจากการหมัก 72 ชั่วโมง การหมักจะเข้าสู่ช่วง Stationary phase การเจริญช่วงนี้จะคงที่ สารอาหารอาจถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากระบวนการเมแทบอลิซึม และการเปลี่ยนแปลงของดัชนีชี้วัดหลังจาก 72 ชั่วโมงมีทิศทางเชิงลบต่อการสลายชั้นของผนังเซลล์ของสไปรูลิना โดยการตรวจวัดสารสำคัญของปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1.7 การเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อประสิทธิภาพหมักและคุณสมบัติของสาหร่ายสไปรูลิनाที่เหมาะสมต่อการใช้ในสุกรหย่านม

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูลิना เช่น เบต้า-แคโรทีน เป็นรงควัตถุที่พบน้อยในสไปรูลิना จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแคโรทีนอยด์ (Sakagami et al., 2010) ผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง มีปริมาณเบต้า-แคโรทีนสูงสุด ( $P < 0.05$ ) ปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่หมักระดับที่ 0 - 2% ไม่ทำให้ปริมาณ เบต้า-แคโรทีนลดลง (1.122, 1.088) (ppm) ส่วนที่ปริมาณของเชื้อ 3% มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกลับกลุ่มควบคุม (1.051 ppm) แต่ปริมาณเชื้อที่ใช้ 4% ทำให้เบต้า-แคโรทีนน้อยที่สุด 0.949 ppm ( $P < 0.05$ ) รวมถึงปริมาณโพลีแซคคาไรด์ พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 72 ชั่วโมงมีมากที่สุด ( $P < 0.05$ ) และปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 3 และ 4% ตรวจวัดสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ได้สูงสุด ( $P < 0.05$ ) แต่ปริมาณของเชื้อที่ใช้หมักไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์โปรตีน ( $P < 0.05$ ) ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ที่มากขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมัก และปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับสมมุติฐานของการทดลองต่อการสลายชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (Scholz et al., 2014)

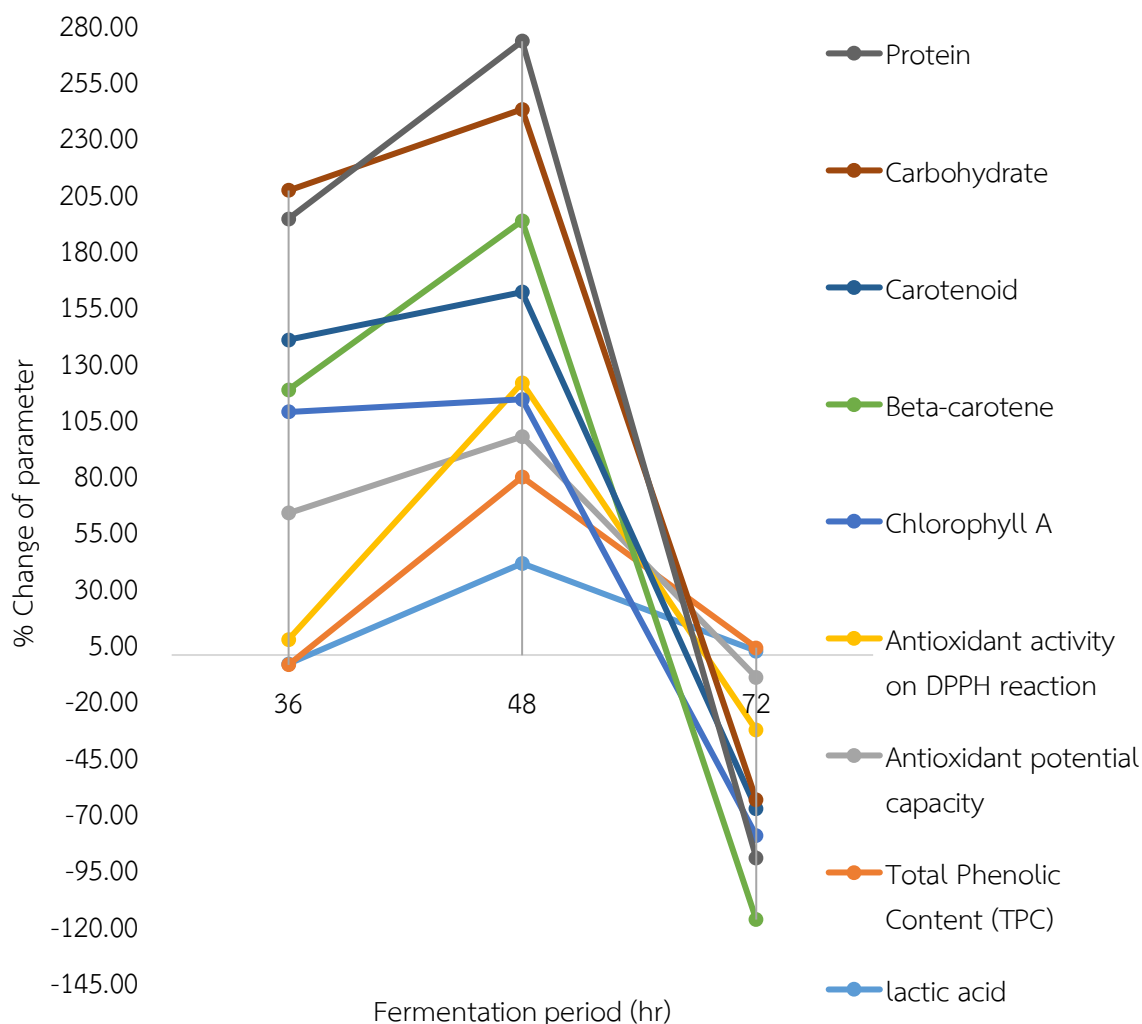
การทดสอบหาปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (APC) หรืออาจเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระ เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด สำหรับกลไกการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และ Chain breaking antioxidant ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง อย่างไรก็ตาม กระบวนการและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีผลต่อการตรวจวัดปริมาณสารต้านออกซิเดชัน จึงออกแบบการตรวจสอบในสาหร่ายสไปรูลิनाทั้งหมด 3 ส่วน ส่วนที่แรกคือ สไปรูลินำอบพร้อมน้ำหมักอบแห้งโดยใช้อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ส่วนที่สองคือ สไปรูลินำหมักแยกน้ำหมักอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และส่วนสุดท้ายคือ ส่วนของเหลวที่ผ่านการ

กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 44 ขนาด 110 มิลลิเมตร กรองอย่างน้อย 2-3 ครั้ง เพื่อพิจารณาคุณสมบัติของแต่ละส่วนที่ได้จากการหมัก สรุปลงได้ว่าส่วนที่อบแห้งพร้อมกับน้ำหมักช่วงเวลาของการหมัก 36 48 และ 72 ชั่วโมงมีปริมาณ APC สูงกว่ากลุ่มที่ยังไม่เกิดการหมัก ( $P < 0.05$ ) (1277.83, 1409.99, 1293.94 และ 795.61 ( $\mu\text{g/ml}$ ) ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับระดับของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบปริมาณ APC มากกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้เชื้อ และใช้เชื้อ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 1368.94, 1286.86, 1039.22 และ 1082.35 ( $\mu\text{g/ml}$ ) ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความจำเพาะเจาะจง และทำให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุดนั้นจะต้องผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูลิน่าหมัก มีหลายวิธี แต่สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยปฏิกิริยาทางเคมีที่มีการทดสอบอย่างแพร่หลาย โดย DPPH ทดสอบการออกฤทธิ์ดังกล่าว พบว่าส่วนของสาหร่ายหมักที่ผ่านกรรมวิธีอบแห้งพร้อมน้ำหมัก อุณหภูมิ 85 °C ใช้เวลาอบแห้ง 6 ชั่วโมง ส่งผลต่อประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลงในกลุ่มที่หมักเพียง 48 และ 36 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้น (26.250, 19.146%) ซึ่งต่ำกว่ากลุ่ม 72 และ กลุ่มที่ยังไม่เริ่มการหมัก (30.01 และ 56.67%) และปริมาณเชื้อของการหมัก ระดับการใช้เชื้อ 2% เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีค่าน้อยที่สุด 28.21% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เชื้อในอาหารหมัก และใช้เชื้อ 3 และ 4% (37.17, 31.60 และ 35.10%) ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสรุปได้ว่าระยะเวลา และปริมาณเชื้อต่อการหมักมีผลต่อประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงอุณหภูมิของการทำให้แห้งนั้นมีผลต่อผลการทดสอบดังกล่าวเช่นกัน เนื่องจากการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายหมักที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 65°C ใน 2 ชั่วโมง ตรวจวัดได้สูงถึง 45-55% อย่างไรก็ตามเมื่อต้องการประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมกำหนดกรรมวิธีเพื่อเป็นต้นแบบการผลิตขนาดใหญ่การดึงน้ำออกจะต้องใช้พลังงาน และค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเนื่องจากการกรองจะต้องใช้กระดาษกรองด้วยปั๊มสุญญากาศ ถ้าหากใช้วิธีการกรองปกติไม่สามารถแยกน้ำหมักออกจากกากได้สืบเนื่องขนาดอนุภาคของสไปรูลิน่าเมื่อผ่านกระบวนการหมักจะมีความหนืด มีขนาดอนุภาคใหญ่ และมีลักษณะอุ้มน้ำ เพื่อให้คงคุณสมบัติหลายประเด็น เช่น องค์ประกอบทางเคมี ทางชีวภาพ ของขั้นตอนการอบแห้งพร้อมน้ำนั้นเหมาะสมต่อการเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์เพื่อต่อยอดการพัฒนาการหมักในหน่วยการหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนของกลุ่มที่ใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของสาหร่ายที่อบแห้งพร้อมน้ำมากกว่าสาหร่ายที่แยกน้ำก่อนอบแห้ง (43.99 เปรียบเทียบกับ 36.13%) ดังนั้นพิจารณาได้ว่าไม่จำเป็นต้องแยกน้ำออกจากสไปรูลิน่าก่อนทำการอบแห้งแต่ต้องพึงระวังอุณหภูมิการอบแห้งที่จะ เป็นปัจจัยต่อการเปลี่ยนแปลงของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และประสิทธิภาพการหมักนั้น จะต้องพิจารณาร่วมด้วยกับองค์ประกอบทางเคมีของสไปรูulinaที่ผ่านกระบวนการหมัก ดังนั้นเมื่อนำดัชนีชี้วัดในด้านต่าง ๆ Table 27 จากการใช้ระยะเวลาในการหมักสไปรูulina 48 ชั่วโมง และปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ต่อการหมักเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดที่ระดับความสำเร็จ 63 และ 49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Niccolai et al. (2018) ได้รายงานการหมักสไปรูulinaด้วย *L. plantarum* ATCC 8014 ที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง สามารถตรวจนับเซลล์จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตได้ถึง  $10^6$  log CFU mL<sup>-1</sup> อีกทั้งการหมักยังสามารถเพิ่มการย่อยได้ในหลอดทดลองได้ 4.4 % เพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบสารประกอบฟีนอล เพิ่มสูงขึ้นหลังจากการหมัก 79% และ 32% ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสไปรูulinaหลังอบ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังจากการหมักมีทิศทางลดลง เนื่องจากการเสื่อมสภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่ไวต่อความร้อนต่อการอบแห้ง และการบ่มเพื่อหมัก ซึ่งสอดคล้องกับ Castro et al. (2019) ที่ได้ทดสอบการหมักสไปรูulinaด้วย *L. plantarum* 36 ชั่วโมง ส่งผลทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีทิศทางลดลง แต่กระบวนการหมักมีประโยชน์ต่อการสลายชั้นผนังเซลล์ เมื่อตรวจสอบกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ รวมถึงองค์ประกอบทางเคมีด้วยนั้น ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการหมักนั้นอยู่ที่ 48 – 72 ชั่วโมง

เนื่องด้วยผลสัมฤทธิ์จากการประเมินช่วงระยะเวลา และปริมาณของ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่เหมาะสมต่อการหมักสไปรูulina นั้น ช่วงระยะเวลาของการหมักที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันมากนัก จึงต้องเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของช่วงระยะเวลาการหมัก 0 ถึง 72 ชั่วโมง ของแต่ละดัชนีชี้วัด ต่อการประเมินคุณภาพ และปริมาณของตัวชี้วัดในช่วงเวลาการหมัก การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ของดัชนีชี้วัด 36 ถึง 48 นั้น เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงบวกตามแสดงในตาราง 27 สืบเนื่องจากกระบวนการหมักของช่วงนี้เป็นช่วงที่ที่เรียกว่าเรียก Log phase (Logarithmic phase หรือ Exponential phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ ส่งผลทำให้การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆ กัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว เมื่อเข้าถึง 72 ชั่วโมงการหมักอยู่ในช่วง Stationary phase ระยะที่จุลินทรีย์จะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม แต่หลังจาก 72 ชั่วโมงมีทิศทางของเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของ

ดัชนีชี้วัดในทิศทางเป็นลบ ซึ่งอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักใช้อาหารและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายจนเหลือน้อย



ภาพ 27 Changing percentage in the score card of fermented evaluation

5.1.8 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี กรดอะมิโน และกรดไขมัน ก่อนและหลังจากการหมัก

หลังจากการผลิตสไปรูลีนาหมักในหน่วยผลิตขนาดกลาง โดยใช้ระดับปริมาณ *L.plantarum* TISTR 2075 ที่ 4% ระยะเวลาหมัก 48 ชั่วโมง เพื่อจำลองการผลิตที่เป็นแนวทางสำหรับการขยายการผลิตขนาดใหญ่ซึ่งได้ในอนาคต ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางโภชนา พบว่า โปรตีน และพลังงาน ลดลงหลังจากการหมัก 9.23% และ 10.43 kcal/1kg ตามลำดับ

สามารถเพิ่มคุณสมบัติใยอาหารของสาหร่ายเพิ่มขึ้น 0.18% ส่วนการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน สอดคล้องกับการลดลงของระดับโปรตีนหลังจากการหมัก กลุ่มของกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ลดลงโดยเฉพาะ Histidine, Isoleucine, Phenylalanine, Lysine, Tyrosine และ Valine ส่วน กลุ่มของกรดอะมิโนชนิดอื่นลดลงเล็กน้อย แต่ในทางกลับกันกรดไขมันโดยเฉพาะ กรดไขมันสายโซ่ หนาดยาว (LCFA) และ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น ของสไปรูulina หลังจากการหมักตามระยะเวลาที่ เหมาะสมนั้นส่งเสริมให้มีค่าสูงขึ้น (168.30 และ 37.13 g/100g) อีกทั้งนักวิจัยยังพบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (PUFAs) สามารถพบมากถึง 25 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของ กรดไขมันทั้งหมดในสาหร่ายสไปรูulina ซึ่งกรดไขมันที่สำคัญ เช่น กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิก โดยเฉพาะกรดปาล์มิติก (44.6–54.1 เปอร์เซ็นต์), กรดโอเลอิก (1–15.5 เปอร์เซ็นต์), กรดไลโนเลอิก (10.8–30.7 เปอร์เซ็นต์) และกรดแกมมา-ไลโนเลนิก ประมาณ 8.0-31.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งช่วง ระยะเวลาของการหมักสไปรูulina ที่ผ่านเพาะเลี้ยงด้วยการทดแทนอาหารสูตรซารุกด้วยน้ำเสียจาก บ่อไบโอแก๊ส จากบ่อบำบัดน้ำเสียฟาร์มสุกรหมักด้วย *L.plantarum* TISTR 2075 ที่ 48 ชั่วโมง และ ระดับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 4% เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม สำหรับต้นแบบกระบวนการหมัก โดยมี อัตราส่วนของสไปรูulina ผง 40 กรัม ต่อน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร จะต้องใช้กรดซิตริก ความเข้มข้น 8 นอร์มอล ปริมาณ 7 มิลลิลิตร เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างก่อนการหมัก โดยอุณหภูมิในการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในการอบแห้ง 85 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง เพื่อเป็นต้นแบบการสร้าง ผลิตภัณฑ์เสริมภูมิคุ้มกันสำหรับสุกรหย่านมจากสไปรูulina โดยที่ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ตามมาตรฐานการตกค้างจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตาราง 35 โดยมีจุดมุ่งหมายต่อการการ สลายชั้นของผนังเซลล์ของสไปรูulina Sheath, Outer membrane, Fibrillar layer1, Peptido-cygan layer เนื่องด้วยชั้นของ peptidoglycan เป็นชั้นที่มีความแข็งแรงและมีความหนา ซึ่งอยู่ ตำแหน่งระหว่างชั้น fibrillar layer 1 และ 2 และเคลือบด้วยโพลีแซคคาไรด์ (Scholz et al., 2014) เป็นที่อยู่ของรงควัตถุ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ จากการ ทดลองจึงได้ช่วงระยะเวลา และปริมาณแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกต่อประสิทธิภาพ ในการปรับปรุง คุณสมบัติของสไปรูulina ให้มีความเหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ในสุกรวัยอ่อนได้

5.1.9 ผลของการเสริมสไปรูulina หมักต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และอัตราการเกิด ท้องเสียของสุกรหย่านม

หลังจากการเสริมผลิตภัณฑ์สไปรูulina หมัก พบว่าที่ระดับการเสริม 20 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหารส่งผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่ำกว่า กลุ่มการทดลองอื่น ( $P < 0.05$ ) และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกลุ่มที่เสริมที่ระดับดังกล่าวสูงกว่า กลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระดับ 5, 10 และ 15 กรัม ต่ออาหาร นั้นไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะแต่มีประสิทธิภาพการ

เจริญเติบโตโดยรวมสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สไปรูลินาหมักที่ระดับสูงสุด สอดคล้องกับ Furbeyre et al. (2018) และ Grinstead et al. (2000) การเสริมสไปรูลินาหมัก 2% ลงในอาหารสุกรหลังจากหย่านม 14-28 วัน ส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน สูงกว่าสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม ( $P < 0.05$ ) และเสริมสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารสุกรหลังหย่านม 0-42 วันหลังจากหย่านม มีแนวโน้มของอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งงานศึกษาการใช้สาหร่ายสไปรีน่า และสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella*) ให้ทางปากในอัตราส่วน 385 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสุกร ช่วงก่อนหย่านม 14 วันถึงหลังหย่านม 14 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโต และลดการเกิดอัตราท้องเสียในช่วงอายุ 1, 2 และ 14 วัน และยังส่งเสริมลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนกลางของสุกรดีขึ้นด้วย สำหรับงานวิจัยการเสริมสไปรูลินาหมักในสุกรหย่านมสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าที่ระดับ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้นส่งผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสุกรหย่านม อาจเป็นเพราะรสชาติ หรือกลิ่นซึ่งส่งผลต่อปริมาณการกินอาหาร สอดคล้องกับ Teo Maria Gemma (2009) ที่รายงานว่าสุกรมีความไวต่อรสชาติอูมามิ (umami) สูงกว่ารสหวานประมาณ 10 เท่า ดังนั้นส่วนผสมของอาหารจะช่วยส่งเสริมความอยากกินอาหาร ดังนั้นจะต้องปรับสมดุลของรสชาติอูมามิซึ่งเป็นรสจากโปรตีน แต่สามารถพบในส่วนผสมของกรดอะมิโน จากการตรวจสอบเยื่อเมือกของสุกร มีความสัมพันธ์ต่อการดูดซึมกรดอะมิโนและการเผาผลาญพลังงาน ลักษณะเดียวกับรสหวานที่มาจากคาร์โบไฮเดรต ถ้าหากให้มากเกินไป ผลต่อการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตเชิงเดี่ยว อีกทั้งกลไกการรับรู้สารอาหารในลำไส้เหล่านี้จะเชื่อมโยงกับการควบคุมวงจรความหิว ความอิ่ม ดังนั้นระดับโปรตีนที่ได้รับไม่ได้เพียงพอแต่ปริมาณการกินอาหารในช่วงแรก แต่ยังสามารถส่งเสริมปริมาณการกินอาหารในระยะยาว และกลไกการดูดซึมโภชนะในลำไส้ของสุกรหลังจากหย่านม จึงสรุปว่าในสุกรหลังจากหย่านมมีความต้องการโปรตีนมีรสชาติดีกว่าคาร์โบไฮเดรต (Teo, 2009; Torrallardona, & Roura, 2009) ผลจากการหมักสไปรูลินาปริมาณกรดอะมิโนโดยรวมมีทิศทางหมดลงลดลง แต่ปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง ในทางกลับกันโปรตีนจากสาหร่ายสไปรูลินาหมักไม่ค่อยจะถูกปากสุกร มีรสชาติค่อนข้างฝืด สุกรหย่านมในช่วงนี้ต้องการโปรตีนที่ถูกปากหรือมีรสชาติที่สุกรพึงพอใจเช่น โปรตีนจาก นม หรือ หางนม ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณอาหารที่กินและอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นหลังจากหย่านม อีกทั้งถ้าหากให้กินปริมาณมากเกินไป จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตในระยะยาว เมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราการเกิดท้องเสียในสุกรพบว่ากลุ่มที่เสริม 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร โอกาสการเกิดท้องเสียต่ำกว่ากลุ่มการทดลองอื่นในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากหย่านม ร่วมด้วยกับการบันทึกคะแนนมูลของสุกร ลักษณะการถ่ายเหลวพบลักษณะมูลที่บ่งบอกถึงการเกิดอาการท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างน้อย สีของมูลมีลักษณะของการถ่ายปกติ จึงสรุปได้ว่าการเสริมสไปรูลินาหมักที่ระดับ 5-10 กรัมต่อกิโลกรัม นั้นไม่ส่งผลเชิงลบหรือความเสี่ยงต่อการเกิดท้องเสีย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้สารสกัดจากสาหร่ายทะเลในสุกรหย่านม (Reilly et al., 2008) พบว่าการใช้สารสกัดจากสาหร่ายทะเล 1.5 กรัมต่อ

กิโลกรัม ตรวจพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จำพวก *bifidobacterial* และ *lactobacilli* ในตัวอย่างของ ลำไส้เล็กส่วนปลาย ไส้ติ่ง และลำไส้ใหญ่ ส่วน *enterobacteria* ในไส้ติ่ง และลำไส้ใหญ่ ลดลง อีกทั้ง ยังไปเพิ่มความสูงของวิลลัสที่ลำไส้เล็กส่วนต้น และส่วนกลาง ส่วน butyric acid เพิ่มขึ้นในลำไส้ ใหญ่ ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเกิดท้องเสีย

การเสริมผลิตภัณฑ์สารเสริมภูมิคุ้มกันจากสไปรูลิน่าหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก (FSP) จัดเป็นสารเสริมที่เหมาะสมต่อการใช้ในอาหารสัตว์วัยอ่อนหรือสุกรหย่านม จาก กระบวนการได้มาของสารเสริมดังกล่าวสามารถช่วยให้สัตว์ใช้ประโยชน์ของคุณค่าทางอาหารและ องค์ประกอบทางเคมี และชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเปรียบเทียบกลุ่มทดลองที่ใช้อาหาร ควบคุม และกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ การใช้ระดับการเสริม 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม มีผลเชิงบวกต่อการ พัฒนาสัญญาณวิทยาลำไส้ เนื่องจากความสูงของวิลลัส และพื้นที่ของวิลลัส มีผลต่อการนำสารอาหาร ในระบบทางเดินอาหารนำไปใช้ เปลี่ยนเป็นโภชนะต่อการเจริญเติบโต และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ของสุกรหลังจากหย่านม ซึ่งจากการศึกษาสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กของสุกรช่วงหย่านม ในส่วนของ ลำไส้เล็กส่วนต้นที่ระดับ FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัม CD มีแนวโน้มใกล้เคียงที่ระดับ 15 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าต่ำที่สุด ( $P < 0.05$ ) (228.17 และ 210.00  $\mu\text{m}$ ) ระดับการเสริม 10-15 กรัมต่อกิโลกรัม VH:CD สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น (2.63 และ 2.86) และความสูงของวิลลัส ความกว้างของวิลลัส และพื้นที่ของวิลลัส ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตาราง 39 Gustatory responsiveness of pigs to L-amino acids and predominant hedonic response in humans and Pig

Amino Acid	L-isomer	
	Human taste	Pig response <sup>1</sup>
Alanine	Sweet	Umami
Arginine	Bitter	Umami
Asparagine	Bitter	Umami
Aspartic	Umami, sour	Umami
Cysteine	Sulphur	n/a
Glutamic	Umami, salty	Umami
Glutamine	Sweet, umami	Umami
Glycine	Sweet	Yes
Histidine	Bitter	No
Hydroxyproline	Sweet	Yes
Isoleucine	Bitter	No
Leucine	Bitter	No
Lysine	Bitter, salty, sweet	Yes
Methionine	Bitter, Sulphur, umami	No
Phenylalanine	Bitter	No
Proline	Sweet, salty	Umami
Serine	Sweet	Yes
Threonine	Sweet	Umami
Tryptophan	Bitter	Bitter
Tyrosine	Bitter	n/a
Valine	Bitter	No

**Note:** <sup>1</sup>Pig response: n/a=not available; YES means that there is a response but the type of taste has not been identified; NO means no response.

**ที่มา:** Adapted from Teo. (2009) , Torrallardona, & Roura. (2009)



สำหรับสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนกลางการเสริม FSP ที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัม VH และ VSA มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริม 15 กรัมต่อกิโลกรัม แต่การเสริมในระดับนี้ส่งเสริมให้ VH, VW, VSA และ VH:CD สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นเช่นกัน (676.25, 167.85, 379.52  $\mu\text{m}$  และ 2.76) ( $P < 0.05$ ) ส่วน CD ต่ำในกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ (187.38  $\mu\text{m}$ ) ( $P < 0.05$ ) สำหรับการเสริม FSP 10 กรัมต่อกิโลกรัม VH:CD และ VW มีแนวโน้มใกล้เคียงกับที่ระดับการเสริม 15 - 20 กรัมต่อกิโลกรัม ( $P < 0.05$ ) สำหรับสัญญาณวิทยาลำไส้เล็กส่วนปลาย VH และ VSA ของกลุ่มใช้อาหารควบคุม สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ๆ (464.89 และ 213.23  $\mu\text{m}$ ), (460.30  $\mu\text{m}$ ) ส่วน CD ต่ำสุดในกลุ่มที่เสริม 15 กรัมต่อกิโลกรัม แต่ในทางกลับกันกลุ่มควบคุม และใช้ยาปฏิชีวนะ CD มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริม 15 กรัมต่อกิโลกรัม มีค่าต่ำสุด และต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (193.12 และ 237.74  $\mu\text{m}$ ) ตามลำดับ และ VH:CD ของกลุ่มอาหารควบคุมและใช้ยาปฏิชีวนะมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่เสริมระดับ 15 กรัมต่อกิโลกรัม (2.36 และ 2.40) ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) วิเคราะห์ได้ว่าลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของลำไส้เล็กที่ตอบสนองต่อการเสริมสไปรูลิน่าหมัก ในระดับต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้อาหารควบคุม และกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ พิจารณาจากสมรรถภาพการเจริญเติบโตของสุกรร่วมกับสัญญาณวิทยาลำไส้ที่เสริมที่ระดับ 15-20 กรัมต่อกิโลกรัมให้ผลเชิง สอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้มีค่าสูงกว่างานศึกษาของ Furbeyre et al. (2017) ได้รายงานการศึกษาการให้สาหร่ายสไปรูลิน่าและสาหร่ายคลอเรลลา ปริมาณ 385 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสุกร 1 กิโลกรัม เพื่อศึกษาสัญญาณวิทยาลำไส้ และประสิทธิภาพการเจริญเติบโต พบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุม แต่สำหรับกลุ่มที่ให้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่ช่วยลดอัตราการเกิดท้องเสียในช่วง 14 วันหลังจากหย่านม ซึ่งสอดคล้องกับสทนทดลองนี้พบว่ากลุ่มที่เสริม FSP 10, 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัมมีประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ ส่วนในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลองการใช้ FSP 15 กรัมต่อกิโลกรัม สุกรช่วงการเลี้ยงใหม่ประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีทิศทางที่สูงขึ้นกว่า และสามารถลดอัตราการเกิดท้องเสีย ดัชนีเหล่านี้เป็นสิ่งยืนยันผลของลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของสุกร ดังนั้นการเสริม FSP สามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้จริงสอดคล้องกับ Relly et al. (2008) ที่ใช้สารสกัดจากสาหร่ายทะเลในสุกรอายุ 24 วันหลังจากหย่านม VH, CD และ VH:CD มีค่าต่ำกว่า งานทดลองนี้ที่ทำการการุณฆาตสุกรอายุ 32 วันหลังจากหย่านมอย่างไรก็ตามสังเกตได้ว่าการใช้สารสกัดหรือแม้แต่การใช้สไปรูลิน่าหมักจะช่วยส่งเสริมความสมบูรณ์ของลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้จะส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ของคุณค่าอาหาร และประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และสอดคล้องกับ Nedeva et al. (2014) ศึกษาการให้สไปรูลิน่า 2 และ 3 กรัมต่อวัน ในสุกรช่วงรุ่น น้ำหนัก 12.15-12.47 ถึง 30.9-33.9 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 12.50 และ 14.25% ตามลำดับ และลดอัตราการป่วยของสุกรได้ถึง 2.40 และ 2.13%

#### 5.1.10 ประสิทธิภาพของสไปรูลิน่าหมักที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสุกร

โดยในปัจจุบันการเลี้ยงสุกรในภาคอุตสาหกรรมนั้น มักเกิดปัญหาความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม และโภชนาการของสุกรหย่านม ทำให้ปริมาณการกินอาหารลดลง ส่งผลให้เกิดการฟ่อตัวของวิลไลของลำไส้เล็ก ภายใน 24 - 72 ชั่วโมงหลังหย่านม (Moeser et al., 2017) ส่งผลกระทบต่อสมรรถภาพการผลิต และการรุกรานของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งส่งผลต่อเนื่องต่ออัตราการเพิ่มขึ้น ท้องเสียหลังหย่านม (post weaning diarrhea) (Lallès et al., 2007; Superchi et al., 2017) เมื่อวิลไลฟ่อตัว (villus atrophy) จะต้องใช้เวลาประมาณ 7 - 14 วันในการฟื้นฟู ซึ่งกลุ่มการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) สามารถพบได้สำหรับสไปรูลิน่า เป็นที่ทราบกันว่ากลุ่มของสารออกฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ คลอโรฟีลล์ เอ (Chlorophyll A) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) เบตาแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์ (Liu et al., 2011) อีกทั้งประกอบด้วยโภชนะที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตที่ช่วยเป็นแหล่งพลังงาน และช่วยการชะลอการเคลื่อนที่ของอาหารในระบบทางเดินอาหาร ไขมัน กรดไขมันที่มีประโยชน์ โอเมก้า 3 และ 6 เป็นต้น จากรายงานการใช้สไปรูลิน่ามีส่วนในการเพิ่มการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของโฮสต์รวมทั้งการปรับปรุงการผลิตแอนติบอดี (Hayashi et al., 1994) ปลดปล่อย cytokine (Mao et al., 2005) การตอบสนองของ T เซลล์และการกระตุ้นการทำงานของ Natural Killer cells (NK) (Hirahashi et al., 2002) และปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารซึ่งมีอิทธิพลต่อการเหนี่ยวนำ Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) แต่ไม่กระตุ้น NK (Seya et al., 2003) อีกทั้งการรอกปากให้หนูด้วยสารสกัดจากน้ำสกัดร้อนของสไปรูลิน่าสามารถกระตุ้น NK cell ได้ ซึ่งสไปรูลิน่าเกี่ยวข้องทั้งการหลั่งของกลุ่มไซโตไคน์เช่น IFN- $\gamma$  รวมถึงการเหนี่ยวนำการทำงานของ NK cell เพื่อไป กระตุ้น Rae-1-positive cell killing ในหนู ดังนั้นการให้สไปรูลิน่าสามารถนำไปสู่การชะลอการเจริญเติบโตของเนื้องอกในหนูได้ การต่อต้านการเกิดเนื้องอกในหนูขึ้นอยู่กับ MyD88 ไม่ใช่ส่วนของ adaptor TICAM-1 (TRIF) สไปรูลิน่ายังสามารถกระตุ้นการเปิดใช้งาน NK MyD88 ที่ไม่ซ้ำกันผ่านการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่เยื่อจึงเป็นการรักษาภูมิคุ้มกันที่เป็นไปได้ของ BCG - CWS ร่วมกับสไปรูลิน่า (Akao et al., 2009) ซึ่งจากรายงานการศึกษาการนำสารสกัด Immulina จากสไปรูลิน่ามาใช้ในคนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Nielsen et al., 2010) การทดสอบสารสกัดทางการค้าจากสไปรูลิน่า ต่อศักยภาพในการกระตุ้น THP-1 monocytes และ CD4+ T cells ในหลอดทดลอง ต่อศักยภาพของหน้าที่ทางด้านภูมิคุ้มกันในหนู พบว่ามีศักยภาพด้านกลไกของ NK cell เมื่อเสริม Immulina ในเป็นเวลา 7 วัน จึงได้มีการศึกษาในมนุษย์ที่สุขภาพดี Immulina ในปริมาณ 400 มิลลิกรัมต่อวัน ในระยะเวลา 7 วัน พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของ NK- และ T-cell marker perforin เพิ่มขึ้น 75 เปอร์เซ็นต์มีการศึกษา

ทดลองในสุกรระยะรุ่น น้ำหนักเฉลี่ย 12.30 – 32.40 กิโลกรัม โดยใช้ระยะเวลาทดลอง 47 วัน ระดับการเสริมสไปรูลิน่า 2 และ 3 กรัมต่อตัวต่อวัน พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ 12.50 และ 14.25 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร และค่าเลือดพบค่า เม็ดเลือดขาว (erythrocytes) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) สูงขึ้น 15 และ 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในสุกรที่เสริมสไปรูลิน่า 3 กรัมต่อตัวต่อวัน และมีสุกรป่วยต่ำกว่า (2.40 และ 2.13%) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริมสไปรูลิน่ามีอัตราการป่วยเท่ากับ 5.40 เปอร์เซ็นต์ (Nedeva et al., 2014) ยังสามารถช่วยเพิ่มความสมดุลของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่สำคัญ เช่น กระตุ้นการทำงานของ INF- $\gamma$  และ NK cell มีผลต่อการต้านสารก่อภูมิแพ้ที่โดยเพิ่มศักยภาพการผลิต IgA ซึ่งบทบาทที่อาจเกิดขึ้นจากผลการได้รับสไปรูลิน่า อยู่ในส่วนของภูมิคุ้มกันเยื่อ (mucosal immunity) ดังนั้นการทดสอบตัวชี้วัดในการนำสไปรูลิน่ามาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสุกรระยะอนุบาล นอกเหนือจากการวัดประสิทธิภาพการผลิตแล้ว ยังศึกษาตัวชี้วัดเชิงลึก ได้แก่การตอบสนองของการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน จากลำไส้ และม้าม และวัดการตอบสนองของเซลล์เยื่อผนังลำไส้เล็ก ที่ส่งผลถึงความสามารถในการดูดซึมสารอาหารของสไปรูลิน่าหมัก และมีค่าสูงกว่าที่ระดับการเสริม 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ดังนั้นการเกิดการอักเสบในลำไส้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่เนื่องจากกลุ่มที่เสริมระดับสูงสุดถึง 20 กรัมต่อกิโลกรัม นั้นส่งผลเชิงลบ IL-12(p40) แสดงออกสูงกว่า Cyclophilin A ( $P < 0.01$ ) สอดคล้องกับการศึกษาการใช้สารสกัดจากสาหร่ายทะเล (Reilly et al., 2008) IL-8 แสดงออกในเนื้อเยื่อลำไส้เล็กโดยแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Furbeyre et al. (2018) ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าและสาหร่ายคลอเรลลา กลุ่มที่ให้สไปรูลิน่า และกลุ่มที่ให้คลอเรลลา ในเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลางไม่พบการแสดงออกของไซโตไคน์แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ความสัมพันธ์ระหว่างการให้กลุ่มของสาหร่ายต่อการเพิ่มขึ้นของ IL-8 และ IL-10 ที่ส่วน TNF- $\alpha$  และ IL-1 มีแนวโน้มแสดงออกเพิ่มขึ้น ( $P < 0.10$ ) ที่เนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลาง TGF- $\beta$  ลดลงในวันที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนหย่านม 1 วัน ( $P < 0.01$ ) ส่วนการแสดงออกของ Occludin ใน Peyer's patch มีแนวโน้มลดลงในกลุ่มที่ให้สไปรูลิน่าร่วมด้วยกับคลอเรลลาของสุกรหย่านมมากกว่าลูกสุกร

การเปลี่ยนแปลงระดับภูมิคุ้มกันที่เยื่อ (mucosal immunity) มีการพัฒนา และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่สามารถเลี้ยงเซลล์ให้เพิ่มจำนวน และการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของ lymphoid progenitor cell และ myeloid cell ทำให้สามารถพิสูจน์ทราบปัจจัยการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด และการกระตุ้นการสร้างสารสื่อต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์และทำลายเซลล์ ซึ่งเกิดจากแมคโคฟาจที่ถูกกระตุ้นสามารถสร้างสารหลายชนิดเพื่อต่อต้านจุลินทรีย์และทำลายเซลล์ที่ถูกจับกิน ซึ่งสารหลายชนิดเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจน หรือไนโตรเจน เป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์

ระหว่างกระบวนการฟาโกไซโทซิส จะมีอัตราการหายใจภายในเซลล์ของแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นอยู่ในระดับสูง ในกระบวนการนี้เอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) บนเมมเบรน ของเวซิเคิล (vesicle) จะเร่งปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของออกซิเจนเป็น Superoxide anion ซึ่งเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เมื่อเซลล์แมคโครฟาจได้รับการกระตุ้นจากองค์ประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียต่าง ๆ เช่น lipopolysaccharide (LPS) หรือ muramyl dipeptide (MDP) ร่วมกับไซโตไคน์ เช่น IFN- $\gamma$  จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ nitric oxide synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ L-arginine เป็น nitric oxide(NO) เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถรวมกับ superoxide anion เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วย ซึ่งปัจจุบันพบว่าปฏิกิริยาการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย รา โปรโตซัว พยาธิต่าง ๆ เกิดจาก nitric oxide(NO) และสารอนุพันธ์ต่าง ๆ หรือ TNF- $\alpha$  เป็นส่วนหนึ่งของการปรับระดับของ hydroxyl radicle เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจน ในการนี้กลไกจากการทำลายจุลินทรีย์โดยกระบวนการที่ใช้สารที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจนแล้ว แมคโครฟาจยังมีการสร้างเอนไซม์และเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ ซึ่งแมคโครฟาจสามารถหลั่งโปรตีนต่าง ๆ ที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน คือ ไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ ต่อการส่งเสริมการเกิดกระบวนการอักเสบ และอาการป่วย นอกจากนี้ยังมีการหลั่งคอมพลีเมนต์โปรตีน (complement protein) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการกำจัดแอนติเจนแปลกปลอมและกระตุ้นกระบวนการอักเสบ ซึ่งแหล่งที่สร้างคอมพลีเมนต์ในร่างกาย คือ ตับ โดยจะมีไลโซโซม (Lysosomes) จะหลั่งออกนอกเซลล์เมื่อแมคโครฟาจถูกกระตุ้น ซึ่งก่อให้เกิดอาการอักเสบและบางครั้งอาจเกิดการเสียหายของเนื้อเยื่อในบริเวณที่ถูกกระตุ้น ทั้งเนื้อเยื่อของอวัยวะหลัก และโครงสร้างการดูดซึมโภชนะของอาหารภายในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่มีส่วนต่อการเจริญเติบโต และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จากผลการศึกษา Pie et al. (2003) ได้ศึกษาผลของการหย่านมต่อการเชื่อมโยงการควบคุมการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกิดการอักเสบในลำไส้ของลูกสุกร พบว่าไซโตไคน์มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกัน แต่ก็ยังมีส่วนช่วยรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อบุลำไส้ ซึ่งเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหัน การเปลี่ยนแปลงปัจจัยด้านอาหารและสิ่งแวดล้อมต่อสัญญาณวิทยาลำไส้ โดยมีช่วงเวลา 0, 1, 2, 5 และ 8 วันหลังจากหย่านมโดยใช้ RT-PCR มีการตอบสนองแบบเฉียบพลันในช่วง 0-2 วัน หลังจากหย่านม พบการตอบสนองของ IL-1, IL-6, และ TNF-messenger RNA (mRNA) เพิ่มขึ้น ส่วนช่วง 2 และ 8 วันมีการแสดงออกของ IL-1, IL-6 ส่วน IL-12 p40 และ IL-18 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งเป็นการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกิดการอักเสบในลำไส้ลดลงเมื่อ 8 วันหลังจากหย่านมโดยเปรียบเทียบ Cyclophilin ใช้เป็น housekeeping genes สำหรับกิจกรรมหย่านมของสุกรหลังจาก การได้รับเชื้อและเกิดการอักเสบ ยืนยันกล่าวจะ

ลดลงหลังจากวันที่ 2 ของการหย่านมเนื่องจากการเนื้อเยื่อลำไส้ลดการเกิดอักเสบลง สอดคล้องกับ McCracken et al. (1995) พบว่าการแสดงออกของ IL-1 เพิ่มขึ้นทุกส่วนของลำไส้เนื่องจากความเครียดจากการหย่านม จะกระตุ้นแบบจำเพาะเจาะจง หรือแม้กระทั่งการทดสอบการตอบสนองต่อแบคทีเรียพบว่า IL-1, IL-6 และ TNF-mRNA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อปล่อยให้สัตว์มีการปรับตัว ยืนเหล่านี้ก็จะค่อย ๆ ลดลงซึ่งสะท้อนว่าสัตว์มีการปรับตัวหลังจากได้รับเชื้อและตอบสนองต่อการทำงานการเกิดสภาวะอักเสบหรือแม้กระทั่งการทดสอบการปนเปื้อน deoxynivalenol (DON) ในข้าวสาลีซึ่งเป็นวัตถุอาหารสุกร มีผลต่อปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตลดลง ส่วนการแสดงออกของไซโตไคน์หลังจากที่ได้รับ 24 วัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของยีน IL-1, IL-6, IL-10, TNF, TLR -4 และ IL-8 ที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย แต่ยีน Claudins 2 เพิ่มขึ้นที่ลำไส้เล็กส่วนปลายเมื่อสุกรได้รับข้าวสาลีปนเปื้อนที่ระดับสูงสุด 0.20–0.40 ppm เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่โดยภาพรวมการปนเปื้อนของ DON ไม่มีผลต่อลักษณะพื้นฐานวิทยาลำไส้ของสุกร (Pasternak et al., 2017) สำหรับการทดสอบ lipopolysaccharide ต่อการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-2, IL-4, IFN- $\alpha$  และ IL-10 ต่อปัจจัยการกระตุ้น GM-CSF เป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว และปัจจัยการเจริญเติบโตของสุกร 5 วันหลังคลอด 40 วัน และ 120 วันหลังจากหย่านม หลังจากที่ได้รับ LPS ที่ 24 ชั่วโมง พบว่า IFN- $\alpha$  มีการแสดงออกส่วนใหญ่ในลูกสุกรแรกคลอดและหลังหย่านม แต่การแสดงออกของ GM-CSF แสดงออกสูง แรกคลอด และหย่านม โดยเฉพาะที่ 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกของ IL-2 ในทุกอายุของสุกร (Islam et al., 2013) และ การใช้สารร้ายไปรูลินาและคลอเรลลา โดยวิธีให้ทางปาก 385 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ในสุกร ช่วงดูตนมอายุ 14 วัน และก่อนหย่านม 14 วัน ถึงหลังหย่านม 14 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เนื้อเยื่อของลำไส้ พบว่าการให้สารร้ายทั้ง 2 ชนิดไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่ 14 วันหลังจากหย่านม แต่ IL-8 สไปรูลินาแสดงออกที่เนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนปลายของสุกรก่อนหย่านม 1 วัน และหลังหย่านม 2 วัน ต่อระยะเวลาการให้ 14 วัน และ คลอเรลลา ที่เนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลาง IL-1 $\beta$  แสดงออกที่สุกรหย่านมที่ให้ตลอด 14 วันหลังจากหย่านม ( $P < 0.05$ ) อีกทั้งยังสามารถลดอัตราการเกิดท้องเสียได้ถึง 50% ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่ากลุ่มการทดลองที่ได้เสริมสารร้ายมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดปัจจัยเสี่ยงและอิทธิพลของความเครียดของสุกรช่วงหย่านม (Fubeyre et al., 2018)

### 5.1.11 ผลของการเสริมสไปรูลินำหมักต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน

จากการเสริมสไปรูลินำหมักด้วยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกเพื่อทำการปรับคุณสมบัติของสาหร่ายสไปรูลินำให้มีคุณสมบัติต่อการใช้ได้ประโยชน์มากที่สุดของสุกรช่วงหลังจากหย่านม อีกทั้งคุณสมบัติหนึ่งที่มีความสนใจของสไปรูลินำต่อจากปริมาณของกลุ่มของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญต่อการกระตุ้น และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ หลังจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และสารชีวเคมี จึงกำหนดให้สไปรูลินำหมักเป็น **“สารเสริมภูมิคุ้มกันจากสไปรูลินำหมัก”** ใช้เสริมในอาหารสุกรช่วงหย่านม ที่มีคุณสมบัติ 5 ประการ (Shokryazdan et al., 2017) 1) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และประชากรของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสารเสริมดังกล่าวเข้าไปกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งสามารถยับยั้งการหลุดลอกเนื้อเยื่อผิวของลำไส้ที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษในระบบทางเดินอาหาร 2) ส่งเสริมกระบวนการหมักในระบบทางเดินอาหารส่วนท้าย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มขึ้นของ กรดไขมันระเหยง่าย ได้แก่ Vitamins, Butyrate, Propionate, Acetate และ Pyruvate และสัตว์ใช้ประโยชน์ต่อการประสิทธิผลการเจริญเติบโต 3) สนับสนุนการทำงานของลำไส้ โดยปรับสมดุลการดูดซึมสารอาหารผ่านลำไส้ 4) ปรับปรุงลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้ เช่น การเพิ่มขึ้นของวิลไล ความลึกของคริปต์ และเพิ่มจำนวนกอบเล็ทเซลล์ต่อวิลลัส 5.) กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยการเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ ยับยั้งการเกิดสภาวะอักเสบ (anti-inflammatory) หรือ การเกิดสภาวะอักเสบ (proinflammatory cytokines) สำหรับไซโตไคน์ที่ไม่หลังในภาวะปกติแต่จะหลังออกมาในสภาวะที่มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเช่น ภาวะที่มีการติดเชื้อซึ่งไซโตไคน์ส่วนใหญ่ที่หลังออกมาจะอยู่ในกลุ่มของ IL-1, TNF และ IFN สภาวะนี้จะมีประโยชน์ต่อเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Gut Associated Lymphoid Tissues ; GALT) ส่วนกลุ่มของ Interleukins เช่น IL-1 Beta และ Gamma จะผลิต Macrophages, B cell, monocytes, dendritic cells ซึ่งมีเซลล์เป้าหมายที่ T helper cells, B cell, natural killer (NK) cell, macrophages และ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelium cell) ส่วนกลุ่มของ IL-12 สามารถผลิต Dendritic cells, B cells, T cells, macrophages ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ T cells, NK cells จากรายงานการศึกษาสาหร่ายและการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Raja et al., 2010) สามารถกระตุ้น Monocytes และ macrophages มีหน้าที่ phagocytes ซึ่งทำหน้าที่ในการป้องกันที่ไม่จำเพาะเจาะจง บทบาททั่วไปจะเข้าไปทำลายเซลล์ที่เคลื่อนที่ และไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่น ๆ เพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือแอนติเจน โดยจะหลั่งสาร เช่น ไนตริกออกไซด์ และไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์การต้านการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) เช่น IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 จะ

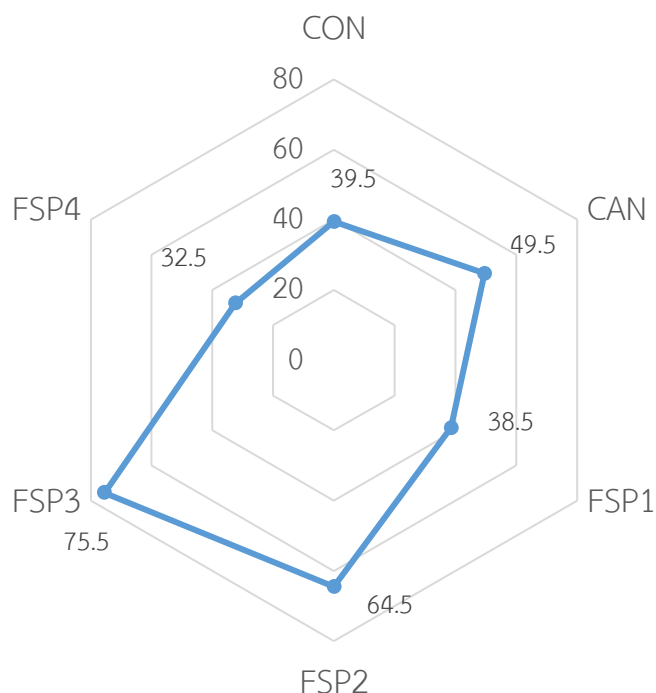
ถูกหลั่งออกมาเมื่อเกิดสภาวะอักเสบ และไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการอักเสบ ไซโตไคน์เหล่านี้จะมีการกระตุ้นระบบการป้องกันทางชีวเคมี เช่น complement system, coagulation pathway และ kinin เป็นต้น จะไปกระตุ้น endothelial cells เซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นจะมีการปล่อย secondary mediators ได้แก่ NO, prostaglandins, vasoactive agents, endorphins, free-O<sub>2</sub> radicals เป็นต้น ผลที่เกิด เช่น อาการไข้ ปวด บวม แดง ร้อน หลังจากนั้นจะเกิดการยับยั้งการเกิดสภาวะอักเสบ ส่วนนี้จะหลั่งตามมาเพื่อมายับยั้งผลของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-4, IL-10 การทำงานร่วมกันของ anti-inflammatory cytokines จะตามมาในช่วง late phase เพื่อมายับยั้งผลของ pro-inflammatory ซึ่ง cytokines ที่เป็นตัวแทนของ anti-inflammatory cytokines ที่มีการศึกษากันคือ IL-10

ในกรณีที่สุกรติดเชื้อแบคทีเรีย ชั้นแรกร่างกายจะป้องกันตัวเองด้วย Mucosal epithelium ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ โดยจะสร้าง IL-8 ซึ่งทำหน้าที่ส่งสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวทำลายสิ่งแปลกปลอม เมื่อเกิดการทำงานแล้วจะมีการสร้างไซโตไคน์ที่สำคัญคือ Tumor necrotic factor (TNF) แต่เนื่องจากไซโตไคน์ตัวนี้ค่อนข้างตรวจวัดยากคงอยู่ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากร่างกายติดเชื้อ และมีความแปรปรวนสูง (Petrov et al., 2014) จากคุณสมบัติของไซโตไคน์ข้างต้น การศึกษาไซโตไคน์ที่สามารถแสดงออกต่อการใช้สไปรูลิน่าหมักในช่วงสุกรวัยอ่อน เช่น TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12(p40) โดยเปรียบเทียบปริมาณสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน Cyclophilin A ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ (housekeeping gene) โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมด้วยกับการประเมินการตอบสนองต่อวัคซีนปากและเท้าเปื่อยสุกร (กรมปศุสัตว์) และวัคซีน Porcine Circovirus (PCV) จากเนื้อเยื่อของลำไส้เล็กส่วนกลาง และม้ามของสุกรหย่านมอายุ 32 วันหลังจากหย่านมหลังจากได้รับการเสริมสไปรูลิน่าหมักตามแผนการทดลอง ผลของการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนกลางพบว่า IL-1 $\beta$  ของกลุ่ม FSP2-3 แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  ของ FSP4 แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วน IL-12(p40) ของ CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และ กลุ่ม FSP1-3 แสดงออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วนเนื้อเยื่อม้ามพบว่า IL-1 $\beta$  ของกลุ่ม FSP1,3,4 แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  ของ CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON ( $P < 0.05$ ) ส่วน IL-12(p40) ของกลุ่ม FSP2-3 แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และกลุ่ม FSP4 แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON ( $P < 0.05$ ) สำหรับการฉีดวัคซีน FMD (A,O) (กรมปศุสัตว์) ฉีดครั้งที่ 1 และ PCV2 ของสุกรช่วง 28 วันหลังจากหย่านม ศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เสริม CAN และ FSP พบว่า TNF- $\alpha$ , IL-12(p40) และ IL-1 $\beta$  แสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุม และสูงขึ้นตามระดับการเสริม FSP ที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่อม้าม จึงจัดไซโตไคน์เหล่านี้เป็น Pro-inflammatory cytokines ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองเปลี่ยนแปลงปลอม จากนั้นปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันเกิดจากแอนติเจนทำงาน

และให้ผลเชิงบวกต่อการกระจายวัคซีนไปยังเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับการแสดงออกของ TNF- $\alpha$  ในกลุ่ม CAN แสดงออกสูงกว่ากลุ่ม CON และ FSP1-4 ( $P < 0.05$ ) เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงช่วงก่อนและหลัง 3 วันของการฉีดวัคซีนในสุกรไม่ควรผสมยาปฏิชีวนะลงในอาหาร เนื่องจากการแสดงออกของไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าปกติจะมีส่วนในการกีดขวางการทำงานของวัคซีน ส่วนการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ในเนื้อเยื่อไขมันของกลุ่มที่เสริมสาหร่ายหมัก 15-20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (FSP3-4) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโตและลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของสุกรหย่านมมีทิศทางเชิงลบ ส่วน IL-12p40 เป็นไซโตไคน์ที่บ่งบอกถึงการตอบสนองต่อการป้องกันเซลล์จากแบคทีเรียและไวรัสที่เข้าไปในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งการทดลองดังกล่าวได้มีการฉีดวัคซีนก่อนการการุณยฆาต 3 วัน เพื่อศึกษาการตอบสนองของการเสริม FSP ต่อการแสดงออกของยีนที่ได้กล่าวมาข้างต้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang และคณะ (2018) ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์การฉีด FMD (A,O,asia1) โดยการกระตุ้นด้วย LPS ศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ คือ interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-2, (IL-2), IL-4, and IL-6 mRNA โดยเฉพาะ T cell จะตอบสนองหลังจากการฉีดวัคซีน เช่น CD4 หรือเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแอนติเจนชนิด CD4 บนผนังเซลล์ ทำหน้าที่ส่งเสริมเรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่น เช่น B cell และ T cells ในการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ เพื่อการเปลี่ยนเป็น cytotoxic T cells (CTL) ดังนั้น CD4+ T cells จึงมีความสำคัญมาก เพราะมีส่วนร่วมในการทำให้ภูมิคุ้มกันทั้งแบบเซลล์และสารน้ำ ส่วนเซลล์ CD8 หรือ killer cells หรือ suppressor cells เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแอนติเจนชนิด CD8 บนผนังเซลล์ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติหรือที่ติดเชื้อจุลชีพ helper T (Th) cells โดยหลังจากการฉีด FMD เปอร์เซ็นต์ของ CD4 + lymphocytes และอัตราส่วน CD4 / CD8 หลังการฉีดวัคซีนมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับการแสดงออกของ IFN- $\gamma$  mRNA หลังการกระตุ้นโดย LPS อีกทั้ง IL-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) เป็นไซโตไคน์ที่มีเป้าหมายกระตุ้นการตอบสนองต่อการทำวัคซีน FMD เนื่องจากมีเซลล์เป้าหมายที่ T helper cells และการเปิดใช้งาน T cells (Shokryazdan et al., 2017) และยิ่งสรุปได้ว่า IL-12p40 มีการตอบสนองในเนื้อเยื่อไขมันสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในกลุ่มที่เสริมสาหร่ายหมัก 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัม (FSP2 และ 3) ซึ่งสอดคล้อง IL-1 $\beta$  ในเนื้อเยื่อลำไส้ และไขมันที่ระดับการเสริม 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ซึ่งจัดเป็น pro-inflammatory cytokines เป็นกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดการอักเสบ รวมถึงการตอบสนองและกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีน FMD ควบคุมผ่าน natural killer cell (NK cell) and macrophage โดยที่ IL-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) เป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าว (Zhang et al., 2002) ดังนั้นสามารถสรุปผลของการเสริมสไปรูลินาหมักที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัม (FSP4) ส่งผลให้ IL-1 $\beta$  ในลำไส้ และ IL-12p40 ในไขมันสูงซึ่งมีการกระตุ้นการต้านการอักเสบ และตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันโดยการฉีดวัคซีนได้อย่างต่อเนื่องต่อการ



เสริมที่ระยะสูงขึ้น สามารถสังเกตได้ว่าไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นต่อเนื่องสำหรับการเสริมสไปรูลิน่าหมักเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอาจเป็นอิทธิพลของการทำวัคซีน FMD สอดคล้องกับงานทดลองที่ผ่านมาของ (Guzmán et al., 2001, Suárez et al., 2006 Rasool and Sabina, 2009) ที่ได้ศึกษาการตอบสนองสารประกอบ Polysaccharides จาก *Chlorella pyrenoidosa* และศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารประกอบ Polysaccharide จาก *Chlorella stigmatophora*, *Phaeodactylum tricornutum* และ *Spirulina fusiformis* สาหร่ายเหล่านี้มีสารประกอบ Immurella และ Immulina ทำหน้าที่ส่งสัญญาณไปยังเซลล์เพื่อหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ดังนั้นการเสริมสไปรูลิน่าในระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารในสุกรตรวจพบการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมในเนื้อเยื่อลำไส้ ซึ่งสอดคล้องกับการตอบสนองของเนื้อเยื่อมาจากระดับการเสริมที่สูงขึ้นของสไปรูลิน่าหมักส่งผลเชิงบวกต่อการตอบสนองของ TNF- $\alpha$  แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในทางกลับกันกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะส่งเสริมให้การแสดงออกของ TNF- $\alpha$  ในเนื้อเยื่อสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) สำหรับระดับการเสริมที่ 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ต่อการแสดงออกของไซโตไคน์สามารถเรียกไซโตไคน์เหล่านี้เป็น pro-inflammatory cytokines ซึ่งทำหน้าที่ในตอบสนองและการกระตุ้นการต้านสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าไปในร่างกายโดยทำหน้าที่สั่งให้แอนติเจนทำงานได้ดีในช่วงที่สุกรภูมิคุ้มกันต่ำ โดยสไปรูลิน่าเป็นสารเสริมที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของไซโตไคน์ได้มากขึ้น อีกทั้งเมื่อพิจารณาพร้อมกับประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ และการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน จากผลประเมินระดับการเสริมต่อดัชนีชี้วัด การเสริมที่ระดับ 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารให้ผลเชิงบวก (64.5 และ 75.5 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในภาพ 28 โดยผลของการเสริมสามารถลดอัตราการเกิดท้องเสีย และปรับปรุงลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ของสุกรดีกว่ากลุ่มทดลองอื่น สอดคล้องกับ Furbeyre et al. (2018) สรุปหน้าที่และความเชื่อมโยงต่อการตอบสนองของ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-12(p40) จะมีการตอบสนองที่สูงขึ้นเมื่อสุกรฟื้นตัวจากความเครียดและเมื่อเริ่มกินอาหารได้มากขึ้น ส่วน TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้ รวมถึงผลกระทบและการป้องกันการสิ่งแปลกปลอมเข้าภายในเซลล์ของบริเวณลำไส้ อีกทั้งยังตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนอีกด้วย ส่วน IL-12p40 ของสุกรช่วงหย่านมมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วและชั่วคราวต่อการเกิดการอักเสบในลำไส้ อวัยวะของสัตว์ที่มีต่อมน้ำเหลือง และอวัยวะของระบบภูมิคุ้มกันโดยทั่วไป แล้วมีการตอบสนองในรูปแบบทางตรงต่อบริเวณระบบทางเดินอาหาร และเซลล์ที่เกี่ยวข้อง ส่วนทางอ้อมนั้นมีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์ การลดการเกิดการอักเสบ อัตราการป่วย และลดการเกิดสภาวะท้องเสีย

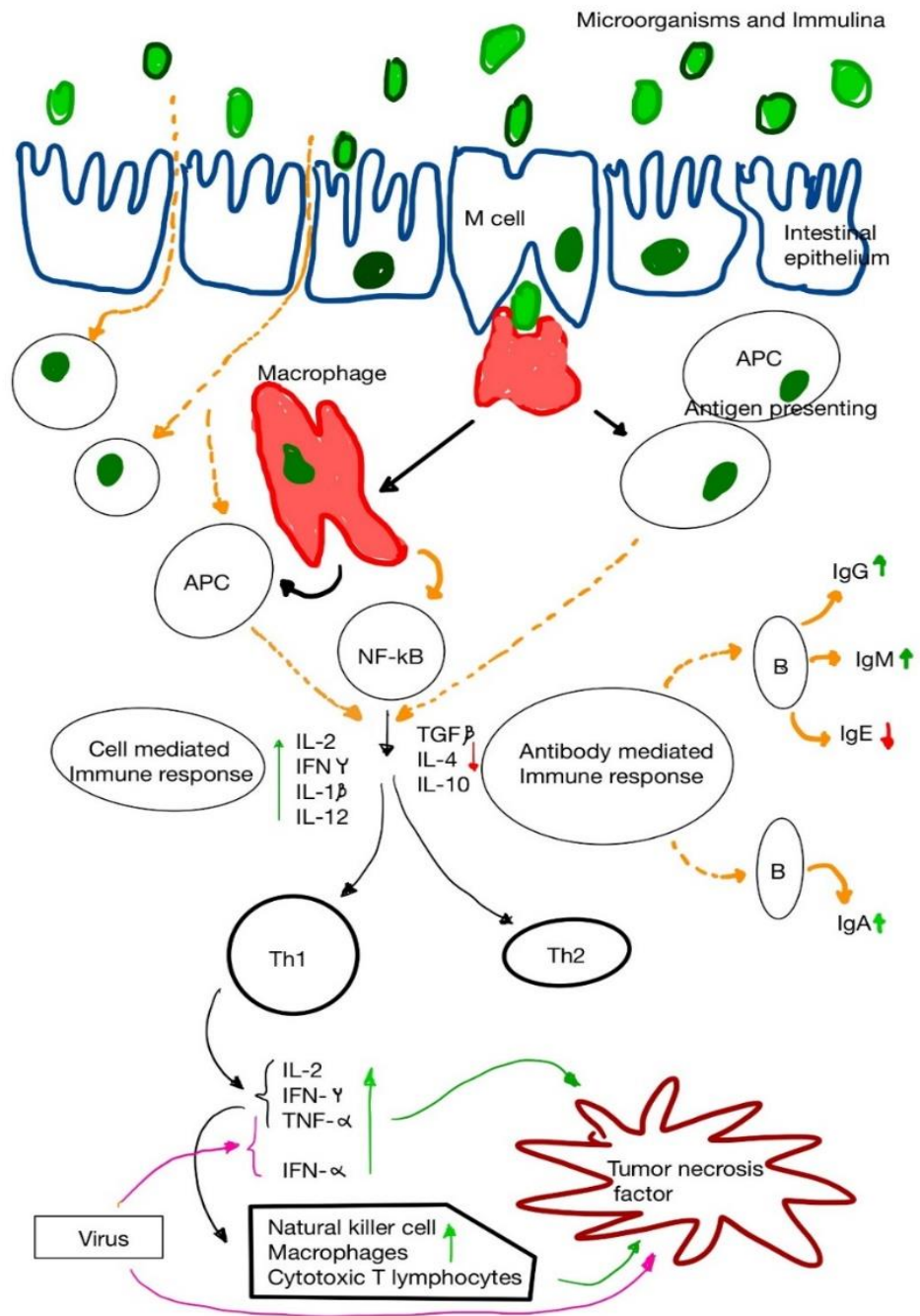


ภาพ 28 Performance percentages and comparison conditions of each parameter in weaning pig fed diet supplemented with fermented spirulina (FSP)

จากความสัมพันธ์ที่ได้สรุปมาข้างต้นเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างสารสื่อเพื่อตอบสนองต่อการทำงานของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อและร่างกายที่เราเรียกว่า ไซโตไคน์ จัดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีหน้าที่ในการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของ โมโนไซต์ และแมคโครฟาจ ต่อการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยวิธี phagocytes เป็นการทำงานป้องกันอย่างจำเพาะเจาะ หรือช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์แบบเชิงป้องกัน ซึ่งการกินและย่อยสลายเชื้อโรคที่เข้าไปในร่างกายไม่ว่าจะอยู่นิ่งหรือเป็นเซลล์ที่เคลื่อนที่ รวมถึงเป็นการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่นๆ (Raja, & Hemaiswary. 2010) เพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคโดย แมคโครฟาจ ทำหน้าที่เป็น Antigen presenting cell (APC) คือ ส่งสัญญาณจากแอนติเจนต่อมายังเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิด T lymphocyte เพื่อรับหน้าที่ต่อไป โดยที่ทำหน้าที่หลักของแมคโครฟาจต่อการหลั่งไซโตไคน์ ที่มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณ ไปยังเซลล์เป้าหมายต่อเพื่อกระตุ้นการตอบสนองต่อการอักเสบ เช่น TNF, IL-1 และ IL-8 เมื่อเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบต่อการติดเชื้อหรือการกระตุ้นจากเชื้อ เช่น การฉีดวัคซีนซึ่ง TNF, IL-1 และ IL-8 จะเกิดการหลั่งจาก Proinflammatory cytokines เป็นกลุ่มของไซโตไคน์ที่ไม่หลั่งในภาวะปกติแต่จะหลั่งออกมาในสภาวะที่มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ

ร่างกายเช่น ภาวะที่มีการติดเชื้อเช่น IL-10 มีหน้าความสำคัญต่อการลดการเปิดการอักเสบ และรักษาสมดุลของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในอวัยวะที่สำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Raja et al. (2008) ได้ศึกษาอาหารที่เสริมกลุ่มของสาหร่ายพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างแอนติบอดีที่ถูกสร้างมาจากม้ามเพื่อตอบสนองต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมถึงสาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ และการผลิต IL-1 แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ IgG สำหรับ IL-1 ยังเป็นไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพรวมถึงกระตุ้นกระบวนการอักเสบต่าง ๆ และการชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Acute phase protein คือกลุ่มโปรตีนที่สร้างจากตับ ซึ่งจะสร้างออกมามากขึ้นเป็นพิเศษระหว่างที่ร่างกายมีการตอบสนองต่อเชื้อโรค และยังมีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองของระบบประสาทโดยตรงอีกด้วย (Mosmann, & Coffman. 1989) ดังแสดงในภาพ 29

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาเรียงต่อกันมากกว่า 2 โมเลกุลขึ้นไป เช่น แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส เป็นต้น เมื่อนำกลุ่มของโพลีแซ็กคาไรด์ของสไปรูลิน่าไปสกัดพบว่ามีสำคัญที่มีชื่อว่า Immulina และในสไปรูลิน่ายังพบว่ามีกลุ่มของ โฟโคไซยานิน ซึ่งเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ ส่วนประกอบเหล่านี้เป็นที่ทราบกันดีว่าส่งผลดีต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยการเกิดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง Granulocyte ได้แก่ Neutrophil, Eosinophil และ Basophil เป็นต้น รวมถึง โฟโบริบลาสต์ ซึ่งได้ผ่านการทดสอบจากเซลล์ไขกระดูกของหนู (Hayshi et al., 2004) ส่วน “อิมมูลิน่า” จากสาหร่ายสไปรูลิน่ายังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B คือ transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการอักเสบ สำหรับกระบวนการอักเสบแบบเรื้อรัง และป้องกันการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ (วนิษา ปันฟ้า และพรสิริ พิจการ, 2558) อีกทั้งยังสามารถเหนี่ยวนำ IL-1 $\beta$  และ TNF ในมนุษย์ และยังพบว่าอีกว่าการกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B โดย อิมมูลิน่า ช่วยส่งเสริมให้ CD14 และ TLR2 ซึ่งเป็นกิจกรรมการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ Macrophages (Grzanna et al., 2006) ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ T cell receptor (TCR) ให้ NF- $\kappa$ B ซึ่งมีส่วนส่งเสริมการทำงานของ Th1 และ Th2 ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นสื่อกลางของการเกิดอักเสบ สภาวะการติดเชื้อ โดยเฉพาะ Th1 จะควบคุมการส่งสัญญาณเหนี่ยวนำการหลั่งไซโตไคน์ เช่น IL-12 เป็นต้น (Liu et al., 2017) สำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูลิน่าที่สำคัญคือ โฟโคไซยานิน (PC) เป็นเม็ดสีโปรตีนที่ละลายน้ำได้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง มีความสามารถในการต้านมะเร็งและเพิ่มภูมิคุ้มกัน (Li et al., 2004) ช่วยลดการแสดงออกของ CD59 เป็นปัจจัยต่อการสลายตัวภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งมีผลในการเกิด hemoglobinuria และลดการตายของเซลล์ อีกทั้งยังพบว่า CD59 มีบทบาทที่สำคัญต่อการควบคุมภูมิคุ้มกัน และมีความสัมพันธ์กับอาการปวด และอักเสบ (McGeer et al., 1991; Raja, & Hemaiswary. 2010)



ภาพ 29 Hypothesized mechanism of immunomodulation.

ที่มา: adapted from Raja, & Hemaiswary. 2010

### 5.1.12 ต้นทุนการผลิตสไปรูลิน่าหมัก และความคุ้มค่า

ต้นทุนของสารเสริม FSP สำหรับสุกรช่วงหย่านม เฉลี่ยอยู่ที่ 311 บาทต่อกิโลกกรัม ซึ่งเป็นต้นทุนที่เกิดจากการผลิตระดับห้องปฏิบัติการ และขนาดต้นแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งคาดว่าต้นทุนจะลดลงเมื่อผลิตในภาคอุตสาหกรรม หรือสามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าได้ในฟาร์มสุกร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่แนะนำให้ใช้ในสุกรหย่านม 10 - 15 กรัมต่อกิโลกกรัมอาหาร จากข้อมูลพื้นฐานปริมาณอาหารที่สุกรอายุ 1-4 สัปดาห์เฉลี่ยกินอาหารตลอดการเลี้ยง 25-30 กิโลกรัมต่อตัว ถ้าหากเสริม FSP ที่ระดับต่ำสุด 10 กรัม พบว่าจะมีต้นทุน เพิ่มขึ้น 3.11 บาทต่อตัว แต่เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ลดอัตราการเกิดท้องเสีย ส่งเสริมสุขภาพของระบบทางเดินอาหาร และกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถต้านทานโรค เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงสุกรในภาคอุตสาหกรรมขนาดใหญ่จะมีอัตราการตายในช่วงอนุบาล รุน และขุน 3-6 เปอร์เซ็นต์ (Gebhardt et al., 2020) ซึ่งในกรณีจึงขอยกตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงสุกรในปัจจุบันของประเทศไทยในกรณีที่มีอัตราการตาย 6 เปอร์เซ็นต์จาก 650 ตัวต่อเล้าต่อรอบ จะต้องมีสุกรตายเนื่องจากอาการที่เกิดจากปัจจัยความเครียด การปรับของระบบทางเดินอาหารจากช่วงดูนมเข้าสู่ช่วงกินอาหารเม็ด เสียหายจากสภาวะโธรมเนื่องจากสาเหตุท้องเสียเรื้อรัง และตายเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันต่ำ ประมาณ 36 ตัว ถ้าหากใช้ FSP สามารถลดอัตราการตายได้ 10% ของอัตราการตายทั้งหมดหรือประมาณ 4 ตัวพบว่าผู้ประกอบการจะได้เงินส่วนต่างเพิ่มขึ้น 38,400 บาทต่อรุ่นของการเลี้ยง สำหรับการเปรียบเทียบเชิงมหภาคการเลี้ยงสุกรในประเทศไทย ณ ปัจจุบัน มีการเลี้ยงสุกรสุกรขุนที่อยู่ในระบบกว่า 20,000,000 ตัวถ้าหากสามารถลดอัตราการตายได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของอัตราการตายเฉลี่ยจะส่งผลต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร ซึ่งจะได้ค่าตอบแทนที่เป็นเงินส่วนต่างเพิ่มขึ้นกว่า 1,152,000,000 บาทสำหรับการใช้ FSP เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมช่วยปรับสมดุลของภูมิคุ้มกันในอาหารสุกรช่วงอนุบาลสามารถสร้างผลกำไรให้อุตสาหกรรมการผลิตสุกรเพิ่มมากขึ้น

## 5.2 สรุปผลการวิจัย

1) การทดแทนสูตรอาหารซารูด้วยอินทรีย์วัตถุจากน้ำบ่อไบโอแก๊สที่ระดับการเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ได้ค่าประเมินประสิทธิภาพผลลัมฤทธิ์ 85 เปอร์เซ็นต์ โดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงพีเอส ความหนาแน่นของเซลล์ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ ไฟโคไซยานิน โพรตีน ไขมัน มวลสไปรูลิน่า และต้นทุนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยต้นทุนการเพาะเลี้ยงสไปรูลิน่าด้วยน้ำบ่อไบโอแก๊สสามารถผลิตได้ในต้นทุน 141.053 บาทต่อกิโลกกรัม

2) การผลิตสไปรูลิน่าหมักโดยใช้ปริมาณ *L. plantarum* TISTR 2075 ที่ 4% หมักระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่ใช้ออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดซิตริก  $5 \pm 0.5$  เป็นปริมาณเชื้อที่ใช้ และระยะเวลาของการหมักที่ดีที่สุดจากการประเมินประสิทธิภาพการหมักมี

การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียแลคติก เนื่องจาก Total Phenolic Content (TPC) สูงขึ้นตามลำดับในช่วง 48 ชั่วโมง เพื่อจุดประสงค์การเพิ่มปริมาณสารประกอบทางชีวภาพและโภชนะของสไปรูลิน่าให้มากขึ้น ซึ่งพิจารณาจาก โปรตีน และพลังงาน ลดลงหลังจากการหมัก แต่ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์ เบต้า-แคโรทีน เพอร์เซ็นต์โพลีแซคคาไรด์ Antioxidant potential capacity (APC), Polyunsaturated Fatty acid, Unsaturated fatty acid และ Omega 6 -9 สูงขึ้น

3) การเสริมสไปรูลิน่าหมักในอาหารของสุกรช่วงอนุบาล 28 วันหลังจากหย่านมที่ระดับการใช้เสริม FSP 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้อาหารควบคุม และกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ ผลของการศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเด็นดังต่อไปนี้

3.1) การเสริม FSP ที่ระดับสูงสุดถึง 20 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร ส่งผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสุกรสำหรับการเสริม FSP ที่ระดับ 5, 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัม ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสุกร แต่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงกว่ากลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ ส่วนการเสริม FSP ในปริมาณ 15 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร สามารถลดอัตราการเกิดท้องเสียในสุกรหย่านมได้

3.2) การเสริม FSP 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ให้ผลดีต่อความสมบูรณ์ของลำไส้สุกร โดยเฉพาะ ลำไส้เล็กส่วนกลางซึ่งเป็นส่วนที่มีความยาวมากที่สุดและมีบทบาทในการย่อยและดูดซึมสารอาหารมากที่สุด

4) สุกรในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมยาปฏิชีวนะ และสไปรูลิน่าหมัก (FSP) ที่ระดับแตกต่างกัน นั้น สามารถตรวจสอบการออกของไซโตไคน์ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  และ IL-12p40 ในเนื้อเยื่อม้าม (spleen) และลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) นอกจากนี้การเสริม FSP 10-15 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถควบคุมการแพร่กระจายของวัคซีน PCV2 และ FMD ที่ฉีดให้สุกร ซึ่งพิจารณาได้จากการแสดงออกของไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  เพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่องต่อการเสริมสไปรูลิน่าหมักเพิ่มสูงขึ้น โดยการพิจารณา ร่วมกับผลการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 $\beta$  และ IL-12p40 จากเนื้อเยื่อลำไส้ และม้าม จัดเป็น pro-inflammatory cytokines ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเกิดการต้านสิ่งแปลกปลอม อีกทั้งสามารถช่วยป้องกันเชื้อก่อโรคเข้าไปในร่างกายในช่วงที่สุกรภูมิคุ้มกันต่ำ

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

1) การใช้น้ำเสียจากฟาร์มสุกรควรตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย และแร่ธาตุ ที่ตกค้างในน้ำเสียทั้งก่อน และหลังของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อประเมินการคุณภาพน้ำต่อระดับการใช้ประโยชน์ในการทดแทนสูตรอาหารซารุค และตรวจสอบแร่ธาตุบางชนิดที่อาจอยู่ในสาหร่ายซึ่งการตกค้างของแร่ธาตุเหล่านี้อาจเป็นพิษในสุกรได้

2) การตรวจสอบกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระของสไปรูulinaหมักควรมีการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทหนึ่งที่พบทั่วไปในอาหารที่มาจากพืช สารประกอบฟลาโวนอยด์ยังมีความสำคัญต่อการสร้างรงควัตถุในสาหร่ายและทำหน้าที่เป็นไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) ช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งช่วยต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการติดเชื้อก่อโรค สารประกอบนี้สามารถถูกย่อย และดูดซึมบริเวณลำไส้เล็กเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกจากการตรวจวัดสารประกอบฟลาโวนอยด์ และควรเปรียบเทียบก่อนและหลังการหมัก

3) การเก็บรักษาลำไส้ในสุกรสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มอลีน 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาลำไส้ที่เก็บมาประมาณ 10 เซนติเมตรต่อชิ้น ควรล้างอาหารภายในลำไส้ให้สะอาดด้วยสารละลายน้ำเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ฟอร์มอลีน 10 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 2 หลังจากเก็บรักษาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถชะลอการเก็บรักษาลำไส้ได้นานมากขึ้น

4) การทำอบแห้งสาหร่ายที่ผ่านหมักควรควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกิน 85 องศาเซลเซียส เนื่องจากจะส่งผลให้ กลุ่มของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง

5) ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของเนื้อเยื่อลำไส้ และม้ามของสุกรแต่ละตัวที่เก็บหลังจากการการุณฆาต เกิดจากจำนวนตัวอย่างหรือจำนวนสัตว์ที่เก็บตัวอย่างค่อนข้างน้อย ซึ่งพิจารณาจากความเหมาะสมในประเด็นจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่อการทดลอง อาจจะต้องพิจารณาเจาะเลือดตรวจคุณสมบัติของเลือด และระดับภูมิคุ้มกันจากเลือดร่วมด้วย เพื่อใช้ผลวิจารณ์ร่วมกับผลของการแสดงออกของไซโตไคน์จากเนื้อเยื่อลำไส้และม้าม

6) สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาองค์ความรู้ด้านการหมัก ด้านโภชนศาสตร์และการผลิตสัตว์ ซึ่งสามารถต่อยอดการพัฒนาสารเสริมภูมิคุ้มกันจากสไปรูulinaในสุกรที่ผลิตในประเทศไทยได้อย่างปลอดภัย มีความมั่นคง ยั่งยืนด้านอาหารสัตว์ และมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปส่งเสริมและประยุกต์การใช้ประโยชน์ในฟาร์มสุกร ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการส่งเสริมการใช้ประโยชน์สาหร่ายสไปรูulinaในอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้น โดยสอดคล้องกับตามแนวยุทธศาสตร์ 3S คือ อาหารปลอดภัย มั่นคง และยั่งยืน (feed Safety, Security & Sustainability) เพื่อลดต้นทุนอาหารสัตว์ ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เป็นสารเสริมที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเป็นการส่งเสริมการสร้างนวัตกรรมสารเสริมชนิดใหม่ใช้ในการผลิตสัตว์ที่มีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม





## บรรณานุกรม

- กาญจนา อุสุวรรณทิม. (2560). *หลักวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunological concepts)*. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- กาญจนาภาชน์ ลีวมโนมนต์. (2527). *สาหร่าย (Algae)*. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กระสินธ์ นพรัตน์ไมตรี. (2551). *ผลของสมุนไพรผสมฟ้าทะลายโจรและไพล ต่อสมรรถนะการผลิต การย่อยได้ของโภชนะและสุขภาพในลูกสุกรหย่านม*. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารสัตวแพทย์).  
ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จกกล พรมยะ, ขจรเกียรติ ศรีนวลสม, และอนุภาพ วรรณคณาพล. (2535). *การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirulina platensis ในน้ำทิ้งจากโรงอาหารเพื่อเป็นอาหารในการอนุบาล และเลี้ยงปลา แพลงก์ตอนสัตว์แบบยั่งยืน* (รายงานผลการวิจัย). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- จกกล พรมยะ, และศิริเพ็ญ ตริยไชยาพร. (2535). *การผลิตตรงควัตถุ กรดไขมัน คุณค่าทางโภชนาการ และต้นทุนการผลิต ในการเพาะเลี้ยง Spirulina platensis (Nordstedt) Geiteler: โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงอาหาร*. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 4(2), 44-52
- จกกล พรมยะ และขจรเกียรติ แซ่ตัน. (2548). *การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อสุขภาพ*. (รายงานผลงานวิจัย). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ชานี ดวงเทพ, จกกล พรมยะ, นิวุฒิ หวังชัย, บัญญัติ มนเทียรอาสน์, และชนกันต์ จิตรมนัส. (2554). *คุณค่าโภชนาการ และแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Oscillatoria sp.) ที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ*. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 5(1), 76-88.
- ณัฐพร จันทร์ฉาย และ จุฑารัตน์ สนธิรอด. (2561). *การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา (Spirulina platensis) ในน้ำหมักเศษเหลือข้าวโพดอาหารสัตว์*. *วารสารเกษตรพระการุณ*, 15(1), 194-203.
- ธำรง ประเสริฐรอด. (2539). *การบำบัดน้ำเสียจากน้ำหมักก๊าซชีวภาพมูลสุกรโดยใช้สาหร่าย Chlorella sp. และ Spirulina sp.* (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารสัตวแพทย์). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นิตยา ผาคำ. (2553). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักปลาต้ม*. การศึกษาอิสระ (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารสัตวแพทย์). พะเยา: มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.

- ปวันรัตน์ วิหังส์, พัชริน สงครี, พลัง สุริหาร, คมศร ลมไธสง, และ กมล เลิศรัตน์. (2557). ปริมาณสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผักข้าวจากสายต้นต่าง ๆ. *วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 42(1), 166-171.
- เพ็ญรัตน์ หงส์วิทยากร และ โฉมยง ไชยอุบล. (2546). การถ่ายทอดเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน. (รายงานผลการวิจัย). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยานิพนธ์ฉบับที่ 1 สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย*. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.
- รับพร กิตติวัชร (2556). *เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ. (2556). *ชีวิตกับสิ่งแวดล้อมสิ่งมีชีวิตกับกระบวนการดำรงชีวิต*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: อักษรเจริญทัศน์.
- ลัดดา ตรวงศา. (2556). *คู่มือการผ่าซากสัตว์และการเก็บตัวอย่าง*. กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- วนิษา ปันฟ้า และพรสิริ พิจารการ. (2558). กระบวนการอักเสบและการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก. *วารสารพิษวิทยาไทย*. 3078-3091.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. (2549). *วิทยาศาสตร์สาหร่าย (Phycology)*. (หน้า 25-30). กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- วรวิวรรณ บุญสมปอง. (2557). *การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกจากมันเทศ*. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์, และ มารุจ ลิ้มปะวัฒน์. (2553). แอสตาแซนธิน: คุณค่าที่มากกว่าความเป็นสี. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*. 5(1), 7-12.
- ศรธรรม ทองดี, วันดี ทาตระกูล, รังสรรค์ เจริญสุข, ทศพร อินเจริญ, สนธยา นุ่มท้วม, นิทัศน์ วิชาสิทธิ์, และอดิศักดิ์ คงแก้ว. (2562). ผลของ *Bacillus toyonensis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและการเกิดท้องเสียของสุกรหย่านม. *วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 47 ฉบับพิเศษ 2, 171-176.
- สามารถ พึ่งเจริญ. (2550). *การใช้ประโยชน์สาหร่าย Phormidium sp ร่วมกับสาหร่าย spirulina platensis ในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดจากฟาร์มสุกร*. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

- เสาวลักษณ์ เรืองอ่อน, และ ศักดิ์ศรี แสนยาเจริญกุล. (2560). การศึกษาปริมาณสารเบต้าแคโรทีนทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและจากฟักทอง. *งานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4*. (น. 1054-1060). กำแพงเพชร: สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.
- สุทิตา เข้มพะกา. (2563). *สารเสริมอาหารในการผลิตสัตว์ (Feed additives in animal Production)*. นครศรีธรรมราช: ห้างหุ้นส่วนจำกัด เลิศศิลป์ สาส์ณ โฮลดิ้ง.
- สุทิตา เข้มพะกา, และ วิทวัส โมฬี. (2554). *ผลของการเสริมกลูตามีนในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การพัฒนาของระบบทางเดินอาหารและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ*. (รายงานผลการวิจัย). นครราชสีมา: สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สุรียา ทุดปอ, และจิตรา สิงห์ทอง. (2560). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแก่นตะวันที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกัน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 19(3), 45-57.
- สุรียรัตน์ สุรงษา, บุญฤทธิ์ ทองทรง, สฤณี กลันทกานนท์ ทองทรง, และ รัฐ พิชญางกูร. (2555). ประสิทธิภาพของโคโคซานสายสั้นต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การย่อยโปรตีนที่ลำไส้ส่วนไอลีเยม และสัณฐานวิทยา ของลำไส้เล็กในลูกสุกรหย่านม. *การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 50(1), 153-161.
- โสมทัตน์ วงศ์สว่าง. (2538). *วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิศักดิ์ คงแก้ว, วันดี ทาตระกูล, รังสรรค์ เจริญสุข, นิทัศน์ วิชาสิทธิ์, และวิทยา ทาวงค์. (2020). ผลของการหมักสไปรูลิน่า (*Arthrospira platensis*) ด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 ต่อการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. *วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 48 ฉบับพิเศษ 1, 277-284.
- อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. (2551). *วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก*. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เอกธิดา ทองเต็จ. (2553). *ผลของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายทะเล (วิทยานิพนธ์ปริญญาโท)*. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abbars, A. B., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (1994). *Cellular and molecular immunology (3th)*. W. B. Saunders Company, A Division of Harcourt Brace & Company. USA.

- Abdullakassim, W., Takigawa, T., & Koike, M. (2008). Development of cassava-vertical planting machine. *Japanese Journal of Farm Work Research*, 43(1), 151–152.
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97, 253–261.
- Ajayan, K.V., Selvaraju, M., & Thirugnanamoorthy, K. (2012). Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen Source: s: An in-vitro study. *Biomass and bioenergy*, 47, 436-441.
- Ahsan, M., Habib, B., & Parvin, M. (2008). A Review on culture, Production and of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, 1034.
- Akao, Y., Ebihara, T., Masuda, H., Saeki, Y., Akazawa, T., Hazeki, K. Hazeki, O., Matsumoto, M., & Seya, T. (2009). Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. *Cancer Science*, 100, 1494–1501.
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis* (15th Ed.). Washington DC.: The Association of Official Analytical Chemist.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (16th Ed.). USA.: The Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2010) *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. (18th Ed.). Washington, DC.: The Association of Official Analytical Chemist.
- Aro, S. O., Aletor. V. A., Tewe, O. O., & Agbede, J. O. (2010). Nutritional potentials of cassava tuber wastes: A case study of a cassava starch processing factory in south-western Nigeria. *Livest. Livestock Research for Rural Developmen*, 22, 11.
- Aumaitre, A., Peinian, J., & Madec, F. (1995). Digestive adaptaion after weaning and nutritional consequences in the piglet. *Pig News and Information*, 16, 73-79.
- AVMA. *The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx> , Accessed September 4, 2018.

- Axelsson, L., (1998). *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, (2<sup>nd</sup> Ed.). Revised and Expanded, New York: Marcel Dekker.
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, *307*, 1915-1920.
- Bal, M. A., Coors, J. G., & Shaver, R. D. (1997). Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. *Journal of Dairy Science*, *80*, 2497-2500.
- Balasingham, K., Valli, C., Radhakrishnan, L., & Balasuramanyam, D. (2017). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from swine intestine, *Veterinary World*, *10*(7), 825-829.
- Becker, E., (2007). Micro-algae as a Source: of protein. *Biotechnology Advances*, *25*, 207-210.
- Becker, W., (2004). *Microalgae in human and animal nutrition*. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd Iowa, USA.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga. *Cell Biology*, *58*, 419-435.
- Behera, B., Aly, N., & Balasubramanian, P. (2019). Biophysical model and techno-economic assessment of carbon sequestration by microalgal ponds in Indian coal based power plants. *Journal of Cleaner Production is an international*, *221*, 587-597.
- Behera, B., Acharya. A., Gargey, I. A., Aly, N., & Balasubramanian, P. (2018). Bioprocessengineering principles of microalgal cultivation for sustainable biofuel production. *BioreSource: Technology Reports*, *5*, 297-316.
- Borie, R., Wislez, M., Antoine, M., Bergman, C. C., Thieblemont, C., & Cadranel, J. (2016). Pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma revisited. Review. *European Respiratory Journal*, *47*, 1244-1260.
- Borowitzka, M.A., & Moheimani, N.R. (2013). Sustainable biofuels from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *18*, 13-25.

- Buddhadasa, S., & Adorno, P. (2004). Report of Analysis (TAAU Australia Pty Ltd). *Australian Government Analytical Laboratories, Melbourne*, 1–2.
- Bhunias A.K., (2008). *Foodborne Microbial pathogens : Mechanisms and Pathogenesis*. USA.: West Lafayette.
- Brandtzaeg, P., (2010). Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunological Investigations*. 39, 303–355.
- Cattle, N., (2009). *Nearly 4,000 Nebraska cattle die in heat wave*.  
[www.cattlenetwork.com/Nearly-4,000-Nebraska-Cattle-Die-In-Heat-Wave/2009-07-07/Article.aspx?oid=487812&tid=Archive](http://www.cattlenetwork.com/Nearly-4,000-Nebraska-Cattle-Die-In-Heat-Wave/2009-07-07/Article.aspx?oid=487812&tid=Archive) Accessed Sep. 17.2020.
- Castro, DM., Veaux, NR., Miraldi, ER., & Bonneau, R. (2019). Multi-study inference of regulatory networks for more accurate models of gene regulation. *PLoS Computational Biology*, 15(1), 1-22.
- Campbell, J. M., Crenshaw, J. D., & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4, 19.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N. W., Siangdung, N., Paithoonrangsarid, K., & Bunnag, B. (2010). Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 609–614.
- Chen, L., Xu, Y., Chen, X., Fang, C., Zhao, L., & Chen, F. (2017). The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition. *Front Microbiol*, 8, 1688.
- Cheunbarn, S., & Peerapornpisal, Y. (2010). Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 586–590.
- Croft M. T., Lawrence, A. D., & Raux-Deery. E. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature Publishing Group*, 438, 90–93.
- Davis, ME., Sears, SC., Apple, JK., Maxwell, CV., & Johnson, ZB. (2006). Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being. *Journal of Animal Science*, 84, 743-756.

- Da Rosa, D. P., Vieira, M. D. M., Kessler, A. M., de Moura, T. M., Frazzon, A. P. G., Mc Manus, C.M., & Ribeiro, A. M. L. (2015). Efficacy of hyperimmunized hen egg yolks in the control of diarrhea in newly weaned piglets. *Food and Agricultural Immunology*, *26*, 622–634.
- Dhawan, S., Cailotto, C., Harthoorn, LF., & de Jonge, WJ. (2012). Cholinergic signalling in gut immunity. *Life Science Journal*, *91*, 1038-1042.
- Dierick, N., Oryn, A., & De Smet, S. (2009). Effect of feeding intact brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on some digestive parameters and on iodine content in edible tissues in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*, 584–594.
- Dineshkumar, R., Narendran, R., & Sampathkumar, P. (2016). Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, *45*(12), 1749-1754.
- Dobois M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Journal of Analytical Chemistry*, *28*, 350-356.
- Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Sewthelon. JP., Fairbrother, J. M., & Oswald, I. P. (1997). A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Veterinary immunology and immunopathology*, *58*, 287-300.
- Dowarah, R., Verma, A., & Agarwal, N. (2017). The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal. Nutrition*, *3*, 1–6.
- Duncker, S. C., Lorentz. A. & Schroeder, B. (2006). Effect of orally administered probiotic *E.coli* strain Nissle on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *111*, 239–250.
- Eiteman, M., & Ramalingam, S. (2015). Microbial production of lactic acid. *Biotechnology Letters*, *37*, 1-18.
- Falka, M., Bernhoftb, A., Reinoso-Masetc, E., Salbuc, B., Lebedc, P., Framstadd, T., Fuhrmanne, H., & Oropeza-Moea, M. (2020). Beneficial antioxidant status of

- piglets from sows fed methionine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 58, 126-439.
- Fubeyre, H., Milgen, J. V., Mener, T., Gloaguen, M., & Labussiere, E. (2017). Effects of oral supplementation with Spirulina and Chlorella on growth and digestive health in piglets around weaning. *Animal*, 12(11), 2264-2273.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Review. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15-S28.
- Gatrell, S., Lum, K., Kim, J., & Lei, X. (2014). Nonruminant Nutrition Symposium: Potential of defatted microalgae from the biofuel industry as an ingredient to replace corn and soybean meal in swine and poultry diets. *Journal of Animal Science*, 92(4), 1306-1314.
- Gebhardt, J.T., Tokach, M.D., Dritz, S., DeRouchey, J.M., Woodworth, J.C., Goodband, R.D., & Henry, S.C. (2020). Postweaning mortality in commercial swine production. I: review of non-infectious contributing factors. *Translational Animal Science*, 4(2), 462-484.
- Geyra, A., Uni, Z., & Sklan, D. (2001). The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *British Journal of Nutrition*. 86(1), 53-61.
- Ginneken, C. V., Meir, F. V., Sys, S., & Weyns, A. (2002). Stereologic Characteristics of Pig Small Intestine During Normal Development. *Digestive Diseases and Sciences*. 47(4), 868-878.
- Gräber, T., Kluge, H., Granica, S., Horn, G., Brandsch, C., & Stang, G. I. (2014). Studies on the health impact of *Agrimonia procera* in piglets. *Veterinary Research*, 10, 210-230.
- Granaci, V., (2007). Achievements in the artificial insemination of swine. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Animal Science and Biotechnologies*, 63, 382-386.
- Grigorova, S., Abadjieva, D., & Gjorgovska, N. (2017). Influence of Natural Sources of Biologically Active Substances on Livestock and Poultry Reproduction. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(2), 189-195.



- Grinstead, G. S., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., Sawyer, J., Maxwell, K., Stott, R., & Moser, A. (1998). Influence of spirulina platensis on growth performance of weanling pigs. *Kansas State University Swine Day*, 67–74.
- Grinstead, G., Tokach, M., Dritz, S., Goodband, R., & Nelssen, J. (2000). Effects of Spirulina platensis on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 83(3), 237–247.
- Grzanna, R., Polotsky, A., Phan, PV., Pugh, N., Pasco, D., & Frondoza, CG. (2006). Immolima a high-molecularweight polysaccharide fraction of Spirulina, enhances chemokine expression in human monocytic THP-1 cells. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 12(5), 429–435.
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., & Enes, P. (2018). Prebiotic as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 10(4), 800-832.
- Habib, M. A., Parvin, B., Huntington, M. R., & Hasan, T. C. (2008). A Review on Culture Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, *FAO Fisheries and Aquaculture Circular: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 1–26.
- Hartke, J. L., Monaco, M. H., Wheeler, M. B., & Donovan, S. M. (2005). Effect of a short-term fast on intestinal disaccharidase activity and villus morphology of piglets suckling insulin-like growth factor-I transgenic sow. *Journal of Animal Science*, 83(10), 2404-2413.
- Hayashi, O., Katoh, T., & Okuwaki, Y. (1994). Enhancement of antibody production in mice by dietary Spirulina platensis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 40(5), 431-441.
- Hayashi, O., Hirahashi, T., Katoh, T., Miyajima, H., Hirano, T., & Okuwaki, Y. (1998). Class specific influence of dietary Spirulina platensis on antibody production in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44(6), 841-851.
- Hayashi, O., Ishii, K., Kawamura, C., YenHei, S., & YeBao, N. (2004). Enhancement of mucosal immune functions by dietary Spirulina platensis in human and animals. *Nutritional Science*, 7(1), 431–434

- He, M., Hollwich, W., & Rambeck, W. (2002). Supplementation of algae to the diet of pigs: A new possibility to improve the iodine content in the meat. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *86*(3), 97–104.
- Heim, G., Sweeney, T., Shea, C. J., Doyle, D. N., & Doherty, J. V. (2014). Effect of maternal supplementation with seaweed extracts on growth performance and aspects of gastrointestinal health of newly weaned piglets after challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *British Journal of Nutrition*, *112*(12), 1955-1965.
- Hedemann, MS., Eskildsen, M., Laerke, HN., Pedersen, C., Lindberg, JE., Laurinen, P., & Knudsen, KE. (2006). Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *Journal of Animal Science*, *84*(6), 1375-1386.
- Hirahashi, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Saeki, Y., & Seya, T. (2002). Activation of the human innate immune system by spirulina: augmentation of interferon gamma production and NK cytotoxicity by oral administration of spirulina. *International Journal of Immunopharmacology*, *2*, 423–434.
- Honda, K., & Littman, D.R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, *535*, 75-84.
- Honolululdris, A., & Suzana, W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, *41*(5), 1117-1123.
- Idris, A., & Suzana, W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, *41*, 1117–1123.
- Islam, M. A. Uddin, M. J., Tholen, E. T., Tesfaye, D., Loof, C., Schellander, K., & Cinar, M.U. (2013). Age-associated differential production of IFN-c, IL-10 and GM-CSF by porcine alveolar macrophages in response to lipopolysaccharide. *Veterinary Journal*, *198*(1), 245–251.

- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2 Suppl), 444–450.
- Isobe, K., Hayashi, O., Hirahashi, T., Katoh, T., & Okuwaki, Y. (1995). Bactericidal activity of mouse macrophages stimulated with Spirulina extracts. *Journal Kagawa Nutrition*, 26, 61-66.
- Jayaraman, B., & Nyachoti, M. (2017) Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*, 3(3), 205–211.
- Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products. Review. *Journal of Meat Science*, 120, 107-117.
- Kelly, J.R., Kennedy, P.J., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G., & Hyland, N.P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 392.
- Kim, H., Lee, E., Cho, H., & Moon, Y. (1998). Inhibitory effect of mast cell mediated immediate-type allergic reactions in rats by Spirulina. *Biochem Pharmacol*, 55(7), 1071-1076.
- Kirchman, D.L., (2012). Processes in Microbial Ecology. *Oxford University Press Inc.*, New York.
- Kroger, M., Klemm, M., & Nelles, M. (2018). Hydrothermal Disintegration and Extraction of Different Microalgae Species. *Energies*, 11, 450.
- Kyriakis, S. C., Georgoulakis, I., Spais, A., Alexopoulos, C., Miliotis, CC., & Kritas, S. K. (2003). Evaluation of *Toyocerin*, a Probiotic Containing *Bacillus toyoi* Spores, on Health Status and Productivity of Weaned, Growing and Finishing Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(9), 1326-1331.
- Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C.R. (2007). Weaning-A challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, 108, 82-93.
- Lapsiri, W., Nitisinprasert, S., & Wanchaitanawong, P. (2011) Lactobacillus plantarum Strains from Fermented Vegetables as Potential Probiotics. *Kasetsart Journal Natural Science*, 45(6), 1071 – 1082.

- Lapsiri, W., Bhandari, B., & Wanchaitanawong, P. (2012) Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in Different Protectants during Spray Drying and Storage. *Drying Technology*, 30(13), 1407-1412.
- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, E., Fravalo, P., & Larivière-Gauthier, G. (2018). Salmonella shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 411–423.
- Li, B., Zhang, X.C., Gao, M.H., & Yu, H. (2004). Study on the anti-tumor immune activity of phycocyanin and polysaccharides from *Spirulina platensis*. *Journal of Ocean University of China*, 34, 396–402.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C., & Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4), 815–820.
- Lindemann, M.D., S. G. Cornelius., S. M. Kandelgy., Moser, R. L., & Pettigrew. J. E. (1986). Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *Scientific Journal Series*, 62(5), 1298-1307.
- Liu, J.G., CW. Hou., SY. Lee., Chuang, Y., & Lin, CC. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina (Arthrospira platensis)* products fermented with lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 46(7), 1405–1410.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun. S.C. (2017). NF-KB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, e17023.
- Lobionda, S., Sittipo, P., Kwon, H. Y., & Lee, Y. K. (2019) The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. *Journal Microorganisms*, 7(8), 271.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farra, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mackey, EM., Ayyadurai, S., Pohl, CS., D'Costa, SD., Li, Y., & Moeser, AJ. (2016). Sexual dimorphism in the mast cell transcriptome and the pathophysiological responses to immunological and psychological stress. *Biology of Sex Differences*. 7, 60.

- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications. review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews, 14*(1), 217–232.
- Mao, TK., Van, De., Water. J., & Gershwin. ME. (2002). Effect of Spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medicinal Food, 3*(3), 135-140.
- McCracken, B. A., Gaskins, H. R., Ruwe-Kaiser, P. J., Klasing, K. C., & Jewell, D. E. (1995). Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *Journal of Nutrition, 125*(11), 2838–2845.
- McGeer, PL., Walker, DG., Akiyama, H., Kawamata, T., Guan, AL., & Parker, CJ. (1991) Detection of the membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) in diseased neurons of Alzheimer brain. *Brain Research, 544*(2), 315–319.
- McLachlan, JB., Hart, JP., Pizzo, SV., Shelburne, CP., & Staats, HF. (2003). Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nature Immunology, 4*, 1199–1205.
- McLamb. BL., Gibson, AJ., Overman, EL., Stahl, C., & Moeser, AJ. (2013). Early Weaning Stress in Pigs Impairs Innate Mucosal Immune Responses to Enterotoxigenic *E. coli* Challenge and Exacerbates Intestinal Injury and Clinical Disease. *PLoS ONE, 8*(4), e59838.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment, 33*(44), 453–467.
- Moeser, AJ., & Blikslager, AT. (2007). Mechanisms of porcine diarrheal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 231*(1), 56-67.
- Moeser, A.J., Calvin, S.P., & Mrigendra, R. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition, 3*(4), 313-321.
- Mosmann, TR., & Coffman, RL. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology, 7*, 145–173.

- Nedeva, R., Jordanova, G., Kistanova, E., Shumkov, K., Georgiev, B., Abadgieva, D., Kacheva, D., Shimkus, A., & Shimkine, A. (2014). Effect of the addition of *Spirulina platensis* on the productivity and some blood parameters on growing pigs. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(3), 680-684.
- Newburg, D. S., & Walker, W.A. (2006). Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk. *Pediatric Research*, 61, 2-8.
- Niccolai, A., Shannon, E., Abu-Ghannam, N., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, R. (2018). Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (spirulina) biomass for probiotic-based products. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1077-1083.
- Nielsen, C.H., Balachandran, P., Christensen, O., Pugh, N.D., Tamta, H., Sufka, K.J., Wu, X., Walsted, A., Schjørring-Thyssen, M., Enevold, C., & Pasco, D.S. (2010). Enhancement of Natural Killer Cell Activity in Healthy Subjects by Immulina®, a Spirulina Extract Enriched for Braun-Type Lipoproteins. *Planta Medica*, 76(16), 1802-1808.
- Patil, A.K., Kumar, S., & Verma, A.K. (2015). Probiotics as feed additives in weaned pigs: A Review. *Livestock research international*, 3(2), 31-39.
- NRC. (2012). *Nutrient Requirements of Swine. Eleventh Revised Edition*. National Academic Press, Washington, D.C. 20418 USA.
- Patel, RM., Myers, LS., Kurundkar, AR., Maheshwari, A., Nusrat, A., & Lin, PW. (2012). Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *The American Journal of Pathology*, 180(2), 626-635.
- Parra, J., Agudelo, J., Sanín, D., Forero, J., Muskus, C., & López, A. (2013). Intestinal expression of pro-inflammatory cytokines induced by oral intake of lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* in weaned pigs. *The Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26(2), 108-118.
- Pascaud, M., (1993). The essential polyunsaturated fatty acids of Spirulina and our immune response. *Bulletin de institution oceanography*, 12, 49-57.
- Pasternak, J. A., Aka-Aiyer, VI., Hamonic, G., Beaulieu, A. D., Columbus, D. A., & Wilson, H. L. (2017). Molecular and Physiological Effects on the Small Intestine

- of Weaner Pigs Following Feeding with Deoxynivalenol-Contaminated Feed. *Toxins (Basel)*, 10(1), 40.
- Petrov, A., Beer, M., & Blome, S. (2014). Development and validation of a harmonized TaqMan-based triplex real-time RT-PCR protocol for the quantitative detection of normalized gene expression profiles of seven porcine cytokines. *PLoS One*, 9(9), e108910.
- Perrin, D.D., & Dempsey, B. (1974). Buffers for pH and Metal Ion Control. Chapman and Hall Ltd, London. 161-162.
- Pie, S., Lalle, S., & Wald, I.P. (2003). Influence of weaning on intestinal proinflammatory patterns in piglets. *Journal of Nutrition*, 134, 641-647.
- Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J.P., Laffitte, J., Taranu, I., & Oswald, I.P. (2010). Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogenactivated protein kinase-dependent mechanism. *Journal of Nutrition*, 140(11), 1956-1962.
- Pluske, J. R., & Williams, I. H. (1996). Split weaning increases the growth of light piglets during lactation. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47(4), 513-523.
- Promya, J., Montien, B., & Chitmanat, C. (2018). Production and Nutritional Values of *Arthrospira platensis* Strain Aspi.MJU2 from Wastewater of Organic Cafeteria of Maejo University Int. *Journal of Agriculture and Applied Biology*, 20(1).
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnology*, 65, 635-648.
- Qian, C., & Cao, X. (2012). Naturally occurring CD1<sup>+</sup> human regulatory dendritic cells: immunoregulators that are expanded in response to *E. coli* infection. *European Journal of Immunology*, 42, 1388-1392.
- Qureshi, MA, Ali, RA., & Hunter, RL. (1995a). Immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* supplementation in chickens. *Proceedings of the 44th Western Poultry Disease Conference*, 3, 117-121.
- Qureshi, MA., Kidd, MT., & Ali, RA. (1995b). *Spirulina platensis* extract enhances chicken macrophage functions after in vitro exposure. *Journal of Nutritional Immunology*, 3, 35-45.

- Qureshi, MA., & Ali, RA. (1996). Spirulina platensis exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 18(3), 457-463.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok K.N., Sridhar, S., & Rengasamy, R. (2008). A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2), 77–88.
- Raja, R., & Hemaiswarya, S. (2010). *Companents and Immune Function: Microalgae and Immune Potential*. Springer Science and Business Media.
- Rao, S. C., Northup, B. K., Phillips, W. A., & Mayeux, H. S. (2007). Interceding novel cool-season annual legumes to improve bermudagrass paddocks. *Crop Science*, 47(1), 168-173.
- Rasool, M. and Sabina, EV. (2009) Appraisal of immunomodulatory potential of Spirulina fusiformis: an in vivo and in vitro study. *Journal of Natural Medicines*, 63(2), 169–175.
- Reilly, P., Doherty, O., Pierce, J., Callan, K., Sullivan, J. O. and Sweeney, J. (2008). The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. *Animal*, 2(10), 1465–1473.
- Saeki, Y., Matsumoto, M., Hayashi, A., Azuma, I., Toyoshima, K., & Seya, T. (2000). Innate immunotherapy for cancer: anti-tumor effects of BCG-CWS in implanted tumor model. *Summary of a paper presented at the 59th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*. 4-6.
- Sajilata, M., Singhal, R., & Kamat, M. (2008). Fractionation of lipids and purification of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) from Spirulina platensis. *Food Chemistry*, 109(3), 580–586.
- Sakagami, Y., Sumiya, Y., & Komemushi, S. (2010). Research on search of the carotenoid producing microorganisms in marine area and the improvement of production ratio. *Yakugaku Zasshi*, 130(11), 1445-1451.
- Sanchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., & Rodriguez, I. (2003). Spirulina (*Arthrospira*): an edible microorganism – a review. *Universityas Scientiarum*. 8(1), 7–24.



- Scholz, M.J., Weiss, T.L., Jinkerson, R.E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M.C., & Gerken, H.G. (2014). Ultrastructure and Composition of the Nannochloropsis gaditana Cell Wall. *Eukaryot Cell*, 13(11), 1450–1464.
- Seya, T., Akazawa, T., & Matsumoto, M. (2003). Innate immune therapy for cancer: application of BCG-CWS and spirulina to patients with lung cancer. *Anticancer Research*, 23, 4369–7376.
- Shokryazdan, P., Jahromi F.M., & Navidshad, B. (2017). Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Medical Microbiology and Immunology*, 206(1), 1–9.
- Smith, F., Clark, J.E., Overman, B.L., Tozel, C.C., & Huang, J.H. (2010). Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(3), 352–363.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
- Steel, R.G., & Torrie, J.H. (1980) *Principles and procedures of statistics. A biometrical approach*, (2nd Ed), New York: McGraw-Hill Book Company.
- Suárez, E.R., Syvitski, R., Kralovec, J.A., Nosedá, M.D., Barrow, C.J., Ewart, H.S., Lumsden, M.D., & Grindley, T.B. (2006) Immunostimulatory polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuranan. Measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY NMR. *Biomacromolecules*, 7(8), 2368–2376.
- Superchi, P., Borghetti, P., Ferrarini, G., Cavalli, V., & Sereni, M. (2017). Effects of dietary crude fiber concentrate on growth on weaned piglets. *Animal*, 11(11), 1905-1912.
- Taelman, S.E., De Meester, S., Roef, L., Michiels, M., & Dewulf, J. (2013). The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: a life cycle perspective. *BioreSource: Technology*, 150, 513–522.
- Taranu, I., Gras, M., Pistol, G.C., Motiu, M., Marin, D.E., Lefter, N., Ropota, M., & Hăbeanu, M. (2014).  $\omega$ -3 PUFA Rich Camelina Oil By-Products Improve the

- Systemic Metabolism and Spleen Cell Functions in Fattening Pigs. *PLoS ONE*, 9(10), e110186.
- Tedo, M.G., (2009). *The umami taste in pig: L-amino acid preferences and in vitro recognition by the receptor dimer pT1r1/pT1r3 expressed in porcine taste and non-taste tissues*. (Doctoral dissertation, Animal Science Department, Autonomous University of Barcelona, Spain). Available from ProQuest Dissertations and database. (B-47456-2010)
- Torrallardona, D., & Roura E. (2009). *Voluntary feed intake in pigs*. Wageningen Academic Publishers.
- Torzillo, G., Pushparaj, B., & Bocci, F. (1986). Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors. *Biomass*, 11(1), 61-74.
- Uesu, T., Mizuno, M., Inoue, H., Tomoda, J., & Tsuji, T. (1995). Enhanced expression of decay accelerating factor and CD59/homologous restriction factor 20 on the colonic epithelium of ulcerative colitis. *Laboratory Investigation*, 72(5), 587–591.
- Varley, M. A., & Wiseman, J. (2001). *The weaner pig*. Wallingford, USA: CABI international.
- Witte, D.C., Devriendt, B., Flahou, B., Bosschem, I., Ducatelle, R., Smet, A., & Haesebrouck, F. (2017). Helicobacter suis induces changes in gastric inflammation and acid secretion markers in pigs of different ages. *Veterinary Research*, 48(34).
- Wintermans, J.E.G., & De Mots, A. (1965). Spectrophotometric Characteristics of Chlorophyll A and B and Their Phaeophytins in Ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis*, 109(2), 448-453.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., & Ryu, H.W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163–172.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C.Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 707–718.
- Ward, O.P., & Singh, A. (2005). Omega-3/ 6 fatty acids: alternative Source: s of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627–3652.

- Xu, R., Shen, Q., Wu, R., & Li, P. (2017). Structural analysis and mucosal immune regulation of exopolysaccharide fraction from *Bifidobacterium* animals RH. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1226–1241.
- Yang, L., Liu, Z., Li, J., He, K., Kong, L., Guo, R., Liu, W., Gao, Y., & Zhong, J. (2018). Association of the expression of Th cytokines with peripheral CD4 and CD8 lymphocyte subsets after vaccination with FMD vaccine in Holstein young sires. *Research in Veterinary Science*, 119, 79-84.
- Yang, F., Chengli, H., Xiangfang, Z. and Shiyan, Q. (2015). The Use of Lactic Acid Bacteria as a Probiotic in Swine Diet. Review, *Pathogens*, 4(1), 34-45.
- Zhang, Z.D., Hutching, G., Kitching, P., & Alexandersen, S. (2002). The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Archives of Virology*, 147(11), 2157-2167.
- Zhang, Y., White, M. A., & Colosi, L. M. (2013). Environmental and economic assessment of integrated systems for dairy manure treatment coupled with algae bioenergy production. *BioreSource: Technology*, 130, 486–494.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### 1. ขั้นตอนการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย

#### 1 การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก (AOAC, 1990)

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น นอร์มอล โดยการชั่ง 0.1 เปอร์เซ็นต์ NaOH จำนวน 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติลงในขวดปรับปริมาตรให้ได้ มิลลิลิตร 1000 จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

1.2) ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟาทาแลต (potassium hydrogen phatha; KHP) 2.0423 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติลงในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรจะได้ KHP 0.1 นอร์มอล

1.3) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน KHP 0.1 นอร์มอลมา 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้โดยใช้ฟีนอลทาลีน เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นคำนวณหาค่า normality ของสารละลาย

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน NaOH (N1)} = (N2 \times V2) / V1$$

โดยที่ N1 คือ ความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์  
V1 คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต  
N2 คือ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานของ KHP  
V2 คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน KHP ที่ใช้ในการไตเตรต

1.4) จากนั้นวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก นำตัวอย่างส่วนที่ใสจากการกรองภากรงสำหรับด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 ขนาด 110 มิลลิเมตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm 10 นาที ดึงส่วนใส 2 มิลลิลิตร

1.5) เจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่น มิลลิลิตร 25 แล้วหยดฟีนอลทาลีน 2 หยด จากนั้นไตเตรดด้วยสารละลาย NaOH 0.1 นอร์มอล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก

$$= \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้น NaOH} \times 25^*}{1000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้} \times 100}$$

หมายเหตุ  $C_3H_6O_3$  90.8

\* น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

2 การหา Total Phenolic content (TPC) ดัดแปลงจาก Niccolai และคณะ (2018)

เตรียมสารละลายกรดแกลกติกความเข้มข้น 100 ppm โดยการชั่ง gallic acid 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

2.1) เตรียมมาตรฐานสารละลาย gallic acid โดยใช้ปิเปต 0.5, 1, 1.5, 2.3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ลงในหลอดทดลองแล้วปรับน้ำกลั่นให้ครบ 8 มิลลิลิตร

#### ตาราง 40 Concentration level of gallic acid (ppm)

Concentration (ppm)	Gallic acid solution (ml)	ddH <sub>2</sub> O (ml)
50 ppm	0.5	7.5
100 ppm	1	7.0
150 ppm	1.5	6.5
200 ppm	2	6
300 ppm	3	5
400 ppm	4	4
500 ppm	5	3
600 ppm	6	2
700 ppm	7	1
800 ppm	8	0

2.2) นำสารละลายที่ปรับไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer แล้วสร้างกราฟมาตรฐานที่มีค่า R<sup>2</sup>) ที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร และใช้เอทานอล 95% เป็นแบงก์

2.3) ปิเปตตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร นำไปปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95% ให้ครบ 25 มิลลิลิตร

2.4) ปั่นเหวี่ยง 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกเอาสารละลายใสไปวิเคราะห์

2.5) ปิเปตสารละลายส่วนใสจากตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร หรือ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร และเติม Folin Ciocalteu Phenol ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร หรือ 300 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มืด

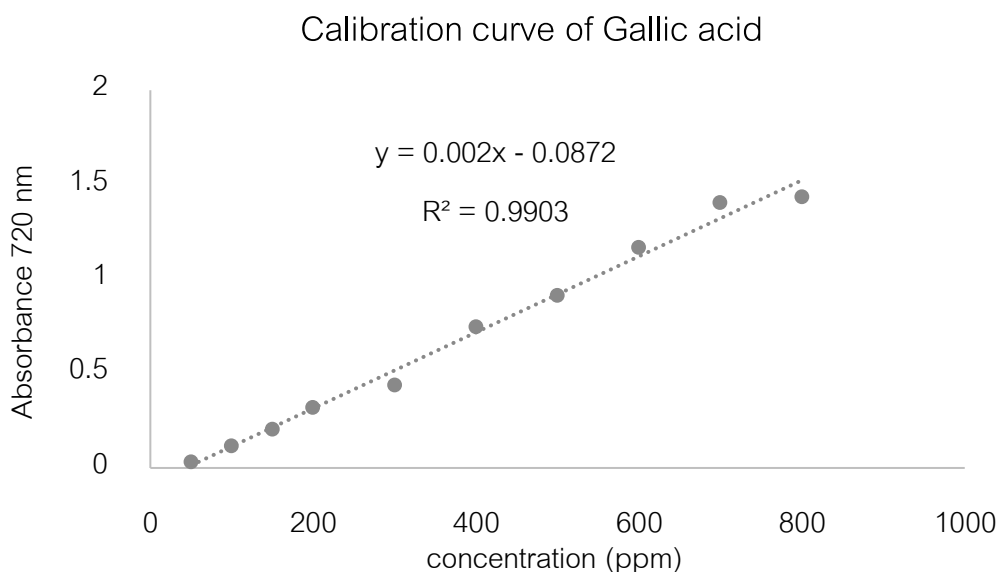
2.6) เติม 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร หรือ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ในที่มืด

2.7) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 720 โดยใช้เอทานอล 95 % เป็นแบงก์ จากนั้นแทนค่า Absorbance ที่วัดได้ลงในสูตรค่ามาตรฐานสารละลาย gallic acid จะได้หน่วย ppm

2.8) นำสารละลายที่ปรับไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer แล้วสร้างกราฟมาตรฐานที่มีค่า R<sup>2</sup> (R-squared) ที่ความยาวคลื่น 720 โดยใช้เอทานอล 95 % เป็นแบงก์

ตาราง 41 Standards Gallic acid at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 720 nm.

No	Absorbance	Absorbance x20	concentration (ppm)
1	0.033	0.660	50
2	0.116	2.320	100
3	0.205	4.100	150
4	0.319	6.380	200
5	0.438	8.760	300
6	0.747	14.940	400
7	0.913	18.260	500
8	1.169	23.380	600
9	1.404	28.070	700
10	1.434	28.680	800



ภาพ 30 Relationship between absorbance and Gallic acid with UV-Vis Spectrophotometer 720 nm.

3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ดัดแปลงจาก Castro et al. (2019); Abdullakasim et al. (2009)

3.1) เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 1 มิลลิโมล (โดยใช้ DPPH 0.0394 กรัม ละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร) แล้วปรับให้ครบ 100 มิลลิลิตร 100 มิลลิลิตร

3.2) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยซึ่งสารสกัดสำหรับ 2 ส่วน คือส่วนหลังจากการกรอง และส่วนหลังจากการอบแห้ง มา 0.5 กรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

3.3) นำไปสกัดโดยนำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 80 องศาเซลเซียส 10-20 นาที แล้ววางไว้ในอุณหภูมิห้องในที่มืด

3.4) ปิเปิดสารสกัด 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 6000 รอบต่อนาที 10 นาที แล้วปิเปิดสารละลายสารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรที่ปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex mixture 3 นาที จากนั้นเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.5) นำส่วนใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer โดยใช้เอทานอลเป็นแบงก์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คิดหาเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ DPPH ตามด้วยวิธี kunaran & karunaku, (2006)



$$\% \text{ DPPH free radical scavenging activity} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$$

โดยที่  $A_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของแบงก์ (เอทานอล95%+DPPH) ที่เวลา 4 นาที  
 $A_1$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (สารสกัดตัวอย่าง95% + DPPH) ที่เวลา 4 นาที

#### 4 การทดสอบ Antioxidant potential capacity ดัดแปลงจาก Niccolai et al. (2018)

4.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำโดยการชั่ง L-ascorbic acid หนัก 0.025 กรัม ละลายในเมทานอลเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ครบปริมาตร 25 มิลลิลิตร

4.2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 5, 25, 50, 100, 200, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำโดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid มา 0.025, 0.125, 0.025, 0.5, 1, 1.25 และ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวด volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95% ให้ครบ 5 มิลลิลิตร

#### ตาราง 42 Concentration level of L-ascorbic acid ( $\mu\text{g/ml}$ )

L-ascorbic acid concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	L-ascorbic solution acid (ml)	Ethanol 95% (ml)
25	0.025	4.975
50	0.125	4.875
100	0.25	4.75
200	0.5	4.5
250	1.0	4.0
500	1.25	3.75
700	1.75	3.25
1000	2.5	2.5

4.3) การเตรียมสารละลายแอมโมเนียโมลิบเดต  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  ความเข้มข้น 4 mM ทำการชั่งแอมโมเนียโมลิบเดตมา 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เทใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.4) เตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) ความเข้มข้น 25 mM ทำโดยการชั่งโซเดียมฟอสเฟตมา 0.37 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นเทใส่ใน L-ascorbic acid แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

4.5) การเตรียมสารละลายกรดซัลฟูริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ความเข้มข้น 600 mM ทำโดยปิเปตสารละลายกรดซัลฟูริกมา 3.33 มิลลิลิตร เทใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.6) การเตรียมสารละลาย Reagent solution (1:1:1) โดยปิเปตสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต สารละลายโซเดียมฟอสเฟต และสารละลายกรดซัลฟูริก มาในปริมาตรเท่ากับ เทใส่ Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน

4.7X สร้างกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ทำโดยปิเปต สารละลาย Reagent solution จำนวน 3 มิลลิลิตรใน vial (ขวดขนาดเล็กฝาปิด) ตามด้วยสารละลาย L-ascorbic acid ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามข้อ ที่ 1 มา 0.3 มิลลิลิตร หรือ 300 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศา เป็นเวลา 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 และ 695 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer และใช้เอทานอล 95% เป็นสารละลายแบล็ก

4.8) เตรียมตัวอย่างโดยชั่งสารสกัดสาหร่าย 2 ส่วน คือส่วนหลังจากการกรอง และส่วนหลังจากการอบแห้งมา 0.5 กรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

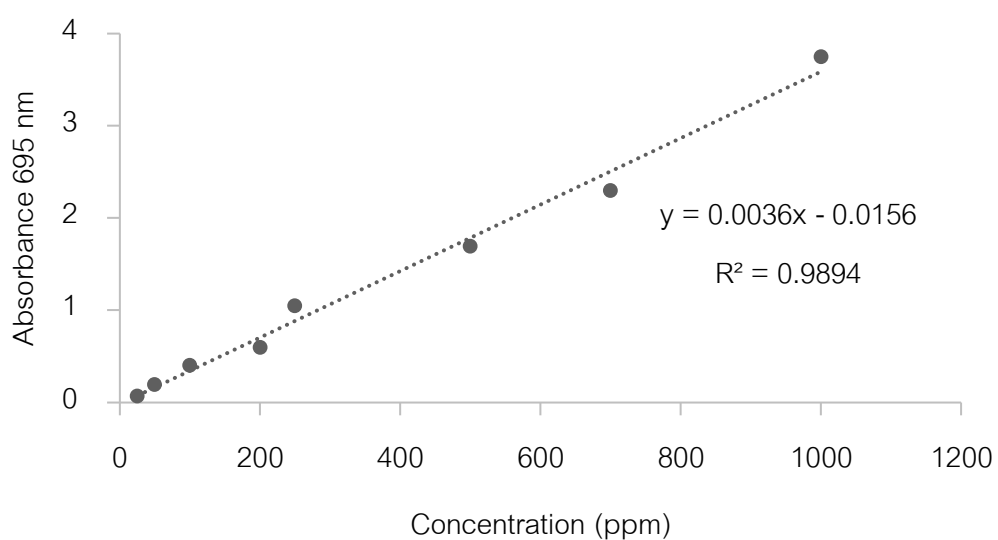
4.9) นำไปสกัดโดยนำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 80 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้ววางไว้ในอุณหภูมิห้อง แล้วปิเปตสารสกัด 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที 10 นาที

4.10) ทดสอบหาค่า Antioxidant potential capacity ทำโดยปิเปตสารละลาย Reagent solution 3 มิลลิลิตร ใน vial (ขวดขนาดเล็กฝาปิดสีขาว) เติมสารละลายสารสกัดของตัวอย่างนั้น ๆ 0.3 มิลลิลิตร หรือ 300 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศา เป็นเวลา 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer โดยใช้เอทานอล 95% เป็นสารละลายแบล็ก

ตาราง 43 Standard L-ascorbic acid at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 695 nm

L-ascorbic acid ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance 695 nm
25	0.066
50	0.192
100	0.4
200	0.6
250	1.05
500	1.694
700	2.3
1000	3.75

Calibration curve of L-ascorbic acid



ภาพ 31 Relationship between absorbance and L-ascorbic acid with UV-Vis Spectrophotometer 695 nm

5 การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (Chlorophyll a) (mg/g) และ แคโรทีนอยด์ carotenoid (mg/g) ในน้ำที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลีนา (Wintermans & De Mots, 1965; Saijo, 1975)

5.1) ปิเปตตัวอย่างสาหร่ายหมักส่วนใสหลังจากการกรอง 2 มิลลิลิตร เติม 90% methanol 10 มิลลิลิตร

5.2) สำหรับสาหร่ายหลังกรอง สาหร่ายหลังอบแห้ง 0.5 กรัม เติม 90% methanol 10 มิลลิลิตร ทั้ง ข้อ 1 และ 2 นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 20 นาที

5.3) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

5.4) ปิเปตสารสกัดไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยอาศัยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร โดยใช้ 90% methanol เป็น blank

5.5) การคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ug/ml)

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ (ug/ml)} = (16.5 \times A_{665}) - (8.5 \times A_{650})$$

$$\text{แคโรทีนอยด์ (ug/ml)} = (A_{461} - (0.046 \times A_{664})) \times 4$$

6 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟโคไซยานิน

6.1) ชั่งสาหร่ายหลังกรอง และหลังอบแห้ง ปริมาณ 5 mg ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 ml

6.2) เติม phosphate buffer (pH=7.0) 0.1 mol/L ปริมาตร 10 ml ลงในหลอด (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตามวิธี ของ Gomori 1955 อ้างโดย Perrin และ Dempsey, 1974)

6.3) ผสมให้เข้ากันแล้วทำการสกัดตรงควัดถูให้ออกจากเซลล์ โดยการนำไปตั้งในอ่างน้ำอุ่น 37°C เวลา 30 นาที หลังจากนั้นแช่เย็น -20 °C ใช้ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

6.4) นำออกมาทำให้ละลายในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 ชั่วโมง

6.5) นำไปเข้าคลื่นอัลตราโซนิก 30 นาที นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 620 652 และเจือจางให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 1.0

6.6) การคำนวณความเข้มข้นไฟโคไซยานิน (silverira et al., 2007)

$$\text{C-PC (mg/ml)} = [A_{620} - 0.474(A_{652})] / 5.34$$

A<sub>620</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

A<sub>652</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร

6.7) การคำนวณปริมาณของสารไฟโคไซยานิน (Extraction Yield: Y) (mg/g)

$$Y = [(C-PC)*V] / BM$$

หมายเหตุ C-PC คือ ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน (ug/ml)

V คือ ปริมาตรของบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร

6.8) การคำนวณความบริสุทธิ์ของสารไฟโคไซยานิน (Extract Purity ; Ep)

$$Ep = A620 / A280$$

7 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ จากสาหร่ายสไปรูลีนาประเภทแห้งหรือสภาพผง ดัดแปลงวิธีจาก de Quirós, & Costa. (2006)

7.1) นำเซลล์สาหร่ายที่บดละเอียดด้วยขนาดตะแกรง 0.1 มิลลิเมตรเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แตก 50 มิลลิกรัม จากนั้นเติม 95% v/v เอทานอล 95% ปริมาตร 5 ml และเติม 60% KOH 1 ml

7.2) นำไปวางในอ่างน้ำอุ่น water bath ที่อุณหภูมิ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C

7.3) นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้รงควัตถุถูกสกัดออกมาจากเซลล์ ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปั่นแยกเศษเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายที่ได้

7.4) เติม 95% v/v เอทานอล 5 ml ในตะกอนเศษเซลล์เพื่อทำการสกัดซ้ำตามข้อ 7.2 และ 7.3 รวมสารละลายที่ได้ (supernatant) ทั้งข้อ 3 และ 4 ปริมาตร 12 มิลลิลิตรแล้วเติมไดเอธิลอีเทอร์ ปริมาตร 12 มิลลิลิตร และ 9% NaCl ปริมาตร 12 ml เขย่าแล้ว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้แยกชั้นสีเขียวและสีเหลือง ปล่อยให้ชั้นสีเขียวของคลอโรฟิลล์ทิ้งไป เก็บชั้นสีเหลืองของแคโรทีนอยด์

7.5) นำชั้นสีเหลืองมา 15 มิลลิลิตร ที่ได้มาเติม 9% NaCl ปริมาตร 15 ml เขย่าตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นสีขาวและสีเหลือง ปล่อยให้ชั้นสีขาวทิ้ง เก็บสารละลายสีเหลืองของแคโรทีนอยด์ ปรับปริมาตรสุดท้าย 20 ml ด้วยไดเอธิลอีเทอร์

7.6) เทสารละลายที่ได้ในหลอดทดลองซึ่งมี Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhydrous) อยู่เพื่อกำจัดน้ำ (เตรียมสารละลายมาตรฐานซัลเฟต โดยการละลาย Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhydrous) (147.9 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

7.7) ปิเปตสารสกัดไปวัดที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์จากสูตร

$$\text{Carotenoid (mg/g cell dry weight-1)} = \frac{(A450 \times 20 \times 1000)}{\text{FSP (mg)} \times \text{cell dry weight}}$$

8 การวิเคราะห์ปริมาณ เบต้า-แคโรทีน จากสาหร่ายสไปรูลิน่า ตามวิธีของ ปรีนรัตน์ วิหงส์ และคณะ (2557)

8.1) ซังสาหร่ายแห้งกรอง และล้างอบแห้ง 50 มิลลิกรัม นำไปสกัดด้วยทำตัวละลาย 3 ส่วน ด้วยอัตราส่วน 1:1:1 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ดังต่อไปนี้

8.2) สารละลายเฮกเซนกับอีเทอร์ด้วยอัตราส่วน 95 ต่อ 5 คือ สารละลายไดเอทิลอีเทอร์ 5 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรโดยปรับปริมาณด้วยเฮกเซนให้ได้สารละลาย 100 มิลลิลิตร

8.3) สารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล อัตราส่วน 2 ต่อ 1 คือ สารละลาย เมทานอล 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรของ 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไดคลอโรมีเทนให้ได้ สารละลาย 100 มิลลิลิตร

8.4) สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลความเข้มข้น 10 % wt/wt<sup>1</sup> คือ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัมในเมทานอล และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย เมทานอล

8.5) เติมสารในข้อ 8.1, 8.2 และ 8.3 ด้วยอัตราส่วน 1:1:1 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ใส่ในสไปรูลิน่า แล้วนำไปเขย่าด้วย vortex 20 นาที จากนั้นเปิดส่วนใสไปเก็บในภาชนะที่มีฝาปิด แล้วเติมสารสกัด 8.1, 8.2 และ 8.3 ซ้ำอีกครั้ง และเปิดส่วนใสเก็บรวมกับภาชนะที่ได้สกัดในครั้งแรก

8.6) นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยง 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายเฮกเซนกับอีเทอร์ด้วยอัตราส่วน 95 ต่อ 5 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จะสังเกตเห็นเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนล่างมีสีน้ำตาลเป็นสารละลายที่ได้จากการสกัดสารประกอบเบต้า-แคโรทีนจากสาหร่าย ส่วนบนมีสีเหลืองใส โดยทำการเปิดส่วนสีเหลือง 2 มิลลิลิตรไปเจือจางในสารละลายเฮกเซนกับอีเทอร์ด้วยอัตราส่วน 95 ต่อ 5 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ในคิวเวต แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ 450 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเฮกเซนกับอีเทอร์ด้วยอัตราส่วน 95 ต่อ 5 เป็นแบล็ก

8.7) เตรียมสารละลายเบต้า-แคโรทีนที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งเบต้า-แคโรทีน 0.002 กรัม ละลายในเฮกเซนกับอีเทอร์ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานเบต้า แคโรทีนที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายเฮกเซนกับอีเทอร์ ในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 ให้ครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

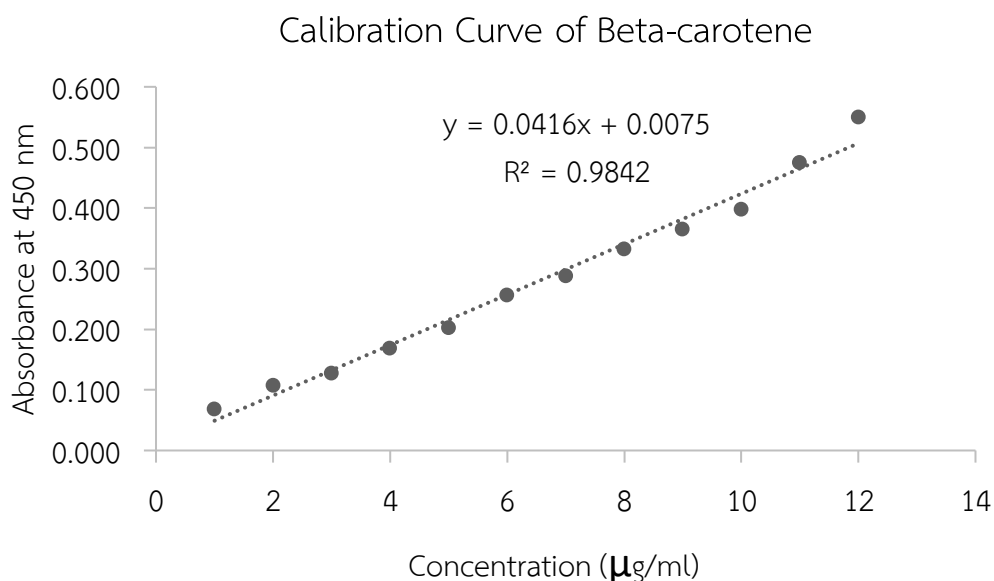
ตาราง 44 Beta-carotene standard solution in volume 10 ml

Beta-carotene concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Beta-carotene solution, concentration 20 $\mu\text{g / ml}$ (ml)	Solution mixes hexane with ether in a ratio of 95 per 5 ml. (ml)
1	0.5	9.5
2	1	9.0
3	1.5	8.5
4	2.0	8.0
5	2.5	7.5
6	3	7
7	3.5	6.5
8	4	6
9	4.5	5.5
10	5	5
11	6	4
12	7	3
13	8	2
14	9	1
15	10	0

ตาราง 45 Standard Beta-carotene solution concentration 20  $\mu\text{g/ml}$  at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 450 nm

Beta-carotene ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance 450 nm
1	0.069
2	0.108
3	0.127
4	0.168
5	0.202
6	0.256
7	0.288
8	0.332
9	0.365
10	0.398
11	0.475
12	0.550
13	0.643
14	0.700
15	0.834





ภาพ 32 Relationship between absorbance and Beta-carotene solution concentration 20 µg/ml with UV-Vis Spectrophotometer 450 nm

9 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต หรือ สารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์

9.1) ชั่งตัวอย่างสไปรูลิना 0.5 กรัม เพื่อนำไปไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วย 2.5N กรดไฮโดรคลอริก 3 มิลลิลิตร (โดย  $V1 = 2,500/27.4 = 91.24$  ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 95 องศาเซลเซียส 60 นาที

9.2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน D-glucose ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 1,000 มิลลิลิตร ต้องชั่งน้ำหนักกลูโคส 0.2 กรัม

สารละลาย 100 มิลลิลิตร ต้องชั่งน้ำหนักกลูโคส 0.02 กรัม

ดังนั้น ชั่ง D-glucose 0.02 กรัม ใส่ลงในขวดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

9.3) เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตาราง 46 Glucose standard solution at concentrations of 10, 20, 40, 50 and 80 mg / l.

Tube	Glucose solution (ul)	ddH <sub>2</sub> O (ul)	standard solution of glucose (mg / l)
1	0	1000	0
2	100	900	10
3	200	800	20
4	300	700	30
5	400	600	40
6	500	500	50
7	600	400	60
8	700	300	70
9	800	200	80
10	900	100	90
11	1000	0	100

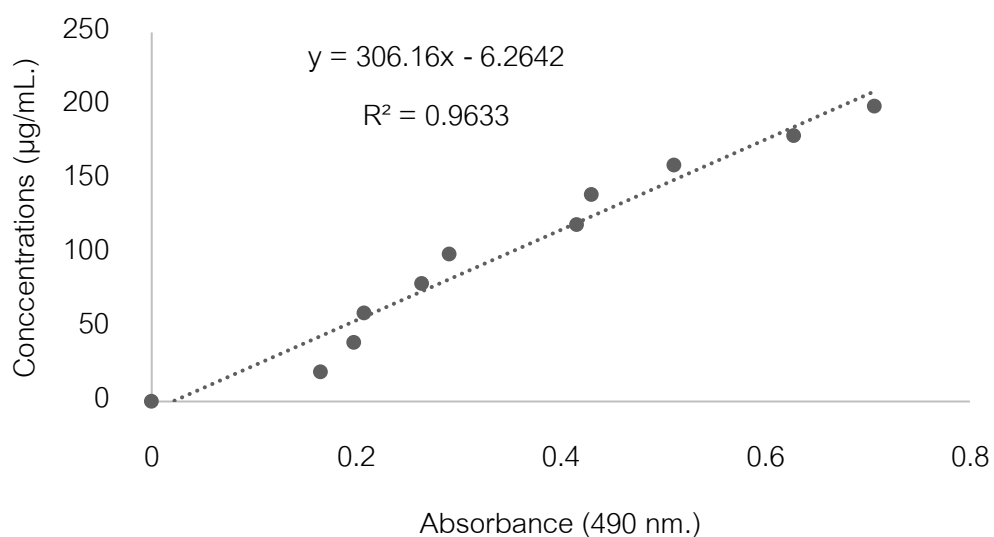
9.4) นำไปตรวจวัดคาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธี Dubois et al. (1956) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการ hydrolysis 0.2 มิลลิลิตร หรือ 200 ไมโครลิตร เติม 5% phenol 1 มิลลิลิตร และ เติมกรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) 6 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นนำไป ต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 95 องศาเซลเซียส 30 นาที

9.5) แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (ค่าดูดกลืนแสงจะต้องคูณ 3 เนื่องจากการเติม 2.5N กรดไฮโดรคลอริก 3 มิลลิลิตร)

ตาราง 47 Standards D Glucose at the absorbance with Spectrophotometer 490 nm.

No.	Absorbance	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0.000(blank)	0
2	0.165	20
3	0.198	40
4	0.208	60
5	0.264	80
6	0.291	100
7	0.416	120
8	0.430	140
9	0.511	160
10	0.628	180
11	0.707	200

Standard curve of carbohydrate

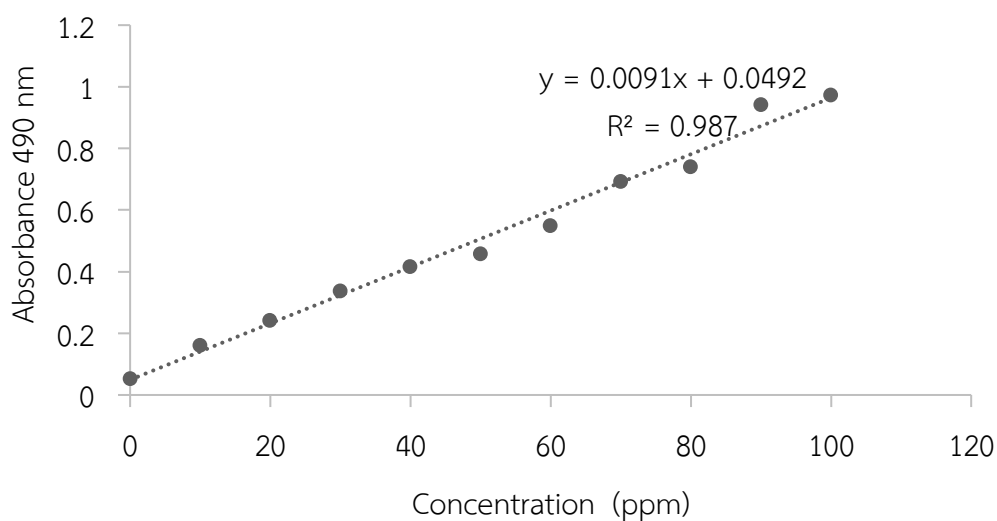


ภาพ 33 Relationship between absorbance and carbohydrate level (D-Glucose) with spectrophotometer 490 nm

ตาราง 48 Standard D-glucose at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 490 nm.

D-glucose (mg/l)	Absorbance 490 nm
0	0.054
10	0.162
20	0.242
30	0.338
40	0.418
50	0.458
60	0.55
70	0.693
80	0.741
90	0.943
100	0.974

Calibration Curve of D-glucose



ภาพ 34 Relationship between absorbance and D-glucose concentration 200 mg / l with UV-Vis Spectrophotometer 490 nm.

10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสาหร่ายไปรูลิน่า ด้วยวิธี Lowry (1951)

10.1 สารละลาย A คือ คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ร้อยละ 1 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)

10.2 สารละลาย B คือ โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate) ร้อยละ 1 (Sodium potassium tartrate 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)

10.3 สารละลาย B คือ โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ร้อยละ 2 ในสารละลายไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ( $\text{NaOH}$  0.8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 ลิตร) ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 กรัม ในสารละลาย  $\text{NaOH}$  0.1 M 100 มิลลิลิตร)

10.4 สารละลาย D คือ สารละลาย Folin ciocalteu reagent ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 ต่อ 1 ก่อนใช้เสมอ

10.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์

10.5.1 เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย A ต่อ สารละลาย B ต่อสารละลาย C ในอัตราส่วน 1:1:98 (ปริมาตร: ปริมาตร: ปริมาตร) เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

10.5.2 ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน จำนวน 10 มิลลิกรัมในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 1.5 มิลลิลิตร เติม  $\text{NaOH}$  1 โมลาร์ ( $\text{NaOH}$  8 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วนต่อตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ต่อ ตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม) แล้วนำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 80 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นวางตัวอย่างที่ต้มเสร็จแล้วในอุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที

10.5.3 ปิดตัวอย่างออกมาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวก์ 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 800 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย E 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 80 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้ววางไว้ในอุณหภูมิห้อง

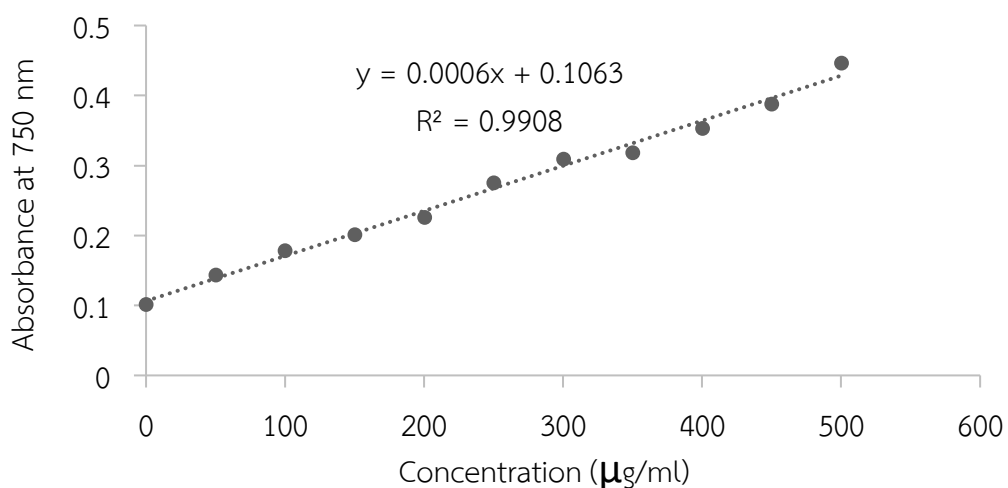
10.5.4 เติมสารละลาย D 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water Bath) 80 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้ววางไว้ในอุณหภูมิห้อง แล้วเปิดตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที 10 นาที

10.5.5 นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน เป็นโปรตีนมาตรฐาน

10.5.6 การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยชั่งโบวินซีรัมอัลบูมิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

10.5.7 เจือจางสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาปรับปริมาตรของแต่ละหลอดให้ได้ 10 มิลลิลิตร

Calibration Curve of Bovine serum albumin



ภาพ 35 Relationship between absorbance and Bovine serum albumin (BSA) solution concentration 1000 µg/ml with UV-Vis Spectrophotometer 750 nm

ตาราง 49 Concentration of Bovine serum albumin solution (mg/ml)

Tube	Bovinc serum albumin solution (ul)	ddH <sub>2</sub> O (ul)	Bovinc serum albumin solution concentration (mg/ml)
1	0	1000	0
2	100	900	50
3	200	800	100
4	300	700	150
5	400	600	200
6	500	500	250
7	600	400	300
8	700	300	350
9	800	200	400
10	900	100	450

ตาราง 50 Standard Bovine serum albumin (BSA) solution concentration 1000 ( $\mu\text{g/ml}$ ) at the absorbance with UV-Vis Spectrophotometer 750 nm

Bovine serum albumin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance 750 nm
0	0.1015
50	0.144
100	0.178
150	0.201
200	0.225
250	0.275
300	0.309
350	0.318
400	0.353
450	0.388
500	0.446

ตาราง 51 Comparison of different mean to relative normalized expression  
between the experimental group and the control group

Cytokine	Tissue	CON	CAN	FSP1	FSP2	FSP3	FSP4
IL-1 $\beta$	Jejunum	1	4.1502	1.0534	3.9788	3.2342	-0.1204
	Std Deviation		1.6	0.3	1.414	1.008	0.257
	Spleen	1	-0.438	-0.641	2.1186	4.162	4.4212
	Std Deviation		0.221	0.052	1.056	0.613	1.6
TNF- $\alpha$	Jejunum	1	1.476	2.2986	0.3752	1.2066	2.5244
	Std Deviation		1.104	1.04	0.41	0.887	0.49
	Spleen	1	4.1238	0.778	1.935	2.9244	3.772
	Std Deviation		1.503	0.568	1.5	1.4	1.6
IL-12p40	Jejunum	1	-0.6936	-0.8558	-0.8704	-0.8382	0.0362
	Std Deviation		0.091	0.078	0.049	0.055	1.242
	Spleen	1	1.5704	1.14	1.9668	2.7698	5.2318
	Std Deviation		0.944	0.53	0.33	0.651	0.969



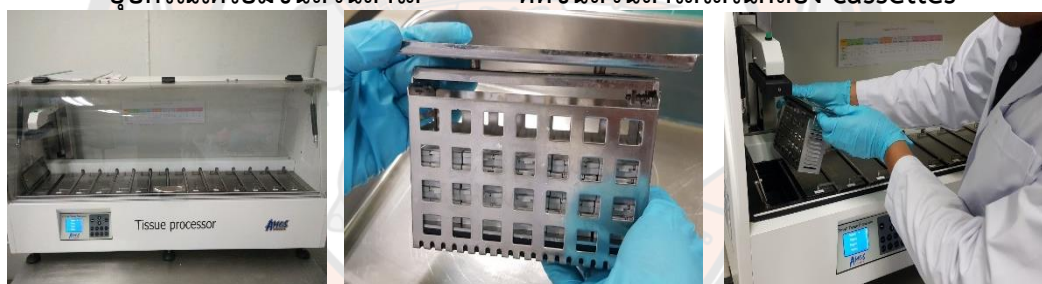
## 11 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อลำไส้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้ของสุกร

11.1 จากที่ได้เก็บชิ้นส่วนของตัวอย่างลำไส้ทั้ง 3 ส่วน โดยทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือ 0.9% แล้วนำไปรักษาคงสภาพลำไส้ด้วย Formalin 10% เมื่อต้องการเตรียมชิ้นส่วน กำหนดให้ตัดชิ้นส่วนของลำไส้แต่ละส่วน ความหนา 1.2-2 มิลลิเมตร 4-5 ชิ้นต่อตัวอย่าง ใส่ลงในกล่อง cassettes เพื่อเข้าเครื่องเครื่อง Tissue processor รุ่น ATP140 ยี่ห้อ Amos ประเทศออสเตรเลีย โดยใช้ Formalin, Alcohol 95%, Isopanal, Xyline และ Paraplast เพื่อดึงน้ำออกจากชิ้นส่วนของลำไส้ และเตรียมชิ้นเนื้อ โดยใช้ระยะเวลา 15 ชั่วโมง (ตารางที่ 50)



อุปกรณ์เตรียมชิ้นส่วนลำไส้

ตัดชิ้นส่วนลำไส้ใส่ในกล่อง cassettes



เครื่อง Tissue processor

เข้าเครื่องเตรียมเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลา 15 ชั่วโมง

## 11.2 เตรียมหลอบบล็อก Paraffin wax ของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วน

11.2.1 นำตัวอย่างลำไส้ที่อยู่ใน กล่อง cassettes จำนวน 1-2 ชิ้นต่อตัวอย่าง หลังจากที่ได้เอาลำไส้จากเครื่อง Tissue processor นำไปละลาย Paraplast ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมหลอบด้วย Paraffin wax ด้วยเครื่อง Paraffin Dispenser รุ่น XH-4002 เป็นเครื่องเตรียม Paraffin wax กำหนดให้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในภาคน้ำแข็ง และเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มากกว่า 24 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมาแต่งบล็อกให้สามารถเข้าเครื่องไมโครโทม (Microtome)

11.2.2 จากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโทม (Microtome) ให้เนื้อเยื่อมีความหนา 4  $\mu\text{m}$  โดยที่บล็อกต้องมีความแข็งจากความเย็น เมื่อตัดสไลด์แล้วไม่ขึ้นรูปให้นำเข้าไปแช่แข็งอีกครั้ง หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นในอ่างน้ำ (Tissue floating bath) ที่มีอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส

และซ้อนลงในแผ่นไลต์กระจก และวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส 30 นาที หรือ Paraffin wax ละลายออกจากเนื้อเยื่อลำไส้



หล่อบล็อก Paraffin

เตรียมและแต่งบล็อก



ตัดสไลด์ลำไส้ด้วยเครื่อง Microtome และซ้อนเนื้อเยื่อลำไส้ลงบนแผ่นสไลต์กระจก

11.2.3 นำเนื้อเยื่อที่ติดอยู่กับกระจกสไลด์มาผ่านกระบวนการย้อมสี โดยใช้สีฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) และ อีโอซิน (Eosin) ตามลำดับดังต่อไปนี้

- |                |        |
|----------------|--------|
| 1) Xylene      | 3 นาที |
| 2) Xylene      | 3 นาที |
| 3) IPA         | 2 นาที |
| 4) 95% Alcohol | 2 นาที |
| 5) 95% Alcohol | 2 นาที |

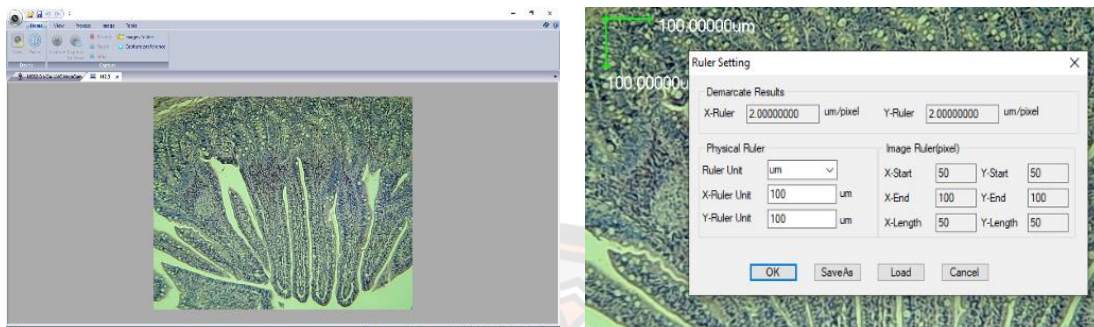
- |                  |        |
|------------------|--------|
| 6) Running water | 5 นาที |
| 7) Mayer         | 3 นาที |
| 8) Running water | 5 นาที |
| 9) Hematoxylin   | 2 นาที |
| 10) Eosin        | 2 นาที |
| 11) 95% Alcohol  | 2 นาที |
| 12) 95% Alcohol  | 2 นาที |
| 13) IPA          | 3 นาที |
| 14) IPA          | 3 นาที |
| 15) Xylene       | 5 นาที |
| 16) Xylene       | 5 นาที |

11.2.4 รอสไลด์แห้งแล้วนำมาปิดด้วย Cover slide โดยใช้น้ำยาปิดผลึกสไลด์



การย้อมสี และปิดด้วยแผ่น Cover slide

11.3 นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (Objelcire 10x) ตามวิธีการของ (Hartke et al., 2005) ศึกษาสัณฐานวิทยาของลำไส้ ในการวัดจะใช้โปรแกรม Sx view เป็นโปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้วิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้ (ไมโครเมตร)



การใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ร่วมกับโปรแกรม Sx view





## ภาคผนวก ข

### ภาพการทดลองที่ 1



1.1 ตู้กระจกเพาะเลี้ยงหัวสาหร่าย 1.2 การทดลองที่ 1 และโรงเรือนเลี้ยงสาหร่าย 6x8 เมตร



1.3 เพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าจากบ่อไบโอแก๊สทดแทนสูตรอาหารซารุค 80%

### ภาพการทดลองที่ 2



2.1 เตรียมสาหร่ายสไปรูลิน่าลงในภาชนะที่ฆ่าเชื้อแล้ว



2.2 เตรียมภาชนะที่ฆ่าเชื้อสไปรูลิน่าและเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก



2.3 บ่มตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม

2.4 อบแห้งด้วย hot air oven



2.5 บดสไปรูลิน่าหมักอบแห้ง กำหนดขนาดของความละเอียด 1-2 ไมโครเมตร

### ภาพการทดลองที่ 3

3.1 เตรียมโรงเรือนเลี้ยงสุกร และตรวจเช็คความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณคลอรีนตกค้าง



3.2 ผสมอาหาร อัดเม็ด เตรียมระบบบำบัดน้ำดื่ม และพื้นที่โดยรอบโรงเรือนวิจัยฯ



### 3.3 ขนย้ายสุกรมายังหน่วยวิจัยสุกร สถานีวิจัยและฝึกอบรมปึงราชนค มหาวิทยาลัยนเรศวร



### 3.4 รับเข้าสุกร ติดป้ายเบอร์หู และจัดกลุ่มการทดลอง



### 3.5 ชั่งน้ำหนัก 14 วัน ถึง 28 วัน และ ฉีดวัคซีน





3.6 คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เข้าตรวจมาตรฐานการใช้สัตว์ฯ



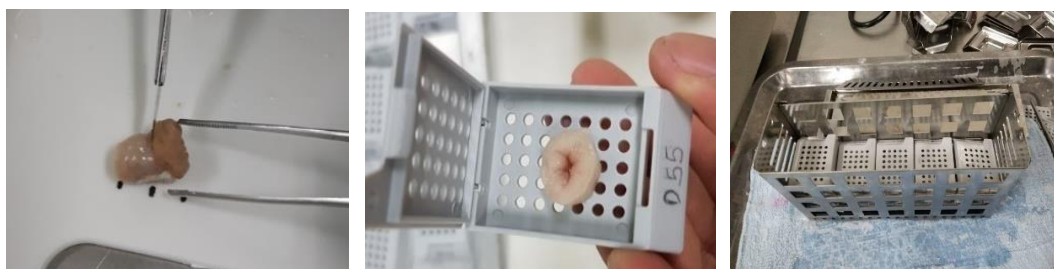
3.7 ทำการการุณฆาตสุกรเพื่อเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์เชิงลึก สุขภาพลำไส้ และลักษณะสัญญาณวิทยาลำไส้



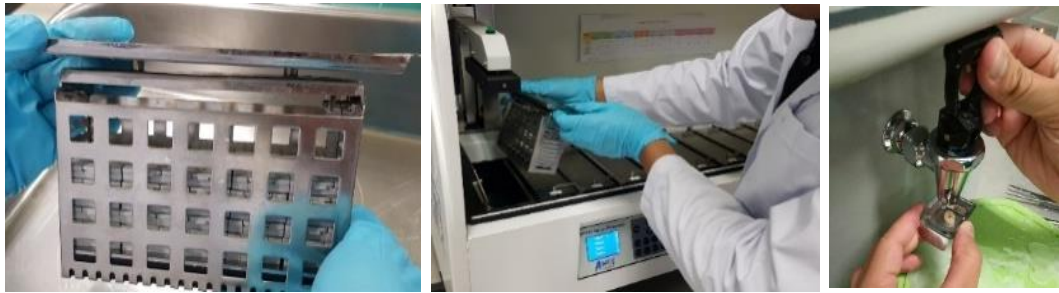
3.8 ทำการการุณฆาตสุกรเพื่อเก็บตัวอย่างลำไส้ในขวดแก้วที่มี buffered formalin 10%



3.9 ขั้นตอนการศึกษาสัญญาณวิทยาลำไส้ (Intestinal morphology of protocol)



3.9.1 ตัดชิ้นส่วนของลำไส้ให้มีขนาด 2 มิลลิเมตร และใส่ในกล่องตะหลับ



3.9.2 ใส่ตะกร้าเพื่อเข้าเครื่อง tissue processing 15 ชั่วโมง

3.9.3 วางตำแหน่งของตัวอย่างแล้วเท paraffin ลงในตะหลับ



3.9.4 ใช้มีดแต่งบล็อก

3.9.5 นำไปสไลด์ให้บาง 0.5  $\mu\text{m}$  ด้วยเครื่อง Microtome

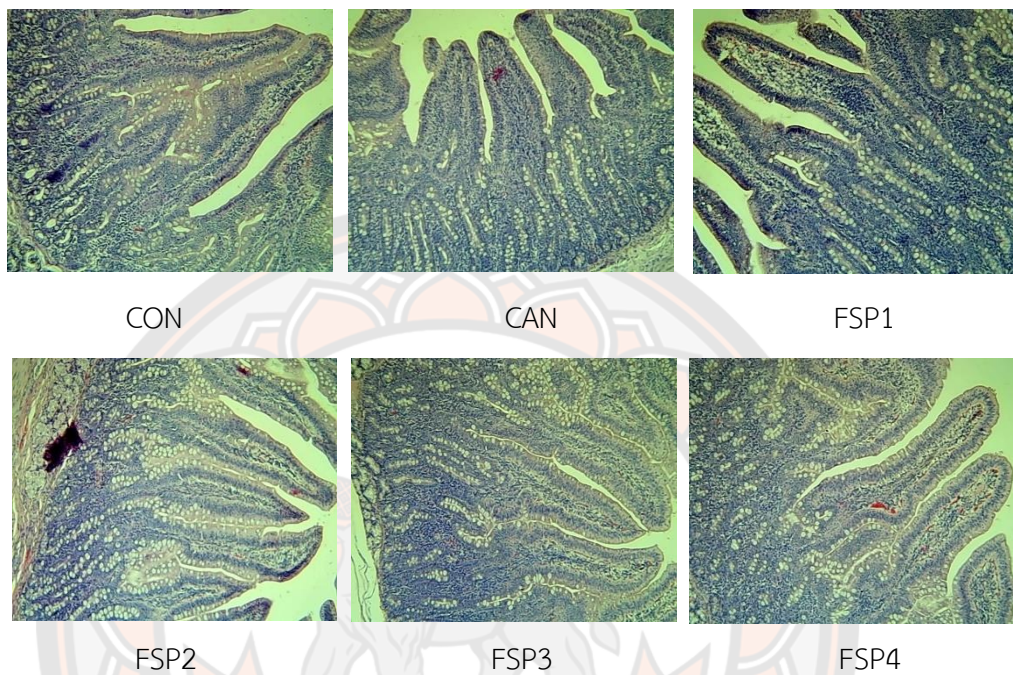
3.9.6 นำไปย้อมสีด้วย Hematoxylin Eosin



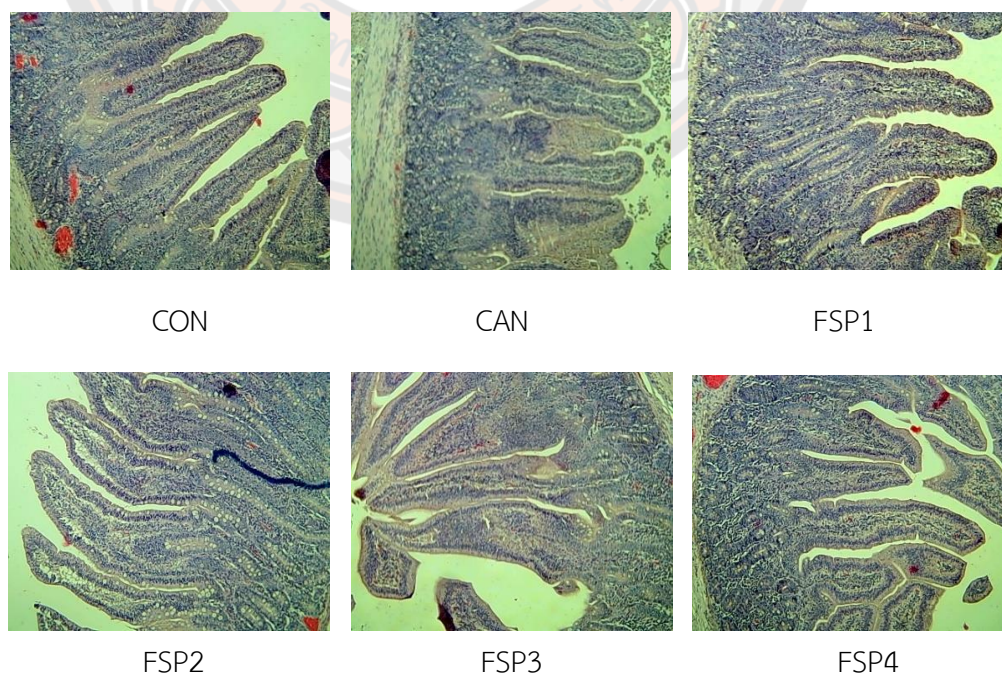
3.9.7 เตรียมสไลด์ติดกาวเคลือบด้วยแผ่นสไลด์เพื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ไมโครสโคปที่ กำลังขยาย 10 เท่า

### 3.10 ภาพเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาลำไส้สุกร

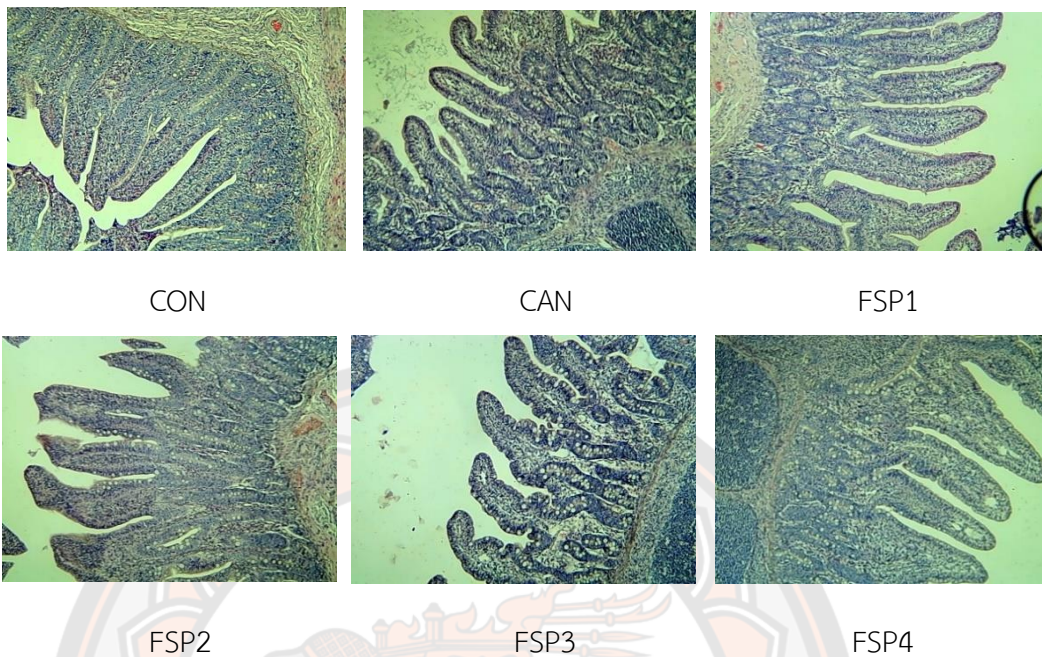
ลำไส้เล็กส่วนต้น



ลำไส้เล็กส่วนกลาง



ลำไส้เล็กส่วนปลาย



3.11 การศึกษาการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันของสุกรจากเนื้อเยื่อไขมัน และลำไส้



เครื่อง Nano-300      เครื่อง PCR (Biometra Tone)      CFX Connect Real-Time PCR  
(Micro-Spectrophotometer)



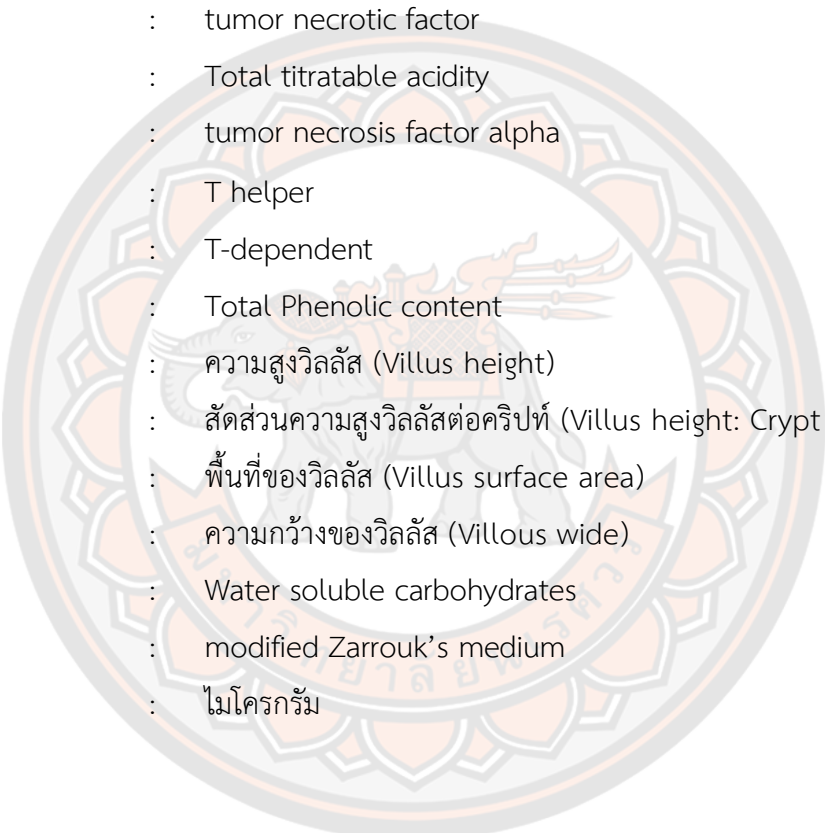
เครื่อง Get Duo                      เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

## อภิธานศัพท์

6-PG pathway	:	6-phosphogluconate pathway
ADFI	:	Average daily feed intake
ADG	:	Average Daily Gain
ATP	:	อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต adenosine triphosphate; (ATP)
APC	:	Antioxidant potential capacity
Ash	:	เถ้า
CaCO <sub>3</sub>	:	แคลเซียมคาร์บอเนต
CAT	:	Catalase
CAN	:	อาหารสูตรควบคุมเสริมยาปฏิชีวนะ
CF	:	Crude fiber
CFU	:	Count all colony forming units
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	:	Monosaccharides
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO	:	1-Sodioethene-1-ol
C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	:	Ammonium citrate tribasic
CTL	:	Cytotoxic T lymphocytes
CLA	:	conjugated linoleic acid
CMI	:	cell-mediated immunity
CMIR	:	cell-mediated immune response
CD	:	Crypt depth
CO <sub>2</sub>	:	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
CON	:	อาหารสูตรควบคุม
Con a	:	Concanavalin A
CRF	:	Corticotropin releasing factor
CSF	:	Colony-stimulating factors
CT	:	Center tank
CTL	:	T Lymphocytes
DPPH assay	:	Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl assay
EE	:	Ether extract
FCR	:	Feed conversion ratio

FSP <sup>+1</sup>	:	อาหารสูตรทดลองเสริมผลิตภัณฑ์สไปรูลิน่าหมักด้วยแลคทีเรียแลคติก 5 เปอร์เซ็นต์
FSP <sup>+2</sup>	:	อาหารสูตรทดลองเสริมผลิตภัณฑ์สไปรูลิน่าหมักด้วยแลคทีเรียแลคติก 10 เปอร์เซ็นต์
FSP <sup>+3</sup>	:	อาหารสูตรทดลองเสริมผลิตภัณฑ์สไปรูลิน่าหมักด้วยแลคทีเรียแลคติก 15 เปอร์เซ็นต์
FSP <sup>+4</sup>	:	อาหารสูตรทดลองเสริมผลิตภัณฑ์สไปรูลิน่าหมักด้วยแลคทีเรียแลคติก 20 เปอร์เซ็นต์
GE	:	Gross Energy
GPx	:	Glutathione peroxidase
GM-CSF	:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IM	:	Intramuscular injection
IU	:	International Unit เป็นหน่วยวัดมาตรฐานสากลซึ่งเป็นหน่วยที่ใช้อ้างอิงเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ สารออกฤทธิ์แต่ละชนิด เช่น วิตามิน (vitamin)
IFN	:	Interferon
IFN- $\gamma$	:	Interferon gamma
IFN- $\alpha$	:	Interferon alpha
IL-1	:	Interleukin 1
IL-1 $\beta$	:	Interleukin 1 beta
IL-2	:	Interleukin 2
IL-4	:	Interleukin 4
IL-6	:	Interleukin 6
IL-8	:	Interleukin 8
IL-12	:	Interleukin 12
IL-12 p40	:	Interleukin 12 P 40
IL-17A	:	Interleukin-17A
IL-18	:	Interleukin 18
LPS	:	lipopolysaccharide
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	Dipotassium phosphate

KJ	:	กิโลจูล
kg	:	กิโลกรัม
LDH	:	lactate dehydrogenase
MALT	:	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MHC	:	Major histocompatibility complex
mg	:	มิลลิกรัม
mlg	:	membrane – bound immunoglobulin
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	:	Magnesium Sulphate
MnSO <sub>4</sub>	:	Manganese Sulfate Monohydrate
MYD88	:	Myeloid differentiation primary response 88
NALT	:	Nasal-associated lymphoid tissue
NAD <sup>+</sup>	:	NAD <sup>+</sup> หรือ Nicotinamide Adenine Dinucleotide เป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญต่อชีวิต และอยู่ในทุกเซลล์ของร่างกาย
NaNO <sub>3</sub>	:	Sodium nitrite
NaOH	:	Sodium hydroxide
NaHCO <sub>3</sub>	:	Sodium bicarbonate
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	:	Sodium Metabisulfite
NH <sub>4</sub> OH	:	Ammonium hydroxide
NF-KB	:	Nuclear factor-KB
NK cell	:	Natural killer cell
OD	:	Optical Density
OP	:	Oxidation pond
PALS	:	periarteriolar lymphoid sheath
PBS buffer	:	Phosphate Buffered Saline
PBMC	:	Peripheral blood mononuclear cells
PC	:	Phycocyanin
PE	:	Phycoerythrin
PHA	:	phytohemagglutinin
PK pathway	:	Phosphoketolase pathway
PUFAs	:	Polyunsaturated fatty acids
APC	:	Allophycocyanin



qRT-PCR	:	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RT-PCR	:	Reverse Transcription PCR
TLR	:	Toll-Like Receptors
SOD	:	Superoxide Dismutase
SRBC	:	Sheep red blood cells
TCR	:	T cell receptor
TLR	:	Toll-like receptors
TNF	:	tumor necrotic factor
TTA	:	Total titratable acidity
TNF- $\alpha$	:	tumor necrosis factor alpha
T <sub>H</sub>	:	T helper
T-D	:	T-dependent
TPC	:	Total Phenolic content
VH	:	ความสูงวิลลัส (Villus height)
VH:CD	:	สัดส่วนความสูงวิลลัสต่อคริปต์ (Villus height: Crypt depth)
VSA	:	พื้นที่ของวิลลัส (Villus surface area)
VW	:	ความกว้างของวิลลัส (Villous wide)
WSC	:	Water soluble carbohydrates
Zm	:	modified Zarrouk's medium
$\mu\text{g}$	:	ไมโครกรัม





ประวัติผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยสุรินทร์

## ประวัติผู้วิจัย

### ชื่อ-นามสกุล

ว่าที่ ร.ต. อติศักดิ์ คงแก้ว

### ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2557- 2559 ตำแหน่งสัตวบาลประจำฟาร์ม ธุรกิจสุกรครบวงจร

บริษัท CPF เครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน)

ฟาร์มพิษณุโลก 1 (ศูนย์ฝึกอบรม) จังหวัดพิษณุโลก ประเภทฟาร์ม GP,GGP  
ขนาดฟาร์ม 4,800 แม่

ฟาร์มสุพรรณบุรี (ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สุกรสายพันธุ์ลูกตก) จังหวัด  
สุพรรณบุรี ประเภทฟาร์ม GP ขนาดฟาร์ม 2,400 แม่

ฟาร์มอุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี ประเภทฟาร์ม GGP ขนาดฟาร์ม 1,200 แม่

ฟาร์มป่าบอน 1 จังหวัดพัทลุง ประเภทฟาร์ม GP,PS ขนาดฟาร์ม 2,400แม่

พ.ศ. 2559-2560 ตำแหน่งนักวิชาการและบริการ

แผนกสนับสนุนวิชาการลูกค้าอาหาร(สุกร) ฝ่ายการตลาด บริษัท Chai tai  
conti company (正大康地(蛇口)有限公司) เขต

เศรษฐกิจพิเศษเซ็นเจิ้น มณฑลกว่างตง สาธารณรัฐประชาชนจีน

### ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556 วท.บ.(สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต  
หาดใหญ่

### ผลงานตีพิมพ์

ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า, อติศักดิ์ คงแก้ว, สุพัฒน์ พลชา, ปิยวัฒน์ ปองผดุง,  
และวิทยา ทาวงค์. (2552). การประเมินการเจริญเติบโตและองค์ประกอบ  
ทางชีวเคมีของสาหร่าย *Arthrospira platensis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหารน้ำเสีย  
จากฟาร์มสุกรจากแผนการทดลองแบบอโทโทนอนอล. การประชุมวิชาการ  
สาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 9, กรุงเทพฯ.

ศรธรรม ทองดี, วันดี ทาตระกูล, รังสรรค์ เจริญสุข, ทศพร อินเจริญ, สนธยา  
นุ่มท้วม, นิทัศน์ วิชาสีทธิ, และ อติศักดิ์ คงแก้ว. (2562). ผลของการเสริม  
*Bacillus toyonensis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและการเกิดท้องเสียของ  
สุกรหย่านม. ต่อการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.  
วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 47 ฉบับ

พิเศษ 2, 171-176.

อดิศักดิ์ คงแก้ว, วันดี ทาตระกูล, รังสรรค์ เจริญสุข, นิทัศน์ วิชาสิทธิ์, และ วิทยา ทาวงศ์. (2563). ผลของการหมักสไปรูลิना (Arthrospira platensis) ด้วย Lactobacillus plantarum TISTR 2075 ต่อการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 48 ฉบับพิเศษ 1, 277-284.

วันดี ทาตระกูล, สุชาดา ทองอิน, นิทัศน์ วิชาสิทธิ์ และ อดิศักดิ์ คงแก้ว. (2563). การใช้สตาร์ช กล้วยน้ำว้าร่วมกับโซเดียมอัลจิเนตในเทคนิคไมโครเอนแคปซูลสำหรับโพรไบโอติก Lactobacillus acidophilus TISTR1338. วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 48 ฉบับพิเศษ 1, 663-668.

นิทัศน์ วิชาสิทธิ์, สุพัตรา อุ่นศรี, อลิษา ช่างปิ่น, วัชรินทร์ อัมทองกลาง, อดิศักดิ์ คงแก้ว และวันดี ทาตระกูล. (2563, มิถุนายน). การเสริมผงไมโครเอนแคปซูลของน้ำมันกรดไขมันสายกลางเข้มข้นในอาหารแม่สุกรต่อประสิทธิภาพการผลิตของแม่และลูกสุกรดูตนม. การประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 17, พิษณุโลก.

อดิศักดิ์ คงแก้ว, วันดี ทาตระกูล, และ รังสรรค์ เจริญสุข (2563). การปรับตัวของอุตสาหกรรมเกลือสุกรและสถาบันการศึกษาต่อวิกฤตการณ์ปัจจุบัน. นิตยสาร Pig and Pork, 139. 27-31

วัชรินทร์ อัมทองกลาง, ระพีพร จัยทัฬห, อรปรียา โชติ, อดิศักดิ์ คงแก้ว, นิทัศน์ วิชาสิทธิ์, ทศพร อินเจริญ, ชัยสิทธิ์ หมอนประเสริฐ, และวันดี ทาตระกูล (2564). ผลของการเสริมฐานเห็ดถั่งเช่าสีทอง ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต และความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในสุกรอนุบาล. วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 49 ฉบับพิเศษ 1, 75-80.

อดิศักดิ์ คงแก้ว, วันดี ทาตระกูล, รังสรรค์ เจริญสุข, วิทยา ทาวงศ์, และ ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า (2564). การประเมินการใช้แหล่งน้ำเสียจากฟาร์มสุกรต่อคุณสมบัติทางชีวเคมี และต้นทุนการผลิตการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิना. วารสารแก่นเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 49 ฉบับพิเศษ 1, 145-151.

รางวัลที่ได้รับ

รางวัลวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ประเภทรางวัลระดับดีเด่น กลุ่ม

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การประกวดนวัตกรรมจากวิทยานิพนธ์และการ  
ค้นคว้าอิสระ (Thesis & Independent Study Innovation Award  
2020) จัดโดยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร วันพฤหัสบดีที่ 3  
กันยายน 2563

รางวัลระดับดี ในการนำเสนอแบบบรรยาย ผลงานวิชาการเรื่อง ผลของการ  
หมักสไปรูลิน่า (*Arthrospira platensis*) ด้วย *Lactobacillus plantarum*  
TISTR 2075 ต่อการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ  
ในงานประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 21 ประจำปี 2563

รางวัลระดับชมเชย ในการนำเสนอแบบบรรยาย ผลงานวิชาการเรื่อง การ  
ประเมินการใช้แหล่งน้ำเสียจากฟาร์มสุกรต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีและต้นทุน  
การผลิตการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ในการประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่  
22 ประจำปี 2564

