วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
Journal of Roi Et Rajabhat University: Science and Technology

การคัดเลือกสารพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพเป็นสารเสริมในอาหารโค
Screening of Effective Prebiotic as Additive in Cattle Feed

เปรมสุดา สมาน
Premsuda Saman
ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
Biodiversity Research Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research
*ผู้นิพนธ์หลัก: premsuda@tistr.or.th
*Corresponding author: premsuda@tistr.or.th

Received: 8 March 2024; Revised: 8 April 2024; Accepted: 11 April 2024

Abstract

The objective of this study was to evaluate the prebiotic properties of potential substances including isomalto-oligosaccharides (IMO), fructo-oligosaccharides (FOS), and Trehalose. Three probiotic bacteria (*Lactobacillus farciminis*, *L. acidophilus,* and *Pediococcus pentosaceus*) isolated from cattle feces were used in this study. Three substance fermentation using individual probiotics have proceeded under controlled conditions. The fermentation used glucose as a carbon source and *E. coli* as a comparative inoculum. The growth of each culture was monitored every 6 hours until 48 hours of fermentation. The results showed that different prebiotic activity scores were obtained when using different bacterial strains and different substances. Among three substances, IMO represented the highest prebiotic activity followed by Trehalose and FOS, respectively. From the results, IMO could affect host health by positively increasing the good intestinal microflora such as *L. farciminis L. acidophilus* and *P. pentosaceus*. Thus, IMO was the effective prebiotic that could be applied in cattle feed.

Keywords: prebiotic; probiotic; cattle

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อที่จะคัดเลือกสารพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ โดยทดสอบกับสารคาร์โบไฮเดรต 3 ชนิด ได้แก่ isomalto-oligosaccharides (IMO) fructo-oligosaccharides (FOS) และ Trehalose วิธีทดสอบจะใช้กระบวนการหมักสารทั้ง 3 ชนิด ด้วยเชื้อโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากมูลโคจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *L. acidophilus* และ *Pediococcus pentosaceus* และใช้กระบวนการ

หมักที่มีน้ำตาล glucose และ *E.coli* เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ตรวจติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำค่าการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมพรีไบโอติกของสารทดสอบ จากผลการทดลองพบว่าสารทดสอบแต่ละชนิดเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันก็จะให้ค่ากิจกรรมพรีไบโอติกที่แตกต่างกันในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยสารทดสอบที่ให้ค่ากิจกรรมพรีไบโอติกที่ดีที่สุดคือ IMO รองลงมาคือ Trehalose และ FOS ตามลำดับ เนื่องจาก IMO สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของ *L. farciminis*, *L.acidophilus* และ *P. pentosaceus* ได้ดี จึงเป็นสารพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นสารเสริมในอาหารโคได้

คำสำคัญ: พรีไบโอติก; โพรไบโอติก; โค

บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจในประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก ทั้งเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ จากการพยากรณ์ขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations หรือ FAO) ได้รายงานว่า ปริมาณความต้องการเนื้อสัตว์ของประชากรโลกในอีก 9 ปีข้างหน้าจะขยายตัวเพิ่มสูงขึ้น โดยในปี ค.ศ. 2050 ปริมาณความต้องการเนื้อโคจะมีมากถึง 106 ล้านตัน (Department of Livestock Development, 2018) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาทั้งรูปแบบการเลี้ยงและอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพ

การส่งเสริมให้สัตว์มีสุขภาพร่างกายที่แข็งแรงนั้น อาหารมีส่วนสำคัญเป็นอย่างมากซึ่งอาหารที่ใช้สำหรับการเลี้ยงโคนั้นประกอบด้วย อาหารหยาบ ซึ่งได้มาจาก หญ้าสด ฟางข้าว พืชตระกูลถั่ว และต้นข้าวโพด เป็นต้น และ อาหารข้น ซึ่งได้จากอาหารที่มีความเข้มข้นและมีโปรตีนสูง มีกากใยต่ำ สัตว์กินเข้าไปแล้วย่อยได้ง่าย เช่น รำ ปลายข้าว ข้าวโพดบด อาหารข้นสำเร็จรูปตามท้องตลาด และหัวอาหาร เป็นต้น การเพิ่มสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อโคเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้โคมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น มีสุขภาพแข็งแรงและป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ สารเสริมในอาหารโคมีหลายชนิด เช่น วิตามิน เอนไซม์ บัฟเฟอร์ โพรไบโอติก และพรีไบโอติก เป็นต้น สารเสริมสุขภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มซึ่งอาจเกิดสารตกค้างและจะส่งผลเสียให้กับผู้บริโภคได้

สารพรีไบโอติกได้รับการนิยามว่าเป็น“ส่วนผสมอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ที่ส่งผลดีต่อโฮสต์โดยการเลือกการกระตุ้นการเติบโตและ หรือกิจกรรมของแบคทีเรียที่ส่งเสริมสุขภาพในลำไส้" (Hoseinifar and Merrifield, 2010) ประโยชน์ของพรีไบโอติก คือ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ Lactic acid bacteria (LAB) ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพหรือโพรไบโอติก และช่วยลดความหนาแน่นของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (Date et al., 2014; Khangwal and Shukla, 2019) จุลินทรีย์โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ (Vieira et al., 2013) แต่การใช้โพรไบโอติกก็ยังมีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น อาจจะทำให้เกิดการแพ้หรือการไม่สมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ (Dysbiosis) (Kothari et al., 2019) โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการใช้สาร พรีไบโอติกซึ่งเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์และปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร

พรีไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์มีหลายชนิด เช่น fructo-oligosaccharides, trans-galacto-oligosaccharides และ Mannan-oligosaccharide พรีไบโอติกเหล่านี้ช่วยเพิ่มจำนวนของ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหาร (Markowiak and Slizewska, 2018) เป็นสารพรีไบโอติกที่มีการใช้ในสัตว์ต่าง ๆ เช่น ไก่ สุกร ปลา และโค (Anadón et al., 2019; Halas and Nochta, 2012; Zheng et al., 2021) นอกจากนี้ Trehalose และ Isomalto-oligosaccharides สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ได้แก่ *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. (Chen and Patrick, 2023; Madsen et al., 2017) ดังนั้น การเสริมสารพรีไบโอติกลงไปในอาหารโค จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้โคมีสุขภาพดี ช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้ เพิ่มภูมิต้านทานแก่สัตว์ โดยไม่ทำให้มีสารตกค้างที่ทำอันตรายต่อผู้บริโภค (Raza et al., 2022; Uyeno et al., 2015)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมอาหารทดสอบ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่เติมสารทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ IMO, FOS และ Trehalose ปริมาณร้อยละ 1 (w/v) และ glucose (สารเปรียบเทียบ) ปริมาณร้อยละ 1 (w/v) ใส่ขวดทดสอบให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อหม้อนึ่งแรงดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

นำจุลินทรีย์โพรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากมูลโค จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. farcimini* *L. acidophilus* และ *P. pentosaceus* มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth (Merck เยอรมัน) และเตรียมเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบ คือ *Escherichia coli* นำมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (Merck เยอรมัน) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซ็นต์) 2 รอบ แล้วนำไปปรับ Optimal density (OD) ที่ 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในการทดสอบการเจริญและหาค่ากิจกรรมพรีไบโอติก

3. การทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ถ่ายหัวเชื้อโพรไบโอติกที่เตรียมไว้ทั้ง 3 สายพันธุ์ และ *E. coli* ลงในอาหารทดสอบแต่ละชนิด ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี drop plate ลงบนอาหาร MRS agar (Merck เยอรมัน) ส่วนเชื้อ *E. coli* ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร EMB agar (Merck เยอรมัน) แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เลือกนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นแต่ละชนิดในระดับการเจือจางที่เหมาะสม (2-30 โคโลนี) บันทึกผลของปริมาณเชื้อที่ได้แล้วนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมพรีไบโอติก (Prebiotic activity, PA) (Lee et al., 2021) ดังนี้

$$PA = \frac{\text{probiotic log CFU/mL on the sample at specific time}}{\text{probiotic log CFU/mL on the sample at 0 h}}$$

probiotic log CFU/mL on glucose at specific time –probiotic log CFU/mL on glucose at 0 h

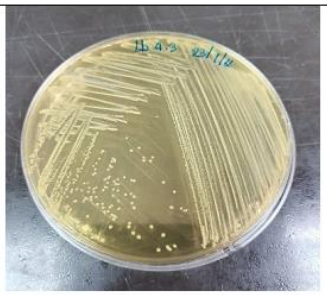
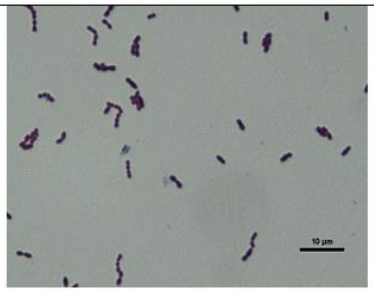
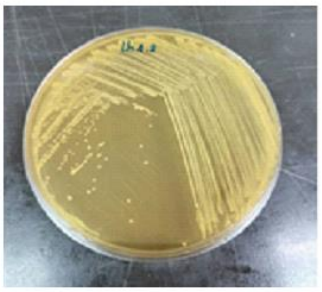
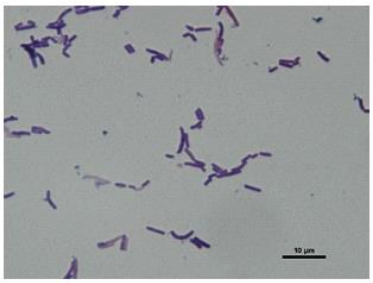
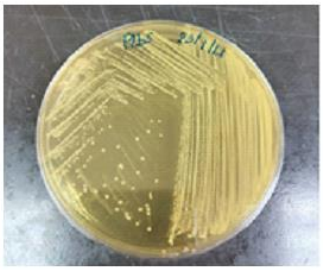
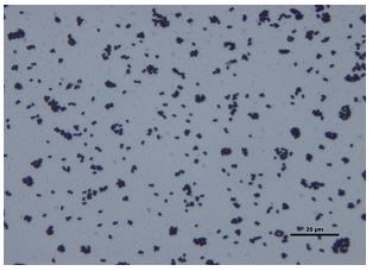
– *E. coli* log CFU/mL on the sample at specific time – *E. coli* log CFU/mL on the sample at 0 h

E. coli log CFU/mL on glucose at specific time – *E. coli* log CFU/mL on glucose at 0 h

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการตรวจติดตามการเจริญของโพรไบโอติกแลคติกแอซิคแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. farcimini, L. acidophilus* และ *P. Pentosaceus* (Table 1) ในสารทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ IMO FOS และ Trehalose โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาล glucose ติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำค่าการเจริญที่ได้มาคำนวณหาค่า PA ผลการทดลองแสดงใน Figure 1 – 3

Table 1. Three probiotic lactic acid bacteria isolated from cattle feces

Probiotic	Colony on MRS agar	Gram stain
L. farciminis		
L. acidophilus		
P. pentosaceus		

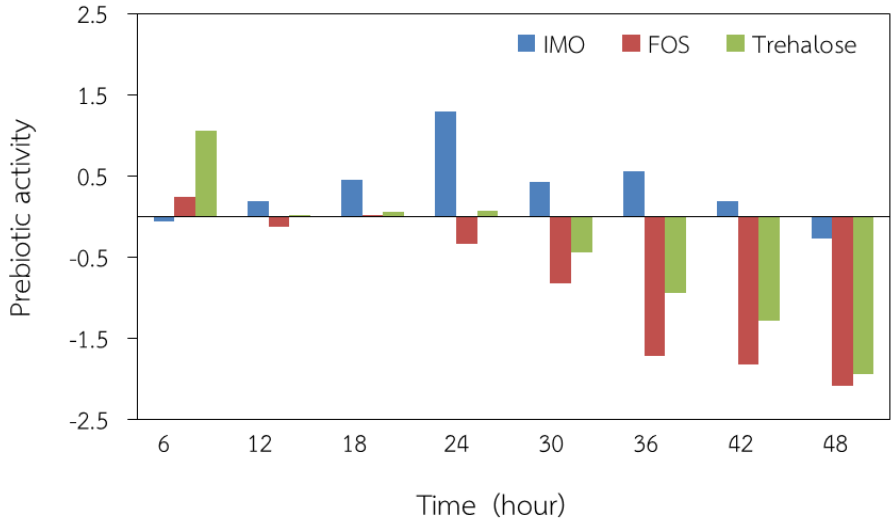


Figure 1 Prebiotic activity of IMO, FOS, and Trehalose tested by *L. farciminis* and *E. coli*

Figure 1 แสดงค่า PA ของสารทดสอบ 3 ชนิด โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *L. farciminis* และ *E. coli* ผลการทดลองพบว่า *L. farciminis* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี IMO ค่า PA จึงเป็นบวกมากที่สุด แต่ *L. farciminis* ไม่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี FOS และ Trehalose เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* ดังนั้นค่า PA จึงมีค่าเป็นลบ

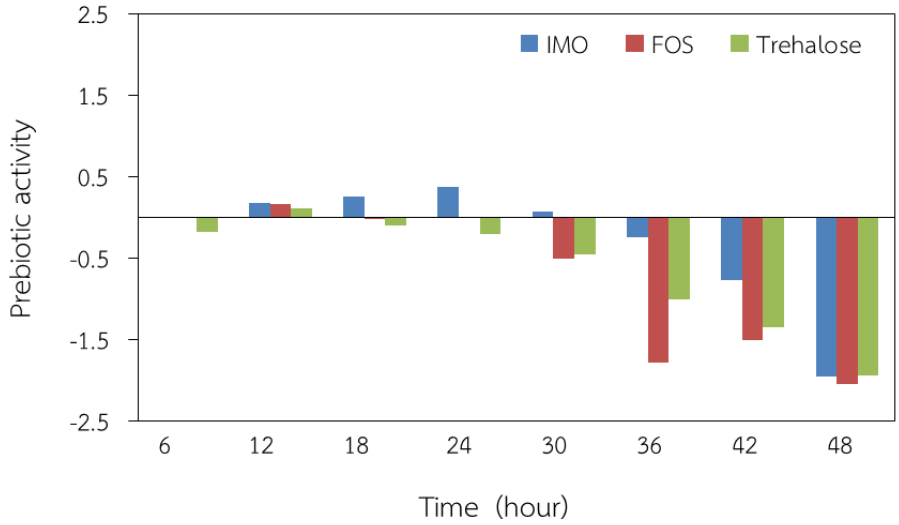


Figure 2 Prebiotic activity of IMO, FOS, and Trehalose tested by *L. acidophilus* and *E. coli*

Figure 2 แสดงค่า PA ของสารทดสอบ 3 ชนิด โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *L. acidophilus* และ *E. coli* ผลการทดลองพบว่า *L. acidophilus* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี IMO ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ FOS และ Trehalose ดังนั้นค่า PA จึงมีค่าเป็นบวกเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม ภายหลังจาก 30 ชั่วโมง ค่า PA ของทุกสารทดสอบมีค่าเป็นลบ

Figure 3 แสดงค่า PA ของสารทดสอบ 3 ชนิด โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *P. pentosaceus* และ *E. coli* จากผลการทดลองพบว่า *P. pentosaceus* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี IMO มากที่สุด ดังนั้นค่า PA จึงมีค่าเป็นบวกอย่างชัดเจน ส่วน FOS และ Trehalose มีค่า PA น้อยกว่า IMO และ PA มีค่าติดลบภายหลัง 24 ชั่วโมง

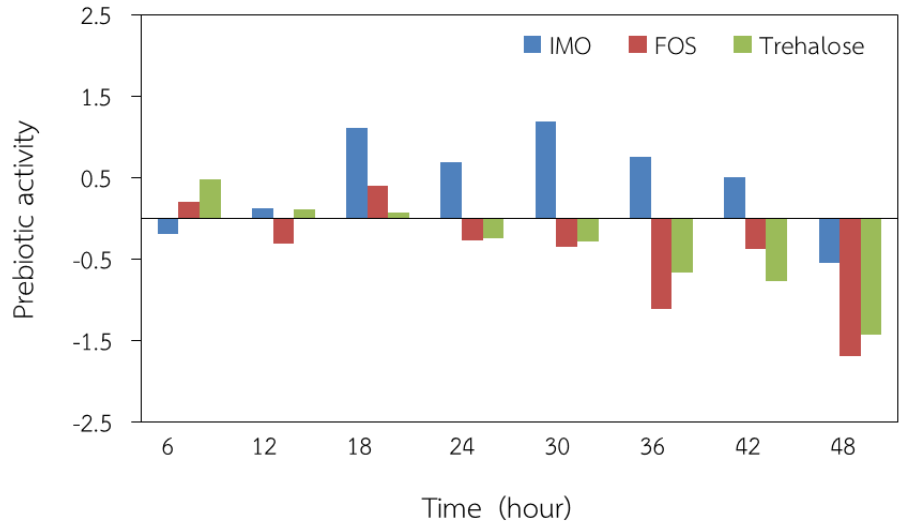


Figure 3 Prebiotic activity of IMO, FOS, and Trehalose tested by *P. pentosaceus* and *E. coli*

เมื่อพิจารณาค่า PA ในสารทดสอบ IMO, FOS และ Trehalose จะสังเกตได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. farciminis*, *L. acidophilus* และ *P. pentosaceus* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี IMO ดีที่สุด ดังนั้น IMO จึงมีค่า PA มากที่สุด จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Keawyok et al., 2023) ที่ได้หาค่า PA ของ IMO โดยทดสอบกับแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ได้แก่ *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *B. animalis* และ *B. bifidum* เชื้อทดสอบทุกสายพันธุ์แสดงค่า PA เป็นบวก ยกเว้น *L. acidophilus* และงานวิจัยของ (Tiangpook et al., 2023) ได้รายงานว่า IMO สามารถส่งเสริมการเจริญของ *B. longum* และ *L. plantarum* แต่ไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อก่อโรค *E. coli* และ *S. enterica* เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์นี้ สามารถผลิตเอนไซม์ที่จำเป็นในการย่อย IMO แต่ *E. coli* และ *S. enterica* ขาดเอนไซม์ที่ใช้ย่อย IMO จึงทำให้ไม่สามารถใช้ IMO ในการเจริญได้ ทำให้ค่า PA ของ IMO มีค่าเป็นบวก นอกจากนี้ (Møller et al., 2012) และ (Wu et al., 2017) ได้รายงานว่า IMO สามารถส่งเสริมการเจริญและเพิ่ม

ปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* sp. และ *Streptococcus* sp. เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ 1, 6-α-glucosidases เพื่อย่อย α-1, 6-glycosidic linkages ซึ่งเป็นพันธะในโครงสร้าง IMO จึงทำให้แบคทีเรียนี้ใช้ IMO เป็นอาหารในการเจริญได้ ดังนั้น จากผลการวิจัยและข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า IMO เป็นสารที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารพรีไบโอติก

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า IMO เป็นสารคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพเป็นพรีไบโอติกที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ อย่างไรก็ตามควรที่จะทำการทดสอบคุณสมบัติของ IMO เพิ่มเติม เช่น ศึกษาประสิทธิภาพของ IMO ในระบบแบบจำลองลำไส้โคเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ การผลิตสารเมตาบอไลส์และกรดไขมันสายสั้นต่างๆ รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัย ความเป็นพิษต่อเซลล์ การต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือความสามารถในการการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Department of Livestock Development. (2018). Department of Livestock Development Strategy 2018-2022. https:// planning. dld. go. th/ th/ images/ stories/ section-5/2561/strategy01.pdf

Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2019). Prebiotics and probiotics in feed and animal health. In: Gupta, R., Srivastava, A., Lall, R. (eds) Nutraceuticals in Veterinary Medicine. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_19

Chen, A., & Patrick A. G. (2023). Dietary trehalose as a bioactive nutrient. *Nutrients, 15*(6), 1393. https://doi.org/10.3390/nu15061393

Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda S, Nuijima, Y., Kato, T., Umehara, M., Ohno, H., & Kikuchi, J. (2014). In vitro evaluation method for screening of candidate prebiotic foods. *Food Chemistry*,*152*, 251-260. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.126

Halas, V., & Nochta, I. (2012). Mannan-oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals*, *2*, 261-274. https://doi.org/10.3390/ani2020261

Hoseinifar, S.H., Zare, P., & Merrifield, D.L. (2010). The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae (*Fenneropenaeus indicus*). *Aquaculture Research*, *41*, 348-352. https://doi:org/10.1111/j.1365-2109.2010.02485.x

Keawyok K, Waree, W., & Jodnak, S. (2023). Prebiotic properties of isomalto-oligosaccharides from cassava as a potential ingredient in high-protein drinks for athletes. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, *6*, 38-55. https://doi.org/10.31989/bchd.v6i3.1063

Khangwal, I., & Shukla, P. (2019). Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. *Journal of Food and Drug Analysis*, *27*, 649- 656. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.02.003

Kothari, D., Patel, S., & Kim, S. K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 111*, 537-547. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.104

Lee, H.B., Son, S.U., Lee, J.E., Lee, S.H., Kang, C.H., Kim, Y.S., Shin, K.S., & Park, H.Y. (2021). Characterization, prebiotic and immune- enhancing activities of rhamnogalacturonan- I- rich polysaccharide fraction from molokhia leaves. *International journal of biological macromolecules*, *175*, 443– 450. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.019

Madsen, L.R., 2nd, Stanley, S., Swann, P., & Oswald, J. (2017). A survey of commercially available isomalto- oligosaccharide- based food ingredients. *Journal of food science*, *82*(2), 401–408. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13623.

Markowiak, P., & Slizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, *10*, 21. https:// doi.org.10.1186/s13099-018-0250-0

Møller M.S., Fredslund, F., Majumder, A., Nakai, H., Poulsen J.N., Leggio, L., Svensson, B., & Hachem, M.A. (2012). Enzymology and structure of the GH13_31 glucan 1,6-**α**- glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Journal of Bacteriology, 194*(16). https://doi.org/10.1128/jb.00622-12

Raza, M., Yousaf, M.S., Ahmad, J., Rashid, M.A., Majeed, K.A., Tahir, S.K., Ashraf, S., Numan, M., Khalid, A., & Rehman, H.U. (2022). Prebiotics supplementation modulates pre- weaning stress in male cattle calves by improving growth performance, health scores and serum biomarkers. *Czech Journal of Animal Science, 67*(3), 102-113. https://doi.org.10.17221/70/2021-CJAS.

Tiangpook, S., Nhim, S., Prangthip, P., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., & Waeonukul, R. (2023). Production of a series of long- chain isomalto-

oligosaccharides from maltose by *Bacillus subtilis* AP- 1 and associated prebiotic properties. *Foods (Basel, Switzerland)* , *12*(7) , 1499. https://doi.org/10.3390/foods12071499

Uyeno, Y., Shigemori, S., & Shimosato, T. (2015). Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and environments*, *30*(2) , 126– 132. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14176

Vieira, A.T., Teixeira, M.M., & Martins, F.S. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in immunology*, *4*, 445. https//doi.org.10.3389/fimmu.2013.00445

Wu, Y., Pan, L., Shang, Q.H., Ma, X., Long, S., Xu, Y., & Piao, X. (2017). Effects of isomalto-oligosaccharides as potential prebiotics on performance, immune function and gut microbiota in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology, 230*. http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.013

Zheng, C., Zhou, J., Zeng, Y., & Liu, T. (2021). Effects of mannanoligosaccharides on growth performance, nutrient digestibility, ruminal fermentation and hematological parameters in sheep. *PeerJ*, *9*, 11631. https//doi.org. 10.7717/peerj.11631