



## รายงานการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์บิฟิโดแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตน้ำนมหมัก  
(Selection of *Bifidobacterium* spp. for Fermented Milk Production)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

# การคัดเลือกสายพันธุ์บีฟิโดแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตนํ้านมหมัก (Selection of *Bifidobacterium* spp. for Fermented Milk Production)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เขมวิทย์ จันทะมา

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริมา สุวรรณภูมิ จันทะมา

นางสาวภัทรา ชาญชัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

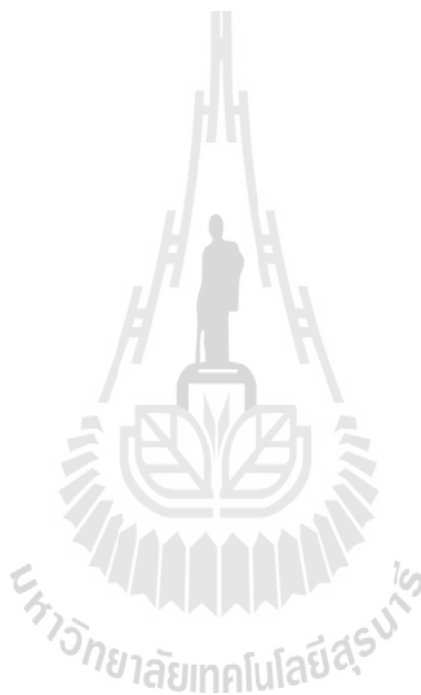
กันยายน 2559

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2556 ผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ผู้ช่วยวิจัยทุกท่านจากหน่วยวิจัยวิศวกรรมเมทาบอคลิก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดถึงความสะดวกสำหรับการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณบิดา คุณมารดา และคุณครูบาอาจารย์ ผู้ประสิทธิ์วิชาความรู้แก่ผู้วิจัย ตลอดถึงขอบคุณบุคคลในครอบครัว ที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจที่อบอุ่น

คณะผู้วิจัย  
กรกฎาคม 2559



## การคัดเลือกสายพันธุ์ไบโไฟโตแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตน้ำนมหมัก

ภัทรา ชาญชัย<sup>1</sup> ศิริมา สุวรรณกุล จันตะมา<sup>2</sup> เขมวิทย์ จันตะมา<sup>1</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

<sup>2</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

### บทคัดย่อ

การอยู่รอด และการคงสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีสาเหตุมาจากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมอาจก่อให้เกิดการลดลงของพหุติกรรมที่เป็นคุณสมบัติที่ดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคของแบคทีเรียโพรไบโอติก ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายในการแสวงหาคูณลักษณะที่ดีของแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ไบโไฟโตแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกมาได้จากตัวอย่างอุจจาระของเด็กทารกไทยที่มีสุขภาพแข็งแรง จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ท้องถิ่นที่คัดแยกมาคือ BF014, BF052, และ BH053 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Bifidobacterium animalis* ซึ่งสามารถแสดงการทนทานที่ดีต่อสภาวะทางเดินอาหาร จากทั้งสามสายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ *B. animalis* BF052 แสดงคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกซึ่งรวมถึงการทนทานต่อกรดและเกลือแร่ ความสามารถในการเกาะยึดต่อเซลล์ Caco-2 และความสามารถในการต้านแบคทีเรียก่อโรคคือ *Salmonella typhimurium* และ *Vibrio cholerae* สายพันธุ์นี้ยังแสดงออกถึงอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ทางการค้าระหว่างการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น นมสด พาสเจอร์ไรซ์ นำนมถั่วเหลือง โยเกิร์ตพร้อมดื่ม และน้ำส้ม ผลกระทบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหารของกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง การเก็บรักษาผงแห้งเยือกแข็ง และการนำผงแห้งเยือกแข็งผสมในอาหารได้ถูกประเมิน ผลการทดลองพบว่ากระบวนการผลิตอาหารข้างต้นไม่ส่งผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญต่อความคงตัวของสมบัติโพรไบโอติกในสายพันธุ์ BF052 โดยเฉพาะความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของทางเดินอาหาร และการเกาะยึดเซลล์ Caco-2 ซึ่งผลนี้เป็นที่น่าพึงพอใจของการประเมินขอบเขตการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์โพรไบโอติกอย่างมีประสิทธิภาพในผลิตภัณฑ์อาหาร

## Selection of *Bifidobacterium* spp. for Fermented Milk Production

Pattra Charnchai<sup>1</sup> Sirima Suvarnakuta Jantama<sup>2</sup> Kaemwich Jantama<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,  
Suranaree University of Technology

<sup>2</sup> Faculty of Pharmaceutical Science, Ubon Ratchatani University

### Abstract

The viability and functionality of probiotics may be influenced by industrial production processes resulting in the reduction of their behaviors that benefit the health of humans. This study aimed to investigate the probiotic characteristics of *Bifidobacterium* strains isolated from fecal samples of healthy Thai infants. It found three local strains (BF014, BF052, and BH053) belonging to *Bifidobacterium animalis* that showed a great resistance against conditions simulating the gastrointestinal tract. Among these, *B. animalis* BF052 possessed considerable probiotic properties, including high acid and bile tolerance, strong adhesion capability to Caco-2 cells, and inhibitory activity against pathogens including *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*. This strain also exhibited a high survival rate compared to commercial strains during storage in a wide variety of products, including pasteurized milk, soy milk, drinking yogurt, and orange juice. The impact of food processing processes as well as the freeze-drying process, storage of freeze-dried powders, and incorporation of freeze-dried cells in food matrix on probiotic properties was also determined. The food processing chain did not affect the stability of the probiotic properties of the BF052 strain, especially its resistance in the gastrointestinal transit and its adherence ability to Caco-2 cells, indicating that it satisfies the criteria as a potential probiotic and may be used as an effective probiotic starter in food applications.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญเรื่อง .....	ง
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	3
การทบทวนวรรณกรรม .....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	9
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย.....	10
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
สถานที่ทำการทดลอง.....	19
บทที่ 3 ผลการวิจัย และการอภิปรายผลการวิจัย	
ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย <i>Bifidobacterium</i> spp. ....	20
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาลูโกโซไฟลิเมอเรส	21
ผลการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด และน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร	22
รวมถึงสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี และน้ำย่อยในลำไส้เล็ก	
การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ API 50 CHL และผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับ	25
ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้	
ผลการศึกษาอัตราการยึดเกาะของเชื้อบีฟิโดแบคทีเรียกับเซลล์ผนังลำไส้	26
ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility)	28
ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	30
ผลการรอดชีวิตของเชื้อบีฟิโดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร	32
ผลการรอดชีวิตของเชื้อสายพันธุ์ BF052 ระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	34
ผลการศึกษาสมบัติของเชื้อ <i>B. animalis</i> BF052 หลังจากกระบวนการผลิต	35
ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BF052	38
ผลการวิเคราะห์ยีนที่สำคัญของเชื้อ <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BF052	39
ผลการใช้ <i>B. animalis</i> BF052 เป็นหัวเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมถั่วเหลือง	44

บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย .....	53
บรรณานุกรม .....	54
ภาคผนวก.....	62
ประวัติผู้วิจัย .....	80



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 การรอดชีวิตของเชื้อที่คัดแยกได้ (log CFU/mL $\pm$ SD) เมื่อบ่มในสภาวะที่เป็นกรด และสภาวะคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหารเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง	23
ตารางที่ 3.2 การรอดชีวิตของเชื้อที่คัดแยกได้ (log CFU/mL) ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี และสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็กหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง	24
ตารางที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้	25
ตารางที่ 3.4 ความสามารถของบิฟิโดแบคทีเรียในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2	26
ตารางที่ 3.5 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียที่ทำการคัดแยก	28
ตารางที่ 3.6 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย	31
ตารางที่ 3.7 การรอดชีวิตของเชื้อ BF052 (log CFU/mL $\pm$ SD) ก่อนและหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และระหว่างการเก็บรักษาเมื่อใช้สารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกัน	35
ตารางที่ 3.8 การรอดชีวิตของเชื้อ BF052 (log CFU/mL $\pm$ SD) เมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารจำลอง และร้อยละการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ Caco2 เมื่อผ่านการเตรียมเซลล์ที่แตกต่างกัน	38
ตารางที่ 3.9 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับใช้คาร์โบไฮเดรตและตำแหน่งของยีนที่ปรากฏอยู่บนจีโนมในฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง	43
ตารางที่ 3.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (log CFU/mL) ในนมถั่วเหลืองระหว่างการหมัก 48 ชั่วโมง	46
ตารางที่ 3.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลือง	51



## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRSc ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของเด็ก	20
รูปที่ 3.2 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X	21
รูปที่ 3.3 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิริยาจากโซโพลีเมอเรสจากเชื้อที่คัดแยกได้	22
รูปที่ 3.4 ลักษณะของเซลล์ผนังลำไส้ Caco2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กลับหัว (40X magnification)	27
รูปที่ 3.5 รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ BF052, หมายเลข 1-13 ได้แก่ streptomycin, tetracycline, gentamicin, penicillin G, erythromycin, aztreonam, chloramphenicol, ampicillin, vancomycin, kanamycin, ofloxacin, norfloxacin, และ lincomycin ตามลำดับ	29
รูปที่ 3.6 การทดสอบความสามารถของเชื้อ BF052 และ BH053 ในการยับยั้งเชื้อ <i>V. cholera</i>	31
รูปที่ 3.7 การรอดชีวิตของเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหาร (A) น้ํานมพาสเจอร์ไรส์รสจืด (B) นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (C) น้ํานมถั่วเหลือง (D) และน้ําส้มคั้น ระหว่างการเก็บรักษา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C	33
รูปที่ 3.8 การจัดเรียงลำดับและทิศทางของแต่ละ contigs	39
รูปที่ 3.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>S. thermophilus</i> บนอาหาร ST agar (รูปซ้ายมือ) และลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>L. bulgaricus</i> (โคโลนีใหญ่สีขาวนํานม) และ <i>B. animalis</i> BF052 (โคโลนีเล็กสีขาวขุ่น) บนอาหาร MRSc agar (รูปขวามือ)	45
รูปที่ 3.10 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ระหว่างการหมักน้ํานมถั่วเหลือง	47
รูปที่ 3.11 การวัดเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตน้ํานมถั่วเหลืองด้วยเครื่อง texture analyzer (รูปซ้ายมือ) และลักษณะกราฟที่เกิดขึ้นภายหลังจากการวัด (รูปขวามือ)	48
รูปที่ 3.12 การเปลี่ยนแปลงของค่าความแน่นเนื้อ (Firmness) ระหว่างการหมักน้ํานมถั่วเหลือง	49
รูปที่ 3.13 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ํานมถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดสอบความชอบ ด้วยการทดสอบทางประสาทสัมผัส	51
รูปที่ 3.14 โครมาโทแกรมจากเครื่อง HPLC จากการวิเคราะห์น้ํานมถั่วเหลืองภายหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง	52



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารนมหมัก (fermented milk products) ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง รวมถึงความมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกของอาหารนมหมักที่มีคุณสมบัติในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารให้เหมาะสมเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค และมีผลในการลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ พร้อมกับการเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหารทำให้เกิดการย่อย และการดูดซึมสารอาหารในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภคได้ดี ส่งผลต่อภาวะการเจริญเติบโตและโภชนาการที่ดีขึ้น การได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายของผลิตภัณฑ์นมหมักในรูปแบบของโยเกิร์ตพร้อมดื่ม และโยเกิร์ตทำให้อุตสาหกรรมการผลิตนมหมักต้องมีการผลิตนมหมักดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง และมีแนวโน้มในการขยายกำลังการผลิตเพื่อให้มีผลิตภัณฑ์นมหมักเพียงพอต่อความต้องการของตลาดผู้บริโภคที่เพิ่มสูงขึ้น

การผลิตนมหมักในระดับอุตสาหกรรมมีความต้องการใช้กล้าเชื้อโพรไบโอติก (probiotic starter) ที่สร้างกรดแล็กติก เพื่อทำการหมักน้ำนมวัวสดให้ได้ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ ในปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักในประเทศไทยมีการนำเข้ากล้าเชื้อโพรไบโอติก จากต่างประเทศมาใช้ในการผลิตเนื่องจากกล้าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ถูกพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับการผลิตนมหมักที่มีรสชาติ กลิ่น เนื้อสัมผัส และคุณภาพที่ดีตรงตามความต้องการและพึงพอใจของผู้บริโภค การนำเข้ากล้าเชื้อโพรไบโอติกจากต่างประเทศทำให้โรงงานอุตสาหกรรมการผลิตนมหมักต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อกล้าเชื้อโพรไบโอติกปีละหลายล้านบาท ดังนั้นจะเป็นการดีอย่างยิ่งที่อุตสาหกรรมการผลิตนมหมักในประเทศไทยจะเริ่มการค้นคว้าวิจัยเพื่อเสาะหา และพัฒนากล้าเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีคุณภาพ และคุณสมบัติที่ดีเพื่อใช้ในการผลิตนมหมักในระดับอุตสาหกรรมเอง เพื่อให้ภาคอุตสาหกรรมการผลิตนมหมักสามารถหลีกเลี่ยงหรือลดต้นทุนการผลิตที่เกิดจากการสั่งซื้อเพื่อนำเข้ากล้าเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ในกระบวนการผลิตจากต่างประเทศได้

### 1.2 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

การใช้ประโยชน์กล้าเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในทางอุตสาหกรรมนั้นต้องการกล้าเชื้อที่มีคุณภาพดี มีอัตราการรอดชีวิตสูง ให้คุณสมบัติและลักษณะผลิตภัณฑ์นมหมักที่ดี และสามารถยังมีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีเมื่อผู้บริโภครับประทานผลิตภัณฑ์ไปแล้ว นอกจากนั้นควรมีราคาถูกซึ่งกล้าเชื้อต้องมีอัตราการรอดของเซลล์แบคทีเรีย ผลผลิต อัตราการเจริญดี และความคงตัวสูงระหว่างกระบวนการผลิตอาหารนมหมัก และระหว่างกระบวนการเก็บรักษากล้าเชื้อ โดยทั่วไปกล้าเชื้อที่ภาคอุตสาหกรรมซื้อมาจากต่างประเทศมีลักษณะในรูปของแข็งซึ่งจะทำให้อายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น แต่ข้อเสียคือจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตลดลงมากหลังจากการระเหยน้ำออกในขั้นตอนการทำกล้าเชื้อแห้ง การสัมผัสอากาศ และอุณหภูมิที่สูงระหว่างการทำแห้ง นอกจากนั้นความคงตัวของหัวเชื้อในแง่ของอัตราการเจริญ ผลผลิต และผลิตผลที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการเก็บรักษาเป็นปัจจัยที่ต้อง

ทำการศึกษาเพื่อที่จะสามารถพัฒนาการค้าเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกขึ้นใช้เองสำหรับอุตสาหกรรมนมหมักในประเทศไทย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จะทำการคัดเลือกเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย ที่มีศักยภาพในการเป็นโพรไบโอติกที่มีคุณภาพสูงเพื่อที่จะนำมาพัฒนาเป็นการค้าเชื้อโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร การไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะ การทนต่อสภาวะต่างๆ ของทางเดินอาหาร เช่นกรด น้ำดี และน้ำย่อยจากตับอ่อน รวมถึงการยึดเกาะลำไส้เป็นอย่างดี นอกจากนี้งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และตัวแปรของการผลิตการค้าเชื้อ รวมถึงสภาวะการเก็บรักษาลำเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ความคงตัวสูงสุด ผลสำเร็จจากงานวิจัยนี้คาดหวังว่าอุตสาหกรรมไทยสามารถนำเอาการค้าเชื้อโพรไบโอติก บีฟิโดแบคทีเรีย ที่มีคุณภาพสูงมาผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักทดแทนการค้าเชื้อที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งทำให้ประเทศไทยสามารถพึ่งพาตนเอง และสร้างความมั่นคงทางด้านอาหาร รวมถึงยังสามารถนำเอาการค้าเชื้อโพรไบโอติกนี้ไปผลิตอาหารเสริมอื่นๆ ได้อีกเช่น ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกอัดเม็ดหรือในแคปซูล เพื่อการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผู้บริโภค

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้มีแนวคิดริเริ่มจากการที่ปัจจุบันอุตสาหกรรมนมหมักในประเทศไทยมีความต้องการการใช้การค้าเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติกเป็นอย่างมากในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก แต่ต้องนำเข้าการค้าเชื้อจากต่างประเทศ ยิ่งไปกว่านั้นผลิตภัณฑ์นมหมักที่ได้จากการหมักของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่มบีฟิโดแบคทีเรีย ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์นมหมักจากเชื้อกลุ่มนี้สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะทำการเสาะหาลำเชื้อสายพันธุ์บีฟิโดแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปต่อยอด และพัฒนาสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตนมหมักเหมือนกับแบคทีเรียโพรไบโอติกในกลุ่มของ lactobacilli ที่มีการวิจัยเพื่อพัฒนาลำเชื้อกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักดังต่อไปนี้

1. คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยมุ่งเน้นเชื้อในกลุ่มบีฟิโดแบคทีเรีย ที่มีต้นกำเนิดในประเทศไทยที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการผลิตนมหมัก และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกคุณภาพดี เช่น สามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ความสามารถยึดเกาะลำไส้และระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภคได้ดี เป็นต้น
2. พัฒนาลำเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกสำหรับการผลิตนมหมักในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์นมหมักที่ได้มาตรฐาน มีคุณภาพสูงทั้งทางด้านรสชาติ กลิ่นและเนื้อสัมผัสที่เป็นที่พอใจของผู้บริโภค
3. พัฒนาลำเชื้อโพรไบโอติกที่มีความคงตัวสูงจากสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนมหมักในระยะยาวต่อไป

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม บิฟิโดแบคทีเรีย ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ถูกนำมาประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การทนทานต่อกรด เกลือน้ำดี และน้ำย่อยจากตับอ่อน นอกจากนี้ความปลอดภัยในการใช้ในแง่ของการต้านยาปฏิชีวนะยังจะได้รับการตรวจสอบ และศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้ในระบบ *in vitro* สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติต่อการเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุดจากการทดสอบข้างต้นจะถูกคัดเลือกและนำมาศึกษาการพัฒนาในรูปแบบการเตรียมกล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อไป

ในการศึกษาการพัฒนาพัฒนาารูปแบบการเตรียมกล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เราจะทำการประเมินองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ และสารที่เป็นตัวป้องกันจากการทำแห้งแบบระเหิดเย็น (freeze drying) และอุณหภูมิในการเก็บรักษากล้าเชื้อจะถูกศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษากล้าเชื้อให้คงตัวมากที่สุด ในแง่ของการอยู่รอดของเซลล์ อัตราการเจริญ และผลิตผลหลังจากการละลายกล้าเชื้อกลับมาเป็นในรูปของเหลว หลังจากนั้นจะทำการศึกษาการผลิตอาหารนมหมัก เช่นโยเกิร์ตจากกล้าเชื้อที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินคุณภาพ และความปลอดภัยในรสชาติของอาหารนมหมัก ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ เช่น ชนิดของกล้าเชื้อ ตัวแปรอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตที่ได้จากระดับห้องปฏิบัติการสามารถคาดหวังว่าจะนำมาประยุกต์ใช้กับการผลิตอาหารนมหมักในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.5 การทบทวนวรรณกรรม

### 1.5.1 ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

โพรไบโอติก (Probiotic) ถูกกล่าวถึงเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 โดย Lilly และ Stillwell ว่าเป็นสารที่หลั่งออกมาจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดหนึ่งแล้วสามารถไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นได้ ซึ่งมีความหมายตรงข้ามกับคำว่ายาปฏิชีวนะ (antibiotics) ต่อมาในปี ค.ศ. 1974 Parker ได้ให้คำนิยามของโพรไบโอติกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและเป็นสารที่มีส่วนทำให้เกิดความสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งคำว่า “สาร” Parker ได้ให้ความหมายรวมไปถึงยาปฏิชีวนะด้วย (Schrezenmeir et al., 2001; Joint FAO/WHO Working Group, 2002)

ในปี ค.ศ. 1989 Fuller ได้พยายามอธิบายคำนิยามของ Parker ให้ดีขึ้นโดยกล่าวว่า โพรไบโอติกเป็นอาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์สิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร จากนั้นในปี ค.ศ. 1992 Havenaar และคณะ ได้ขยายคำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่เจริญได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์และมนุษย์ โดยการปรับปรุงสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตนั้น (Schrezenmeir et al., 2001; Joint FAO/WHO Working Group, 2002) ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 Salminen ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็นส่วนผสมอาหารจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ (Schrezenmeir et al., 2001)

ปัจจุบัน The Food Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO) ได้ให้คำจำกัดนิยามของโพรไบโอติกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กซึ่งเมื่อได้รับอย่างเหมาะสมจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่มีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ (Brown และคณะ, 2004)

### 1.5.2 ความสำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ร่างกายของมนุษย์มีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ด้วยกัน 2 ประเภท ได้แก่ แบคทีเรียที่ย่อยอาหารแล้วสร้างสารเป็นพิษต่อร่างกาย ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือแบคทีเรียที่ย่อยอาหารแล้วสร้างสารที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria; LAB) โดยในภาวะที่ร่างกายเป็นปกติ แบคทีเรียดังกล่าวจะรักษาสมดุลโดยควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ซึ่งกันและกันให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยมีอัตราส่วนของ LAB ร้อยละ 85 และจุลินทรีย์ก่อโรครักษาอื่น ๆ ร้อยละ 15 แต่เมื่อใดถ้าร่างกายมนุษย์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ไป จะก่อให้เกิดปริมาณของ LAB ลดลงหรือมีจุลินทรีย์ก่อโรครักษาอื่น ๆ เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติต่างๆ เช่น ท้องผูก ภูมิแพ้ เบื่ออาหาร ท้องอืด ท้องเฟ้อ และระบบการทำงานในร่างกายผิดปกติ เชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (bifidobacteria) เป็นเชื้อโพรไบโอติกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

### 1.5.3 สมบัติของโพรไบโอติกที่ดี

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่บริเวณทางเดินอาหาร (Havenaar et al., 1992) ดังนั้นการที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถเจริญ และผ่านลงไปทางเดินอาหารโดยยังสามารถดำรงชีพในลำไส้ได้ จึงต้องมีสมบัติหลายประการเพื่อสามารถทนต่อสภาวะทางเดินอาหารซึ่งรวมถึงหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย และผ่านลงไปเจริญในลำไส้ใหญ่ได้ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. เจริญได้ง่ายและสามารถมีชีวิตอยู่ภายในลำไส้ มีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อผ่านระบบต่างๆ ของร่างกาย เช่น ในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ซึ่งต้องทนได้ในทุกสภาวะในระบบทางเดินอาหาร เช่น ทนกรดที่ pH 2-3 (กระเพาะอาหาร) หรือสามารถทนความเป็นด่างที่ pH 8-9 (ลำไส้เล็ก) เป็นต้น และมีความคงทนต่อสภาพแห้งได้นาน และสามารถรอดชีวิตได้แม้กระทั่งในขณะทำการทดลอง (Fuller, 1989)

2. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตโดยเพิ่มจำนวนและแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารและสามารถยึดเกาะกับเซลล์ในผนังลำไส้ได้ดี และสามารถเจริญได้แม้ในสภาวะที่มีแหล่งอาหารน้อย

3. ทำหน้าที่เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันที่มีคุณสมบัติเพิ่มการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงต้านทานการเกิดโรค และก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (Klein et al., 1998)

4. ไม่ก่อให้เกิดโรคและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยความสามารถในการผลิตกรดแล็กติกหรือสารแบคทีริโอซิน (bacteriocin) มายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Havenaar, 1992; Gilliland, 1989) ช่วยย่อยสลายกากอาหารเพื่อให้กรดแอมิโน กรดไขมัน และวิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถลดการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ลดการสังเคราะห์สารประกอบแอมีน (amine compounds) ที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร

5. สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง
6. มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดหรือสร้างสารพิษ โดยสามารถถูกยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized As Safe)
7. ไม่มีสมบัติการก่อกลายพันธุ์ หรือสมบัติในการถ่ายทอดพันธุกรรมทางด้านยา

#### 1.5.4 แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria; LAB)

LAB เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram's positive bacteria) ประกอบไปด้วยแบคทีเรียรูปแท่งและรูปกลม โดยกลุ่มของแบคทีเรียรูปกลมได้แก่ *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. และกลุ่มของแบคทีเรียรูปแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ทนทานต่อสภาวะที่มี pH ต่ำได้ดี เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนน้อย สร้างกรดแล็กติกเป็นสารเมแทบอลิต์หลัก โดยผ่านทางกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบไปด้วยปฏิกิริยา 2 วิธีทาง คือ homofermentative เป็นการหมักที่ได้กรดแล็กติกเป็นผลผลิตสำคัญเพียงอย่างเดียวและ heterofermentative เป็นการหมักที่ได้แล็กติก เอทานอล หรือแอซิเทต และคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส (Hove et al., 1999; Saeed et al., 2009)

ในปี ค.ศ. 1995 Hammes และ Vogel กล่าวว่า LAB ประกอบด้วยกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลาย ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์กับมนุษย์ค่อนข้างมาก บางชนิดอาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร บางชนิดพบในอาหารหมัก นอกจากนี้บางชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับโดยทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร นอกจากนั้น LAB มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบได้เป็นอย่างดี โดยสมบัตินี้เกิดในขณะที่มีการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติกและกรดแอซิดิก (Gilliland and Speck, 1977) รวมถึงสารต้านจุลชีพอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) หรือสารคล้ายแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-like compounds) ซึ่ง LAB ส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในหลายๆ ด้าน

#### 1.5.5 ไบฟิโดแบคทีเรีย (บิฟิโดแบคทีเรีย) กับการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก

ไบฟิโดแบคทีเรีย (บิฟิโดแบคทีเรีย) เป็นโพรไบโอติกชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ และเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย มีลักษณะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีหลายรูปร่าง เช่น รูปตัววาย (Y-shape) รูปตัววี (V-shape) รูปโค้ง (bent) หรือ กระจบอง (club) โดยไม่พบเชื้อในลักษณะที่เกาะกลุ่มเป็นสายยาว เจริญได้ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (obligate anaerobe) จัดเป็นพวก heterofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดแอซิดิกและกรดแล็กติก

เชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ย่อมไม่ติดสีแบบ acid fast ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน หรือเป็นแท่งยาวตรงปลายเป็นกระจบองคล้ายกระจบองเพชรหรือช้อน ตรงปลายอาจจะแตกออกเป็นง่ามคล้ายตัวรูปตัววายหรือรูปตัววี อย่างไรก็ตามลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับชนิดและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเจริญ แบคทีเรีย

กลุ่มนี้ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ในเทรต ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส มีปริมาณเบสกวีนีน (Guanine: G) และไซโตซีน (Cytosine: C) สูงถึง 55-67% โมลของปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์ Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซส จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล จะได้ผลผลิตเป็นกรดแล็กติกและกรดแอสติกในอัตราส่วน 2:3 เอนไซม์ F6PPK นี้จึงเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการใช้จำแนกเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย ในระดับจีโนม และใช้แยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกจากแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มอื่นๆ (lactic acid bacteria) (Lee and O'Sullivan, 2010) เชื้อ บีฟิโดแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (strictly anaerobe) อย่างไรก็ตามบางสายพันธุ์สามารถทนต่อออกซิเจนได้ เช่น *B. animalis* subsp. *lactis* เป็นสายพันธุ์ใช้ในอุตสาหกรรมนํ้านมหมักสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงถึง 5% (Meile et al., 1997)

เชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระของเด็กทารกที่เลี้ยงด้วยนมมารดา โดยในปี ค.ศ. 1899 Tissier ได้จัดแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal microflora) พบได้เป็นส่วนใหญ่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยที่ในส่วนของลำไส้ใหญ่ของมนุษย์พบว่ามีจำนวนประชากรของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย เป็นลำดับสามรองจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroides และ Eubacteria ตามลำดับ แบคทีเรีย บีฟิโดแบคทีเรีย พบได้มากที่สุดในเด็กทารกในช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิด และพบได้ถึง 60-91% จากอุจจาระของทารกที่ดื่มนํ้านมมารดา (Harmsen et al., 2000) ร้อยละการพบเชื้อชนิดนี้จะลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น และปัจจัยภายนอกอื่นๆ เช่น การให้อาหารชนิดอื่นแทนนํ้านมมารดา รวมถึงสุขภาพและโภชนาการทางอาหารของบุคคลนั้นๆ

บีฟิโดแบคทีเรียพบได้เป็นส่วนน้อยในช่องคลอด และช่องปากของมนุษย์ งานวิจัยล่าสุดพบว่าเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย สามารถคัดแยกได้จากนํ้านมของมารดาและปริมาณเชื้อจะลดลงตามอายุของทารกที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน (Solis et al., 2010 และ Arboleya et al., 2011) นอกจากนี้เชื้อชนิดนี้ยังสามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลื้อยคืบ เช่น *B. magnum*, *B. boum*, *B. gallinarum*, *B. animalis* subsp. *animalis* และลำไส้ของแมลง เช่น *B. asteroides*, *B. indicum*, *B. coryneforme* (Ventura et al., 2007)

ทางเดินอาหารของมนุษย์เป็นระบบนิเวศขนาดใหญ่ ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ซึ่งอยู่สัมพันธ์กับเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย องค์ประกอบทั้งสามต้องอยู่ร่วมกันอย่างสมดุลทั้งในแง่ของโครงสร้างและการทำงาน ร่างกายของมนุษย์จึงจะสามารถทำงานได้เป็นปกติ หากสมดุลนี้เสียไปจะทำให้การทำงานของระบบทางเดินอาหารผิดปกติ และทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคตามมาได้ เชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย จัดเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ในการช่วยปรับสมดุลสภาวะแวดล้อมในระบบลำไส้ ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และช่วยป้องกันและบรรเทาอาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (GI's tract infection) โดยพบว่าทารกที่ได้รับ *B. bifidum* และ *Streptococcus thermophilus* สามารถบรรเทาอาการท้องร่วงอย่างเฉียบพลัน (acute diarrhea) และลดจำนวนไวรัสโรต้า (Rotavirus) อย่างมีประสิทธิภาพ (Saavedra และคณะ, 1994) งานวิจัยล่าสุดยังพบว่าหนูทดลองที่ถูกเลี้ยงด้วยนํ้านมที่มีเชื้อ *B. longum* subsp. *longum* สามารถมีชีวิตรอดหลังจากได้รับ Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างพิษซิก้า (Shiga toxin) ที่ทำให้เกิดอาการลำไส้ใหญ่อักเสบแบบมีเลือดออก (hemorrhagic colitis) การบริโภคนมหมักที่มี *B. animalis* subsp. *lactis* ยังช่วยลดและรักษาอาการ



โรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (inflammatory bowel disease; IBD) ในหนูทดลอง โดยช่วยก่อภูมิต้านทานให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และยังช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรค *Klebsiella pneumoniae* และ *Proteus mirabilis* ซึ่งเป็นเชื้อสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่นอกจากนี้จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ยังช่วยลดอาการท้องผูกในผู้สูงอายุได้อีกด้วย (Meance et al., 2001) การบริโภคผลิตภัณฑ์นมที่มี *B. longum* ร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกชนิดอื่น เช่น *L. acidophilus* ช่วยเพิ่มปริมาณโคเลสเตอรอลชนิดดี (high-density lipoprotein; HDL) (Kiesling และคณะ, 2002) และการบริโภคโยเกิร์ตที่มี *B. lactis* ร่วมกับ *L. acidophilus* ยังช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลรวมในซีรัมได้อีกด้วย (Ataie-Jafari et al., 2009) อีกทั้งภาวะไม่ทนต่อแล็กโทส (lactose intolerance) ในมนุษย์ก็มีแนวโน้มลดลงในผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย เป็นส่วนผสม (He et al., 2008) ส่วนกลไกในการต้านมะเร็งของเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย ยังเป็นที่ศึกษากันอยู่ซึ่งอาจจะไปช่วยกวดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ควบคุมหรือเหนี่ยวนำการเจริญของแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ในการทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง มีผลต่อการเคลื่อนไหวหรือการบีบตัวของลำไส้ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น เป็นต้น

ทราบกันอยู่แล้วว่า บิฟิโดแบคทีเรีย สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งเกิดจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และสามารถทนต่อสภาพที่เป็นด่างที่เกิดจากน้ำดีที่ผลิตขึ้นโดยตับ จึงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้ จึงเป็นไปได้ว่าจำนวนของ บิฟิโดแบคทีเรีย ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นจะบ่งชี้ถึงความสมดุลในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะเพิ่มจำนวน บิฟิโดแบคทีเรีย ในระบบทางเดินอาหารในรูปของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อส่งเสริมสุขภาพที่ดีให้กับผู้บริโภค

### 1.5.6 ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อสุขภาพ

1.5.6.1 โพรไบโอติกสามารถย่อยสลายกากอาหารภายในลำไส้ใหญ่แล้วให้พลังงานในรูปของ short-chain fatty acid หรือกรดอินทรีย์สายสั้นๆ และยังสังเคราะห์วิตามินเค และวิตามินซีได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Cummins et al., 1987) ช่วยดูดซึมแคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังสามารถช่วยย่อยสลายสารอาหารจำพวกไขมันและเนื้อสัตว์ในลำไส้ ทำให้ลดโอกาสเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ หรือเกิดสภาวะลำไส้อักเสบได้ (Shanahan, 2001; Swidsinski et al., 2002)

1.5.6.2 โพรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้โดยการสร้างกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดแล็กติก หรือสร้างสารแบคทีริโอซิน นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสามารถเจริญในลำไส้และแผ่กระจายโดยยึดเกาะกับผนังลำไส้ใหญ่ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคเกาะติดผนังลำไส้และเจริญได้อีกทั้งควบคุมลำไส้ให้เคลื่อนไหวเป็นปกติทำให้เนื้อเยื่อของลำไส้ต่างๆ สมบูรณ์ซบถได้อย่างเป็นธรรมชาติ (Alvarez et al., 2001; Laiho et al., 2002)

1.5.6.3 โพรไบโอติกกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แล็กเทส (lactase) และเอนไซม์เบตา-กาแล็กโทซิเดส ( $\beta$ -galactosidase) ซึ่งเอนไซม์นี้ช่วยย่อยน้ำตาลที่อยู่ในน้ำนมสำหรับผู้ที่เกิดอาการท้องอืดและอยู่ในสภาวะแพ้น้ำตาลแล็กโทส (Lactose intolerance) (Gilliland, 1989)

1.5.6.4 โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเม็ดเลือดขาว (white blood cells) ชนิด monocyte หรือ macrophage ที่มีความสามารถในการจับสิ่งแปลกปลอมภายนอกในร่างกายให้มารวมตัวกัน ส่งผลให้เกิดการทำงานของ secretory immune system โดยการหลั่งแอนติบอดี เช่น IgA

มาจับกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมะเร็งให้เกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติก ส่งเสริมภูมิคุ้มกันโดยป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคบริเวณเยื่อผนังลำไส้ของผู้ป่วยโรค Crohn's disease (Cabre and Gassull, 2007)

1.5.6.5 มีรายงานการวิจัยการใช้โพรไบโอติกจากเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงรักษาผู้ป่วยติดเชื้อในลำไส้และลำไส้อักเสบ (Inflammatory bowel disease, IBD) พบว่าสามารถช่วยปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และทางเดินอาหาร และลดการติดเชื้อในลำไส้ได้อย่างเด่นชัด ซึ่งเป็นทางเลือกแบบใหม่สำหรับการบำบัดรักษาโรค (Geier et al., 2007)

1.5.6.6 โพรไบโอติกสามารถลดการเกิดมะเร็งลำไส้ โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับการลดลงของปริมาณเอนไซม์ที่สร้างสารก่อมะเร็งในลำไส้ โดยการทดสอบให้อาสาสมัครรับประทานโยเกิร์ตที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติก พบว่าเอนไซม์ที่บ่งชี้อาการโรคมะเร็งลำไส้มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Ling et al., 1994) นอกจากนี้ทำให้ระบบขับถ่ายเป็นปกติไม่เกิดการหมักหมมของของเสียในร่างกาย เป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Ling et al., 1994) ลดการผลิตเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ  $\beta$ -glucosidase (Kontula et al., 1998)

### 1.5.7 การนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อต้องการให้สุขภาพดีและชะลอความแก่ชราอันเนื่องมาจากภาวะเครียด การได้รับสารเคมี และการรับประทานยาประเภทสเตียรอยด์ ยาคุมกำเนิด ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้โพรไบโอติกในร่างกายมีปริมาณลดน้อยลง

Marvin (1981) พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพโดยใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกซึ่งช่วยให้ความสมดุลของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ ซึ่งพบว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *L. acidophilus* จะช่วยให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลงมากกว่าการบริโภคนมที่ไม่มีเชื้อดังกล่าว และมีการกล่าวถึงการบริโภค Kefir ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยการย่อยน้ำตาลแลคโตสในคนที่มีภาวะ lactose intolerance และยังช่วยลดการเกิดมะเร็งอีกด้วย (Hertzler and Clancy, 2003)

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในรูปของนม และผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต สำหรับผู้ที่ไม่สามารถบริโภคผลิตภัณฑ์นมได้ สำหรับผู้ที่มีปัญหาการย่อยน้ำตาลแลคโตส สามารถบริโภคผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกผสมอยู่ เช่น น้ำผักและผลไม้ เป็นต้น

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการทดลองใช้แบคทีเรียและโพรไบโอติก (probiotics) ชนิดต่างๆ เพื่อช่วยย่อยสลายอาหาร เร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มอัตราการรอดของสัตว์น้ำ รวมทั้งเพื่อควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำในแหล่งน้ำ (สยามมาริน, 2550)

โพรไบโอติกยังใช้เป็นสารเสริมชีวนะซึ่งสามารถนำมาผสมอาหารได้โดยตรงหรืออาจใช้เป็น Food หรือ Feed additives สำหรับมนุษย์และสัตว์ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตสารเสริมชีวนะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacilli*, *Streptococci* และ *Yeast* สารเสริมชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์มีทั้งชนิดที่มีจุลินทรีย์ชนิดเดียวและชนิดที่มีจุลินทรีย์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น *Lactobacillus* sp. กับ

*Streptococcus* sp. ทั้งนี้เพื่อให้สามารถได้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวณะสูงสุด (Klein et al., 1998)

วิเชียร ลีลาว์ชรรมาศ (2534) ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกผลิตสารที่ช่วยเพิ่มรส กลิ่น คุณภาพของอาหารหมัก เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต่างๆ เนื้อ ผัก หรือแม้แต่การทำไวน์ผลไม้ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถเปลี่ยนแล็กเทตให้เป็นกรดแล็กติก ทำให้เกิดการหมักหรือการใช้กรดแล็กติกทำงานร่วมกับยีสต์ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลจากผลไม้ให้เป็นเอทานอล จึงเกิดแบคทีเรียกรดแล็กติกในผลไม้ ในกระบวนการหมักทำให้รสชาติดีขึ้น

การนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารในรูปของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต โดยการใส่กล้าเชื้อที่ได้จากจุลินทรีย์โพรไบโอติก เช่น *L. casei* *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น (Nakazawa and Hosono, 1992)

การใช้โพรไบโอติกในการบำบัดโรค Crohn's disease (CD) เช่น การทดลองในหนูโดยผสมในอาหารที่มีเชื้อ *L. lactis* จะทำให้เกิดการหลั่ง trefoil factor ที่จำเป็นในหนู และพบว่าโพรไบโอติกมีผลในการนำพา trefoil factor ไปยัง mucosa ซึ่งส่งผลต่อการป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้โพรไบโอติกยังทำให้หายจากโรค dextran sodium sulfate induced colitis ในหนู และลดความรุนแรงของ chronic colitis ในหนูที่ขาด IL-10 อีกด้วย (Steidler et al., 2000)

การใช้โพรไบโอติกปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสัตว์ จากการศึกษาการหลั่งของ cytokines ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ epithelial ในลำไส้ของหนูในการตอบสนองต่อโพรไบโอติกชนิด *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. หรือ *L. helveticus* อื่นๆ ที่ไม่ก่อโรค พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งสามชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งของ interleukin-6 (IL-6) ในระดับปานกลางจาก epithelial cells ในขณะที่ *Escherichia coli* จะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการหลั่ง IL-6 อย่างรุนแรง ซึ่งโพรไบโอติกสามารถกระตุ้น epithelium ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม สำหรับการทำหน้าที่สร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Smits et al., 2005)

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่มบิฟิโดแบคทีเรีย ที่มีคุณภาพสูงที่สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารน้านมหมักได้ภายในประเทศ ซึ่งส่งผลให้สามารถลดหรือทดแทนการนำเข้ากล้าเชื้อจากต่างประเทศยังผลให้สามารถลดต้นทุนการผลิต และส่งเสริมความเข้มแข็งและมั่นคงทางด้านอาหารภายในประเทศของเราเอง โดยสามารถนำกล้าเชื้อที่ได้ไปผลิตอาหารน้านมหมักหรืออาหารเสริมอื่นๆ ในขนาดการผลิตขนาดใหญ่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป นอกจากนี้ผลจากงานวิจัยทำให้สามารถเข้าใจถึงผลกระทบของสายพันธุ์โพรไบโอติกต่อการรักษาสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้นทำให้เราสามารถนำเอาความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชศาสตร์ในการรักษาโรคทางเดินอาหาร การป้องกันการท้องเสียจากผลของยาปฏิชีวนะ การป้องกันอาการติดเชื้อภายในทางเดินอาหาร และการป้องกันอาการระคายเคืองท้องเรื้อรังเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีรสเผ็ด รวมถึงการพัฒนาอาหารเสริมสุขภาพอื่นๆ อีกด้วย

งานวิจัยนี้ยังจะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษาดังนั้นความรู้และเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้จะถูกถ่ายทอดโดยตรงกับนักศึกษาบัณฑิตศึกษาที่กำลังอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ นอกเหนือจากนั้นงานวิจัยนี้เป็นการใช้องค์ความรู้เฉพาะทางที่มีจุดมุ่งหมายระยะยาวในการถ่ายทอดเทคนิควิธีการจากมหาวิทยาลัยไปสู่ทั้งภาคเกษตรและภาคอุตสาหกรรมเพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติกบิฟิโดแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการผลิตอาหารน้ำนมหมักและอาหารเสริมอื่นๆ ให้มีฐานการผลิตขนาดใหญ่ ที่จะเป็เป้าหมายในการผลิตเพื่อการค้าในอนาคต

นอกจากนั้นในแผนงานวิจัยนี้ทั้งหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมงานวิจัยยังมีโอกาสในการถ่ายทอดความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ที่ตนเองถนัดไปยังนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทที่สนใจเข้ามามีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยที่เสนอในแผนงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ นักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโทจะมีโอกาสได้เรียนรู้การปฏิบัติงานทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างมีระบบ และเป็นแบบแผนซึ่งจะเป็นพื้นฐานการสร้างบุคลากรทางวิทยาศาสตร์ที่มีความสามารถต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัยนี้คือการตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิทยาศาสตร์ในระดับนานาชาติ นอกจากนี้งานวิจัยนี้น่าจะสามารถนำไปจดสิทธิบัตรเรื่อง เพื่อนำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีจากภาคการศึกษาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมน้ำนมหมักขนาดใหญ่เพื่อลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากการนำเข้ากล้าเชื้อโพรไบโอติกของบิฟิโดแบคทีเรีย จากต่างประเทศปีละหลายล้านบาท โดยหันมาใช้กล้าเชื้อโพรไบโอติกของบิฟิโดแบคทีเรีย ที่พัฒนาจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ภายในประเทศ

## 1.7 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

งานวิจัยในประเทศไทยยังไม่มีมีการพัฒนากล้าเชื้อโพรไบโอติกของแบคทีเรียชนิดบิฟิโดแบคทีเรีย ยังอย่างจริงจัง ดังนั้นผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้น่าจะมีประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรมการผลิตนมหมักของไทยเป็นอย่างมากเพื่อที่จะสามารถลดการนำเข้ากล้าเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในการผลิตนมหมักจากต่างประเทศชนิด บิฟิโดแบคทีเรีย นอกจากนี้อุตสาหกรรมนมหมักยังสามารถนำเชื้อโพรไบโอติกดังกล่าวมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมที่มุ่งหวังในการบรรเทาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดจากอาหาร รวมถึงอาหารเสริมที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้บริโภคเช่นผู้ป่วยสูงอายุที่มีอาการป่วยบ่อยหรือผู้ป่วยที่อยู่ในสภาวะอ่อนแอเนื่องจากการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารเป็นต้น ทั้งนี้การถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวสามารถทำได้หลังจากการสิ้นสุดการดำเนินงานวิจัย

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

##### 2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอุจจาระจากเด็กทารกอายุช่วง 5 วัน ถึง 3 เดือน โดยเก็บตัวอย่างหลังจากเด็กทารกถ่ายในทันที โดยใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เชี่ยวตัวอย่างอุจจาระใส่ในสารละลาย phosphate buffer saline ที่มีร้อยละ 0.05 ของ L-cysteine hydrochloride (PBSc) จำนวน 0.5-2 กรัม ที่บรรจุในหลอดฝาเกลียว จากนั้นนำหลอดตัวอย่างในภาชนะ เก็บตัวอย่างในที่เย็น และนำตัวอย่างที่ได้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกเชื้อภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง

##### 2.1.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp.

ทำการแยกเชื้อ *Bifidobacterium* จากตัวอย่างอุจจาระจากเด็กทารกที่เลี้ยงด้วยนมมารดา ตัวอย่างที่ได้จะนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในสารละลาย PBSc จากนั้นทำการเจือจางในสารละลายเดียวกัน และเกลี่ย (spread) เชื้อลงบนอาหารแข็ง DeMan, Rogosa and Sharpe ที่มีร้อยละ 0.05 ของ L-cysteine hydrochloride (MRSc) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นของเชื้อจากสมบัติการติดสีแกรม และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก และมีรูปร่างท่อนที่มีลักษณะไม่แน่นอน เช่น มีรูปร่างเป็นกิ่งก้านสาขา หรือแท่งยาวเรียวยาวตรงปลายเป็นกระเปาะคล้ายกระบองหรือมีง่ามเป็นรูปตัววาย รวมถึงให้ผลกับเอนไซม์คาทาเลสเป็นลบ จะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อทำการเก็บรักษาเชื้อในสารละลายกลีเซอรอล 20 % (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสต่อไป

##### 2.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

แบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกจะนำมาเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย เพื่อเป็นการยืนยันผลในระดับโมเลกุลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยใช้โคโลนีเดียวของเชื้อนั้นๆ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis, strain BB-12 (Chr. Hansen, Denmark) โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-F (5'-GGGTGGT AATGCCGGATG-3') และ Bif662-R (5'-CCACCGTTACACCGGAA-3') (Kok และคณะ, 1996) และตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้แผ่นแอกาโรสเจลความเข้มข้น 1.2% (w/v) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จะมีขนาดประมาณ 520 คู่เบส

#### 2.1.4 การศึกษาหาเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Simulated gastric juice) สภาวะที่มีเกลือน้ำดี (Bile salt) และน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (Pancreatic juice)

เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะนำมาศึกษาการทนต่อสภาวะต่างๆในระบบทางเดินอาหาร ตามวิธีการของ Maragkoudakis และคณะ (2006) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว MRSc ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย PBSc pH 7.2 จำนวน 2 รอบ จากนั้นจึงละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ในสารละลาย PBSc ที่ pH 2 และ 3 และละลายในสารละลายคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่มี 0.3% (w/v) ของเอนไซม์เพปซิน (pepsin) ในสารละลาย PBSc ที่ pH 2 และ 3 เช่นเดียวกัน โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ  $10^7$  CFU/mL จากนั้นจึงบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อที่ชั่วโมง 0 และ 3 ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง MRSc ทำการนับโคโลนีของเชื้อหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (% survival rate) ในรูปของเปอร์เซ็นต์ CFU/mL เทียบกับเชื้ออ้างอิง *B. animalis* subsp. *lactis*, strain BB-12

สำหรับการทดสอบภายใต้สภาวะคล้ายลำไส้เล็กนั้น จะทดสอบสมบัติของเชื้อแบคทีเรียต่อสารละลายเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่างๆ และในสภาวะที่มีเอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) โดยละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้างต้นในอาหาร MRSc ที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3%, 0.5% และ 1% (pH 8) ส่วนการวัดความทนทานของเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่มีน้ำย่อยจากลำไส้เล็กจะนำแบคทีเรียมาละลายในสารละลาย PBSc pH 8 ที่มี 0.1% (w/v) ของ เอนไซม์แพนครีเอติน บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการนับโคโลนีบนอาหารแข็งและคำนวณร้อยละการรอดชีวิตเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

#### 2.1.5 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ชุดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL และโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจาก 16S rDNA

เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (Bio-Mérieux, France) ซึ่งจะจัดจำแนกแบคทีเรียจากรูปแบบการใช้คาร์โบไฮเดรต โดย API 50 CHL จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CHL strip ที่มีคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 49 ชนิดอยู่ภายในแต่ละแถบ ทำได้โดยเขี่ยเชื้อปิพิโดแบคทีเรีย บนอาหารแข็ง MRSc ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 2 McFarland แล้วจึงถ่ายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วลงไปในการเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ผสมให้เข้ากันและหยอดลงไปในแต่ละช่องของ API 50 CHL strip และปิดหลอดด้วย mineral oil จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลหลังจากบ่มแล้ว 24 และ 48 ชั่วโมง บันทึกผลเป็นบวกเมื่อเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรด ทำให้เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง

การจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับโมเลกุลทำได้โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ Bif164-F และ Bif662-R โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หลังจากทำ

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรมเมอร์ชุดเดียวกัน (MACROGEN Inc., Korea) จากนั้นจึงนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อการจัดจำแนกต่อไป

## 2.1.6 การศึกษาอัตราการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียบีฟิโดแบคทีเรียกับเซลล์ผนังลำไส้ (Caco-2)

วิธีการทดสอบสมบัติในการยึดเกาะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับเซลล์เป็อบุผนังลำไส้ชนิด Caco-2 ดัดแปลงตามวิธีการของ Pennacchia และคณะ (2006) และ Maragkoudakis และคณะ (2006) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) ที่มี 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 1% 10mM non-essential amino acid solution และ 1% ของ penicillin and streptomycin (5000 IU/ml and 5000 µg/ml) ใน 6-well plate โดยใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ  $1.2 \times 10^5$  เซลล์/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ร้อยละ 5 และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 48 ชั่วโมง จนเซลล์โตและยึดเกาะทั่วพื้นผิวของจานอาหาร เมื่อเซลล์โตจนเต็มพื้นที่ของจานอาหารแล้ว ทำการล้างด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Non-supplemented DMEM ลงไปหลุมละ 2 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีก๊าซ CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนการเตรียมสารละลายแบคทีเรียทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRSc broth ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ใน PBS pH 7.2 จำนวน 2 รอบ และละลายเซลล์ที่ได้ด้วยอาหาร Non-supplemented DMEM ให้มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU/mL

เมื่อบ่มเซลล์ Caco-2 ครบ 1 ชั่วโมง จึงดูดอาหารเก่าออก และเติมสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นลงใน 12 well plate หลุมละ 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารในหลุมออก และล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะกับ Caco-2 ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงเติม 0.05% Trion X-100 ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะทำให้สารละลายเซลล์และแบคทีเรียหลุดออกจากการยึดเกาะกับจานอาหาร นำสารละลายที่ได้ไปเจือจางและเกลี่ยบนอาหารแข็ง MRSc บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน อ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และคำนวณอัตราการยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียในรูปของเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะ

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ (\% adhesion capacity)} = \frac{\text{จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เกาะกับเซลล์}}{\text{จำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น}} \times 100$$

## 2.1.7 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility)

ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธี Disk diffusion (ดัดแปลงตามวิธีการของ Ortu และคณะ, 2007) แผ่นยาปฏิชีวนะ (antibiotic disk) ที่ใช้ในการทดลองนี้ ประกอบไปด้วย streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg), penicillin G

(10 µg), aztreonam (30 µg), vancomycin (30 µg), erythromycin (15 µg), chloramphenicol (30 µg), kanamycin (30 µg), ampicillin (10 µg), lincomycin (15 µg), norfloxacin (10 µg) และ ofloxacin (5 µg) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว MRSc ที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์เป็น  $10^7$  CFU/mL จากนั้นใช้ไม้สำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย แล้วป้ายลงผิวหน้าของอาหารแข็งให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ (antibiotic disk) ลงบนผิวหน้าของอาหารบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียได้โดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) รอบ antibiotic disk และทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น บันทึกผลและแปลความหมายตาม National Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยถ้าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะจะบันทึกในรูปของ Sensitive (S) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลางบันทึกเป็น Intermediate (I) and และไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะบันทึกเป็น Resistant (R)

### 2.1.8 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคสามารถทำได้โดยวิธี agar-well diffusion (ดัดแปลงตามวิธีการของ Maragkoudakis และคณะ, 2006 โดยเลี้ยงเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย ในอาหารเหลว MRSc ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ในการทดสอบจะแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 ชุด คือ น้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth), ส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง (3000 rpm, 4°C, 5 นาที) และปรับ pH เป็น 6.0 จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง (filter sterilization) และสุดท้ายคือส่วนใสจากการหมุนเหวี่ยงที่ไม่ได้ปรับ pH เชื้อก่อโรคที่ใช้ในการทดลองนี้ ประกอบไปด้วย *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Vibrio cholerae*, and *Candida albicans* TISTR 718 โดยเลี้ยงเชื้อทั้งเจ็ดสายพันธุ์นี้ในอาหาร *Brain-Heart Infusion* broth (BHI broth) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ประมาณ  $10^5$  CFU/mL จากนั้นใช้ไม้สำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เตรียมไว้ เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแข็ง BHI และใช้ cork borer (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 mm) เจาะลงไปบนผิวหน้าของอาหารแข็งให้เกิดเป็นหลุม แล้วจึงดูดตัวอย่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนใสที่ปรับและไม่ปรับ pH ของเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย ลงไปหลุมละ 100 µl จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

### 2.1.9 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร

เชื้อแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะนำมาทดสอบการมีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์รสจืด นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม นำนมถั่วเหลือง และน้ำส้มคั้น โดยเลี้ยงเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย ในอาหารเหลว MRSc ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อไปยังอาหารเหลว MRSc ใหม่ บ่มเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่



4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ในน้ำกลั่นจำนวน 2 รอบ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้นๆ จึงถ่ายเชื้อปริมาณร้อยละ 2 ลงไป 100 mL ของผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิด เก็บอาหารเป็นระยะเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วันเพื่อวัด pH ของตัวอย่างอาหาร และวัดความมีชีวิตรอดของเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง MRSc

### 2.1.9 การรอดชีวิตของเชื้อระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำได้โดยเลี้ยงเชื้อ *B. animalis* BF052 ในอาหารเหลว MRSc ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสถานะไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อไปยังอาหารเหลว MRSc ใหม่ บ่มเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง (ระยะ early stationary phase) จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ในน้ำกลั่นจำนวน 2 รอบ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการเติม 1 mL ของสารป้องกันความเย็น (cryoprotectant) แต่ละชนิด ได้แก่ 10% (w/v) น้ำตาลแล็กโทส, 10% (w/v) น้ำตาลซูโครส, 10% (w/v) skim milk, 10% (w/v) ข้าวกล้องงอก, (w/v) งาดำ และน้ำนมถั่วเหลืองลงในขวด vial ที่ปราศจากเชื้อ ทำการนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง MRSc จากนั้นจึงนำขวด vial ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จึงนำไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดโดยละลายเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งด้วยอาหารเหลว MRSc แล้วจึง spread plate บนอาหารแข็ง MRSc

เพื่อทำการคัดเลือกสารป้องกันความเย็นที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุดหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เซลล์ที่ผ่านการทำแห้งจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4°C และทำการตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 6 เดือน

### 2.1.10 การศึกษาสมบัติของเชื้อ *B. animalis* BF052 หลังจากกระบวนการผลิต

การศึกษาสมบัติของเชื้อโพรไบโอติก *B. animalis* BF052 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ 10% skim milk เป็นสารป้องกันความเย็น จะถูกเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (4°C) เป็นระยะเวลา 1 เดือน เมื่อครบกำหนดละลายตะกอนเซลล์ด้วยนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม แล้วจึงถ่ายเชื้อปริมาณ 1% ลงไป 100 mL ของนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เก็บนมไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากการเก็บจึงนำเชื้อมาศึกษาต่อการทนสถานะต่างๆในระบบทางเดินอาหาร โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Peres และคณะ (2014) และ Sousa และคณะ (2015) โดยถ่ายเชื้อปริมาณ 1 mL จากน้ำนมที่เก็บรักษา ลงในสารละลาย sterile electrolyte solution (SES; 0.22 g/L CaCl<sub>2</sub>, 6.2 g/L NaCl, 2.2 g/L KCl, 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w/v) pH 6.2 ปริมาตร 35 mL จากนั้นจึงเติม 5 mL ของ SES ที่มีเอนไซม์ไลโซไซม์ (0.01% w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อจำลองสภาวะในปาก แล้วจึงเติม 3 mL ของ SES (pH 5.0) ที่มีส่วนผสมของ 0.3% (w/v) เอนไซม์เพปซิน (pepsin) เพื่อจำลองสภาวะในกระเพาะอาหาร และค่อยๆลด pH ของสารละลายด้วย 1 N HCl เป็น 6 บ่มเป็นเวลา 10 นาที

ก่อนที่ปรับเป็น pH เป็น 5.0 (บ่มเป็นเวลา 10 นาที), pH 4.0 (10 นาที), pH 3.0 (30 นาที), และ pH 2.0 (30 นาที) ตามลำดับ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 130 rpm รวมระยะเวลา 90 นาที จากนั้นจึงเติม 4 ml ของ SES (5 g/l NaCl, 0.6 g/l KCl and 0.3 g/l CaCl<sub>2</sub>, w/v) pH 8 ที่มี 0.3% (w/v) bile salts และ 0.1% (w/v) เอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) แล้วจึงปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.0 ด้วย 1 M NaHCO<sub>3</sub> บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 45 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อจำลองสภาวะในส่วนของลำไส้เล็ก ส่วนคูโอดินัม และจึงปรับ pH เป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 45 rpm เป็นเวลา 90 นาที เพื่อจำลองสภาวะในส่วนของลำไส้เล็กส่วนไอเลียม จากนั้นจึงนำสารละลายเซลล์แบคทีเรียไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และละลายตะกอนที่ได้ด้วยอาหาร DMEM และเติมลงไปใน 6 well plate ที่มี monolayer Caco-2 cells หลุมละ 1 mL เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์เยื่อผนังลำไส้ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีก๊าซ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด ดูดอาหารในหลุมออก และล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงเติม 0.05% Trion X-100 ลงในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะทำให้สารละลายเซลล์และแบคทีเรียที่หลุดออกจากการยึดเกาะกับจานอาหาร นำสารละลายที่ได้นี้เจือจางและเกลี่ยบนอาหารแข็ง MRSc บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน อ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และคำนวณอัตราการยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ของแบคทีเรียในรูปของเปอร์เซ็นต์ของการยึดเกาะ และเปรียบเทียบผลกับเชื้อ *B. animalis* BF052 ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการข้างต้น

### 2.1.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (Whole genome sequencing) ของเชื้อ *B. animalis* BF052

#### 2.1.11.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction)

นำเชื้อ *B. animalis* BF052 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRSc ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน นำเซลล์ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ใน Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (TE buffer) และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 200 µl ของ 20% สารละลายซูโครสใน TE buffer จากนั้นจึงเติม 2 mg/ml ของเอนไซม์ไลโซไซม์ปริมาตร 20 µl 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 100 µl และ 10 mg/ml RNase นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเติม 5M sodium chloride (NaCl) ปริมาตร 75 µl กลับหลอดไปมา จากนั้นจึงกำจัดโปรตีนโดยใช้สารละลาย Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดใหม่ กำจัดโปรตีนที่ยังตกค้างด้วยวิธีเดิมอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นจึงทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม Isopropanol ปริมาตร 500 µl และ 3 M Potassium acetate ปริมาตร 50 µl นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 µl หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 25 µl ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้แผ่นแอกาโรสเจลความเข้มข้น 0.7% และวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

### 2.1.11.2 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จะส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Next generation sequencing (NGS) ที่บริษัท Baseclear ประเทศเนเธอร์แลนด์ ในกระบวนการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์นั้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกตัดให้เป็นสายสั้นๆ และเชื่อมต่อเข้ากับ adaptor ที่ใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยวิธี PCR ซึ่งจะทำให้ได้นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (reads) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับเบสที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Illumina (Illumina Casava pipeline version 1.8.3) นิวคลีโอไทด์สายต่างๆที่เครื่องวิเคราะห์ได้จะถูกนำมาประกอบเรียงชิ้นส่วน (*De novo assembly*) ด้วย CLC Genomics Workbench version 6.5.1 และนำมาเชื่อมเข้าด้วยกันด้วย SSPACE Premium scaffolder version 2.3 และปิดช่องว่างด้วย GapFiller version 1.10 เพื่อให้ได้ DNA Contigs ปริมาณน้อยที่สุด และ DNA Contigs ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์นั้นจะนำมาเรียงลำดับเป็นเส้นเดียวโดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจีโนมอ้างอิงในฐานข้อมูล NCBI จากนั้นจึงทำการเชื่อมช่องว่าง (gaps) ระหว่าง contigs เข้าด้วยกันโดยการทำ primer walking และผลิตผล PCR ที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส (Macrogen, ประเทศเกาหลี) เพื่อทำการต่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมที่สมบูรณ์

### 2.1.12 การใช้เชื้อ *B. animalis* BF052 เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมถั่วเหลือง

#### 2.1.12.1 การเตรียมน้ำนมถั่วเหลือง

นำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาดและแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นจึงเทน้ำที่แช่ทิ้งและนำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงทำด้วยกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อสกัดเอาแต่ส่วนน้ำของน้ำนมถั่วเหลือง หลังจากการกรองกรองจะทำให้ได้น้ำนมถั่วเหลืองปริมาณ 1,200 mL จากถั่วเหลืองน้ำหนักเริ่มต้น 250 g และน้ำกลั่นปริมาตรสุทธิ 1,500 mL เมื่อเทน้ำนมถั่วเหลืองใส่ภาชนะที่บรรจุเรียบร้อยแล้ว จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 15 นาที

#### 2.1.12.2 แบคทีเรียและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

การทดลองนี้จะใช้เชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง เชื้อทั้งสามจะนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่าย 1% ของเชื้อไปยังอาหารใหม่ บ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง และอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. thermophilus* คือ *Streptococcus thermophilus* (ST) broth (10 g/L casein enzymic hydrolysate, 5 g/L yeast extract, 10 g/L sucrose and 2 g/L  $K_2HPO_4$ ; pH 6.8 ± 0.2) ส่วน *L. bulgaricus* เลี้ยงในอาหาร MRS broth และ *B. animalis* BF052 เลี้ยงในอาหาร MRSc broth ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ

### 2.1.12.3 การหมักนํ้านมถั่วเหลือง

หลังจากการเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิดที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จำนวน 2 รอบ จึงนำไปหมวนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ล้างและละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 รอบ ปรับปริมาตรเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5 log CFU/mL จากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงขวดฝาเกลียวขนาด 150 mL ที่มีนํ้านมถั่วเหลืองปริมาตร 120 mL โดยจะถ่ายเชื้อแต่ละชนิดลงในนํ้านมถั่วเหลืองเพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด หรือ ถ่ายเชื้อ *B. animalis* BF052 ร่วมกับ *S. thermophilus* หรือ *L. bulgaricus* หรือ ถ่ายเชื้อทั้งสามชนิดร่วมกัน ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยไม่มีการเขย่า และเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนครบเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อวัดการเติบโตของเชื้อโดยวิธี plate counts บนอาหาร ST agar สำหรับเชื้อ *S. thermophilus* และ MRSc agar สำหรับเชื้อ *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 รวมถึงวัดการเปลี่ยนแปลงของ pH และวัดเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่เกิดขึ้น

### 2.1.12.4 การวัดค่า pH และเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตนํ้านมถั่วเหลือง

วัดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของนํ้านมถั่วเหลืองระหว่างการหมักที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยเครื่อง pH meter (pH 700 Benchtop Meter, Oakton, USA) ส่วนการวัดเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองทำได้ตามวิธีของ Mani-López et al. (2014) โยเกิร์ตที่หมักโดยเชื้อแต่ละชนิด ณ ช่วงเวลาต่างๆ จะนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการวัดประมาณ 5 นาที การวัดเนื้อสัมผัสนี้วัดได้โดยใช้เครื่อง texture analyzer TA.XT.plus (Stable Micro Systems, UK) และใช้หัววัดชนิด 60° cone probe (มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 27 mm ความสูง 25 mm และน้ำหนัก 18.144 g) เมื่อโพรบสัมผัสกับผิวหน้าของโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง โพรบจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็ว 10 mm/s เป็นระยะทาง 20 mm แล้วจึงเคลื่อนกลับสู่ตำแหน่งเดิม ค่าที่ได้จากการวัดจะอยู่ในรูปของความแข็งแรงของเนื้อเจล (gel strength) หรือ ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ซึ่งคำนวณได้จากค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าบวกอันเกิดจากแรงที่กระทำต่อเนื้อสัมผัส (นิวตัน: N) ต่อเวลา (s)

### 2.1.12.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนํ้านมถั่วเหลือง

โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักร่วมกันของเชื้อ *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *B. animalis* เป็นระยะเวลา 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง จะนำมาประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์โดยการทดสอบความชอบด้วยการทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory preferences) จากผู้บริโภครที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝน (untrained panelists) จำนวน 30 คน โดยใช้ผู้ทดสอบเป็นนักศึกษาสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยวิธี 9-point hedonic scale (มีการให้คะแนน คือ; 9 = ชอบมากที่สุด, 5 = เฉยๆ และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด) การประเมินความชอบนี้จะแบ่งการทดสอบออกเป็น 5 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ปรากฏ (appearance; สังเกตจากลักษณะภายนอกที่เห็นด้วยตา) กลิ่น (odor; กลิ่นที่สัมผัสได้จากการใช้จมูกสูดดม) เนื้อสัมผัส (texture; เนื้อสัมผัสจากการใช้ช้อนสัมผัสกับเนื้อโยเกิร์ตและเนื้อสัมผัสจากการใช้ลิ้นสัมผัส) รสชาติ (taste; รสที่สัมผัสด้วยลิ้น) และการยอมรับโดยภาพรวม (overall acceptability) และระหว่างการทดสอบจะมีน้ำดื่มและขนมปังแครกเกอร์ให้รับประทานระหว่างทดสอบแต่ละตัวอย่างเพื่อปรับสภาพการรับรสของลิ้นให้เป็นปกติ

## 2.2 สถานที่ทำการทดลอง

2.2.1 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

2.2.2 กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
85 ถนนวาริน-เดชอุดม ตำบลเมืองศรีโค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
34190



## บทที่ 3

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 3.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp.

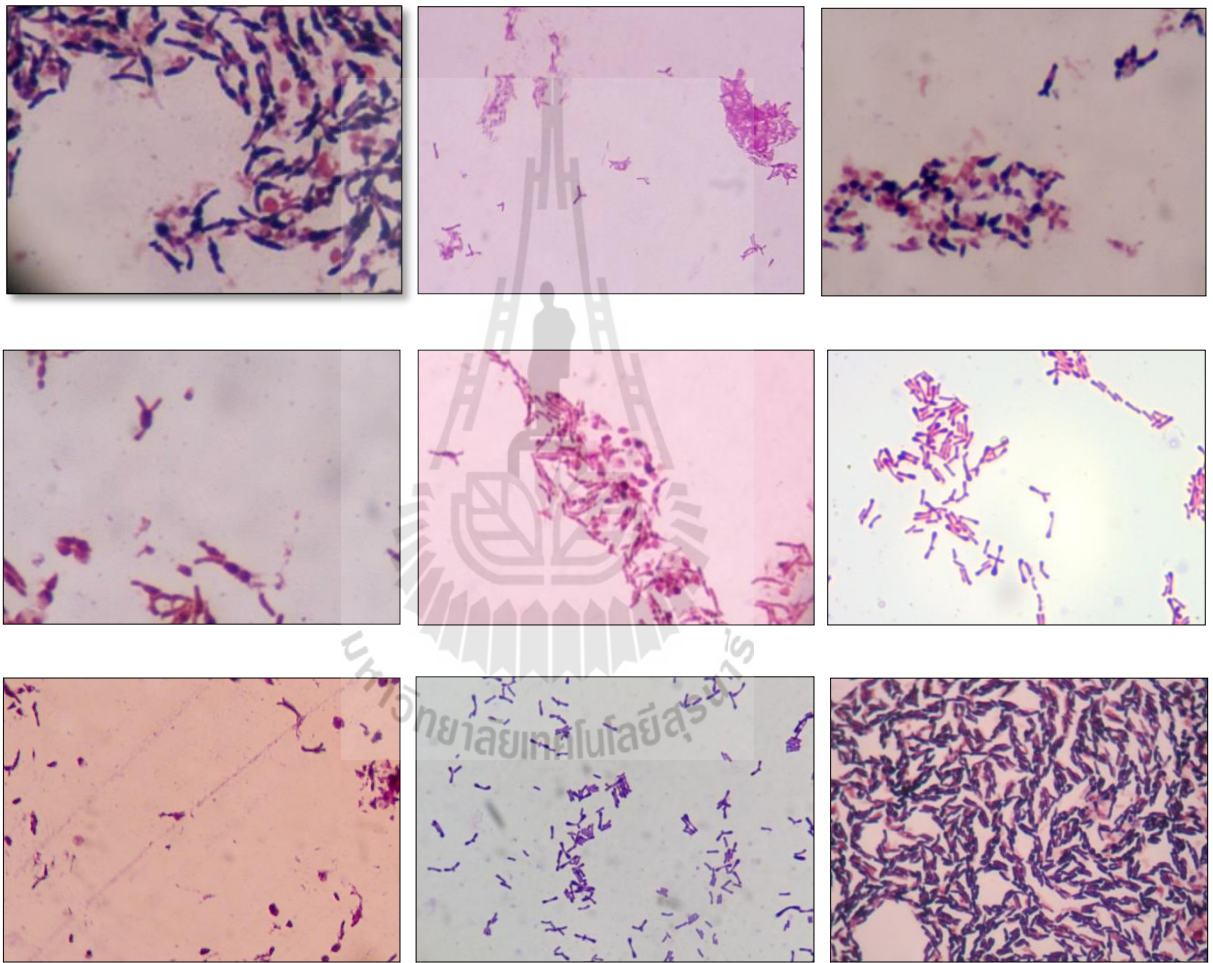
จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารกที่มีช่วงอายุที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10 วัน จนถึง 5 เดือน จำนวน 15 ตัวอย่าง เมื่อทำการเจือจางตัวอย่าง และเพาะเลี้ยงลงอาหารแข็ง MRSc ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อ แบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRSc ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวใสจนถึงสีขาวขุ่น และมีขนาดที่แตกต่างกันไปดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRSc ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของเด็ก

จากนั้นจึงทำการเลือกโคโลนีแบบสุ่มจำนวน 50 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจสอบ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียที่ติดสี ม่วงหรือแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน เป็นแท่งยาวตรงปลายเป็นกระเปาะคล้ายกระบอง หรือ อาจจะแตกออกเป็นง่ามคล้ายรูปตัววายหรือตัววี ดังตัวอย่างในรูปที่ 3.2 เชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวจะคัด แยกออกมาและนำมาทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งหมด 325 ไอโซเลต จากตัวอย่างที่ทำการคัด แยกพบว่าจำนวนเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย จะมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับช่วงอายุของเด็กทารก การให้นม บุตร และสภาพการเลี้ยงดู โดยเชื้อชนิดนี้พบได้ตั้งแต่ 50-80% ต่อหนึ่งตัวอย่างที่ทำการแยก เชื้อที่ย้อม ติดสีแดงหรือแกรมลบ หรือมีลักษณะกลม (cocci) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะถูกคัดทิ้งไป การศึกษานี้ยัง พบว่าเด็กทารกที่ไม่ได้รับน้ำนมจากมารดาจะไม่พบเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียในการคัดแยก ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Solís และคณะ (2010) และ Arboleya และคณะ (2011) ที่รายงานว่า สามารถพบ แบคทีเรีย บิฟิโดแบคทีเรีย ได้มากในอุจจาระเด็กทารกที่ดื่มน้ำนมมารดาที่มีอายุตั้งแต่ 10 วันเป็นต้น ไป และยังสามารถพบเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย ประมาณร้อยละ 3-11 ในน้ำนมมารดาในช่วงหลังจากคลอด บุตรได้ประมาณ 3 เดือน นอกจากนี้ น้ำนมมารดายังเป็นแหล่งอาหารชั้นดีของเชื้อโพรไบโอติกหรือที่

เรียกว่า 프리ไบโอติก (prebiotics) ซึ่งเป็นสารจำพวกกาแล็กโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญให้เชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย มีปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งแบคทีเรียชนิดดีเหล่านี้จะทำให้แบคทีเรียก่อโรค เช่น โคลิฟอร์ม (coliform) และเอนเทอโรคอคคัส (Enterococcus) มีจำนวนที่น้อยลง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ทารกที่ดื่มน้ำนมมารดาตั้งแต่แรกคลอดมีสุขภาพแข็งแรง และมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าทารกที่ดื่มน้ำนมจากขวดหรือนมกระป๋อง เนื่องจากภายในลำไส้ของเด็กที่ดื่มน้ำนมมารดามีแบคทีเรีย บีฟิโดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อลำไส้มากกว่าเด็กที่ไม่ได้รับน้ำนมมารดา อย่างไรก็ตามเมื่อเด็กทารกมีอายุมากขึ้น ประกอบกับพฤติกรรมในการบริโภคที่เปลี่ยนไป รวมไปถึงการเข้ายาส้วมชิวะนั้น ก็จะส่งผลให้เชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย มีปริมาณที่น้อยลงได้

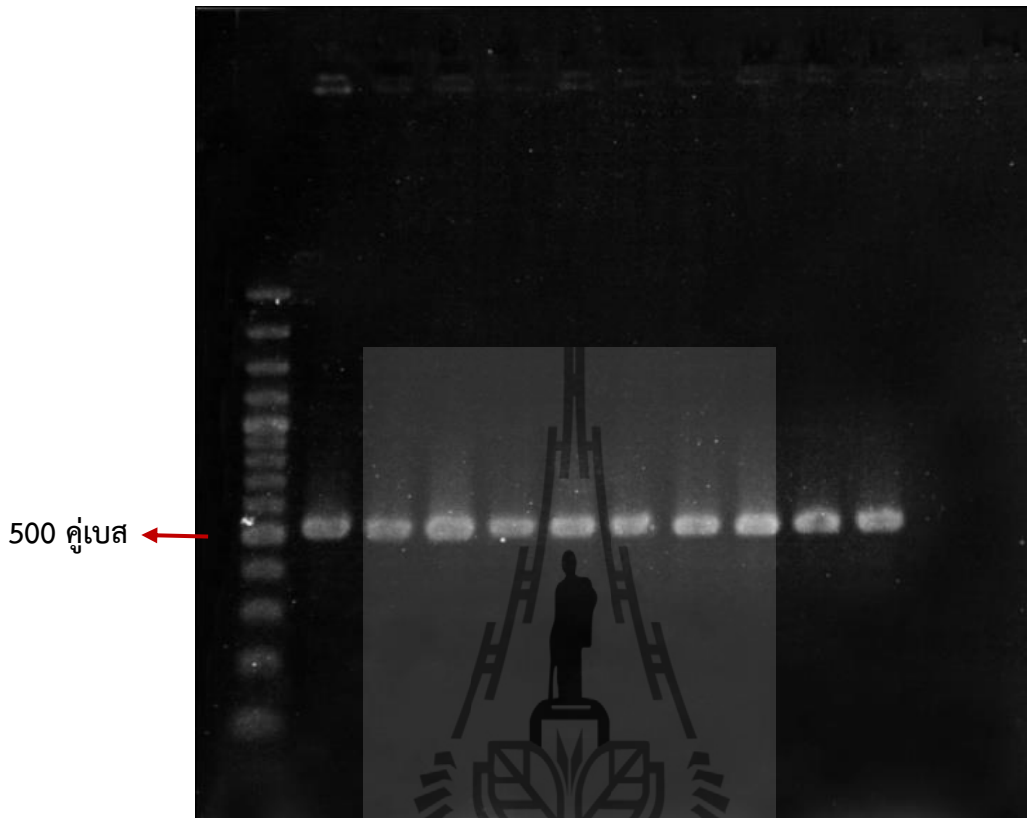


รูปที่ 3.2 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

### 3.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

แบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยก และผ่านการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา จะนำมายืนยันด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rDNA ร่วมกับไพรเมอร์ Bif164-F และ Bif662-R ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของจีโนม บีฟิโดแบคทีเรีย เมื่อตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.2% พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 325

ไอโซเลต มี 290 ไอโซเลต ที่เกิดผลิตผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขนาดประมาณ 520 คู่เบส (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากเชื้อที่คัดแยกได้

ช่องที่ M : ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ 100 คู่เบส

ช่องที่ 1 : *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, strain BB-12 (ตัวควบคุมบวก)

ช่องที่ 2-10 : เชื้อที่ทำการคัดแยกได้

ช่องที่ 11 : *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (ตัวควบคุมลบ)

ช่องที่ 12 : *Escherichia coli* (ตัวควบคุมลบ)

### 3.3 ผลการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด และน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (simulated gastric juice) รวมถึงสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salt) และน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (pancreatic juice)

แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบผลิตผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ (conserved region or sequence) ของยีนส์ บีฟิโดแบคทีเรีย จะนำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเชื้อโพรไบโอติกด้วยการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหาร จากการทดลองพบว่ามี 4 ไอโซเลต (BF014, BF049, BF052 และ BH053) ที่มีจำนวนเซลล์มีชีวิตรอดลดลงน้อยกว่า 1 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เริ่มต้นในสภาวะที่เป็นกรด



(pH 3) เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และในสภาวะที่เป็นกรดที่ pH 2 นั้นไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดอยู่เลยรวมทั้งเชื้ออ้างอิงที่ใช้ทางการค้า *B. animalis* subsp. *lactis*, strain BB-12 อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียในสารละลายคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหารในสารละลาย PBS ที่มี 0.3% (w/v) ของ เอนไซม์เพปซิน พบว่าไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นทั้งในสารละลาย pH 2 และ pH 3 โดยมีชีวิตรอดมากกว่า 6 log CFU/mL จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 7 log CFU/mL เฉพาะไอโซเลต BF014 เท่านั้นที่ไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตรอดเลยในสารละลายคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่ pH 2 ตามแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** การรอดชีวิตของเชื้อที่คัดแยกได้ (log CFU/mL  $\pm$  SD) เมื่อบ่มในสภาวะที่เป็นกรด และสภาวะคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหารเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ไอโซเลต	จำนวนเชื้อเริ่มต้น	สภาวะที่เป็นกรด		สภาวะคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร	
		pH 2	pH 3	pH 2	pH 3
BB-12	6.71 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	- <sup>A</sup>	6.61 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	6.21 $\pm$ 0.039 <sup>b</sup>	6.65 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
BF014	7.14 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	-	6.86 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	6.46 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	7.08 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
BF049	7.13 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	-	6.93 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	-	1.61 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
BF052	7.31 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	-	7.25 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	6.99 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	7.26 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
BH053	7.79 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	-	7.34 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	7.19 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	7.65 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

<sup>A</sup> ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอด

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 มีแนวโน้มการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร หรือในสภาวะที่มีเอนไซม์เพปซิน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เพปซินน่าจะมีส่วนช่วยส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการทนต่อกรดได้ดียิ่งขึ้น Mättö และคณะ (2006) ได้ศึกษาพบว่าเมื่อมีตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซิน (pepstatin A; pepsin inhibitor) จะทำให้ *B. animalis* subsp. *lactis* E2010 มีความสามารถในการทนต่อสารละลายคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (0.15 % (w/v) เอนไซม์เพปซิน) ที่ pH 2 ได้ลดลงและยังพบว่าในกรณีที่มี N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD; an inhibitor of proton translocating enzymes) ในสารละลายคล้ายน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร จะลดความสามารถของเอนไซม์เพปซินในการปกป้องปิพิโดแบคทีเรียจึงทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์เพปซินน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการช่วยให้เชื้อปิพิโดแบคทีเรียสามารถทนต่อในสภาวะเป็นกรดได้ดีขึ้น และอาจจะทำงานสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ( $H^+$ -ATPase) อย่างไรก็ตามกลไกในการทนต่อสภาวะในกระเพาะอาหารในกรณีที่มีเอนไซม์เพปซินขึ้นขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากไอโซเลต BF049 แม้จะมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ดี แต่กลับพบว่ามีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างชัดเจนเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์เพปซิน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อที่คัดแยกได้นั้นมีสมบัติในการทนต่อสภาวะต่างๆได้แตกต่างกัน

ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในลำไส้เล็กนั้น พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึงทนต่อสภาวะที่มีเอนไซม์แพนครีเอตินได้ดี โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงประมาณ 1 log CFU/mL โดยปกติแล้วเกลือ น้ำที่ดีจะถูกปล่อยออกมาเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น มีส่วนช่วยให้ไขมันแตกตัวเพื่อสะดวกต่อการย่อยโดยเอนไซม์ลิเพสต่อไป Wang และคณะ (2010) รายงานว่าความเข้มข้นของเกลือ น้ำที่ดีโดยทั่วไปในมนุษย์นั้นอยู่ในช่วง 0.3-0.5% และเนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีไขมันองค์ประกอบ ความเข้มข้นของเกลือ น้ำที่ดีในปริมาณสูงจึงอาจส่งผลให้เกิดการละลายของไขมันในส่วนของฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายได้ และทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีควรมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำที่ดีแม้ในความเข้มข้นที่สูง จากการทดลองพบว่าไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้แม้จะอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (pH 8) และมีเกลือ น้ำที่ดีสูงถึง 1% (w/v) ตามแสดงในตารางที่ 3.2

**ตารางที่ 3.2** การรอดชีวิตของเชื้อที่คัดแยกได้ (log CFU/mL) ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำที่ดี และสภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็กหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

ไอโซเลต	จำนวนเชื้อเริ่มต้น	ความเข้มข้นของเกลือ น้ำที่ดี (pH 8)			สภาวะคล้ายน้ำย่อยในลำไส้เล็ก (pH 8)
		0.3%	0.5%	1%	
BB-12	7.42 ± 0.14 <sup>a</sup>	6.45 ± 0.08 <sup>b</sup>	6.43 ± 0.04 <sup>b</sup>	6.41 ± 0.09 <sup>b</sup>	6.42 ± 0.27 <sup>b</sup>
BF014	7.28 ± 0.12 <sup>a</sup>	6.51 ± 0.26 <sup>b</sup>	6.38 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.15 ± 0.14 <sup>b</sup>
BF049	7.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.58 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.58 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.09 <sup>c</sup>	5.10 ± 0.11 <sup>d</sup>
BF052	7.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.77 ± 0.01 <sup>b</sup>	6.73 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.15 <sup>c</sup>
BH053	7.43 ± 0.10 <sup>a</sup>	6.25 ± 0.18 <sup>b</sup>	6.23 ± 0.12 <sup>b</sup>	6.23 ± 0.15 <sup>b</sup>	6.31 ± 0.15 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะในลำไส้เล็กนั้น พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำที่ดีที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึงทนต่อสภาวะที่มีเอนไซม์แพนครีเอตินได้ดี โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงประมาณ 1 log CFU/mL โดยปกติแล้วเกลือ น้ำที่ดีจะถูกปล่อยออกมาเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น มีส่วนช่วยให้ไขมันแตกตัวเพื่อสะดวกต่อการย่อยโดยเอนไซม์ลิเพสต่อไป Wang และคณะ (2010) รายงานว่าความเข้มข้นของเกลือ น้ำที่ดีโดยทั่วไปในมนุษย์นั้นอยู่ในช่วง 0.3-0.5% และเนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีไขมันองค์ประกอบ ความเข้มข้นของเกลือ น้ำที่ดีในปริมาณสูงจึงอาจส่งผลให้เกิดการละลายของไขมันในส่วนของฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายได้ และทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีควรมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำที่ดีแม้ในความเข้มข้นที่สูง จากการทดลองพบว่าไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้แม้จะอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (pH 8) และมีเกลือ น้ำที่ดีสูงถึง 1% (w/v) ตามแสดงในตารางที่ 3.2 จากผลการทดลองนี้ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าสภาวะในระบบทางเดินอาหารที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียมากที่สุด คือสภาวะในกระเพาะ

อาหารที่มีความเป็นกรดสูง เพราะมีแบคทีเรียเพียงไม่กี่ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้ ซึ่งไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 สามารถทนได้ทั้งสภาวะในกระเพาะอาหารและสภาวะในลำไส้เล็ก จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตน่าจะสามารถทนต่อสภาวะจริงในระบบทางเดินอาหารได้ ทั้งสามไอโซเลตจึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาสมบัติในการเป็นเชื้อโพรไบโอติกอื่นๆอีกต่อไป

### 3.4 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ API 50 CHL และผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน ของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ปิพิโดแบคทีเรียสายพันธุ์ BF014, BF052 และ BH053 ได้ถูกจำแนกโดยชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีรูปแบบการใช้คาร์โบไฮเดรตที่เหมือนกัน โดยสามารถใช้น้ำตาล D-Ribose, D-glucose, Amygdalin, Esculin, Salicin, D-Maltose, D-melibiose, D-Sucrose, D-Raffinose และ Gentiobiose และเมื่อป้อนข้อมูลดังกล่าวลงในโปรแกรมวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียตามรูปแบบการใช้น้ำตาลพบว่าซอฟต์แวร์มีการทำนายว่าสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้นอยู่ในวงศ์ *Bifidobacterium sp.*

เพื่อเป็นการยืนยันการจำแนกเชื้อ *Bifidobacterium spp.* ในระดับอนุชีววิทยาโมเลกุลว่า จะอยู่ในสปีชีส์ใดนั้น เราได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16sDNA ของไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 พบว่าเมื่อนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากไอโซเลต BF014, BF052 และ BH053 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ Bif164-F หรือ Bif662-R จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพของ National center for Biotechnology Information (NCBI) ผลการเปรียบเทียบพบว่าทั้งสามไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกับ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน (Identity) ถึง 99-100% ดังแสดงในตารางที่ 3.3 จากรูปแบบการใช้คาร์โบไฮเดรตที่เหมือนกัน และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่ทำการแยกได้นั้นเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bifidobacterium animalis*

ตารางที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบส 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์	% ความเหมือน กับสายพันธุ์ใกล้เคียง
BF014 (461 เบส)	GTACCCGGCGCAGATCCACCGTTAGGCGATGGACTTTCACACCGGACGCGACGAACCGCC TACGAGCCCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGC TGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTGCTTATTGCAACAATCCACTCAACACGGCCGAAACCGT GCCTTGCCCTTGAACAAAAGCGGTTTACAACCCGAAGCCCTCCATCCCGCACGCGCGTC GCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTGCTGCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCACCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCAACGC CTTGGTGGGCCATCACCCGCCAACAAGCTGATAGGACGCGACCCATCCCATGCGCGAA AAGCATTTCCACCCACCATGCGATGGAGCGGAGCATCCG	100% <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1, complete genome: (CP003039.2)
BF052	GTACCCGGCGCAGATCCACCGTTAGGCGATGGACTTTCACACCGGACGCGACGAACCGCC	99%

(461เบส)	TACGAGCCCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGC TGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTGGAACAATCCACTCAACACGGCCGAAACCGT GCCTTGCCCTTGAACAAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCTCCATCCCGCACGCGGCGTC GCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGTGCCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCAACGC CTTGGTGGGCCATCACCCGCCAACAAGCTGATAGGACGCGACCCATCCCATGCCGCAA AAGCATTTCCACCCACCATGCGATGGAGCGGAGCAACCG	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis BLC1, complete genome: (CP003039.2)
BH053 (461 เบส)	GTACCCGGCGCAGATCCACCGTTAGGCGATGGACTTTCACACCGGACGCGACGAACCGCC TACGAGCCCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGC TGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTGGAACAATCCACTCAACACGGCCGAAACCGT GCCTTGCCCTTGAACAAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCTCCATCCCGCACGCGGCGTC GCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGTGCCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCAACGC CTTGGTGGGCCATCACCCGCCAACAAGCTGATAGGACGCGACCCATCCCATGCCGCAA AAGCATTTCCACCCACCATGCGATGGAGCGGAGCATCCG	100% <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis BLC1, complete genome: (CP003039.2)

### 3.5 ผลการศึกษาอัตราการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียบิฟิโดแบคทีเรียกับเซลล์ผนังลำไส้

ผลการทดสอบสมบัติการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเซลล์เป็อบุผนังลำไส้ Caco-2 แสดงในตารางที่ 3.4 และลักษณะของเซลล์ผนังลำไส้ Caco2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กลับหัว (inverted microscope) แสดงในรูปที่ 3.4 จากการทดลองพบว่า BF052 สามารถยึดเกาะกับเซลล์เป็อบุผนังลำไส้ได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ และสายพันธุ์อ้างอิง BB-12 โดยมีค่าร้อยละการยึดเกาะเท่ากับ 3.38 ซึ่งหมายความว่า BF052 สามารถยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ได้ประมาณ  $3.38 \times 10^6$  CFU/mL จากเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU/mL

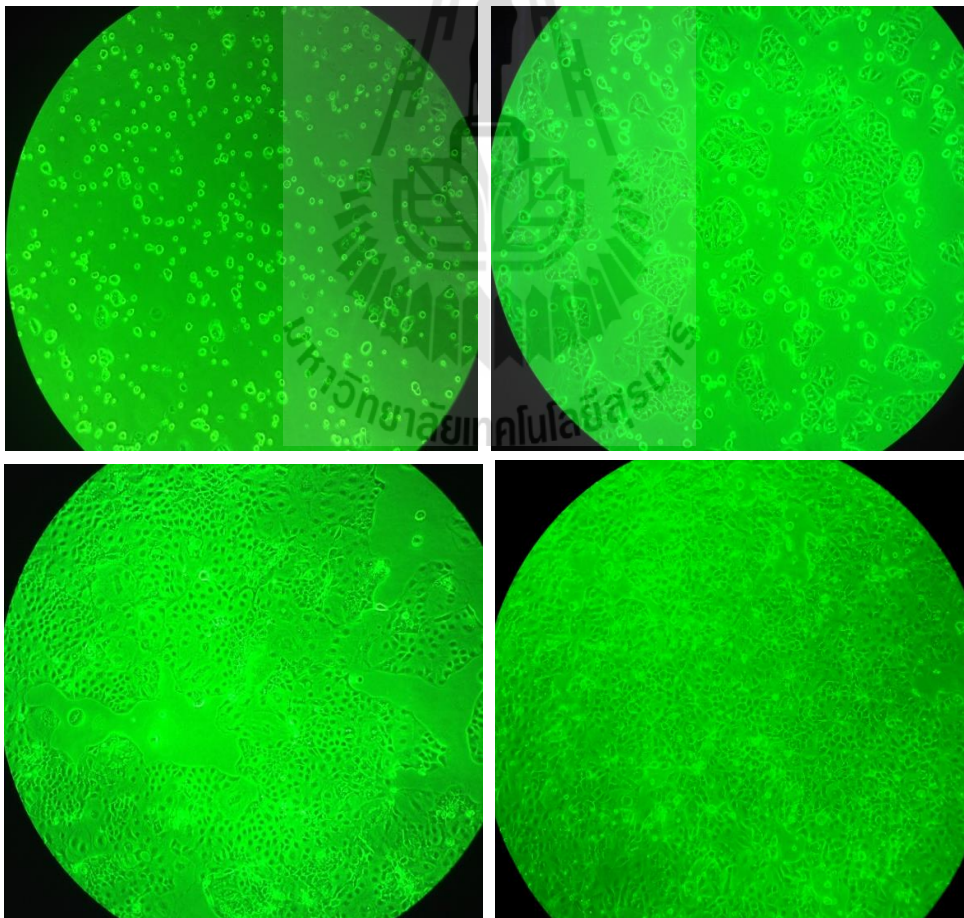
ตารางที่ 3.4 ความสามารถของบิฟิโดแบคทีเรีย ในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2

ไอโซเลต	ร้อยละการยึดเกาะ (mean $\pm$ SD)
BB-12	$2.96 \pm 0.12^{ab}$
BF014	$2.57 \pm 0.38^c$
BF052	$3.38 \pm 0.15^a$
BH053	$2.72 \pm 0.37^{ab}$

<sup>a,ab,c</sup> อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์ แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

Laparra and Sanz (2009) ศึกษาพบว่าเชื้อ *B. animalis* BB-12 มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผนังลำไส้ชนิด Caco-2 และ mucin (type II) ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่น เช่น *Lactobacillus rhamnosus* GG, *B. animalis* IATA-A2 และ *B. bifidum* IATA-ES2 Sánchez และคณะ (2010) รายงานพบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. lactis IPLA4549 มีความสามารถยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ชนิด HT29-MT ได้ร้อยละ  $2.96 \pm 1.74$  เปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง BB-12 ซึ่งยึดเกาะได้ถึงร้อยละ  $3.08 \pm 1.37$  ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ BB-12 ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้กันทางการค้ามีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ได้ดี จากผลการทดลองนี้พบว่า BF052 มี

ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิง BB-12 ซึ่งความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียโพรไบโอติกกับเซลล์ผนังลำไส้ของเจ้าบ้านนั้นจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าแบคทีเรียสามารถครอบครองพื้นที่เซลล์เยื่อบุทางเดินของผนังลำไส้ได้มากน้อยเพียงใด ความสามารถในการยึดครองนี้จะช่วยป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ มายึดเกาะเพื่อเพิ่มจำนวนและก่อโรค จุลินทรีย์ก่อโรคที่ไม่สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ก็จะถูกกำจัดไปกับกลไกการขับถ่ายของเสีย หรือถูกกำจัดโดยสารที่หลั่งออกมาจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ แบคทีเรียโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) หรือสารชนิดอื่น ๆ แบคทีเรียโพรไบโอติกยังสามารถทำให้สภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่มีสภาพเป็นกรดทำให้เชื้อก่อโรคซึ่งมักไม่ทนกรดนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ยึดเกาะผนังลำไส้ได้ยังสามารถผลิตสารหรือวิตามินที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้าน และยังช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายได้อีกด้วย เพราะในลำไส้มีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกว่าร้อยละ 80 การที่แบคทีเรียสามารถเกาะติดลำไส้ผู้บริโภคนั้นจะช่วยให้ร่างกายผู้บริโภครวมเกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ดีขึ้นได้อีกด้วย (Lebeer และคณะ, 2010; O'Toole และ Cooney, 2008) ดังนั้น สมบัติในการเกาะยึดติดเซลล์เยื่อบุลำไส้ของแบคทีเรียโพรไบโอติกจึงเป็นสมบัติที่มีความสำคัญที่จะเป็นตัวขับเคลื่อนเพื่อส่งผลให้เกิดสุขภาพที่ดีต่อผู้บริโภค



รูปที่ 3.4 ลักษณะของเซลล์ผนังลำไส้ Caco2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กลับหัว (40X magnification)

### 3.6 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic susceptibility)

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร จะถูกนำมาศึกษารูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองนี้จะแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่มใหญ่ ตามโครงสร้างของยาปฏิชีวนะ กลุ่มแรก คือ aminoglycosides ได้แก่ streptomycin, gentamicin และ kanamycin ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน กลุ่มที่สองคือ  $\beta$ -lactam ได้แก่ penicillin และ ampicillin ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ส่วน aztreonam (synthetic monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotic) จัดอยู่ในยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้เช่นกันแต่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มที่สาม คือ broad-spectrum antibiotic ได้แก่ tetracycline และ chloramphenicol ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ กลุ่มที่สี่ glycopeptide antibiotic ได้แก่ vancomycin ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก กลุ่มที่ห้า คือ macrolide antibiotic ได้แก่ erythromycin ออกฤทธิ์ยับยั้งการกระบวนการการสังเคราะห์โปรตีน กลุ่มที่หก คือ lincosamide antibiotic ได้แก่ lincomycin ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกัน และกลุ่มที่เจ็ด คือ fluoroquinolone ได้แก่ norfloxacin และ ofloxacin เป็นยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ออกฤทธิ์ยับยั้งในกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์ ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะแสดงดังตารางที่ 3.5 พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต รวมทั้งเชื้ออ้างอิงไว (sensitive) ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam (penicillin และ ampicillin), กลุ่ม broad-spectrum antibiotic (tetracycline และ chloramphenicol) รวมไปถึงยาปฏิชีวนะ vancomycin, erythromycin และ lincomycin และพบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความต้านทาน (resistant) ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides (streptomycin, gentamicin และ kanamycin) รวมถึง aztreonam และกลุ่ม fluoroquinolone (norfloxacin และ ofloxacin) ซึ่งรูปแบบของความไวต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ก็มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่นๆที่รายงานว่าเชื้อ *Bifidobacterium* spp. มักจะไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin, ampicillin, และ erythromycin และมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides รวมทั้ง aztreonam (D'Aimmo และคณะ, 2007; Sharma และคณะ, 2014) รูปที่ 3.5 แสดงตัวอย่างรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ BF052

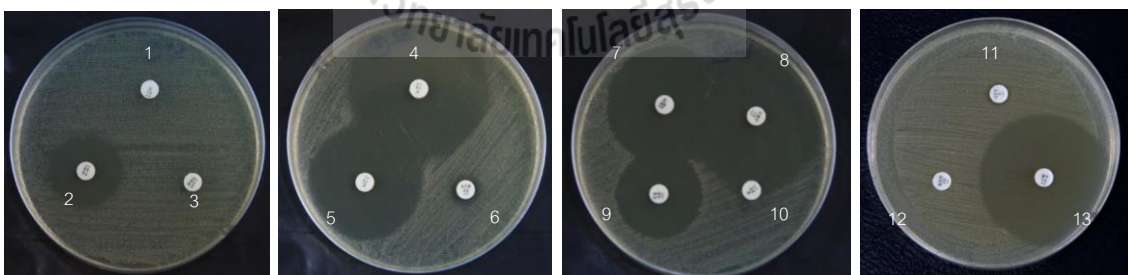
ตารางที่ 3.5 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย ที่ทำการคัดแยก

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ*			
	BB-12	BF014	BF052	BH053
Streptomycin (10 $\mu$ g)	R	R	R	R
Gentamicin (10 $\mu$ g)	R	R	R	R
Kanamycin (30 $\mu$ g)	R	R	R	R
Penicillin G (10 $\mu$ g)	S	S	S	S
Ampicilin (10 $\mu$ g)	S	S	S	S
Aztreonam (30 $\mu$ g)	R	R	R	R
Tetracycline (30 $\mu$ g)	S	S	S	S
Chloramphenicol (30 $\mu$ g)	S	S	S	S

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ*			
	BB-12	BF014	BF052	BH053
Vancomycin (30 µg)	S	S	S	S
Erythromycin (15 µg)	S	S	S	S
Lincomycin (15 µg)	S	S	S	S
Norfloxacin (10 µg)	I	R	R	R
Ofloxacin (5 µg)	R	R	R	R

\*Sensitive (S), Intermediate (I) และ Resistant (R)

โดยทั่วไปการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรคนั้น ยาจะออกฤทธิ์ไม่จำเพาะ ทำให้ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น หรือจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกายให้มีจำนวนที่น้อยลง การที่เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมีสมบัติในการทนต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดนั้นจะช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยจะช่วยฟื้นฟูสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ทำให้เป็นผลดีต่อสุขภาพของผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความปลอดภัยแล้วยีน (gene) ที่ทำให้แบคทีเรียทนต่อยาปฏิชีวนะนั้นนั้นควรจะเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม (chromosomally coded resistance) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ รวมถึงจุลินทรีย์ก่อโรค (Bujnakova และคณะ, 2014; Sharma และคณะ, 2014) จากการศึกษาพบว่ากลไกการดื้อยาของเชื้อ บีพีโดแบคทีเรีย ต่อยาปฏิชีวนะ streptomycin, gentamicin และ mupirocin เป็นการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) ส่งผลให้ยีนดื้อยาไม่สามารถถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ต่างชนิดได้ (Sharma และคณะ, 2014) ดังนั้นในการที่จะนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ในรูปแบบใด ควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นอย่างดี เพื่อความปลอดภัยและได้รับประโยชน์สูงสุดในการส่งเสริมสุขภาพ



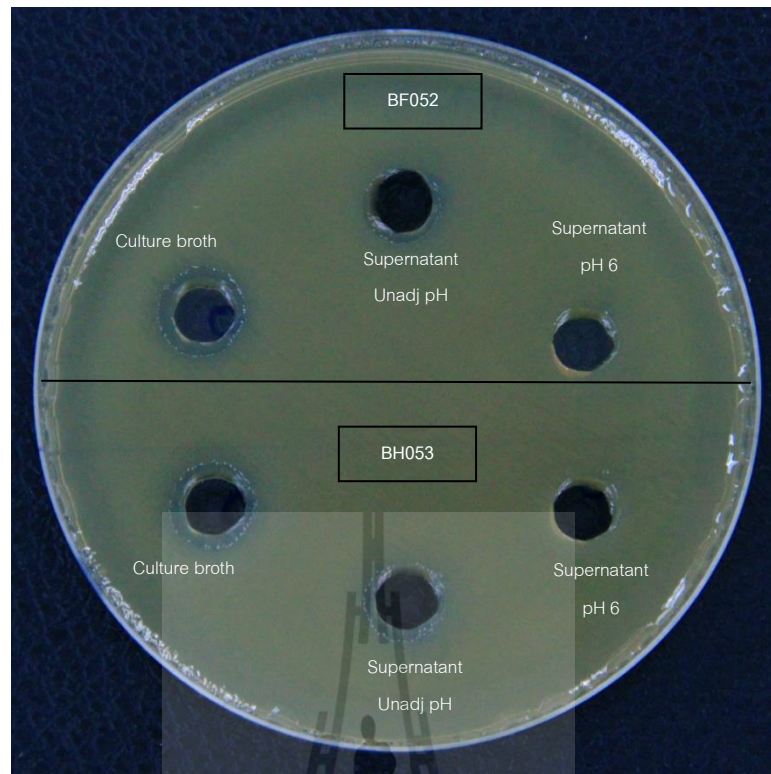
รูปที่ 3.5 รูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ BF052, หมายเลข 1-13 ได้แก่ streptomycin, tetracycline, gentamicin, penicillin G, erythromycin, aztreonam, chloramphenicol, ampicillin, vancomycin, kanamycin, ofloxacin, norfloxacin, และ lincomycin ตามลำดับ

นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าการดื้อยาปฏิชีวนะชนิด ofloxacin และ norfloxacin ซึ่งอยู่ในกลุ่ม fluoroquinolone นั้นน่าจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีเชื้อ BF052 ผสมอยู่เป็นประจำ ถ้าผู้ป่วยโรคป่วยด้วยอาการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) หรือทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory tract infection) จนต้องได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ การได้รับยาไม่น่าจะส่งผลต่อการรักษาสมดุลจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติก BF052 ที่บริเวณลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยโรคยังได้รับประโยชน์ต่อการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกอย่างต่อเนื่องขณะหรือหลังการรักษาอาการติดเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ

### 3.7 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี agar-well diffusion โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ชุดที่หนึ่งคือใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ชุดที่สองคือส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทำการปรับ pH (non-neutralized supernatant) และชุดที่สามคือส่วนใสที่ปรับ pH เป็น 6.0 จากการศึกษาพบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อของ BF014, BF052, BH053 และเชื้ออ้างอิง BB-12 ที่ปรับ pH เป็น 6.0 นั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้เลย ส่วนส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ บีพีโดแบคทีเรีย ไอโซเลต BF052 และ BH053 ที่ไม่ปรับ pH (ซึ่งมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.2-4.7) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. cholera* (รูปที่ 3.6) และ *S. typhimurium* ดังแสดงในตารางที่ 3.6 นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของทุกสายพันธุ์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้อีกด้วย โดยทั่วไปนั้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียโพรไบโอติกจะเกิดจากการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ เป็นต้น จากผลการศึกษาทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่เกิดจากการใช้ส่วนใสที่ไม่ปรับ pH นั้นน่าจะเป็นผลมาจากการผลิตกรดอินทรีย์ (organic acids) ของเชื้อ เช่น กรดแล็กติก หรือ กรดแอสติก เป็นต้น ผลการทดลองนี้เป็นไปทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Arboleya และคณะ (2011) ที่รายงานว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ปรับ pH ของเชื้อ *B. longum* และ *B. breve* ที่คัดแยกได้จากนํานมมารดาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella enteric* และ *Shigella sonnei* แต่ส่วนใสที่ปรับ pH เป็น 6.2 กลับไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ทำการทดลองได้เลย นอกจากนี้ Fukuda และคณะ (2011) ยังศึกษาพบว่ากรดแอสติกที่ผลิตจากเชื้อ *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217, *B. longum* subsp. *infantis* 157F และ *B. longum* subsp. *longum* NCC 2705 สามารถยับยั้งการเจริญของเอนเทอโรฮีโมเรจิกอีโคไล (entero-hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7) ในหนูทดลอง ทำให้เชื้อไม่สามารถหลั่งสารพิษชิกาชนิดที่ 2 (Shiga toxin 2) เพื่อทำลายเซลล์ได้ ดังนั้นการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อ บีพีโดแบคทีเรีย จึงน่าจะเป็นกลไกสำคัญในการทำให้เชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้





รูปที่ 3.6 การทดสอบความสามารถของเชื้อ BF052 และ BH053 ในการยับยั้งเชื้อ *V. cholera*

ตารางที่ 3.6 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย

ชนิดของเชื้อก่อโรค	ขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)							
	BB-12		BF014		BF052		BH053	
	Cb <sup>a</sup>	S <sub>unadj</sub> <sup>b</sup>	Cb	S <sub>unadj</sub>	Cb	S <sub>unadj</sub>	Cb	S <sub>unadj</sub>
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	9	-	10	-	10	-	11	-
<i>V. cholerae</i>	-	-	-	-	10	8	10	9
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	11	-	11	10	11	10	11	11
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

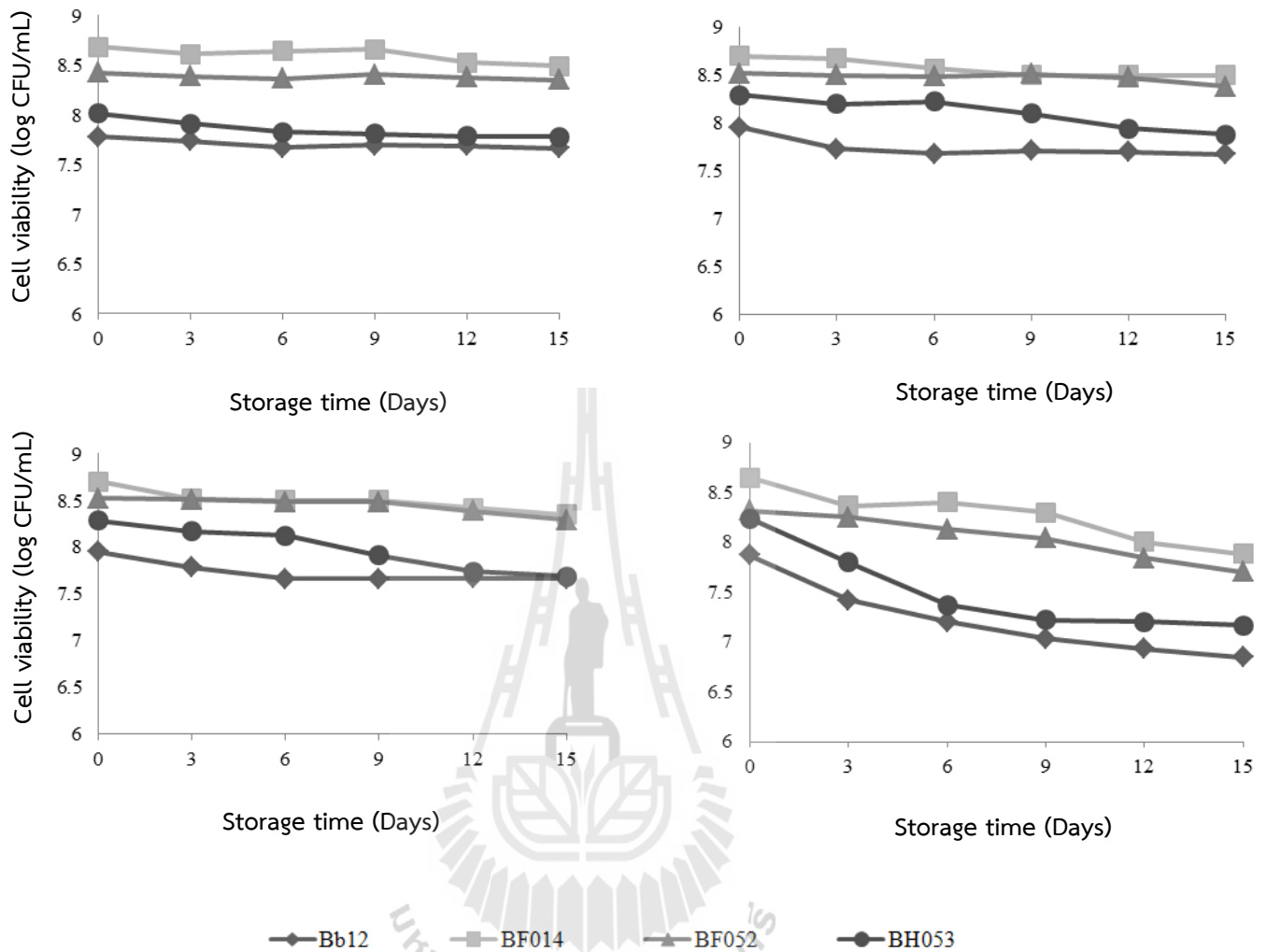
a: Culture broth

b: Unadjusted supernatant

### 3.8 ผลการรอดชีวิตของเชื้อบีฟิโดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร

เป็นที่ทราบกันว่าโพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งอาจอยู่ในรูปของอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมซึ่งเมื่อรับประทานด้วยปริมาณที่พอเหมาะแล้วจะช่วยส่งเสริมสุขภาพที่ดีต่อผู้บริโภค (FAO/WHO, 2006) ซึ่งปริมาณของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารควรมีอยู่อย่างน้อย  $10^6$ - $10^7$  CFU/mL ดังนั้นในกระบวนการผลิต นอกจากจะต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะในกระบวนการผลิตแล้ว การมีชีวิตรอดของเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการเก็บรักษาจนกระทั่งวันหมดอายุก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติก เพื่อให้เชื้อมีปริมาณที่จำนวนมากเพียงพอก่อนถึงมือผู้บริโภค

ในการทดลองนี้เชื้อแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะนำมาทดสอบการมีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์อาหาร 4 ชนิด ได้แก่ น้่านมพาสเจอร์ไรส์รสจืด นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม น้่านมถั่วเหลือง และน้ำส้มคั้น ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นระยะเวลา 15 วัน จากการทดลองพบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ BF014, BF052, BH053 และสายพันธุ์อ้างอิง BB-12 มีการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์รสจืดและน้่านมถั่วเหลืองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา 15 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.7 ในขณะที่เชื้อ BH053 มีการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ในนมเปรี้ยวพร้อมดื่มหลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 9 วัน ส่วนในน้ำส้มคั้นทั้ง 4 สายพันธุ์มีการรอดชีวิตที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) หลังจากการเก็บรักษาได้ 3 วัน โดยมีการรอดชีวิตลดลงประมาณ  $1 \log$  CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นระหว่างวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษา ซึ่งสายพันธุ์ BF052 มีแนวโน้มการรอดชีวิตในน้ำส้มคั้นได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Saarela และคณะ (2006) และ Vinderola และคณะ (2012) ที่รายงานว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* มีการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์นมได้สูงกว่าในน้ำผลไม้เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  และ Nualkaekul และคณะ (2011) ได้รายงานว่าปริมาณของโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหารมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตได้สูงขึ้น ซึ่งตรงกับการทดลองนี้ที่พบว่าถึงแม้ค่า pH ของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มและน้ำส้มคั้นจะแตกต่างกันไม่มาก แต่เชื้อกลับมีชีวิตรอดในนมเปรี้ยวพร้อมดื่มได้ดีกว่าในน้ำส้มคั้นที่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า



รูปที่ 3.7 การรอดชีวิตของเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหาร (A) นมพาสเจอร์ไรส์รสจืด (B) นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (C) น้ํานมถั่วเหลือง (D) และน้ําส้มคั้น ระหว่างการเก็บรักษา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดต่างหรือ ค่า pH ของอาหารก็เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตรอดของเชื้อ เพราะเชื้อโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักซึ่งมีค่า pH ค่อนข้างต่ำ เมื่อ pH ของอาหารมีค่าต่ำ เชื้อจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ ATP ในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อรักษาสมดุลของระดับ pH ภายในเซลล์เพื่อให้เซลล์ดำรงชีวิตอยู่ได้ ทำให้ปริมาณ ATP ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเซลล์สำหรับใช้ในกิจกรรมอื่นๆ ที่สำคัญ จึงเป็นสาเหตุให้เชื้อแบคทีเรียตายเมื่อต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (Pimentel และคณะ, 2015) และเมื่อทำการวัดค่าของ pH ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่าสายพันธุ์ BF052 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ในผลิตภัณฑ์อาหารน้อยที่สุดระหว่างวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บรักษา ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.66-6.64 ในนมพาสเจอร์ไรส์รสจืด, 6.50-6.33 ในนมถั่วเหลือง, 3.79-3.78 ในนมเปรี้ยว

พร้อมดื่ม และ 3.67-3.66 ในน้ำส้มคั้น และจะเห็นได้ว่าน้ำนมถั่วเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH สูงที่สุด โดยอาจเป็นผลมาจากที่นมถั่วเหลืองมีน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น แรฟฟิโนส (raffinose) และสแตคีโอส (stachyose) ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้สามารถใช้ได้โดยแบคทีเรีย บีฟิโดแบคทีเรีย เป็นผลให้เชื้อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ ทำให้ pH ของอาหารมีค่าลดลง (Wang และคณะ, 2004) แต่อย่างไรก็ตามการสร้างกรดโดยเชื้อระหว่างการเก็บรักษานั้นเป็นสมบัติที่ไม่พึงประสงค์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร เพราะอาจจะทำให้อาหารมีกลิ่นและรสชาติที่เปลี่ยนแปลงไป และค่า pH ที่สูงขึ้นอาจเป็นสาเหตุให้เชื้อมีการรอดชีวิตที่ลดลงได้ (Heller, 2001)

จากการทดลองพบว่าเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้แม้จะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน คือ *B. animalis* แต่ก็ยังให้ผลความสามารถในการเป็นเชื้อโพรไบโอติกที่แตกต่างกันแม้กระทั่งความสามารถในการอยู่รอดในผลิตภัณฑ์อาหาร จากการศึกษาพบว่าเชื้อ BF052 มีแนวโน้มการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และยังมีความสามารถในทนต่อสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารได้ดี มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และยังมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค สายพันธุ์ BF052 จึงได้รับคัดเลือกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกในการทดลองต่อไป

### 3.9 ผลการรอดชีวิตของเชื้อสายพันธุ์ BF052 ระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying process)

การเก็บรักษาเชื้อก่อนการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกเป็นอีกขั้นตอนสำคัญ ที่ต้องคำนึงถึงในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในทางอุตสาหกรรม ซึ่งการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งถือว่าเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมสูงในการเก็บรักษาหัวเชื้อ เนื่องจากเป็นการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ จึงลดการทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้างภายในของจุลินทรีย์ ทำให้ลดอัตราการสูญเสียชีวิตของจุลินทรีย์ลง และยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์หลังจากการทำแห้งมีการคืนตัว (rehydration) ที่ดีอีกด้วย นอกจากนี้การใช้สารป้องกันความเย็นที่เหมาะสมถือว่าเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยรักษาความคงตัวช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ระหว่างการทำแห้ง และยังสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น จึงช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตจึงลงได้ (Schoug และคณะ, 2006)

การศึกษการรอดชีวิตของเชื้อ BF052 ระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้สารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกัน พบว่าเฉพาะ 10% skim milk เท่านั้นที่ให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อก่อนและหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไม่แตกต่างกันทางนัยสถิติ ( $p>0.05$ ) ตามด้วยข้าวกล้องงอก และนมถั่วเหลืองที่ให้ผลการรอดชีวิตลดลงมา ดังแสดงในตารางที่ 3.7 หลังจากการเก็บเชื้อที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 1 และ 3 เดือน พบว่า 10% skim milk, 10% งาดำ และน้ำนมถั่วเหลืองให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อไม่แตกต่างกันทางนัยสถิติ ( $p>0.05$ ) และ 10% skim milk ก็ยังให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อไม่แตกต่างกันทางนัยสถิติ ( $p>0.05$ ) ตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือนที่อุณหภูมิ 4°C แต่อย่างไรเมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเชื้อเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าเฉพาะ 10% งาดำ และน้ำนมถั่วเหลืองเท่านั้นที่ให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อที่ไม่แตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) และเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 เดือนและ 6 เดือน

พบว่าสารปกป้องความเย็นทุกชนิดให้ผลการปกป้องเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลงเรื่อยๆจนถึงระยะเวลา 6 เดือน ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C จึงช่วยรักษาการมีชีวิตรอดของเชื้อได้ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

จากการทดลองสารป้องกันความเย็นที่ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้ดีที่สุดระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้ดีที่สุด คือ 10% skim milk โดย skim milk จะช่วยเคลือบและรักษาเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างการทำแห้งทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตได้สูงขึ้น (Huang และคณะ, 2006) 10% skim milk จึงได้รับคัดเลือกให้เป็นสารป้องกันความเย็นสำหรับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อการใช้เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกต่อไป อย่างไรก็ตาม skim milk จะนิยมใช้เป็นสารปกป้องความเย็นในกรณีที่ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นอาหารจำพวกนมวัว หรือใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารนมหมัก แต่ในกรณีที่เป็นอาหารประเภทอื่น เช่น อาหารจำพวก non-dairy probiotic products หรือสำหรับคนที่แพ้น้ำนมวัว หรือน้ำตาลแล็กโตส การใช้สารป้องกันความเย็นชนิดอื่นที่ให้การปกป้องเซลล์ได้ดีทั้งระหว่างการทำแห้งและการเก็บรักษา เช่น นมถั่วเหลือง หรือ งาดำ ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเก็บรักษาหัวเชื้อโพรไบโอติกให้มีชีวิตระหว่างเก็บที่ยาวนานขึ้นได้

**ตารางที่ 3.7** การรอดชีวิตของเชื้อ BF052 (log CFU/mL  $\pm$  SD) ก่อนและหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และระหว่างการเก็บรักษาเมื่อใช้สารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกัน

ชนิดของสาร ป้องกันความเย็น	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต		จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 4°C			จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิห้อง		
	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง	1 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	1 เดือน	3 เดือน	6 เดือน
น้ำกลั่น	9.32 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	8.60 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	8.42 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	8.10 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	7.79 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	6.09 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>	-	-
10% ซูโครส	9.32 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	9.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	8.73 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	8.68 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	8.44 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	6.26 $\pm$ 0.19 <sup>e</sup>	- <sup>A</sup>	-
10% แล็กโตส	9.34 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	8.99 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	8.75 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	8.76 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>	8.65 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	7.80 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>	6.02 $\pm$ 0.16 <sup>f</sup>	3.10 $\pm$ 0.04 <sup>g</sup>
10% Skim milk	9.21 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	9.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	9.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.12 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	8.78 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	7.42 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	6.06 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
10% ข้าวกล้องงอก	9.81 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	9.41 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	9.19 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	8.90 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	nd <sup>B</sup>	7.61 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	5.14 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup>	nd
10% งาดำ	9.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	8.39 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	8.31 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	nd	7.76 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	6.58 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	nd
นมถั่วเหลือง	9.20 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	8.93 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	8.87 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	8.83 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	nd	8.77 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	7.33 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	nd

อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A : ไม่พบเชื้อที่มีชีวิตรอด

B : ไม่ได้ทำการทดลอง (not determined)

### 3.10 ผลการศึกษาสมบัติของเชื้อบีฟิโดแบคทีเรีย BF052 หลังจากกระบวนการผลิต

เนื่องจากโพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณที่พอเหมาะจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามกว่าที่แบคทีเรียโพรไบโอติกจะให้ประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้

นั้น เชื้อโพรไบโอติกต้องมีปริมาณที่มากเพียงพอตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการผลิต ต้องมีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์อาหารจนกว่าจะถึงมือผู้บริโภคหรือจนกว่าจะถึงวันหมดอายุ และเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วก็ต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่าง และเอนไซม์ต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารเริ่มตั้งแต่ที่ปาก กระเพาะอาหาร จนกระทั่งถึงที่ลำไส้ซึ่งเป็นอวัยวะที่เชื้อโพรไบโอติกจะทำการยึดเกาะเพื่อทำหน้าที่ส่งเสริมสุขภาพต่อผู้บริโภค (Ventura และคณะ, 2007) ดังนั้นเชื้อโพรไบโอติกที่นำมาใช้เพิ่มคุณค่าในผลิตภัณฑ์อาหารจึงควรที่จะมีสมบัติในการทนต่อสภาวะข้างต้นทั้งหมด เพื่อให้ยังคงเหลือไว้ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะให้ประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้ ในการทดลองนี้เชื้อโพรไบโอติก BF052 จะนำไปผ่านกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยเชื้อจะผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ 10% skim milk เป็นสารป้องกันความเย็น และเก็บผลิตภัณฑ์เซลล์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อ 1 % ลงไป 100 mL ของนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เก็บน้ำนมไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนำเชื้อมาผ่านสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติและความสามารถของเชื้อในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารและการยึดเกาะกับผนังลำไส้เปรียบเทียบกับเชื้อ BF052 ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการดังกล่าว

จากผลการทดลองพบว่าไม่ว่าจะผ่านกระบวนการผลิตหรือไม่ผ่านกระบวนการผลิต เชื้อ BF052 ก็ยังคงมีรูปแบบในการทนต่อสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3.8) โดยมีความสามารถในการทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ดี เริ่มต้นจากที่ปากที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ไลโซไซม์ และมี pH ค่อนข้างเป็นกลาง ตามด้วยสภาวะในกระเพาะอาหารที่มีส่วนผสมของเอนไซม์เพปซินที่มีค่าความเป็นกรดค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึง pH 2 ตามด้วยสภาวะจำลองในลำไส้เล็กที่มีเอนไซม์แพนกรีเอตินและ bile salt และยังมีการหมุนเหวี่ยงเชื้อที่ความเร็วรอบที่แตกต่างกัน เพื่อแสดงถึงว่าเชื้อต้องมีการเคลื่อนไหวจากอวัยวะหนึ่งสู่อวัยวะหนึ่ง จากการทดลองพบว่าเฉพาะสภาวะในกระเพาะอาหารที่ pH 2 เท่านั้นที่ทำให้เชื้อมีปริมาณการรอดชีวิตที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งสภาวะนี้เป็นสภาวะจำลองเมื่อเซลล์ต้องอยู่ในช่วงที่กระเพาะอาหารใกล้จะว่าง โดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงประมาณ 1 log CFU/mL ซึ่งความสามารถของเชื้อ *B. animalis* ในการทนต่อสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่แสดงว่าเชื้อ *B. animalis* สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *B. animalis* BB-12 (Souza และคณะ, 2015) และ *B. animalis* Bo (Madureira และคณะ, 2011) ต่างก็มีความสามารถในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่องได้ดีเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่า กระบวนการผลิต เช่น การทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง และกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อสมบัติความเป็นเชื้อโพรไบโอติกทั้งในแง่ของความสามารถในการทนต่อระบบทางเดินอาหาร และความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ ซึ่งเชื้อ BF052 ยังคงแสดงเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะที่ไม่แตกต่างกันทางนัยสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง และไม่ได้ผ่านกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Du Toit และคณะ (2013) ที่รายงานว่า การทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมีผลให้เชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus casei* Shirota, *B. animalis* BB-12 และ *B. animalis* IF20/1 มีอัตราการยึดเกาะกับ human colonic mucus ได้ต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้แห้ง ซึ่งการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในระหว่างช่วงของการทำ freezing หรือ การลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิดกลายเป็นไอ อาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างหรือเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ และเมื่อ

เซลล์ได้รับความเสียหายก็เป็นเหตุให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ได้ต่ำลง อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารปกป้องเซลล์ระหว่างการทำ freeze-drying และการใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำแห้งผลิตภัณฑ์อย่างเหมาะสมก็จะช่วยลดความเสียหายระหว่างการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งลงได้ (Du Toit และคณะ, 2013; Jankovic และคณะ, 2010)

อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้เป็นตัวกลางสำหรับขนส่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกไปยังผู้บริโภค ซึ่งอาหารที่ใช้นี้ก็ควรจะช่วยรักษาและส่งเสริมสมบัติความเป็นเชื้อโพรไบโอติกให้มีความคงตัวทั้งในผลิตภัณฑ์และจนกว่าจะถึงอวัยวะเป้าหมายที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะออกฤทธิ์เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และ โยเกิร์ต ถือว่าเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมที่ใช้ในการขนส่งเชื้อโพรไบโอติกไปยังผู้บริโภค ในการทดลองนี้หลังจากเชื้อผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตามด้วยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เซลล์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 1 เดือน เชื้อจะถูกถ่ายไปยังนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และเก็บน้ำนมไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จึงนำไปทดสอบความสามารถของเชื้อในการทนต่อสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารและทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ ผลการทดลองพบว่าเชื้อ BF052 ก็ยังคงแสดงคุณลักษณะดั้งเดิมของเชื้ออยู่ คือยังให้รูปแบบการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารเช่นเดิม และให้ผลการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้เป็นตัวกลางสำหรับขนส่งนั้นมีผลต่อการอยู่รอดและการแสดงลักษณะคุณสมบัติของเชื้อโพรไบโอติก โดย Kos และคณะ (2000) พบว่าเชื้อ *L. acidophilus* M92 สามารถทนต่อสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และทนต่อสภาวะที่มี bile salt ความเข้มข้นสูงได้ดีขึ้นเมื่อใช้โปรตีนเวย์เข้มข้น (whey protein concentrate) เป็นตัวกลางในการขนถ่ายเชื้อ Madureira และคณะ (2011) พบว่าเวย์ชีส (whey cheese matrices) ช่วยทำให้เชื้อ *L. casei*, *L. acidophilus* and *B. animalis* มีความสามารถในการทนต่อสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร MRS เป็นตัวกลาง นอกจากนี้ Saarela และคณะ (2006) ก็ยังได้ศึกษาพบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. lactis E2010 ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งและใช้นมพาสเจอร์ไรซ์เป็นสื่อในการขนส่งนั้น ช่วยให้เชื้อมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด และสภาวะที่มี bile salt ได้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ผลไม้ และการใช้สารละลาย PBS ดังนั้นในการเลือกผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อเป็นสื่อในการขนส่งเชื้อโพรไบโอติกนั้น นอกจากคุณค่าทางสารอาหารที่มีในส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารเองแล้วนั้น อาหารที่ใช้นี้ก็ควรจะช่วยลดผลกระทบต่ออายุรอดของเชื้อและกระทบต่อคุณสมบัติของเชื้อโพรไบโอติกน้อยที่สุด (Heller, 2001)

จากหลักการในการคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติเป็นเชื้อโพรไบโอติกนั้น เชื้อที่ดีควรจะต้องคงเอกลักษณ์และคุณลักษณะดั้งเดิมของสายพันธุ์จุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆไว้ สามารถอยู่รอดและยังคงไว้ซึ่งสมบัติความเป็นเชื้อโพรไบโอติกจนกว่าจะถึงอวัยวะเป้าหมายที่จุลินทรีย์จะออกฤทธิ์เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค (Sharma และคณะ, 2014) ซึ่งการนำเชื้อไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารนั้นเชื้อที่ดีก็ควรจะมีคุณลักษณะที่มีความคงตัวสูง และมีความคงตัวทางด้านพันธุกรรม จากทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้เชื้อ BF052 จะผ่านกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง ไม่ว่าจะการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้ง การอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อ BF052 ก็ยังให้รูปแบบการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารและมีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ผนังลำไส้ที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น เชื้อ

BF052 ที่มีความคงตัวที่ดีจึงน่าจะสามารถใช้เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและน่าจะเป็นประโยชน์ช่วยส่งเสริมสุขภาพต่อผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามก็ยังคงต้องมีการศึกษาและตรวจติดตามปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์จุลินทรีย์และเจ้าบ้านหรือผู้บริโภค (*in vivo* study) เพิ่มเติม เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ว่าเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพจริง

**ตารางที่ 3.8** การรอดชีวิตของเชื้อ BF052 (log CFU/mL  $\pm$  SD) เมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารจำลอง และร้อยละการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ Caco2 เมื่อผ่านการเตรียมเซลล์ที่แตกต่างกัน

Process	เชื้อเริ่มต้น	ระบบทางเดินอาหารจำลอง								ร้อยละการยึดเกาะ
		ปาก	หลอดอาหาร-กระเพาะอาหาร					ดูโอเดียม	ไอลีียม	
		2 นาที	pH 6 10 นาที	pH 5 10 นาที	pH 4 10 นาที	pH 3 30 นาที	pH 2 30 นาที	pH 5 30 นาที	pH 6.5 90 นาที	
BF052-Caco2	8.13 $\pm$ 0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	3.19% $\pm$ 0.11 <sup>A</sup>
BF052-GI test-Caco2	8.47 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	8.47 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	8.46 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	8.43 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	8.38 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	7.21 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	7.09 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	6.99 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	3.81% $\pm$ 0.32 <sup>A</sup>
BF052-FD-Caco2	8.13 $\pm$ 0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	3.08% $\pm$ 0.15 <sup>A</sup>
BF052 - FD-GI test-Caco2	8.34 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.23 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.32 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	8.29 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	8.27 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.19 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	7.01 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	6.85 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	6.77 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	3.45% $\pm$ 0.21 <sup>A</sup>
BF052-FD -milk-GI test-Caco2*	8.53 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.49 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	8.50 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	8.43 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.39 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	7.45 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	7.35 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	7.30 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	3.67% $\pm$ 0.50 <sup>A</sup>

<sup>a,b</sup> อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

<sup>A</sup> อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์ร้อยละการยึดเกาะ แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

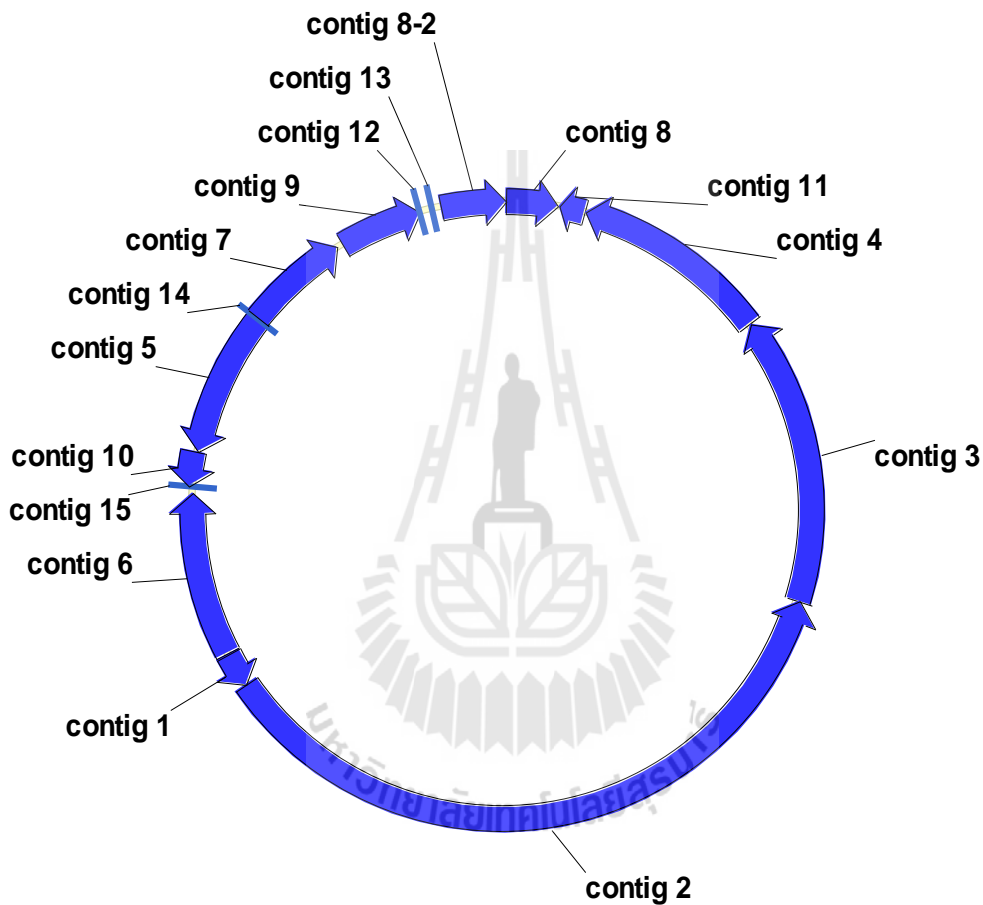
\* เชื้อ BF052 จะนำไปผ่านกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยเชื้อจะผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ 10% skim milk เป็นสารป้องกันความเย็น (FD) และเก็บผลิตภัณฑ์เซลล์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นจึงถ่ายเชื้อ 1% ลงไป 100 mL ของนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (milk) เก็บนมไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนำเชื้อมาผ่านสภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง (GI test) และดูร้อยละการยึดเกาะ (Caco-2) ตามลำดับ

### 3.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052

จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 ทำให้ได้สาย DNA จำนวน 15 Contigs และแต่ละ Contigs จะนำเข้าไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลจีโนมของ *B. animalis* ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อจัดเรียงลำดับและทิศทางของแต่ละสายเข้าด้วยกันดังแสดงในรูปที่ 3.8 และเมื่อทำการเติมช่องว่าง (gaps) ระหว่าง contigs จากการทำ



primer walking เรียบร้อยสมบูรณ์แล้ว จะทำให้ได้โครโมโซมที่มีลักษณะเป็นวงกลมซึ่งมีนิวคลีโอไทด์รวมทั้งหมด 1,938,624 bp และมีปริมาณเบส G และ C 60.48% จากนั้นจึงนำจีโนมของเชื้อไปทำ annotation เพื่อระบุตำแหน่งของยีนโดย NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>) พบว่า *B. animalis* BF052 ประกอบไปด้วย 1,603 ยีน ที่มี 1,536 coding genes, 12 rRNA operons และ 52 tRNAs และนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *B. animalis* BF052 ได้ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยมี accession number คือ CP009045



รูปที่ 3.8 การจัดเรียงลำดับและทิศทางของแต่ละ contigs

### 3.12 ผลการวิเคราะห์ยีนที่สำคัญของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052

การทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อโพรไบโอติก *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 ถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นสำคัญที่จะนำไปสู่การไขความลับเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเชื้อโพรไบโอติกในระดับโมเลกุล ช่วยให้สามารถทำนายปรากฏการณ์ทางพันธุกรรมหรือกลไกการปรับตัว หรือการตอบสนองของเชื้อเมื่อต้องอยู่ในสภาวะต่างๆ เป็นที่ทราบกันดีว่ากว่าเชื้อโพรไบโอติกจะเข้าสู่ร่างกายเพื่อส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้นั้น เชื้อโพรไบโอติกจะต้องมีความสามารถในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ (stress responses) เริ่มต้นตั้งแต่กระบวนการผลิต จนกว่าเชื้อจะเข้า

สร้างกายผ่านสภาวะต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร เพื่อจะก่อประโยชน์ต่อผู้บริโภคในที่สุด ดังนั้นการทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อก็จะช่วยบ่งชี้ให้รู้รายละเอียดของยีนทั้งหมดที่ปรากฏในจีโนมทำให้สามารถทำนายการแสดงออกของยีนทั้งหมดได้ ซึ่งจะเป็นหลักฐานสนับสนุนว่าเชื้อมีกลไกในการปรับตัวต่อสภาวะต่างๆ และสามารถส่งเสริมสุขภาพต่อผู้บริโภคได้จริง

ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมอาหาร ในบางกรณีนั้นเชื้อต้องผ่านสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการผลิต ในบางกรณีเชื้อต้องผ่านความร้อน เช่น การใช้ spray drying ในการผลิต บางกรณีเชื้อต้องผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งหรือ freeze drying เชื้อจึงต้องปรับตัวมีชีวิตรอดในสภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ ซึ่งอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไปที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการผลิตนี้ก็อาจจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบสำคัญภายในของจุลินทรีย์ โดยอาจส่งผลให้สายโพลีเปปไทด์หรือโปรตีนมีการม้วนพับที่ผิดปกติแบบไป (protein misfolding) และถ้าโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมมีรูปแบบหรือมีการฟอร์มตัวที่ผิดปกติไปจากปกติ เอนไซม์นั้นก็จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ เป็นเหตุให้จุลินทรีย์ถึงแก่ความตายได้ ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อก็จะมีกลไกในการควบคุมและแก้ไขโปรตีนที่มีการฟอร์มตัวที่ผิดปกติ (ในช่วงหลังการเกิด translation) ด้วยการทำงานของ chaperone protein หรือ heat shock protein (Hsp) ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยโปรตีนตัวอื่นในการม้วนพับตัวเพื่อให้ได้ฟอร์มที่ถูกต้อง De Dea Lindner และคณะ (2007) รายงานว่า Hsp100, ClpP, Hsp70, Hsp60, DnaJ, GrpE และ small Hsps เป็น chaperone protein ที่พบได้ในเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย จากการวิเคราะห์ยีนที่สามารถถอดรหัสพันธุกรรม (coding DNA sequence) ของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 พบว่ามี chaperone protein กลุ่ม GroEL (GU89\_03340) และ GroES (GU89\_00640, GU89\_01820) ที่ทำหน้าที่หลักในการช่วยเหลือในการม้วนพับตัวของสายโปรตีนที่เกิดการม้วนพับผิดปกติ และยังพบ chaperone protein DnaK (Hsps70) (GU89\_07865), DnaJ (GU89\_04255, GU89\_07855) และ GrpE (GU89\_07860) ที่ช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มของสายโพลีเปปไทด์และช่วยในการม้วนพับโปรตีนร่วมกับ chaperone protein ตัวอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบ caseinolytic proteases (Clp) (GU89\_03385, GU89\_05455, GU89\_05460) ที่มีความเกี่ยวข้องในการปรับตัวของเชื้อเมื่อต้องอยู่ในสภาวะทั้งที่อุณหภูมิสูงและต่ำ และ cold-shock proteins (Csp) (GU89\_03335, GU89\_03365) ที่ถือว่าเป็น freeze-protective protein ที่ช่วยให้เชื้อมีการปรับตัวเมื่อต้องอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำได้ ตีก็ยังพบได้ใน *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 อีกด้วย (Wouters et al., 2001) ซึ่งโปรตีนทั้งหลายเหล่านี้จะช่วยให้เชื้อมีกลไกการแก้ไขโปรตีนที่ผิดปกติเพื่อฟอร์มตัวให้ได้เป็นโปรตีนที่สมบูรณ์ แม้จะต้องอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเชื้อที่มีการปรับตัวได้ดีในสภาวะดังกล่าว ก็จะมีชีวิตรอดในกระบวนการผลิตในระบบอุตสาหกรรมที่มีอุณหภูมิเป็นตัวแปรในการผลิต นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเมื่อเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย ต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของตัวทำละลายมากหรืออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูง (osmotic stress) เชื้อจะปรับตัวโดยจะมีการแสดงออกของยีน chaperone protein เช่น dnaK, dnaJ, grpE และ clpB ในปริมาณที่สูงขึ้น (De Dea Lindner และคณะ, 2007) จึงมีความเป็นไปได้ว่า chaperone protein ก็น่าจะมีส่วนช่วยให้เชื้อมีการตอบสนองต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้อีกด้วย

เมื่อผ่านกระบวนการในการผลิตแล้ว แบคทีเรียโพรไบโอติกยังต้องสามารถมีชีวิตรอดในอาหารที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งเชื้อแบคทีเรียไปยังผู้บริโภค แบคทีเรียต้องมีปริมาณที่เพียงพอจนกว่าจะหมดอายุหรือจนกว่าจะถึงมือผู้บริโภค ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอาหารที่ใช้จะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกนมหมัก เช่น โยเกิร์ต หรือ นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ซึ่งมีค่า pH ค่อนข้างต่ำ และเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายแล้วก็ต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร ดังนั้นความสามารถของจุลินทรีย์ในการอยู่รอดทั้งในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีค่า pH ต่ำ และต่อสภาวะที่น้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูงจึงมีความสำคัญ เมื่อมีความจำเป็นต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง แบคทีเรียจะอาศัยการทำงานของ proton-translocating ATPase ( $F_1F_0$ -ATPase) เพื่อรักษาสมดุลที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างโปรตอนภายในและภายนอกเซลล์ (Ventura และคณะ, 2007) จากการวิเคราะห์ยีนของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 พบยีนที่ถอดรหัสได้เป็น  $F_1F_0$ -ATP synthase subunit ต่างๆ ที่ตำแหน่ง GU89\_07235, GU89\_07240, GU89\_0724, GU89\_07250, GU89\_07255, GU89\_07260 และ GU89\_07270 นอกจากนี้ยังพบ cystathionine beta-lyase (GU89\_02195) cystathionine gamma-synthase (GU89\_02865) และ cystathionine beta-synthase (GU89\_02870) ที่มีบทบาททำให้เชื้อสามารถทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงได้อีกด้วย (Sun และคณะ, 2015) จากการศึกษาจีโนมของ *B. dentium* Bd1 โดย Ventura และคณะ 2009 พบยีนสองยีนตำแหน่งใกล้เคียงกัน (BDP\_1749 and BDP\_1750) ที่ถอดรหัสได้เป็น glutamate decarboxylase (GadB) และ glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter (GadC) ซึ่งไม่พบใน บีฟิโดแบคทีเรีย สายพันธุ์อื่นเลย เมื่อ *B. dentium* Bd1 ต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรด พบว่ามีการแสดงออกของยีนทั้งสองเป็น 90 และ 51 เท่าตามลำดับ อย่างไรก็ตามกลับไปพบการแสดงออกของ  $F_1F_0$ -ATPase เลย จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้อาจจะมีกลไกตอบสนองต่อสภาวะที่เป็นกรดด้วยการย่อยสลายกรดแอมิโน (amino acid degradation) จึงเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีกลไกการตอบสนองต่อสภาวะเครียด เช่น สภาวะที่เป็นกรดที่แตกต่างกัน (Cronin และคณะ, 2011)

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ หรือไม่มีออกซิเจน ซึ่งในขั้นตอนของกระบวนการผลิตนั้นเชื้อต้องมีโอกาสที่จะสัมผัสกับออกซิเจนไม่มากนักน้อย เชื้อในกลุ่มนี้จึงจำเป็นต้องมีกลไกในการกำจัดออกซิเจน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเอนไซม์จำพวก NADH oxidase, NADH peroxidase และ superoxide dismutase (SOD) จะมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเพื่อกำจัด reactive oxygen species (ROS) ออกจากเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย กลับไม่พบยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ SOD เลย (SOD-related genes) (Lee และคณะ, 2010) แต่กลับพบยีนที่เป็นอนุพันธ์ของ NADH oxidase แทน เช่น copper oxidase (GU89\_01685) และเมื่อออกซิเจนทำปฏิกิริยากับ NADH ด้วยเอนไซม์ NADH oxidase จะทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ซึ่งสามารถสร้างความเสียหายต่อระบบต่างๆ ภายในเซลล์ได้ และเนื่องจาก บีฟิโดแบคทีเรีย ไม่มีเอนไซม์คะตะเลสทำให้เชื้อไม่สามารถเปลี่ยน  $H_2O_2$  ไปเป็นออกซิเจนและน้ำเพื่อลดความเป็นพิษภายในเซลล์ได้ เชื้อสายพันธุ์นี้จึงน่าจะมีความเสี่ยงต่อการสะสม  $H_2O_2$  แทน จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย พบยีนที่ทำงานในการลดการสะสม  $H_2O_2$  ได้แก่ peroxiredoxin ซึ่งสามารถพบได้ใน *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 (GU89\_02325) และ *B. animalis* สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *B. animalis* subsp. *lactis*

DSM 10140 และ *B. animalis* subsp. *lactis* BLC1 ซึ่งถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีที่สุด แต่ บิฟิโดแบคทีเรีย จีนีสอื่น ๆ เช่น *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* subsp. *longum* JDM301, *B. breve* DSM 20213 และ *B. bifidum* ATCC 29521 กลับไม่พบ peroxiredoxin ยีนเลย และการทำงานของ thioredoxin reductase ก็สามารถเปลี่ยน  $H_2O_2$  ให้เป็นน้ำได้เช่นกัน ซึ่งระบบการกำจัด  $H_2O_2$  ด้วย thioredoxin และ NADH นี้พบได้ทั่วไปในเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย และใน *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 พบได้ที่ตำแหน่ง GU89\_04390 และ GU89\_08190 นอกจากนี้ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 ยังมียีน nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (MutT) (GU89\_01035, GU89\_02925, GU89\_04420) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการกำจัดออกซิเจนอีกด้วย (Lee และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตามกลับไม่พบยีน MutT ในเชื้อ *B. breve* DSM 20213 และ *B. bifidum* ATCC 29521

โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียโพรไบโอติกจะอาศัยร่วมกับเจ้าบ้าน (host) หรือกับผู้บริโภครูปแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) เชื้อโพรไบโอติกจะได้รับสารอาหารจากเจ้าบ้านที่อาศัยอยู่ โดยจะย่อยสลายสารอาหารในส่วนที่ร่างกายไม่สามารถดูดซึมได้ และเจ้าบ้านก็จะได้ประโยชน์จากการอาศัยของโพรไบโอติกภายในลำไส้ โดยเชื่อจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ แบคทีเรียโอซิน หรือสารชนิดอื่นๆ และนอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมต่อสุขภาพในด้านอื่นๆ เช่น ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยกระตุ้นหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยป้องกันการติดเชื้อ ลดปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง จึงถือว่าเป็นการอาศัยผลประโยชน์ซึ่งกันและกัน อาหารที่สามารถใช้ได้โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกจึงต้องเป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน และถูกใช้โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ (Russell และคณะ, 2011; Van den Broek และคณะ, 2008; Ventura และคณะ 2007) ซึ่งเราเรียกสารอาหารเหล่านี้ว่า โพรไบโอติก ซึ่งโพรไบโอติกที่พบได้ในธรรมชาติ ได้แก่ Fructo-oligosaccharides หรือ FOS พบได้ในผักทั่วไป เช่น หัวหอม หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วฝักยาว กระเทียมต้นหอม ชิโครี (chicory) ถั่ว เป็นต้น มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น  $(\beta\text{-D-FruF-(2}\rightarrow\text{1)})_n\text{-D-FruF}$  ซึ่งไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในร่างกายของมนุษย์ ส่วนอินูลิน (inulin) ก็จัดว่าเป็น oligofructose เช่นกันแต่เป็นพอลิเมอร์ที่มีสายยาวกว่า เชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย จะใช้เอนไซม์  $\beta\text{-fructofuranosidase}$  ในการย่อย FOS ที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง  $\beta\text{-2,1}$  ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาล กลูโคส-ฟรักโทส และ/หรือ ฟรักโทส-ฟรักโทส ซึ่งเอนไซม์นี้พบได้ใน *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. breve*, และ *B. longum* subsp. *infantis* (Van den Broek และคณะ, 2008) และใน *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 (GU89\_06305) เช่นเดียวกัน ผลจากการย่อยสารอาหารเหล่านี้จะทำให้ได้สารบางชนิดที่เป็นประโยชน์ ที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) และยังทำให้ค่า pH ในลำไส้ลดลงจึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดได้ (Russell และคณะ, 2011) ดังนั้นความสามารถในการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกจึงมีความสำคัญเพราะจะทำให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ในร่างกายต่อไปเพื่อส่งเสริมประโยชน์ต่อผู้บริโภครูปแบบที่ 3.9 แสดงถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับใช้คาร์โบไฮเดรตและตำแหน่งของยีนที่ปรากฏอยู่บนจีโนมในฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ *B. animalis* BF052 และเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย สายพันธุ์อื่นๆ

ตารางที่ 3.9 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับใช้คาร์โบไฮเดรตและตำแหน่งของยีนที่ปรากฏอยู่บนจีโนมในฐานข้อมูล NCBI ของเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย สายพันธุ์ต่าง

เอนไซม์	สารตั้งต้น หรือ กิจกรรมของ เอนไซม์	Locus tag							
		<i>B. animalis</i> subsp. lactis strain BF052	<i>B. animalis</i> subsp. lactis BB-12	<i>B. animalis</i> subsp. lactis DSM 10140	<i>B. animalis</i> subsp. lactis BLC1	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	<i>B. longum</i> subsp. longum JDM301	<i>B. breve</i> DSM 20213	<i>B. bifidum</i> ATCC 29521
$\beta$ -fructofuranosidase	Fructo-oligosaccharide	GU89_06305	BIF_01865	Balat_1241	BLC1_1203	BAD_1325 BAD_1150	-	BBBR_1379	-
$\beta$ -galactosidase	Lactose	GU89_00270	BIF_01474	Balat_0053	BLC1_0047	BAD_0435	BLJ_0417	BBBR_0011	BBBF_0159
		GU89_01365	BIF_01526	Balat_0268	BLC1_0258	BAD_1211	BLJ_0519	BBBR_0363	BBBF_0172
		GU89_02430	BIF_00647	Balat_0484	BLC1_0464	BAD_1401	BLJ_1919	BBBR_0453	BBBF_0474
		GU89_02460	BIF_00909			BAD_1402	BLJ_1934	BBBR_1549	BBBF_1344
		GU89_02470	BIF_00799			BAD_1582 BAD_1603 BAD_1605			BBBF_1456
$\alpha$ -galactosidase	melibiose raffinose stachyose	GU89_07770	BIF_01624	Balat_1537	BLC1_1483	BAD_1525	BLJ_1911	BBBR_1868	BBBF_1801
		GU89_08055	BIF_00525	Balat_1596	BLC1_1543	BAD_1528	BLJ_1990		
		GU89_08080		Balat_1601		BAD_1576			
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	arabinan, arabinogalactan arabinoxylan	GU89_00330	BIF_00092	Balat_0065	BLC1_0058	BAD_0152	BLJ_0521	-	BBBF_0019
		GU89_02610	BIF_01649 BIF_00405	Balat_0512	BLC1_0488	BAD_0423 BAD_1524	BLJ_0550 BLJ_1719 BLJ_1910		
pullulanase	starch, amylopectin, pullulan	GU89_04680 GU89_04685 GU89_07890	BIF_01617 BIF_00181 BIF_02253	Balat_0924	BLC1_0884 BLC1_1506	BAD_0708	-	-	-
amylopullulanase	starch, amylopectin, pullulan	GU89_04675	-	-	-	-	-	BBBR_0107	-
xylose isomerase	D-xylose $\rightleftharpoons$ D-xylulose	GU89_02605	BIF_00501	Balat_0511	BLC1_0487	BAD_0422	BLJ_1607	-	-
arabinose isomerase	D-arabinose $\rightleftharpoons$ D-ribulose	GU89_00345	BIF_01646	Balat_0068	BLC1_0061	BAD_1410	BLJ_0403	-	-

$\beta$ -Galacto-oligosaccharides ก็จัดเป็นพรีไบโอติกอีกชนิดหนึ่ง เป็น oligosaccharides ที่มีน้ำตาลกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบพบได้ในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์  $\beta$ -galactosidases เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในเชื้อบีฟิโดแบคทีเรีย ใน *B. animalis* subsp. lactis BF052 พบยีนที่ถอดรหัสได้เอนไซม์  $\beta$ -galactosidases จำนวน 5 ตำแหน่ง (GU89\_00270, GU89\_01365, GU89\_02430, GU89\_02460 และ GU89\_02470) Goulas และคณะ (2009) รายงานว่าเชื้อ *B. bifidum* NCIMB41171 มีการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -galactosidases ที่มีกิจกรรมแตกต่างกัน 4 แบบ (ทั้ง hydrolytic และ transglycosylic activities) ได้แก่  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) galactobiose,  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) galactobiose,  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) galactosyllactose และ N-acetyllactosamine และยังมีพรีไบโอติกจำพวก  $\alpha$ -Galacto-oligosaccharides ที่สามารถพบได้

ทั่วไปในน้ำนมถั่วเหลือง โดยจะมีน้ำตาลแรฟฟิโนส (ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 โมเลกุล คือ ฟรักโทส กลูโคส และกาแล็กโทส) และน้ำตาลสแตคิโอส (ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 4 โมเลกุล คือ กาแล็กโทส 2 โมเลกุล กลูโคส 1 โมเลกุล และฟรักโทส 1 โมเลกุล) น้ำตาลเหล่านี้สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์  $\alpha$ -galactosidase เอนไซม์นี้สามารถพบได้ทั่วไปในเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 พบยีนที่ถอดรหัสได้เอนไซม์  $\beta$ -galactosidases จำนวน 3 ตำแหน่ง (GU89\_07770, GU89\_08055, GU89\_08080)

นอกจากนี้ยังมีคาร์โบไฮเดรตในกลุ่ม arabinan, arabinogalactan และ arabinoxylan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช สามารถย่อยได้ด้วย  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ซึ่งเอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในเชื้อ บีฟิโดแบคทีเรีย แต่ไม่พบใน *B. breve* (Van den Broek และคณะ, 2008) และยังมีสารจำพวก pullulan ซึ่งเป็นสตาร์ชที่ผลิตขึ้นจากรา *Aureobasidium pullulans* ในโมเลกุลของ pullulan จะประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคส 3 โมเลกุล เชื่อมด้วยพันธะไกลโคไซด์  $\alpha$ -(1,4) (เรียกว่า maltotriose) และในแต่ละหน่วยของ maltotriose เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1,6) เอนไซม์ที่สามารถย่อย pullulan แบ่งออกได้เป็น 2 จำพวก คือ 1) Pullulanases type I จะย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์  $\alpha$ -(1,6) ใน pullulan และ amylopectin พบได้ใน *B. animalis* subsp. *lactis* และใน *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 (GU89\_04680, GU89\_04685 และ GU89\_07890) แต่ไม่พบใน *B. longum*, *B. breve* และ *B. bifidum* 2) Pullulanases type II หรือที่เรียกว่า amylopullulanases เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมการย่อยสตาร์ชเพราะสามารถย่อยได้ทั้งพันธะได้ทั้ง  $\alpha$ -(1,6) และ  $\alpha$ -(1,4) ซึ่ง Ryan และคณะ 2006 รายงานว่าเฉพาะ *B. breve* เท่านั้นที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ amylopullulanase จากการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ที่ปรากฏอยู่บนฐานข้อมูล NCBI เฉพาะ *B. animalis* subsp. *lactis* AD011, *B. animalis* RH และ *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 (GU89\_04675) เท่านั้นที่พบยีน amylopullulanase

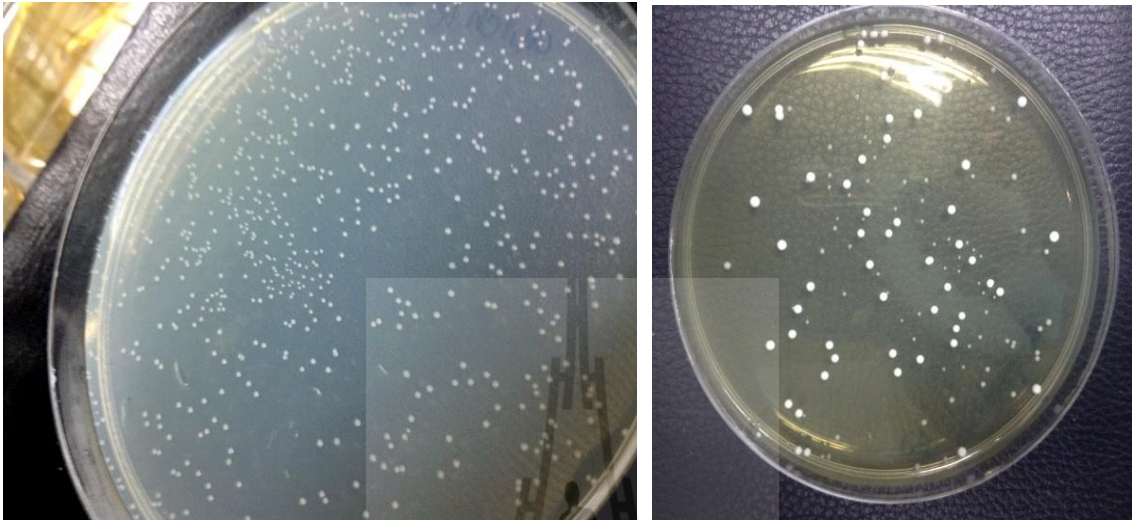
จากข้อมูลดังกล่าวช่วยบ่งชี้ได้ว่าการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมนั้นเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพราะช่วยให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของยีนทั้งระบบ ช่วยให้เข้าใจกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ได้มากขึ้น และสามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาประยุกต์ใช้และสนับสนุนกับผลการศึกษาในห้องทดลองว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้นั้นมีประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้มากน้อยเพียงใดด้วยเหตุผลใด เพราะในการจะนำจุลินทรีย์ไปโอดีทมาใช้จริงกับผู้บริโภคได้นั้นก็ควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์เป็นอย่างดี เพื่อความปลอดภัยและได้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพอย่างสูงสุด

### 3.13 ผลการใช้ *B. animalis* BF052 เป็นหัวเชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลือง

#### 3.13.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อระหว่างการหมักน้ำนมถั่วเหลือง

การวัดการเจริญของเชื้อในการทดลองนี้ทำได้โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดบนอาหารแข็ง โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ปรากฏบนอาหารแข็งแสดงในรูปที่ 3.9 และรูปแบบการเจริญของเชื้อในนมถั่วเหลืองระหว่างการหมักที่ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 3.10 โดยพบว่า *S.*

*thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 สามารถใช้สารอาหารในน้ำนมถั่วเหลืองเพื่อการเจริญของเชื้อได้ โดย *S. thermophilus* มีความสามารถในการเจริญในน้ำนมถั่วเหลืองได้ดีที่สุดในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และมีปริมาณเชื้อสูงที่สุดตลอดระยะเวลาการหมัก ในขณะที่ *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ลดลงหลังสิ้นสุดการหมักที่ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. thermophilus* บนอาหาร ST agar (รูปซ้ายมือ) และลักษณะโคโลนีของเชื้อ *L. bulgaricus* (โคโลนีใหญ่สีขาวนม) และ *B. animalis* BF052 (โคโลนีเล็กสีขาวขุ่น) บนอาหาร MRSc agar (รูปขวามือ)

Champagne และคณะ (2009) รายงานว่าเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย จะมีอัตราการเจริญที่ลดลงเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. thermophilus* แต่จากการทดลองนี้กลับไม่พบความแตกต่าง ( $p > 0.05$ ) ของปริมาณเชื้อ *B. animalis* BF052 ระหว่างการหมักด้วยหนึ่งสายพันธุ์หรือเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. thermophilus* นอกจากนี้ Wang และคณะ (2002) ยังทำการศึกษาพบว่าหลังจากการหมักนมถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *B. infantis* ที่เลี้ยงร่วมกับ *L. bulgaricus* จะมีชีวิตรอดสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหมักด้วย บิฟิโดแบคทีเรีย เพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่ง Farnworth และคณะ (2007) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่าสารอาหารที่ปล่อยออกมาจากแบคทีเรียชนิดอื่นที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย เช่น กรดแอมิโน สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. animalis* BF052 ร่วมกับ *L. bulgaricus* เชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย จะมีการเจริญหรือมีปริมาณเซลล์ที่สูงกว่า ( $p \leq 0.05$ ) การหมักด้วยสายพันธุ์เดียวตั้งแต่ 24 ชั่วโมงจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก อย่างไรก็ตาม เชื้อ *L. bulgaricus* กลับมีอัตราการเจริญที่ให้ผลตรงกันข้าม เพราะหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมงเชื้อกลับมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดลดลง ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหมักด้วย *L. bulgaricus* เพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่งผลการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2002) ที่พบว่าปริมาณเชื้อ *L. bulgaricus* จะลดลงอย่างชัดเจนภายหลังการหมักเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ในกรณีที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *B. longum* หรือ *B. infantis* ซึ่งอัตราการเจริญที่ลดลงนี้อาจเป็นผลมาจากกรดแอซิดิกที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย

ตารางที่ 3.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (log CFU/mL) ในน้ำนมถั่วเหลืองระหว่างการหมัก 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48
1.ST	5.54±0.06 <sup>a</sup>	9.72±0.06 <sup>c</sup>	10.03±0.13 <sup>abc</sup>	11.93±0.31 <sup>c</sup>	12.19±0.09 <sup>e</sup>
2.LB	5.56±0.01 <sup>a</sup>	8.60±0.26 <sup>a</sup>	9.78±0.06 <sup>abc</sup>	10.45±0.33 <sup>b</sup>	9.94±0.34 <sup>ab</sup>
3. BF052	5.67±0.45 <sup>a</sup>	8.55±0.16 <sup>a</sup>	9.56±0.22 <sup>ab</sup>	10.14±0.60 <sup>ab</sup>	9.99±0.89 <sup>ab</sup>
4.ST+ 52					
ST	5.46±0.21 <sup>a</sup>	10.36±0.53 <sup>d</sup>	10.73±0.17 <sup>cd</sup>	10.58±0.25 <sup>b</sup>	10.34±0.24 <sup>abc</sup>
BF052	5.67±0.07 <sup>a</sup>	8.69±0.27 <sup>a</sup>	9.47±0.38 <sup>ab</sup>	9.79±0.28 <sup>ab</sup>	10.41±0.03 <sup>abc</sup>
5.LB+52					
LB	6.10±0.66 <sup>a</sup>	8.74±0.14 <sup>a</sup>	9.19±0.03 <sup>a</sup>	9.39±0.08 <sup>a</sup>	9.59±0.03 <sup>ab</sup>
BF052	6.08±0.33 <sup>a</sup>	8.87±0.09 <sup>ab</sup>	10.04±1.11 <sup>abc</sup>	10.57±0.48 <sup>b</sup>	10.69±0.20 <sup>bcd</sup>
6.ST+LB					
ST	5.43±0.09 <sup>a</sup>	11.54±0.02 <sup>f</sup>	11.83±0.51 <sup>e</sup>	11.53±0.15 <sup>c</sup>	11.35±0.56 <sup>cde</sup>
LB	5.42±0.10 <sup>a</sup>	9.30±0.21 <sup>bc</sup>	9.57±0.36 <sup>ab</sup>	9.36±0.12 <sup>a</sup>	9.50±0.04 <sup>a</sup>
7.ST+LB+52					
ST	5.56±0.05 <sup>a</sup>	10.91±0.09 <sup>e</sup>	11.26±0.06 <sup>de</sup>	11.53±0.19 <sup>c</sup>	11.55±0.28 <sup>de</sup>
LB	6.12±0.62 <sup>a</sup>	9.44±0.02 <sup>c</sup>	9.93±0.55 <sup>abc</sup>	10.10±0.52 <sup>ab</sup>	10.16±0.58 <sup>ab</sup>
BF052	6.12±0.78 <sup>a</sup>	9.56±0.02 <sup>c</sup>	10.42±0.38 <sup>bcd</sup>	10.34±0.31 <sup>b</sup>	11.31±0.82 <sup>cde</sup>

- ST: *S. thermophilus*, LB: *L. bulgaricus*, BF052: *B. animalis* BF052

- อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

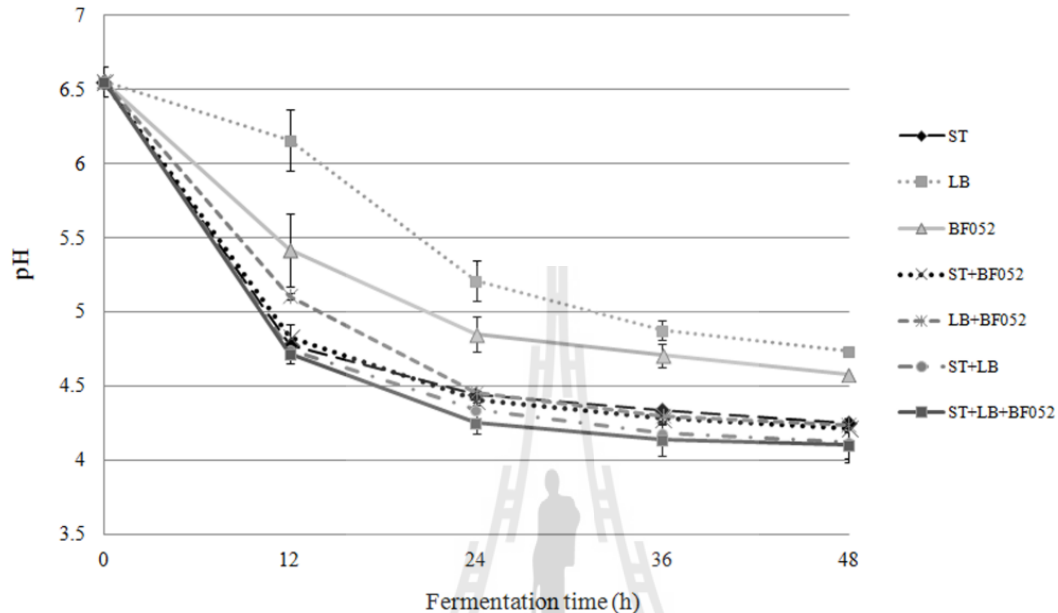
( $p \leq 0.05$ ) ณ ช่วงเวลาต่างๆของการหมัก

ในการผลิตนมหมัก (fermented milk) เชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* จะมีการเจริญที่ช่วยส่งเสริมซึ่งกันและกัน โดย *S. thermophilus* จะเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสในน้ำนมให้เป็นกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแล็กติก และกรดฟอร์มิก ทำให้ค่า pH ลดลง จึงช่วยส่งเสริมการเจริญของ *L. bulgaricus* และเชื้อ *L. bulgaricus* จะช่วยย่อยโปรตีนในน้ำนมให้ได้กรดแอมิโน เช่น ฮีสทีดีน ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการเจริญของ *S. thermophilus* นอกจากนี้ *L. bulgaricus* ยังสามารถเปลี่ยนกรดแล็กติกเป็นแอซีทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในโยเกิร์ต และนอกจากเชื้อทั้งสองชนิดจะมีการเจริญที่ส่งเสริมกันและกันในน้ำนมแล้ว Farnworth และคณะ (2007) ยังพบปฏิสัมพันธ์เช่นนี้ในนมถั่วเหลืองด้วย ซึ่งก็สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* ร่วมกันในนมถั่วเหลือง เชื้อทั้งสองชนิดมีการเจริญที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหมักเพียงสายพันธุ์เดียว โดยวัดจากจำนวนเซลล์ที่มีปริมาณมากขึ้นในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกับเชื้อ บิฟิโดแบคทีเรีย พบว่าปริมาณเชื้อ *B. animalis* BF052 ก็มีปริมาณที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ( $p \leq 0.05$ ) โดยทั้งเชื้อ *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 มีช่วงการเจริญที่ยาวขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากขึ้นประมาณ 1 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับหมักเพียงสายพันธุ์เดียว แต่



ในทางตรงกันข้ามจำนวนเซลล์ที่มีรอดของเชื้อ *S. thermophilus* กลับมีแนวโน้มลดลงหลังผ่านการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ในน้ำนมถั่วเหลืองมีปริมาณที่สูงขึ้น

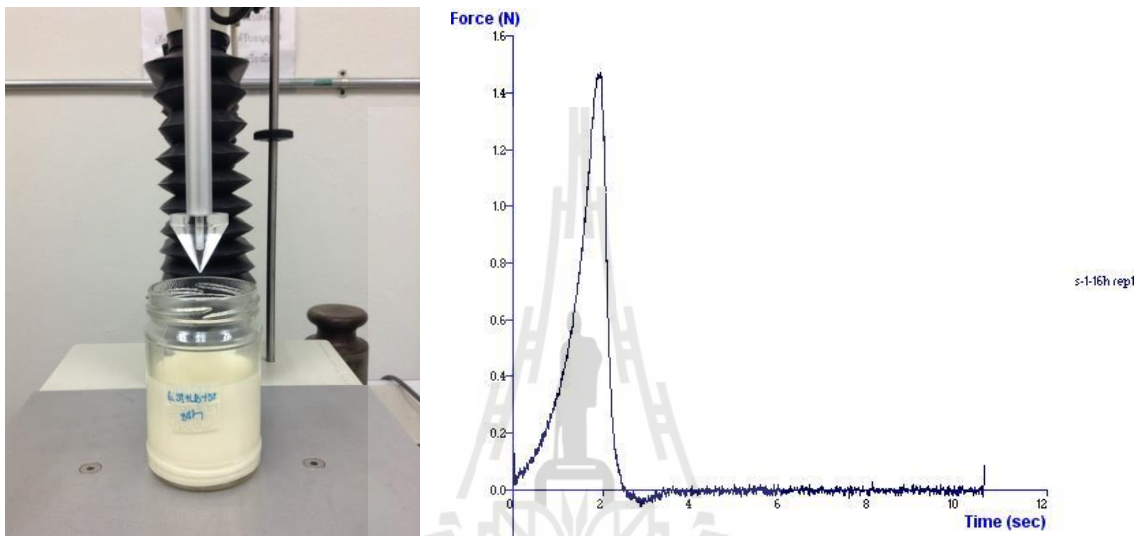
### 3.13.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH และเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองระหว่างการหมัก



รูปที่ 3.10 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ระหว่างการหมักน้ำนมถั่วเหลือง

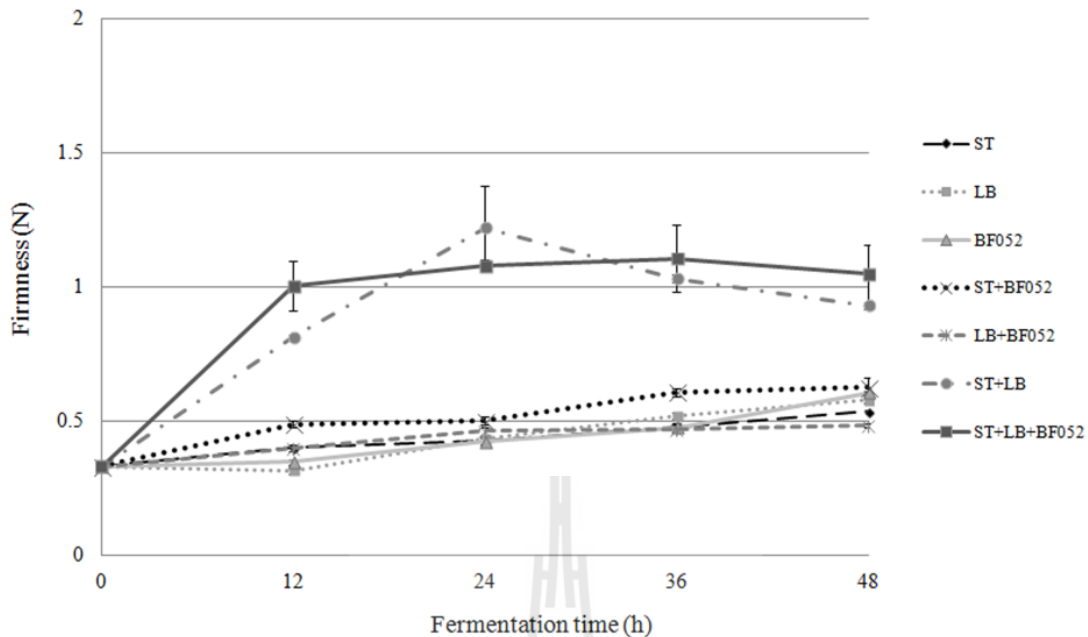
การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในนมถั่วเหลืองระหว่างการหมักที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงแสดงดังรูปที่ 3.10 pH เริ่มต้นของนมถั่วเหลืองมีค่า  $6.55 \pm 0.10$  และหลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่านมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อทั้งสามชนิดร่วมกันมีค่า pH ต่ำที่สุด คือ  $4.71 \pm 0.06$  ตามด้วยนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* ( $4.74 \pm 0.04$ ) และ *S. thermophilus* ( $4.77 \pm 0.08$ ) ตามลำดับ และที่ 12 ชั่วโมง *L. bulgaricus* ให้ค่าความเป็นกรด-เบสสูงที่สุด คือ  $6.15 \pm 0.20$  ซึ่งค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปนี้มีสาเหตุหลักมาจากการเปลี่ยนน้ำตาลในนมถั่วเหลืองได้เป็นกรดอินทรีย์ทำให้ค่า pH มีค่าต่ำลง ซึ่งน้ำตาลที่พบในได้ทั่วไปในนมถั่วเหลือง คือ น้ำตาลไดแซคคาไรด์ เช่น ซูโครส และน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น น้ำตาลแรฟฟิโนส (ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 โมเลกุล คือ ฟรักโทส กลูโคส และกาแล็กโทส) และน้ำตาลสแตคิโอไอส (ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 4 โมเลกุล คือ กาแล็กโทส 2 โมเลกุล กลูโคส 1 โมเลกุล และฟรักโทส 1 โมเลกุล) ผลจากการใช้น้ำตาลเหล่านี้ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในนมถั่วเหลือง เช่น กรดแล็กติก และ/หรือ กรดแอสซิติก มีปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลให้ pH มีค่าต่ำลง (Wang และคณะ, 2003) ณ เวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก Wang และคณะ (2002) พบว่า pH ของนมถั่วเหลืองจากการหมักของเชื้อ *S. thermophilus* มีค่า  $4.56 \pm 0.12$  เมื่อเปรียบเทียบกับหมักด้วย *L. acidophilus* คือ  $6.45 \pm 0.03$  หรือหมักร่วมกันของ *S. thermophilus* และ *B. infantis* ( $4.45 \pm 0.12$ ) และ *L. acidophilus* และ *B. infantis* ( $5.98 \pm 0.02$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่าที่ 24 ชั่วโมง นมถั่วเหลืองมีการเปลี่ยนแปลง pH เป็น *S. thermophilus* ( $4.44 \pm 0.01$ ), *L. bulgaricus* ( $5.20 \pm 0.13$ )

และการหมักร่วมของ *S. thermophilus* และ *B. animalis* BF052 ( $4.44 \pm 0.03$ ) และ *L. bulgaricus* กับ *B. animalis* BF052 ( $4.45 \pm 0.01$ ) ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า *S. thermophilus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาททำให้ pH ของนมถั่วเหลืองลดลงมากที่สุด ซึ่งโดยปกติทั่วไปของการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักนั้น จะทำการหยุดการหมักเมื่อนมมีค่า pH ประมาณ 4.5 ดังนั้นการหมักผลิตภัณฑ์นมด้วยเชื้อ *S. thermophilus* จึงช่วยลดระยะเวลาในการหมักลงได้ (Mani-López และคณะ 2014) จากผลการทดลองนี้ในกรณีที่มีเชื้อ *S. thermophilus* ต้องใช้เวลา 12-24 ชั่วโมง เพื่อให้ pH ของนมถั่วเหลืองลดเหลือประมาณ 4.5 และการหมักร่วมกันของเชื้อทั้งสามชนิด คือ *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 ให้ค่า pH ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรหมักด้วยเชื้อแบบอื่นๆ



รูปที่ 3.11 การวัดเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองด้วยเครื่อง texture analyzer (รูปซ้ายมือ) และลักษณะกราฟที่เกิดขึ้นหลังจากการวัด (รูปขวามือ)

การวัดเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่หมักโดยเชื้อแต่ละชนิด ณ ช่วงเวลาต่างๆ ด้วยเครื่อง texture analyzer นั้น จะทำให้ได้ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) จากพื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าบวกอันเกิดจากแรงที่กระทำต่อเนื้อสัมผัส (Newton, N) ต่อเวลา (s) ดังแสดงในรูปที่ 3.11 และจากผลการทดลอง (รูปที่ 3.12) พบว่าที่ชั่วโมงที่ 12 และ 48 นมถั่วเหลืองที่หมักร่วมกันของเชื้อ *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 ให้ค่า Firmness ( $1.00 \pm 0.09$  N ที่ 12 ชั่วโมง และ  $1.04 \pm 0.11$  N ที่ 48 ชั่วโมง) สูงกว่าการหมักด้วยเชื้อชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และช่วง 24 และ 36 ชั่วโมง การหมักร่วมกันของ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* และการหมักร่วมกันด้วยเชื้อทั้ง 3 ชนิดให้ค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่การหมักด้วยเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวหรือด้วยเชื้อแบบอื่นๆ จะให้ค่าความแน่นเนื้ออยู่ในช่วง 0.31 – 0.62 N จากผลการทดลองช่วยบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* มีบทบาทในการทำให้โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองมีเนื้อสัมผัสที่หนาแน่นคงตัวมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าความแน่นเนื้อตลอดช่วงระยะเวลาการหมักตั้งแต่ 12-48 ชั่วโมง พบว่าเฉพาะการหมักด้วยเชื้อทั้ง 3 ชนิดร่วมกันเท่านั้นที่ให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติตลอดระยะเวลาการหมัก ( $p > 0.05$ ) แสดงว่าการหมักร่วมกันของเชื้อทั้ง 3 ให้ความคงตัวของเนื้อสัมผัสโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองได้ดีที่สุด



รูปที่ 3.12 การเปลี่ยนแปลงของค่าความแน่นเนื้อ (Firmness) ระหว่างการหมักนํ้านมถั่วเหลือง

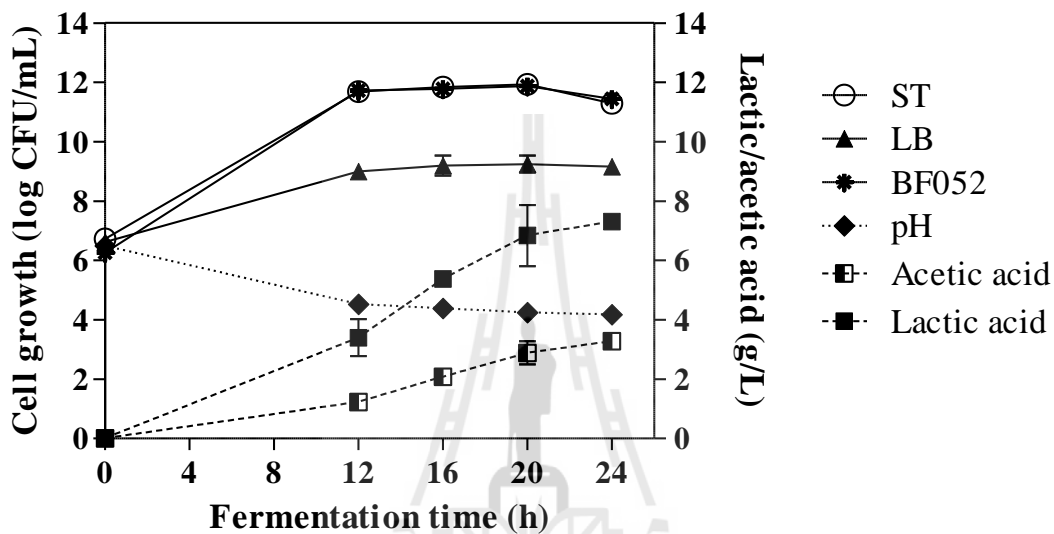
Jianming และคณะ (2013) รายงานว่าค่าความเป็นกรด-เบสจะมีผลต่อการละลายของโปรตีนในนํ้านมถั่วเหลือง โดยถ้าค่า pH สูงหรือต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) จะทำให้โมเลกุลของโปรตีนละลายในนํ้าได้ดี แต่เมื่อนมถั่วเหลืองมีค่า pH เท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริก ซึ่งเป็นค่า pH ที่โปรตีนมีประจุบวกและประจุลบเท่ากัน โมเลกุลของโปรตีนจะดึงดูดกัน และแขวนลอยในนํ้าได้น้อย ทำให้โปรตีนตกตะกอนออกมาในที่สุด ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่ในถั่วเหลืองเป็นโปรตีนโกลบูลิน (globulin) โดยมีปริมาณร้อยละ 50-90 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด โปรตีนโกลบูลินไม่ละลายที่จุดไอโซอิเล็กทริกมีค่า pH 4.2-4.6 ดังนั้นเมื่อค่า pH ลงถึงค่านี้นี้จะให้นํ้านมถั่วเหลืองเปลี่ยนสภาพเป็นร่างแหเจลที่อุ่มนํ้าเอาไว้ในโครงสร้างหรือที่เรียกว่าเคิร์ด (curd) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในนํ้านมถั่วเหลืองโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ให้นํ้านมถั่วเหลืองเปลี่ยนโครงสร้างจนมีลักษณะเป็นเนื้อโยเกิร์ต นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักถั่วเหลืองก็มีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตมีลักษณะที่ความแน่นเนื้อแตกต่างกันไป (Ghosh และคณะ, 2013 และ Shobharani และคณะ, 2015) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการหมักร่วมกันของเชื้อ *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *B. animalis* BF052 ในช่วงการหมักระหว่าง 12 ถึง 24 ชั่วโมงให้ค่า pH อยู่ในช่วง  $4.71 \pm 0.06$  ถึง  $4.25 \pm 0.07$  ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ค่า pH ใกล้เคียงกับจุดไอโซอิเล็กทริก และให้ค่าความแน่นเนื้อที่ทำให้เนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตมีความคงตัวที่อยู่ในช่วง  $1.00 \pm 0.09$  N ถึง  $1.08 \pm 0.02$  N นอกจากนี้ในช่วง 12 ถึง 24 ชั่วโมง เชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* ในกรณีนี้ที่หมักร่วมกับ *B. animalis* BF052 ยังมีปริมาณเชื้อมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหมักเพียงสายพันธุ์เดียว ดังนั้นนมถั่วเหลืองที่เกิดจากการหมักร่วมกันของเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ในช่วงเวลาการหมัก 12 ถึง 24 ชั่วโมง จะถูกนำไปประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ด้วยการทดสอบทางประสาทสัมผัสในการทดลองต่อไป

### 3.13.3 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลือง

โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักร่วมกันของเชื้อ *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *B. animalis* เป็นระยะเวลา 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง จะนำมาประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์โดยการทดสอบความชอบด้วยการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale จากผู้บริโภครวม 30 คน ผลแสดงในตารางที่ 3.11 โดยพบว่าผลการหมักที่เวลา 12 และ 16 ชั่วโมงมีค่าประเมินความชอบในทุกลักษณะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) โดยที่ชั่วโมงที่ 16 ให้ค่าการประเมินในด้านลักษณะที่ปรากฏ รสชาติ และการยอมรับโดยรวมสูงที่สุด ในขณะที่ 12 ชั่วโมงให้ค่าการประเมินในเรื่องของกลิ่น และเนื้อสัมผัสสูงสุด เมื่อพิจารณาแต่ละลักษณะ ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ (appearance; สังเกตจากลักษณะภายนอกที่เห็นด้วยตา) พบว่าที่ชั่วโมงที่ 12, 16 และ 20 ให้ค่าการประเมินความชอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) โดยชั่วโมงที่ 16 และ 24 ได้ค่าการประเมินสูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบกลิ่น (Odor; กลิ่นที่สัมผัสได้จากการใช้จมูกสูดดม) ค่ะแนจะค่อยๆ ลดลงเมื่อทำการหมักในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ที่มีปริมาณสูงขึ้นระหว่างการหมัก ส่งผลให้โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองมีกลิ่นรสที่เปรี้ยวมากขึ้นตามลำดับ ส่วนเนื้อสัมผัส (texture; เนื้อสัมผัสจากการใช้ช้อนสัมผัสกับเนื้อโยเกิร์ตและเนื้อสัมผัสจากการใช้ลิ้นสัมผัส) รสชาติและการยอมรับ พบว่าชั่วโมงที่ 12 และ 16 มีค่าการประเมินความชอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

จากผลการทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัสมาจะเห็นได้ว่า ระยะเวลาการหมักที่สูงขึ้น โดยเฉพาะตั้งแต่ 20 ชั่วโมงเป็นต้นไป ค่าการประเมินความชอบจะค่อยๆ ลดต่ำลงตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักที่ชั่วโมงต่าง ๆ นั้น (รูปที่ 3.13) พบว่าเชื้อ *S. thermophilus* และ *B. animalis* BF052 มีการเจริญในน้ำนมถั่วเหลืองได้ดีไม่แตกต่างกัน ขณะที่ *L. bulgaricus* มีความสามารถในการเจริญในน้ำนมถั่วเหลืองได้ต่ำกว่า และระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นก็ทำให้ pH มีค่าต่ำลง โดยชั่วโมงที่ 0, 12, 16, 20 และ 24 มีการเปลี่ยนแปลง pH เป็น  $6.49 \pm 0.05$ ,  $4.59 \pm 0.13$ ,  $4.38 \pm 0.01$ ,  $4.25 \pm 0.01$  และ  $4.18 \pm 0.03$  ตามลำดับ ซึ่งค่า pH ที่เปลี่ยนไปก็มีสาเหตุหลักมาจากกรดอินทรีย์ที่เชื้อผลิตขึ้นระหว่างการหมักน้ำนมถั่วเหลือง โดยพบปริมาณของกรดแล็กติก ณ ชั่วโมงที่ 12, 16, 20 และ 24 เป็น  $3.39 \pm 0.62$ ,  $5.37 \pm 0.01$ ,  $6.84 \pm 1.03$  และ  $7.31 \pm 0.24$  g/L และพบกรดแอสซิติคเป็น  $1.20 \pm 0.06$ ,  $2.10 \pm 0.08$ ,  $3.15 \pm 0.77$  และ  $3.44 \pm 0.45$  g/L ตามลำดับ ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่วัดจากเครื่อง HPLC จากการวิเคราะห์น้ำนมถั่วเหลืองภายหลังการหมักได้ 24 ชั่วโมงแสดงในรูปที่ 3.14 โดยเมื่อนมถั่วเหลืองมีระยะเวลาการหมักที่สูงขึ้น ค่า pH รวมถึงปริมาณกรดแล็กติกและกรดแอสซิติคก็จะสูงขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ก็เป็นอย่างยิ่งหนึ่งซึ่งผลกระทบต่อเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองด้วย (Jianming และคณะ, 2013) จากการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาสูงขึ้นไปน้ำที่แยกตัวออกมาจากโยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองก็มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากสมบัติความมีขี้ของโปรตีนที่สามารถรวมตัวกับโมเลกุลของน้ำ จึงสามารถเกิดการฟอร์มตัวกันเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นร่างแหตาข่ายที่สามารถกักเก็บน้ำโมเลกุลของน้ำไว้ภายใน แต่เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักยาวนานขึ้นทำให้ค่า pH และปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำนมถั่วเหลืองมีค่าเปลี่ยนแปลงไป โปรตีนในสภาพเป็นเจลจึงเกิดการเสียสภาพ ทำให้โปรตีนมีสายที่สั้นลง โมเลกุลของโปรตีนจึงกลับมารวมตัวกันเองมากขึ้น โมเลกุลของน้ำบางส่วนจึงหลุดออกมาจากโครงสร้างร่างแหตาข่าย เกิดสถานะเยิ้ม น้ำ ที่เรียกว่า syneresis

(Mani-López และคณะ 2014) อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบค่าความแน่นเนื้อของโยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองกลับไม่พบความแตกต่างในระหว่างการหมัก ( $p>0.05$ ) โดยค่าความแน่นเนื้อ ณ ชั่วโมงที่ 12, 16, 20 และ 24 มีค่า  $1.16\pm 0.01$ ,  $1.23\pm 0.04$ ,  $1.149\pm 0.01$  และ  $1.08\pm 0.02$  ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักน้ำนมถั่วเหลืองทั้งทางชีวภาพและกายภาพนี้จึงส่งผลกระทบต่อการประเมินความชอบทางประสาทสัมผัส จากผลการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าที่น้ำนมถั่วเหลืองที่หมักในช่วงระยะเวลา 12–16 ชั่วโมง เหมาะสมสำหรับการผลิตและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองมากที่สุด

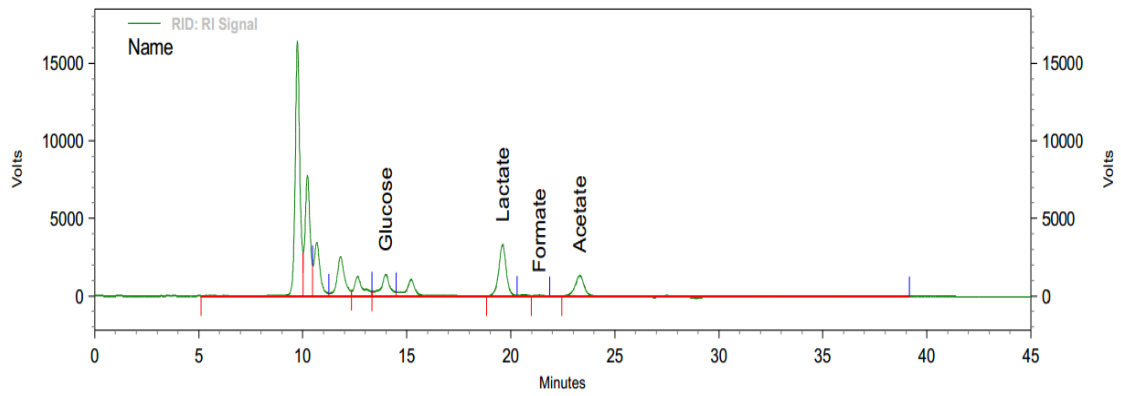


รูปที่ 3.13 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักนมถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดสอบความชอบด้วยการทดสอบทางประสาทสัมผัส

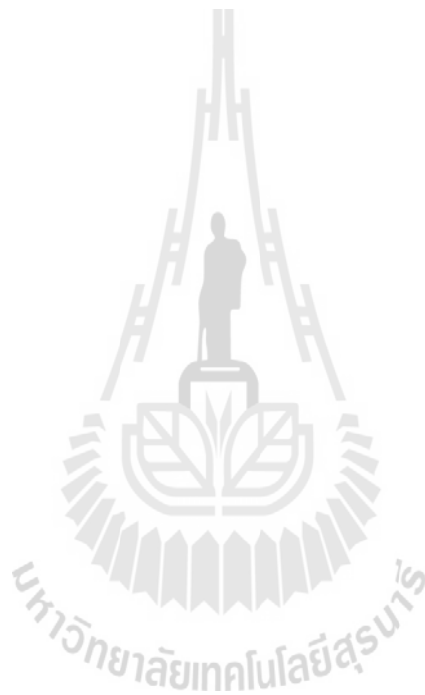
ตารางที่ 3.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมถั่วเหลือง

คุณลักษณะ	Harvest time (ชั่วโมง)			
	12	16	20	24
ลักษณะที่ปรากฏ	$6.57\pm 1.59^a$	$6.87\pm 1.72^a$	$6.37\pm 1.88^a$	$4.93\pm 1.85^b$
กลิ่น	$6.27\pm 1.87^a$	$5.67\pm 2.26^a$	$4.50\pm 2.08^b$	$3.60\pm 1.61^b$
เนื้อสัมผัส	$5.93\pm 1.78^a$	$5.83\pm 1.68^a$	$5.30\pm 2.04^{ab}$	$4.67\pm 1.84^b$
รสชาติ	$5.27\pm 1.85^a$	$5.40\pm 2.21^a$	$4.07\pm 2.13^b$	$3.43\pm 1.63^b$
การยอมรับโดยรวม	$6.03\pm 1.65^a$	$6.23\pm 1.78^a$	$4.97\pm 1.79^b$	$4.23\pm 1.67^b$

- อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\leq 0.05$ )



รูปที่ 3.14 โครมาโทแกรมของ HPLC จากการวิเคราะห์น้ำนมถั่วเหลืองภายหลังการหมักได้ 24 ชั่วโมง



## บทที่ 4

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

ในปัจจุบันความต้องการอาหารทางเลือกที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้นกำลังเป็นที่นิยมอย่างมาก ดังนั้นจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการค้นหาสายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีความปลอดภัยและมีสมบัติของโพรไบโอติกที่ดีเพื่อนำมาใช้สำหรับอาหารทางเลือก โดยที่สายพันธุ์ดังกล่าวต้องมีความทนทานสภาวะในการผลิตอาหาร การเก็บรักษา และความเครียดในทางเดินอาหารของผู้บริโภคเป็นสำคัญ ในการศึกษาวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ *Bifidobacterium animalis* BF052 สามารถแสดงคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดี และยังแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการดำรงชีพและเกาะยึดติดกับเซลล์ผิวผนังลำไส้ใหญ่ได้เป็นอย่างดีทั้งๆ ที่ผ่านสภาวะทางเดินอาหารหรือแม้กระทั่งกระบวนการผลิตอาหารในอุตสาหกรรมก็ตาม ดังนั้นสายพันธุ์ *B. animalis* BF052 น่าจะนำมาใช้พัฒนาเพื่อใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ (starter) โพรไบโอติกในการผลิตอาหารทางเลือกต่อไป



## บรรณานุกรม

- สยามมารีน. วัคซีนกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากโปรไบโอติก, <http://www.SiamMarine.com>. ธันวาคม 2550.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมไทย, โปรซีตติ้ง: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 15.
- Arbolea, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de los Reyes-Gavilan, C. G., Gueimonde, M. 2011. Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 28-36.
- Ataie-Jafari, A., Larijani, B., Alavi Majd, H., Tahbaz, F., 2009. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann. Nutr. Metab.* 54, 22–27.
- Alvarez, O.M., Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy, *Clinical Infectious Diseases*. 32, 1567-76.
- Brown AC, Valiere A. 2004. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutrition Clinical Care*. 7(2), 56–68.
- Bujnakova, D., Strakova, E., Kmet, V. 2014. *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of Lactobacilli isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, 29(0), 118-127.
- Cabre, E., Gassull, M.A. 2007. Probiotics for preventing relapse or recurrence in Crohn's disease involving the ileum: Are there reasons for failure", *Journal of Crohn's and Colitis*. 1, 47-52.
- Champagne, C. P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barrette, J., Buckley, N. 2009. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International*, 42(5-6), 612-621.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 4-18.
- Cummings, J.H., and et al. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood, *An International of Gastroenterology and Hepatology*. 28, 1221- 7.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 35-42.



- Damin, M. R., E. Minowa, M. R. Alcântara, and M. N. Oliveira. 2008. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies*. 39, 40–55.
- De Dea Lindner, J., Canchaya, C., Zhang, Z., Neviani, E., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., Ventura, M. 2007. Exploiting *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), 13-24.
- Du Toit, E., Vesterlund, S., Gueimonde, M., Salminen, S. 2013. Assessment of the effect of stress-tolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 165(1), 51-56.
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food Nutrition Pap. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M. P., Gardner, N., Fliss, I., Champagne, C. 2007. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 174-181.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. 2001. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 365–78.
- Geier, M.S., Butler, R.S., Howarth, G.S. 2007. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic; probiotics and synbiotics, *International Journal of Food Microbiology*. 115, 1-11.
- Gilliland, S.E. 1989. *Acidophilus* Milk Products; A reviews of potential benefits to consumers, *Journal Dairy Science*. 72, 2483-2494.
- Gilliland, S. and Speck, M. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli, *Applied and Environmental Microbiology*. 33, 15-18.
- Geier, M.S., Butler, R.S., Howarth, G.S. 2007. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic; probiotics and synbiotics, *International Journal of Food Microbiology*. 115, 1-11.
- Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., Gibson, G. 2009. Comparative analysis of four  $\beta$ -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171: purification and biochemical characterisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 1079-1088.
- Ghosh, D., Chattoraj, D. K., Chattopadhyay, P. 2013. Studies on changes in microstructure and proteolysis in cow and soy milk curd during fermentation

- using lactic cultures for improving protein bioavailability. *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 979-985.
- Hammes, W.P. and R.F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. In, B.J.B. Wood and W.H. Holzapel (eds). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall, London.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., Welling, G. W. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30, 61-67.
- Havenaar, R., Huis in't Veld, JHJ. 1992. *Probiotics: a general view, The Lactic Acid Bacteria*", Elsevier Applied Science. 1, 151-70.
- He, T., Priebe, M. G., Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Antoine, J. M., Welling, G. W., Vonk, R. J. 2008. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol.* 104, 595-604.
- Heller, K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 374s-379s.
- Hertzler, S.R. Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion, *Research.* 103(5), 582-586.
- Hoh, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed., Williams & Wilkins.
- Hove H, Nürgaard H, and Mortensen PB. 1999. Review lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *European Journal of Clinical Nutrition.* 53, 339– 50.
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lu, F., Bie, X. 2006. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 55-61.
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., Mercenier, A. 2010. Application of probiotics in food products - challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.
- Jianming, W., Qiuqian, L., Yiyun, W., Xi, C. 2013. Research on soybean curd coagulated by lactic acid bacteria. *SpringerPlus*, 2, 250.
- Joint FAO/WHO Working Group. 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002, 1-11
- Klein, G., and et al. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *Int J Food Microbiol.* 41, 103-125.
- Kontula, P., and et al. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product

- effect on gastrointestinal microbiota, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 246-252.
- Kok, R. G., Waal, A. de, Schut, F., Welling, G. W., Weenk, G., Hellingwerf, K. J., 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl Environ Microbiol.* 62, 3668-3672.
- Kiessling, G., Schneider, J., Jahreis, G. 2002. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur J Clin Nutr.* 56, 843-849.
- Kok ,R.G., De Waal, A., Schut, F., Welling, G.W., Weenk, G., Hellingwerf, K. J. 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3668–3672.
- Kos, B., Suskovic, J., Goreta, J., Matosic, S. 2000. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 121–127.
- Laparra, J. M., Sanz, Y. 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 695-701.
- Laiho, K., and et al. 2002. Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 89, 75-82.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 171-184.
- Lee, J.H., O'Sullivan, D.J., 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 378–416.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H. 1965. Probiotic : growth promoting factors produced by microorganisms, *Science.* 147, 747-748.
- Ling, W.H., and et al. 1994. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activity in healthy female adults, *The Journal of Nutrition.* 124, 18-23.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2011. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), 465-470.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. 2014. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2578-2590.

- Mättö, J., Alakomi, H.-L., Vaari, A., Virkajarvi, I., Saarela, M. 2006. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16(9), 1029-1037.
- Marvin, L.S. 1981. Use of microbial culture: Dairy products. *Food Technology*. 35(1), 79-83.
- Meance, S., Cayuela, C., Turchet, P., Raimondi, A., Lucas, C., Antoine, J.-M., 2001. A fermented milk with a bifidobacterium probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microbiol Ecol Health Dis.* 13, 217-222.
- Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S., Teuber, M., 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst Appl Microbiol.* 20, 57-64.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Method for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 4<sup>th</sup> ed., Approved standard, NCCLS publication no. M11-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Nakazawa, Y., Hosono, A. 1992. Functions of fermented milk, Translated by Howells, B.W. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex, England.
- Nualkaekul, S., Salmeron, I., Charalampopoulos, D. 2011. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*, 129(3), 1037-1044.
- Ortu, S., Felis, G. E., Marzotto, M., Deriu, A., Molicotti, P., Sechi, L. A., Dellaglio, F., Zanetti, S. 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal*, 17(11), 1312-1320.
- O'Toole, P.W., Cooney, J.C. 2008. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, 1-9.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4-8.
- Pennacchia, C., Vaughan, E. E., & Villani, F. 2006. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science*, 73(1), 90-101.
- Peres, C. M., Alves, M., Hernandez-Mendoza, A., Moreira, L., Silva, S., Bronze, M. R., Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., Prudencio, S. H. 2015. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp.

- paracasei and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 415-422.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 88-105.
- Ryan, S.M., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D, 2006. Screening and identification of starch, amylopectin and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5289–5296
- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A., Yolken, R. H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in-hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* , 344, 1046-1049.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P., Mättö, J. 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16(12), 1477-1482.
- Saeed M, Anjum F.M., Zahoor T, Nawaz H, Rehman SU. 2009. Isolation characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. *International Journal of Agriculture and Biology*. 11(3), 329-332.
- Salminen, S., et al. 1998. A functional food science and gastrointestinal physiology and function, *British Journal of Nutrition*. 80(1), S147-171.
- Schrezenmeir J, Vrese MD. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 73, 361S–4S.
- Shanahan, F. 2001. Inflammatory bowel disease : immunodiagnostics, immunotherapeutic, and ecotherapeutics, *Gastroenterology*. 120, 622-35.
- Smits, H.H. and et al. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115, 1260-1267.
- Solis, G., Reyes-Gavilan de los, C. G., Fernandez, N., Margolles, A., Gueimonde, M., 2010. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16(3), 307-310.
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Bertozzi, E., Avataneo, E., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R. 2010. Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. *Vet Med Int*. 1-7.
- Steidler L, et al. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10, *Science*. 289(5483), 1352-1355.
- Swidsinski, A. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*. 122, 44-54.

- Sánchez, B., Fernández-García, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Ruas-Madiedo, P. 2010. Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis strain. *International Dairy Journal*, 20(11), 800-805.
- Schoug, A., Olsson, J., Carlfors, J., Schnürer, J., Håkansson, S. 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology*, 53(1), 119-127.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R. 2014. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195.
- Solis, G., de los Reyes-Gavilán, C. G., Fernández, N., Margolles, A., Gueimonde, M. 2010. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16(3), 307-310.
- Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., Duarte, A. C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Freitas, A. C. 2015. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioproducts Processing*, 93, 90-97.
- Sun, E., Zhao, L., Ren, F., Liu, S., Zhang, M., Guo, H. 2015. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis A6, a probiotic strain with high acid resistance ability. *Journal of Biotechnology*, 200, 8-9.
- Temmerman R, B. Pota, G. Huysa, J. Swings. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol.* 81(1), 1-10.
- Tissier, H., 1900. Recherchers sur la flora intestinale normale et pathologique du nourisson. Thesis, University of Paris, Paris, France.
- Van den Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J.-P., Voragen, A. G. J. 2008. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 146-163.
- Vilas-Boas, L., Peres, C., Malcata, F. X. 2014. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 234-246.
- Veiga, P., Gallini, C. V., Beal, C., Michaud, M., Delaney, M. L., DuBois, A., Khlebnikov A., van Hylckama, J.E.T., Punit, S., Glickman, J. N., Onderdonk, A. B., Glimcher, L. H., Garrett, W. S. 2010. *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *PNAS*, 107(42), 18132-18137.

- Ventura, M., O'Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J. A., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. 2007. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 2-12.
- Ventura, M., Turrone, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M. J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R. S., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G. F., O'Toole, P. W., van Sinderen, D. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genetics*, 5(12), 1000785.
- Vinderola, G., Zacarias, M. F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J., Heller, K. J. 2012. Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology*, 30(1), 274-280.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C. 2002. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology*, 19(5), 501-508.
- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., Shyu, Y. T. 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578-585.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 209-217.
- Wouters, J. A., Frenkiel, H., de Vos, W. M., Kuipers, O. P., & Abee, T. 2001. Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5171-5178.
- Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi, M., Mollania, N. 2010. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(2), 57-63.





ผลงานวิจัยที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติรายละเอียดดังนี้

Charnchai P., Jantama SS., Prasitpuriprecha C., Kanchanatawee., Jantama K. 2016.

Effects of the Food Manufacturing Chain on the Viability and Functionality of *Bifidobacterium animalis* through Simulated Gastrointestinal Conditions. Plos One. 11(6): e0157958



RESEARCH ARTICLE

## Effects of the Food Manufacturing Chain on the Viability and Functionality of *Bifidobacterium animalis* through Simulated Gastrointestinal Conditions

Pattra Charnchai<sup>1\*</sup>, Sirima Suvarnakuta Jantama<sup>2†</sup>, Chutinun Prasitpuriprecha<sup>2‡</sup>, Sunthorn Kanchanatawee<sup>1‡</sup>, Kaemwich Jantama<sup>1\*†</sup>

**1** Metabolic Engineering Research Unit, Institute of Agricultural Technology, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Suranaree Sub-district, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand, **2** Division of Biopharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

© These authors contributed equally to this work.  
 ‡ These authors also contributed equally to this work.  
 \* [kaemwich@sut.ac.th](mailto:kaemwich@sut.ac.th)



OPEN ACCESS

**Citation:** Charnchai P, Jantama SS, Prasitpuriprecha C, Kanchanatawee S, Jantama K (2016) Effects of the Food Manufacturing Chain on the Viability and Functionality of *Bifidobacterium animalis* through Simulated Gastrointestinal Conditions. PLoS ONE 11(6): e0157958. doi:10.1371/journal.pone.0157958

**Editor:** Anderson de Souza Sant'Ana, University of Campinas, BRAZIL

**Received:** April 7, 2016

**Accepted:** June 4, 2016

**Published:** June 22, 2016

**Copyright:** © 2016 Charnchai et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) under the Royal Golden Jubilee PhD Program (Grant No. PHD/0076/2552). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Abstract

The viability and functionality of probiotics may be influenced by industrial production processes resulting in a decrease in probiotic efficiency that benefit the health of humans. This study aimed to investigate the probiotic characteristics of *Bifidobacterium* strains isolated from fecal samples of healthy Thai infants. In the present work, three local strains (BF014, BF052, and BH053) belonging to *Bifidobacterium animalis* showed a great resistance against conditions simulating the gastrointestinal tract. Among these, *B. animalis* BF052 possessed considerable probiotic properties, including high acid and bile tolerance, strong adhesion capability to Caco-2 cells, and inhibitory activity against pathogens including *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*. This strain also exhibited a high survival rate compared to commercial strains during storage in a wide variety of products, including pasteurized milk, soy milk, drinking yogurt, and orange juice. The impact of food processing processes as well as the freeze-drying process, storage of freeze-dried powders, and incorporation of freeze-dried cells in food matrix on probiotic properties was also determined. The stability of the probiotic properties of the BF052 strain was not affected by food processing chain, especially its resistance in the simulated gastrointestinal conditions and its adherence ability to Caco-2 cells. It indicates that it satisfies the criteria as a potential probiotic and may be used as an effective probiotic starter in food applications.

### Introduction

The consumption of health-promoting foods has developed in recent years together with an increasing variety of products conferring specific health benefits. In this regard, probiotic-

containing foods are highlighted as attractive products due to possess health promotion effects [1,2]. However, before probiotics can be of benefit to the health of humans, they must first be able to survive in sufficient numbers the manufacturing processes and storage as freeze-dried cultures, and also in the food products into which they are finally formulated. In addition, they should also possess the ability to survive the gastrointestinal (GI) tract and retain their functionality to be effective in the host [3,4]. Consequently, probiotic strains selected for commercial applications must retain the characteristics for which they were originally selected [5]. Recently, du Toit et al. [6] demonstrated that the same probiotic strain presented different characteristics depending on the manufacturing and processing conditions.

The manufacture of bifidobacterial cells at the recommended level of  $10^6$ – $10^7$  CFU/ml of product represents a major technological challenge due to several factors that affect the viability of bifidobacteria during manufacturing and storage, such as the presence of oxygen, temperature, pH, and osmotic changes [2,7]. Production technology, in particular freeze-drying, manufactures powders containing a high number of viable cell cultures. Moreover, bifidobacterial cultures need to be able to survive during the shelf-life of the products [8]. The viability and stability of probiotics are challenges for industrial producers, and new technology has been developed to obtain highly stable probiotic starters with stable functionality [2,3,9]. A rigorous effort in strain selection and characterization is regarded as a prerequisite in this process [10]. This reinforces the need for robust bifidobacteria that are able to survive stressful environmental challenges not only during industrial processes such as freeze-drying, manufacturing, and storage but also after consumption through the GI tract stresses, until their adherence to the intestinal epithelium to exert health-promoting effects there [4]. Therefore, to guarantee a functional and effective probiotic strain with predictable health benefits, its viability and functionality throughout the food manufacturing processes and GI stress barriers must be investigated to ensure that health-promoting properties are maintained.

The aim of the present work was to investigate the probiotic characteristics of *Bifidobacterium* spp. previously isolated from fecal samples of healthy Thai infants as a highly stable probiotic starter. The candidate strains were initially screened on the basis of acid and simulated gastric tolerance and were further screened for functional properties, such as antimicrobial activity and adhesion ability. In addition, the study investigated the viability of the probiotic strains during storage in different food matrices. The authors consider this study to be a pioneer work in the evaluation of the impact of the production process chain on the selected probiotic's survival and resistance to GI stress, and its adhesion ability to Caco-2 cells. This part of the study was to ensure that the strain would still provide probiotic effects after consumption.

## Materials and Methods

### Microorganisms and culture conditions

Thirty bifidobacterial strains identified as *Bifidobacterium animalis* were selected from Suranaree University of Technology (SUT) culture collection, Thailand. These strains were previously isolated from fecal samples of healthy Thai infants. The widely used *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis, strain BB-12 (Bb12) (Chr. Hansen, Denmark) was included in the experiments for comparison purposes. All strains were grown anaerobically at 37°C in DeMan, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid Ltd., UK) broth supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride (MRSc) and maintained in MRSc broth containing 20% (v/v) sterile glycerol and stored at -80°C.

The indicator organisms used for antimicrobial activity included *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Vibrio cholerae* O139, and *Candida albicans*

TISTR 718 which were supplied from the culture collection of the Laboratory of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Thailand. All strains were cultured on Brain-Heart Infusion agar (BHI; Conda-Pronadisa, Spain) at 37°C for 16 h.

### Resistance under conditions simulating the human gastrointestinal tract

The resistance of the examined strains under conditions simulating the GI tract was tested as previously described [11]. The tolerance was initially screened through low pH and simulated gastric juice. Briefly, bacterial cells from overnight (18 h) cultures were harvested (4,000 rpm, 10 min, 4°C) and washed twice with phosphate buffered saline (PBS; 0.8% NaCl, 0.2% KCl, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride (Merck, Germany) (PBSc), before being re-suspended in PBSc solution and adjusted to pH solutions of 2 and 3. For resistance to simulated gastric juice, bacterial cells were harvested and washed as described above. The bacterial suspension was then re-suspended in PBSc solution containing 0.3% (w/v) pepsin (Sigma-Aldrich, USA) and adjusted to pH solutions of 2 and 3. Resistance was assessed in terms of viable colony counts on MRSc agar after incubation of bacterial suspensions at 37°C for 0 and 3 h, reflecting the time spent by food in the stomach.

For resistance to small intestine conditions, bacterial cells as prepared above were re-suspended in PBSc solution containing 0.1% (w/v) pancreatin (Sigma-Aldrich, USA) and pH 8. The ability of the isolates to grow in the presence of bile was determined by adding cell suspensions to MRSc broth supplemented with 0.3%, 0.5 and 1% (w/v) bile salt (Oxoid Ltd., UK) and pH 8. The viable colony counts were determined after incubation at 37°C for 0 and 4 h, reflecting the time spent by food in the small intestine.

### *In vitro* adherence assay

An adherence ability of the bifidobacteria was examined *in vitro* using Caco-2, a colonic adenocarcinoma cell line that expresses the morphological and physiological characteristics of normal mature human enterocytes. An adhesion assay was conducted as previously indicated by Pennacchia et al. [12]. Caco-2 cells were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco, USA) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum, 1% (v/v) L-glutamine, 1% (v/v) non-essential amino acid solution, and 1% (v/v) penicillin/streptomycin solutions (Gibco, USA) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere. Before the adhesion assay, overnight cultures of bacterial strains were harvested by centrifugation at 4,000 rpm and 4°C for 10 min (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Germany). An aliquot of culture suspensions was serially diluted 10-fold in PBSc to determine the viable population by plate counting on MRSc agar after 48 h of incubation at 37°C. Another aliquot was re-suspended in non-supplemented DMEM (pH 7.0). This bacterial suspension was used to inoculate the six-well tissue culture plates with a concentration of about 10<sup>8</sup> CFU/mL.

The monolayer Caco-2 cells in the six-well tissue culture plates were washed twice with PBS and 2 ml of non-supplemented DMEM was added to each well. The plate was incubated at 37°C for 1 h. After incubation, non-supplemented DMEM was removed from each well and replaced by 1 ml of the bacterial suspension, prepared as described above. After incubation at 37°C for 90 min, the wells were softly washed 3 times with PBS to remove non-adherent bacteria. The washed monolayer was treated with 1 ml of 0.05% Triton X-100 water solution for 10 min to lyse the Caco-2 cells. The number of viable adhering bacteria was determined by plating serial 10-fold dilutions of the mixture containing lysed Caco-2 cells and bacterial cells on MRSc agar after 48 h of incubation at 37°C. The adhesion ability of the strains on Caco-2 cells was calculated as a percentage of the viable bacteria according to their initial population.

### Antibiotic susceptibility test

Antibiotic susceptibility patterns of the strains were investigated by the disk diffusion method. The tested antibiotic discs (Oxoid, England) included streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg), penicillin G (10 µg), aztreonam (30 µg), vancomycin (30 µg), erythromycin (15 µg), chloramphenicol (30 µg), kanamycin (30 µg), ampicillin (10 µg), lincomycin (15 µg), norfloxacin (10 µg), and ofloxacin (5 µg). Strains were grown in MRSc broth at 37°C for 24 h under anaerobic condition to obtain a density of  $10^7$  cfu/mL. The culture suspension was swabbed on MRSc agar. Antibiotic discs were placed aseptically on the inoculated plates and agar plates were incubated anaerobically for 24 h at 37°C. The diameters of the inhibition zones around the discs were measured (average of three readings) and the results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) as sensitive (S), intermediate (I), and resistant (R).

### Antimicrobial Activity

The ability of the candidate strains to inhibit the growth of pathogenic microorganisms was determined using the agar-well diffusion assay [13]. An overnight culture of the indicator strains was applied to inoculate in BHI agar at 37°C. Fresh overnight bifidobacteria cultures were harvested by centrifugation (4,000 rpm, 10 min, 4°C). The supernatants were neutralized to pH 6.5 and the others left unadjusted followed by filter-sterilization through 0.22 µm membrane filter. Cell-free extracts of bifidobacteria samples (100 µL) were pipetted into drilled holes (7mm) of the agar. The plates were then incubated at 37°C and were examined after overnight incubation. Antimicrobial activity was recorded as growth-free inhibition zones (mm) around the well.

### Stability of probiotics in commercial products during storage

All candidate bifidobacteria were propagated in MRSc broth overnight at 37°C followed by sub-culturing and incubating for a further 18 h. All cultures were harvested by centrifugation and the pellets were then washed twice in PBSc solution, pH 7.4. A 1% inoculum of each bifidobacterial culture was aseptically distributed into 100 mL portions of four commercial dairy and non-dairy products (pasteurized milk, drinking yogurt, soy milk, and orange juice) to obtain a final concentration of  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL. Cell counts and pH measurements were performed immediately after the addition and every three days until 15 days of storage at a refrigerated temperature.

### Preservation of bifidobacteria by freeze-drying in different cryoprotectants

A fresh overnight culture of a selected probiotic strain, *B. animalis* BF052, was grown in MRSc broth at 37°C. A 1% inoculum was then subsequently transferred to fresh MRSc broth. At the early stationary phase of growth (18 h), cells were harvested by centrifugation and washed twice with PBSc solution, pH 7.4. The pellet was re-suspended in 10% (w/v) lactose, 10% (w/v) sucrose, 10% (w/v) skim milk, 10% (w/v) germinated brown rice (GBR), 10% (w/v) black sesame (BS), and commercial soy milk. Sterile de-ionized water was used as a control. Aliquots (1 ml) of each cell suspension in different cryoprotectants were transferred into sterilized vials and frozen at -80°C for 4 h. Then, the samples were immediately freeze-dried for 18 h in a freeze-dryer (Alpha 1-2, Christ, Germany).

After freeze-drying, the freeze-dried powders were re-hydrated with MRSc broth (1 ml) and the cell suspensions were allowed to stand for 10 min at room temperature, and subsequently

plated on MRSc agar. The number of viable cells before and after freeze-drying was determined at 37°C after incubation for 48 h. To select the most effective cryoprotectant, freeze-dried samples were kept at room and refrigerated temperatures. After storage for 1, 3, and 6 months, the viability of the freeze-dried cells was then determined by plating on MRSc agar after 48 h of incubation at 37°C.

### Gastrointestinal transit tolerance of BF052

The study investigated the effects of the production process chain, freeze-drying, storage of freeze-dried powders, and incorporation of cells in food matrix on the stability of the probiotic properties of *B. animalis* BF052. The strain *B. animalis* BF052 was subjected to a process of freeze-drying. The skim milk (10%) was used as a cryoprotective agent and the freeze-dried powders were then stored for 1 month following incorporation into a whole pasteurized milk and kept at refrigerated temperatures for 2 weeks. The strains were then sequentially exposed to simulated GI conditions followed by the adherence assay. To mimic *in vivo* human GI transit, an *in vitro* model was conducted as previously described by Peres et al. [1] and Sousa et al. [2], with slight modifications. After incorporation of the freeze-dried cells in a whole pasteurized milk for 2 weeks, 1 ml of products were transferred to a 34 ml of sterile electrolyte solution (SES; 0.22 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 6.2 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2.2 g L<sup>-1</sup> KCl, 1.2 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, w/v) adjusted to pH 6.2. To simulate *in vivo* saliva conditions, 5 mL of a sterile electrolyte solution containing lysozyme (final concentration of 0.01% w/v) was added to 35 mL of cell suspension and incubated at 37°C, 200 rpm for 2 min. Then, 3 mL of the electrolyte solution (pH 5.0) with 0.3% (w/v) pepsin was incorporated into the cell suspension to simulate the oesophagus-stomach environment. The pH curve in the stomach was reproduced by adding 1 N HCl to the cell suspension to pH 6.0, 5.0, 4.0 every 10 min and to pH 3.0, 2.0 every 30 min, at 37°C, 50 rpm respectively. After 90 min of incubation, the samples were then adjusted to pH 5.0 using 1 M NaHCO<sub>3</sub> and mixed with 4 mL of a sterile electrolyte solution (5 g/L NaCl, 0.6 g/L KCl and 0.3 g/L CaCl<sub>2</sub>, w/v), containing 0.3% (w/v) bile salts and 0.1% (w/v) pancreatin (pH 8) and incubated for 30 min (37°C and 50 rpm) to simulate the intestinal environment at the duodenum step. Finally, the ileum step was brought about by an increase of pH to 6.5 and incubation for 90 min at 37°C and 50 rpm. After passing through the GI step, cells were then sequentially tested for adherence ability. Briefly, bacterial solution was centrifuged and the pellet was re-suspended in 2 ml of non-supplemented DMEM. The monolayer Caco-2 cells in the six-well tissue culture plates were washed twice with PBS and 2 ml of non-supplemented DMEM was added to each well. The plate was incubated at 37°C for 1 h. After incubation, the non-supplemented DMEM was removed from each well and replaced by 2 ml of the bacterial suspension. After incubation at 37°C for 90 min, the wells were washed 3 times with PBS to remove non-adherent bacteria. The washed monolayer was treated with 2 ml of 0.05% Triton X-100 water solution for 10 min to lyse the Caco-2 cells. The number of viable adhering bacteria was enumerated by plating on MRSc agar after 48 h of incubation at 37°C.

### Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical differences in multiple groups were determined by one-way ANOVA followed by multiple mean comparisons with Duncan's test. All numerical data were displayed as mean ± standard deviation and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and Discussion

### Resistance of bifidobacteria under conditions simulating the gastrointestinal tract

An essential step towards the selection of potential probiotic candidates is to examine their resistance under GI stress environments [1,14]. Out of 30 strains, only BF014, BF049, BF052, and BH053, including the reference strain Bb12, showed a decrease in viable counts lower than 1 log cycle even after 3 h of exposure at pH 3 (Table 1). No significant differences ( $p > 0.05$ ) in viable cells were observed in BF052 and Bb12 after an exposition to solutions with or without pepsin at pH 3 compared with initial counts. Although BF014, BF052, and BH053 did not survive after exposure at pH 2 for 3 h, all of the three strains consistently tolerated the pepsin solutions at pH 2 after 3 h of incubation. These results indicated that the bifidobacterial isolates (except strain BF049) were able to tolerate simulated gastric juice at pH 2 in the presence of pepsin. This result is relevant to the work of Mättö et al. [15] that showed the addition of inhibitors of pepsin and proton translocating enzyme significantly decreased the survival rate of *B. animalis* subsp. *lactis* at pH 2. Therefore, it was likely that pepsin was able to protect the cells during exposure to low pH by maintenance of the pH homeostasis and support of the role of  $H^+$ -ATPase. However, the loss of viability in BF049 after exposure to simulated gastric juice may indicate that the resistance to enzymatic barriers was strain-specific.

The strains resistant to stomach conditions were further tested for their ability to tolerate small intestinal conditions. All of the candidate strains were resistant to bile salts and pancreatic solutions at pH 8 by decreasing their viability approximately 1 log unit after 4 h exposure, as shown in Table 2. In general, the relevant physiological concentrations of human bile range from 0.3% to 0.5%. However, it was reported that bile salts were critical to bacterial cells since they disorganized the structure of the cell membrane [16]. However, all tested strains in this study retained their viability with small reductions at high concentrations of bile ranges from 0.3% to 1%.

In this study, three strains, BF014, BF052, and BH053, showed satisfactory probiotic properties for preliminary screening under conditions simulating the GI tract, suggesting that they may survive through the human GI transit. All of these three strains were therefore selected for the study of other probiotic properties.

### Caco-2 cell adhesion

Adhesion of probiotic strains to human intestinal mucosa is regarded as a prerequisite characteristic for potential probiotic microorganisms. The adhesion ability to Caco-2 cells was

**Table 1. Cell viability of probiotic strains after 3 h of exposure to low pH conditions and simulated gastric juice.**

Strain	Initial count	low pH conditions		Resistance to gastric juice with 0.3% (w/v) pepsin	
		pH 2	pH 3	pH 2	pH 3
Bb12	$6.71 \pm 0.02^{a,*}$	- <sup>y</sup>	$6.61 \pm 0.05^a$	$6.21 \pm 0.04^b$	$6.65 \pm 0.01^a$
BF014	$7.14 \pm 0.11^a$	-	$6.86 \pm 0.25^{a,b}$	$6.46 \pm 0.05^b$	$7.08 \pm 0.12^a$
BF049	$7.13 \pm 0.03^a$	-	$6.93 \pm 0.02^b$	-	$1.61 \pm 0.02^c$
BF052	$7.31 \pm 0.06^a$	-	$7.25 \pm 0.07^a$	$6.99 \pm 0.02^b$	$7.26 \pm 0.05^a$
BH053	$7.79 \pm 0.06^a$	-	$7.34 \pm 0.18^b$	$7.19 \pm 0.03^b$	$7.65 \pm 0.03^a$

<sup>a</sup> Each value represents the mean value (log CFU/mL)  $\pm$  standard deviation (SD) from three trials. The equal superscript lowercase letters in the same row indicate no significant differences ( $p > 0.05$ )

<sup>y</sup> No growth.

doi:10.1371/journal.pone.0157958.t001

**Table 2. Cell viability of probiotic strains after 4 h of exposure to bile salt and pancreatin.**

Strain	Initial count	Bile salt (pH 8)			Pancreatin (pH 8)
		0.3%	0.5%	1%	
Bb12	7.42 ± 0.14 <sup>a</sup>	6.45 ± 0.08 <sup>b</sup>	6.43 ± 0.04 <sup>b</sup>	6.41 ± 0.09 <sup>b</sup>	6.42 ± 0.27 <sup>b</sup>
BF014	7.28 ± 0.12 <sup>a</sup>	6.51 ± 0.26 <sup>b</sup>	6.38 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.15 ± 0.14 <sup>b</sup>
BF049	7.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.58 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.58 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.09 <sup>c</sup>	5.10 ± 0.11 <sup>d</sup>
BF052	7.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.77 ± 0.01 <sup>b</sup>	6.73 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.15 <sup>c</sup>
BH053	7.43 ± 0.10 <sup>a</sup>	6.25 ± 0.18 <sup>b</sup>	6.23 ± 0.12 <sup>b</sup>	6.23 ± 0.15 <sup>b</sup>	6.31 ± 0.15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Each value represents the mean value (log CFU/mL) ± standard deviation (SD) from three trials. The equal superscript lowercase letters in the same row indicate no significant differences ( $p > 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0157958.t002

evaluated and the result is presented in Table 3. The BF052 strain had a significantly higher adherence ( $3.38 \pm 0.15$ ) to Caco-2 cells comparable with the reference strain Bb12 ( $2.96 \pm 0.12$ ), whereas BF014 and BH053 expressed lower levels of adhesive abilities than those of BF052 and Bb12 strains. Sánchez et al [12] revealed that adhesion values to the intestinal cell line HT29-MTX by *B. animalis* subsp. lactis IPLA4549 ( $2.96 \pm 1.74$ ) was slightly lower than Bb12 ( $3.08 \pm 1.37$ ). In addition, Laparra and Sanz [18] reported that Bb12 showed the highest adherence capability to Caco-2 cell and to human mucus (mucin type II) compared with other probiotic strains including *Lactobacillus rhamnosus* GG, *B. animalis* IATA-A2 and *B. bifidum* IATA-ES2. In this study, BF052 showed the highest percentage of adhesion compared to those candidate strains including the reference strain. As previously reported, the adhesion capability was not associated with species but as a characteristic of strain [19].

The adhesion of the microorganisms to the intestinal mucosa is an important feature involved in colonization and is related to the ability of the strains to interact with the host [20]. Probiotic bifidobacteria have several mechanisms that enable them to adhere to the intestinal epithelial cells. Their possible mechanisms may confer competition for substrates, direct antagonism by inhibitory substances, competitive exclusion of pathogenic bacteria, and potentially host-mediated effects, such as enhancing the function of the intestinal epithelial barrier by stimulation of the various signaling pathways and modulating immune responses [21–23]. As a result, high adhesive ability of bacteria to the cell lines may indicate that strains may contribute their beneficial effects to the host. However, investigations are still necessary to confirm their functionality in *in vivo* situations.

### Antibiotic susceptibility assay

An important requirement for probiotic strains is that the isolated probiotics must be safe for human consumption. In this regard, antibiotic susceptibility profiles should be revealed and

**Table 3. Adhesion ability of the isolates to Caco-2 cells.**

Strain	% adhesion (mean ± SD)*
Bb12	2.96 ± 0.12 <sup>a</sup>
BF014	2.57 ± 0.38 <sup>b</sup>
BF052	3.38 ± 0.15 <sup>c</sup>
BH053	2.72 ± 0.37 <sup>ab</sup>

\*The equal superscript lowercase letters in the column indicate no significant differences between strains ( $p > 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0157958.t003

Table 4. Antibiotic susceptibility profiles.

Type of antibiotics	Antibiotic susceptibility profiles			
	Bb12	BF014	BF052	BH053
Streptomycin (10µg)	R	R	R	R
Gentamicin (10µg)	R	R	R	R
Tetracycline (30µg)	S	S	S	S
Penicillin G (10µg)	S	S	S	S
Aztreonam (30µg)	R	R	R	R
Vancomycin (30µg)	S	S	S	S
Erythromycin (15µg)	S	S	S	S
Chloramphenicol (30µg)	S	S	S	S
Kanamycin (30µg)	R	R	R	R
Ampicillin (10µg)	S	S	S	S
Lincomycin (15µg)	S	S	S	S
Norfloxacin (10µg)	R	R	R	R
Ofloxacin (5µg)	R	R	R	R

doi:10.1371/journal.pone.0157958.t004

taken into account for safety [24]. Table 4 lists the antibiotic susceptibility patterns of the candidate strains and all candidates displayed similar phenotypic resistances comparable with the reference strain, Bb12. All tested strains were interpreted to be resistant towards aminoglycoside group (streptomycin, gentamicin, kanamycin), fluoroquinolone antibiotics (norfloxacin and ofloxacin), and  $\beta$ -lactam antibiotic (aztreonam, which is gram-negative spectrum). In contrast, all strains were sensitive to antibiotics belonging to a broad range of antibiotics related to different modes of action, such as  $\beta$ -lactam antibiotics (penicillin and ampicillin), broad-spectrum antibiotics (tetracycline and chloramphenicol), macrolide antibiotic (erythromycin), glycopeptide antibiotic (vancomycin), and lincosamide antibiotic (lincomycin). These antibiotic results indicated related patterns to previous reports [5,25,26]. From a safety point of view, it was proposed that a prospective probiotic should not carry transmissible antibiotic resistance genes, resulting in the corresponding genes not being transferred to the others including pathogens and commensal gut microbiota [27]. Probiotic strains with intrinsic antibiotic resistance may be thus useful for the restoration of the gut microbiota after antibiotic treatment [5]. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first report in which all tested strains conferred resistance to norfloxacin and ofloxacin. Therefore, it is beneficial for patients suffering from urinary tract infection to restore the *Bifidobacterium* population after treatments involving norfloxacin and ofloxacin.

### Antimicrobial Activity

For the antimicrobial assay, there was no observation of inhibition for any of the supernatants in which the pH was neutralized (results not shown). However, the non-neutralized culture supernatants of BF052 and BH053 strains showed inhibitory activities against *S. typhimurium* and *V. cholerae* as shown in Table 5. These results indicated that the most likely explanation was that the inhibition was due to organic acid production by the strains. Our results were in an agreement with previous works. Stropfova and Laukova [28] demonstrated that inhibition effects were not explained by bacteriocin action and were most probably due to the production of organic acids along with pH lowering effects during the growth in *Bifidobacterium*. Arboleya et al. [25] also reported that non-neutralized supernatants of breast-milk isolates (*B. longum* and *B. breve*) were able to inhibit *Salmonella enteric* and *Shigella sonnei*. Ibrahim and Bezkorovainy [29] demonstrated that no antibacterial substances were detected in the fermentation



Table 5. Inhibitory effects of non-neutralized bifidobacterial supernatants against pathogens.

Strains	Diameter (mm) of inhibition zones						
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
Bb12	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
BF014	-	-	-	-	-	10	-
BF052	-	-	-	8	-	10	-
BH053	-	-	-	9	-	11	-

<sup>a</sup> No antagonistic activity was observed.

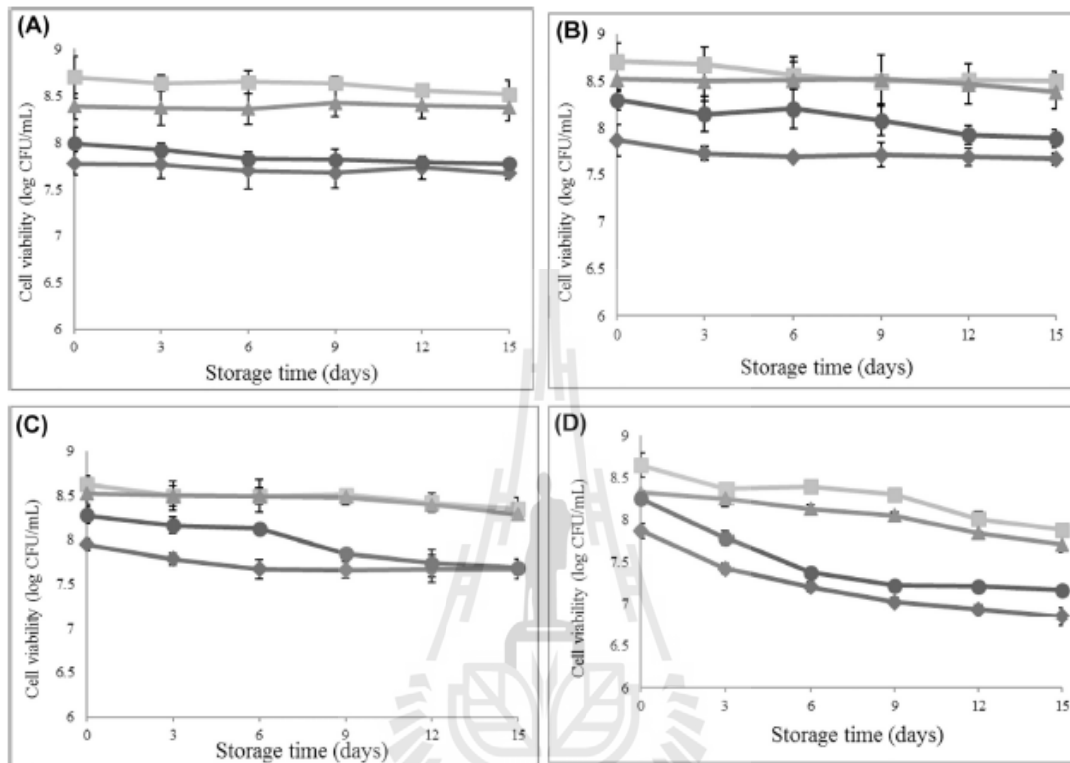
doi:10.1371/journal.pone.0157958.t005

broth of tested bifidobacteria. Only acetic and lactic acids were produced and could inhibit the pathogenic strain of *E. coli*. In addition, Fukuda et al. [30] proposed that the production of acetate by *B. longum* subsp. longum JCM 1217, *B. longum* subsp. infantis 157F, and *B. longum* subsp. longum NCC 2705 was able to protect mice against death induced by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. However, Liu et al. [31] recently found a novel broad-spectrum bacteriocin called bifidocin A that is produced by *B. animalis* BB04. Therefore, it is likely that the antimicrobial activity of bifidobacteria may be implemented not only by the production of organic acids but also by the secretion of bacteriocin.

### Storage stability of probiotics in commercial products

Many criteria have been suggested for the selection of probiotics. Besides the challenge to overcome the GI stresses, the ability of probiotics to survive in products during storage is also important. It was recommended that the level of probiotics in food products needed to be high, suggesting the minimum counts of live cells should be at least  $10^6$ – $10^7$  CFU/mL before consumption [2, 32]. This requirement has a significant impact on the selection of potential probiotics with high stability in different food products.

In the present study, strains Bb12, BF014, BF052, and BH053 were incorporated into dairy (pasteurized milk and drinking yogurt) and non-dairy products (soy milk and orange juice) at refrigerated temperatures for 15 days. Fig 1 displays viable cells in refrigerated storage over 15 days. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed in all the candidate strains in cultivable cell numbers during storage in pasteurized milk and soy milk during the 15 days. In drinking yogurt, a significant decrease ( $p \leq 0.05$ ) in cell viability was detected only in strain BH053 after storage for nine days (S1 Table). A major significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in cell counts ranging from 0.6 to 1.0 log cycles was observed in orange juice in all tested strains. These results are in agreement with those of Saarela et al. [33] and Vinderola et al. [34] who reported that the stability of bifidobacterial cells in the low pH of fruit juice was poorer than the fairly neutral pH of milk during refrigerated storage. Nuaikaekul et al. [35] proposed that the presence of protein sources in food matrices may improve the survival of bifidobacteria during refrigerated storage. This was in accordance with the present study's findings that high amounts of proteins in drinking yogurt may have resulted in a higher rate of cell survival than in juices, although pH values of both products were slightly different. It was proposed that when probiotic cells were present in low pH environments, the requirement of energy consumption increased to maintain the intracellular pH, resulting in depression of ATP for crucial cellular functions and thereby causing cell death. In addition, exposure to oxygen under acidic conditions during refrigeration storage was most probably responsible for the reduction in probiotic counts [36, 37]. Among all the candidates, BF052 showed the highest survival rate during storage in all products, while the reduction rates of BH053 in terms of viable counts were significantly higher than those of other strains.



**Fig 1. Cell viability of probiotics in refrigerated storage over 15 days in (a) pasteurized milk, (b) soy milk, (c) drinking yogurt and (d) orange juice.** Symbols: Bb12 (◆), BF014 (■), BF052 (▲), and BF053 (●).

doi:10.1371/journal.pone.0157958.g001

Additionally, changes of pH values of BH053 slightly declined compared to those of other strains, especially in soy milk, whereas BF052 remained constant during the incubation period (data not shown). The reduction of the pH value of BF052 in only soy milk (within 0.17 pH-values) but no other products was observed. This result was in line with previous studies which showed the decrease of the pH levels in the soy beverage was faster than in milk [38, 39] suggesting a greater rate of organic acid production. It was also observed that soy milk containing oligosaccharides, such as raffinose and stachyose, may support the growth of bifidobacteria causing acid production and subsequent reduction of pH. However, post-acidification during storage is an undesirable property in probiotic-containing products. This process may have adverse effects on the taste or aroma of the product and may cause a loss in the viability of the probiotic strain [40].

The main purpose of the present study was to identify suitable probiotic strains for incorporation into food products. It was clearly observed that candidate strains belonging to the same species may present different characteristics even in food matrices. Among all candidates, BF052 was found to exhibit the highest survivability in a wide variety of the products,

suggesting that it may have been present in sufficient amounts throughout the entire shelf life of the product. In addition, BF052 possessed considerable probiotic properties including high acid and bile tolerance ability, strong adhesion capability, and good inhibitory activity against pathogens. This strain was thus selected as a promising probiotic strain that may have potential as probiotic starter.

### Preservation of BF052 by freeze-drying in different cryoprotectants

In industrial applications, the use of probiotics as starter cultures is required to guarantee long-term delivery of stable cultures in terms of cell viability and functionality [41]. Freeze-drying is a well-documented technique used for the preservation of microorganism [42]. Moreover, the utilization of a suitable cryoprotective as a freeze-drying agent is an achievable attempt to improve cell viability during this process. In this study, sucrose, lactose, skim milk, GBR, BS, and soy milk were examined for their ability to protect the BF052 cells during freeze-drying. Table 6 shows the effect of cryoprotectants on the survivability of BF052 at different storage periods and temperatures.

Among all candidate cryoprotectants, only 10% skim milk showed no statistical difference ( $p > 0.05$ ) in protecting cells during freeze-drying. After storage, the survival rates of the BF052 freeze-dried cells were better at refrigerated temperatures than room temperature. It was reported that powdered *Bifidobacterium* preparations survived better in refrigerated storage than at room temperature [33]. In addition, there were no significant differences ( $p < 0.05$ ) in the viable cells using soy milk and BS after storage of freeze-dried powders for 1 month at refrigerated temperature and room temperature. However, after a month storage, the cell viability after 1 month storage in soy milk was higher than that of BS.

According to Carvalho et al. [43], distinct properties of the cryoprotectants resulted in different protection features. The protective ability of skim milk on freeze-dried cells may be explained by its capacity in the prevention of cellular injury, stabilization of the cell membrane constituents, and provision of a protective coating for the cells [44]. Vinderola et al. [33] also found that skim milk and lactose were effective in the protection of *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 comparable with sucrose during freeze-drying and storage, including after exposure under the harsh conditions of simulated digestion. Besides skim milk, soy milk is especially interesting as an attractive cryoprotectant. It is likely that soy milk contains many substances

**Table 6. Effects of cryoprotective agents on cell survival of BF052 during freeze-drying (FD) and storage.**

Cryoprotectants	Cell viability (log CFU/mL $\pm$ SD)		Cell viability after storage in refrigerator (log CFU/mL $\pm$ SD)			Cell viability after storage at room temperature (log CFU/mL $\pm$ SD)		
	Before FD	After FD	1 month	3 months	6 months	1 month	3 months	6 months
DI water	9.32 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	8.60 $\pm$ 0.2 <sup>-b</sup>	8.42 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	8.10 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	7.79 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	6.09 $\pm$ 0.08 <sup>e</sup>	-	-
10% Sucrose	9.32 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	9.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	8.73 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	8.68 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	8.44 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	6.26 $\pm$ 0.19 <sup>e</sup>	- <sup>ff</sup>	-
10% Lactose	9.34 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	8.99 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	8.75 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	8.76 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	8.65 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	7.90 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>	6.02 $\pm$ 0.16 <sup>f</sup>	3.10 $\pm$ 0.04 <sup>g</sup>
10% Skim milk	9.21 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	9.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	9.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.12 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	8.78 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	7.42 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	6.06 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
10% Germinated brown rice	9.81 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	9.41 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	9.19 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	8.90 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	nd	7.61 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	5.14 $\pm$ 0.13 <sup>e</sup>	nd
10% Black sesame	9.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	8.39 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	8.31 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	nd	7.76 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	6.58 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	nd
soy milk	9.20 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	8.93 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	8.87 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	8.83 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	nd	8.77 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	7.33 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	nd

- The equal superscript lowercase letters indicate no significant differences between cryoprotectant ( $p > 0.05$ )

<sup>ff</sup> No growth

<sup>nd</sup> Not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0157958.t006

in protecting BF052 freeze-dried cells, such as protein, which is equivalent to that of milk, soybean-oligosaccharides, stachyose, and raffinose. Moreover, it was reported that the survival of *B. animalis* subsp. *lactis* 10140 during the freeze-drying process was enhanced by the presence and increment of probiotics [45]. In contrast to skim milk and soy milk, GBR and BS are composed of mostly polymeric sugars. They easily form glasses that often do not have suitable structures to be able to depress membrane phase transition resulting in failure to protect microbial cells during the freeze-drying process [46]. Zhao and Zhang [41] suggested that a good cryoprotection should protect the cells during the freezing process, be easily dried, and provide a good matrix to allow stability and ease of rehydration. During rehydration using MRS broth, GBR and BS were not perfectly rehydrated due to complex substances and thus affected the survival rate of freeze-dried cells.

Nowadays, the demand for non-dairy probiotic products has increased and the use of soy milk as a cryoprotectant during the freeze-dried process is an option to develop a fully non-dairy probiotic product. However, dairy products are still the main vehicles for the incorporation of probiotic cultures [5, 47]. In this study, skim milk was the most effective protective agent for BF052 cells during freeze-drying and storage, and was therefore selected for further study.

### Gastrointestinal transit tolerance of BF052

This study aimed to examine the consistency of the probiotic properties of BF052 after the production process, including freeze-drying, storage, and incorporation of the strain into the products. After this process, BF052 was evaluated the tolerance ability through an *in vitro* model of the human GI tract. The strain was encountered the lysozyme-containing saliva in the mouth, pH gradient and gastric enzymes in the stomach, followed by the bile and pancreatic enzymes in the small intestine, and the adherence of the strain to human intestinal mucosa as a final step. Changes in cell viability by the end of each stage were examined.

Strain BF052 showed the ability to resist to the adverse conditions tested in every compartment as shown in Table 7. It exhibited a small susceptibility through each step, with different enzymatic- and pH-dependent barriers until gastric emptying at increasingly lower pH (reaching to pH 2.0). A significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in cell survival occurred only at pH 2 in all processes. This strain was also resistant to the duodenum and ileum steps and retained its viability with a small reduction in viable counts. These results are consistent with those previously revealed from other *B. animalis* strains belonging to *B. animalis* Bb12 [2] and *B. animalis* Bo [48], which generally showed a great resistance throughout the whole processes of simulated digestion.

In addition, the impact of food manufacturing processes, such as freeze-drying, was also determined and compared with the direct adherence assay. The results showed that no significant differences ( $P > 0.05$ ) in adhesion capability were detected among freeze-dried and non-freeze-dried cells. This result was in contrast to Du Toit et al. [6] who reported that freeze-drying of probiotics was found to have an adverse effect on adhesion capability. Osmotic shock, formation of intracellular ice, and re-crystallization during freeze-drying may damage the biological structures of the cell and probably affect the adhesion ability of probiotics. However, use of an appropriate cryoprotectant during freeze-drying may reduce such adverse changes resulting in the maintenance of the ability of this strain to exhibit probiotic behavior [9]. However, our experiments also demonstrated the effect of freeze-drying process on adhesion ability of probiotics after passage through the conditions of the GI tract. Based on our results, it was observed that the introduction of BF052 through the GI transit may enhance the adhesive ability to Caco-2 cells compared with those of non-challenged conditions. It may be explained that

Table 7. Cell viability (log CFU/mL  $\pm$  SD) within dynamic *in vitro* model and adhesion capability of *B. animalis* BF052 from different processes.

Process	Initial count	Gastrointestinal compartment										% Adhesion	
		Mouth 2 min	pH 6 10 min	pH 5 10 min	pH 4 10 min	pH 3 30 min	pH 2 30 min	Duodenum pH 5 30 min	Ileum pH 6.5 90 min				
BF052-Caco2	8.13 $\pm$ 0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BF052-GI test-Caco2	8.47 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	8.47 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	8.46 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	8.43 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	8.38 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	7.21 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	7.09 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	6.99 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	-	-	3.19% $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	3.81% $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>
BF052-FD-Caco2	8.13 $\pm$ 0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BF052-FD-GI test-Caco2	8.34 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.28 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.32 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	8.29 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	8.27 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.19 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	7.01 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	6.85 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	6.77 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	-	-	3.08% $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	3.45% $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
BF052-FD-milk-GI test-Caco2*	8.53 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.49 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	8.50 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	8.48 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	8.43 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	8.38 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	7.45 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	7.35 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	7.30 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	-	-	3.67% $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	3.67% $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>

- The equal superscript lowercase letters in the same row indicate no significant differences between digestion steps ( $p > 0.05$ )

- The equal superscript capital letter in the last column indicates no significant differences in adhesion percentage for each process ( $p > 0.05$ )

\* In this process, *B. animalis* BF052 were freeze-dried (FD) by using 10% skim milk as a cryoprotectant agent and then stored as freeze-dried powders for 1 month at refrigerated temperature following incorporation into a whole pasteurized milk and kept at refrigerated temperature for 2 weeks before exposure through GI (GI) transit followed by adherence assay (Caco2).

doi:10.1371/journal.pone.0157958.t007

either acid or bile adaptation appeared to affect the *in vitro* adhesion to the intestinal cell line. Also, it was reported that the induction of acid or bile resistance in bifidobacteria may improve cellular surface properties and thus enhance the adhesion ability that favors their potential functionality as probiotics [49,50,51].

Before delivering probiotic-containing products to consumers, probiotic bacteria should survive and retain their functionality not only during storage as freeze-dried cultures but also in the food products into which they are finally formulated [52]. Eventually, it would be beneficial that the strain would be supplemented into the whole pasteurized milk as one of the alternative means for delivering probiotics. In this study, after freeze-drying and the subsequent storage as freeze-dried powder for 1 month, BF052 were sequentially delivered in a whole pasteurized milk as a probiotic vehicle and stored at refrigerated temperatures for two weeks. The survival of the strain throughout the process of simulated digestion was then monitored. Interestingly, the whole production process did not affect the stability of the probiotic properties of BF052, especially the resistance of this strain through the GI transit, including adherence ability. BF052 still displayed a similar ability to withstand GI stresses and exhibited no significant variations ( $P > 0.05$ ) in adhesive ability to Caco-2 cells despite differences in cell preparations. Moreover, it was observed that carriers of probiotic bacteria were involved in affecting the viability and functionality of probiotics during storage and throughout the simulated GI system [53]. Kos et al. [54] studied the effect of whey protein concentrate (WPC) on the viability of *L. acidophilus* M92, and found that addition to WPC may protect the cells from the low pH of simulated gastric juice, and even higher concentrations of bile salts. In addition, Madureira et al. [48] proposed that whey cheese matrices as a probiotic vehicle were shown to protect *L. casei*, *L. acidophilus*, and *B. animalis* during *in vitro* simulated digestion, compared with their performance in plain MRS medium. Saarela et al. [32] also reported that acid and bile tolerances were better in freeze-dried *B. animalis* subsp. *lactis* F2010 added to pasteurized milk compared with those in phosphate-buffered saline or juice held at 4°C over two weeks. Therefore, several factors may influence the ability of the probiotics to survive in the product and become active when entering the consumer's GI tract. In this regard, the interactions of probiotics with the food matrix or the starter culture, pH, acidity, temperature, and oxygen content of the product are also important.

Probiotic strains selected for commercial application in foods must retain the characteristics for which they were originally selected [5]. In this report, even though the strains encountered potentially stressful conditions throughout the manufacturing processes and biological barriers during the GI transit, BF052 still maintained its original characteristics. These included the characteristics of survival and tolerance during manufacture and after consumption, and during transit through the stomach and small intestine until adherence to the intestinal epithelium. Therefore, it is anticipated that BF052 retains its probiotic functionality and remains viable at levels necessary to provide health benefits to consumers. However, *in vivo* investigations are still necessary to fully validate its beneficial roles to the health of human hosts.

## Conclusion

It is crucial to investigate interesting strain characteristics in terms of safety and functional aspects for probiotic potential. In this regard, resistance of strains against production, storage, and GI tract stresses is of prime importance. This research demonstrated that *B. animalis* BF052 displayed promising probiotic properties and exhibited resilience to adverse conditions not only during industrial processes but also under GI environments before adherence to the intestinal epithelium to exert health-promoting benefits there. Therefore, *B. animalis* BF052 studied in this research is a potential probiotic candidate for further development as an effective probiotic starter.

## Supporting Information

**S1 Table. Data for cell viability (log CFU/ml) in various products after 15 days storage.** (DOC)

## Acknowledgments

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) under the Royal Golden Jubilee PhD Program (Grant No. PHD/0076/2552). The authors thank staff of the Office of International Relations at Ubon Ratchathani University for assistance with English.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KJ SSJ PC. Performed the experiments: PC SSJ. Analyzed the data: KJ SSJ PC CP. Contributed reagents/materials/analysis tools: KJ SSJ CP SK. Wrote the paper: KJ PC.

## References

1. Peres CM, Alves M, Hernandez-Mendoza A, Moreira L, Silva S, Bronze MR, et al. (2014) Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT—Food Science and Technology* 59(1): 234–246.
2. Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Silva JP, Costa P, Amaral MH, et al. (2015) Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioprocess Technology* 9(3(0)): 90–97.
3. Mattila-Sandholm T, Mylläinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12(2–3): 173–182.
4. Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2007) From bacterial genome to functionality: case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 120(1–2): 2–12. PMID: [17623975](#)
5. Sharma P, Tomar SK, Goswami P, Sangwan V, Singh R (2014) Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International* 57(0): 176–195.
6. Du Toit E, Vesterlund S, Gueimonde M, Salminen S (2013) Assessment of the effect of stress-tolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 165(1): 51–56. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.022](#) PMID: [23688551](#)
7. Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, Ruas-Madiedo P, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG (2004) Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International* 37(9): 839–850.
8. Saarela M, Alakomi HL, Mättö J, Ahonen AM, Tynkkynen S (2010) Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis with improved stability in fruit juice. *LWT—Food Science and Technology* 44(4): 1012–1018.
9. Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A (2010) Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology* 21(2): 175–181. doi: [10.1016/j.copbio.2010.03.009](#) PMID: [20417089](#)
10. Solieri L, Bianchi A, Mottolese G, Lemmett F, Giudici P (2014) Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiology* 38(0): 240–249.
11. Maragkoudakis PA, Zoumpoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E (2006) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16(3): 189–199.
12. Pennacchia C, Vaughan EE, Villani F (2006) Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science* 73(1): 90–101. doi: [10.1016/j.meatsci.2005.10.019](#) PMID: [22062058](#)
13. Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY (2014) Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells. *Anaerobe* 28(0): 29–36.

14. Garcia-Ruiz A, Gonzalez de Llano D, Esteban-Fernandez A, Requena T, Bartolome B, Moreno-Arribas MV (2014) Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology* 44(0): 220–225.
15. Mäntö J, Alakomi HL, Vaari A, Virkajarvi I, Saarela M (2006) Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal* 16(9): 1029–1037.
16. Kaewnopparat S, Dangmanee N, Kaewnopparat N, Srichana T, Chulasiri M, Settharaksa S (2013) *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* 22(0): 6–13.
17. Sánchez B, Fernández-García M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Ruas-Madiedo P (2010) Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *International Dairy Journal* 20(11): 800–805.
18. Laparra JM, Sanz Y (2009) Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* 49(6): 695–701. doi: [10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x) PMID: [19843211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19843211/)
19. López P, Monteserín DC, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Suárez A, et al. (2012) Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different *in vitro* responses upon interaction with human cells. *Food Research International* 46(1): 99–107.
20. González-Rodríguez I, Ruiz L, Gueimonde M, Margolles A, Sánchez B (2013) Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters* 340(1): 1–10. doi: [10.1111/1574-6968.12056](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12056) PMID: [23181549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23181549/)
21. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8(3): 171–184. doi: [10.1038/nrmicro2297](https://doi.org/10.1038/nrmicro2297) PMID: [20157338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20157338/)
22. O'Toole PW, Cooney JC (2008) Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*: 1–9.
23. Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT (2010) Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe* 16(6): 578–585. doi: [10.1016/j.anaerobe.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.003) PMID: [20951815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20951815/)
24. Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Solís G, Salminen S, de los Reyes-Gavilán CG, et al. (2011) Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology* 149(1): 28–36. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.036](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.036) PMID: [21109322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21109322/)
25. Ammor MS, Belén Flórez A, Mayo B (2007) Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 24(6): 559–570. PMID: [17418306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17418306/)
26. D'Amico M R, Modesto M, Biavati B (2007) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology* 115(1): 35–42. PMID: [17198739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17198739/)
27. Bujnakova D, Strakova E, Kmet V (2014) *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe* 29(0): 118–127.
28. Strompfová V, Lauková A (2013) Isolation and characterization of faecal bifidobacteria and lactobacilli isolated from dogs and primates. *Anaerobe* 29: 108–112. doi: [10.1016/j.anaerobe.2013.10.007](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.10.007) PMID: [24239978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24239978/)
29. Ibrahim SA, Bezkorovainy A (1993) Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. *Journal of Food Protection* 56(8): 713–715.
30. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshim K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. (2001) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 409(7331): 543–547.
31. Liu G, Song Z, Yang X, Gao Y, Wang C, Sun B (2016) Antibacterial mechanism of bifidocin A, a novel broad-spectrum bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04. *Food Control* 62: 309–316.
32. Chaikham P (2015) Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. *Food Bioscience* 12: 61–66.
33. Saarela M, Virkajarvi I, Alakomi H L, Sigvar-Mattila P, Mäntö J (2006) Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16(12): 1477–1482.
34. Vinderola G, Zacarias MF, Bockelmann W, Neve H, Reinheimer J, Heller K J (2012) Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology* 30(1): 274–280. doi: [10.1016/j.fm.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.004) PMID: [22265312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22265312/)



35. Nualkaekul S, Salmeron I, Charalampopoulos D (2011) Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry* 129(3): 1037–1044. doi: [10.1016/j.foodchem.2011.05.071](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.071) PMID: [25212334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25212334/)
36. Pimentel TC, Madrona GS, Garcia S, Prudencio SH (2015) Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT—Food Science and Technology* 63(1): 415–422.
37. Sheehan VM, Ross P, Fitzgerald GF (2007) Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8(2): 279–284.
38. Farnworth ER, Mainville I, Desjardins MP, Gardner N, Fliss I, Champagne C (2007) Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology* 116(1): 174–181. PMID: [17292991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17292991/)
39. Wang YC, Yu RC, Chou CC (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soy-milk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology* 93(2): 209–217. PMID: [15135959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15135959/)
40. Heller KJ (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Society for Clinical Nutrition* 73(2): 374s–379s.
41. Zhao G, Zhang G (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* 99(2): 333–338. PMID: [16033464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16033464/)
42. Khoramnia A, Abdullah N, Liew SL, Siew CC, Ramasamy K, Ho YW (2011) Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Animal Science Journal* 82(1): 127–135. doi: [10.1111/j.1740-0929.2010.00804.x](https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00804.x) PMID: [21269371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21269371/)
43. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10): 835–847.
44. Huang L, Lu Z, Yuan Y, Lu F, Bie X (2006) Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33(1): 55–61. PMID: [16244855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16244855/)
45. Shamekhi F, Shuhaimi M, Ariff A, Manap Y (2013) Cell viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* under freeze-drying, storage and gastrointestinal tract simulation conditions. *Folia Microbiologica* 58(2): 91–101. doi: [10.1007/s12223-012-0183-9](https://doi.org/10.1007/s12223-012-0183-9) PMID: [22843029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22843029/)
46. Santivarangkna C, Higl B, Foerst P (2008) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology* 25(3): 429–441. doi: [10.1016/j.fm.2007.12.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.004) PMID: [18355668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18355668/)
47. Pimentel TC, Madrona GS, Prudencio SH (2015) Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: sensory profile and acceptability. *LWT—Food Science and Technology* 62(1): 838–846.
48. Madureira AR, Amorim M, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX (2011) Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 44(1): 465–470.
49. Collado M. C, Gueimonde M, Sanz Y, Salminen S (2006) Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *Journal of Food Protection* 69: 1675–1679. PMID: [16865903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16865903/)
50. Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S (2007) Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile—a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 113: 228–232. PMID: [16842877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16842877/)
51. Sánchez B, Ruiz L, Gueimonde M, Rus-Mediedo P, Margolles A (2013) Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research* 69(1): 127–136. doi: [10.1016/j.phrs.2012.11.004](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.004) PMID: [23178557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23178557/)
52. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mäntö J, Mattila-Sandholm T (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3): 197–215. PMID: [11164262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11164262/)
53. Madureira AR, Pereira CI, Truszkowska K, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX (2005) Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal* 15(6–9): 921–927.
54. Kos B, Suskovic J, Goreta J, Matosic S (2000) Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology* 38: 121–127.

## ประวัติคณะผู้วิจัย

### ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายเขมวิทย์ จันตะมา  
(ภาษาอังกฤษ) Mr. KAEMWICH JANTAMA  
เลขหมายประจำตัวประชาชน 3501900644622
2. ตำแหน่งปัจจุบัน  
รองศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ  
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี  
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ 044-22 4562; โทรสาร 044-22 4150, 044-22 4154  
E-mail: kaemwich@sut.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถานศึกษา	วิชาเอก
ปริญญาตรี	2541	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Chiang Mai University)	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) B.Sc. (Food Science and Technology)
ปริญญาโท	2544	มหาวิทยาลัยมหิดล (Mahidol University)	อณูพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ M.Sc. (Molecular Genetics and Genetic Engineering)
ปริญญาโท	2547	University of Florida, USA	วิศวกรรมเคมี M.E. (Chemical Engineering)
ปริญญาเอก	2551	University of Florida, USA	วิศวกรรมเคมี Ph.D. (Chemical Engineering)

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ  
Metabolic Engineering and Evolution, Fermentation Technology, Molecular Genetics and Genetic Engineering, and Protein Expression
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
  - ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย ... การขยายขนาดการผลิตของ 2,3-บิวเทนไดออล และการแยกบริสุทธิ์.....

○ **หัวหน้าโครงการวิจัย :**

ชื่อโครงการวิจัย วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* เพื่อผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์

ชื่อโครงการวิจัย Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media

ชื่อโครงการวิจัย การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซัคซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกลง

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตกรดซัคซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซัคซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*

ชื่อโครงการวิจัย การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเด็กซ์ทรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลาย ด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากขานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซัคซินิก

○ **งานวิจัยที่กำลังทำ :**

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. เพื่อใช้ในเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก

แหล่งทุน: โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก)

สถานะภาพในการทำวิจัย : อยู่ในระหว่างขั้นตอนการดำเนินงานแล้วเสร็จ 90%

○ **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :**

ชื่อโครงการวิจัย วิศวกรรมกระบวนการสร้างและสลายของเชื้อจุลินทรีย์ *Klebsiella oxytoca* เพื่อผลิตกรดซัคซินิกบริสุทธิ์

แหล่งทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ชื่อโครงการวิจัย การดัดแปลงเมตาบอลิกของ *Klebsiella oxytoca* เพื่อนำไปสู่การผลิตกรดซัคซินิกที่มีอัตราการผลิต และผลผลิตสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกลง

แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์ย่อยของกากขานอ้อยเพื่อการผลิตกรดซัคซินิก

แหล่งทุน: โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก)

ชื่อโครงการวิจัย Production of Lactic Acid by Metabolic Engineered *Klebsiella oxytoca* in Mineral Salts Media

แหล่งทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตกรดซัคซินิกจากน้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาลอ้อย

แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

**ชื่อโครงการวิจัย** การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซึกซินิกจากกระบวนการหมักแบบกะจากเชื้อ  
*Actinobacillus succinogenes*  
**แหล่งทุน:** สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ

**ชื่อโครงการวิจัย** การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซึกซินิกจากกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง  
**แหล่งทุน:** สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

**ชื่อโครงการวิจัย** การผลิต 2,3-บิวเทนไดออล จากมอลโตเดรกซ์ตรินโดยเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* KMS005 ที่ผ่านการดัดแปลงวิถีกระบวนการสร้างและสลายด้วยระบบการหมักแบบกะและกึ่งกะ  
**แหล่งทุน:** สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

### ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

- ชื่อ นางศิริมา สุวรรณกุล นามสกุล จันทะมา  
Name : Mrs. Sirima Suvarnakuta Last name : Jantama
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3341500897428
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ตำบลเมืองศรีไค อำเภวารินชำราบ จังหวัด อุบลราชธานี 34190  
โทรศัพท์ 045-353617 โทรสาร 045-353626  
E-mail: sirima.s@ubu.ac.th

### 5. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ชื่อปริญญา	สาขา	ปีที่สำเร็จการศึกษา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
ปริญญาตรี	ภบ.	เภสัชศาสตร์	2541	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	ไทย
ปริญญาเอก	ปร.ด.	เภสัชศาสตร์ชีวภาพ	2549	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

### 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เภสัชจุลชีววิทยา (Pharmaceutical Microbiology), อณูชีววิทยา (Molecular biology) และพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (Microbial genetic)

### 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :  
ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

**ชื่อโครงการวิจัย** การแสดงออกและการทดสอบคุณสมบัติของไฮโดรโฟบิน NRH1 จากรากอโรค  
ในแมลง *Nomuraea rileyi*

**แหล่งทุน:** สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

**ชื่อโครงการวิจัย** การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียชื่อ *Acinetobacter*

*baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี  
**แหล่งทุน:** มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551  
**ชื่อโครงการวิจัย** การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซัคซินิกจากกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยว  
 เอื้อง

**แหล่งทุน:** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

### 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

**ชื่อโครงการวิจัย** การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียดื้อยา *Acinetobacter*  
*baumannii* ที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี  
**แหล่งทุน:** มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551  
**ชื่อโครงการวิจัย** การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดซัคซินิกจากกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยว  
 เอื้อง

**แหล่งทุน:** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

### 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ :

ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัย  
 ลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

**ชื่อโครงการวิจัย** การแสดงออกและการทดสอบคุณสมบัติของไฮโดรโฟบิน NRH1 จากราก่อโรค ใน  
 แมลง *Nomuraea rileyi*

**แหล่งทุน:** สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

**สถานภาพในการวิจัย :** หัวหน้าโครงการวิจัย งานวิจัยดำเนินงานไปแล้ว 80%

**ชื่อโครงการวิจัย** การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์คาร์บาพิเนมและยีนดื้อยาในเชื้อแบคทีเรีย  
*Acinetobacter baumannii* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มคาร์บาพิเนมที่แยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาล  
 สรรพสิทธิประสงค์

**แหล่งทุน:** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557-2558

**สถานภาพในการวิจัย :** หัวหน้าโครงการวิจัย งานวิจัยดำเนินงานไปแล้วเสร็จ