ศักยภาพความเป็นโพรไบโอติกของ *Bifidobacterium animalis* ที่คัดแยกได้จากมนุษย์และสัตว์

Probiotic Potential of *Bifidobacterium animalis* Isolated from Humans and Animals

สังวาลย์ หาญกล้า[1] และ พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์[2*]

Sungwarn Hankla[1] and Patcharanan Amornrattanapan[2*]

[1]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2]*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1]*Program in Biological Sciences, Faculty of Science, Burapha University*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 16 April 2017

Accepted : 27 June 2017

Published online : 26 July 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกและจำแนก *Bifidobacterium* spp. จากเด็กทารก ไก่ และสุกร ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของ *Bifidobacterium* spp. ที่คัดแยกได้ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลท ที่มีลักษณะทางสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับ *Bifidobacterium* spp. และมีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *B. animalis* เมื่อพิจารณาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เมื่อศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของ *B. animalis* พบว่ามี 3 สายพันธุ์ (H1-05, H9-01, H9-02) ที่คัดแยกจากอุจจาระเด็กทารก และ 1 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากมูลลูกสุกร (P8-S01) ที่มีศักยภาพโดดเด่นสำหรับนำไปใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยพบการรอดชีวิตมากกว่า 85 % ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดที่ค่า pH 2.0 และในสภาวะที่มีน้ำดีความเข้มข้น 1 % มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้อยู่ในระดับสูงและสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ สายพันธุ์ P8-S01 มีลักษณะเด่น คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน

คำสำคัญ : *Bifidobacterium animalis* โพรไบโอติก เด็กทารก ไก่ สุกร

***Corresponding author. E-mail** : patcharanan@go.buu.ac.th

Abstract

This research aimed to isolate and identify *Bifidobacterium* spp. from infants, chickens, and swines. Probiotic properties of isolated *Bifidobacterium* spp. strains were also evaluated. Total number of 16 bacterial isolates inherited morphological and biochemical characteristics of *Bifidobacterium* spp. were retrieved and they were closely related to *B. animalis* based on phylogenetic analysis of 16S rRNA. Investigation of probiotics properties revealed that strains that were isolated from infants' faeces (H1-05, H9-01 and H9-02) and from piglet stool samples (P8-S01) showed the best characteristics of probiotics since they had over 85% survival rate after exposure to acidic (pH 2.0) and 1% oxgall conditions. They showed high adhesion efficiency to intestinal mucus and they were able to survive at the maximum temperature of 60^{O}C. In addition, strain P8-S01 was able to grow in aerobic conditions.

Keywords : *Bifidobacterium animalis*, probiotics, infants, chickens, swines

บทนำ

แม้ว่าการผลิตและการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ของไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงพบปัญหาและอุปสรรคหลายอย่าง เช่น การระบาดของโรคในไก่ ปัญหาโรคปากและเท้าเปื่อย โรคท้องร่วงติดต่อในสุกร (BAAC research and development center, 2016; Krungsri research, 2016) จากการพบยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ ตลอดจนการตระหนักถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก ทำให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกใหม่ทดแทนยาปฏิชีวนะที่เมื่อเลี้ยงสัตว์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานส่งผลให้จุลินทรีย์ในลำไส้เกิดการดื้อยา เกิดความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และอาจมียาปฏิชีวนะตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Landers *et al*., 2012) คุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก คือ จะต้องสามารถรอดชีวิตได้ในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ซึ่งมีทั้งสภาวะที่เป็นกรดจากน้ำย่อยกระเพาะอาหารไปจนถึงสภาวะที่มีน้ำดีในลำไส้เล็ก และจะต้องสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ได้จึงจะไปช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคโดยการป้องกันการครอบครองพื้นที่และการรุกรานของเชื้อก่อโรค ตลอดจนการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Williams *et al*., 2001) นอกจากนี้แล้วการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และสัตว์จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติที่นอกเหนือจากคุณสมบัติโพรไบโอติกเนื่องจากในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก เช่น การทำ spray drying หรือ freeze drying นั้นมีขั้นตอนที่เซลล์จุลินทรีย์ต้องสัมผัสกับออกซิเจนและอุณหภูมิสูง (Simpson, Stanton, Fitzgerald, & Ross, 2005) ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องสามารถรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์หลังจากผ่านกระบวนการดังกล่าวได้ อีกทั้งยังต้องมีจำนวนเซลล์มีชีวิตปริมาณมากเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์ (Morelli & Lucio, 2012) สำหรับประเทศไทย สายพันธุ์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เติมในอาหารสำหรับสัตว์และมนุษย์จะต้องมีรายชื่อตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และประกาศกระทรวงสาธารณสุข ตามลำดับ โดยมีปริมาณไม่น้อยกว่า 10^5 CFU/อาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม (MOAC, 2016) และมีปริมาณไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/อาหารสำหรับมนุษย์ 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหาร (MOPH, 2011)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่หลายจีนัส เช่น *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* และ *Bacillus* (Gaggia *et al*., 2010) ซึ่งถูกนำมาใช้ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารของมนุษย์และสัตว์ หลายสปีชีส์ของ Bifidobacteria เช่น *B. infantis, B. adolescentis, B. animalis* subsp*. animalis, B. animalis* subsp*. lactis, B. bifidum, B. longum* และ *B. breve* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของมนุษย์ (Fijan, 2014; Song *et al*., 2012) แต่ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในประเทศไทยยังพบได้น้อย เนื่องจาก *Bifidobacterium* spp. มักจะมีความจำเพาะต่อการเจริญหลายอย่าง *Bifidobacterium* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างท่อนหลายแบบ จัดเป็นจุลินทรีย์ Anaerobes แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Zhang *et al*., 2016) และเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ตลอดจนมูลของสัตว์ เช่น ไก่ สุกร และอุจจาระของเด็กทารก (Ventura *et al*., 2001; Bottacini *et al*., 2014)

การค้นหาและคัดเลือก *Bifidobacterium* spp. ที่มีคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ตามเกณฑ์หลักของจุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้นเป็นหัวใจสำคัญสำหรับการนำ *Bifidobacterium* spp. ไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และการศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในสภาวะต่าง ๆ จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ปรับสภาวะต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตเพื่อให้แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตได้ตามต้องการ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจำแนก *Bifidobacterium* spp. จากเด็กทารก ไก่และสุกรในจังหวัดชลบุรี และตรวจสอบคุณสมบัติของโพรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ความสามารถในการทนกรดและน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน และความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สภาวะในการเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp.

เก็บตัวอย่างที่ศึกษาและเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่เกิดจากการใช้ซองผลิตก๊าซเพื่อเลี้ยงเชื้อ Anaerobes (Mitsubishi Gas Chemical, AnaeroPack®-Anaero) ใน AnaeroPack Rectangular Jar

2. การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp.

2.1 ตัวอย่างและขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง (ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในคนและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์และคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

เก็บตัวอย่างอุจจาระเด็กทารกแรกเกิดถึงอายุ 5 เดือนจากจังหวัดชลบุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้ Cotton swab ป้ายอุจจาระประมาณ 1-2 กรัม ใส่ใน Thioglycollate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างลำไส้ไก่ส่วนต่าง ๆ (ลำไส้เล็กส่วนต้น ลำไส้เล็กส่วนกลาง ลำไส้เล็กส่วนปลายและไส้ตัน) จากไก่พื้นเมือง จำนวน 10 ตัว ที่ซื้อจากตลาดในจังหวัดชลบุรี โดยการผ่าซากไก่แล้วนำลำไส้ไก่ไปใส่ใน Thioglycollate broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างมูลแม่สุกร มูลลูกสุกรและน้ำนมสุกร จากฟาร์มสุกรในจังหวัดชลบุรีอย่างละ 10 ตัวอย่าง โดยเก็บใส่ในถุงพลาสติก บรรจุตัวอย่างทั้งหมดลงใน AnaeroPack Rectangular Jar ในสภาวะไร้ออกซิเจน ก่อนนำไปคัดแยกเชื้อ

2.2 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp.

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลาย Anaerobic dilution buffer จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ไป Spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium medium (BM agar) (DSMZ GmbH) ที่เติม Bifido selective supplement A (FD250) (Himedia) นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥ 1 มิลลิเมตร (Simpson *et al*., 2004) ตัวอย่างละ 10-20 โคโลนี

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ

นำเชื้อแบคทีเรียมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยการย้อมแกรม ย้อมสปอร์ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase การรีดิวซ์ไนเตรต การสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส การทดสอบคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลฟรุกโตสแบบ homofermentative /heterofermentative และการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK)

4. การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™Genomic DNA kits (Invitrogen) เก็บรักษาดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.1 การเพิ่มชิ้นส่วนบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของจีนัส Bifidobacteria คือ ไพรเมอร์ Bif164-f (5'-GGG TGG TAA TGC CGG ATG-3') และ Bif662-r (5'-CCA CCG TTA CAC CGG GAA-3') (Kok *et al*., 1996) ดำเนินปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermocycler โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ; 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 66 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ; และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตรวจสอบ PCR products ขนาด 520 คู่เบส ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรส 1.2% ที่ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน 1 X TAE buffer และใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV Transilluminator (Sambrook & Russell, 2001)

4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำ PCR products มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PureLink™ Quick PCR purification kit (Invitrogen) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม FinchTV (version 1.4.0) และ BioEdit (version 7.2.5.0) แล้วนำไป Blast (www.ncbi.nim.gov/BLAST/) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ribosomal RNA sequences และดำเนินการระบุสปีชีส์โดยใช้ % similarity ตั้งแต่ 99% ขึ้นไป จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปจัดเรียงแบบ Multiple sequence alignment โดยใช้ CLUSTAL W (version 1.6) แล้วสร้างแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA (version 7.0) โดยใช้วิธี Neighbor-joining และทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrap 1000 ซ้ำ

5. การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก

ทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกในด้านต่างๆ โดยใช้ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ต้นแบบ (Type strain) ของ *B. animalis* ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Loquasto *et al*., 2011) และมีรายงานการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกมาก่อน (Chae & Jhon, 2006) และใช้ *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 เป็น positive control และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 เป็น negative control สำหรับการทดสอบความสามารถในการยึด

เกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ เนื่องจากมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่า *Salmonella* Enteritidis และ *Bacillus subtilis* มีและไม่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ตามลำดับ (Lertworapreecha, 2007)

5.1 ความสามารถในการทนกรด (ดัดแปลงจาก Erkkila & Petaja, 2000)

ทดสอบโดยปิเปต *Bifidobacterium* spp. ที่เลี้ยงใน BM broth ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 CFU/ml ซึ่งได้มาจากการนับจำนวนเชื้อบน BM agar โดยวิธี spread plate) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ไปใส่ในสารละลาย PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีค่า pH แตกต่างกัน ได้แก่ pH 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 และมี Pepsin ความเข้มข้น 0.3 % เก็บตัวอย่างเซลล์ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง มาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร BM agar และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากสมการดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต = $(N/ N_0) \times 100$

เมื่อ N = ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต ณ เวลาใดๆ (CFU/ml)

N_0 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง (CFU/ml)

5.2 ความสามารถในการทนน้ำดี (ดัดแปลงจาก Chung *et al*., 1999)

ทดสอบโดยปิเปตเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ที่เลี้ยงใน BM broth ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 CFU/ml) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ไปใส่ใน BM broth (pH 5.0) ที่เติม oxgall bile (Merck KGaA, ประเทศเยอรมนี) ความเข้มข้น 0, 0.30 และ 1 % หลอดละ 10 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง มาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร BM agar และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

5.3 ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ (ดัดแปลงจาก Ehrmann *et al*., 2002 และ Lertworapreecha, 2007)

ทดสอบโดยนำเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ที่เลี้ยงใน BM broth ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.5×10^8 CFU/ml จากนั้นปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี Mucus ที่เตรียมจากลำไส้ไก่ซึ่งละลายใน 50 mM Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะออกด้วย PBS ที่เติม Tween 20 (0.05 %) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง เท PBS ทิ้ง เก็บเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะโดยเติม Anaerobic dilution buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลอดแล้วนำไปตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร BM agar และคำนวณหาประสิทธิภาพในการยึดเกาะได้ของแบคทีเรียจากสมการดังต่อไปนี้

ประสิทธิภาพในการยึดเกาะได้ของแบคทีเรีย (%) = $(N/ N_0) \times 100$

เมื่อ N = ปริมาณแบคทีเรียที่ยึดเกาะได้ (CFU/ml)

N_0 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/ml)

5.4 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (ดัดแปลงจาก Maxwell *et al*., 2004)

ทดสอบโดยปิเปตเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ที่เลี้ยงใน BM broth ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 CFU/ml) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด จากนั้นแบ่งหลอด BM broth จำนวน 3 หลอด ไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน และ

อีก 3 หลอด ไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และคำนวณค่าความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (RBGR = relative bacteria growth ratio) จากสมการดังต่อไปนี้

$$RBGR = \frac{OD_{630} \text{ ในสภาวะที่มีออกซิเจน}}{OD_{630} \text{ ในสภาวะไร้ออกซิเจน}}$$

5.5 ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง (ดัดแปลงจาก Simpson *et al*., 2005)

ทดสอบโดยปิเปตเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ที่เลี้ยงใน BM broth (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 CFU/ml) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ไปใส่ใน BM broth ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 42, 52, 55, 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 30 และ 60 นาที มาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร BM agar และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

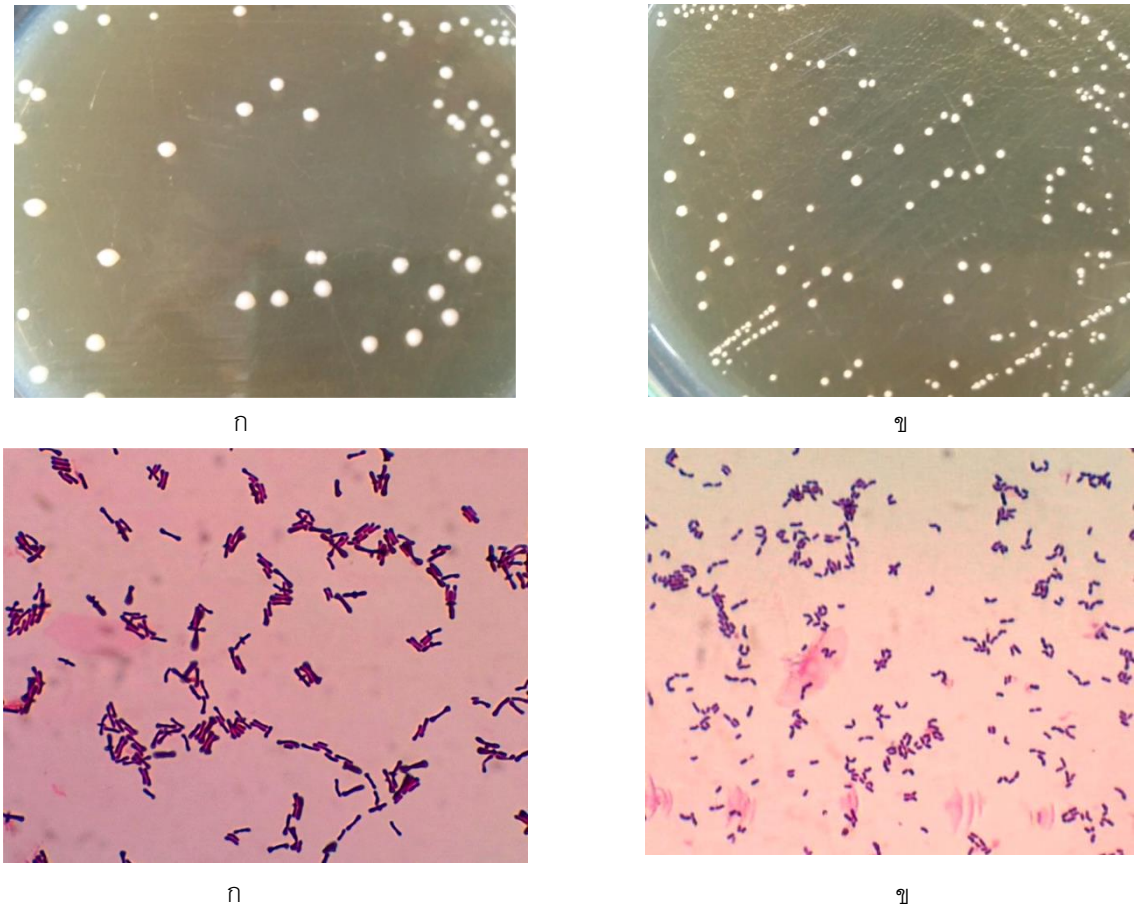
1. การคัดแยก การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและการเคลื่อนที่ของ *Bifidobacterium* spp.

จากตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาคัดแยกเชื้อ *Bifidobacterium* spp. บนอาหาร BM agar ที่เติม FD250 ซึ่งเป็นอาหารคัดเลือกสำหรับ *Bifidobacterium* spp. เนื่องจากมี mupirocin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มอื่น ได้แก่ lactobacilli, bacilli, enterococci และ streptococci (Simpson *et al*., 2004) พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด จำนวน 16 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากมูลสุกร จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ P1-P01, P4-S01, P4-S03, P8-S03 P8-P01 และ P9-P01 และคัดแยกได้จากอุจจาระเด็กทารก จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 โดยทั้ง 16 ไอโซเลทนี้ มีลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบเรียบ เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก รูปท่อนคล้ายกระบองและรูปตัววี เรียงตัวเป็นแนวคล้ายรั้ว ไม่สร้างสปอร์ ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bifidobacterium* spp. และเมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการเคลื่อนที่ พบว่าทุกไอโซเลทมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับคุณสมบัติของ *Bifidobacterium* spp. กล่าวคือ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase ไม่รีดิวซ์ไนเตรต ผลิตกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส หมักน้ำตาลฟรุกโตสแบบ Heterofermentative และมีกิจกรรมของเอนไซม์ F6PPK อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ ไม่พบ *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ไก่และน้ำนมสุกร ซึ่งเป็นไปได้ว่าการแพร่กระจายของ *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ไก่อาจมีอยู่น้อย เนื่องจากแบคทีเรียที่พบเป็นหลักในลำไส้ไก่มักเป็นแบคทีเรียในไฟลัม *Firmicutes* (เช่น *Lactobacillus* spp.) รองลงมาคือแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* และ *Bacteroidetes* ในขณะที่แบคทีเรียในไฟลัม *Actinobacteria* (ซึ่ง *Bifidobacterium* spp. จัดอยู่ในไฟลัมนี้) พบอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก (Waite & Taylor, 2014) และถึงแม้ว่าจะมีรายงานการคัดแยก *Bifidobacterium* spp. จากน้ำนมของมนุษย์มาก่อน (Arboleya *et al*., 2011) แต่ก็ยังไม่เคยมีรายงานการพบ *Bifidobacterium* spp. ในน้ำนมสุกร ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นเช่นเดียวกัน

2. การระบุสปีชีส์ของ *Bifidobacterium* spp. โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลท มาเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r พบ PCR products ขนาดประมาณ 520 คู่เบส จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 16 ไอโซเลทเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ เช่น ไอโซเลท H1-05, H9-01, H9-02, H9-06 ที่แสดงในภาพที่ 2 (แสดงผล PCR ของบางไอโซเลท)

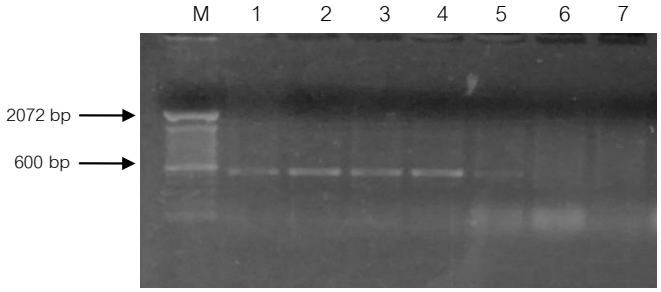
เมื่อนำ PCR products ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอุจจาระเด็กทารก จำนวน 10 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 และไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างสุกร จำนวน 4 ไอโซเลท คือ P1-P01, P4-S01, P4-S03 และ P8-S03 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายคลึง 100% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* YIT 4121 ส่วนอีก 2 ไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างสุกร คือ P8-P01 และ P9-P01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึง 99% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* YIT 4121 และเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องของการระบุแทกซอนโดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของทั้ง 16 ไอโซเลท กับ Bifidobacteria สปีชีส์ต่างๆ ที่เป็น Type strains และใช้ *Gardnerella* เป็น outgroup เนื่องจากเป็นจีนัสที่อยู่ใน Family เดียวกันกับ Bifidobacteria จึงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุดกับ Bifidobacteria พบว่าทั้ง 16 ไอโซเลทจัดอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับ *B. animalis* subsp. *lactis* และ *B. animalis* subsp. *animalis* ดังแสดงในภาพที่ 3 จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงระบุได้ว่าทั้ง 16 ไอโซเลทมีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *B. animalis* และแม้ว่าผลการศึกษาครั้งนี้ ดูเหมือนว่าจะขาดความหลากหลายของสปีชีส์ที่พบ แต่ก็เคยมีรายงานการคัดแยก *B. animalis* ได้จากโฮสต์ที่แตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นจากเด็กทารกและสุกรมาก่อนหน้านี้เช่นกัน โดย Kharchenko *et al*. (2015) ได้ คัดแยกและจำแนก *B. animalis* จากอุจจาระเด็กทารกแรกเกิด ในขณะที่ Zhang *et al*. (2016) รายงานการคัดแยกและจำแนก *B. animalis* จากมูลสุกรพันธุ์ Guizhou Xiang



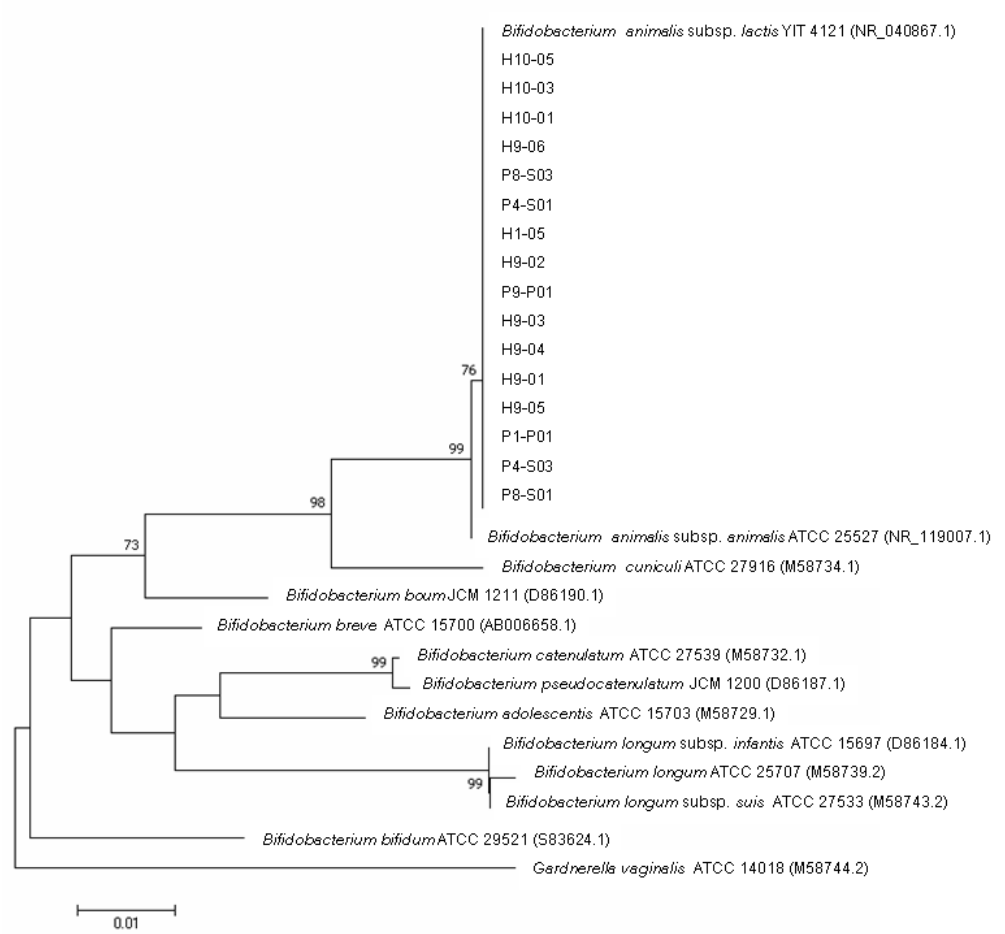
ก ข

ก ข

ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีและเซลล์ที่ผ่านการย้อมแกรมของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-01 (ก) และ P1-P01 (ข) ที่คัดแยกจากอุจจาระเด็กทารกและมูลแม่สุกร ตามลำดับ โดยเซลล์เจริญบนอาหาร BM agar ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (กำลังขยายรวม 1000 เท่า)



ภาพที่ 2 ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดย M,Marker = 100 bp DNA ladder, lane 1 = *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, lane 2 = H1-05, lane 3 = H9-01, lane 4 = H9-02, lane 5 = H9-06, lane 6 = No template control, lane 7 = No primer control



ภาพที่ 3 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากการศึกษานี้เปรียบเทียบกับ Bifidobacteria สปีชีส์ต่างๆ และมี *Gardnerella vaginalis* เป็น outgroup แผนภูมินี้ถูกสร้างขึ้นบนโปรแกรม MEGA (version 7.0) ด้วยวิธี Neighbor-joining และทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี Bootstrap 1000 ซ้ำ

3. การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

3.1 ความสามารถในการทนกรด

B. animalis ทุกสายพันธุ์สามารถทนกรดที่ pH 2.0-5.0 ในสภาวะที่มี Pepsin ความเข้มข้น 0.3% ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง โดยบางสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเมื่อมีความเป็นกรดสูงขึ้น ในขณะที่ สายพันธุ์อื่นมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ใกล้เคียงกันสำหรับทุกค่า pH ที่ทดสอบ และพบว่ามี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ H1-05, H9-01, H9-02, H9-06, P4-S03 และ P8-S01 ที่สามารถทนกรดที่ pH 2.0 ได้ในระดับดีมากโดยมีเซลล์ที่รอดชีวิตไม่ต่ำกว่า 87% และพบว่าสายพันธุ์ H1-05 และ H9-02 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิง (*B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100.66 และ 100.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ความสามารถในการทนกรดของ *B. animalis* แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน โดย Zuo *et al.* (2016) รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 สามารถทนสภาวะกรดของน้ำย่อย

กระเพาะอาหารจำลองที่มีค่า pH 2.5 และมี pepsin 0.3 % เป็นเวลา 1 ชั่วโมงได้โดยมีเซลล์ที่รอดชีวิต 70.13±0.26% ในขณะที่ Presti *et al*. (2015) พบว่า *B. animalis* subsp. *lactis* PBS 075 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงในสภาวะที่มี ค่า pH เท่ากับ 2.0 เมื่อเปรียบเทียบกับ pH 3.0, 4.0 และ 5.0 ที่เวลา 180 นาที

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *B. animalis* สายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะที่เป็นกรด เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

สายพันธุ์	% การรอดชีวิต หลังจากเผชิญสภาวะกรด			
	ที่ pH 2.0	ที่ pH 3.0	ที่ pH 4.0	ที่ pH 5.0
H1-05	100.66	104.11	102.68	105.11
H9-01	88.74	93.43	92.61	95.60
H9-02	100.14	100.08	99.52	99.87
H9-03	60.11	84.25	90.95	95.95
H9-04	77.99	94.76	93.98	93.11
H9-05	76.41	95.78	93.47	96.61
H9-06	96.83	104.95	105.65	107.99
H10-01	80.00	102.41	111.82	109.54
H10-03	59.91	80.81	86.81	97.64
H10-05	82.19	93.52	98.77	99.71
P1-P01	68.62	98.34	91.90	98.77
P4-S01	53.55	85.13	94.23	94.10
P4-S03	91.29	102.28	100.58	100.00
P8-S01	87.05	97.05	96.41	94.44
P8-S03	84.46	96.69	92.40	94.44
P9-P01	79.34	86.02	99.32	98.58
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	96.86	101.78	101.28	104.25

3.2 ความสามารถในการทนน้ำดี

B. animalis ทุกสายพันธุ์ สามารถทนสภาวะที่มีน้ำดีได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง โดยมี 10 สายพันธุ์ที่สามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ได้ในระดับดีมากโดยมีการรอดชีวิตไม่ต่ำกว่า 88 % และพบว่าสายพันธุ์ H9-04, P4-S01 และ P8-S01 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิง โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 98.88 105.11 และ 98.01 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นความสามารถในการทนน้ำดีของ *B. animalis* ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารละลายที่ใช้ทดสอบด้วย โดย Ranadheera *et al*. (2014) รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 สามารถรอดชีวิตได้นาน 240 นาที ในระบบน้ำย่อยจากลำไส้เล็กจำลองที่มีองค์ประกอบเป็น Pancreatin 0.1% ที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% และมีเกลือน้ำดี 0.3% ที่ pH 8.0 Zuo *et al*. (2016) รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ที่สัมผัสกับ Bile juice ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 45 มิลลิโมลาร์ Pancreatine 0.1% และ Oxgall 0.3% ที่ pH 8.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 0.46%

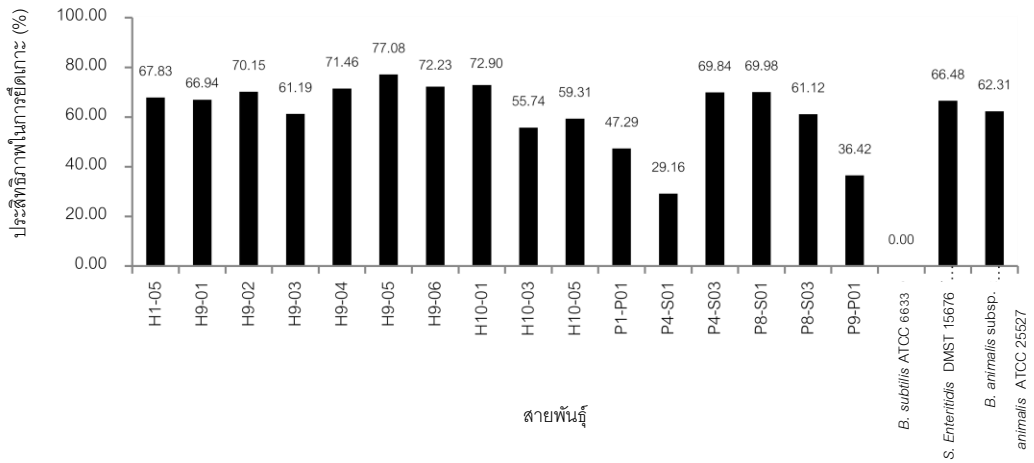
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *B. animalis* สายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะที่มีน้ำดี เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

สายพันธุ์	% การรอดชีวิต หลังจากเผชิญสภาวะที่มีน้ำดีความเข้มข้น		
	0 %	0.3 %	1 %
H1-05	103.09	102.17	94.80
H9-01	104.42	95.22	95.92
H9-02	96.94	97.19	97.24
H9-03	82.96	72.15	44.56
H9-04	93.16	100.15	98.88
H9-05	92.81	91.67	88.72
H9-06	97.18	88.91	88.15
H10-01	99.58	101.53	94.45
H10-03	99.14	100.74	83.50
H10-05	103.22	96.90	78.22
P1-P01	104.09	93.00	78.62
P4-S01	109.54	105.97	105.11
P4-S03	85.57	82.96	83.81
P8-S01	107.51	102.05	98.01
P8-S03	90.92	95.14	92.88
P9-P01	98.20	85.33	75.11
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	97.28	97.39	97.39

3.3 ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้

การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะโดยใช้เยื่อเมือกผนังลำไส้มีข้อได้เปรียบกว่าการศึกษาการยึดเกาะกับเซลล์เพาะเลี้ยงตรงที่เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ต้องใช้วัสดุอุปกรณ์หรือเครื่องมือเฉพาะทาง (Tassell & Miller, 2011) และงานวิจัยนี้ได้ใช้เยื่อเมือกผนังลำไส้จากไก่ในการทดสอบกับ *B. animalis* ทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากมนุษย์และสุกร เนื่องจากมีรายงานมาก่อนว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งที่อยู่ในจีนัส *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้โดยไม่แสดงความจำเพาะต่อโฮสต์ (Rinkinen *et al*., 2003; He *et al*., 2001) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยึดเกาะของ *B. animalis* ทุกสายพันธุ์ที่มาจากโฮสต์ที่แตกต่างกันกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ที่ถูกเตรียมด้วยวิธีเดียวกัน โดยจากผลการศึกษา พบว่า *B. animalis* จำนวน 11 สายพันธุ์ คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, P4-S03, P8-S01 และ P8-S03 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ในระดับสูง (>60%) มี 3 สายพันธุ์ คือ H10-03, H10-05 และ P1-P01 ที่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับปานกลาง (40-60%) และสายพันธุ์ P4-S01 และ P9-P01 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับต่ำ (<40%) ดังแสดงในภาพที่ 4 ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิง *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ 62.31% *S.* Enteritidis DMST 15676 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ 66.48% และ *B. subtilis* ATCC 6633 ไม่สามารถยึดเกาะได้ ซึ่งเป็นไปตามที่คาดการณ์เอาไว้ล่วงหน้าสำหรับสายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็น Positive control และ Negative control ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *B. animalis* ทั้งสายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากมนุษย์และสุกรสามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของไก่ได้ และพบว่า

ประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้มีค่าสูงกว่าที่มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Gueimonde *et al.* (2005) รายงานว่า *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของมนุษย์ได้แตกต่างกัน โดย *B. animalis* 4549dOX สามารถยึดเกาะได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 14.5±3.6 ในบัฟเฟอร์ที่ไม่เติมน้ำดี แต่ในบัฟเฟอร์ที่มีน้ำดี 0.3 % พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลงอยู่ที่ 10.1±1.2 และ Collado *et al.* (2007) รายงานว่า *B. breve* Bb99 และ *L. rhamnosus* GG สามารถยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของมนุษย์ได้แตกต่างกันโดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 2.5 และ 20 ตามลำดับ นอกจากนี้ Nishiyama *et al.* (2014) ได้ศึกษาการยึดเกาะของ *Bifidobacterium* จำนวน 22 สายพันธุ์กับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของสุกรด้วยวิธี Biacore assays พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ crude mucin และ purified mucin ได้แตกต่างกันโดย *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* PNC-2-9G ยึดเกาะกับ purified mucin ได้ดีที่สุด ในขณะที่ *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525 ยึดเกาะกับ purified mucin ได้ดีกว่า crude mucin สาเหตุที่ *Bifidobacterium* spp. สามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของของโฮสต์ได้นั้น อาจเป็นเพราะว่ามี mucus binding proteins หรือระยางค์ประเภท pili เป็นต้น (Tassell & Miller, 2011; Grimm *et al.*, 2014)

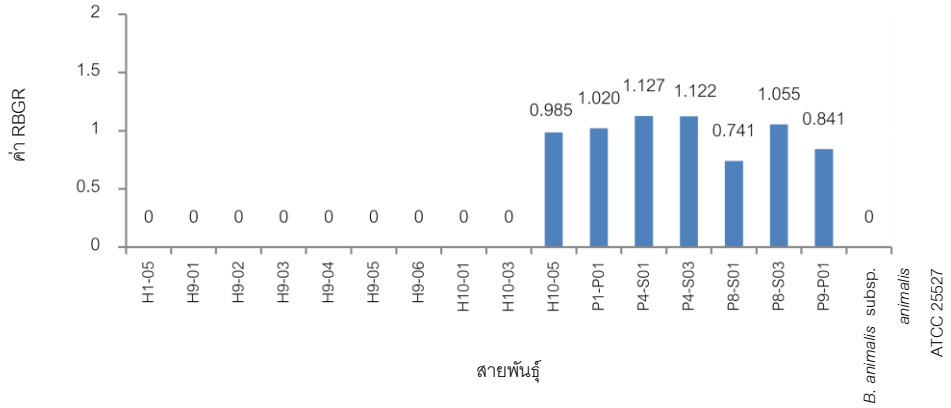


ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *B. animalis* สายพันธุ์ต่างๆ

3.4 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจนในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีการวัดค่า Optical density เนื่องจากเป็นวิธีที่มีรายงานมาก่อนว่าสามารถนำมาใช้วัดการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารเหลวได้อย่างรวดเร็วและทำได้ง่าย (Homayouni *et al.*, 2008) จากผลการศึกษา พบว่า *B. animalis* ที่แยกได้จากเด็กทารก จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ H10-05 สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ในขณะที่อีก 9 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับสายพันธุ์อ้างอิง ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยมีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ P1-P01, P4-S01, P4-S03 และ P8-S03 ที่สามารถเจริญได้ในระดับดี (RBGR >9) ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ คือ P8-S01 และ P9-P01 สามารถเจริญได้ในระดับปานกลาง (RBGR <9) ดังแสดงในภาพที่ 5 ถึงแม้ว่า *Bifidobacterium* spp. ส่วนใหญ่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจน 1-21 %

(Zhang *et al*., 2016) และความแตกต่างของระดับการทนออกซิเจนของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์นั้นขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัด Reactive oxygen species (ROS) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น NADH oxidase, NADH peroxidase และ Superoxide dismutase (Lee& O'Sullivan, 2010)



ภาพที่ 5 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนของ *B. animalis* สายพันธุ์ต่างๆ

3.5 ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง

ในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^5-10^6cfu/g หรือ cfu/ml จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีมาช่วยในกระบวนการผลิต เช่น spray drying ซึ่งมีขั้นตอนที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องสัมผัสกับอุณหภูมิสูง (60 องศาเซลเซียส) ซึ่งส่งผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ ไรโบโซมและดี เอ็นเอของจุลินทรีย์จะถูกทำลาย การศึกษานี้จะสามารถนำไปใช้ในการปรับสภาวะต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตเพื่อให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ (Simpson *et al*., 2005) เมื่อพิจารณาการรอดชีวิตในทุกอุณหภูมิที่ทดสอบโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่า 85 เป็นเกณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า *B. animalis* จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-04, P4-S01, P4-S03, P8-S01 และ P8-S03 สามารถทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ที่เวลาแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ P8-S01 สามารถทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้นานสูงสุดเป็นเวลา 30 นาที และพบว่ามีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ H9-03, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03, H10-05 และสายพันธุ์อ้างอิง สามารถทนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้ที่เวลาแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ H10-01 สามารถทนได้นานสูงสุด 60 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ P1-P01 และ P9-P01 ทนอุณหภูมิสูงได้ไม่ดีเท่ากับสายพันธุ์อื่น ๆ โดยสายพันธุ์ P1-P01 ทนได้ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และสายพันธุ์ P9-P01 ทนได้ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยสรุป จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เกือบทุกสายพันธุ์ของ *B. animalis* ยกเว้นไอโซเลท P1-P01 และ P9-P01 สามารถรอดชีวิตได้ดีที่อุณหภูมิสูงทั้งที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าที่รายงานไว้โดย Simpson *et al*. (2005) ที่รายงานว่า *Bifidobacterium* spp. แต่ละสปีชีส์มีระดับการทนอุณหภูมิสูงได้แตกต่างกันออกไป โดย *B. animalis* subsp. *animalis* DSMZ 20104, *B. animalis* subsp. *lactis* JCM 7117, *B. animalis* subsp. *lactis* DSMZ 20105 และ *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ในระดับสูงโดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.9±0.1, 65.4±6.9, 1.3±0.9 และ 1.2±0.2 ตามลำดับ และรายงานของ Bevilacqua *et al*. (2012) ที่พบว่า

B. animalis subsp. *lactis* DSMZ 10140 ไม่มีเซลล์ที่รอดชีวิตเหลืออยู่เลยหลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 3 ระยะเวลาในการทนอุณหภูมิสูงของ *B. animalis* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	ระยะเวลาที่เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ >85% (นาที) ที่อุณหภูมิ				ระดับความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง
	42 °C	52 °C	55 °C	60 °C	
H1-05	60	30	10	5	สูง
H9-01	60	30	5	5	สูง
H9-02	60	30	10	5	สูง
H9-03	60	10	5	-	กลาง
H9-04	60	60	10	10	สูง
H9-05	30	10	10	-	ปานกลาง
H9-06	60	10	10	-	ปานกลาง
H10-01	60	30	60	-	ปานกลาง
H10-03	60	30	10	-	ปานกลาง
H10-05	60	30	10	-	ปานกลาง
P1-P01	60	5	-	-	ต่ำ
P4-S01	60	60	10	10	สูง
P4-S03	60	60	5	5	สูง
P8-S01	60	60	30	30	สูง
P8-S03	60	60	5	5	สูง
P9-P01	30	-	-	-	ต่ำ
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	60	10	10	-	ปานกลาง

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. จากอุจจาระเด็กทารกและมูลสุกรได้ทั้งหมดจำนวน 16 สายพันธุ์ที่มีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *B. animalis* เมื่อพิจารณาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีอยู่ในบัญชีรายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข เมื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกทั้ง 16 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ H1-05, H9-01, H9-02 และ P8-S01 ที่มีคุณสมบัติโดดเด่นที่สุดในทุกการทดสอบ คือ สามารถทนกรดที่ pH 2.0 ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง ทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1% ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้อยู่ในระดับสูง และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีกว่า *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง อย่างไรก็ตาม ในจำนวน 4 สายพันธุ์นี้มี 1 สายพันธุ์ คือ P8-S01 ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากสามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ในระดับดี จึงสามารถนำไปเลี้ยงและจัดการได้ง่ายกว่าอีก 3 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ ของสายพันธุ์เหล่านี้

เพิ่มเติม เช่น การยับยั้งเชื้อก่อโรค ความไวต่อยาต้านจุลชีพ ตลอดจนการประเมินความปลอดภัยในระบบ in vivo ก่อนนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ไพรัช ธิติศักดิ์ ประธานกรรมการบริษัท เค.เอ็ม.พี.ไบโอเทค จำกัด ที่ให้ความสนับสนุนด้านงบประมาณ เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de Los Reyes-Gavilán, 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.

BAAC research and development center. (2016). World and Thailand economic outlook in 2017. Retrieved Jan 16, 2017, from https:// www.pandinthong.com%2Fcritic-dwl- th%2F382991791801&usg= AFQjCNFqkP6-Do3RWS5V0IVljuFzD8oajQ&bvm=bv.152479541,d.c2I (in Thai)

Bevilacqua, A., Cagnazzo, M. T., Caldarola, C., Ciuffreda, E., Dragano, A. R., Franchino, S., Lauriola, R., Pacifico, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2012). Bifidobacteria as potential functional starter cultures: a case study by MSc students in food science and technology (University of Foggia, Southern Italy). *Food and Nutrition Sciences*, *3*, 55-63.

Bottacini, F., Ventura, M., van Sinderen, D., & O'Connell Motherway, M. (2014). Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories, 13*(1), S4.

Chae, M. H., & Jhon, D. Y. (2006) Preparation of kimchi containing *Bifidobacterium animalis* DY-64. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*, 431-437.

Chung, H. S., Kim, Y. B., Chun, S. L., & Ji, G. E. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *Journal of Food Microbiology, 47*(1-2), 25-32.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, *40*, 629-636.

Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Jounal of Applied Microbiology, 92*(5), 966-975.

Erkkila, S. & Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science*, *55*(3), 297-300.

Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(5), 4745–4767.

Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotic in animal feeding for safe food production. *Journal of Food Microbiology, 141,* S15-S28.

Grimm, V., Westermann, C., & Riedel, C.U. (2014). Bifidobacteria-host interactions-an update on colonisation factors. *BioMed Research International*, 1-10.

Gueimonde, M., Noriega, L., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C. G., & Salmimen, S. (2005). Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *International Jounal of Food Microbiology, 101,* 341-346.

He, F., Ouwehand, A. C., Hashimoto, H., Isolauri, E., Benno, Y., & Salminen, S. (2001). Adhesion of Bifidobacterium Spp. to Human Intestinal Mucus. *Microbiology and Immunology*, *45*, 259–262.

Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H., & Yarmand, M. S. (2008) Spectrophotometricaly Evaluation of probiotic growth in liquid media. *Asian Journal of Chemistry*, *20*(3), 2414-2420.

Kharchenko, N. V., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2015). New approaches for the isolation of Bifidobacterial strains, their molecular characterization, and assessment of their probiotic potential. *Microbiology, 84*(3), 419-424.

Kok, R. G., Waal, A. D., 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*(10), 3668-3672.

Krungsri research. (2016). Frozen & processed chicken industry. Retrieved Jan 16, 2017, from https://www.krungsri.com/bank/getmedia/547be15f-6d5d-44c3-ace7-996f3d03e4dc/IO_Chicken_2016_EN.aspx

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, *127*(1), 4–22.

Lee, J. H. & O'Sullivan, D. J. (2010). Genomic insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74*(3), 378–416.

Lertworapreecha, N. (2007). Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from native chicken for probiotic use according to the *in vitro* properties. Master of Science Thesis, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. (In Thai)

Loquasto, J. R., Barrangou, R., Dudley, E. G., & Roberts R. F. (2011) Short communication: The complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subspecies *animalis* ATCC 25527^T and comparative analysis of growth in milk with *B. animalis* subspecies *lactis* DSM 10140^T. *Journal of Dairy Science*, *94*(12),

5864 – 5870.

Maxwell, F. J., Duncan, S. H., Hold, G., & Stewart, C. S. (2004). Isolation, growth on prebiotics and probiotic potential of novel bifidobacteria from pigs. *Anaerobe, 10*(1), 33-39.

MOAC (Ministry of Agriculture and Cooperatives). (2016, 26 December). Notification of MOAC entitled Feed additives, quantities and restrictions to inhibit production, import and selling animal feeds. Vol.113, No.306, pp18-26.

MOPH (Ministry of Public Health). (2011, 3 August). Notification of MOPH entitled Applications of probiotics in food. Vol.128, No.86, pp21-25.

Morelli, L., & Lucio, C. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *46*, S1-S2.

Nishiyama, K., Kawanabe, A., Miyauchi, H., Abe, F., Tsubokawa, D., Ishihara, K., Yamanmoto, Y., & Mukai, T. (2014). Evaluation of bifidobacterial adhesion to acidic sugar chain of porcins of porcine colonic mucins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 78*(8), 1444-1451.

Presti, I., Orazio, G. D., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M. & Di Gennaro, P. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(13), 5613-5626.

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C. & Baines, S. K. (2014). Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Foods, 8,* 18-25.

Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2003). Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology*, *97*(1), 55-61.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning*. (3rd ed.). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P. (2004).The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiological Methods, 57*(1), 9-16.

Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology, 99* (3), 493-501.

Song, D., Ibrahim, S., & Hayek, S. (2012). Recent application of probiotics in food and agricultural science. In E. C. Rigobelo (Ed.), *Probiotics* (pp. Ch. 01). Rijeka: InTech.

Tassell, M. L. V., & Miller, M. J. (2011). Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, *3*(5), 613–636.

Ventura, M. Elli, M., & Zink, R. (2001). Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology, 36*(2-3), 113-121.

Waite, D. W. & Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology, 5*(223), 1-12.

Williams, B. A., Verstegen, M.W.A., & Tamminga, S. (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews, 14*(2), 207-228.

Zhang, R., He, L., Zhang, L., Li, C., & Zhu, Q. (2016). Screening of cholesterol-lowering *Bifidobacterium* from Guizhou Xiang pigs, and evaluation of its tolerance to oxygen, acid, and bile. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources, 36*(1), 37-43.

Zuo, F., Yu, R., Feng, X., Chen, L., & Zeng, Z., Khaskheli, G. B., & Chen, S. (2016). Characterization and in vitro properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, *66*(3), 1027-1037.