การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีในหลอดทดลอง

Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and evaluation of survival under *in vitro* acidic and bile salt conditions

จุฬาลักษณ์ ชูพรหม

Julalak Chuprom

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวจุฬาลักษณ์ ชูพรหม

สาขาวิชา ***เทคโนโลยีชีวภาพ***

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสน่ห์ แก้วนพรัตน์)

……..กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

……..กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

……..……

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นางสาวจุฬาลักษณ์ ชูพรหม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

การรอดชีวิตของโปรไบโอติก ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และนำไปทดลองการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ในโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G เป็นสภาวะที่เหมาะสมซึ่งใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 45.36 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกรด และจากการเปรียบเทียบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน หนูและอาหารหมักที่ถูกห่อหุ้ม พบว่า *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ซึ่งแยกจากคน มีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 71.11 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ซึ่งแยกจากอาหารหมักและหนู ให้การรอดชีวิต 25.08 และ 31.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกได้มากกว่าเซลล์อิสระในสภาวะที่มีกรด การทดลองห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ร่วมการเติมสารสกัดและเส้นใยอาหารของพืช 10 ชนิด และทดสอบการทนต่อกรด พบว่า *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรให้การรอดชีวิตสูงสุด คือ 84.39 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) ที่สภาวะเป็นกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมซึ่ง ได้แก่ เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมสารสกัดหรือเส้นใยจากพืชให้การรอดชีวิตเท่ากับ 61.92 และ 68.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของเส้นใยถั่วเหลืองที่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ คือ 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 จาก 68.78 เป็น 85.30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซานช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกได้ 86.58 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เม็ดเจลที่ไม่ผ่านการเคลือบและเคลือบด้วยสารละลายอัลจิเนตให้การรอดชีวิต 84.14 และ 82.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การห่อหุ้ม

Lactobacillus plantarum CIF17 A5 ร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองและเติมซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสาร cryoprotectant ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตจาก 63.94 เป็น 73.58 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ขณะที่การใช้นมพร่องมันเนยหรือเส้นใยถั่วเหลือง ให้การรอดชีวิตเท่ากับ 74.39 และ 70.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครสซึ่งใช้เป็นสาร cryprotectant คือ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยให้การรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเท่ากับ 77.62 เปอร์เซ็นต์ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบด้วยไคโตซานให้การรอดชีวิตเท่ากับ 80.02 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เซลล์อิสระและ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่มีการเติมสารสกัดและเส้นใยจากพืช ให้การรอดชีวิตเท่ากับ 55.71 และ 61.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และผ่านเกลือน้ำดีนาน 6 ชั่วโมง เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มจะมีการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลอย่างรวดเร็วในสภาวะที่เป็นกลางและเบส พบว่าที่พีเอช 8.0 การปลดปล่อยตัวเซลล์ออกจากเม็ดเจลเกิดขึ้นเร็วกว่าที่พีเอช 5.0, 6.0 และ 7.0 *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบด้วยสารละลายไคโตซาน และนำเม็ดเจลที่ได้ไปบรรจุในแคปซูลเจลาติน เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในถุงลามิเนตภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 สูงกว่า การเก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Thesis Title	Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and evaluation of survival under *in vitro* acidic and bile salt conditions
Author	Miss Julalak Chuprom
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2010

ABSTRACT

Survival of probiotic bacteria, including *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 encapsulated in calcium alginate beads were tested under highly acidic condition of simulated gastric juice at pH 2.0 for 3 h. Encapsulated *L. acidophilus* TISTR 1034 in 2% sodium alginate solution by using 18G syring needle showed the highest survival of 45.36%. The survival increased proportionately with increasing alginate concentrations and syringe needle size. Encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 (animal origin) showed the highest survival of 71.11%, whereas encapsulated *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 (fermented food origin) and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 (animal origin) exhibited only 31.88 and 25.08 % of survival, respectively. Microencapsulation enhanced acidic survival of all probiotic strains compared to free cells. Survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 co-encapsulated with ten different potential prebiotics were evaluated under simulated gastric condition. *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 co-encapsulated with 2% soybean crude fiber showed the highest survival of 84.39% ($p>0.05$) after acidic exposure at pH 2.0 for 3 h, while the control groups including free and microencapsulated cells exhibited 61.92 and 68.78% of survival, respectively. Addition of 3% (w/v) soybean crude fiber significantly enhanced survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 from 68.78 to 85.30%. Chitosan coating of the soybean crude fiber co-encapsulated probiotic increased survival to 86.58% compared to that of uncoated and alginate-coated, which showed 84.14 and 82.36% survival, respectively. Addition of 10% (w/v) sucrose as cryoprotectant enhanced survival of freeze dried, encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 from 63.94 to 73.58% while skim milk and soybean crude fiber showed 74.39 and 70.46%, respectively. The sucrose concentrations of 15 and 20% (w/v) showed 77.62 and 78.78% ($p<0.05$) survival of co-encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying,

respectively. Survival of co-encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 after gastric juice exposure at pH 2.0 for 4 h and bile salt exposure for 6 h was 80.02% while free cell and encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 exhibited 55.71 and 61.55% survival, respectively. The release of co-encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 in pH 8.0 was higher than at pH 5.0, 6.0 and 7.0. Co-encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 stored in hard gelatin capsule and vacuum aluminium foil bag at 4°C for 8 weeks showed higher survival than room temperature.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรศีรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เสน่ห์ แก้วนพรัตน์ ประธานกรรมการ และ รศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในการสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้อง ๆ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์และโอกาสในการศึกษามาโดยตลอด รวมทั้งพี่ ๆ น้อง ๆ เพื่อน ๆ และเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนทุก ๆ ท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จุฬาลักษณ์ ชูพรหม

สารบาญ

หน้า

สารบัญ…… (8)

LIST OF TABLES…….. (9)

LIST OF FIGURES…… (11)

บทที่

1. บทนำ…….. 1

บทนำต้นเรื่อง…….. 1

การตรวจเอกสาร……. 3

วัตถุประสงค์การวิจัย……..... 41

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ……... 42

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง……... 55

4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ……..... 82

เอกสารอ้างอิง……... 84

ภาคผนวก……. 98

ประวัติผู้เขียน……... 108

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Examples of bacteria used as probiotics……..	3
2.	Examples of lactic acid bacteria used as probiotics for human consumption…….	4
3.	Health promoting effects and mechanisms of probiotic substances……	7
4.	Concentration of fructo-oligosaccharides in various foods…….	12
5.	Structure and composition of commercially available prebiotics……...	19
6.	Structures of oligosaccharides in legumes……...	20
7.	Concentration of carbohydrates composition in legume species…….	21
8.	Comparison of total dietary fiber content in cereal grains……..	23
9.	Positive and negative features of extrusion and emulsion techniques…….	30
10.	Effect of pH on viable counts of free and microencapsulated *L. casei* NCDC-298	32
11.	The size of encapsulated *L. acidophiilus* TISTR 1034 beads was determined by using the vernier caliper……..	56
12.	The effect of sodium alginated concentration on the size of encapsulated *L. acidophiilus* TISTR 1034 beads……..	58
13.	Effects of needle size on survival of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C)…..…..…..…..…..…..….	102
14.	Effects of sodium alginate concentration on survival of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C)……..	102
15.	Comparative survival of free cell and encapsulated probiotic originated from human rat and kickled cabbage under acidic condition (pH 2.0 for 3 h)……	103
16.	Effects of prebiotics and crude fibers as co-encapsulants on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition at pH 2.0 for 3 h at 37 °C…….	103
17.	Effects of different soybean crude fiber concentrations on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 under simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C)……	104
18.	Effects of polymer coatings on survival of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition (pH 2.0 for 3 h)…….	104

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
19.	Survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after freez-drying and vacuum-drying……..	105
20.	Effects of cryoprotectants on survival of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying…….	105
21.	Concentrations of sucrose on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying	106
22.	Survival of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic and bile salt conditions…….	106
23.	Effect of pH on the release of *L. plantarum* CIF17 A5 from alginate beads (co-encapsulated with soybean crude fiber with chitosan coating)……	107

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	The possible mechanisms of prebiotic action……..	10
2.	Chemical structures of fructo-oligosaccharides……..	12
3.	Chemical structures of galacto-oligosaccharides……	13
4.	Chemical structures of oligosaccharides in legumes……...	14
5	Chemical structures of A) chitin and B) chitosan……...	16
6.	Chemical structure of lactosucrose……..	17
7.	Microencapsulation (extrusion and emulsion)……	26
8.	Chemical structure of alginate…….	27
9.	Chemical structure of (a) carrageenan; (b) k-carageenan……	28
10.	Chemical structure of chitosan……	29
11.	Water phase diagram……...	36
12.	Freeze drying process……..	37
13.	Hard gelatin capsules……...	53
14.	Co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 stored in soft gelatin capsules…….	53
15.	Aluminium foil bag…….	53
16.	Effects of needle size on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C)……...	56
17.	Effects of sodium alginate concentration on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C)……...	58
18.	Comparative survival of free cell and encapsulated probiotic originated from human rat and kickled cabbage under acidic condition (pH 2.0 for 3 h)……	60
19.	Effects of prebiotics and crude fibers as co-encapsulants on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition at pH 2.0 for 3 h at 37 °C…….	63

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
20.	Effects of different soybean crude fiber concentrations on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml)of *L. plantarum* CIF17 A5 under simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C)……..	65
21.	Effects of polymer coatings on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition (pH 2.0 for 3 h)	67
22.	Effects of freeze-dry and vacuum-dry on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5……...	69
23.	Effects of cryoprotectants on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying…….	72
24.	Concentrations of sucrose on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying……	74
25.	a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic and bile salt conditions……..	77
26.	Scanning electron micrographs (SEM) of microencapsulated *L. plantarum* CIF17 A5…….	78
27.	Effect of pH on the release of *L. plantarum* CIF17 A5 from alginate beads (co-encapsulated with soybean crude fiber with chitosan coating)……	79
28.	Viable population of freeze-dried encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 in gelatin capsule packed in vacuum aluminium foil and storage at 4°C (a) and room temperature (b) for 8 weeks……...	81

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบันมีหลายปัจจัยที่ทำให้สุขภาพของมนุษย์มีความอ่อนแอลง เช่น สิ่งแวดล้อม สารพิษที่มีการเจือปนในอาหาร เป็นต้น พฤติกรรมการบริโภคอาหารที่เปลี่ยนไปก็มีส่วนสำคัญทำให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคท้องผูกและท้องร่วง ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร เป็นต้น จากความเสี่ยงของโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นทำให้มนุษย์หันมาให้ความสำคัญต่อสุขภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจและศึกษากันมาก คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือโปรไบโอติก (probiotic) ซึ่งมีบทบาทในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ช่วยสร้างความแข็งแรงและสามารถเพิ่มภูมิต้านทานให้แก่ร่างกายได้ โดยในปัจจุบันมีการเสริมโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด ได้แก่ โยเกิร์ต นมผง นมเปรี้ยว เป็นต้น

การมีชีวิตอยู่ของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากโปรไบโอติกที่มีชีวิตจะสามารถก่อตัวและเพิ่มจำนวนในลำไส้ใหญ่และให้ประโยชน์มากมายต่อสุขภาพของผู้ถูกอาศัย (host) โดยการรอดชีวิตของโปรไบโอติกขึ้นกับปัจจัยหลายปัจจัยทั้งภายในและภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พีเอช สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวจุลินทรีย์ ภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา และกระบวนการแปรรูป เป็นต้น Shah และคณะ (1995) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต 5 ชนิด ที่ขายในออสเตรเลียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าจำนวนโปรไบโอติกทั้งสองชนิดมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลาย ๆ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเหล่านี้ เช่น พีเอชต่ำ กรด น้ำดีและน้ำย่อย (Conway, 1996 อ้างโดย Iyer and Kailasapathy, 2005) International Dairy Federation (IDF) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจะต้องมีแบคทีเรียที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^7 CFU/g จนกระทั่งวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Ouwehand and Salminen, 1998) นอกจากมาตรฐานดังกล่าวแล้วในแต่ละประเทศได้มีการพัฒนามาตรฐานของจำนวนโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น ประเทศญี่ปุ่น The Fermented

Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association (Krasaekoopt *et al.,* 2003)ได้กำหนดมาตรฐานขั้นต่ำของจำนวนโปรไบโอติกไว้ที่ 10^7 CFU/ml และในหลายประเทศมีการกำหนดมาตรฐานขั้นต่ำของจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ 10^6 CFU/g เช่น อาร์เจนตินา ปารากวัย บราซิล และอุรุกวัย เป็นต้น การศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ โดยใช้วิธีการหลายวิธีในการปกป้องโปรไบโอติก เช่น การห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* ด้วย k-carragenan (Tsen *et al.,* 2002) นอกจากนี้ยังมีการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกก่อนการแช่เยือกแข็งโดยการใช้อัลจิเนต (Sultana *et al*., 2000) ซึ่งเป็นเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตโดยการใช้แคลเซียมอัลจิเนตซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากอัลจิเนตไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มและเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นสารสำหรับเติมแต่งอาหาร (food additive) (Prevost and Divies, 1992 อ้างโดย Iyer and Kailasapathy, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้พรีไบโอติกร่วมด้วยในการห่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการรอดชีวิตของเซลล์ได้ (Chen *et al*., 2005)

การวิจัยนี้เป็นการใช้เทคนิคการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้อัลจิเนตร่วมกับพรีไบโอติก (prebiotic) และเส้นใยอาหารเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะต่าง ๆ ในทางเดินอาหาร รวมทั้งการศึกษาการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และปัจจัยที่มีผลต่อเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม ได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตและขนาดของเม็ดเจล สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ชนิดและปริมาณของพรีไบโอติกและเส้นใยอาหาร ชนิดของสารเคลือบเม็ดเจล วิธีการทำแห้งเม็ดเจล ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่ช่วยเพิ่มรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มหลังการทำแห้งและผ่านกรด ศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยของเซลล์ออกจากเม็ดเจลและการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเมื่อนำไปประยุกต์ใช้โดยบรรจุในแคปซูล

การตรวจเอกสาร

1. โปรไบโอติก (Probiotics)

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเป็นอาหารเสริมที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านโดยจะช่วยในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Adhikari *et al*., 2000) มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้โดยส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* นอกจากนี้ยังมีโปรไบโอติกในกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งแสดงใน Table 1. โดยโปรไบโอติกจะทำหน้าที่ย่อยอาหารและผลิตสารที่มีประโยชน์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลกติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2542) โดยโปรไบโอติกกลุ่มที่มีการเติมลงในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค ได้แก่ Lactobacilli, Bifidobacteria, Streptococci และ Enterococci ซึ่งแสดงใน Table 2.

Table 1. Examples of bacteria used as probiotics.

***Lactobacillus* species**	***Bifidobacterium* species**	**Other**
Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium bifidum*	*Bacillus cereus*
Lactobacillus casei (rhamnosus) - LGG	*Bifidobacterium longum*	*Escherichia coli*
Lactobacillus reuteri	*Bifidobacterium breve*	*Sacccharomyces cerevisiae*
Lactobacillus bulgaricus	*Bifidobacterium infantis*	*Saccharomyces boulardii*
Lactobacillus plantarum	*Bifidobacterium adolescentes*	*Enterococcus faecalis*
Lactobacillus johnsonii	*Bifidobacterium lactis*	*Streptococcus thermophilus*
Lactobacillus lactis		*Trichuris suis*

ที่มา : อุทัย เก้าเอี้ยน (2549)

Table 2. Examples of lactic acid bacteria used as probiotics for human consumption.

Lactobacilli	**Bifidobacteria**	**Streptococci**	**Enterococci**
Lactobacillus delbrueckii subsp *bulgaricus*	*B. bifidum*	*S. thermophilus*	*E. faecalis*
L. acidophilus	*B. longum*		*Enterococcus faecium*
Lactobacillus rhamnosus	*B. breve*		
L. reuteri	*B. infantis*		
L. casei			

ที่มา : Fooks และคณะ (1999)

1.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งโปรไบโอติกสามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น การที่โปรไบโอติกสามารถส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านได้นั้นโปรไบโอติกจะต้องสามารถผ่านสภาวะความเป็นกรดและด่างในทางเดินอาหารส่วนต้นและผ่านลงไปเจริญในลำไส้ใหญ่ได้ ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดีจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1.1.1 สามารถสร้างกรดแลกติก และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (Table 3.) (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

1.1.2 แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ดีจะต้องมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula, 1998) ซึ่งพีเอชของกรดในกระเพาะอาหารโดยปกติจะอยู่ในช่วง 1-3 นอกจากนี้ยังพบว่าโปรไบโอติกจะมีความสามารถในการทนต่อกรดได้แตกต่างกัน เช่น *L. lactis*, *L. plantarum* และ *Lactobacillus fermentum* ทนต่อกรดที่พีเอชต่ำ สามารถรอดชีวิตที่พีเอช 2.5-6.5 เวลา 1.5 ชั่วโมง แต่ไม่พบการรอดชีวิตที่พีเอช 1.0-2.0 ยกเว้น *L. plantarum* (Balcázar *et al*., 2008) *Lactobacillus sake* (RM 10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่พีเอช 3.0 (Erkkila and Petaja, 2000) ซึ่งการทนต่อกรดของโปรไบโอติกยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกจุลินทรีย์ โดย Khalil และคณะ (2007) ได้แยกโปรไบโอติกจากอุจจาระของเด็กทารกจากประเทศอียิปต์ที่รับประทานนมแม่ซึ่งได้โปรไบโอติกทั้งหมด 55 สายพันธุ์ พบว่า 28 สายพันธุ์จาก 55 สายพันธุ์ สามารถทนกรดที่พีเอช 3.0 นาน 3 ชั่วโมง ได้ นอกจากนี้ Maragkoudakis และคณะ (2006) ได้ทำการแยกแบคทีเรียแลกติกที่มี

คุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จากนมหมัก ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 29 สายพันธุ์ และพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อกรดพีเอช 3.0 ได้ 6 ชั่วโมง สามารถทนต่อกรดพีเอช 2.0 ได้ 3 ชั่วโมง 6 สายพันธุ์ และสามารถทนต่อกรดพีเอช 1.0 ได้ 1 ชั่วโมง

1.1.3 โปรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ เนื่องจากในทางเดินอาหารโดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีเกลือน้ำดีที่หลั่งจากตับอ่อนเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15-0.30 (Erkkila and Petaja, 2000) ซึ่ง Succi และคณะ (2005) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลกติก *L. rhamnosus* จากเนยแข็ง Parmigiano Reggiano ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

1.1.4 สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้เคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) การที่โปรไบโอติกเกาะเคลือบที่ผนังทางเดินอาหารจะช่วยในการ colonization ของโปรไบโอติกได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยในการย่อยอาหาร และการดูดซึมให้เป็นไปอย่างปกติอีกด้วย (Fuller, 1993) ซึ่งจากการศึกษาของ Zhong และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* และ *Clostridium difficile* ในเยื่อบุผนังลำไส้ โดยใช้ adhesin จากเชื้อ *B. adolescentis* 1027 พบว่า adhesin ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 μg/ml สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* และ *C. difficile* ที่เยื่อบุผนังลำไส้ได้

1.1.5 สามารถสร้างสารต่าง ๆ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีจำนวนที่มากเกินไป เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Fuller, 1993) Con และคณะ (2001) ได้แยกแบคทีเรีย *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 4 สายพันธุ์ จาก sucuk ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ จากนั้นศึกษาผลการยับยั้ง *Listeria* 16 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจาก sucuk เช่นกัน พบว่า *Pediococcus* สายพันธุ์ 413, 416, 419 และ 446 สามารถยับยั้ง *Listeria* สายพันธุ์ที่ทดสอบได้ และนอกจากนี้ยังพบว่ารูทีริน (reuterin) ซึ่งเป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L. reuteri* (Helander *et al*., 1997) สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

1.1.6 สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่าง ๆ ดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

1.1.7 กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งสามารถพบได้ในแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่ง Kaila และคณะ (1992) *Lactobacillus* sp. จากผลิตภัณฑ์นมและโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทานพบว่าทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้นถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus* sp. มีการสร้างภูมิคุ้มกัน 46 เปอร์เซ็นต์

1.1.8 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) โดยจะไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น β-glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β-glucosidase (Saarela *et al*., 2000) Goldin และ Gorbach (1980) รายงานว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. acidophilus* ไม่เพียงแต่ช่วยลดการทำงานของเอนไซม์ dimethylhydrazine (DMH) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในลำไส้ แต่ยังช่วยเพิ่มระยะ latency ในหนูได้อีกด้วย

1.1.9 ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหารเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่าง ๆ ในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

1.1.10 ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Kailasapathy and Chin, 2000) Buke และ Gilliland (1994) ได้แยก *L. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัครจากนั้นได้ศึกษาการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด พบว่า *L. acidophilus* O16 สามารถดูดซึมคอเลสเตอรอลได้มากที่สุด คือ 50.9 µg/ml และ *L. acidophilus* C14 ดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ 47.1 µg/ml

1.1.11 เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

1.1.12 ป้องกันการเกิด lactose intolerance ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์แลกเตสมาย่อยน้ำตาลแล็กโตสได้ ทำให้เกิดอาการท้องอืดหรือท้องเสีย เมื่อรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลแล็กโตสเข้าไป ส่วนใหญ่จะพบมากในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ โดยโปรไบโอติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งป้องกันการเกิด lactose intolerance (Fooks *et al*., 1999)

1.1.13 สามารถแย่งอาหารของจุลินทรีย์ก่อโรค (Fuller, 1993)

Table 3. Health promoting effects and mechanisms of probiotic substances.

Beneficial effects	**Mechanisms**	**References**
Reduce risk of pathogen infection	Decreased pH and produced bacteriocins inhibited growth of undesirable bacteria	Tzortzis *et al.* (2004)
Improve mineral absorption	Decreased pH; increased mineral solubility	Bosscher *et al*. (2003)
Decrease lipids and chloresterol	-Increased short-chain fatty acid (SCFA) modulated lipogenesis -Lowering of pH & biles precipitation -Suppression of hepatic triglyceride and very low density lipoprotein (VLDL) synthesis -Reduced fatty acid synthesis in the liver	Delzenne *et al*. (2003)
Decrease risk of cancer	Increased butyrate; fule for colonocytes and cell differentiation Decreased bile acid formation Decreased genotoxic metabolites and enzymes and carcinogens	Brady *et al*. (2000)
Immune system	Direct contact of lactic acid bacteria or bacterial product with immune cells in the intestine Production of SCFA	Schley and Field (2002) Salminen, S. (2001)
Reduce constipation Reduce diarrhoea	Feacal bulkink and fibre like effect	Mizota.(1996)

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกในลำไส้

เชื้อที่จัดเป็นโปรไบโอติกโดยส่วนใหญ่คือแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก (lactic acid bacteria) โดยทั่วไปคือกลุ่มแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ อีกที่มีการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติว่าเป็นโปรไบโอติก เช่น Streptococci และ Enterococci เป็นต้น

1.2.1 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงแบคทีเรียแลกติกในสกุลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ รวมถึงความสามารถเจริญได้ในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแล็กโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus* และ *Leuconostoc* (Wood and Holzapfel, 1997)

แบคทีเรียแลกติกสามารถแบ่งตามลักษณะตามการใช้อาหารและผลผลิตที่ได้จากการหมักเป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative lactic acid bacterial) เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathways : EMP pathway ได้กรดแลกติก ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus sake, L. casei, L. acidophilus, Enterococcus* sp. และ *Pediococcus pentosaceus* (Axelsson, 1998)

ข. เฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterofermentative lactic acid bateria) เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Pentose phosphoketolase pathway แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลกติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *L. fermentum, L. plantarum*, *L. brevis* และ *Bifidobacterium* (Axelsson , 1998)

1.2.2 ไบฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacteria*)

Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล Actinomycetaceae มีปริมาณ G+C ในดีเอ็นเอมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์โมล เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกกลุ่มอื่น ๆ (Schleifer and Ludwig, 1996) ลักษณะโดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ รูปร่าง curved rods และ bifid rod ลักษณะคล้ายอักษร Y บางครั้งอาจพบรูปร่าง branch หรือ straight rot และ

unbranched ได้อีกด้วย นอกจากนี้ *Bifidobacteria* ยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ซึ่งมีประโยชน์สำคัญต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (Alander *et al*., 1999) *Bifidobacteria* มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายโดยการเพิ่มการผลิตอิมมูโนโกลบูลินหรือปรับปรุงภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) (Gill *et al*., 2001)

2. พรีไบโอติก (Prebiotics)

พรีไบโอติก คือ องค์ประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยซึ่งมีประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ที่มีประโยชน์อย่างจำเพาะและช่วยปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้าน (Gibson and Roberfroid, 1995) สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น (Fooks *et al*., 1999) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษได้ (Gibson and Roberfroid, 1995) พรีไบโอติกที่ดีควรส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้ เช่น *Bifidobacterium* และ Lactobacilli (Gibson and Roberfroid, 1995) สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกสามารถพบได้ในพืชผักต่าง ๆ เช่น หอม กระเทียม กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช

2.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร และลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อที่จุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยในลำไส้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gison, 2004) นอกจากนี้ต้องส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli (Gibson and Roberfroid, 1995; Holzapfel and Schillinger, 2002) ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Clotridium perfrigens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ (Gibson and Roberfroid, 1995; Kolida *et al.,* 2000) และนอกจากนี้จะต้องส่งผลให้สุขภาพของผู้บริโภคดีขึ้น เช่น ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Lopez *et al*., 2000; Van *et al*., 1998) ช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ดังแสดงใน Figure 1.

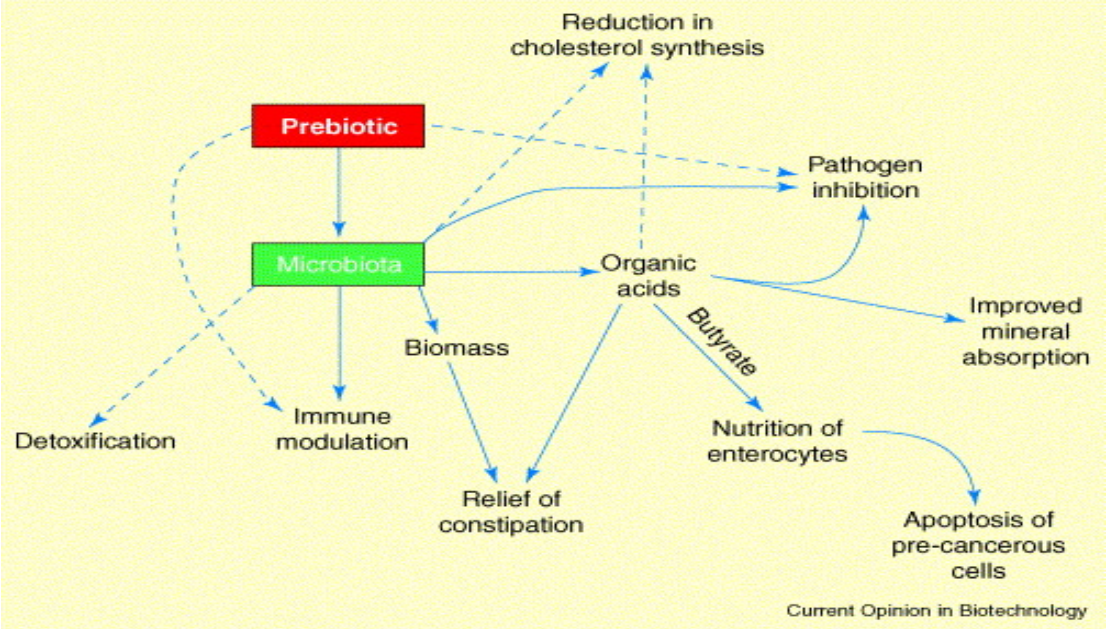


Figure 1. The possible mechanisms of prebiotic action.

ที่มา : Ouwehand และคณะ (2005)

2.2 ชนิดของสารพรีไบโอติก

สารพรีไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมและมีขายทางการค้าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อย 2-20 มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่มีในธรรมชาติจะพบได้ในผักและผลไม้ เช่น กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง ในปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ทางการค้าและในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์

2.2.1 พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

2.2.1.1 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosacchrides, FOS) และ อินนูลิน (Inulin)

อินนูลินเป็นสารโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้ซึ่งเป็นสารประกอบขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฟรุคโตส (fructose) 3-60 โมเลกุล ดังแสดงใน Figure 2. อินนูลินพบทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรีย และราบางชนิด โดยเฉพาะผักและผลไม้มากกว่า 3,600 ชนิด โดยพบในผักตระกูล chicorium เช่น ชิคอรี (chicory) และพืชในตระกูลหอม เช่น

หอมใหญ่ กระเทียม เป็นต้น (Table 4.) (Bxcommerce, 2001) อินนูลิน และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ละลายน้ำได้ดีโดยเฉพาะในน้ำร้อน (Tanya, 2002) อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Kim and Wang, 2002) แต่ละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็น และแอลกอฮอล์ (Paul, 1997) และมีความคงตัวสูง ไม่มีผลข้างเคียงต่อประสาทสัมผัส รสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหาร เช่น นำไปปรับปรุงในรสชาติและเนื้อสัมผัส ช่วยรักษาความสดและความชื้นในเค้ก ช่วยให้เครื่องดื่มละลายเข้ากันดีมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional property) (Vicki, 2002)

นอกจากอินนูลินจะถูกจัดเป็นเส้นใยอาหารแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกด้วย เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้อย่างจำเพาะ โดยพบว่า การเติมอินนูลินในไอศครีมจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* และ *B. lactis* และยังช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วย (Akin *et al*., 2007)

Wang และ Gibson (1993) ได้ทำการทดลองโดยให้อาสาสมัครรับประทานอินนูลิน 15 กรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ระหว่างช่วงเวลานั้นปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* เพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ และจุลินทรีย์ก่อโรคมีปริมาณลดลง ซึ่งส่งผลให้สุขภาพ ผู้ที่รับประทานอาหารนั้น ๆ ดีขึ้น พรีไบโอติกจึงมีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิดกับมนุษย์ หากร่างกายได้รับจุลินทรีย์สุขภาพและเส้นใยอาหารพรีไบโอติกที่เหมาะสม จะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายมาก เช่น ช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน ป้องกันความรุนแรงของการเกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. และ *Listeria* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยลดสารพิษ ช่วยให้การขับถ่ายดีขึ้น ช่วยย่อยน้ำตาลแล็กโตสในน้ำนม ซึ่งแก้ปัญหาแน่นท้องหรือท้องเสียได้ และช่วยให้ร่างกายดูดซึมสารอาหารโดยเฉพาะแคลเซียมและเหล็กได้ดี

จากรายงานการศึกษาการให้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ แก่หนูที่มีการชักนำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) และภาวะกระดูกพรุน (osteopenia) ทดสอบกับหนูสามกลุ่ม คือ หนูที่ไม่มีการให้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมในอาหาร หนูกลุ่มที่มีการให้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมในอาหาร และหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ชักนำให้เกิดภาวะโลหิตจางและกระดูกพรุนและไม่ได้รับฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมในอาหาร จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดทุกสัปดาห์เพื่อวัดปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด และเมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำกระดูกส่วนโคนขา (femur) และกระดูกส่วนหน้าแข้ง (tibia) มาวัดความหนาแน่นของมวลกระดูก (Bone mineral density: BMD) พบว่า หนูกลุ่มที่มีการให้ฟรุคโตโอลิโอแซคคาไรด์ ปริมาณ 75 กรัม/กิโลกรัม อาหาร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

มีปริมาณของฮีโมลโกลบินเพิ่มขึ้น และความหนาแน่นของมวลกระดูกมากกว่ากลุ่มการทดลองทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (Ohta *et al*., 1998)

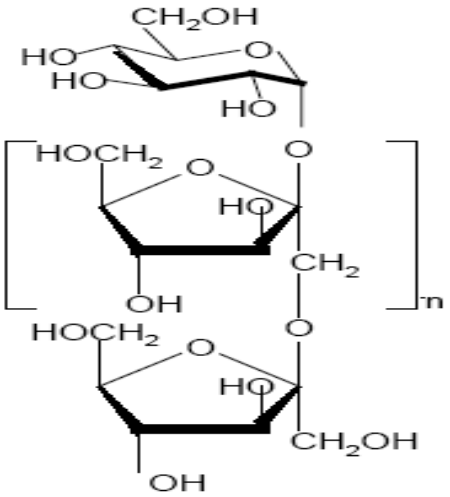


Figure 2. Chemical structures of fructo-oligosaccharides.

ที่มา : Gibson และ Angus (2000)

Table 4. Concentration of fructo-oligosaccharides in various foods.

Source	**Percentage of FOS**
Barley	0.15
Tomato	0.15
Onion	0.23
Banana	0.30
Brown sugar	0.30
Rye	0.50
Garlic	0.60
Honey	0.75

ที่มา : Sangeetha และคณะ (2005)

2.2.1.2 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแล็กโตสเป็นองค์ประกอบ (Figure 3.) พบในน้ำนมมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากแล็กโตส โดยเอนไซม์

เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharides) จึงสามารถผ่านไปถึงลำไส้ได้โดยไม่ถูกย่อยและดูดซึม และถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักจะเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวไทเรท และมีก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการศึกษาในระดับ *in vivo* ทั้งในคนและสัตว์ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน โดย Ito และคณะ (1990 อ้างโดย Sofia และคณะ, 2001) ได้ให้กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์แก่อาสาสมัคร 12 คน ที่มีจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่ำกว่าปกติ บริโภคในปริมาณ 10 กรัม/วัน พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์ประจำถิ่นเพิ่มขึ้น เมื่ออาสาสมัครได้รับปริมาณกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์

จากการศึกษานมแม่หรือ Human milk oligosaccharides (HMOs) มีค่า dairy product (DP) อยู่ในช่วง 3-32 จัดเป็นสารพรีไบโอติกที่อยู่ในกลุ่มกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีรายงานว่าเมื่อทารกดื่มนมแม่ (HMOs) พบว่า HMOs ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของทารก และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่มีผลไปเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกพวก Bifidobacteria ได้ (Coppa *et al*., 2001) และจากรายงานของ Ward และคณะ (2006) ทำการศึกษาโดยใช้ HMOs อินนูลินและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของ *B. infantis* ATCC 15697 และ *L. gasseri* ATCC 33323 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่ในลำไส้ใหญ่ของทารก พบว่า *B. infantis* ATCC 15697 สามารถใช้ HMOs เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในขณะที่ *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 ไม่สามารถใช้ HMOs ในการเจริญได้ และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหารที่มีอินนูลิน เป็นแหล่งคาร์บอน HMOs จึงจัดเป็นสารพรีไบติกที่ส่งเสริมการเจริญในโปรไบโอติกบางชนิดเท่านั้น โดยเฉพาะเสริมการเจริญของโปรไบโอติกซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ในลำไส้ใหญ่ของทารก

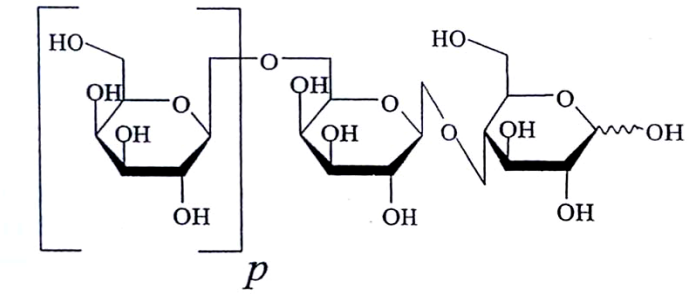


Figure 3. Chemical structures of galacto-oligosaccharides.

ที่มา : Gibson และ Angus (2000)

2.2.1.3 ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharide, SOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบทั่วไปในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Raffinose family oligosaccharides ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น raffinose และ stachyose (Gibson, 2004) ซึ่งมีโมเลกุลโครงสร้างประกอบด้วย Galα1-6 Glu1-2ßFru และ Galα1-6 Galα1-6 Gluα1-2ßFru ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 4. สามารถทนต่อการย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ จากการศึกษาการหมักซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ในอาสาสมัครเพศชาย 6 คน ให้ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ โดยอาสาสมัครที่ได้รับแรฟฟีโนส ในปริมาณ 15 กรัม/วัน มีปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า และสามารถลดจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* spp. ได้ 0.6 เท่า และ *Clostridium* spp. ได้ 1.6 เท่า และพบว่าการให้ soygerm powder ปริมาณ 4 กรัม/วัน จะช่วยให้ จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเกลือน้ำดีของ*L. reuteri* ได้ (Rastall and Maitin, 2002)

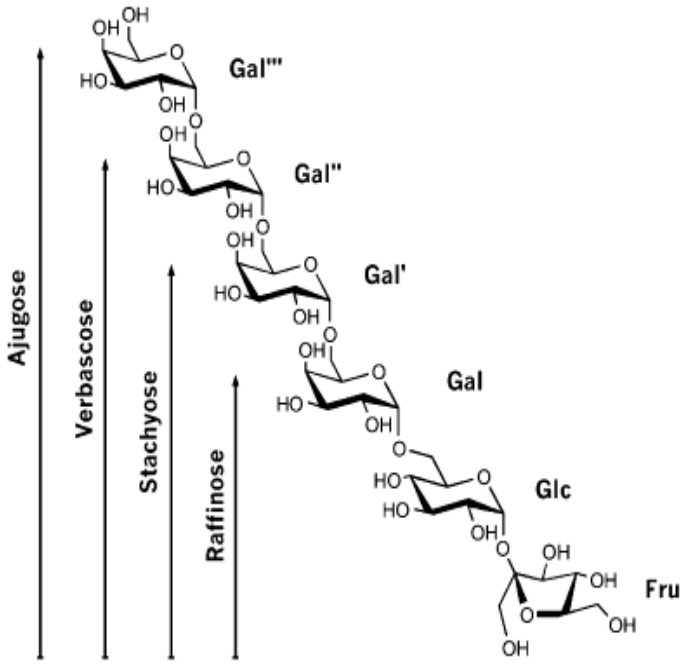


Figure 4. Chemical structures of oligosaccharides in legumes.

ที่มา : Kotiguda และคณะ (2006)

2.2.1.4 คาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ และสารที่ไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (Non-starch polysaccharide; NPS) ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

สารประเภทคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ และสารที่ไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เส้นใยอาหารซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพรีไบโอติก ส่วนมากได้จากพืชหรือจุลินทรีย์ เช่น สารกลุ่มเพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัมอารบิก ไซแลน ไคโตซาน และสารเมือกที่ได้จากแบคทีเรียโปรไบโอติก (exopolysaccharides) เป็นต้น ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักโดยแบคทีเรียโปรไบโอติก (Lee *et al*., 2002)

2.2.1.4.1 ไคโตซาน (Chitosan; CS)

ไคโตซานเป็นอนุพันธุ์ที่ไม่ละลายน้ำของไคติน (chitin) พบได้ในธรรมชาติ โดยสกัดได้จากเปลือกของกุ้งขนาดกลางและเล็ก กุ้งกร้ามกราม หรือปู ซึ่งพบได้ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน สายโพลิเมอร์ประกอบด้วยหน่วยของ glucosamine เชื่อมต่อกันด้วย β-1,4 glucosidic bonds (Figure 5.) ซึ่งไคโตซานมีผลทางชีวภาพคือ เป็นสารต้านมะเร็ง (antitumor) ป้องกันภาวะเลือดไหลไม่หยุด (hemostatic) ป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูง (hypocholesterolemic) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค (antibacterial) เช่น *Salmonella* spp. โดยกลไกการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคของไคโตซานยังไม่ทราบแน่ชัด (Helander *et al*., 2001) คาดว่าไคโตซานมีประจุบวกของ NH_3^+ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ glucosamine ซึ่งอาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrances) ของจุลินทรีย์ซึ่งมีประจุลบ มีการศึกษาถึงผลของไคโตซานต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์ โดยศึกษาในแบคทีเรียก่อโรค 6 สายพันธุ์ ที่มักพบในลำไส้ของมนุษย์ โดยใช้ปริมาณของไคโตซานเท่ากับ 0.025, 0.05 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรค โดยไคโตซานสามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacteroides* และ *Clostridium* ได้ถึง 91-97 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Roseburia* sp., *Eubacterium* sp. และ *Faecalibacterium* sp. สามารถยับยั้งการเจริญได้ 63-83 เปอร์เซ็นต์ (Simunex *et al*., 2006)

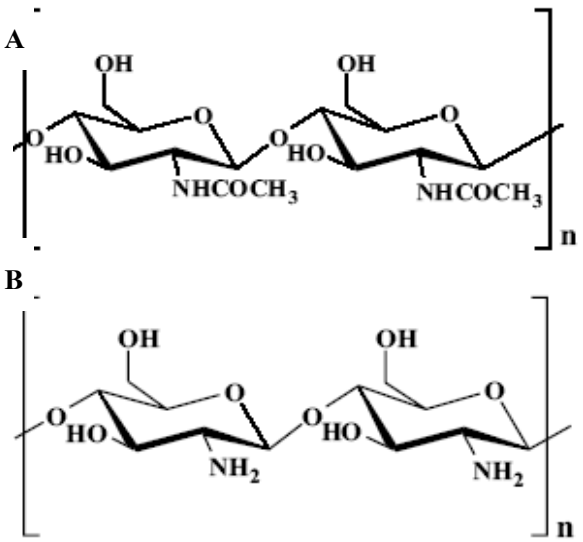


Figure 5. Chemical structures of A) chitin and B) chitosan
ที่มา : Barreteau และคณะ (2006)

2.2.1.4.2 เพคติน (Pectin)

เพคตินเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่และซับซ้อน สามารถละลายได้ในน้ำร้อน ประกอบด้วยหน่วยย่อยในสายหลักเป็นน้ำตาลแรมโนส พบได้ในผลไม้ทุกชนิดในส่วนของผนังเซลล์ และ intracellular tissues และยังมีคุณสมบัติเป็นใยอาหาร (dietary fiber) พบประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไม่สามารถย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ ทำให้เพคตินสามารถช่วยให้เกิดการขับถ่ายได้ดี ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และยังช่วยทำหน้าที่ขัดขวางการดูดซึมของไขมันไม่ให้เข้ากระแสเลือดจึงป้องกันไม่ให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดในสมองตีบ ดังนั้นทางด้านเภสัชกรรมจึงได้มีการนำเพคตินมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มการทำงานของยา ช่วยลดคอเลสเตอรอลและระดับน้ำตาลในเลือด ใช้เป็นเส้นใยอาหารป้องกันโรคระบบทางเดินอาหาร และเนื่องจากเพคตินสามารถช่วยลดการระคายเคืองจึงมีการนำมาผลิตเป็นอาหารเด็ก เพคตินยังมีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อละลายน้ำจะพองตัวเป็นเจล ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มจึงนิยมใช้เพคตินเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยใช้เป็นตัวทำให้เกิดความยืดหยุ่น (gelling agent) ในผลิตภัณฑ์แยม เยลลี่ และขนมหวาน หรือช่วยทำให้เกิดความหนืด (viscosity) ในซอสเครื่องปรุง น้ำเชื่อมเข้มข้น น้ำสลัด เครื่องดื่ม และใช้เป็นตัวรักษาสภาพ (stabilizer) ในผลิตภัณฑ์นม และโยเกิร์ต เป็นต้น (Gray, 2006)

2.2.2 พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

2.2.2.1 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครสผลิตมาจากการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นของน้ำตาลแล็กโตสและซูโครส (Figure 6.) โดยใช้เอนไซม์ β-fructofuronosidase และมีคุณสมบัติไปเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria มีรายงานว่า การให้แลคโตซูโครส ปริมาณ 3 กรัม/วัน แก่อาสาสมัคร 3 คน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ 0.7 เท่า และลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* spp. ได้ 0.6 เท่า (Ohkusa *et al.*, 1995)

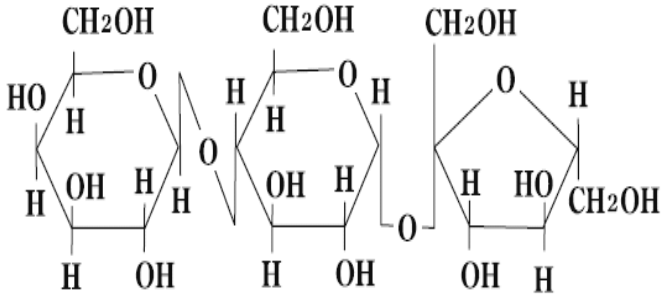


Figure 6. Chemical structure of lactosucrose.
ที่มา : Ohkusa และคณะ (1995)

2.2.2.2 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disacchrides) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกาแลคโตสและฟรุคโตสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic linkage มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อยและไม่ละลายในอีเทอร์และแลคทูโลส แสดงคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก คือ สามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ได้ (Saunders and Wiggins, 1981 อ้างโดย Tuohy *et al.*, 2005) Ballongue และคณะ (1997) ได้ศึกษาโดยการให้แลคทูโลส 10 กรัม/วัน ในอาสาสมัคร 2 คนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยมีผลลดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารก่อมะเร็ง (carcinogens) เช่น β-glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase เป็นต้น (Tuohy *et al.*, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ballongue และคณะ (1997) ศึกษาโดยให้แลคทูโลสแก่อาสาสมัคร 36 คน ปริมาณ 20 กรัม/วัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของ Lactobacilli อีกทั้งยังลดปริมาณของ *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. และ Coliforms bacteria เป็นผลให้สามารถลดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับสารก่อมะเร็ง และสารเมทาบอไลท์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียก่อโรค

เหล่านี้ได้ด้วย ซึ่งโดยปกติแล้วแลคทูโลสไม่มีหรือมีน้อยมากในอาหารทั่วไปส่วนมากมีการนำแลคทูโลสไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อเสริมสุขภาพผู้บริโภค

2.2.2.3 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharide, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะ α,1-6 glycosidic linkage ถูกเปลี่ยนมาจากแป้งโดยการใช้กระบวนการย่อยโดยใช้เอนไซม์ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ α-amylase และ pullulanase ร่วมกัน ในการศึกษาผลของไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเสริมการเจริญของโปรไบโอติก กลุ่ม Bifidobacteria โดยใช้ระบบ Human colonic-batch culture ซึ่งมีการเติม IMO ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ได้ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* และพบว่าปริมาณของ Clostridia ลดจำนวนลงด้วย (Rycroft *et al*., 2001)

2.2.2.4 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharide, GOS)

โอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะ β–1,6 glucosidic linkage เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* หรืออาจสกัดมาจาก β-glucan จากต้นโอ๊กและได้มีการยอม รับว่าเป็นอาหารสุขภาพ (functional food) และกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ ถูกย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ยกเว้น *B. bifidum* และถูกย่อยโดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* และ Clostridia แต่ไม่ถูกย่อยด้วยกลุ่ม Lactobacilli

2.2.2.5 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides) (XOS)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งมีผลให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพิ่มขึ้น และสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* ได้ จากการให้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ปริมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักแก่หนูทดลอง พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ดีกว่าการให้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Campbell *et al*., 1997) และจากผลการศึกษาของ Rycroft และคณะ (2001) ที่ศึกษาจุลินทรีย์ผสมของอุจจาระมนุษย์ พบว่า หลังจากมีการให้ β-1,4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว สามารถเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ภายหลัง 24 ชั่วโมง และยังสามารถลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides* ได้อีกด้วย

ในตลาดสากลมีการวางขายผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งมีชื่อทางการค้าเรียกแตกต่างกันไป (Table 5.) และมีการใช้และจำหน่ายมากในประเทศญี่ปุ่นและในตลาด

ยุโรป เช่น กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีชื่อทางการค้า คือ โอลิโกเมท (oligomate) ที่ผลิตมาจากแล็กโตส ซึ่งเป็นของเสียที่มีปัญหาในการกำจัดมากในอุตสาหกรรมนม โดยนำไปทำปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์ β-galactosidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็น กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น

Table 5. Structure and composition of commercially available prebiotics.

Substrate	**Oligosaccharide structure**	**Composition**
Raftilose P95	Gluα1-2[βFru1-2]$_n$ where n=2-9 average 4-5	95% oligosaccharides
Raftiline LS	Gluα1-2[βFru1-2]$_n$ where n > 10 average 10-12	99% inulin
Lactulose	Galβ1-4Fru	99% lactulose
Xylo-oligosaccharides	Xylβ1-4[Xyl]$_n$ where n = 2-7	35% oligosaccharides
Oligomate 55	α-Glu1-4[βGal1-6]$_n$ where n = 1-4 average 2	50% oligosaccharides, 12% lactose, 38% monosaccharides
Soybean oligosaccharides	Stachyose (Galα1-6 Galα1-6 Gluα1-2 βFru) Raffinose (Galα1-6 Gluα1-2βFru)	25% stachyose, 10% raffinose, 50% sucrose, 15% monosaccharises
Isomalto-oligosaccharides	Gluα1-6 [Gluv1-6]$_n$ where n $\geq$ 1 average 1-2	91% oligosaccharides, 2% glucose, 7% high molecular weight (n $\geq$ 11)

ที่มา : Rycroft และคณะ (2001)

2.2.3 แหล่งของพรีไบโอติก

2.2.3.1 ธัญพืช

ธัญพืชที่สามารถตรวจพบสารพรีไบโอติก ได้แก่ ข้าว ถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น ในถั่วนั้นนิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีสารอาหารสูง มีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรตในระดับสูง เช่นเดียวกับข้าวโพดที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ แต่มีโปรตีนประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ประกอบด้วย โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

3-10 โมเลกุล เช่น ราฟฟิโนส มีโครงสร้างเป็น α-gal-(1-6)-α-glu-(1-2)-β-fru (Table 6.) โดยมีคุณสมบัติเฉพาะตัว 2 อย่าง คือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ องค์ประกอบหลักที่เป็นแหล่งคาร์บอนในพืชตระกูลถั่วมากมายหลายชนิด เช่น โอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส (raffinose family of oligosaccharides; RFOs) (Wang *et al*., 2003) โดยมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ โดยทั่วไปถั่วมีส่วนประกอบของสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีนประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นในถั่วเหลือง จะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าคาร์โบไฮเดรต และยังมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบอีก แตกต่างกันไปแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนมากแล้วองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตจะเป็นพวก soluble carbohydrates ดังแสดงใน Table 7. คาร์โบไฮเดรตในถั่วแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วย ราฟฟิโนส สตาคีโอส (stachyose) และเวอร์แบสโคส (verbascose) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) โดยคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่วจัดอยู่ในกลุ่มราฟฟิโนส (Hedley, 2001; Martinez-Villaluenga *et al*., 2005)

Table 6. Structures of oligosaccharides in legumes.

Oligosaccharides	**Structure**
raffinose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)- α-D-glucopyranosyl-(1-2) -β-D-fructofuranoside
stachyose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)- α-D-glucopyranosyl-(1-6) -α-D-glucopyranosyl-(1-2)- β-D-fructofuranoside
verbascose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)-[α-D-galactopyranosyl-(1-6)-]$_2$ -α-D-glucopyranosyl- (1-2)- β-D-fructofuranoside
ajugose	α-D-galactopyranosyl-(1-6)-[α-D-glucopyranosyl-(1-6)-]$_3$ -α-D-glucopyranosyl- (1-2)- β-D-fructofuranoside

ที่มา : Hedley (2001)

Table 7. Concentration of carbohydrates composition in legume species.

Legume species	Starch	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Verbascose	Fibre	total
Soybean	1.5	6.2	0.9	4.3	0.1	20	32.5
Lupin spp.	0.4	2.5	0.7	6.8	0.6	26	36.7
Chickpea	44.4	2.0	1.5	5.5	3.0	9	65.3
Mung bean	45.0	1.1	1.7	2.0	3.0	7	60.0
Pigeon pea	44.3	2.5	1.0	3.0	4.0	10	64.9
Jack bean	35.0	1.5	0.7	1.5	0.1	9	47.8
Common	41.5	5.0	0.3	4.1	0.1	10	61.3
Bean	41.0	3.3	0.2	0.7	2.5	12	59.8
Faba bean	46.0	2.9	0.5	2.4	0.9	12	64.4
Lentil	45.0	2.1	0.9	2.4	3.2	12	65.5
Pea							

Fibre[1]: รวม insoluble และ soluble carbohydrates

ที่มา : Hedley (2001)

2.2.3.2 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides) จากแบคทีเรียแลกติก

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เป็นโพลิเมอร์ที่สร้างโดยแบคทีเรียและ microalgae แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ขณะที่มีการเจริญ และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าสารเมือก (slime) ซึ่งแตกต่างจากสารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ที่เกาะอยู่กับผิวหน้าอย่างถาวรที่เรียกว่า capsular polysaccharides (Sutherland, 1985) โดยเฉพาะเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่เป็นกลุ่มโพลิเมอร์ที่มีการศึกษากันมาก เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกจัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) โดยได้นำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ทางด้านอาหารเพื่อเป็นการปรับปรุงผิวสัมผัสของอาหาร เป็นสารเพิ่มความหนืดในด้านอุตสาหกรรม ในด้านเภสัชกรรมใช้เป็นพลาสเตอร์ และเป็นสารห่อหุ้มตัวยาเพื่อควบคุมการออกฤทธิ์ของยาเฉพาะที่ เป็นต้น ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสามารถจัดเป็น 2 กลุ่ม คือ homopolysaccharides และ heteropolysaccharides โดยอาศัยความแตกต่างขององค์ประกอบในโพลิเมอร์

homopolysaccharides (HoPSs) เป็นโพลิเมอร์ที่มีน้ำตาลชนิดเดียวเป็นองค์ประกอบ หากโพลิเมอร์มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคส จะเรียกเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ชนิดนี้ว่า กลูแคน (glucan) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ได้ คือ *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* และ *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งพันธะ α-glucan และ β-glucan (Monson *et al*., 2001 อ้างโดย Korakli and Vogel, 2006) และหากโพลิเมอร์มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลฟรุคโตส จะเรียกว่า ฟรุคแตน (fructan) ซึ่งแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ได้ คือ *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Weissella* โดยสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจศึกษาสามารถผลิตฟรุคแตนชนิดอินนูลินซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(1, 2) และลีแวน (levan) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(2, 6) (Monsan *et al*., 2001) โดยที่ HoPSs ทั้งกลูแคนและฟรุคแตนมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ คือ glucosyltransferase และ fructosyltransferase ตามลำดับ และมีสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะในการผลิตคือน้ำตาลซูโครส

heteropolysaccharides (HePSs) เป็นโพลิเมอร์ที่องค์ประกอบเป็นน้ำตาลต่างชนิดกัน ซึ่งแบคทีเรียแลกติกโดยส่วนใหญ่สามารถผลิต EPSs ชนิดนี้ได้ โดยที่น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบย่อยภายในสายโพลิเมอร์มักพบน้ำตาลกาแล็กโตส และกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ และบางครั้งอาจพบน้ำตาลแรมโนส ฟรุคโตส แมนโนส และกาแล็กโตส แต่พบในปริมาณน้อย (Degeest *et al*., 2001; Van den Berg *et al*., 1995)

จากการทดลองของนันทินา เชิญทอง (2550) ซึ่งได้คัดเลือกลักษณะและคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลกติกจากสัตว์ทะเล พบว่า *Weissella cibaria* A2, *Weissella confuse* A2, *L. plantarum* A3 และ *P. pentosaceus* 5S4 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ปริมาณ 14, 7.6, 4.9 และ 7 g/l ตามลำดับ เมื่อทดสอบการเป็นพรีไบโอติกพบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากที่สกัดได้ทั้งหมดทนต่อการย่อยได้ดีมาก และเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. cibaria* A2 สามารถส่งเสริมการเจริญ *B. bifidum* ได้

3. เส้นใยอาหาร (Dietary Fiber)

เส้นใยอาหาร คือ สารพวกลิกนิน (lignin) และโพลีแซคคาไรด์จากพืชซึ่งไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากกระเพาะและลำไส้ของมนุษย์ Bermink (1994 อ้างโดย Rupasinghe และคณะ 2008) ปี ค.ศ. 1950 นักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มได้แบ่งเส้นใยอาหารออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ละลายน้ำ (soluble fiber) เช่น เพคตินและกัม เป็นต้น ซึ่งกลุ่มเส้นใยอาหารที่สามารถละลายน้ำจะมีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด นอกจากนี้ยังสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในลำไส้

(Kelsey, 1978) และอีกกลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) เช่น เซลลูโลส(cellulose) ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) บางชนิด เส้นใยกลุ่มนี้จะช่วยเพิ่มมวลของอุจจาระ ทำให้ระบบการขับถ่ายเป็นไปอย่างปกติ (ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2542) ต่อมาสถาบันวิทยาศาสตรแหงชาติ (*National Academy* of *Sciences*, *NAS*) ได้แบ่งกลุ่มของเส้นใยอาหารออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มสุดท้ายครอบคลุมถึงกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์และลิกนิน (nondigestible carbohydrates and lignin) ที่ทนต่อกระบวนการย่อยในทางเดินอาหาร ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ได้แก่ กัม เซลลูโลส รำข้าวโอ๊ต (oat bran) รำข้าวสาลี (wheat bran) โดยพืชหลายชนิดที่ให้เส้นใยได้แก่ ธัญพืชชนิดต่าง ๆ และรำข้าว ซึ่งจะให้ปริมาณเส้นใยอาหารที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ดังแสดงใน Table 8.

Table 8. Comparison of total dietary fiber content in cereal grains.

Cereals	**Total dietary fibre (%, db)**
Legumes	13.6-28.9
Rye	15.5
corn	15
Triticale	14.5
Oat	14
wheat	12
Sorghum	10.7
Barley	10
Finger millet	6.2-7.2
Rice	1.9±2

ที่มา : Charalampopoulod และคณะ (2000)

3.1 ประโยชน์ของเส้นใยอาหาร

3.1.1 เส้นใยอาหารกับการป้องกันและรักษาโรค

จากการศึกษาของ Scheneeman (1987) พบว่า เส้นใยอาหารชนิดที่ไม่ละลายน้ำมีผลต่อการควบคุมการทำงานของลำไส้และเส้นใยอาหารชนิดที่ละลายน้ำมีผลต่อการลดระดับคอเลสเตอรอลและมีผลต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในลำไส้ และจากการศึกษาเกี่ยวกับการบริโภคอาหารที่มีเส้นใยและองค์ประกอบอื่น ๆ กับการเกิดมะเร็งในลำไส้ของสตรีที่มีอายุสูงกว่า 60 ปี ของ Willette และคณะ (1990) พบว่า การบริโภคเส้นใยจากผลไม้ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง

มากกว่าเส้นใยจากแหล่งอื่น ๆ เช่น เส้นใยจากธัญพืช เส้นใยจากผัก โดยมีเหตุผลสนับสนุนว่าเส้นใยจากผลไม้มีสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณเล็กน้อย (micronutrients) ที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น วิตามินอี วิตามินซี และเบต้า-แคโรทีน ซึ่งสารเหล่านี้พบอยู่ร่วมกับเส้นใยอาหาร และเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้

3.1.2 เส้นใยอาหารกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย

เส้นใยอาหารมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมไขมัน คาร์โบไฮเดรตและการดูดซึมแร่ธาตุ โดยจากการทดลองของ Glore และคณะ (1994) รายงานว่าเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำมีผลต่อการลดระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมด และลดปริมาณของไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (Low Density Lipoprotein, LDL) ในเลือด พบว่าการดูดซึมกรดเกลือของเส้นใยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของคอเลสเตอรอล ทำให้เกิดการสูญเสียคอเลสเตอรอลออกจากร่างกาย โดยขั้นแรกเพิ่มการขับกรดเกลือทำให้การสังเคราะห์กรดเกลือจากคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น จากนั้นกรดเกลือที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ในลำไส้จะเกิดเป็นไมเซลล์ ซึ่งไมเซลล์จะไปยับยั้งการดูดซึมไขมันและคอเลสเตอรอล นอกจากนั้นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้จะย่อยเส้นใยอาหารได้เป็นกรดไขมันสายสั้น ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้

นอกจากนั้นเส้นใยอาหารยังมีผลต่อระบบเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและการดูดซึมแร่ธาตุ โดยพบว่าเส้นใยที่ละลายน้ำและเส้นใยที่มีความหนืดสูงจะเป็นตัวช่วยลดระดับกลูโคสและคอเลสเตอรอลหลังรับประทานอาหารได้ดี ส่วนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำมีผลต่อการยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสีเนื่องจากเส้นใยมีองค์ประกอบของไฟเทต (phytate) อยู่ด้วย ดังนั้นแนวทางแก้ปัญหาในส่วนนี้ทำได้โดยกำจัดไฟเทตออกจากเส้นใยอาหารในระหว่างกระบวนการแปรรูป ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายมีการดูดซึมธาตุเหล็ก สังกะสี และแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

4. ซินไบโอติก (Synbiotic)

ซินไบโอติก เป็นส่วนผสมของพรีไบโอติกและโปรไบโอติก ซึ่งนักวิจัยบางท่านยังให้ความหมายของซินไบโอติกว่าเป็นการผสมกันระหว่างโปรไบโอติกและพรีไบโอติกและส่วนผสมดังกล่าวต้องช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของแบคทีเรียซึ่งอยู่ในระบบกระเพาะลำไส้ส่วนบน (Roberfroid, 2000) และเป็นการส่งผ่านจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเข้าไปในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplements) ในทางเดินอาหารและลำไส้ จากการศึกษาของ Bielecka และคณะ (2002) ซึ่งให้หนูรับประทานผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกที่มีการผสมระหว่าง *Bifidobacterium* ที่มีจำนวนเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 9 log CFU/ml และสารพรีไบโอติกชนิดโอลิโกฟรุคโตสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

น้ำหนักต่อน้ำหนัก พบว่าหนูที่รับประทานผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกเป็นเวลานาน 14 วัน จำนวน *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 log CFU/g ของอุจจาระ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่รับประทานแต่ *Bifidobacterium* เพียงอย่างเดียวมีการเพิ่มขึ้น 0.6 log CFU/g อุจจาระ

มีรายงานว่าผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก มีผลต่อการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยสามารถลดการพัฒนาของเซลล์ที่สามารถเกิดโรคมะเร็งลำไส้ได้ เมื่อให้อินนูลินหรือโอลิโกฟรุคโตสประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารที่บริโภค พร้อมกับการให้แบคทีเรียสุขภาพโปรไบโอติก คือ *B. longum* สังเกตพบว่ามีการลดลงของเซลล์ก่อนที่จะเกิดเป็นเนื้องอก (preneoplastic lesion) เมื่อให้โปรไบโอติก *B. longum* พร้อมกับอินนูลินทางปากสามารถลดปัจจัยดังกล่าวได้มากกว่าการให้โปรไบโอติก *B. longum* หรือให้อินนูลินเพียงอย่างเดียว (Reddy, 1999) และจากผลการศึกษาซินไบโอติกในระดับ *in vivo* โดยทำการศึกษาในหนูทดลองจำนวน 16 ตัว โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่มีการให้อาหารธรรมดาปริมาณ 20 กรัม/วัน กลุ่มที่สองให้ผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกในปริมาณ low dose คือ 1.5 กรัม/ กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู/วัน และกลุ่มที่สามให้ซินไบโอติกในปริมาณ high dose คือ 7.5 กรัม/ กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยซินไบโอติกที่ใช้ คือ FloraGuard® (Viva Life Science, Costa Mesa, CA, USA) มีส่วนผสมระหว่างโปรไบโอติก คือ *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum, B. longum* และ *S. thermophilus* ส่วนพรีไบโอติกที่ใช้ คือ อินนูลินที่สกัดจากชิคอรี เมื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียพบว่า *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งกลุ่ม low dose และ high dose โดยที่กลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่ากิจกรรมของไลเพส (lipase), ซูเครส (sucrase) และ ไอโซมอลเตส (isomaltase) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนแล็กเตสพบกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญในกลุ่ม low dose ในขณะที่พบกิจกรรมของไลเพส และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม high dose เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการที่ให้ซินไบโอติกในปริมาณที่เป็น low dose มีความเพียงพอต่อการส่งเสริมสุขภาพของร่างกายเจ้าบ้าน (Yang *et al*., 2005)

5. การห่อหุ้มโปรไบโอติกในเม็ดเจล (Microencapsulation)

การห่อหุ้มเซลล์เป็นวิธีการที่ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในทางเดินอาหารและยังช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียจาก bacteriophages ซึ่งจากการทดลองของ Steenson และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลของการห่อหุ้มเซลล์ *Saccharomyces lactis* C2 และ *Saccharomyces cremoris* HP ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต จากนั้นเติมเซลล์ดังกล่าวที่ถูกห่อหุ้มใน

นมหมัก พร้อมกับการเติม lytic phages c2 and hp พบว่า *S. lactis* C2 และ *S. cremoris* HP ยังสามารถเจริญได้ในนมหมัก นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ยังช่วยเพิ่มการรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

การห่อหุ้มเซลล์ เป็นวิธีการที่ใช้ในการป้องกันแบคทีเรียโปรไบโอติก จากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรียและเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน โดยการห่อหุ้มหรือการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการไว้ในวัสดุตรึง สารที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) คาร์ราจีแนน (carrageenan) เซลลูโลสอะซิเตตพลาเลต (cellulose acetate phthalate) และเจลาติน (gelatin) เป็นต้น เทคนิคที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ของโปรไบโอติก ได้แก่ extrusion technique (droplet method) และ emulsion technique (two phase system) ดังแสดงใน Figure 7.

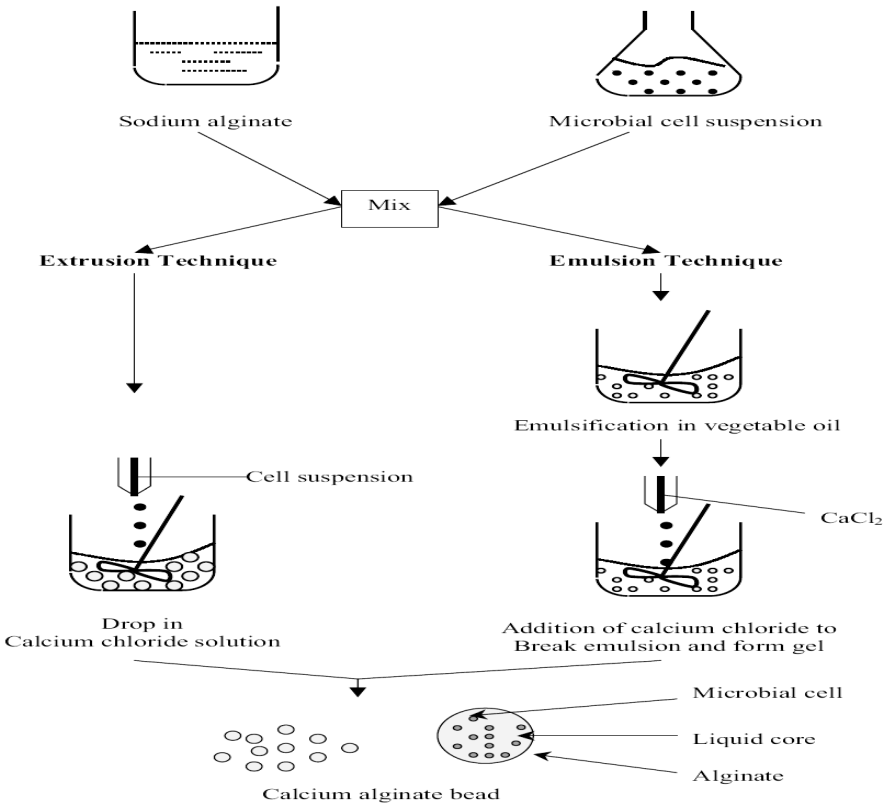


Figure 7. Microencapsulation (extrusion and emulsion).

ที่มา : Krasaekoopt และคณะ (2003)

5.1 Extrusion technique (droplet method) เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันโดยทั่วไปในการทำเม็ดเจลด้วย hydrocolloid ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย hydrocolloid เช่น เซลลูโลสอะซิเตตพลาเลต (Rao *et al*., 1989) ไคโตซาน (Groboillot *et al*., 1993) เจลาติน (Hyndman *et al*., 1993) อัลจิเนต (alginate) (Kim *et al*., 2008) แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมกัน และใช้วิธีการปล่อย suspension ของเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยดลงไปในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) เช่น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้และความสูงของการหยด suspension ของเซลล์ลงใน hardening solution วิธีการนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสภาวะที่ไม่รุนแรงเซลล์แบคทีเรียจึงมีการรอดชีวิตได้สูง (Krasaekoopt *et al.,* 2003)

วัสดุตัวพยุง (supporting material) สำหรับการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธี extrusion คือ อัลจิเนต ซึ่งเป็นเฮทเทอร์โรโพลีแซคคาไรด์สายตรง (linear heteropolysaccharide) ของ D-mannuronic และ L-guluronic acid (Figure 8.) ซึ่งพบในสาหร่ายหลายสปีชีส์ ซึ่งคุณสมบัติและหน้าที่ของ อัลจิเนต เป็นวัสดุตัวพยุง โดยความแข็งแรงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและลำดับของ D-mannuronic และ L-guluronic acid การขึ้นรูปเม็ดเจลเกิดจากอัลจิเนตเกิดปฏิกิริยาเชื่อมไขว้ (cross-linking) กับสารละลาย multivalent cation ซึ่งสารที่นิยมใช้ คือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปเจลมีความหลากหลาย เช่น Jankowski และคณะ (1997) ใช้อัลจิเนตความเข้มข้นต่ำมาก คือ 0.6 เปอร์เซ็นต์ และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ในขณะที่การศึกษาโดยทั่วไปใช้อัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.05-1.5 โมลาร์ (Krasaekoopt *et al*., 2003)

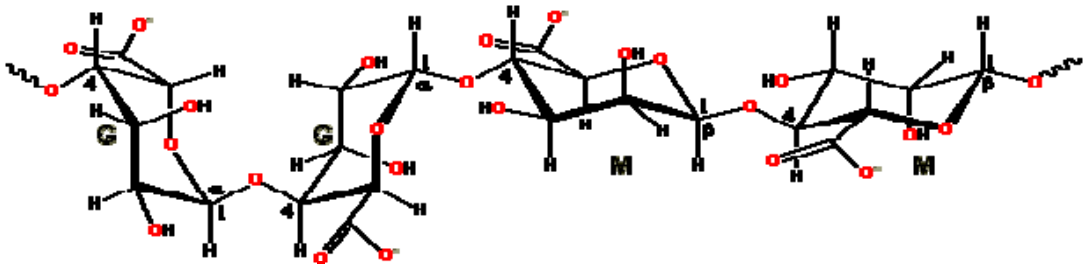


Figure 8. Chemical structure of alginate.

ที่มา : Chaplin (2008)

5.2 Emulsion technique (two phase system) เทคนิคนี้ใช้การเติม suspension ของจุลินทรีย์ที่ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่าหรือน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ส่วนผสมจะถูกตีปั่นจนอยู่ในรูป water-in-oil emulsion จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัวลงไป ซึ่งส่วนใหญ่แล้วนั้นจะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น hardening solution ขนาดของเม็ดเจลที่เกิดขึ้นขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่น โดยแคปซูลที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 μm ถึง 2 mm (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

วัสดุตัวพยุงที่นิยมใช้ในวิธีนี้ มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น ส่วนผสมของ คาร์ราจีแนน เซลลูโลสอะซิเตตพลาเลต และเจลาติน เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพยุงจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป เช่น

- คาร์ราจีแนน โดยทั่วไปจะใช้ k-carageenan (Figure 9.) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่โดยทั่วไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารและใช้อุณหภูมิที่ 60-80 องศาเซลเซียส ในการละลายคาร์ราจีแนน ที่มีช่วงความเข้มข้น 2-5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำการเกิดเจลโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในการห่อหุ้มโดยการเติม suspension ของแบคทีเรียลงในสารละลายคาร์ราจีแนน ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสแล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และจะใช้โปตัสเซียมไอออนซึ่งอยู่ในรูปของโปตัสเซียมคลอไรด์ทำให้เจลมีความคงตัวหลังจากการขึ้นรูป (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

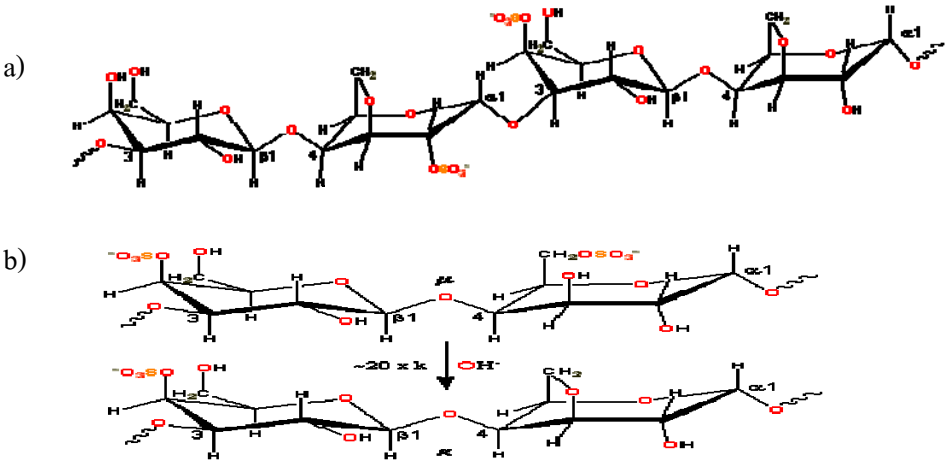
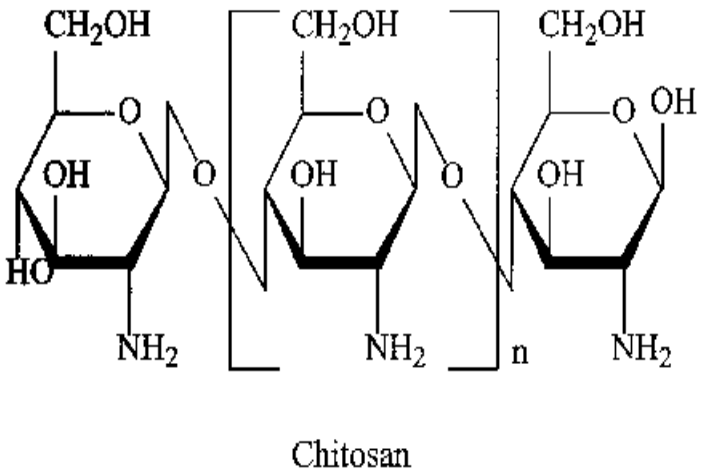


Figure 9. Chemical structure of (a) carrageenan; (b) k-carageenan.

ที่มา : Chaplin (2008)

- ไคโตซาน เป็นโพลีแซคคาไรด์สายตรงซึ่งเป็นประจุบวก (Figure 10.) ที่ได้มาจากกระบวนการ deacetylation ของไคตินที่สกัดจากโครงร่างแข็งภายนอกร่างกายของสัตว์ทะเลเปลือกแข็ง (subphylum crustacean) ไคโตซานสามารถละลายน้ำได้ที่พีเอชน้อยกว่า 6 (Krasaekoopt *et al.,* 2003)



Chitosan

Figure 10. Chemical structure of chitosan.
ที่มา : Chitosan (2007)

เนื่องจากมีความนิยมในการเสริมโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยการห่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นการป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์และกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร Chandramoulia และคณะ (2004) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะที่ถูกน้ำย่อย พบว่า *L. acidophilus* CSCC 2400 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่ถูกน้ำย่อย และจากการศึกษาการทนต่อกรด เกลือน้ำดีและความร้อนของโปรไบโอติก 8 สายพันธุ์ คือ *L. rhamnosus*, *B. longum, L. salivarius, L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* type Bl-O4 และ *B. lactis* type Bi-07 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต พบว่าการห่อหุ้มเซลล์จะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะดังกล่าวได้ (Ding and Shah, 2007) นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับแหล่งคาร์บอน เช่น สารพรีไบโอติก สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียได้มากขึ้นจากการศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* สายพันธุ์ CSCC 2400 และ CSCC 2409 โดยการห่อหุ้มเซลล์ด้วย Hi-maize resistant starch พบว่า *L. acidophilus* ที่ถูกห่อหุ้ม รอดชีวิตจากสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดีได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วย Hi-maize resistant starch (Iyer and Kailasapathy, 2005)

6. ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก

การรอดชีวิตและกิจกรรมของโปรไบโอติกมีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรไบโอติกต้องรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาซึ่งต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตน้อยที่สุด 10^7 CFU/g จนกระทั่งวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Ouwehand and Salminen, 1998) นอกจากนี้ต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารและต้องทนต่อการทำลายของเอนไซม์และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก ซึ่งมีปัจจัยหลายด้านด้วยกันที่มีบทบาทต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก โดยสามารถสรุปได้ ดังนี้

6.1 วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์

วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์แบ่งเป็น 2 วิธี คือ extrusion technique และ emulsion technique นอกจากขั้นตอนในการทำของทั้งสองวิธีจะต่างกันแล้วยังพบข้อดีและข้อด้อยในการห่อหุ้มเซลล์ของทั้งสองวิธีซึ่งแสดงใน Table 9.

Table 9. Positive and negative features of extrusion and emulsion techniques.

	Extrusion	**Emulsion**
Technological feasibility	Difficult to scale up	Easy to scale up
Cost	Low	High
Simplicity	High	Low
Size of bead	2–5 mm	25 μm–2 mm

ที่มา : Krasaekoopt และคณะ (2003)

6.2 วัสดุตัวพยุง

วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น อัลจิเนต เซลลูโลสอะซิเตตพลาเลตและกัมอารบิก เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพยุงที่แตกต่างกันก็จะมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ต่างกัน จากการทดลองของ Lian และคณะ (2003) ทำการห่อหุ้มเซลล์ *B. longum* B6 และ *B. infantis* CCRC14633 ด้วยวัสดุพยุงที่แตกต่างกัน ได้แก่ กัมอารบิก เจลาติน แป้งมันสำปะหลัง (soluble starch) และ นมขาดมันเนย จากนั้นทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ดังกล่าวในสภาวะที่มีกรดพีเอช 3.0 นาน 0 และ 4 ชั่วโมง และหาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ดังกล่าว ซึ่งพบว่าการรอดชีวิตของ *B. longum* B6 และ *B. infantis* CCRC14633 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยแป้งมันสำปะหลัง ให้การ

รอดชีวิตสูงสุด คือ 95.47 และ 92.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ กัมอารบิก เจลาติน และนมขาดมันเนย

6.3 ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ใช้

ระดับความเข้มข้นของตัวพยุง เมื่อใช้อัลจิเนตในการห่อหุ้มแบคทีเรีย Lee และ Heo (2000) ศึกษาการรอดชีวิตของ *B. bifidum* ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะกรดในทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลที่ใช้วัสดุตัวพยุงที่ความเข้มข้นสูงมีการรอดชีวิตได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ต่ำกว่า โดยพบว่าอัลจิเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียภายในเม็ดเจลมีการรอดชีวิตได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเม็ดเจลมาบ่มในสภาวะกรดในทางเดินอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ความเข้มข้นของอัลจิเนต ยังมีผลต่อขนาดของเม็ดเจลโดยถ้าอัลจิเนต มีความเข้มข้นมากเม็ดเจลจะมีขนาดที่เล็กลง

Mandal และคณะ (2006) ได้ศึกษาความเข้มข้นของอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของ *L. casei* NCDC-298 ในสภาวะที่มีกรดพีเอช 1.5 และ 6.5 เกลือน้ำดีความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และความร้อนที่ 55, 60 หรือ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยใช้อัลจิเนตความเข้มข้น 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่พีเอช 6.5 เวลา 3 ชั่วโมง เซลล์อิสระและเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบความแตกต่างของเซลล์ที่รอดชีวิตในสภาวะที่มีกรดพีเอช 6.5 นาน 0, 1 และ 3 ชั่วโมง ขณะที่สภาวะที่มีกรดพีเอช 1.5 เซลล์อิสระลดลงเหลือ 4.24 และ 3.38 log CFU/ml เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ แต่การรอดชีวิตต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน Table 10.

Table 10. Effec tof pH on viable counts of free and microencapsulated *L. casei* NCDC-298 (log CFU/ml for free cells and log CFU/g for encapsulated cells).

Alginate	pH 6.5			pH 1.5		
concentration	0 h	1 h	3 h	0 h	1 h	3 h
0%	9.33 ± 0.12^{ap}	9.45 ± 0.12^{ap}	9.29 ± 0.08^{ap}	7.56 ± 0.17^{bq}	4.24 ± 0.52^{cr}	3.38 ± 0.21^{cs}
2%	9.57 ± 0.12^{ap}	9.35 ± 0.13^{ap}	9.34 ± 0.10^{ap}	7.42 ± 0.12^{bq}	5.96 ± 0.27^{cq}	5.37 ± 0.12^{cr}
3%	9.39 ± 0.08^{ap}	9.39 ± 0.13^{ap}	9.23 ± 0.07^{ap}	9.26 ± 0.47^{ap}	7.04 ± 0.18^{bp}	6.27 ± 0.08^{cq}
4%	9.37 ± 0.13^{ap}	9.46 ± 0.253^{ap}	9.67 ± 0.12^{ap}	9.14 ± 0.14^{ap}	8.07 ± 0.32^{bp}	7.54 ± 0.43^{bp}

ที่มา : Mandal และคณะ (2006)

โดยทั่วไปการเพิ่มความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงสามารถเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลได้ เนื่องจากความเข้มข้นของวัสดุที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจลซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เซลล์รอดชีวิตได้มากขึ้น

6.4 ขนาดของเม็ดเจล

จากการศึกษาความแตกต่างของขนาดเม็ดเจลต่อความสามารถในการรอดชีวิตของโปรไบโอติก พบว่า ความเข้มข้นของอัลจิเนตยังมีผลต่อขนาดของเม็ดเจลโดยถ้าอัลจิเนต มีความเข้มข้นมากเม็ดเจลจะมีขนาดที่เล็กลง จากการศึกษาของ Chandramoulia และคณะ (2004) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* CSCC 2400 และ *L. acidophilus* CSCC 2409 โดยใช้อัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 6.9 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้จุลินทรีย์ 10^9 CFU/ml เตรียมเม็ดเจลให้มีขนาดต่าง ๆ กัน คือ 200, 450 และ 1000 μm พบว่า การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้น โดยเม็ดเจลขนาด 1000 μm ทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตจากกรดที่มีพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมงได้มากที่สุดรองลงมา คือ เม็ดเจลขนาด 450 และ 200 μm ตามลำดับ (Chandramoulia *et al*., 2004)

การที่แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มขนาดของเม็ดเจลให้ใหญ่ขึ้น เนื่องจากเมื่อเม็ดเจลมีขนาดใหญ่พื้นที่ผิวสัมผัสที่จะสัมผัสกับสภาวะต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายกับตัวเซลล์แบคทีเรียจะน้อยลง ในขณะที่เม็ดเจลขนาดเล็กนั้นมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากขึ้นทำให้แบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมมากขึ้นจึงทำให้แบคทีเรียมีการตายเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

6.5 เวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายที่ช่วยในการแข็งตัวหรือการขึ้นรูปเม็ดเจล ซึ่งจากการศึกษาของ Chandramoulia และคณะ (2004) ได้ทดลองโดยแช่เม็ดเจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 5, 30 นาที, 1, 2 และ 8 ชั่วโมง เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียในเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เวลา 30 นาที หรือมากกว่า 30 นาที มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 5 นาที ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้จากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

6.6 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

สายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการห่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาของ Grosso และ Fávaro-Trindade (2004) เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *B. lactis, S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่ผ่านการห่อหุ้มและเติมลงในโยเกิร์ตที่เก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 28 วัน *S. thermophilus* และ *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* สามารถมีชีวิตรอด $1.8x10^6$ และ $8.7x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการรอดชีวิตของ *B. lactis* แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ มีการรอดชีวิตแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์นั้น ๆ ก่อนการห่อหุ้มเซลล์จึงควรศึกษาถึงลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะนำมาใช้ด้วย นอกจากนี้ควรเลือกวัสดุตัวพยุงให้เหมาะสมกับเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตให้กับแบคทีเรียเช่นกัน นอกจากนี้ Ding และ Shah (2007) ได้ศึกษาการทนต่อกรดพีเอช 2.0 ของโปรไบโอติก 8 สายพันธุ์ ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 10 log CFU/ml ใช้ emulsion technique ในการห่อหุ้มเซลล์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ไปผ่านกรดพีเอช 2.0 นาน 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าที่ 60 นาทีของการผ่านกรด โปรไบโอติกทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตมากกว่า 7 log CFU/ml และที่ 120 นาที ของการผ่านกรดโปรไบโอติกทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตมากกว่า 6 log CFU/ml

7. การทำแห้งโปรไบโอติก

การทำแห้ง หมายถึง กระบวนการที่ความร้อนถูกถ่ายเทด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งไปยังวัตถุที่มีความชื้น เพื่อไล่ความชื้นในวัตถุนั้น ๆ ให้ออกไป โดยในขณะที่อากาศอบแห้งไหลผ่านวัตถุ การถ่ายเทความร้อนและมวลของน้ำจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน ความร้อนจะเกิดการถ่ายเทจากอากาศที่อบแห้งไปยังผิวของวัตถุที่เย็นกว่าทำให้น้ำที่ผิวของวัตถุระเหยและถ่ายเทไปยังอากาศที่ไหลผ่านทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นลดลง (วาสนา กิตติกนกรัตน์, 2546) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและวิธีการทำแห้งแบบต่าง ๆ เข้ามาช่วยในการทำแห้งผลิตภัณฑ์

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำโดยการแช่แข็งจุลินทรีย์ที่ต้องการอบแห้งก่อน แล้วจึงนำไปอบแห้งด้วยการระเหิดที่อุณหภูมิและความดันต่ำ (สุญญากาศ) เพื่อทำให้น้ำในวัตถุระเหิดออกไป วิธีการนี้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถทำให้แห้งได้ด้วยความร้อนหรือเสื่อมเสียได้ง่าย (Gardiner *et al*., 2002) ซึ่ง Lee และคณะ (2004) ได้ห่อหุ้ม *L. bulgaricus* KFRI673 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตจากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ไปเคลือบด้วยไคโตซานแล้วนำเม็ดเจลที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีอบแห้งแบบแช่แข็ง และนำเม็ดเจลที่ผ่านการทำแห้งไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 22 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่า *L. bulgaricus* KFRI673 ลดลงจาก 7 log CFU/ml เหลือ 6 log CFU/ml

การอบแห้งแบบฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized-bed drying) เป็นการอบแห้ง โดยการใช้อากาศร้อนป้อนเข้าทางตอนล่างของตะแกรง ทำให้อนุภาคของแข็งที่ต้องการอบแขวนลอยในอากาศร้อน

การอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ทำโดยการพ่นของเหลวที่มีความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ (wet basis) ผ่านหัวฉีด (atommizer) ให้กระจายเป็นอนุภาคที่ละเอียดเข้าไปในอากาศร้อน เกิดการถ่ายเทความร้อนระหว่างผลิตภัณฑ์กับอากาศร้อน เกิดการระเหย ทำให้ผลิตภัณฑ์จากของเหลวเปลี่ยนเป็นรูปผง มีรายงานการทดลองการทำแห้ง *Lactobacillus* และ Bifidobacteria โดยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *L. paracasei* (Gardiner *et al.*,2000), *B. ruminantium* (O' Riordan *et al.,* 2001) อย่างไรก็ตามโปรไบโอติกไม่สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีอุณหภูมิและแรงดันออสโมติกสูงในระหว่างกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยได้

การอบแห้งแบบถาดอยู่กับที่ (fixed-tray drying) โดยเครื่องอบแห้งแบบถาดอยู่กับที่นี้ วัสดุที่ต้องการอบแห้งจะบรรจุอยู่ในถาดซึ่งวางซ้อนกันโดยมีช่องว่างของอากาศระหว่างถาด

ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของวัสดุไม่ควรสูงมากนัก (ควรต่ำกว่า 24 เปอร์เซ็นต์) โดยเครื่องอบแห้งแบบนี้จะทำให้วัสดุแห้งโดยการให้ลมร้อนไหลผ่านวัสดุที่บรรจุอยู่ในถาด

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปผงแห้งมีข้อดีคือมีอายุการเก็บรักษานาน การขนส่งสะดวกซึ่งการทำแห้งจะทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์หยุดลง และเป็นการป้องกันการงอกของสปอร์ด้วย การที่จุลินทรีย์จะมีความสามารถในการทนต่อความแห้งได้นั้นจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ วัสดุตัวกลางที่ห่อหุ้มจุลินทรีย์ โดยถ้าสามารถเลือกวิธีการทำแห้งที่ถูกวิธีจะทำให้สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตที่สูง และมีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้นได้

8. การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งหรือการทำแห้งแบบระเหิด (sublimation drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า “Lyophilization” เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ จึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส โครงสร้าง สี กลิ่น และรสชาติ ใกล้เคียงกับของสด โดยหลักการพื้นฐานของกระบวนการทำแห้งชนิดต่าง ๆ สามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (phase diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ (Figure 11.) จุด A ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ (30 องศาเซลเซียส และ 105 ปาสคาล) น้ำอยู่ในสถานะของเหลว การทำแห้งโดยทั่วไป (convention drying) จะให้พลังงานความร้อนกับผลิตภัณฑ์ จนถึงระดับความร้อนแฝงของการระเหยน้ำ (latent heat of evaporation) น้ำภายในผลิตภัณฑ์ระเหยเปลี่ยนสถานะเป็นไอที่จุด B แต่การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็ง C หรือจุด D ซึ่งต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำภายในผลิตภัณฑ์สร้างผลึกเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดความดันสุญญากาศจนถึงจุดต่ำกว่าจุด E หรือเส้นขอบเขตของการเปลี่ยนสถานะ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งภายในผลิตภัณฑ์เกิดการระเหิดเปลี่ยนสถานะกลายเป็นไอได้อย่างสมบูรณ์ (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547)

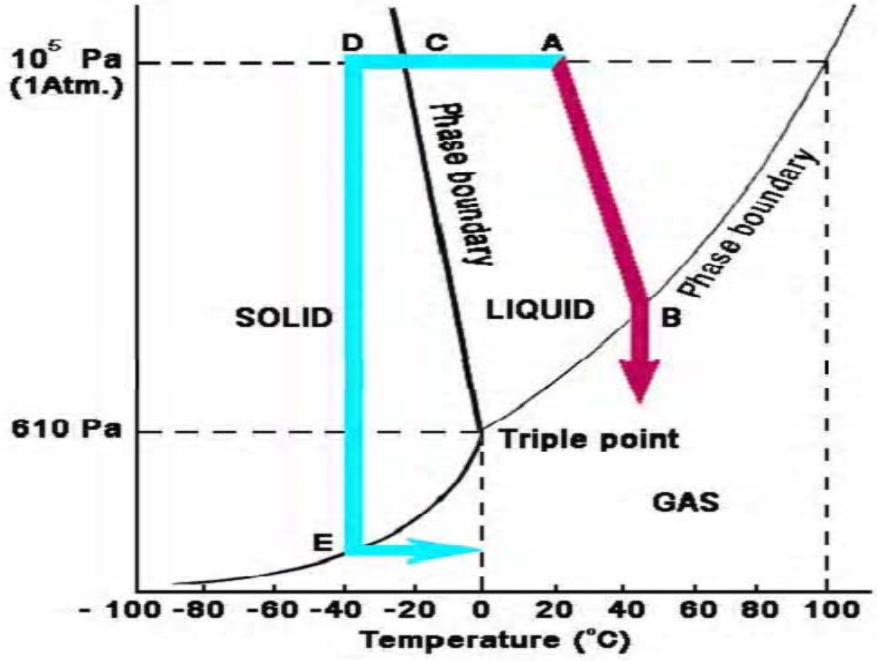


Figure 11. Water phase diagram.

ที่มา : ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ การแช่เยือกแข็งการทำแห้งระยะที่ 1 (primary drying) และการทำแห้งระยะที่ 2 (secondary drying) ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

การแช่เยือกแข็งในขั้นตอนนี้เป็นการลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ลงจนถึงจุดเยือกแข็งหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ให้น้ำหรือสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ สิ่งสำคัญของขั้นตอนนี้ คือ การเกิดผลึกน้ำแข็ง ระดับความเร็วของการแช่เยือกแข็งควรเป็นการแช่แบบเร็ว (quick freezing) เนื่องจากผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก ซึ่งเกิดจากน้ำที่อยู่ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์แข็งตัวอย่างรวดเร็ว ลักษณะของผลึกเช่นนี้ ไม่ทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหาย แต่หากเป็นการแช่เยือกแข็งแบบช้า (natural freezing) เวลาในการเกิดผลึกนาน ทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่เบียดช่องว่างระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์แตก โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ได้รับความเสียหาย การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบเร็วที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่แข็งแบบลมเป่า การแช่เยือกแข็งแบบสัมผัส และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด เป็นต้น

การทำแห้งระยะที่ 1 (primary drying) ขั้นตอนนี้เป็นการลดความดันลง เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของความดันสุญญากาศควรอยู่ในระดับสุญญากาศละเอียด (fine vacuum) ถึงระดับสุญญากาศสูง (High vacuum)

ซึ่งมีความดันต่ำกว่า 132 ปาสคาล และ 132 mPa ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งระหว่างการทำแห้งระยะที่ 1 (Figure 12.) แหล่งความร้อนถ่ายเทความร้อนแฝงในการระเหิดกับผลิตภัณฑ์ โดยมีลำดับของการระเหิด ดังนี้

- การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (ice layer) บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์
- ชั้นน้ำแข็งที่ระเหิดไป กลายเป็นชั้นแห้ง (dry layer) อยู่บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์
- ชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ระเหิดผ่านชั้นแห้งออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์

ทั้งนี้เวลาการระเหิด (sublimation time) ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดว่าโครงสร้างเซลล์โปร่งหรือแน่นเพียงใด

การทำแห้งระยะที่ 2 (secondary drying) ในขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดน้ำที่อยู่ในรูปของพันธะกับสารอื่น (bound water) ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งไม่ตกผลึกและแข็งตัวไปกับน้ำอิสระ ช่วงการทำแห้งนี้ เรียกว่า “desorption” จาก Figure 12. ช่วงของการ desorption อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนแฝงให้ชั้นน้ำแข็งหมดไป พลังงานจากแหล่งความร้อนจึงถ่ายเทสู่ผลิตภัณฑ์โดยตรง

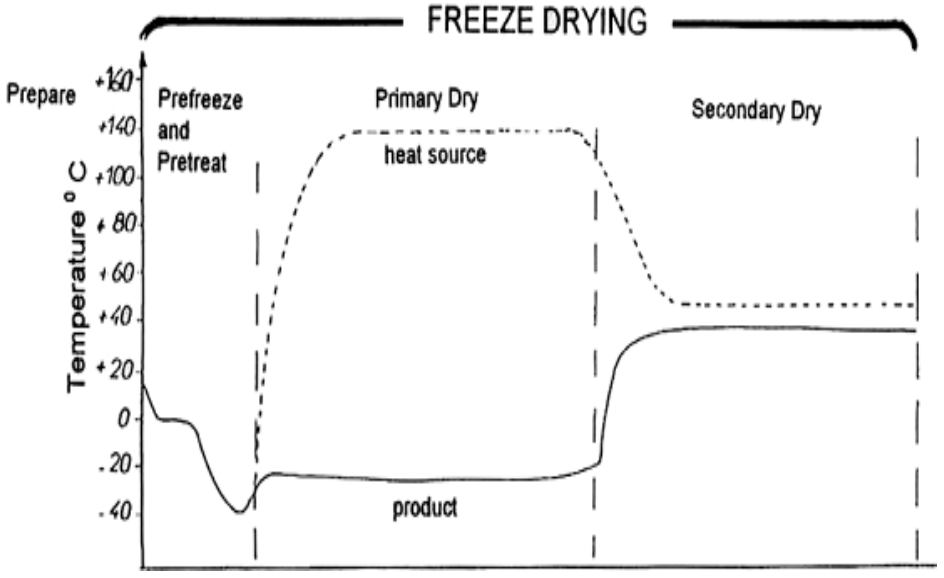


Figure 12. Freeze drying process.

ที่มา : ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

9. ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในรูปผลิตภัณฑ์

การรอดชีวิตและกิจกรรมของโปรไบโอติกมีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรไบโอติกต้องรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาซึ่งต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตน้อยที่สุด 7 log CFU/g จนกระทั่งวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Ouwehand and Salminen, 1998) นอกจากนี้ต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารและต้องทนต่อการทำลายของเอนไซม์และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก ซึ่งมีปัจจัยหลายด้านด้วยกันที่มีบทบาทต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก โดยสามารถสรุปได้ ดังนี้

9.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ จะทำให้การรอดชีวิตของจุลินทรีย์เมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่าง ๆ มีจำนวนมาก ทำให้ผู้บริโภคได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ จากการทดลองของ To และ Etzel (1997) ได้ศึกษาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *L. lactis* ssp. *cremoris* D11, *L. casei* ssp. *pseudo-plantarum* UL137 และ *S. thermophilus* CH3TH โดยใช้ Maltodextrin 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเซลล์ และพบว่า *L. lactis* ssp. *cremoris* D11, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* UL137 และ *S. thermophilus* CH3TH มีการรอดชีวิตของจุลินทรีย์อยู่ที่ 63, 71 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Capela และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* และ *B. longum* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า *B. longum* มีการรอดชีวิตสูงกว่า *L. acidophilus* แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการรอดชีวิตของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ (Carvalho *et al*., 2004)

9.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยแรกที่ควรคำนึงถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นั้นสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว

Bruno และ Shah (2002) ศึกษาการเจริญ การรอดชีวิตและกิจกรรมของ *Bifidobacterium* spp. 5 สายพันธุ์ ในนมพร่องมันเนยที่มีส่วนประกอบของพรีไบโอติก 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งสารพรีไบโอติกที่ใช้ คือ Hi-maize starch, Raftilose แลคทูโลสและอินนูลินซึ่งชุดควบคุม คือ ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารพรีไบโอติก ในการหมักและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยง *B. animalis* ร่วมกับการเติม Hi-maize starch

ส่งเสริมการเจริญและการรอดชีวิตดีที่สุด โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 75.34 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารพรีไบโอติกให้การรอดชีวิตเท่ากับ 1.73 เปอร์เซ็นต์

9.3 พีเอช จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญในพีเอชที่ต่างกันดังนั้นพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันก็ส่งผลให้จุลินทรีย์มีการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน จากการทดลองของ Palmfeldt และ Hgerdal (2000) ซึ่งเลี้ยง *L. reuteri* ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับก่อนทำแห้ง พบว่าที่พีเอช 5.0 เซลล์มีการรอดชีวิตประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าที่พีเอช 6.0 ซึ่งรอดชีวิตประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

พีเอชที่ต่ำทำให้การรอดชีวิตของโปรไบโอติกลดน้อยลง ในสภาวะที่เป็นกรดโปรไบโอติก เช่น *L. acidophilus* รอดชีวิตดีกว่า *L. delbrueckii* spp. และ *S. thermophilus* ในโยเกิร์ต Hood และ Zottola (1988) พบว่า *L. acidophilus* (BG2f04) มีการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วที่พีเอช 2.0 แต่ที่พีเอช 4.0 ไม่พบการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิต เหตุผลนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lankaputhra และคณะ (1996) ซึ่งศึกษา *L. acidophilus* 6 สายพันธุ์ ซึ่งรอดชีวิตสูงที่พีเอช 3.0 หรือมากกว่า และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต มากกว่า 10^7 CFU/g หลังจากบ่ม 3 ชั่วโมง แต่ *L. acidophilus* มีความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดมากกว่า *B. bifidum* และการเจริญของ *B. bifidum* จะช้าลงที่พีเอชประมาณ 5.0 แต่อย่างไรก็ตามการทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารของ *Bifidobacterium* นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

9.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่า *Lactobacillus* มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญ 2-53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส

9.5 ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเชื้อ การเจริญของแบคทีเรียมี 4 ระยะ คือ lag, log, stationary และ death phase ซึ่งที่ระยะ stationary phase จะเกิดความหลากหลายทางกายภาพของเซลล์ โดยระยะที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ Corcoran และคณะ (2004) พบว่าที่ระยะ stationary phase *L. rhamnosus* มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง 31-50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระยะ log phase มีการรอดชีวิต 14 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะ lag phase เซลล์รอดชีวิตน้อยที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์

9.6 สาร cryoprotectant คือ วัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้เพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก สาร cryoprotectant ก็มีด้วยกันหลายชนิด ที่นิยมใช้

ได้แก่ นมพร่องมันเนยคืนรูป ซูโครส เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้วัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์อย่างเหมาะสมจะทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตที่สูง

Saarela และคณะ (2006) ศึกษาการใช้ไฟเบอร์จากแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ต และอินนูลิน เป็นตัวพยุงเซลล์ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เปรียบเทียบกับการใช้ซูโครสเป็นตัวพยุง พบว่า *L. rhamnosus* ที่ห่อหุ้มอยู่ในตัวพยุงที่เป็นไฟเบอร์จากข้าวโอ๊ตมีการรอดชีวิตสูงกว่าตัวพยุงชนิดอื่น หลังจากผ่านการ

Michida และคณะ (2006) ศึกษาการใช้สารสกัดจากธัญพืช (cereal extract) และเส้นใยจากธัญพืช (cereal fiber) ที่สกัดจากข้าวมอลต์และบาร์เล่ย์ มาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ของ *L. plantarum* เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกที่มีกรดแลกติก เมื่อผ่านสภาวะในทางเดินอาหาร พบว่า เมื่อเซลล์อิสระผ่านสภาวะที่เสมือนน้ำย่อยในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 30 นาที ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU/ml จะลดลงเหลือ 1.92 log CFU/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับผลของเซลล์ที่มีการห่อหุ้มด้วยสารสกัดบาร์เล่ (barley extract) 2 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะเดียวกันที่เวลา 180 นาทีปรากฏว่าปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU/ml จะลดลงเหลือ 6.5 log CFU/ml ส่วนผลของเซลล์อิสระในสภาวะน้ำดีนั้น เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 240 นาทีปรากฏว่าไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการรอดชีวิตของโปรไบโอติกให้เพิ่มมากขึ้นหรือลดจำนวนลง ส่วนเซลล์อิสระที่มีการห่อหุ้มด้วยสารสกัดบาร์เล่ 2 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะเดียวกันที่เวลา 240 นาที ปรากฏว่าปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่มี 7.59 log CFU/ml จะเพิ่มขึ้นเป็น 7.72 log CFU/ml

Sultana และคณะ (2000) ศึกษาการห่อหุ้มโปรไบโอติก ด้วยอัลจิเนตร่วมกับแป้งข้าวโพด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก แล้วเติมลงในโยเกิร์ต หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปเซลล์อิสระจะมีลดลงประมาณ 1 logcycle ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีการห่อหุ้มมีจำนวนลดลงประมาณ 0.5 logcycle

9.7 อุณหภูมิและภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น และภาชนะที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์ มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์ โดยต้องไม่มีการแพร่ผ่านของออกซิเจนและความชื้น จากการทดลองของ Dave และ Shah (1997) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส นาน 35 วัน ในขวดแก้วและถ้วยพลาสติก พบว่า หลังการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 35 วัน *L. acidophilus* ที่เก็บในขวดแก้วพบรอดชีวิต 3.49 log CFU/g ขณะที่การเก็บในแก้วพลาสติกพบการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* 3 log CFU/g ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณออกซิเจน

ที่อยู่ในขวดแก้วจะต่ำในขณะที่โยเกิร์ตในถ้วยพลาสติกจะมีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจน โดยปริมาณออกซิเจนที่ต่ำนำมาสู่การรอดชีวิตของโปรไบโอติก

วัตถุประสงค์

1. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตและขนาดของเม็ดเจลที่ใช้ห่อหุ้มโปรไบโอติกต่อการรอดชีวิตจากสภาวะกรด
2. เปรียบเทียบการทนกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน สัตว์และอาหารหมัก
3. ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารที่ใช้ร่วมกับการห่อหุ้มต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากสภาวะกรด
4. ศึกษาผลของการเคลือบเม็ดเจลต่อการรอดชีวิตจากสภาวะกรดของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม
5. ศึกษาวิธีการทำแห้งและการเก็บรักษาโปรไบโอติกในรูปของผลิตภัณฑ์แคปซูล

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 แบคทีเรียโปรไบโอติก

2.1.1.1 *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

2.1.1.2 *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034

2.1.1.3 *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5

Lactobacillus plantarum TISTR 875 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกมาจากกะหล่ำปลีดองและหนู ตามลำดับ

Lactobacillus plantarum CIF17 A5 แยกมาจากอุจจาระของเด็กทารกเพศชายอายุ 5 เดือน

2.1.2 แบคทีเรียแลกติกที่ผลิต Exopolysaccharide (EPSs)

2.1.2.1 *Weissella cibaria* A2 แยกมาจากทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่ (นันทินา เชิญทอง, 2550)

2.2 พืชที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากพืชและเส้นใย

2.2.1 ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr)

2.2.2 ข้าวโพด (*Zea mays* L.)

2.2.3 ถั่วเขียว (*Vigna radiate* (L.) R.Wilczek)

2.2.4 กล้วยหอม (*Musa paradisiacal* L.Var. sapientum O.Ktze)

2.3 ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
1. HCl 37 เปอร์เซ็นต์	Lab scan/ Analytical/ Thailand
2. NaOH	Merck/ Analytical/ Germany
3. De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia/ Analytical/ India
4. NaCl	Merck/ Analytical/ Germany
5. Peptone water	Merck/ Germany
6. Bile salt (Oxgall)	Himedia/ India
7. Bromocresol purple	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
8. $CaCl_2.2H_2O$	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
9. Sodium alginic acid	Food grade/UK
10. K_2HPO_4	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
11. KH_2PO_4	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
12. Cysteine–HC1	Fluka/ Germany
13. Acetic acid glacial 99.7 เปอร์เซ็นต์	Lab scan / Analytical/ Thailand
14. Pepsin from porcine stomach mucosa	Sigma/ Analytical/ Germany
15. Pancreatin from porcine stomach mucosa	Sigma/ Analytical/ Germany
16. Chitosan 92 เปอร์เซ็นต์ degree of deacetylation	Food grade/ Thailand
17. Nitrogen gas	Com. Grade 98 เปอร์เซ็นต์

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorius/ USA
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorius/ USA
3. Vortex Mixer	Labnet/ USA
4. กล้องจุลทรรศน์	Nikon/ USA
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach/ Germany

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

6. ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ	Scientific promotion/
7. Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Philadelphia/ USA
8. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation)	Büchi Rotavapor® R-200/205, Switzerland
9. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy/ Japan
10. Vial ขนาด 20 ml	-
11. Microtiterplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek/ UK
12. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo/ Thailand
13. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 µl)	LabMate/ USA
14. ไมโครปิเปต (ขนาด 1000 µl)	Gilson/ France
15. ไมโครปิเปต (20-200 µl)	LabMate/ USA
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert/ USA
17. เข็มฉีดยา	NIPRO/Belgium
18. สายยางซิลิโคน ขนาด 4x7 ml	-
19. Peristaltic pump BT00-300T	China
20. กระดาษกรองเบอร์ 4	Advantec/Japan
21. เครื่อง Freeze dry	FTS system/ USA
22. เครื่องเขย่าสาร (shaker)	PNP/TJ instrument/Australia
23. เครื่องปิดผนึกภาชนะยืดหยุ่นแบบสุญญากาศ	Henko/ Japan
24. ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์เคลือบ 3 ชั้น (ไนลอน โพลิเอทิลีน และฟอยด์)	Thailand
25. Sputter coater (WI-RES-Coater-001)	UK

2.5 วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก

2.5.1.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์

นำแบคทีเรียแลกติกมาทำการเจือจางแบบ serial ten-fold dilution ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยแบคทีเรียที่ผ่านกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^2 ถึง 10^4 และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านกรด ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^6 ถึง 10^8 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยการ pour plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารแข็ง MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU/ml

2.5.1.2 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการห่อหุ้ม

ชั่งเม็ดเจล 1 กรัม เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 9 มล. นำไปเขย่าบนเครื่อง vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 10 นาที เจือจาง suspension ของเซลล์ที่ได้ต่อแบบ serial ten-fold dilution ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจล โดยการ pour plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารแข็ง MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU/ml

เม็ดเจล 1 กรัม สามารถคำนวณเป็นค่า log CFU/ml ได้ดังนี้ ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ 40 ml ได้เม็ดเจล 22 กรัม ดังนั้นเม็ดเจล 1 กรัม จะเท่ากับแบคทีเรีย 1.82 ml ถ้าในเม็ดเจลมีแบคทีเรีย 10^9 CFU/g ก็จะเท่ากับแบคทีเรีย 0.55 x 10^9 CFU/ml ซึ่งเท่ากับ 8.74 log CFU/ml

2.6 การเตรียมสารสกัดและเส้นใยพืช

2.6.1 การเตรียมสารสกัดและเส้นใยจากข้าวโพด ถั่วเหลืองและถั่วเขียว

นำเมล็ดข้าวโพด อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อสะดวกในการเก็บรักษา สามารถเก็บตัวอย่างมาได้ครั้งละมาก ๆ ในครั้งเดียว และเก็บไว้ได้ใช้ตลอดการทดลอง ซึ่งเมื่ออบแห้งแล้วนำมาหาความชื้นในพืชแต่ละชนิดโดยใช้เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer) จากนั้นนำมาเก็บใส่ถุงปิดผนึกเพื่อเก็บไว้ทดลองต่อไป

นำตัวอย่างมาบดและชั่งน้ำหนัก 5 กรัม สกัดด้วยน้ำ 95 ml ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เขย่าหรือกวนเป็นเวลา 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดธัญพืช และส่วนตะกอนซึ่งเป็นเส้นใยนำไปทำแห้ง

แบบแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักที่ได้และเก็บสารสกัดในถุงปิดผนึกใส่ในกล่องที่มีสารดูดความชื้นและเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.6.2 การเตรียมสารสกัดเนื้อกล้วยและเปลือกกล้วย

นำเนื้อกล้วยและเปลือกกล้วยหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งการอบเพื่อสะดวกในการเก็บรักษา สามารถเก็บตัวอย่างมาได้ครั้งละมาก ๆ ในครั้งเดียว และเก็บไว้ได้ใช้ตลอดการทดลอง ซึ่งเมื่ออบแห้งแล้วนำมาหาความชื้นในพืชแต่ละชนิดโดยใช้เครื่องวัดความชื้น จากนั้นนำมาเก็บใส่ถุงปิดผนึกเพื่อเก็บไว้ทดลองต่อไป

นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดโดยเติมสารละลายเอทานอลเป็นตัวกลาง ปั่นด้วยเครื่องปั่น (blender) ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้ว 10 กรัม เติมเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 100 ml (ตัวอย่าง 10 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ เพื่อแยกกากออก แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนตะกอนซึ่งเป็นเส้นใยออกจากสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดมาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator จากนั้นนำตัวอย่างมาทำเป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักที่ได้และเก็บสารสกัดในถุงปิดผนึก ใส่ในกล่องที่มีสารดูดความชื้นและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Hedley, 2001)

2.7 การเตรียมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (EPSs) จากแบคทีเรียแลกติก

ทำการเตรียมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรีย *Weissella cibaria* A2 ตามวิธีการของ Smitinont และคณะ (1999)ในอาหาร MRS ปริมาตร 200 ml ในฟลาก์ส ขนาด 500 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงบนอาหาร MRS แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกตัวเซลล์ออกโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของสารละลาย และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาทำให้แห้งในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วรายงานผลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ในรูปน้ำหนักแห้งของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (g)/ปริมาตรของอาหาร (ml) นำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บ

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ในขวดเก็บแก้วปิดสนิทไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

2.8 วิธีการวิจัย

2.8.1 ผลของขนาดเม็ดเจลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

2.8.1.1 การเตรียมเซลล์โปรไบโอติกเริ่มต้น

นำเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1034 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ในขวดฝาปิดสนิทขนาด 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตัวเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยง 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตัวเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 2 ครั้ง และเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำให้เป็น suspension และเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นับจำนวนเซลล์เริ่มต้น ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.1 รายงานผลเป็น log CFU/ml

2.8.1.2 การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก

นำโปรไบโอติกมาห่อหุ้มตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Chandramoulia และคณะ (2004) โดยนำ *L. acidophilus* TISTR 1034 ที่เตรียมจากข้อ 2.8.1.1 มาห่อหุ้ม โดยแขวนลอยเชื้อปริมาณ 9-10 log CFU/ml ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 6.9 ปริมาตร 40 ml แล้วหยด suspension ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 27G, 24G, 22G และ18 G ความสูงของปลายเข็มฉีดยากับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 5 เซนติเมตร ควบคุมความเร็วในการหยดด้วย peristatic pump แช่เม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นเวลา 30 นาที แยกเม็ดเจลโดยการกรองเม็ดเจลผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร

2.8.1.3 การวัดขนาดของเม็ดเจล

นำเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มโดยใช้เข็มฉีดยา ขนาด 27G, 24G, 22G และ18 G มาวัดขนาดโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper) โดยวัดขนาด 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

2.8.1.4 ผลของกรดต่อการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม

นำเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มในข้อ 2.8.1.2 และเซลล์อิสระ มาแช่ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ที่มีการเติมเปปซิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกเม็ดเจลออกจากสารละลายกรดโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาล้าง 2 ครั้ง ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเหมือนข้อ 2.5.1.2

คำนวณการรอดชีวิตโดย

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังแช่กรด 3 ชั่วโมง (log CFU/ml)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียก่อนแช่กรด (log CFU/ml)}} \times 100$$

2.8.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

เตรียมเซลล์เริ่มต้นของ *L. acidophilus* TISTR 1034 ตามวิธีการข้อ 2.8.1.1 มาศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด จากนั้นนำเซลล์ที่เตรียมได้มาห่อหุ้มตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1.2 โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ นำเม็ดเจลที่ได้มาวัดขนาดตามวิธีการข้อ 2.8.1.3 และศึกษาทนการต่อกรดตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1.4 เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ นับจำนวนจุลินทรีย์หลังการห่อหุ้มและผ่านสภาวะที่เป็นกรด ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.5.1 และคำนวณการรอดชีวิต คัดเลือกความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เซลล์โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงสุดจากสภาวะกรดได้

2.8.3 เปรียบเทียบการทนกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน สัตว์และอาหารหมัก

จากการทดลองข้อที่ 2.8.1 และข้อ 2.8.2 ซึ่งศึกษาผลของขนาดเม็ดเจลและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด จากนั้นคัดเลือกขนาดของเข็มฉีดยาและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตซึ่งทำให้ *L. acidophilus* TISTR 1034 มีการรอดชีวิตจากสภาวะกรดได้สูงสุด เพื่อใช้ในการทดลอง 2.8.3 ซึ่งทดลองเพื่อเปรียบเทียบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน สัตว์และอาหารหมักโดยใช้โปรไบโอติก 3 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* CIF17 A5 แยกมาจากอุจจาระของเด็กทารกเพศชายที่ได้รับนมแม่และนมผง 5 เดือน คลอดด้วยการผ่าตัด *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 เป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกมาจากหนูและกะหล่ำปลีดอง และเก็บรักษาไว้ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

เตรียมเซลล์และห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกเริ่มต้นของ *L. plantarum* CIF17 A5 *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ตามวิธีการข้อ 2.8.1.1 ทำการห่อหุ้มเซลล์ตามวิธีการข้อ 2.8.1.2 โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G ตามลำดับ และนำเม็ดเจลที่ได้มาแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ตามวิธีการข้อ 2.8.1.4 นับเซลล์เริ่มต้นก่อนการแช่กรด เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรดตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.5.1 และคำนวณการรอดชีวิต

2.8.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก

2.8.4.1 การใช้พรีไบโอติกหรือเส้นใยจากพืชร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านกรด

นำโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อที่ 2.8.3 มาศึกษาผลของการใช้พรีไบโอติกหรือเส้นใยจากพืชร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่มีกรด

(1) การเตรียมเซลล์เริ่มต้น

เตรียมเซลล์โปรไบโอติกที่ได้คัดเลือกได้จากการทดลองข้อที่ 2.8.3 ตามวิธีการข้อ 2.8.1.1 จากนั้นทำการสกัดสารสกัดและเส้นใยจากพืช เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ตามวิธีการข้อ 2.6.1 และ 2.6.2

(2) การห่อหุ้มเซลล์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมสารพรีไบโอติก (co-encapsulation)

นำโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 2.8.3 มาห่อหุ้มตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Chandramoulia และคณะ (2004) โดยเตรียมเซลล์เริ่มต้นของ *L. plantarum* CIF17 A5 ตามวิธีการข้อ 2.8.1.1 ผสมกับโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และเติม 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของสารพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหาร โดยใช้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผสมให้เข้ากัน นำไปหยดในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วแช่เม็ดเจลที่ได้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 2 ครั้ง นำเม็ดเจลที่ได้มาผ่านกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามวิธีการข้อ 2.8.1.3 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2.5.1.2 และคำนวณการรอดชีวิต

2.8.4.2 ผลของความเข้มข้นของพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารต่อการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในอัลจิเนตในสภาวะที่เป็นกรด

นำโปรไบโอติกทีคัดเลือกได้จากข้อ 2.8.3 มาห่อหุ้มด้วยสารสกัดหรือเส้นใยจากพืชที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.8.4.1 ซึ่งทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตจากสภาวะกรดได้สูงสุดมา

ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของ พรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารที่คัดเลือกได้ต่อการรอดชีวิตในสภาวะที่มีกรด โดยเริ่มจากการเตรียมเซลล์เริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1.1 ทำการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมเส้นใยหรือพรีไบโอติกที่คัดเลือกจากข้อ 2.8.4.1 ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร นำเม็ดเจลที่ได้มาแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ที่มีเปปซิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามข้อ 2.8.1.4 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2.5.1.2 และคำนวณการรอดชีวิต จากนั้นจะคัดเลือกความเข้มข้นพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตจากสภาวะกรดได้สูงสุด

2.8.4.3 ผลของการเคลือบเม็ดเจลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหาร

นำเซลล์โปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารตามข้อ 2.8.4.2 มาศึกษาผลของการเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซาน และโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร

(1) การเตรียมสารละลายไคโตซาน

การเคลือบด้วยไคโตซานเริ่มจากเตรียมสารละลายไคโตซาน (92 เปอร์เซ็นต์ degree of diacetylation) โดยชั่งไคโตซาน 0.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 90 ml ที่มีกรดอะซิติก 0.4 ml จนได้ไคโตซานที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งปกติแล้วไคโตซานจะไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่มีพีเอชสูงกว่า 6.5 จากนั้นนำสารละลายไคโตซานที่ได้มาปรับให้ได้พีเอช 5.7 ถึง 6 ด้วยสารละลาย NaOH 1 โมลาร์ จากนั้นฆ่าเชื้อสารละลายไคโตซานโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Zhou *et al*., 1998)

(2) การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

จากการเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต โดยชั่งโซเดียมอัลจิเนต 0.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml จากนั้นฆ่าเชื้อสารละลายโซเดียมอัลจิเนต โดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

(3) การห่อหุ้มเซลล์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมสารพรีไบโอติก (Co-encapsulation) (ดัดแปลงจาก Chandramoulia, และคณะ 2004) ตามวิธีการข้อ 2.8.4.1 (2)

(4) การเคลือบเม็ดเจล

ชั่งเม็ดเจล 12 กรัม แช่ในสารละลาย ไคโตซานและ สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 100 ml เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที กรองเม็ดเจลออกจากสารละลาย ไคโตซานและสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร (Zhou *et al*.,

1998) จากนั้นนำเม็ดเจลมาแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ที่มีเปปซิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามวิธีการข้อ 2.8.1.4 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2.5.1.2 จากนั้นคัดเลือกสารเคลือบเม็ดเจลที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตจากสภาวะกรดได้สูงสุดโดยเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ, เซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตโดยปราศจากการเคลือบเม็ดเจลด้วยสารต่าง ๆ และนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.8.4.4 ผลของวิธีการทำแห้งเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม

นำเซลล์โปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.8.3 มาห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับการเติมพรีไบโอติกหรือเส้นอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.8.4.1 ในระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 2.8.4.2 เคลือบเม็ดเจลด้วยสารเคลือบที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีชีวิตรอดมากที่สุดหลังการผ่านกรด มาศึกษาผลของวิธีการทำแห้งเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม โดยวิธีการทำแห้งที่ใช้ คือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและทำแห้งที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศ โดยเตรียมเซลล์เริ่มต้นและห่อหุ้มเซลล์ตามวิธีการข้อ 2.8.1.1 และ 2.8.4.1 (2) นำเม็ดเจลที่ได้ไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและทำแห้งที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศโดยระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งทราบได้โดยวัดความชื้น ของเม็ดเจลจนเม็ดเจลมีความชื้นคงที่ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดหลังจากทำแห้งตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.2 คำนวณการรอดชีวิต

2.8.4.5 ผลของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

(1) ผลของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำเซลล์โปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.8.3 มาห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับการเติมพรีไบโอติกหรือเส้นอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.8.4.1 ในระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 2.8.4.2 และเคลือบเม็ดเจลด้วยสารเคลือบที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีชีวิตรอดมากที่สุด ชั่งเม็ดเจล 1 กรัม ใส่ขวดแก้ว (vial) และเติมสารละลาย cryoprotectant เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 1 มล. ซึ่งสาร cryoprotectant ที่ใช้ คือ นมพร่องมันเนย ซูโครส และตะกอนถั่วเหลือง โดยชุดควบคุม คือ เม็ดเจลที่มีการเติมสารละลายเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 M และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร นำเม็ดเจลไปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดหลังการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.2 และคำนวณการรอดชีวิต และคัดเลือกสาร cryoprotectant ที่ทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตมากที่สุดเพื่อทำการทดลองต่อไป

(2) ผลความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

จากการทดลองที่ 2.8.4.5 (1) ซึ่งคัดเลือกสาร cryoprotectant ซึ่งทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงหลังจากกระบวนการทำแห้ง เพื่อมาศึกษาผลความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่ใช้ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และนับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดหลังการทำแห้งแบบวิธีแช่เยือกแข็ง ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.2 และคัดเลือกความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุดหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาทำการทดลองต่อไป

2.8.5 ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีกรดสูง และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่ผ่านถูกห่อหุ้มหลังผ่านการทำแห้ง โดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง

การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีกรดสูง และเกลือน้ำดีของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง ทำโดยชั่งเม็ดเจล 1 กรัม แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 2 ที่มีเปปซิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงแยกเม็ดเจลที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งการทดลองเป็นสองส่วน ส่วนแรก คือ ส่วนที่ไม่ผ่านสภาวะที่มีเกลือน้ำดีนำมานับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.2 และส่วนที่สองนำเม็ดเจลมาเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 และมีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.2

2.8.6 ศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยของเซลล์ออกจากเม็ดเจล

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วย ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีการข้อ 2.8.4.1 (2) จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้เคลือบด้วยสารละลายไคโตซาน 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ชั่งเม็ดเจล 1 กรัม ใส่ขวดแก้ว (vial) และเติมสารละลายซูโครส เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 1 ml นำเม็ดเจล 1 กรัม ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มาละลายกลับในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 5, 6, 7 และ 8 ปริมาตร 1 ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดย

การ pour plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเซลล์

คำนวณเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเซลล์โดย

$$\%\text{Cell release} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียปลดปล่อยออกมาที่เวลาต่าง ๆ (log CFU/ml.)}}{\text{จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการทำแห้ง (log CFU/ml.)}} \times 100$$

2.8.7 ผลของอุณหภูมิและสภาวะการเก็บรักษาโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มและทำแห้งหลังการบรรจุในแคปซูล

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วย ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีการข้อ 2.8.4.1 (2) จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้เคลือบด้วยสารละลายไคโตซาน 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ชั่งเม็ดเจล 0.5 กรัม ใส่ขวดแก้ว (vial) เติมสารละลายซูโครส เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเส้นใยถั่วเหลืองความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 ml นำเม็ดเจลที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และนำมาบรรจุในแคปซูลเจลาตินแบบแข็งเบอร์ 1 (Figure 13.) จะได้ผลิตภัณฑ์ดังแสดงใน Figure 14. นำแคปซูลบรรจุในสภาพสุญญากาศในถุงลามิเนต (Figure 15.) นำผลิตภัณฑ์ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.5.1.2 ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์

Figure 13. Hard gelatin capsules.

Figure 14. Co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 stored in soft gelatin capsules.

Figure 15. Aluminium foil bag.

2.8.8 ผลการศึกษาลักษณะของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วย scanning electron microscope (SEM)

นำตัวอย่างเม็ดเจลที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มาทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Eun และคณะ (2007) โดย นำตัวอย่างมาติดบนแท่งวางตัวอย่าง (stub) โดยใช้ metallic tape เป็นตัวยึด นำตัวอย่างไปเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater (WI-RES-Coater-001) นำตัวอย่างไปศึกษาด้วย SEM

กรณีที่เม็ดเจลที่ยังไม่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำมาทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Eun และคณะ (2007) โดยนำเม็ดเจล มา fix ครั้งแรก ด้วย glutaraldehyde 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และ paraformaldehyde 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ใน glycine–HCl buffer พีเอช 2.0 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลา ล้างตัวอย่างด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง และนำตัวอย่างมา fix ครั้งที่สอง ด้วย osmium tetroxide 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลา ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ alcohol series นำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Critical point drying (WI-RES-CPD-001) ตัวอย่างมาติดบนแท่งวางตัวอย่าง (stub) โดยใช้ metallic tape เป็นตัวยึด นำตัวอย่างไปเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater (WI-RES-Coater-001) นำตัวอย่างไปศึกษาด้วย SEM

2.8.9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม SPSS (Statistical Packages for the Social Science) โดยข้อที่ 2.8.1-2.8.5 และ 2.8.7 วิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกการทดลองทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลของขนาดเม็ดเจลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

นำ *L. acidophilus* TISTR 1034 มาห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G, 22G, 24G และ 27G เปรียบเทียบการรอดชีวิตกับเซลล์อิสระในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ในเม็ดเจลโดยใช้หัวเข็มขนาด 18G ซึ่งให้เม็ดเจลขนาด 2.40 mm. (Table 11.) ทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 45.43 เปอร์เซ็นต์ (Figure 16A.) เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรีย พบว่าเริ่มต้น 9.18 log CFU/ml ลดลงเหลือ 4.17 log CFU/ml (Figure 16B.) และนอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ในเม็ดเจลโดยใช้หัวเข็มขนาด 22 ซึ่งให้เม็ดเจลขนาด 2.10 mm. (Table 11.) ทำให้มีค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 37.94 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เข็มฉีดยาขนาด 24 และ 27G ซึ่งให้เม็ดเจลขนาด 2.08 และ 1.80 mm. (Table 11.) ตามลำดับ โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 32.11 และ 30.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าการรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์อิสระให้ค่าการรอดชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม โดยให้ค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 26.16 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองจะพบว่าการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้เข็มขนาด 18G ให้เม็ดเจลขนาดใหญ่กว่าการใช้เข็มขนาด 22, 24 และ 27G ซึ่งเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่จะให้ค่าการรอดชีวิตสูง เนื่องจากเม็ดเจลขนาดใหญ่จะมีพื้นที่สัมผัสกับกรดน้อยกว่าเม็ดเจลขนาดเล็ก ขณะที่เม็ดเจลขนาดเล็กจะมีพื้นที่สัมผัสกับกรดมากกว่า ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chandramoulia และคณะ (2004) โดยห่อหุ้ม *Lactabacillus* 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 ด้วยวิธี extrusion โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเม็ดเจลที่ได้มีขนาด 200, 450 และ 1,000 μm พบว่า ภายใต้สภาวะกรดพีเอช 2.0 ของทางเดินอาหาร การรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้น โดยเม็ดเจลขนาด 1,000 μm ทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตได้มากที่สุดรองลงมาคือเม็ดเจลขนาด 450 และ 200 μm ตามลำดับ นอกจากนี้ Lee และ Heo (2000) ยังรายงานว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะกรดทางเดินอาหารส่วนต้นลดลงเมื่อขนาดของเม็ดเจลลดลง จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G ในการห่อหุ้มเซลล์ให้ค่าการรอดชีวิตสูงสุด เนื่องจากการใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G ให้ขนาดเม็ดเจลขนาดใหญ่ ซึ่งมีพื้นที่สัมผัสกับกรดน้อย ดังนั้นจึงเลือกเข็มฉีดยาขนาด 18G ไปใช้ในการทดลองต่อไป

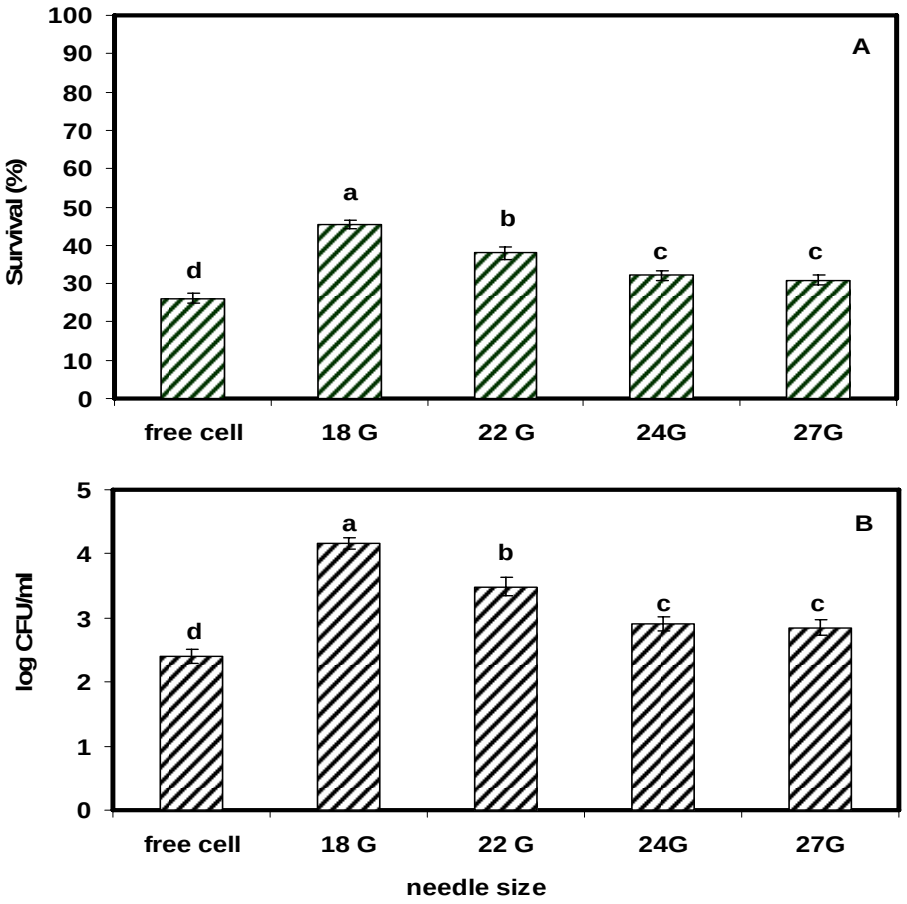


Figure 16. Effects of needle size on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C).

Table 11. The size of encapsulated *L. acidophiilus* TISTR 1034 beads was determined by using the vernier caliper.

Needle size	Beads size (mm.)
18G	2.40 ± 0.050
22G	2.10 ± 0.100
24G	2.08 ± 0.161
27G	1.80 ± 0.050

3.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

เมื่อศึกษาการรอดชีวิตจากสภาวะกรดสูงของ *L. acidophilus* TISTR 1034 ที่ถูกห่อหุ้ม โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งให้เม็ดเจลขนาด 2.25, 2.30 และ 2.50 mm. ตามลำดับ (Figure 12.) พบว่า ให้ค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 33.95, 45.36 และ 45.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 17A. การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุดในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เท่ากับ 45.36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 9.19 log CFU/ml ลดลงเหลือ 4.17 log CFU/ml (Figure 17B.) ซึ่งจากการทดลอง พบว่าระดับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เพิ่มขึ้นช่วยให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chandramoulia และคณะ (2004) ซึ่งห่อหุ้ม *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยอัลจิเนตโดยใช้วิธี extrusion พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตจาก 0.75 เป็น 1, 1.5, 1.8 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Lee และ Heo (2000) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของ *B. bifidum* ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า เมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะกรดในทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลที่ใช้วัสดุตัวพยุงที่ความเข้มข้นสูงมีการรอดชีวิตได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ต่ำกว่า โดยพบว่าอัลจิเนต ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียภายในเม็ดเจลมีการรอดชีวิตได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 3 และ 2 เมื่อนำเม็ดเจลมาบ่มในสภาวะกรดในทางเดินอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และจากการทดลองพบว่าเซลล์อิสระจะให้ค่าการรอดชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม โดยให้ค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 27.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mandal และคณะ (2006) ได้ห่อหุ้ม *L. casei* NCDC-298 ด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์อิสระให้การรอดชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม ในสภาวะที่มีกรดพีเอช 1.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์

การห่อหุ้ม *L. acidophilus* TISTR 1034 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตสูงกว่าการห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกรด เนื่องจากอัลจิเนตเป็น supporting material โดยความแข็งแรงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและลำดับของ D-mannuronic และ L-guluronic acid ซึ่งความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เพิ่มขึ้น จะช่วยให้ D-mannuronic และ L-guluronic acid เกิดการจับกันแบบเชื่อมไขว้กับ

สารละลายแคลซียมคลอไรด์ได้มากขึ้น ทำให้เพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจลซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เซลล์รอดชีวิตได้มากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

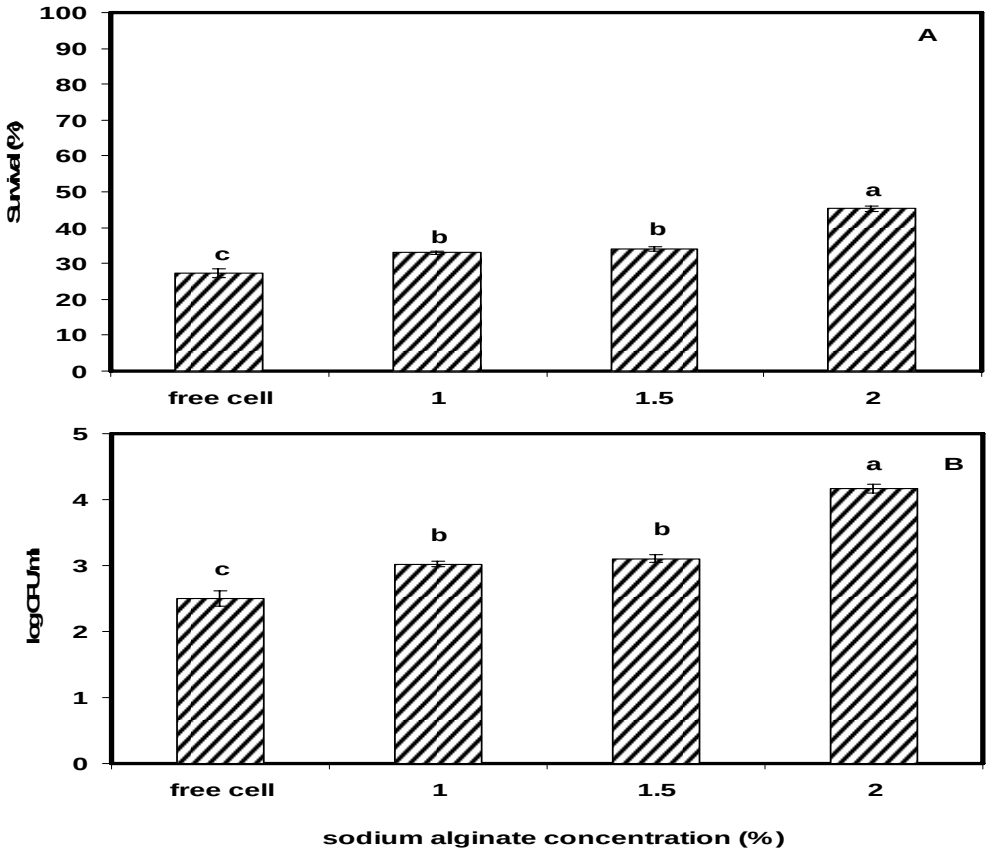


Figure 17. Effects of sodium alginate concentration on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C).

Table 12. The effect of sodium alginated concentration on the size of encapsulated *L. acidophiilus* TISTR 1034 beads.

Sodium alginate concentration (%)	Beads size (mm.)
1	2.25 ± 0.100
1.5	2.30 ± 0.050
2	2.50 ± 0.050

3.3 เปรียบเทียบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน สัตว์และอาหารหมัก

จากการศึกษาเปรียบเทียบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน สัตว์และอาหารหมัก โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งแยกได้จากคน *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ซึ่งแยกมาจากหนูและกะหล่ำปลีดองนำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ มาห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนต แล้วหยด suspension ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G จากนั้นนำเม็ดเจลมาแช่ในกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มให้การรอดชีวิตสูงสุด เท่ากับ 71.11 เปอร์เซ็นต์ (Figure 18A.) หลังผ่านกรด และเมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่าจากเริ่มต้น 9.28 log CFU/ml ลดลงเหลือ 6.97 log CFU/ml. (Figure 18B.) เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มให้การรอดชีวิตสูงกว่า *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 โดย *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ถูกห่อหุ้มให้การรอดชีวิตเท่ากับ 25.08และ 31.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังแสดงในFigure 18A. และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มกับเซลล์อิสระในสภาวะที่มีกรด พบว่า เซลล์อิสระให้การรอดชีวิตต่ำกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มโดยการรอดชีวิตของเซลล์อิสระของแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* CIF17 A5, *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 เท่ากับ 69.14, 22.49 และ 29.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Chandramoulia และคณะ (2004) ซึ่งได้ห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดี พบว่าเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 9 log CFU/ml ขณะที่เซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 6 log CFU/mlในสภาวะที่มีกรด

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกสามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะที่มีกรดส่งผลให้ *L. plantarum* TISTR 875, *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ซึ่งถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์อิสระมีการรอดชีวิตน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mandal และ Singh (2006) ซึ่งห่อหุ้มเซลล์ *L. casei* NCDC-298 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และศึกษา

การทนต่อกรด พีเอช 1.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *L. casei* NCDC-298 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ให้การรอดชีวิต 5.37 log CFU/ml ขณะที่เซลล์อิสระให้การรอดชีวิต 3.38 log CFU/ml

เมื่อพิจารณาในส่วนของสายพันธุ์ก็จะพบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งแยกได้จากคนจะทนต่อกรดได้ดีกว่า *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ซึ่งแยกได้จากหนูและกะหล่ำปลี ทั้งนี้เนื่องจากในทางเดินอาหารของคนมีสภาวะความเป็นกรดพีเอช 2.0-3.0 ขณะที่ในหนูและกะหล่ำปลีดองมีพีเอช 4.6-5.8 และ 3.8-4.1 (Holzapfel *et al*., 2003) ตามลำดับ ซึ่งทำให้ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ผ่านการแช่ในพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้การรอดชีวิตสูงกว่า *L. acidophilus* TISIR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 จึงคัดเลือก *L. plantarum* CIF17 A5 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

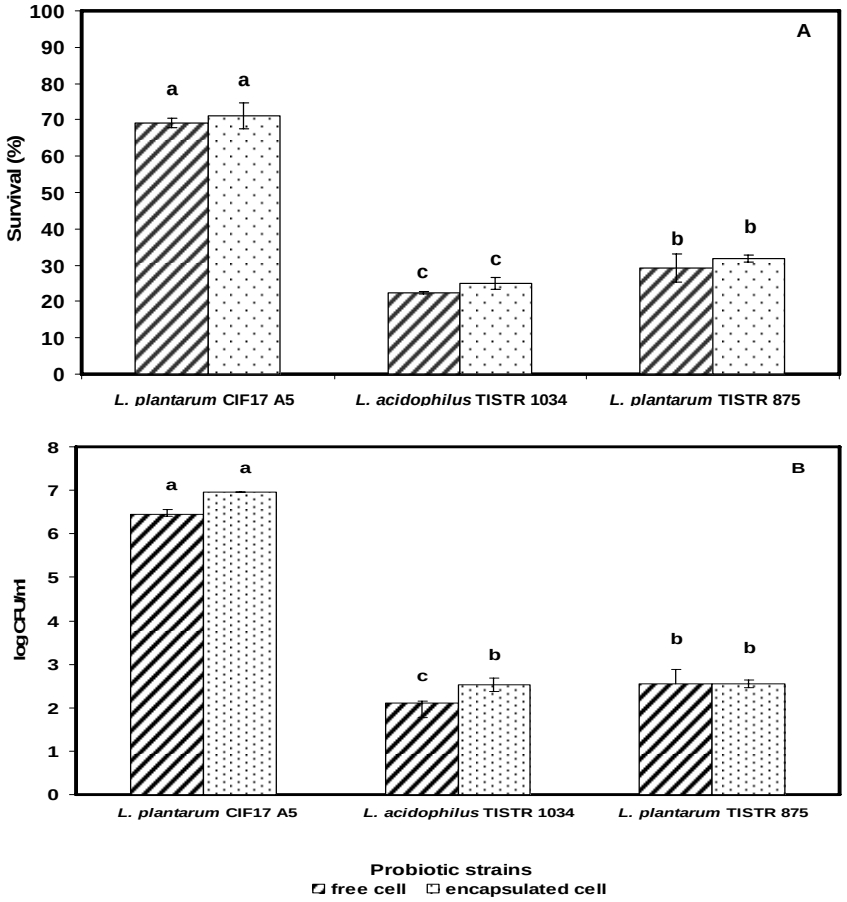


Figure 18. Comparative a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of free cell and encapsulated probiotic originated from human rat and kickled cabbage under acidic condition (pH 2.0 for 3 h).

3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก

3.4.1 ผลของการใช้สารพรีไบโอติกและเส้นใยอาหารต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

จากการนำแบคทีเรีย *L. plantarum* CIF17 A5 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 มาศึกษาผลของการใช้สารพรีไบโอติกและเส้นใยอาหารต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด โดยการห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมสารสกัดหรือเส้นใยจากพืช 2 เปอร์เซ็นต์ จากสารสกัดถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด กล้วยหอม เส้นใยถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด และเปลือกกล้วยหอม นอกจากนี้ยังมีการเติมเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเชื้อ *W. cibaria* A2 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารสกัดและเส้นใยอาหารจากพืชและชุดการทดลองที่มีการเติมฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาแช่กรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าการรอดชีวิต พบว่า การใช้เส้นใยถั่วเหลืองร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ให้การรอดชีวิตสูงสุด คือ 84.39 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นจาก 9.30 log CFU/ml ลดลงเหลือ 7.85 log CFU/ml (Figure 19B.) ขณะที่การใช้เติมสารสกัดถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด กล้วยหอม เส้นใยจาก ถั่วเขียว ข้าวโพด เปลือกกล้วยหอม ฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ห่อหุ้มเซลล์ให้การรอดชีวิตในสภาวะกรดเท่ากับ 69.35, 74.78, 70.84, 67.50, 74.79, 66.50, 66.67 และ 72.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 19A. และเมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองกับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า การห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยอาหารจากถั่วเหลืองให้การรอดชีวิตสูงกว่าการเติมฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในสภาวะกรด นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์แบคทีเรีย *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยอาหารจากถั่วเหลืองให้การรอดชีวิตสูงกว่าชุดการทดลองที่ห่อหุ้มเซลล์แต่ไม่ได้มีการเติมสารสกัดหรือเส้นใยจากพืชและเซลล์อิสระในสภาวะที่มีกรดโดยเซลล์แบคทีเรีย *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มแต่ไม่มีการเติมสารสกัดหรือเส้นใยและเซลล์อิสระให้การรอดชีวิตเท่ากับ 68.78 และ 61.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองนี้จะเห็นว่าการห่อหุ้มเม็ดเจลด้วยโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองให้การรอดสูงกว่าการใช้เส้นใยอาหารจากพืชชนิดอื่น และสูงกว่าชุดการทดลองซึ่งไม่เติมเส้นใยอาหารร่วมในการห่อหุ้ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเส้นใยอาหารถั่วเหลืองสามารถป้องกันแบคทีเรียจากสภาวะที่รุนแรงได้ โดยเส้นใยอาหารเหล่านี้จะเข้าไปปิดรูพรุนของเม็ดเจลส่งผลให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไปในเม็ดเจลได้น้อยลง ซึ่งจากการศึกษาของ Iyer และ Kailasapathy (2005) โดยห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 ร่วมกับสารพรีไบโอติก คือ Hi-maize, raftiline และ

raftilose พบว่า การห่อหุ้มโปรไบโอติกร่วมกับ Hi-maize จะให้การรอดชีวิตสูงสุดเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรด เนื่องจาก Hi-maize จะเข้าไปปิดรูพรุนของเม็ดเจลไว้ ส่งผลให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไปในเม็ดเจลได้ยาก ทำให้โปรไบโอติกมีโอกาสสัมผัสกับกรดได้น้อย จึงมีการรอดชีวิตสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Michida และคณะ (2006) ได้ศึกษาการใช้สารสกัดจากธัญพืชและ เส้นใยธัญพืชที่สกัดจากข้าวมอลต์และบาร์เล่ย์ มาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ของ *L. plantarum* เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติก เมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดในทางเดินอาหาร ผลปรากฏว่าเซลล์อิสระมีปริมาณลดลงจาก 7.24 log CFU/ml เหลือ 1.92 log CFU/ml ในขณะที่เซลล์ที่มีการห่อหุ้มด้วยสารสกัดจากข้าวบาร์เลย์ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียลดลงเหลือ 6.5 log CFU/ml

เส้นใยอาหารจากธัญพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณของเส้นใยที่แตกต่างกัน ซึ่งเส้นใยอาหารมีคุณสมบัติความเป็นรูพรุน ซึ่งช่วยในการเป็นตัวพยุงและยึดเกาะของเซลล์ เพื่อป้องกันจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การใช้เส้นใยอาหารร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ยังเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่มีกรด โดยจากการทดลอง พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งถูกห่อหุ้มเซลล์แต่ไม่มีการเติมพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารให้การรอดชีวิต 68.78 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเติมเส้นใยถั่วเหลืองให้การรอดชีวิต 84.39 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกรด ทั้งนี้เนื่องจากกรดจะซึมผ่านรูพรุนบนเม็ดเจลเข้าไปสัมผัสกับโปรไบโอติก ขณะที่การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองกรดจะมีโอกาสซึมผ่านรูพรุนบนเม็ดเจลได้น้อยทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูง เนื่องจากเส้นใยถั่วเหลืองจะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างรูพรุนบนเม็ดเจล ดังนั้นจึงเลือก เส้นใยถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

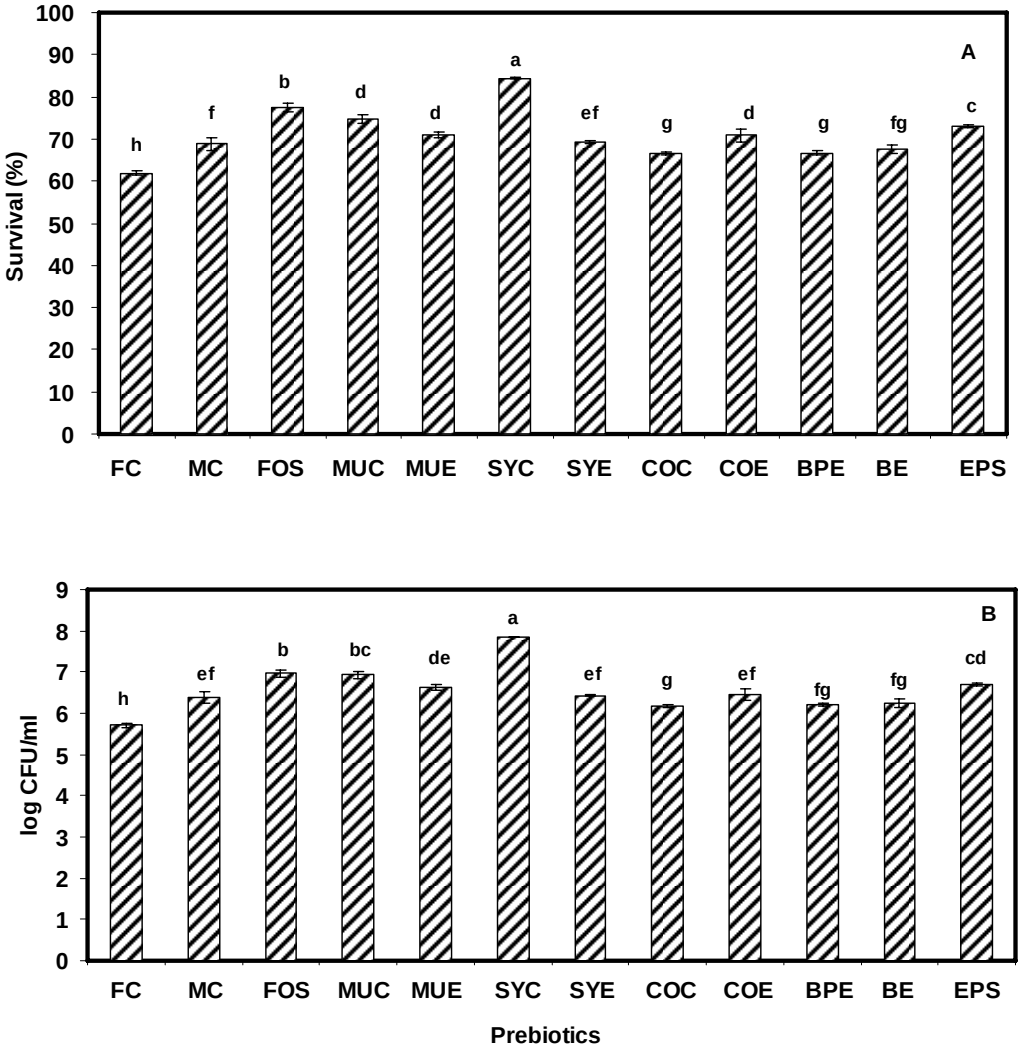


Figure 19. Effects of prebiotics and crude fibers as co-encapsulants on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition at pH 2.0 for 3 h at 37 °C. (free cell (FC), microencapsulated cell (MC), fructooligosaccharide (FOS), mung bean crude fiber (MUC), mung bean extract (MUE), soybean crude fiber (SYC), soybean extract (SYE), corn crude fiber(COC), corn extract (COE), banana peel extract (BPE), banana extract (BE) and exopolysaccharide (EPS))

3.3.2 ผลของความเข้มข้นของเส้นใยถั่วเหลืองต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

เมื่อนำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองที่คัดเลือกได้ โดยใช้ความเข้มข้นของเส้นใยถั่วเหลือง 0, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ไปแช่ในกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และคำนวณค่าการรอดชีวิต พบว่าการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูง เท่ากับ 85.30 เปอร์เซ็นต์ (Figure 20A.) เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่าจากเริ่มต้น 9.19 log CFU/ml ลดลงเหลือ 7.84 log CFU/ml (Figure 20B.) ขณะที่การเติม 0, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยถั่วเหลือง ให้การรอดชีวิตเท่ากับ 68.78, 78.87, 81.38 และ 76.57 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 20A. เซลล์อิสระให้การรอดชีวิตเท่ากับ 62.97 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากโปรไบโอติกจะสัมผัสกับกรดโดยตรงในขณะที่การห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ 22.32 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Iyer และ Kailasaphathy (2005) ซึ่งห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 1.8 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการเติม Hi-maize 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติม Hi-maize 1 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตสูงกว่าการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 4 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเส้นใยถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะขัดขวางการจับตัวของโซเดียมอัลจิเนต เช่นเดียวกับการทดลองของ Iyer และ Kailasaphathy (2005) พบว่าการห่อหุ้ม *L. acidophilus* CSCC 2400 ร่วมกับการเติม Hi-maize 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน

เส้นใยถั่วเหลืองมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกและมีปริมาณเส้นใยสูง การห่อหุ้มโปรไบโอติกร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่มีกรด โดยในการทดลองครั้งนี้เส้นใยถั่วเหลืองความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกได้ดีที่สุด เนื่องจากเส้นใยถั่วเหลืองจะเข้าไปแทรกระหว่างรูพรุนในเม็ดเจลทำให้กรดซึมผ่านเม็ดเจลได้ยาก ทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูง ขณะที่การห่อหุ้มโปรไบโอติกร่วมการเติมเส้นใยถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตต่ำกว่า เนื่องจากโอกาสที่เส้นใยจะเข้าไปแทรกระหว่างรูพรุนมีน้อยกว่า ดังนั้นกรดจะ

สัมผัสกับโปรไบโอติกได้สูง จึงเลือกเส้นใยถั่วเหลืองความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

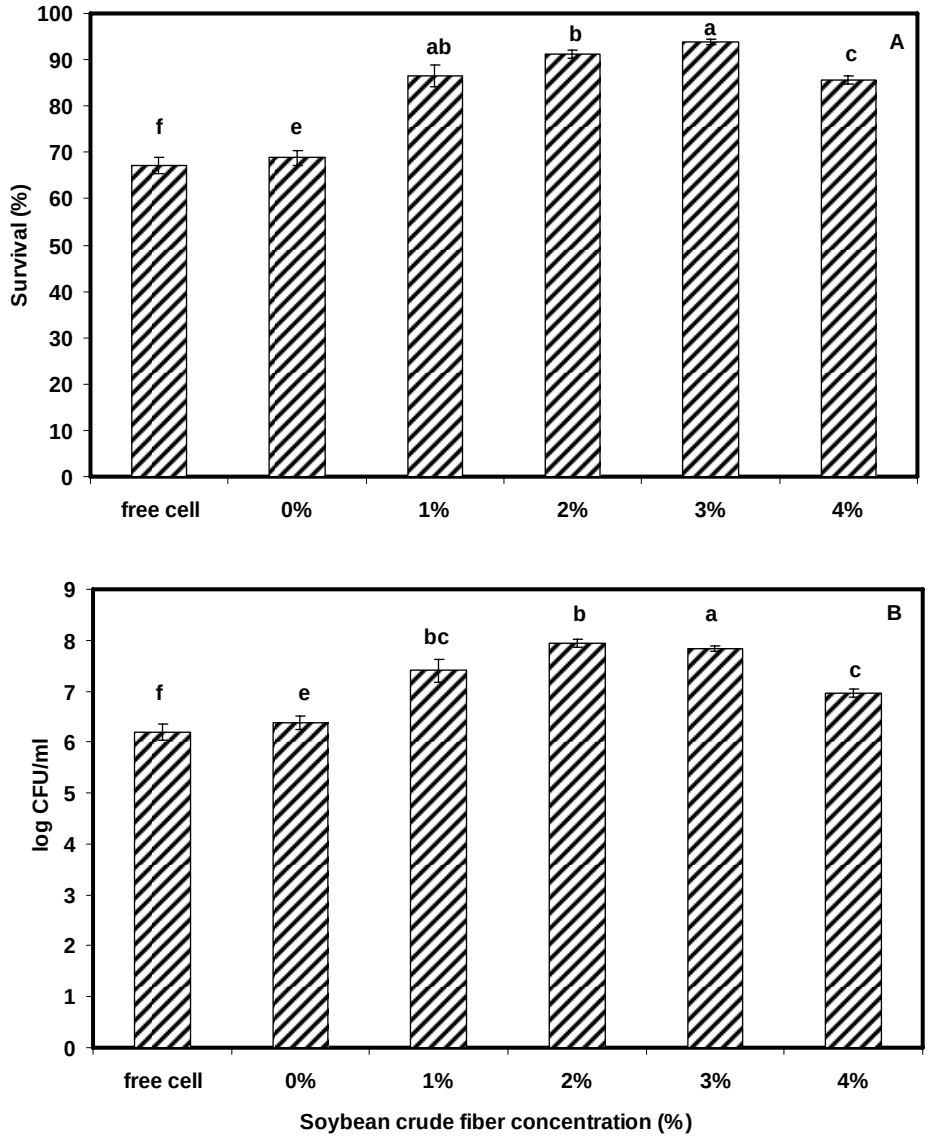


Figure 20. Effects of different soybean crude fiber concentrations on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml)of *L. plantarum* CIF17 A5 under simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C).

3.3.3 ผลของการเคลือบเม็ดเจลโดยใช้ไคโตซาน และอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มเซลล์หลังสภาวะที่เป็นกรด

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ นำเม็ดเจลมาเคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนตหรือสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร นำเม็ดเจลที่ได้ไปแช่ในกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คำนวณการรอดชีวิต พบว่า การห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซาน 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ให้การรอดชีวิตสูงสุดในสภาวะที่มีกรด โดยการรอดชีวิตเท่ากับ 86.58 เปอร์เซ็นต์ (Figure 21A.) เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่าจากเริ่มต้น 9.35 log CFU/ml ลดลงเหลือ 8.09 log CFU/ml (Figure 21B.) ขณะที่เม็ดเจลที่เคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนต ให้การรอดชีวิตเท่ากับ 82.31 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเจลที่เคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนตกับเม็ดเจลที่ไม่ผ่านการเคลือบให้การรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) (Figure 21A.) โดยเม็ดเจลที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนตให้การรอดชีวิตเท่ากับ 84.14 และ 82.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 17A. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Koo และคณะ (2001) ซึ่งห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* YIT 9018 ด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซานและเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเคลือบและไม่เคลือบด้วยไคโตซาน พบว่าจำนวนแบคทีเรียในเม็ดเจลที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยสารละลายไคโตซานสูงกว่าเซลล์อิสระ 2-3 log CFU/ml ในสภาวะที่มีน้ำย่อยและเอนไซม์เปปซิน และจากการทดลองในครั้งนี้ยังพบว่าเม็ดเจลที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยไคโตซานให้การรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากการละลายไคโตซานต้องละลายด้วยกรดอะซิติก ซึ่งกรดอะซิติกอาจทำลายแคปซูลที่ห่อหุ้มเซลล์ เมื่อนำเม็ดเจลไปผ่านกรด ผลการรอดชีวิตจึงไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตในสภาวะที่มีกรด พบว่า เม็ดเจลที่เคลือบด้วยไคโตซานให้การรอดชีวิตสูงกว่าเม็ดเจลที่เคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนต ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Iyer และ Kailasaphathy (2005) ซึ่งห่อหุ้ม *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต และเคลือบเม็ดเจลด้วยด้วยไคโตซาน พบว่า เม็ดเจลที่เคลือบด้วยไคโตซานโปรไบโอติกจะมีการรอดชีวิตสูงกว่าเม็ดเจลที่เคลือบด้วยอัลจิเนตและโพลีแอลไลซีน ในสภาวะที่มีกรด และเช่นเดียวกับการทดลองของ Krasaekoopt และคณะ (2003) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่ถูกห่อหุ้มและเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตแซน อัลติเนตและโพลีแอลไลซีน นำเม็ดเจลมาผ่านสภาวะกรดพีเอช 1.55 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์และเคลือบด้วยไคโตซานให้การรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 75.15 และ

66.92 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเคลือบด้วยอัลจิเนตให้การรอดชีวิต 60.43 และ 43.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

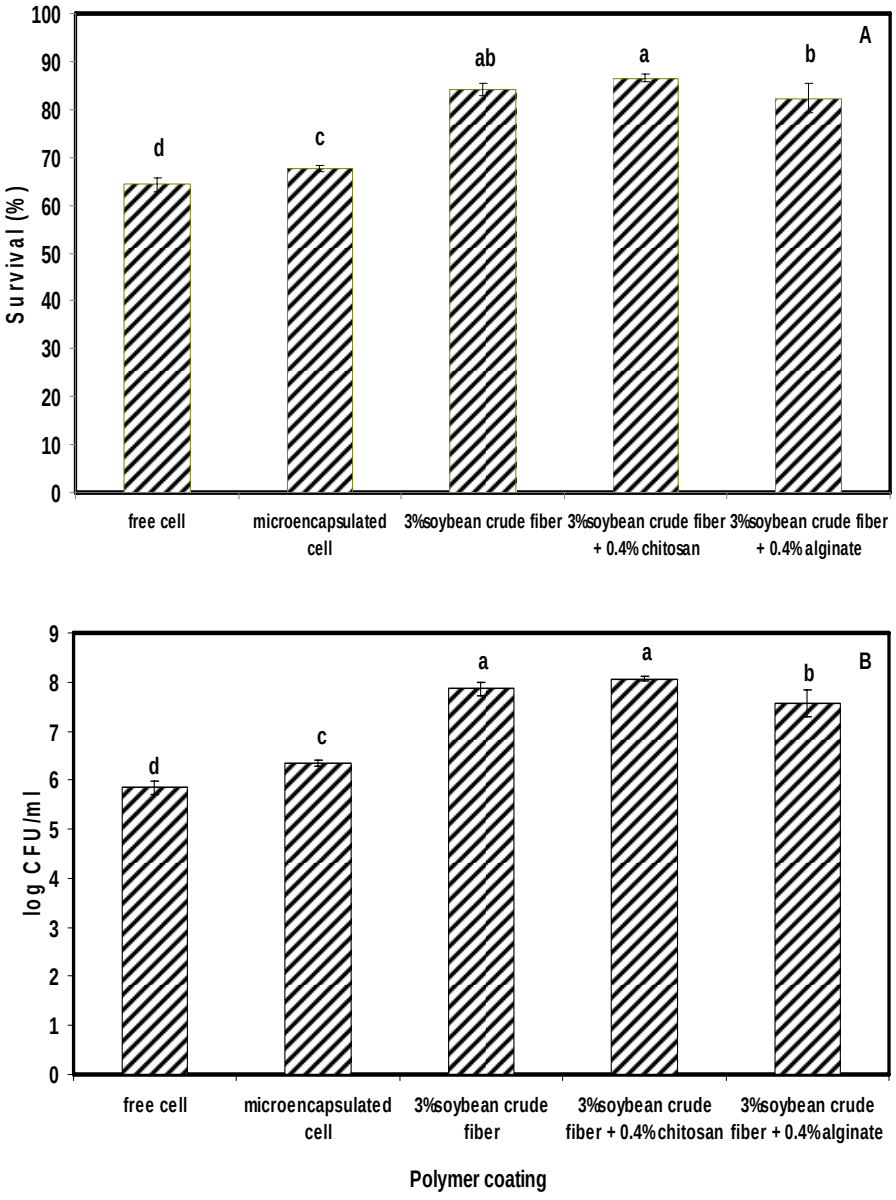


Figure 21. Effects of polymer coatings on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition (pH 2.0 for 3 h).

3.3.4 ผลของวิธีการทำแห้งเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มต่อการรอดชีวิตในสภาวะที่มีกรด

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ไปเคลือบด้วย สารละลายไคโตซาน 0.4 เปอร์เซ็นต์ นำเม็ดเจลที่ได้ไปผ่านการทำแห้งโดยเปรียบเทียบวิธีการทำแห้งสองวิธี คือ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและทำแห้งโดยใช้ระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้องร่วม พบว่า การทำแห้งเม็ดเจลด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้การรอดชีวิตเท่ากับ 67.98 เปอร์เซ็นต์ (Figure 22A.) เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่าจากเริ่มต้น 9.36 log CFU/ml ลดลงเหลือ 6.36 log CFU/ml (Figure 22B.) ขณะที่เซลล์ที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีวางที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศให้การรอดชีวิตเท่ากับ 55.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่าจากเริ่มต้น 9.36 log CFU/ml ลดลงเหลือ 5.22 log CFU/ml ดังแสดงใน Figure 22B. โปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ผ่านการเคลือบด้วยไคโตซาน ให้การรอดชีวิตเท่ากับ 60.07 และ 48.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและทำแห้งโดยใช้ระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้องร่วม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซาน โปรไบโอติกจะมีการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการทำแห้งด้วยวิธีวางที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศ เนื่องจากการห่อหุ้มเซลล์ช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะภายนอกที่ไม่เหมาะสมทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตหรือบาดเจ็บน้อยที่สุด จากการทดลองของ Sultana และคณะ (2000) ศึกษา การห่อหุ้ม *L. acidophilus* และ *B. infantis* ด้วยอัลจิเนต ร่วมกับ Hi-maize starch ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เปรียบเทียบกับเซลล์ *L. acidophilus* และ *B. infantis* อิสระ แล้วเติมลงในโยเกิร์ต หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจำนวน *L. acidophilus* และ *B. infantis* ในรูปเซลล์อิสระจะมีลดลงประมาณ 1 log CFU/g ในขณะที่เซลล์ *L. acidophilus* และ *B. infantis* ที่มีการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตและอัลจิเนตร่วมกับ Hi-maize starch มีจำนวนลดลงประมาณ 0.5 และ 1.0 log CFU/g และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทำแห้งเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มทั้ง 2 วิธี พบว่า เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง และผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ให้การรอดชีวิตสูงกว่าการทำแห้งโดยใช้ระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้องร่วม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำแห้งด้วยวิธีวางที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แห้งประมาณ 5 วัน ขณะที่เซลล์ที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งใช้เวลา 1 วัน ในการทำให้เซลล์แห้ง ดังนั้นจึงเลือกวิธีการทำแห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็งซึ่งมีความเหมาะสมในการทำแห้งเซลล์ ดังนั้นจึงเลือกวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

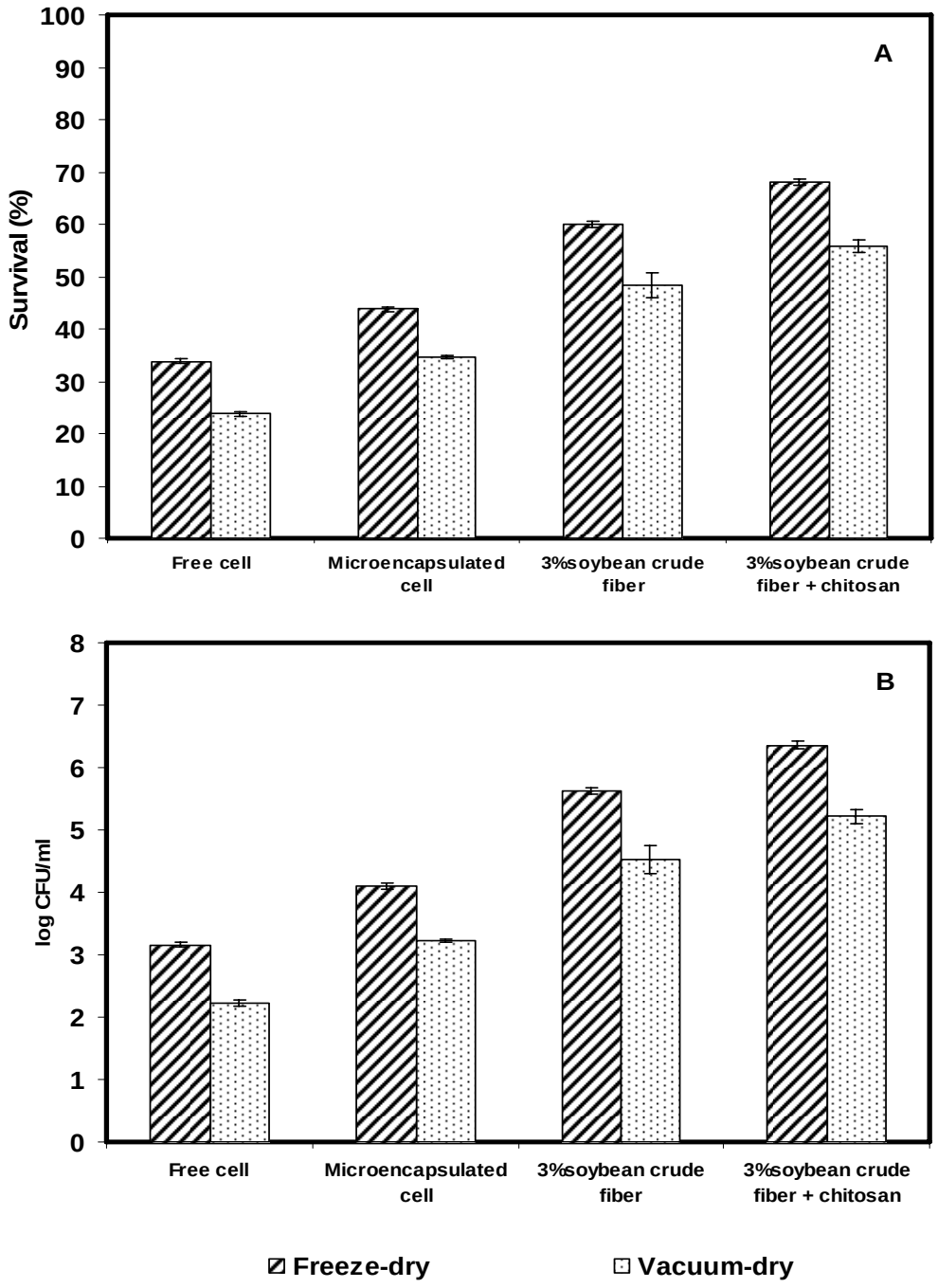


Figure 22. Effects of freeze-dry and vacuum-dry on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5.

3.3.5 ผลของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตร่วมการการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ และเคลือบด้วยสารละลายไคโตซาน จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งจากการนำเม็ดเจลไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงอย่างมาก จึงได้แก้ปัญหานี้โดยการใช้หาวิธีที่ทำให้เชื้อโปรไบโอติกมีการรอดชีวิตมากที่สุดหลังการทำแห้ง ซึ่งวิธีการดังกล่าว คือ การเติมสาร cryoprotectant ซึ่งสาร cryoprotectant ที่ใช้ คือ นมพร่องมันเนย ซูโครส และเส้นใยถั่วเหลือง ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร จากผลการทดลอง พบว่า การใช้ซูโครสหรือนมพร่องมันเนย ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสาร cryoprotectant ช่วยให้ *L. plantarum* CIF17 A5 มีการรอดชีวิตมากที่สุด ($p<0.05$) โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 73.58 และ 74.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 23A. เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่าจากเริ่มต้น 9.33 log CFU/ml หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวนเซลล์เหลือ 6.88 และ 6.98 log CFU/ml ตามลำดับ (Figure 23B.) การใช้ซูโครสหรือนมการใช้ซูโครส นมพร่องมันเนย และเส้นใยถั่วเหลืองเป็นสาร cryoprotectant ให้การรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดควบคุมให้การรอดชีวิตเท่ากับ 63.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการนำส่วนของเส้นใยอาหารมาใช้เป็น cryoprotectant กับการใช้สาร cryoprotectant ที่ใช้กันทั่วไป คือ น้ำตาลซูโครสและนมพร่องมันเนย พบว่า ซูโครสและนมพร่องมันเนยนั้นเสริมการรอดชีวิตของเชื้อหลังการทำแห้งได้ดีกว่า ดังนั้นการใช้เส้นใยอาหารจากธัญพืชบางชนิด จึงเหมาะสำหรับการเติมลงไปในการห่อหุ้มเซลล์เพื่อช่วยในเรื่องการลดปริมาณรูพรุนบนเม็ดเจลและการเป็นตัวพยุงและยึดเกาะของเซลล์ในระหว่างการเลี้ยง

ปัจจุบันมีการใช้สาร cryoprotectant หลายชนิดเพื่อช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งสารที่มีการใช้ เช่น นมพร่องมันเนยคืนรูป ซูโครส ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และอินนูลิน เป็นต้น จากการทดลองของ Capela และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองใช้สาร cryoprotectant เพื่อช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตแช่เยือกแข็งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน ซึ่งสาร cryoprotectant ที่ใช้ ได้แก่ Hi-maize, ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Raftilose®P95) และอินนูลิน (Raftiline®ST) พบว่าการเติม ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Raftilose®P95) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกได้ 1.42 log CFU/ml ระหว่างการเก็บโยเกิร์ตที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และจากการทดลองของ Saarela

และคณะ (2006) ได้ศึกษาการทำแห้งเชื้อ *L. rhamnosus* E 800 และ *L. rhamnosus* E 522 โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งร่วมกับการเติมไฟเบอร์ของแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ตที่มีส่วนประกอบของ β-glucan 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ wheat dextrin, polydextrose และอินนูลิน เป็นสาร cryoprotectant โดยมีชุดควบคุม คือ ซูโครส พบว่า *L. rhamnosus* ทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลการรอดชีวิตที่ใกล้เคียงกัน โดยการใช้ cryoprotectant ที่เป็นwheat dextrin และ polydextrose มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกับการใช้ซูโครสเป็น cryoprotectant แต่สูงกว่าการใช้พรีไบโอติกชนิดอื่นเป็น cryoprotectant หลังจากผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นอกจากนี้ในรายงานของ Otero และคณะ (2007) พบว่า การใช้นมพร่องมันเนย 6 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์เป็นสาร cryoprotectant จะทำให้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* มีปริมาณลดลงหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 2 log CFU/ml และน้อยกว่าการใช้น้ำเป็นสารตัวกลางอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลง 9 log CFU/ml แต่ไม่จำเป็นว่านมผงพร่องมันเนยจะเหมาะสมสำหรับเชื้อทุกชนิด เช่นจากการทดลองของ Costa และ (2002) ที่ทำแห้งเชื้อ Pantoea agglomerans CPA-2 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และใช้สารตัวกลางต่าง ๆ ในการทำแห้ง พบว่า น้ำตาลพวกไดแซคคาร์ไรด์ให้การรอดชีวิตของเชื้อ Pantoea agglomerans CPA-2 สูงที่สุดมากกว่า 60.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้นมผงพร่องมันเนยให้การรอดชีวิตที่ 15.00 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการใช้ซูโครสหรือนมพร่องมันเนย เป็นสาร cryoprotectant ให้ผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกดีกว่าการใช้เส้นใยถั่วเหลือง เนื่องจาก สารละลายซูโครสและผมพร่องมันเนยสามารถเคลือบเม็ดเจลได้ทั้งหมด และนมผงพร่องมันเนยเป็นโปรตีนที่สามารถไปเคลือบปกป้องบริเวณผนังเซลล์ได้ และนอกจากนั้นมีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันผนังเซลล์ไม่ให้เกิดการเสียหายในระหว่างการทำแห้ง โดยจะช่วยให้การเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก (Carvalho *et al*., 2004) ทำให้โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เนื่องจากซูโครสมีราคาที่ถูกกว่าและให้การรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างจากการใช้นมพร่องมันเนย ดังนั้นจึงเลือกซูโครสเป็นสาร cryoprotectant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

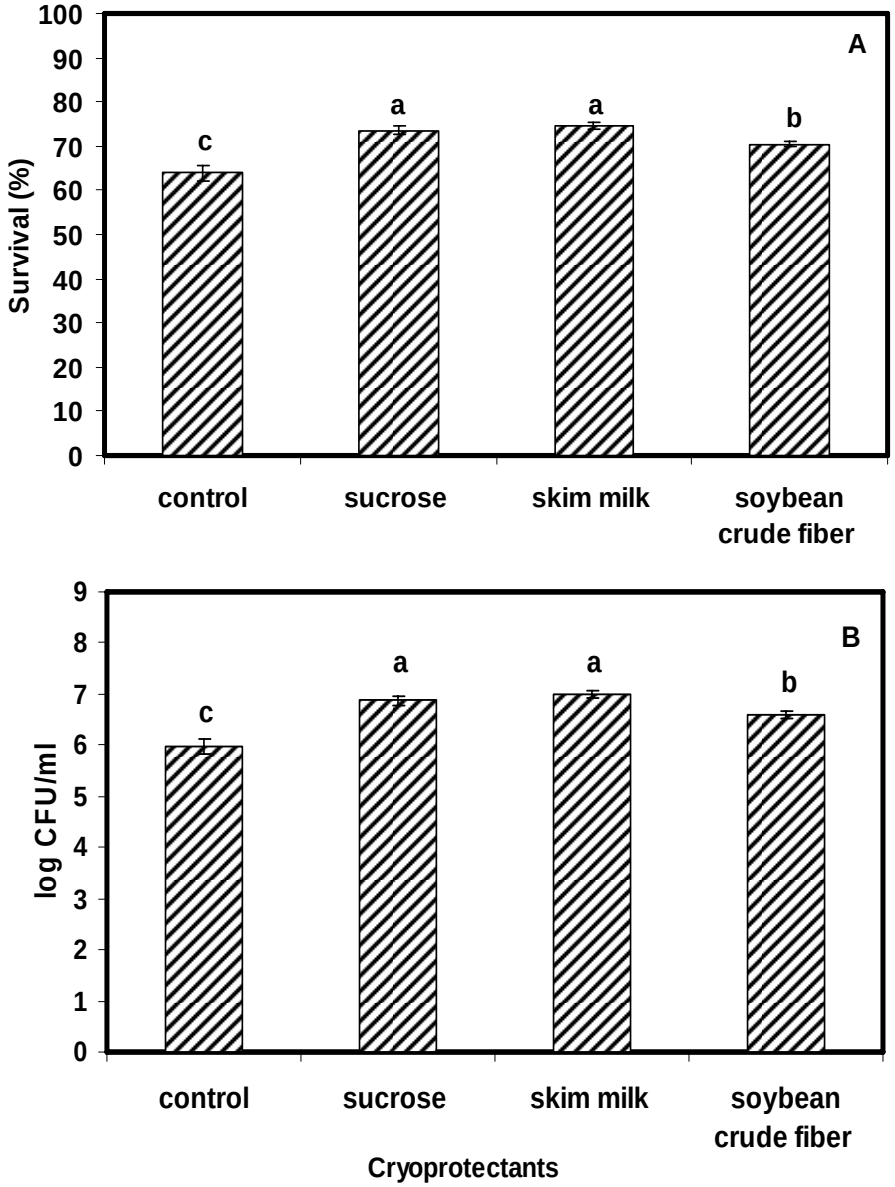


Figure 23. Effects of cryoprotectants on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying.

จากการทดลอง พบว่า ซูโครสเป็นสาร cryoprotectant ซึ่งทำให้โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มและผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยนำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ นำเม็ดเจลที่ได้ไปเคลือบด้วยไคโตซาน และเติมซูโครสเพื่อเป็นสาร cryoprotectant โดยความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำเม็ดเจลไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า การใช้ซูโครสความเข้มข้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุดหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและมีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 77.62 และ 78.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 24A. เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียพบว่า จากเริ่มต้น 9.32 log CFU/ml เหลือ 7.23 และ 7.34 log CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 24B. ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสาร cryoprotectant เท่ากับ 18.06 และ 19.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะใช้ซูโครสความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 77.22 และ 74.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นการทำแห้งผลิตภัณฑ์โดยใช้อุณหภูมิต่ำทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตน้อย ซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ มีคุณสมบัติเป็นสาร cryoprotectant ซึ่งช่วยปกป้องเซลล์จากกระบวนการทำแห้ง โดยสาร cryoprotectant ช่วยทำให้เกิดน้ำอิสระน้อยในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก (Carvalho *et al*, 2004) และเซลล์ซึ่งผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมจะช่วยเคลือบเม็ดเจล ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่าซูโครสที่ความเข้มข้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกซูโครสที่ความเข้ม 15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

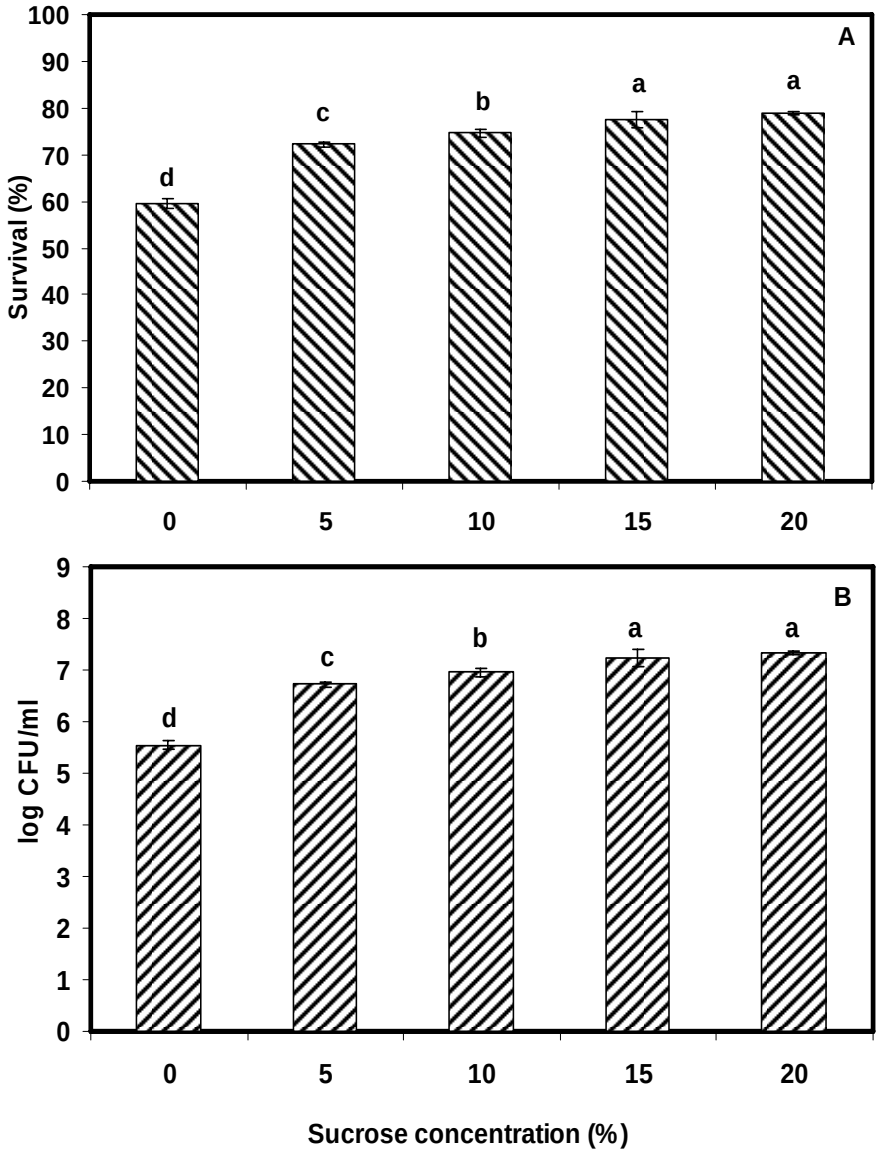


Figure 24. Concentrations of sucrose on a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying.

3.5 ทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีกรดสูง และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่ผ่านถูกห่อหุ้มหลังผ่านการทำแห้ง โดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเคลือบเม็ดเจลด้วยไซโตซาน นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาร cryoprotectant มาศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีกรดสูง พีเอช 2.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ให้การรอดชีวิต 81.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 7.66 log CFU/ml หลังผ่านกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เหลือ 6.14 log CFU/ml (Figure 25B.) ขณะที่เม็ดเจลที่ไม่มีการเติมเส้นใยถั่วเหลือง (microencapsulated cell) และเซลล์อิสระให้รอดชีวิต 62.69 และ 61.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 25A. จะเห็นได้ว่าเม็ดเจลที่ห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบด้วยไคโตซานให้การรอดชีวิตสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม ทั้งนี้เนื่องจากเส้นใยอาหารที่เติมเข้าไปมีคุณสมบัติเป็นรูพรุนช่วยให้เซลล์เข้าไปยึดเกาะและเส้นใยถั่วเหลืองยังช่วยลดรูพรุนบนผิวของเม็ดเจลอีกด้วย (Figure 26C.) จึงทำให้กรดซึมผ่านเข้าไปสู่เม็ดเจลได้ยาก ทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตสูง จากนั้นเมื่อนำเม็ดเจลที่ผ่านกรดพีเอช 2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.30 เปอร์เซ็นต์ ต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบด้วยไคโตซานให้การรอดชีวิตเท่ากับ 80.02 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่มีการเติมเส้นใยถั่วเหลืองและเซลล์อิสระให้การรอดชีวิต 61.55 และ 55.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากเส้นใยอาหารมีคุณสมบัติไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน ดังนั้นจึงช่วยในการปกป้องเซลล์จากสภาวะความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหารได้ ทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูง ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองของ Michida และคณะ (2006) ซึ่งใช้สารพรีไบโอติกจากธัญพืช ได้แก่ ข้าวมอลต์ และบาร์เล่ย์ เป็นตัวห่อหุ้มเซลล์เพื่อช่วยเคลื่อนย้ายโปรไบโอติกที่ต้องผ่านทางเดินอาหารส่วนต้นไปสู่ลำไส้ใหญ่ พบว่า เมื่อเซลล์อิสระของ *L. plantarum* ผ่านสภาวะที่เสมือนน้ำย่อยในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 30 นาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก 7.24 log CFU/ml เหลือ 1.92 logCFU /ml แต่เมื่อนำ *L. plantarum* มาห่อหุ้มด้วยเส้นใยบาร์เล่ย์ และทดสอบในสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 30 นาที ปรากฏว่าจากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7.24 log CFU /ml ลดลงเหลือ 5.1 log CFU/ml นอกจากนี้ Chandramoulia และคณะ (2004) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ที่ถูกห่อหุ้ม เมื่อผ่านสภาวะที่เป็นน้ำย่อยในทางเดินอาหาร พบว่า *L. acidophilus* CSCC 2400 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่ผ่านน้ำย่อย และจากการศึกษาการทนต่อกรด เกลือน้ำดีและความร้อนของโปรไบโอติก 8 สายพันธุ์ คือ *L. rhamnosus*, *B. longum, L. salivarius, L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* type Bl-O4, และ *B. lactis* type Bi-07 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต พบว่า การห่อหุ้มเซลล์จะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะดังกล่าวได้ (Ding and Shah, 2007) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเส้นใยอาหารจากพืชสามารถป้องกันแบคทีเรียจากสภาวะที่รุนแรง เช่น การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สภาวะความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหาร เป็นต้น เส้นใยอาหารจากพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณของเส้นใยที่แตกต่างกัน โดยเส้นใยอาหารเหล่านี้จะเข้าไปปิดรูพรุนของเม็ดเจลส่งผลให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไปในเม็ดเจลได้น้อยลง และจากคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของเส้นใยอาหารยังช่วยในการยึดเกาะของตัวเซลล์อีกด้วย จะเห็นว่าในสภาวะที่มีความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหารเซลล์อิสระจะมีให้ค่าการรอดชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการใช้เส้นอาหาร เนื่องจากเซลล์อิสระจะสัมผัสโดยตรงกับกรดด่างในทางเดินอาหาร ขณะที่เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มจะมีโซเดียมอัลจิเนตเป็นชั้นปกปกป้องเซลล์และมีเส้นใยอาหารช่วยกั้นรูพรุนบนเม็ดเจล ซึ่งทำให้ที่กรดด่างซึมผ่านไปสัมผัสกับตัวเซลล์ได้ยาก

จากการศึกษาทำให้มั่นใจได้ว่าการนำเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์มาใช้ในการห่อหุ้มโปรไบโอติก จะสามารถป้องกันสภาวะความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหารได้ เนื่องจากพบว่าเมื่อเม็ดเจลตกลงสู่กระเพาะอาหาร โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในเม็ดเจลจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเม็ดเจลน้อย เนื่องจากอัลจิเนตที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์นั้นจะคงตัวได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และจะละลายเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชเป็นกลางหรือเป็นด่าง (Annan *et al*., 2008) เมื่อลงสู่ลำไส้ซึ่งมีสภาวะเป็นด่างอ่อน ๆ แบคทีเรียจะถูกปลดปล่อยออกมาช้า ๆ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าเม็ดเจลเริ่มพองตัวและแตกออกเมื่อบ่มในสภาวะเสมือนด่างของลำไส้ และนอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยอาหารจากพืชทำให้โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงขึ้นในสภาวะที่มีกรดด่างในทางเดินอาหาร เนื่องจากเส้นใยอาหารจากพืชช่วยปิดรูพรุนของเม็ดเจลส่งผลให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไปในเม็ดเจลได้น้อยลง โปรไบโอติกจึงมีการรอดชีวิตสูง และเมื่อเม็ดเจลผ่านสภาวะความเป็นกรดและเข้าสู่สภาวะความเป็นด่างในลำไส้ เม็ดเจลจะค่อย ๆ ละลาย เส้นใยอาหารซึ่งมีคุณสมบัติความเป็นรูพรุนจึงช่วยในการยึดเกาะของโปรไบโอติก ทำให้เกลือน้ำดีเข้าไปสัมผัสกับโปรไบโอติกได้ยาก ส่งผลให้การรอดชีวิตของโปรไบโอติกเพิ่มขึ้น

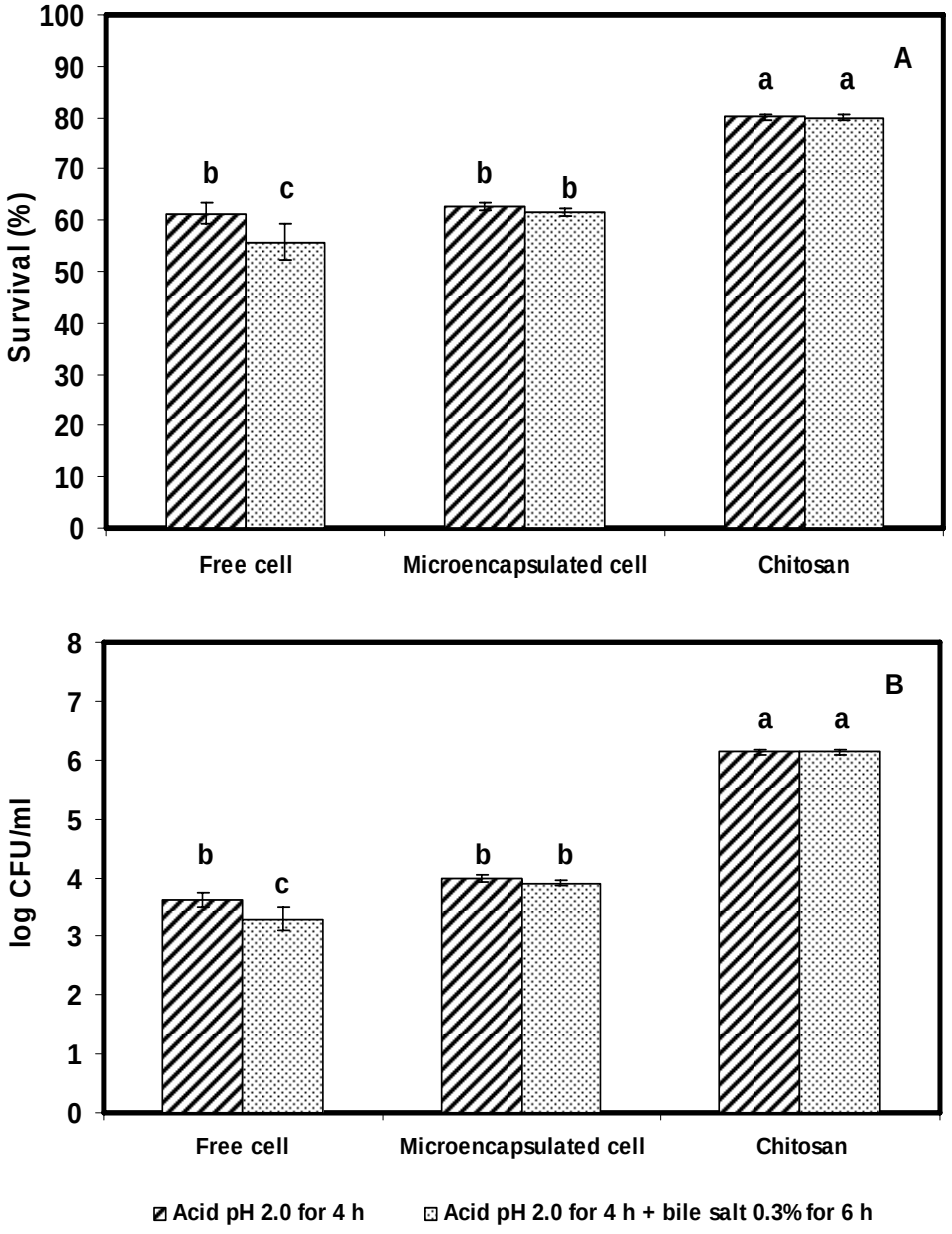
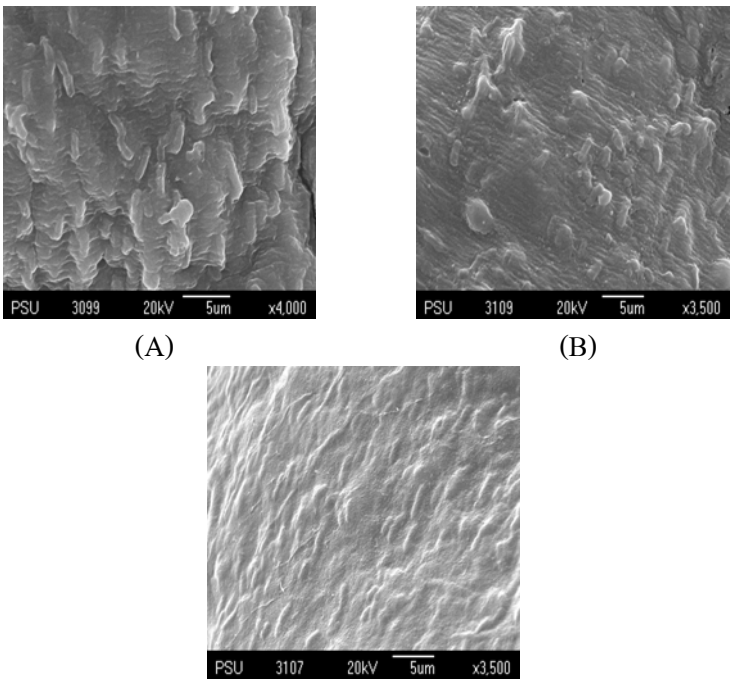


Figure 25. a) %survival and b) cell numbers (log CFU/ml) of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic and bile salt conditions.



(A) (B)

(C)

Figure 26. Scanning electron micrographs (SEM) of microencapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 with sodium alginate (A), co-encapsulated with 3% (w/v) soybean crude fiber (B) and co-encapsulated with soybean crude fiber was coated chitosan (C)

3.5 ผลของประสิทธิภาพการปลดปล่อยของเซลล์ออกจากเม็ดเจล

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเคลือบเม็ดเจลด้วยสารละลายไซโตซาน นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาร cryoprotectant มาศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยของเซลล์จากเม็ดเจล โดยแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที นับจำนวนเซลล์ที่หลุดออกมาในส่วนของสารละลายทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของเซลล์ที่ออกจากเม็ดเจล ซึ่งจากการทดลองจะพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของโปรไบโอติกออกจากเม็ดเจลมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นดังแสดงใน Figure 27. โดยเม็ดเจลที่นำมาทดสอบในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และ 6.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจล 47.48 และ 52.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่พีเอช 7.0 และ 8.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจล 99.00 และ 99.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เซลล์จะปลดปล่อยออกจากเม็ดเจลได้อย่างรวดเร็วที่สุดใน

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8 ซึ่งมีสภาวะที่เป็นเบส เนื่องหมู่ไฮดรอกซิลในเบสจะเข้าไปจับกับ Ca^{2+} ทำให้ D-mannuronic และ L-guluronic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอัลจิเนตจับกับ Ca^{2+} ได้น้อย ส่งผลให้อัลจิเนตละลายในเบสได้ดี เซลล์จึงถูกปลดปล่อยออกจากเม็ดเจลอย่างรวดเร็ว ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเซลล์จะปลดปล่อยออกจากเม็ดเจลอย่างช้า ๆ ในสภาวะที่เป็นกรด สอดคล้องกับการทดลองของ Annan และคณะ (2008) ซึ่งห่อหุ้ม *B. adolescentis* 15703T ด้วยอัลจิเนตและเคลือบเม็ดเจลด้วยเจลาติน พบว่า เม็ดเจลจะคงตัวได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และจะละลายเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชเป็นกลางหรือเป็นด่าง ยิ่งสภาวะที่เป็นด่างเม็ดเจลจะละลายอย่างรวดเร็ว

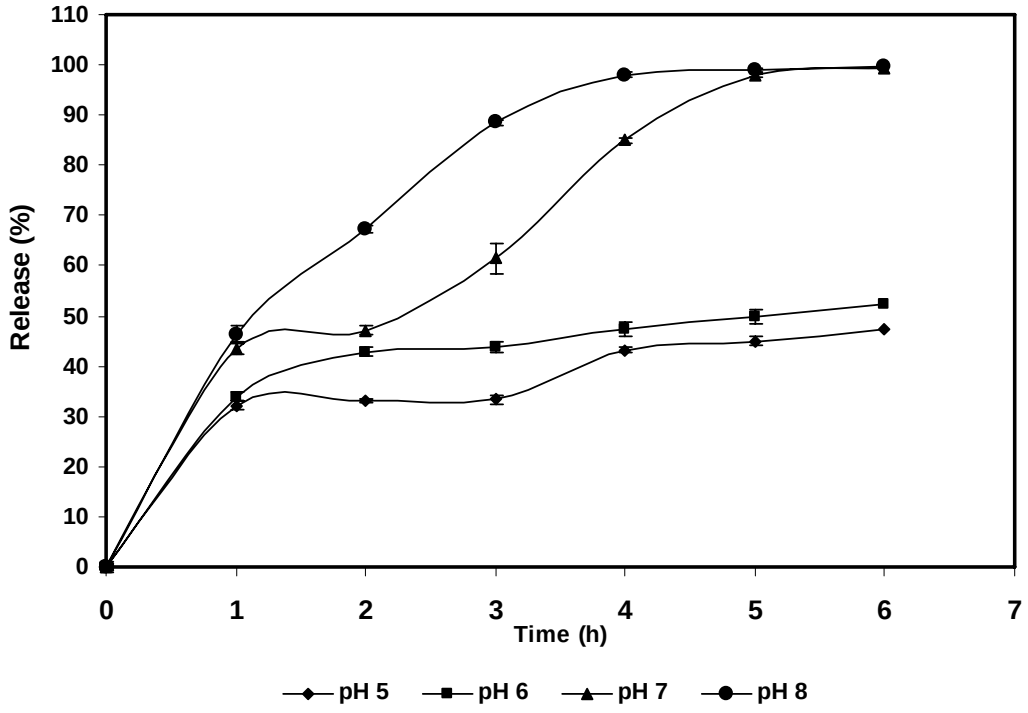


Figure 27. Effect of pH on the release of *L. plantarum* CIF17 A5 from alginate beads (co-encapsulated with soybean crude fiber with chitosan coating).

3.6 ผลของอุณหภูมิและสภาวะการเก็บรักษาโปรไบติกที่ผ่านการห่อหุ้มและทำแห้งหลังการบรรจุในแคปซูล

นำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเคลือบเม็ดเจลด้วยสารละลายไซโตซาน นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาร cryoprotectant นำเม็ดเจลมาบรรจุ

ในแคปซูลและบรรจุลงในถุงลามิเนต นำไปทำให้เป็นสุญญากาศด้วยเครื่องปิดปากถุงสุญญากาศ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมเส้นใยอาหาร พบว่า โปรไบโอติกที่ห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบด้วยไคโตซานมีจำนวนเซลล์คงที่เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่เซลล์อิสระและเซลล์ที่ห่อหุ้มโดยไม่เติมเส้นใยอาหารมีปริมาณแบคทีเรียลดลง 0.25 และ 0.12 log CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาจนครบ 8 สัปดาห์ ดังแสดงใน Figure 28. เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่า โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองและเคลือบด้วยไคโตซานมีจำนวนลดลง 2.17 log CFU/ml ในขณะที่เซลล์อิสระและเซลล์ที่ห่อหุ้มโดยไม่เติมเส้นใยอาหารมีจำนวนแบคทีเรียลดลง 2.96 และ 3.17 log CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 29. เมื่อเก็บรักษาจนครบ 8 สัปดาห์ ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก ดังจะเห็นได้จากการทดลองนี้ซึ่งพบว่าลักษณะผลิตภัณฑ์เดียวกันแต่เก็บรักษาที่ต่างสภาวะอุณหภูมิ จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตก็มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Costa และคณะ (2002) พบว่า *Pentoea agglomerans* ที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณแบคทีเรียลดลงเพียง 0.5 log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ 90 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณแบคทีเรียลดลง 3 log CFU/ml ที่เวลาการเก็บรักษา 28 วัน และจากการทดลองของ Saarela และคณะ (2000) พบว่า *Bifidobacterium* sp. ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จะมีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มจะมีการรอดชีวิตมากกว่าเซลล์อิสระ และการเติมเส้นใยอาหารร่วมกับการห่อหุ้มก็ส่งเสริมการรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้นและช่วยเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saarela และคณะ (2006) พบว่าการใช้เส้นใยอาหารของแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ต wheat dextrin, polydextrose และอินนูลินเป็นตัวพยุงเซลล์ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเปรียบเทียบกับการใช้ซูโครสเป็นตัวพยุง พบว่า *L. rhamnosus* ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในตัวพยุง คือ wheat dextrin และ polydextrose มีการรอดชีวิตสูงกว่าตัวพยุงชนิดอื่น หลังจากผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งหลังจากนั้นคัดเลือกตัวพยุงที่ให้การรอดชีวิตของ *L. rhamnosus* ดีที่สุดมา 4 ชนิด คือ sucrose, oat flour 20 เปอร์เซ็นต์ β-glucan, wheat dextrin และ polydextrose มาเติมในน้ำแอปเปิ้ล และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่า oat flour 20 เปอร์เซ็นต์ β-glucan ให้ผลการรอดชีวิตของ *L. rhamnosus* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ Sultana และคณะ (2000) ได้ศึกษาการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติก ด้วยอัลจิเนตร่วมกับแป้งข้าวโพด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก แล้วเติมลงในโยเกิร์ต เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า

จำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปเซลล์อิสระจะมีลดลงประมาณ 1 logcycle ในขณะที่โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีจำนวนลดลงเพียง 0.5 logcycle

โดยส่วนใหญ่แล้วอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของโปรไบโอติกที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นจะอยู่ในช่วง 3–6 สัปดาห์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นจะมีความคงตัวของเชื้อโปรไบโอติกมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาโดยไม่ได้แช่เย็น ส่วนอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่เติมเชื้อในลักษณะแห้ง จะประมาณ 12 เดือน แต่อย่างไรก็ตาม การรอดชีวิตของโปรไบโอติกอาจลดลงได้ระหว่างระยะเวลาเก็บรักษา (Lori, 2001)

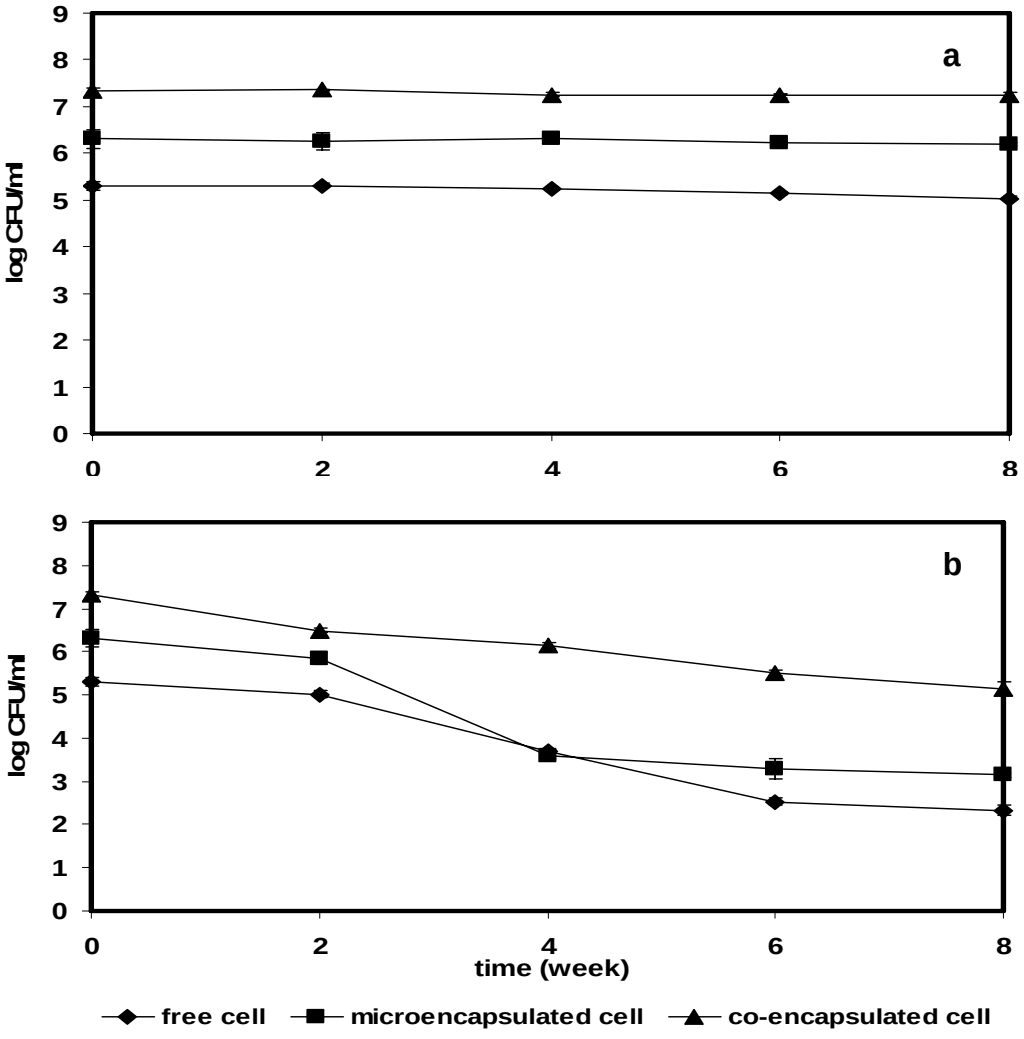


Figure 28. Viable population of freeze-dried encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 in gelatin capsule packed in vacuum aluminium foil and stored at 4°C (a) and room temperature (b) for 8 weeks.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การห่อหุ้ม *L. acidophilus* TISTR 1034 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18, 22, 24 และ 27G ศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่า การห่อหุ้มเซลล์โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G ซึ่งให้เม็ดเจลขนาด 2.40 mm. ทำให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 45.43 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงเลือกเข็มฉีดยาขนาด18G ไปใช้ในการห่อหุ้มเซลล์และศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่มีกรด พบว่า การห่อหุ้ม *L. acidophilus* TISTR 1034 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้โปรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูง เท่ากับ 45.36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้การรอดชีวิตสูงกว่าการห่อหุ้มโปรไบโอติกด้วยโซเดียมอัลจิเนต 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาเปรียบเทียบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกที่แยกมาจากคน สัตว์ และอาหารหมักโดย *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งแยกได้จากคน *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ซึ่งแยกมาจากหนูและกะหล่ำปลีดอง ตามลำดับ นำโปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มาห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G นำเม็ดเจลไปแช่กรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มให้การรอดชีวิตสูงกว่า *L. acidophilus* TISTR 1034 และ*L. plantarum* TISTR 875 ซึ่งให้การรอดชีวิตเท่ากับ 71.11 เปอร์เซ็นต์ และการเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มจะมีการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ จึงเลือก *L. plantarum* CIF17 A5 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยการห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเติมพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารจากพืช และศึกษาการทนต่อกรด พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองจะช่วยให้ *L. plantarum* CIF17 A5 มีการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 84.39 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขณะที่เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมสารพรีไบโอติกหรือเส้นใยอาหารจากพืชให้การรอดชีวิตเท่ากับ 68.78 เปอร์เซ็นต์ โดยเส้นใยถั่วเหลืองจะช่วยปิดรูพรุนบนเม็ดเจลทำให้กรดซึมผ่านไปสัมผัสกับโปรไบโอติกได้ยาก โดยพบว่าการห่อหุ้มโปรไบโอติกร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตเท่ากับ 85.30 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์เพื่อใช้การทดลองต่อไป โดยศึกษาผลการเคลือบเม็ดเจลต่อการรอดชีวิตหลังการผ่านกรด พบว่า การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ และเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซาน 0.4 เปอร์เซ็นต์ให้ค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 86.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเคลือบเม็ดเจลด้วยอัลจิเนต แต่เมื่อนำเม็ดเจลดังกล่าวไปศึกษาการทำ

แห้ง โดยศึกษาการทำแห้ง 2 วิธี คือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและทำแห้งโดยใช้ระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้องร่วม การห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ และเคลือบด้วยไคโตซาน และนำเม็ดเจลไปผ่านการทำแห้ง พบว่าการทำแห้งเม็ดเจลด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโปรไบโอติกจะมีการรอดชีวิตเท่ากับ 67.98 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทำแห้งด้วยวิธีวางที่อุณหภูมิห้องร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศให้การรอดชีวิตเท่ากับ 55.78 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป อย่างไรก็ตามจะเห็นได้โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตน้อยเมื่อผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงทดลองเติมสาร cryoprotectant ก่อนการนำเม็ดเจลไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยสาร cryoprotectant ที่ใช้ คือ นมพร่องมันเนย ซูโครส และเส้นใยถั่วเหลือง ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าซูโครสและนมพร่องมันเนย เป็นสาร cryoprotectant ที่ช่วยให้โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุด ($p>0.05$) หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แต่เนื่องจากซูโครสมีราคาถูกกว่านมพร่องมันเนย จึงเลือกใช้ซูโครสเป็นสาร cryoprotectant โดยพบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสม คือ 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยช่วยให้ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตเท่ากับ 77.62 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองดังที่กล่าวมาข้างต้นจะได้ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18G และเคลือบเม็ดเจลด้วยไคโตซาน 0.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้ซูโครสความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาร cryoprotectant นำเม็ดเจลที่ได้ไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาทดสอบการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี พบว่า สามารถทนต่อสภาวะกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้ดีว่าเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่มีการเติมเส้นใยอาหาร โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับ 80.02 เปอร์เซ็นต์ หลังผ่านกรดและเกลือน้ำดีแบบต่อเนื่อง และโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มจะมีการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลได้ดีในสภาวะที่มีเบส นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาบรรจุในแคปซูลและนำแคปซูลที่ได้มาบรรจุในถุงลามิเนตสภาวะสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง พบว่า มีจำนวนเซลล์คงที่ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่เซลล์อิสระและเซลล์ที่ห่อหุ้มโดยไม่เติมเส้นใยอาหารมีปริมาณแบคทีเรียลดลง 0.25 และ 0.12 log CFU/ml ตามลำดับ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจำนวนเซลล์จะมีการลดลงอย่างรวดเร็ว

เอกสารอ้างอิง

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. Probiotic. ว. แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. 53: 357-360.

นันทินา เชิญทอง. 2550. การคัดเลือก ลักษณะ และคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลกติกจากสัตว์ทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นวลจันทร์ พารักษา. 2533. สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก. ว. สุกรสาส์น 16: 6-13.

ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล. 2547. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 1). ว. สมาคมเครื่องทำความเย็นไทย. 11: 20-22.

วาสนา กิตติกนกรัตน์. 2546. การศึกษาและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* TISTR001. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อุทัย เก้าเอี้ยน. 2549. โปรไบโอติก. สงขลานครินทร์เวชสาร 24: 315-323.

อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโปรไบโอติกในเชิงอาหารสัตว์. ว. สุกรสาส์น 18: 11-16.

Annan, N. T., Borza, A. D. and Hansen, L. T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Res. Int. 41: 184–193.

Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. J. Food Sci. 83: 1946–1951.

Akın, M. B, Akın, M. S. and Kırmacı, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. Food Chem. 104: 93–99.

Alander, M., De Smet, I., Nollet, L., Verstraete, W. and Von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T., 1999. The effect of probiotic strains on the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. Int. J. Food Microbiol. 46: 71–79.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology. In Lactic acid bacteria: microbiology and functional espects. (Salminen, S. and Wright, A. eds.). p. 1-72. Marcel. Dekker, Inc. New York.

Balcázar, L. J., Vendrell, D., Blas D. I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, L. J. and Girones, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. 278: 188-191.

Ballongue, J., Schumann, C. and Quignon, P. 1997. Effect of lactulose and lactinol on colonic microflora and enzyme activity. Scand. J. Gastroentero. Suppl. 222: 41-44.

Barreteau, H., Delattre, C. and Michaud, P. 2006. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. Food Technol. Biotechnol. 44: 323-333.

Bielecka, M., Biedrzycka, E. and Majkowska, A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. Food Res. Int. 35: 125-131.

Bosscher, D., Caillie-Bertrand, M. V., Cauwenbergh, R. V. and Deelstra, H. 2003. Availabilities of calcium iron and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. J. Nutr. 19: 641–645.

Brady, L. J., Gallaher, D. D. and Busta, F. F. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130: 410-414.

Bruno, F. A., and Shah, N. P. 2002. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. In skim milk containing prebiotics. J. Food Sci. 67: 2740-2744.

Bxcommerce. 2001. What is inulin ? (online). Available http://www.stonyfield.com (2008. October 14)

Buke, M. L. and Gilliland, E. S. 1994. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci. 77: 2925 – 2933.

Campbell, J. M., Fahey, G. C. and Wolf, B. W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microfrora in rats. J. Nutr. 127: 130-136.

Capela, P., Hay, T. K. C. and Shah, N. P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Res Int. 39: 203-211.

Chaplin, M. 2008. Water structure and science. (Online). Available http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html (2008. January 20)

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int. Dairy. J. 14: 835-847.

Chandramoulia, V., Kailasapathya, K., Peirisb, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. J. Microbiol. Meth. 56: 27-35.

Charalampopoulod, D., Wang, R., Pandiella, S. S. and Webb, C. 2000. Application of cereal and cereal composition in functional food : a review. Int. J. Food Microbiol. 79: 131-141.

Chen, K. N., Chen, M. J., Liu, J. R., Lin, C. W. and Chiu, H. Y. 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. J. Food Sci. 70: 260-266.

Chitosan. 2007. Available http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/chi_0067.shtml (2009. November 10)

Con, H. A., Gokalp, S. H. and Kaya, M. 2001. Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. Meat Sci. 59: 437-441.

Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Bruni, S., Carloni, I. and Gabrielli, O. 2001. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. Adv. Exp. Med. Biol. 501: 307-314.

Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic Lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotc substances. J. Appl. Microbiol. 96: 1024-1039.

Costa, E., Usall, J. Teixido, N., Garcia, N. and Vinas, I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viabilty of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 89: 793-800.

Dasechel, M. A. and Klaenhammer, T. R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1538-1541.

Dave, R. T. and Shah, N. P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurt made from commercial starter cultures. Int Dairy J. 7: 31-41.

Degeest, B., Janssens, B. and De Vuyst, L. 2001. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* O-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yield. J. Appl. Microbiol. 91: 470-477.

Delzenne, N., Cherbut, C. and Neyrinck, A. 2003. Prebiotics: actual and potential effects in inflammatory and malignant colonic diseases. Curr. Opin. Clin. Nutr. 6: 518-186.

Ding, W. K. and Shah, N. P. 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria and microencapsulated probiotic bacteria. J. Food Sci. 72: 446-450.

Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. J. Dairy Sci. 70: 1-12.

Eun, A. Y., Younghoon, K., Sejong, O., Jee-Young, I., Dong-Jun, P., Kyoung, H. S., Han, K. and Sae, K. H. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. Int. J. Food Sci. Tech. 42: 411-419.

Fook, J. L., Fuller, R. and Gidson, R. G. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53-61.

Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developments. Int. Food Ingred. 3: 23-26.

Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. and Stanton, C. 2002. A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. Int. Daily J. 12: 749-756.

Gardiner, G. E., OiSullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. 2000. Comparative survival rates of human-derivedprobiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2605-2612.

Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. J. Gastroentero. Suppl. 18: 287-298.

Gibson, G. and Anngus, F. 2000. Prebiotic and Probiotic. Leatherhead publishing. England. 1-81.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of prebiotic. J. Nutr. 125: 1404-1412.

Gill, S. H., Rutherfurd, J., Cross, L. and Gopal, P. K. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN 019. Am J. Clin. Nutr. 74: 833-839.

Glore, R. S., Treeck, V. D., Knehans W. A. and Guild, M. 1994. Dietary fiber. J. Am. Diet. Assoc. 94: 425-436.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. J. Natl. Cancer Inst. 64: 263-265.

Gray, J. 2006. Dietary Fibre. *In* Definition, Analysis, Physiology and Health. (Champ, M., ed.). p. 13-17. ILSI Europe. Brussels. Belgium.

Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D. and Poncelet, D. 1993. Membrane formation by interfacial cross-linkingof chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. Biotechnol. Bioeng. 42: 1157–1163.

Grosso, C. R. F. and Fávaro-Trindade, C. S. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. Braz. J. Microbiol. 35 :151-156.

Hedley, C. L. 2001. Carbohydrates in grain legume seeds: Improving nutritional quality and agronomic charecteristics. CABI publishing. Wallingford. UK.

Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. and Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Int. J. Food Microbiol. 71:235-244.

Helander, I. M., Wright, A. V. and Mattila-Sandholm, T. M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends Food Sci. Technol. 8: 146-150.

Holzapfel, W. H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. Food Res. Int. 35: 109–116.

Holzapfel, W., Schillinger, U. and Buckenhuskes, H. J. (2003). Sauerkraut. In E. R. Farnworth (Ed.), Handbook of fermented functional foods (pp. 343–359). Raton, FL: CRC Press.

Hood, S. K. and Zottola, E. A. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J. Food Sci. 53: 1514-1516.

Hyndman, C. L., Groboillot, A. F. and Poncelet, D. 1993. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. J. Chem. Technol. Biot. 56: 259–263.

Iyer, C. and Kailasapathy, K. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. J. Food Sci. 70: 18-23.

Jankowski, T., Zielinska, M., and Wysakowska, A. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. Biotechnol. Technol. 11: 31–34.

Kaila, M., Isolauri, E., Soppi. E., Virtanen, E., Laine, S. and Arvilommi, H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human dirrhoea by a human *Lactobacillus* strain. Int. J. Ped. Res. 32: 141-144.

Kailasapathy, K. and Chin, J. C. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotics organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol Cell Biol. 78:80–8.

Kelsey, J. L. 1978. A review of research on effect of fiber intake on man. Am. J. Clin. Nutr. 31: 142–159.

Khalil, R., Mahrous, H., Halafaway, E. K., Kamaly, K., Frank, J. and Soda, E. M. 2007. Evaluation of the probiotic potential of lactic acid acteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. J. Biotechnol. 6: 939-949.

Kim, Y. and Wang, S. S. 2002. Physiochemical properties of inulin in baking as a fat substitute. http://www.confex.com. (2008. October 14)

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. 2000. The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. Brit. J. Nutr. 25: 223-231.

Kontula, P. 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. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 246-252.

Koo, S. M., Cho, Y. H., Huh, C. S., Baek, Y. J. and Park, J. 2001. Improvement of stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. J. Microbiol. Biotechnol. 11: 376–83.

Korakli, M. and Vogel, R. F. 2006. Structure/function of homopolysaccharide producing glycansucrase and therapeutic potential of their synthesized glycans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 790-803.

Kotiguda, G., Peterbauer, T. and Mulimani, V. H. 2006. Isolation and structural analysis of ajugose from Vigna mungo L. Carbohydr. Res. 341: 2156-2160.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int. Dairy J. 14: 737-743.

Lankaputhra, W. E. V, Shah, N. P. and Britz, M. L. 1996. Evaluation of media for selected enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Food Aust. 48: 113-118.

Lee, H. W., Park, Y. S., Jung, J. S. and Shin, W. S. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. Anaerobe. 8: 319-324.

Lee, J., Cha, D. S. and Park, H. J. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. J. Agric. Food Chem. 52: 7300-7305.

Lee, K. Y. and Heo, T. R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulate gastric juices and bile salt solution. Appl. Environ. Microbiol. 66: 869-873.

Lian, W. C. Hsiao, H. C. and Chou, C. C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. Int. J. Food Microbiol. 86: 293–301.

Lopez, H. W., Coudray, C., Levrat-Verny, M. A., Coudray, F. C., Demigne, C. and Reesy, C. 2000. Fructooligosaccharide enhance miniral absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. J. Nutr. Biochem. 11: 500-508.

Lori, K., 2001. Prophylactic and therapeutic use of probiotic: A review. J. Am. Diet. Assoc. 101: 229-238.

Mandal, S. Puniya, A. K. and Singh, K. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. Int. Dairy J. 16: 1190–1195.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. 16: 189-199.

Martinez-Villaluenga, C., Frias, J. and Vidal-Valverde, C. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food Chem. 91: 645-649.

Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S. S., Webb, C., Fukuda, H. and Kondo, A. 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochem. Eng. J. 28: 73-78.

Mizota, T. 1996. Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. Bull. Int. Dairy Found. 313: 31-35.

Monson, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Simon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11: 675-686.

Ohta, A., Ohtsuki, M., Uehara, M., Hosono, A., Hirayama, M., Adachi, T. and Hara, H. 1998. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. J. Nutr. 128: 485-490.

Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K. and Ikeda, H. 1995. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. Microbiol. Res. 56: 415-420.

O' Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., and Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of *Bifdobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. J. Appl. Microbiol. 91: 1059-1066.

Otero, M. C., Espeche, C. and Nader-Macias, M. E. 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbureckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. Process. Biochem. 42: 1406-1411.

Ouwehand, A. C., Derrien, M., De Vos, W., Tiihonen, K. and Rautonen, N. 2005. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. Curr. Opin. Biotechnol. 16: 1-6.

Ouwehand, A. C. and Salminen, S. J. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. Int. Dairy J. 8: 749-758.

Palmfeldt, J. and Hahn-Hagerdal, B. 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. Int. J. Food Microbiol. 55: 235-238.

Paul, B. 1997. Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. http://medherb.com (2008. October 14)

Rao, A. V., Shiwnavain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juiced. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 22: 45-346.

Rastall, R. A. and Maitin, V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Food Biotechnol. 3: 490-496.

Reddy, B. S. 1999. Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence carcinogenesis and tumor growth. J. Nutr. 129: 1478-1482.

Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics: are they functional food. Am. J. Clin. Nutr. 71: 1682-1687.

Rupasinghe, V. H. P., Wang, L., Huber, M. G. and Pitts, L. N. 2008. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. Food Chem. 107: 1217-1224.

Rycroft, C., Jone, M. R., Gibson, G. and Rastall, R. A. 2001. A comparative *in vitro* evalution of fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 878-887.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J. and Mattila-Sand-holm, T. 2000. Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215.

Saarela, M., Virkajarvi, I., Nohynek, L., Vaari, A. and Matto, J. 2006. Fiber as carrier for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereal. J. Food Microbiol. 112: 171-178.

Salminen, S. 2001. Human studies on probiotics : aspects of scientific documentation. Scand. J. Nutr. 45: 8-12.

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. and Prapulla, S. G. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructo-oligosaccharides. Trends Food Sci. Technol. 16: 442-457.

Scheneeman, B. O. 1987. Soluble vs. insoluble fibre-different psysiological response. Food Biotechnol. 41: 81-82.

Schleifer, K. and Ludwig, W. 1996. Phylogeny of the genus *Lactobacillu*s and related genera. Syst. Appl. Microbiol. 18: 461-467.

Schley, P. D. and Field, C. J. 2002. The immune enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. J. Nutr. 87: 221-230.

Shah, N. P., Lankaputra, W. E., Britz, M. L. and Kyle, W. S. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial during refrigerated. Int. Dairy J. 5: 515-521.

Simunex, J., Tishchenko, G., Hodrova, B. and Bartonova, H. 2006. Effect of chitosan on the growth of human colonic bacteria. Folia Microbiol. 51: 306-308.

Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratibul, S. and Navarini, L. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented food: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. Int. J. Food Microbiol. 15: 105-111.

Sofia, K., Tuohy, K. and Gibson, G. R. 2001. The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. Brit. Nutr. Found. 25: 223-231.

Steenson, L. R., Klaenhammer, T. R. and Swaisgood, H. E. 1987. Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophages. J. Dairy Sci. 70: 1121-1127.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol. 62: 47-55.

Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacteria extracellular and cell wall polysaccharides Annu. Rev. Microbiol. 39: 243-270.

Tanya, Z. 2002. The ecosystem in your gut : how prebiotic work. http://www.Dietandbody.com (2008. October 14)

To, B.C. S. and Etzel, M. R. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria. J. Food Sci. 63: 576-585.

Tsen, H. J., Chen H. H. and King E. A. V. 2002. Survival of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* immobilized in *k*-carrageenan. J. Appl. Microbiol. 48: 237-241.

Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. and Gibson, G. R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today 8: 692-700.

Tzortzis, G., Baillon, M. L. A., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2004. Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate. J. Appl. Microbiol. 96: 552-559.

Van der Berg, D. J. C., Robijin, G. W. and Janssen, A. C. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* O-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.

Van, D. H., Schaafsma, G., Muys, T. and Van, D. W. 1998. Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme-iron absorption in young healthy men. J. Clinic Nutr. 67: 445-451.

Vicki, K. 2002. Inulin. A prebiotic. http://www. Stonyfield.com. (2008. October 14)

Wang, X and Gibson, G. R. 1993. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by inulin by bacteria growing in the human large intestine. J. Appl. Bacteriol. 75: 373-380.

Wang, T. L., Domoney, C., Hedley, C. L., Casey, R. and Grusak, M. A. 2003. Nutritional quality of legume seeds. Plant Physiol.131: 886-891.

Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B. and German, J. B. 2006. *In vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4497-4499.

Willette, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosener, B. A. and Speizer, F. F. 1990. Relation of feat, fat and fiber intake to risk of colon cancer in a prospective study among women. New Engl. J. Med. 323: 1664-1672.

Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. 1997. The lactic bacteria. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B. J. and Holzapfel, W. H., ed) p. 1-6. Blackie Academic and Professional.Lon don.

Yang, S. J., Lee, H. S., Park, C. S., Kim, Y. R., Moon, T. W. and Park, K. H. 2004. Enzymatic analysis of amylolytic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* reveals its novel catalytic properties as both an α-amylase and a cyclodextrin hydrolyzing enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5988-5995.

Zhong, S. S., Zhang, S. Z., Wang, D. J., Lai, S. Z., Wang, Y. Q., Pan, J. L. and Ren, X. Y. 2004. Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of *Bifidobacterium adolescentis* 1027. World J. Gastroenterol. 10: 1630-1633.

Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C. P. and Neufeld, R. J. 1998. Spectophotometric quatification and control of cell release with chitosan coating. J. Appl. Microbiol. 84: 342-348.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Proteose peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.10	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 55.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ประกอบด้วย

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.05	โมลาร์
KH_2PO_4	0.05	โมลาร์
NaCl	0.85	กรัม

ใช้ สารละลาย KH_2PO_4 ปรับ สารละลาย $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ จนได้พีเอชที่ต้องการ จากนั้นตวงบัฟเฟอร์ตามปริมาตรที่ต้องการ เติม NaCl ลงไป ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ (L. plantarum CIF17 A5, *L. plantarum* TISTR 875 และ *L. acidophilus* TISTR 1034 และ) เลี้ยงในอาหาร MRS ปริมาตร10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตัวเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยง 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตัวเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 2 ครั้ง และเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำให้เป็น suspension เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^{9}-10^{10} CFU/ml

2. การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

2.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์

นำแบคทีเรียแลกติกมาทำการเจือจางแบบ serial ten-fold dilution ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยแบคทีเรียที่ผ่านกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^{2} ถึง 10^{4} และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านกรด ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^{6} ถึง 10^{8} นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยการ pour plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารแข็ง MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU/ml

2.2 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการห่อหุ้ม

ชั่งเม็ดเจล 1 กรัม เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 9 ml นำไปเขย่าบนเครื่อง vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 10 นาที เจือจาง suspension ของเซลล์ที่ได้ต่อแบบ serial ten-fold dilution ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจล โดยการ pour plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารแข็ง MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU/ml

3. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ทำซ้ำข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัมและจดบันทึก

3. ชั่งตัวอย่างใส่ภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของภาชนะและตัวอย่าง

4. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

5. ชั่งน้ำหนักภานะและตัวอย่างหลังจากนั้นนำกลับไปอบในตู้อบและทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัมและจดบันทึก

วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{(น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

Table 13. Effects of needle size on survival of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C).

Sodium alginate concentration	**Viable cells (log CFU/ml)**	
(%)	**Before**	**After**
free cell	9.17 ± 0.089	2.50 ± 0.109
1	9.15 ± 0.062	3.02 ± 0.048
1.5	9.15 ± 0.028	3.11 ± 0.061
2	9.19 ± 0.091	4.17 ± 0.067

Table 14. Effects of sodium alginate concentration on survival of *L. acidophiilus* TISTR 1034 under treatment of simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C).

Needle sizes	**Viable cells (log CFU/ml)**	
	Before	**After**
free cell	9.17 ± 0.070	2.40 ± 0.114
18 G	9.18 ± 0.080	4.17 ± 0.088
22 G	9.20 ± 0.107	3.49 ± 0.148
24G	9.08 ± 0.045	2.92 ± 0.110
27G	9.21 ± 0.112	2.84 ± 0.121

Table 15. Comparative survival of free cell and encapsulated probiotic originated from human rat and kickled cabbage under acidic condition (pH 2.0 for 3 h).

probiotic strains	**Viable cells (log CFU/ml)**			
	free cell		**encapsulated cell**	
	Before	**After**	**Before**	**After**
L. plantarum CIF17 A5	9.31 ± 0.08	6.44 ± 0.11	9.28 ± 0.020	6.96 ± 0.010
L. acidophilus TISTR 1034	9.40 ±0.05	2.11 ± 0.03	10.07 ± 0.58	2.52 ± 0.160
L. plantarum TISTR 875	8.75 ± 0.04	2.55 ± 0.330	8.00 ± 0.160	2.87 ± 0.080

Table 16. Effects of prebiotics and crude fibers as co-encapsulants on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition at pH 2.0 for 3 h at 37 °C.

Prebiotics	**Viable cells (log CFU/ml)**	
	Before	**After**
free cell	9.23 ± 0.067	5.71 ± 0.052
micro-encapsulated cell	9.28 ± 0.023	9.28 ± 0.142
FOS	8.99 ± 0.040	8.99 ± 0.099
mung bean crude fiber	9.28 ± 0.080	9.28 ± 0.093
mung bean extract	9.33 ± 0.014	9.33 ± 0.063
soybean crude fiber	9.30 ± 0.022	9.30 ± 0.009
soybean extract	9.31 ± 0.207	9.31 ± 0.031
corn crude fiber	9.29 ± 0.062	9.29 ± 0.029
corn extract	9.10 ± 0.043	9.10 ± 0.140
banana peel extract	9.32 ± 0.048	9.32 ± 0.044
banana extract	9.26 ± 0.097	9.26 ± 0.097
EPS	9.20 ± 0.028	9.20 ± 0.028

Table 17. Effects of different soybean crude fiber concentrations on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 under simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h at 37°C).

Soybean crude fiber concentration (%)	Viable cells (log CFU/ml)	
	Before	After
free cell	9.22 ± 0.067	5.80 ± 0.161
0	9.39 ± 0.401	6.38 ± 0.142
1	9.39 ± 0.4012	7.40 ± 0.229
2	9.19 ± 0.010	7.64 ± 0.076
3	9.14 ± 0.039	7.84 ± 0.054
4	9.28 ± 0.023	7.00 ± 0.077

Table 18. Effects of polymer coatings on survival of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic condition (pH 2.0 for 3 h).

Polymer	Viable cells (log CFU/ml)	
	Before	After
free cell	9.09 ± 0.222	5.85 ± 0.133
microencapsulated cell	9.37 ± 0.031	6.33 ± 0.060
3% soybean crude fiber	9.34 ± 0.082	7.86 ± 0.131
3% soybean crude fiber + 0.4% chitosan	9.35 ± 0.026	8.07 ± 0.050
3% soybean crude fiber + 0.4% alginate	9.19 ± 0.149	7.56 ± 0.275

Table 19. Survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after freez-drying and vacuum-drying.

	Viable cells (log CFU/ml)			
	Freeze-dry		**Vacuum-dry**	
	Before	**After**	**Before**	**After**
Free cell	9.35 ± 0.015	3.16 ± 0.040	9.35 ± 0.015	2.22 ± 0.045
Microencapsulated cell	9.36 ± 0.026	4.10 ± 0.045	9.33 ± 0.045	3.23 ± 0.026
3%soybean crude fiber	9.36 ± 0.024	5.62 ± 0.053	9.36 ± 0.024	4.52 ± 0.227
3%soybean crude fiber + chitosan	9.36 ± 0.025	6.36 ± 0.061	9.36 ± 0.025	5.22 ± 0.108

Table 20. Effects of cryoprotectants on survival of co-encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying.

Cryoprotectants	**Viable cells (log CFU/ml)**	
	Before	**After**
control	9.36 ± 0.054	5.98 ± 0.155
sucrose	9.36 ± 0.054	6.88 ± 0.092
skim milk	9.36 ± 0.054	6.99 ± 0.078
soybean crude fiber	9.36 ± 0.054	6.59 ± 0.061

Table 21. Concentrations of sucrose on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after freeze-drying.

Sucrose concentration (%)	**Viable cells (log CFU/ml)**	
	Before	**After**
0	9.32 ± 0.026	5.55 ± 0.097
5	9.32 ± 0.026	6.73 ± 0.051
10	9.32 ± 0.026	6.96 ± 0.083
15	9.32 ± 0.026	7.23 ± 0.162
20	9.32 ± 0.026	7.34 ± 0.038

Table 22. Survival of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 under acidic and bile salt conditions.

	Viable cells (log CFU/ml)		
	Before	**acid pH 2.0 for 4 h**	**acid pH 2.0 for 4 h + 0.3% bile salt for 6 h**
Free cell	5.92 ± 0.068	3.63 ± 0.122	3.30 ± 0.207
Microencapsulated cell	6.34 ± 0.041	3.98 ± 0.057	3.90 ± 0.052
3%soybean crude fiber + chitosan	7.66 ± 0.124	6.14 ± 0.043	6.13 ± 0.049

Table 23. Effect of pH on the release of *L. plantarum* CIF17 A5 from alginate beads (co-encapsulated with soybean crude fiber with chitosan coating).

Time (h)	**Cell release (log CFU/ml)**					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
pH 5	2.33 ± 0.051	2.39 ± 0.063	2.41 ± 0.026	3.12 ± 0.071	3.25 ± 0.038	3.43 ± 0.066
pH 6	2.46 ± 0.023	3.10 ± 0.069	3.17 ± 0.058	3.43 ± 0.076	3.61 ± 0.110	3.77 ± 0.105
pH 7	3.15 ± 0.066	3.40 ± 0.085	4.45 ± 0.059	6.14 ± 0.214	7.08 ± 0.043	7.19 ± 0.035
pH 8	3.36 ± 0.034	4.87 ± 0.130	6.40 ± 0.056	7.09 ± 0.035	7.16 ± 0.043	7.21 ± 0.029

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวจุฬาลักษณ์ ชูพรหม

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5111020004

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- โครงการสร้างขีดความสามารถด้านการวิจัยและพัฒนาและการแข่งขันของภาคอุตสาหกรรมโดยกลไกความร่วมมือระหว่างภาครัฐ เอกชน และมหาวิทยาลัย

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Julalak Chuprom and Tipparat Hongpattarakere. 2009. Effect of potential prebiotic extracts and plant crude fiber on survival of microencapsulated probiotics under simulated gastric juice. The 21st Annual Meeting and International Conference of The Thai Society for Biotechnology. Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand. 24-25 September 2009. pp. 105.