การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว

Survival Enhancement of Probiotic by Co-encapsulation with Root Crop Fiber

สิรสา สุมงคล

Sirasa Sumongkhon

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
2556

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว

ผู้เขียน นางสาวสิรสา สุมงคล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
……..	……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)	(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)
	……..กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)
	……..กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

……..……..……

(ศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่าผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ……..……..
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ……....……..
(นางสาวสิรสา สุมงคล)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ……...……..……...…

(นางสาวสิรสา สุมงคล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว

ผู้เขียน นางสาวสิรสา สุมงคล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ที่แยกมาจากคน หนูและอาหารหมัก ตามลำดับ จากการนำไปทดสอบการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด พีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 มีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 83.57 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ซึ่งแยกจากหนูและกะหล่ำปลีดองให้การรอดชีวิต 74.79 และ 65.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากสภาวะที่มีกรดสูงได้มากกว่าเซลล์อิสระ การศึกษาการทนต่อกรดของ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมการเติมสารสกัดและเส้นใยอาหารจากพืชหัว 3 ชนิด พบว่า *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตสูงสุดคือ 86.12 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) จากสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นเซลล์อิสระที่ไม่ถูกห่อหุ้ม และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมเส้นใยจากพืชให้การรอดชีวิตเท่ากับ 37.21 และ 81.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการใช้เส้นใยบีทรูทความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 จาก 37.75 เป็น 86.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเซลล์ที่ห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูท มาผ่านสภาวะเป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง และเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 ชั่วโมง แบบต่อเนื่อง พบว่ามีการรอดชีวิตเท่ากับ 7.98 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มโดยไม่เติมเส้นใยจากพืชหัวให้การรอดชีวิตเท่ากับ 3.30 และ 6.45 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทให้การรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อเก็บรักษาในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือแกง 8 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ อาหารเหลว skim milk เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ หรือแม้แต่ในอาหารเหลว MRS ที่มี พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

Thesis Title	Survival enhancement of probiotic by co-encapsulation with root crop fiber.
Author	Miss Sirasa Sumongkhon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2012

ABSTRACT

Survival of calcium alginate encapsulated probiotic bacteria, including *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 which were isolated from human, rat and sauerkraut respectively, were evaluated under highly acidic condition of simulated gastric juice at pH 2.0 for 3 h. Encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 showed the highest survival of 83.57%, whereas encapsulated *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 exhibited only 74.79% and 65.49% of survival, respectively. Encapsulation enhanced acidic survival of all probiotic strains compared to free cells. Survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 co-encapsulated with three different root crop crude fibers were evaluated under simulated gastric condition. *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 co-encapsulated with 2% beet root crude fiber showed the highest survival of 86.12% ($p>0.05$) after acidic exposure at pH 2.0 for 3 h, while the control groups including free and microencapsulated cells exhibited 37.21% and 81.81% of survival, respectively. Addition of 2% beet root crude fiber significantly enhanced survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 from 37.75% to 86.78%. Viable cell of co-encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 with beet root crude fiber after the consecutive exposure of gastric juice at pH 2.0 for 3 h and bile salt exposure for 6 h was 7.98 log CFU/ml. While 3.30 and 6.45 log CFU/ml were obtained from free cells and microencapsulated cells, respectively. Viability of co-encapsulated *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 with beet root crude fiber was higher than free cell during 14 days storage at 4°C in MRS broth with 8% salt, 20% sucrose, 20% skim milk broth or even MRS broth pH 4.5.

สารบาญ

หน้า

สารบัญ…… (8)
LIST OF TABLES…….. (9)
LIST OF FIGURES…… (11)
บทที่
1. บทนำ…….. 1
บทนำต้นเรื่อง…….. 1
การตรวจเอกสาร……. 3
วัตถุประสงค์การวิจัย……..... 33
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ……..... 34
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง……..... 44
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ……..... 64
เอกสารอ้างอิง……..... 66
ภาคผนวก……. 81
ประวัติผู้เขียน……... 90

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Examples of bacteria used as probiotics……..……..….	7
2.	Structure and composition of commercially available prebiotics….....…	18
3.	Structures of oligosaccharides found in legumes……	20
4.	Concentrations of carbohydrate composition in legume species……	21
5.	Comparison of total dietary fiber content in cereal grains……..	23
6.	Positive and negative features of extrusion and emulsion techniques……	30
7.	Effect of cell load on viability of encapsulated *L. acidophilus* CSCC 2400 bacteria in simulated gastric condition (pH 2 for 3 h at 37 °C)…….	31
8.	Encapsulation yields of probiotic cell encapsulated in alginate microspheres…..	44
9.	Effect of alginate encapsulation on probiotics survival after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C……..	46
10.	Comparative survival of free cell and encapsulated probiotic originated from human rat and sauerkraut after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C……..	83
11.	Effects of prebiotics and crude fibers as co-encapsulants on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C. …….....	83
12.	Effects of different beet root crude fiber concentrations on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C……	84
13.	%Survival and cell number (log CFU/ml) of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h) and bile salt conditions (bile salt 0.3% for 6 h)…….	85
14.	Viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in various concentrations of salt……..….	86
15.	Viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in various concentrations of sucrose…….....	87

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
16.	Viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in various concentrations of skim milk……	88
17.	Influence of acid on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in MRS adjusted to pH 4.5 with various kinds of organic acids……	89

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Bifidobacteria……...……...	6
2.	SEM analysis of *Lactobacillus plantarum*.…….	7
3.	Chemical structures of (D) and (L) lactic acid isomers……...……	8
4.	The structural formula of prebiotics a) inulin b) lactulose c) galactooligosaccharides and d) xylooligosaccharides…….	16
5.	Chemical structures of lactosucrose…..……..	17
6.	Microencapsulation (extrusion and emulsion)……	25
7.	Particle size distribution of bead from encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5……	45
8.	Effect of crude fibers from various root crops as co-encapsulant on a) survival and b) cell viability (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C……...	49
9.	Effect of beetroot crude fiber concentration as co-encapsulant on a) survival and b) cell viability (log CFU/ml) *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C……..……..	51
10.	a) %Survival and b) cell viability (log CFU/ml) of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h) and bile salt conditions (bile salt 0.3% for 6 h)……	53
11.	Effect of different percentage of sodium chloride (NaCl) on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C.……..…….	60
12.	Effect of different percentage of sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C……..……..	61

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
13.	Effect of different percentage of skim milk on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C……	62
14.	Effect of acidified MRS broth (pH 4.5) on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C……	63

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โปรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถนำเข้าสู่ภายในทางเดินอาหาร และหากได้รับเข้าไปแล้ว เชื้อที่รอดชีวิตมีปริมาณมากเพียงพอ จะทำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายมนุษย์ได้ (Gilliland, 1989) โดยช่วยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในร่างกาย ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีหน้าที่ที่สำคัญ เช่น ช่วยปรับสมดุลในร่างกายให้ปกติ กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย และช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เป็นต้น (Anal and Singh, 2007) การมีชีวิตอยู่ของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ เป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากโปรไบโอติก ที่มีชีวิตจะสามารถก่อตัว และเพิ่มจำนวนในลำไส้ใหญ่ และให้ประโยชน์มากมายต่อสุขภาพของผู้ถูกอาศัย (host) โดยการรอดชีวิตของโปรไบโอติกขึ้นกับปัจจัยหลายปัจจัยทั้งภายในและภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พีเอช สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวจุลินทรีย์ ภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา และกระบวนการแปรรูป เป็นต้น Shah และคณะ (1995) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต 5 ชนิด ที่จำหน่ายในออสเตรเลีย แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเซลล์โปรไบโอติกทั้งสองชนิดมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลายๆ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเหล่านี้ เช่น พีเอชต่ำ กรด น้ำดีและน้ำย่อย (Conway, 1996 อ้างโดย Iyer and Kailasapathy, 2005) International Dairy Federation (IDF) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์เสริมโปรไบโอติกจะต้องมีแบคทีเรียที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Ouwehand and Salminen, 1998) นอกจากมาตรฐานดังกล่าวแล้วในแต่ละประเทศได้มีการพัฒนามาตรฐานของจำนวนเซลล์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น ประเทศญี่ปุ่น The Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association ได้กำหนดมาตรฐานขั้นต่ำของจำนวนเซลล์โปรไบโอติกไว้ที่ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และในหลายประเทศมีการกำหนดมาตรฐานขั้นต่ำของจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เช่น อาร์เจนตินา ปารากวัย บราซิล และอุรุกวัย เป็นต้น (Krasaekoopt *et al.,* 2003)

การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้เพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก ที่นิยมใช้กันแพร่หลายในปัจจุบันโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีกรดเป็นองค์ประกอบอย่างเช่น ในโยเกิร์ต การห่อหุ้มเซลล์จะช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่อาจทำร้ายเซลล์โปรไบโอติก จนส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ได้ การพัฒนารูปแบบการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกนิยมใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชั่น เนื่องจากเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก เพิ่มความคงตัวในการเก็บรักษา รวมไปถึงช่วยในการควบคุมอัตราการปลดปล่อยเซลล์โปรไบโอติก เพื่อให้มีอัตราการปลดปล่อยอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ ทำให้มีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการส่งผลดีแก่สุขภาพผู้บริโภค ช่วยกลบรสชาติ สี และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้ ดังนั้นการทำให้เซลล์โปรไบโอติกที่ได้มีความคงตัว การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกจึงเป็นวิธีที่ดีอย่างหนึ่ง ที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการเก็บรักษา และเกิดประโยชน์แก่ร่างกายมนุษย์ งานวิจัยนี้เลือกใช้อัลจิเนตในกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชั่นเซลล์โปรไบโอติก ซึ่งอัลจิเนตเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วย monomer จำนวนมาก (จำนวนตั้งแต่ 100-300 โมโนเมอร์) เชื่อมต่อกันโดยมีโครงสร้างเป็น glycuroglycan สายยาวที่จัดอยู่ในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์สายตรง (linear unbranched polysaccharides) ประกอบด้วย monomer 2 ชนิด คือ D-mannuronic acid และ L-guluronic acid ซึ่งเป็น C-5 epimer มีโครงสร้างคล้ายกัน แตแตกตางกันที่ตำแหนงของหมูคารบอกซิล ซึ่งสงผลให โครงสรางแบบ block มีความแตกตางกันมาก พอลิเมอรของอัลจิเนตเกิดการเชื่อมตอของ monomer ดวยพันธะไกลโคซิดิก (1, 4) ที่คารบอนตำแหนงที่ 1 ของโมเลกุลหนึ่งกับคารบอนตำแหนงที่ 4 ของอีกโมเลกุลหนึ่ง (Imeson, 1997) กระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชั่นเกิดขึ้นโดยการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโซเดียมอัลจิเนตของ L-guluronic acid และแคลเซียมไอออน เกิดการก่อเจลและไขว้เชื่อมกลายเป็นแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งโครงสร้างภายในเป็นลักษณะคล้ายกล่องบรรจุไข่ (egg-box structure) ห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกไว้ภายใน แคลเซียมอัลจิเนตที่ได้จะไม่ละลายน้ำ มีลักษณะเป็นเจลเนื้อแข็งที่ทนต่อการกร่อน และไม่พองตัวง่ายในสภาวะกรด และจะทำหน้าที่กีดขวางและควบคุมการแพร่ของอนุภาคที่ถูกกักเก็บได้ดี ช่วยในการควบคุมอัตราการปลดปล่อยเซลล์โปรไบโอติก เพื่อให้มีอัตราการปลดปล่อยอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ ทำให้มีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการส่งผลดีแก่สุขภาพผู้บริโภค ช่วยกลบรสชาติ สี และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้ อัลจิเนตมีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โปรไบโอติก สามารถหาได้ง่าย และมีราคาถูก ดังนั้นการห่อหุ้มเซลล์จึงถูกนำมาใช้ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกเมื่อผ่านกรดที่มีค่าพีเอชประมาณ 2 ภายในกระเพาะอาหารของมนุษย์ (Kailasapathy, 2006) ดังนั้น

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนารูปแบบการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก เพื่อช่วยปกป้องการทำลายเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์

การตรวจเอกสาร

1. โปรไบโอติก (Probiotic)

โปรไบโอติก ตามความหมายขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ หมายถึง จุลชีพที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อเราบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมแล้ว จะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายเรา (FAO/WHO, 2002) อาหารเสริมโปรไบโอติกที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย โปรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ต่อร่างกาย เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลกติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะหลายชนิดซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2542)

1.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

1) สามารถสร้างกรดแลกติก และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2) สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al*., 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway *et al*., 1987) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่พีเอช 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al*., 1998) *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit, 1998) และ *Lactobacillus sake* (RM 10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่พีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000)

3) สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย เช่น ยา หรือแร่ธาตุบางตัว (Kontula *et al*., 1998) จากรายงานของ Shirota (1962) กล่าวว่า *Lactobacillus* ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูง ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus fermenti, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* Shirota ทนได้ที่ความเข้มข้น 2, 4, 10, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4) สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (Peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของเซลล์โปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้ จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993) สอดคล้องกับการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโปรไบโอติกพวก *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Lactobacillus pentosus* UK1A, *Lactobacillus pentosus* SK2A, *Enterococcus faecium* M74, *Enterococcus faecium* SF273 ในการแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทุกชนิดที่ทดสอบสามารถแย่งยึดเกาะผนังลำไส้กับเชื้อ *Clostridium perfringens* ได้ดี โดยสามารถลดอัตราการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของเชื้อ *C. perfringens* จาก 79.1 เป็น 53.7 เปอร์เซ็นต์ (Rinkinen *et al.,* 2003)

5) สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆ ดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

6) สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Fuller, 1993) สอดคล้องกับ Arihara และคณะ (1998) พบว่า *Lactobacillus gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกที่พบได้มากในทางเดินอาหารของคนและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อ *Staphylococcus aureus* รวมถึงลดการสร้าง enterotoxin ในระหว่างการหมักไส้กรอกได้ การหมักทำให้เกิดกรดแลกติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน ทำให้มีสภาวะไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

7) การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ โดยพบว่าใน *Lactobacillus* sp. ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง γ-globulin, γ-interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) เมื่อนำ *Lactobacillus casei* GG จากผลิตภัณฑ์นม หรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่าช่วยให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *L. casei* GG ที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียง 46 เปอร์เซ็นต์ (Kaila *et al*., 1992)

8) ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหารเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่างๆ ในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

9) ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น β-glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β-glucosidase (Renner and Münzner, 1991; Kontula *et al*., 1998; Naidu *et al*., 1999; Saarela *et al*., 2000)

10) แย่งอาหารของเชื้อก่อโรค (Fuller, 1993)

11) เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

12) สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง และวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ (Fuller, 1993)

13) ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดโดยพบว่า *L. acidophilus* บางสายพันธุ์ช่วยในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอล โดยการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้ได้ ซึ่งจากการแยกเชื้อ *L. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัคร 9 คน พบว่า *L. acidophilus* (O16) สามารถดูดซึมคอเลสเตอรอลได้มากที่สุด คือ 50.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ D5 จะดูดซึมได้น้อยที่สุดคือ 28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Buke and Gilliland, 1990)

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดให้เป็นโปรไบโอติก

เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดให้เป็นโปรไบโอติกโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งได้แก่ lactobacilli, streptococci, enterococci, lactococci, ไบฟิโดแบคทีเรีย ดังแสดงใน Table 1 ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สร้างกรดแลกติก ได้แก่ *Bacillus* spp. นอกจากนี้ยังมีเชื้อรา คือ *Aspergillus* spp. และเชื้อยีสต์ คือ *Saccharomyces* spp. (Gibson *et al*., 2000) สำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติกที่นำมาใช้กับมนุษย์โดยทั่วไป ได้แก่ lactobacilli เช่น *L. acidophilus, L. casei* และ *L. delbrueckii* โดยใช้ได้ทั้งในลักษณะ สปีชีส์เดียวกัน หรือผสมกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น และนอกจากนี้พบว่ายังมีไบฟิโดแบคทีเรีย เช่น *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* และ streptococci เช่น *Strepococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ lactococci เช่น *Lactococcus lactis* โดยส่วนใหญ่ใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ส่งผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยลดอาการของโรคโดยเฉพาะโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ โรคท้องร่วง โรคท้องผูก อาการอักเสบของลำไส้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ภาวะท้องอืดมีลมในกระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ภาวะกรดเกินในกระเพาะอาหาร กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การมีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดมากกว่าปกติ เป็นต้น (Gibson and Roberfroid, 1995)

1.2.1 ไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria)

ไบฟิโดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล Actinomycetaceae มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรีย แกรมบวก รูปร่าง curved rods และ bifid rod ลักษณะคล้ายอักษรตัว Y ดังแสดงใน Figure 1 นอกจากนี้ยังอาจพบรูปร่างแบบ branched หรือ straight rod และ Unbranched ได้อีกด้วย

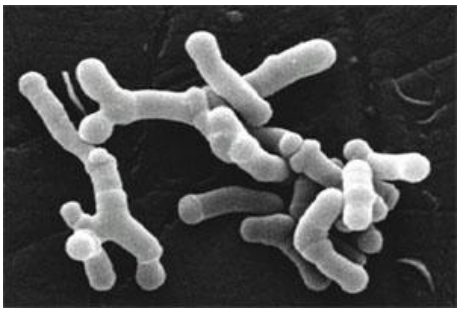


Figure 1. Bifidobacteria.

ที่มา: Schell และคณะ (2002)

Table 1. Examples of bacteria used as probiotics.

Lactobacilli	**Bifidobactria**	**Other**	**Yeast**
Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium animalis*	*Streptococcus thermophilus*	*Sacchromyces cerevisiae*
Lactobacillus casei	*Bifidobacterium longum*	*Enterococcus feacium*	*Sacchromyces Boulardi*
Lactobacillus ferciminis	*Bifidobacterium lactis*	*Lactococcus lactis*	
Lactobacillus gasseri	*Bifidobacterium infantis*	*Propionibacterium freudenreichii*	
Lactobacillus johnsonii	*Bifidobacterium breve*	*Escherichia coli* nessle 1971	
Lactobacillus plantarum	*Bifidobacterium bifidum*	*Bacillus oligonitrophilis*	
Lactobacillus reuteri,	*Bifidobacterium thermophilum*		
Lactobacillus rhamnosus GG	*Bifidobacterium adolescents*		
Lactobacillus salivarius			
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bugaricus*			
Lactobacillus brevis			
Lactobacillus cellobiosus			
Lactobacillus curvatus			
Lactobacillus fermentum			
Lactobacillus helviticus			

ที่มา: Penner และคณะ (2005)

เนื่องจากไบฟิโดแบคทีเรีย สามารถสร้างแลคเตสฟอร์เมต และเอธิลแอลกอฮอล์ โดยการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาล ซึ่งในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตของเชื้อนี้เพื่อให้

เกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆ นั้น จะมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการใช้สารได้ต่างกัน และทำให้เกิดผลิตผลในปริมาณที่ต่างกันด้วย

นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวแล้วเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียยังมีความสามารถในการทนต่อน้ำดี จึงเจริญอยู่ในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้ดีและทำให้เอนไซม์ β-galactosidase ที่เชื้อผลิตขึ้นนั้นสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ ทำให้ร่างกายสามารถนำแลคโตสไปใช้ได้และไม่ก่อให้เกิดอาการ lactose intolerance โดยผลที่เกิดขึ้นจะดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่น (พิณทิพย์ รัมภกาภรณ์ และ สุดสาย ตรีวาณิช, 2533)

1.2.2 *Lactobacillus plantarum* ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

L. plantarum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งตรงสั้นๆ ปลายมน กว้าง 0.9-1.2 ไมโครเมตร ยาว 3-8 ไมโครเมตร (Figure 2) สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง พบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ คู่ หรือ สายสั้นๆ โคโลนีลักษณะ นูน กลม ขอบเรียบ สีขาว เหลืองอ่อน หรือเหลืองหม่น ไม่ก่อโรค โดยปกติแล้วสามารถมีชีวิตรอดเมื่อผ่านน้ำลาย และกระเพาะอาหารของคน จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก โครงสร้างจีโนมของ *L. plantarum* มีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกชนิดอื่นๆ และทราบลำดับเบสทั้งหมดแล้ว การใช้เป็นโปรไบโอติกนั้น *L. plantarum* ได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้ทางด้านชีวบำบัดเพิ่มมากขึ้น

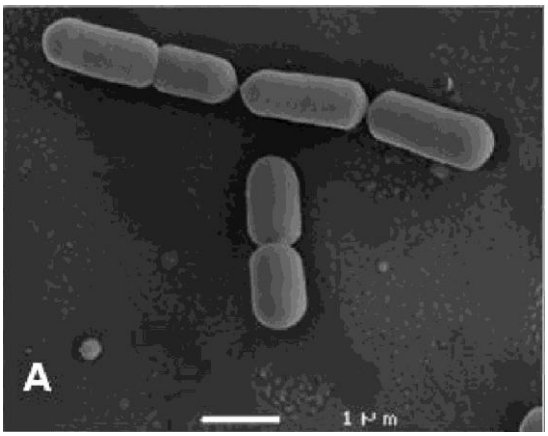


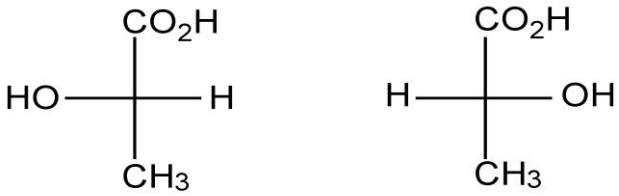
Figure 2. SEM analysis of *Lactobacillus plantarum.*

ที่มา: Bokhorst-van de Veen (2011)

L. plantarum เป็นแบคทีเรียประเภท facultative anaerobic หมายถึง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจนนั้น *L. plantarum* มีความสามารถในการเปลี่ยนออกซิเจนให้กลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่จะช่วยให้ *L. plantarum* มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงได้ ในทางกลับกันเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนสามารถรอดอยู่ได้ในกระบวนการหมักและเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลกติก หรือ

แอลกอฮอล์ (heterofermentative) ซึ่งกรดแลกติกที่ผลิตได้นั้นอยู่ในรูป D-isomer และ L-isomer ร่วมกัน ดังแสดงใน Figure 3 และนอกจากนี้ *L. plantarum* ยังสามารถเปลี่ยนเจลาตินให้เป็นของเหลวได้อีกด้วย

L. plantarum เป็นแบคทีเรียชนิดที่ใช้กันแพร่หลายในอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น โยเกิร์ต เนยแข็ง กิมจิ แตงกวาดอง กะหล่ำปลีดอง ไนจีเรียนโอกิ แป้งขนมปัง และน้ำปลา เป็นต้น เนื่องจากการนำ *L. plantarum* มาใช้อย่างกว้างขวางในอาหารทำให้สามารถเชื่อได้ว่า *L. plantarum* มีความเหมาะสมในการพัฒนาในด้านความเป็นโปรไบโอติกต่อไป



L(+) lactic acid **D(-) lactic acid**

Figure 3. Chemical structures of (D) and (L) lactic acid isomers.

ที่มา: Barron (2010)

L. plantarum เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดหนึ่งเนื่องจากมีผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ยืนยันว่า *L. plantarum* สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารและทนต่อสภาวะที่มีกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนต้น และเพิ่มจำนวนชั่วคราวอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยยึดเกาะอยู่บริเวณลำไส้เล็กและเยื่อบุลำไส้ใหญ่ ได้รับการทดสอบการนำมาใช้ในด้านการบรรเทารักษาโรคลำไส้อักเสบ และหลักฐานที่พบมากขึ้นชี้ให้เห็นว่า *L. plantarum* ส่งผลต่อการลดอาการปวดท้อง ท้องอืดและท้องเฟ้อลงได้ (Bixquert, 2009) นอกจากนี้ Nissen และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองแล้วพบว่า *L. plantarum* ช่วยเพิ่มความสมบูรณ์ให้กับลำไส้เล็ก ปรับปรุงกิจกรรมการย่อยจากเซลล์ในลำไส้เล็ก และยังช่วยกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Cammarota และคณะ (2009) ซึ่งพบว่า *L. plantarum* ชักนำให้เกิดการตอบสนองจาก pro-inflammatory เพื่อป้องกันการเกิดผื่นคัน และชักนำให้เกิดการตื่นตัวของระบบภูมิคุ้มกันในเยื่อบุลำไส้เล็กให้เพิ่มมากขึ้น ยิ่งกว่านี้ยังพบว่าการได้รับ *L. plantarum* เข้าสู่ร่างกายช่วยลดอาการของโรคในระบบทางเดินอาหารระหว่างที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Lonnermark *et al*., 2010) และในการทดลองแบบสุ่มจากคณะของ Karlsson (ประเทศสวีเดน) พบว่าการให้ผู้ป่วยโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือดได้รับ *L. plantarum* ที่ยังมีชีวิตเข้าสู่ร่างกายนั้น จะช่วยสร้างสมดุลเพิ่มความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียภายในลำไส้ของผู้ป่วยได้ (Karlsson *et al*., 2010)

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Danone Research Center จากประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยใช้หนูทดลองที่เป็นโรคหอบหืด (ovalbumin allergy) มารักษาด้วยการกิน *L. plantarum* ซึ่งผลที่ได้คือช่วยลดการตอบสนองต่อสารกระตุ้น Methacholine ซึ่งเป็นสารกระตุ้นที่ใช้ในการบ่งบอกถึงความรุนแรงของอาการหอบหืด (ถ้าผู้ป่วยตอบสนองต่อสาร Methacholine รวดเร็วมาก แสดงว่าอาการรุนแรงมาก), ช่วยลดจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เจอในน้ำล้างหลอดลม ช่วยลดแอนติบอดีที่จำเพาะกับโรค ovalbumin allergy อีกด้วย (Hougee *et al*., 2010) นอกจากนี้ *L. plantarum* ยังสามารถปกป้องเซลล์เยื่อบุจากโรคที่เกิดจาก *E. coli* โดยการป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุได้ (Qin *et al*., 2009)

Uraipan (2013) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ได้จากตัวอย่างเด็กทารกที่คลอดโดยวิธีผ่าตัด อายุ 5 เดือน ซึ่งรับประทานนมแม่ร่วมกับนมผง แล้วนำมาทดสอบความเป็นโปรไปโอติกเบื้องต้น โดยพบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระอาหาร (พีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง) เท่ากับ 92.29 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 มีความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ด้วย

1.3 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงแบคทีเรียแลกติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ รวมถึงความสามารถเจริญได้ในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลกติกได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc* (Wood and Holzapfel, 1997)

แบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกมีประโยชน์ในการช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสที่มีในผลิตภัณฑ์นม ช่วยสร้างวิตามินที่จำเป็น ได้แก่ วิตามิน B1, B2, B6, B12, niacin, folic acid และ pantothenic acid อีกทั้งช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยโปรตีน ช่วยควบคุมรักษาสมดุลในลำไส้และเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Rice, 2002) นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ สารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีดังนี้

1) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างขึ้น ระหว่างการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอน อาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียแลกติกจะมีปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมอยู่มาก เพราะแบคทีเรียแลกติกไม่มีเอนไซม์คะตะเลส การสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* typhimurium, *Escherichia coli* และ *Clostridium perfringens* (อรนุช อุตรภิชาติ, 2530)

2) Diacetyl (2,3-butanedione) เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแบคทีเรียแลกติกบางสปีชีส์ เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก ส่งผลทำให้มีกลิ่นที่ไม่น่ารับประทาน

3) Reuterin เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน สามารถละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งยีสต์ รา และโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย

4) Microgard สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลกติก

5) แบคเทอริโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ผลการยับยั้งต่างกันไปทั้งในด้านการทำลายกลไกการทำงาน (mode of action) และการทำลายคุณสมบัติทางเคมี ศรัลยา แพงไตร (2540) ได้แบ่งสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติก เป็น 2 ประเภทตามลักษณะผลการยับยั้ง โดยประเภทแรกคือ สารต่อต้านจุลินทรีย์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อที่สร้าง เช่น แบคทีเรียแลกติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด ประเภทที่สองสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่กว้างขึ้นโดยมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Clostridium botulinum* และ *Listeria monocytogenes*

1.4 การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

มนุษย์เรามีการนำเอาโปรไบโอติกมาใช้ในอาหารมาเป็นเวลานานกว่าหลายร้อยปีในหลายประเทศทั่วโลก อาหารที่มีส่วนประกอบของโปรไบโอติก เช่น นมเปรี้ยว นัตโต มิโสะ และเทมเป้ของประเทศญี่ปุ่น โยเกิร์ตและคีเฟอร์ของประเทศแถบยุโรป นมแพะหมักของอินเดีย ชีสด้า ซาวเคราท์ ซึ่งเป็นกะหล่ำปลีหมักของเยอรมันนี ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกนอกจากในรูปแบบที่เป็นส่วนที่ผสมอยู่ในอาหารแล้ว ในปัจจุบันยังมีอีกหลายรูปแบบเช่น แคปซูล ผงผสมกับเครื่องดื่ม ลูกอมหรือแม้แต่เครื่องดื่มหลากหลายประเภทที่มีการเติมแบคทีเรียโปรไบโอติกเข้าไป หากต้องการได้รับประโยชน์จากแบคทีเรียโปรไบโอติกสูงสุดแล้ว ควรรับประทานอาหารที่มี

แบคทีเรียโปรไบโอติก ร่วมกับพรีไบโอติกซึ่งเป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยในร่างกายคนเรา แต่จะเป็นอาหารที่ช่วยให้แบคทีเรียโปรไบโอติกมีการเจริญเติบโตและทำหน้าที่อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย อาหารที่เป็นแหล่งของพรีไบโอติก เช่น ธัญพืชต่างๆ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วดำ หน่อไม้ฝรั่ง กล้วย กระเทียม เป็นต้น

อาหารที่มีแบคทีเรียโปรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นประเภทนมหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมักเตรียมได้จากนมหลายชนิดอาจเป็นนมสด นมขาดมันเนย นมผงหรือนมข้นก็ได้ นำมาผ่านการโฮโมจีโนซ์เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลง แล้วนำมาฆ่าเชื้อด้วยการสเตอริไลซ์ แล้วหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์หรือทั้งสองชนิดร่วมกัน ในการหมักนมเกิดได้ 2 แบบ คือ เป็นการหมักที่ให้กรดเพียงอย่างเดียว กับคีเฟอร์เป็นการหมักที่ทำให้เกิดกรด ก๊าซ และแอลกอฮอล์ขึ้นเล็กน้อย หลักการของแบคทีเรียแลกติกในการหมักก็คือ การสร้างกรดแลกติกของกล้าเชื้อในการหมักให้มีพีเอชลดลง และทำให้เกิดการจับตัวของโปรตีนในนม เกิดเป็น curd คือทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวเกิดขึ้น อย่างเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* การผลิตโยเกิร์ตจะมีการหมักเกิดขึ้นภายในเวลา 4 ชั่วโมง ช่วงแรกของการหมัก streptococci จะเจริญอย่างรวดเร็ว และจะลดลงเมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.3-6.5 เป็น 5.5 แล้ว lactobacilli จะเจริญขึ้นในภายหลัง เมื่อสิ้นสุดการหมักผลิตภัณฑ์จะมีความเป็นกรดพีเอชประมาณ 4.5 และจำนวนเชื้อของแบคทีเรียแลกติกทั้งสองชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นประมาณ 0.90-0.95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการหมักที่ทำให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย คือ นมหมักที่เรียกว่า คีเฟอร์ ซึ่งเกิดจากการหมักนมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในการหมักแบบนี้จะประกอบด้วยแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ ที่ยึดเกาะกันเป็นเมือกเหนียว การอยู่ร่วมกันของกล้าเชื้อคีเฟอร์เป็นแบบ synbiotic ถ้าหากเชื้อคีเฟอร์อยู่ในน้ำนมจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ การหมักคีเฟอร์ที่เกิดจากยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจะทำหน้าที่ในการหมักนมให้เป็นสารประกอบหลายอย่าง ได้แก่ กรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์และเอธานอลเล็กน้อย และนอกจากนี้ยังจะได้สารที่มีกลิ่นหอม กลิ่นรสจากคีเฟอร์ จากนมต่างชนิดจะมีกลิ่นที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของนมที่จะใช้ในการหมัก องค์ประกอบของไขมันในนม องค์ประกอบของกล้าเชื้อในคีเฟอร์ ตลอดจนการใช้เทคโนโลยีในการผลิตในแต่ละครั้ง ซึ่งประโยชน์ที่ได้จากนมหมักที่เป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ได้แก่รักษาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร รักษาโรคภูมิแพ้ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ใช้เป็นอาหารของทารกได้ และยังมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย (Guzel-seydim *et al*., 2000; Beshkova *et al*., 2002) ปัจจุบันมีการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดต่างๆ ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์นมเสริมโปรไบโอติกให้มีความหลากหลายมากขึ้น ซึ่งผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้เป็น

ตัวกลางในการส่งผ่านแบคทีเรียโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เช่น อาหารสำหรับทารก เนยแข็ง เครื่องดื่มจากเวย์ ซุปผลไม้ น้ำผลไม้ และยังใช้ในด้านเภสัชกรรมหรือด้านการแพทย์ได้อีกด้วย สำหรับในปัจจุบันแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลกติก ในตระกูล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ได้รับความสนใจในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในแง่ของการเหลือรอดชีวิตของเซลล์ และประโยชน์ที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพ (Svensson, 1999) แต่เซลล์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต จะมีจำนวนลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ในขณะที่วางจำน่ายตามท้องตลาด (Shah *et al*., 1995) การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก ทำให้อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ได้นานเพียง 2 สัปดาห์ (ภวัต สังขะวัฒนะ, 2544)

การทำผักดอง เป็นการทำให้ผักสามารถเก็บไว้ให้บริโภคได้นาน โดยการนำมาแปรรูป และยังรวมไปถึงการนำผลไม้มาดองด้วย ซึ่งในการดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก ผักที่นิยมนำมาดองส่วนมากจะเป็นกะหล่ำปลี หอม แตงกวา หน่อไม้ เป็นต้น ส่วนผลไม้ที่นิยมใช้ในการดอง ได้แก่ มะขาม มะม่วง เป็นต้น ปัจจุบันการดองเป็นอุตสาหกรรมการค้าในประเทศไทยที่เป็นที่รู้จักของคนทั่วไป (Steinkraus, 1995)

การหมักเนื้อที่ใช้แบคทีเรียแลกติก เช่น แหนม ไส้กรอก ซึ่งแหนมเป็นการหมักที่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์อื่น เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการทำสั้น ไม่มีการทำให้แห้ง ผลิตจากเนื้อหมู หนังหมู ข้าวสุก กระเทียม และส่วนผสมอื่นๆ มาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วใส่ถุงพลาสติก ในปัจจุบันนิยมบรรจุลงในหลอดพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำในระหว่างการหมักมีกรดแลกติกเกิดขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดลง (Adams and Moss, 1995) ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วย ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ที่เกิดจากสารที่ผลิตจากกล้าเชื้อ หรือแบคทีเรียที่พบในแหนม เช่น แบคเทอริโอซิน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อนี้ จะทำให้มีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นานขึ้น แบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบทั่วไป ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก นอกจากนี้บางผลิตภัณฑ์ยังใช้ micrococcus ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเทรตซึ่งมีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความสวยงามขึ้น (Swetwiwathana *et al.,* 2009)

การหมักปลาเป็นการหมักที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ ปลาร้า ปลาส้ม หลักในการหมักจะประกอบด้วย ปลา เกลือ เช่น ในการผลิตน้ำปลาจะประกอบด้วยปลาและเกลือเท่ากับ 3:1 ผสมให้เข้ากันแล้วบรรจุใส่ในโอ่งแล้วปล่อยให้เกิดการหมัก 18 เดือนหรือมากกว่าก็ได้ ในระหว่างที่ทีการหมักปลา ปลาจะถูกย่อยสลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปลา ได้ผลผลิตเป็น

ของเหลวสีน้ำตาลออกมา ซึ่งของเหลวที่ออกมานี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน โปรตีน และนิวคลีโอไทด์ ที่จะทำให้น้ำปลามีคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้นและยังนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบ และถนอมอาหารหลายประเภท แบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมักได้แก่ *Lactobacillus farcimnis, L. pentosus, L. plantarum, Lactobacillus* sp. และ *Leuconostos* sp. จุลินทรีย์ที่ดีในผลิตภัณฑ์ปลาหมักต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อเกลือได้ดี และเจริญได้เล็กน้อยในระหว่างการหมัก จึงจะมีการช่วยเสริมรสชาติของการหมักได้เป็นอย่างดี

การหมักธัญพืชซึ่งเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมนำมาศึกษาการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักธัญพืชมีหลายกลุ่มด้วยกัน เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์จากการหมักธัญพืชได้แก่ ซีอิ๊ว ซึ่งจัดเป็นเครื่องปรุงรสในกลุ่ม ถั่วหมักของคนญี่ปุ่นในการหมักส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ได้แก่ *Aspergillus oryzae, Pediococcus halophillus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

2. พรีไบโอติก (Prebiotics)

Gibson และ Roberfroid (1995) ได้ให้คำนิยามว่า พรีไบโอติก คือ องค์ประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อย โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นสารอาหารกลุ่มนี้จึงผ่านระบบทางเดินอาหารไปสู่บริเวณลำไส้ใหญ่ในสภาพที่สมบูรณ์ และกลายเป็นอาหารของแบคทีเรียโปรไบโอติก จากการย่อยสารอาหารกลุ่มนี้จะได้สารบางชนิดที่เป็นประโยชน์ซึ่งร่างกายนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) และผลจากการย่อยยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในลำไส้ลดลง ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด อาหารที่มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ได้แก่ ธัญพืช ผัก ผลไม้

2.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

1) สามารถเคลื่อนไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อย และไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน (Fooks *et al.,* 1999; Kolida *et al.,* 2002; Gibson, 2004)

2) สามารถที่จะเกิดการหมักภายในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์แก่ร่างกาย เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* (Kolida *et al.,* 2002; Gibson, 2004)

3) ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* และไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น*Clostridium perfrigens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ได้ (Gibson and Roberfroid, 1995; Kolida *et al.,* 2002) ซึ่ง Gibson และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) และ อินูลิน ใน

อาสาสมัคร 100 โดยให้รับประทาน 5-20 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้นภายในลำไส้ของอาสาสมัคร

สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร สามารถเคลื่อนที่ไปจนถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อใช้เป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งสามารถใช้สารเหล่านี้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gibson, 2004) และส่งผลให้สุขภาพของเจ้าบ้าน (host) ดีขึ้น เช่น ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Lopez *et al*., 2000; Van *et al*., 1998) ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิดของสารพรีไบโอติกกลุ่มที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น แลคโตส แลคตูโลส แรฟฟีโนส สตาคีโอส และ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) และยังมีสารอื่นๆ ที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักโดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น ไบฟิโดแบคทีเรีย และ *Lactobacillus* ในลำไส้ใหญ่ คือ resistant starch (RS), non-starch polysaccharide (NSP) ทั้งนี้รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และไซแลน และนอกจากนี้ mucine glycoprotein ซึ่งผลิตโดย goblet cell ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้ เช่นกัน Lee และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของสารไคโตแซนโอลิโก-แซคคาไรด์ (COS) ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. และ *B. bifidum* พบว่า COS ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *B. bifidum* KCTC 3440 และ *Lactobacillus* sp.

2.2 ชนิดของสารพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่ขายทางการค้าและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอยู่ในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อย 2-20 มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) ซึ่งมีชื่อเรียกว่า พันธะไกลโคซิดิก พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่มีในธรรมชาติจะพบได้ในผักและผลไม้ เช่น กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง ในปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ทางการค้า และในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์

2.2.1 พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

2.2.1.1 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ดังแสดงรูปสูตรโครงสร้างใน Figure 4 เป็นโอลิโก-แซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ พบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากแลคโตส โดยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) เป็นกลุ่มโอลิโก-แซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharides) โดยเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อยแต่สามารถเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ที่อาศัย

อยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักจะเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวไทเรท และแก๊ซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังมีผลผลิตอื่น เช่น แลคเตส ซึ่งผลจากการย่อยกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์จะมีผลไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย และ lactobacilli ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ช่วยในการสังเคราะห์วิตามิน กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันการเกิดท้องเสีย

2.2.1.2 Fructo-oligosaccharides (FOS) และ อินูลิน

อินูลิน ดังแสดงรูปสูตรโครงสร้างใน Figure 4 เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหารซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุคโตโอลิโก-แซคคาไรด์มีฟรุคโตส (Fructose) 3-60 โมเลกุล พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรียและราบางชนิด ซึ่งอินูลินพบในผักและผลไม้มากกว่า 3,600 ชนิดโดยเฉพาะในผักตระกูล chicorium เช่น ชิคอรี (Chicory) นอกจากนี้ยังพบในกล้วย และพืชในตระกูลหอม เช่น หอมหัวใหญ่ กระเทียม เป็นต้น (Bxcommerce, 2001) อินูลินไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็ก แต่บางส่วนถูกย่อยในลำไส้ใหญ่โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ อินูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ละลายน้ำได้ดีโดยเฉพาะในน้ำร้อน (Tanya, 2002) อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Kim and Wang, 2002) แต่ละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็น และแอลกอฮอล์ (Paul, 1997) และมีความคงตัวสูง ไม่มีผลข้างเคียงต่อรสสัมผัสของอาหาร รสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่างๆ (Vicki, 2002) เช่น นำไปปรับปรุงรสชาติและเนื้อสัมผัส ช่วยรักษาความสดและความชื้นในเค้ก ช่วยให้เครื่องดื่มละลายเข้ากันดี มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional property)

2.2.1.3 ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharide, SOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในถั่วเหลืองซึ่งเป็นกลุ่ม แรฟฟีโนส และ สตาคีโอส (Gibson, 2004) สามารถทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรียได้ซึ่ง Hayakawa และคณะ (1990) ได้ศึกษาการหมักซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharides) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย มีการเจริญเพิ่มขึ้น

2.2.2 พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

2.2.2.1 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครสผลิต ดังแสดงสูตรโครงสร้างใน Figure 5 มาจากการรวมกันของแลคโตสและซูโครสโดยใช้เอนไซม์ β-fructofuronosidase และมีคุณสมบัติไปเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย ซึ่ง Ohkusa และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของแลคโตซูโครสใน

อาสาสมัคร 3 คนโดยให้ LS ปริมาณ 3 กรัมต่อวัน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรียได้ 0.7 เท่า และลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteriodes* ได้ 0.6 เท่า นอกจากนี้กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท และ บิวเทอเรท ยังมีปริมาณเพิ่มขึ้น

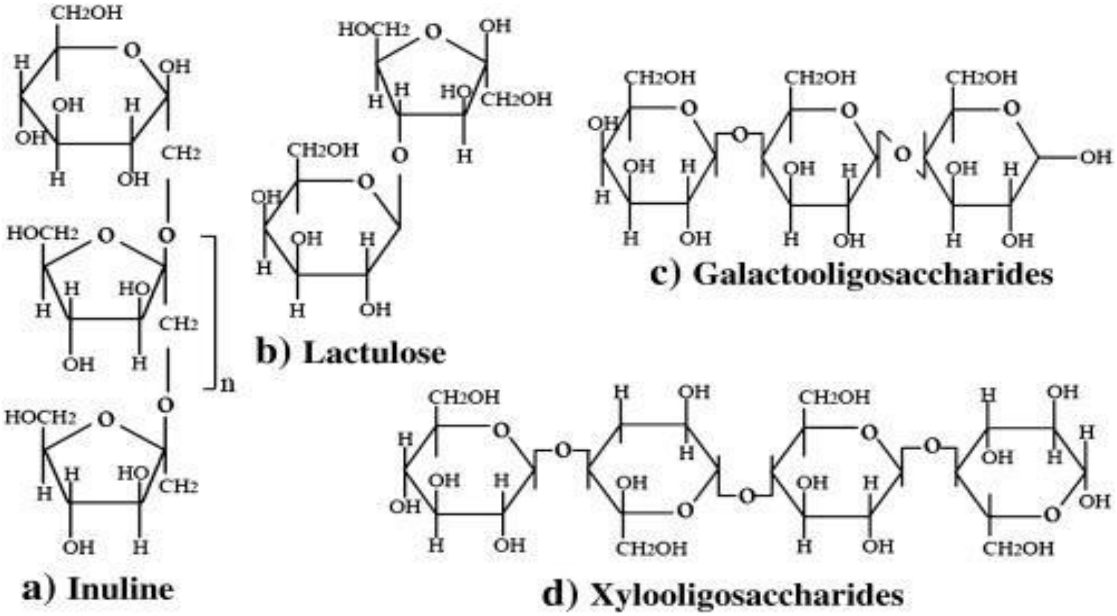


Figure 4. The structural formula of prebiotics a) inulin b) lactulose c) galactooligosaccharides and d) xylooligosaccharides.

ที่มา: Choque และคณะ (2011)

2.2.2.2 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลส ดังแสดงรูปสูตรโครงสร้างใน Figure 4 ผลิตจากน้ำตาลแลคโตส มีโครงสร้างอยู่ในรูป Gal β,1-4 Fru มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อย และไม่ละลายในอีเทอร์ ซึ่งแลคทูโลสจะไม่ถูกย่อยดูดซึมในลำไส้เล็กแต่จะเกิดการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ และมีผลให้จำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้เพิ่มขึ้น Terada และคณะ (1993) ศึกษาผลของแลคทูโลสต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่โดยให้แลคทูโลส 3 กรัมต่อวันในอาสาสมัคร 8 คน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียกลุ่มไบฟิโดแบคทีเรียเพิ่มขึ้นและแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น clostridia, bacteriodes และ streptococci ลดลง นอกจากนี้ Ballongue และคณะ (1997) ได้ศึกษาโดยการให้แลคทูโลส 10 กรัมต่อวันในอาสาสมัคร 2 คนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli เพิ่มขึ้น

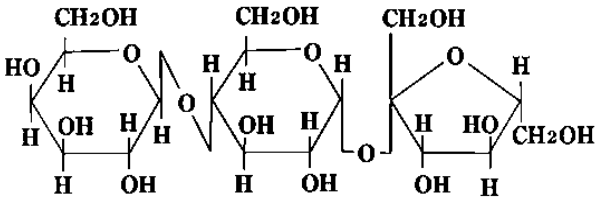


Figure 5. Chemical structures of lactosucrose.

ที่มา: Ohkusa และคณะ (1995)

2.2.2.3 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharide, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ถูกเปลี่ยนมาจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์ บางส่วนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก คือไอโซมอลโตส (Kolida *et al*., 2000) Olano-Martin และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกในลำไส้โดยทำการศึกษาในผู้ชาย 6 คน ที่มีสุขภาพแข็งแรงโดยให้ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณ 20 กรัมต่อวันพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย ซึ่งจากการศึกษาการหมักไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์กับแบคทีเรียแลกติกพบว่าสามารถผลิตบิวเทอเรทได้

2.2.2.4 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharides, GOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* หรืออาจสกัดมาจาก β-glucan จากต้นโอ๊กและได้มีการยอม รับว่าเป็น functional food และ GOS ถูกย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย ยกเว้น *Bifidobacterium bifidum* และถูกย่อยโดยจุลินทรีย์กลุ่ม bacteroides และ clostridia แต่ไม่ถูกย่อยด้วยกลุ่ม lactobacilli

2.2.2.5 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β,1-4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ดังแสดงรูปสูตรโครงสร้างใน Figure 4 สามารถถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์กลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย และ lactobacilli ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพิ่มขึ้นและจุลินทรีย์กลุ่ม bacteroides ลดลง

ในตลาดสากลมีการวางขายผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งมีชื่อทางการค้าเรียกแตกต่างกันไป (Table 2) และมีการใช้และจำหน่ายมากในประเทศญี่ปุ่นและในตลาดยุโรป เช่น กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีชื่อทางการค้า คือ โอลิโกเมท (oligomate) ที่ผลิตมาจากแลคโตส ซึ่งเป็นของเสียที่มีปัญหาในการกำจัดมากในอุตสาหกรรมนม โดยนำไปทำปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์ β-galactosidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น

Table 2. 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)

2.3 แหล่งของพรีไบโอติก

2.3.1 ธัญพืช

ธัญพืชที่สามารถตรวจพบสารพรีไบโอติก ได้แก่ ข้าว ถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น ในถั่วนั้นนิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีสารอาหารสูง มีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรตสูงเช่นเดียวกับข้าวโพดที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ แต่มีโปรตีนประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ประกอบด้วย โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์สายสั้นๆ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3-10 โมเลกุล เช่น ราฟฟิโนส มีโครงสร้างเป็น α-gal-(1-6)-α-glu-(1-2)-β-fru (Table 3) โดยมีคุณสมบัติเฉพาะตัว 2 อย่าง คือไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ องค์ประกอบหลักที่เป็นแหล่งคาร์บอนในพืชตระกูลถั่วมากมายหลายชนิด เช่น โอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส (raffinose family of oligosaccharides; RFOs) (Wang *et al*., 2002) โดยมี

คุณสมบัติเฉพาะ คือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ โดยทั่วไปถั่วมีส่วนประกอบของสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีนประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นในถั่วเหลืองจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าคาร์โบไฮเดรต และยังมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบอีก แตกต่างกันไปแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนมากแล้วองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตจะเป็นพวก soluble carbohydrates ดังแสดงใน Table 4 คาร์โบไฮเดรตในถั่วแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วย ราฟฟิโนส สตาคีโอส (stachyose) และเวอร์แบสโคส (verbascose) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) โดยคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่วจัดอยู่ในกลุ่มราฟฟิโนส (Hedley, 2001; Martinez-Villaluenga *et al*., 2005)

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) โดยได้นำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านอาหารเพื่อเป็นการปรับปรุงผิวสัมผัสของอาหาร เป็นสารเพิ่มความหนืดในด้านอุตสาหกรรรม 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) ซึ่งแบคทีเรียที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลี-แซคคาไรด์ชนิดนี้ได้ คือ *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Weissella* โดยสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจศึกษาสามารถผลิตฟรุคแตนชนิดอินนูลินซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(1, 2) และลีแวน (levan) ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(2, 6) (Monsan *et al*., 2001) โดยที่ HoPSs ทั้งกลูแคนและฟรุคแตนมีเอนไซม์ที่

เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ คือ glucosyltransferase และ fructosyltransferase ตามลำดับ และมีสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะในการผลิตคือน้ำตาลซูโครส

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

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 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบการเป็นพรีไบโอติกพบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากที่สกัดได้ทั้งหมดทนต่อการย่อยได้ดีมาก และเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. cibaria* A2 สามารถส่งเสริมการเจริญ *B. bifidum* ได้

Table 3. Structures of oligosaccharides found 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)

2.3.3 พืชหัวที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

นิรัญญา บุญติ้น (2550) นำสารสกัดเอทานอลจากพืชหัว 12 ชนิด คือ บีทรูท มันเทศสีส้ม หัวไชเท้า แครอท มันแกว มันเทศสีม่วงเปลือกแดง มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันขี้หนู มันเทศสีขาวเปลือกแดง เห้ว มันฝรั่ง และเผือก มาทดสอบต่อการทนการย่อยด้วยกรดที่พีเอช 1, 2 และ 3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีศักยภาพ

เป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยสารสกัดจากมันเทศสีขาวเปลือกแดง บีทรูท มันฝรั่ง และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มีปริมาณองค์ประกอบของสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยเหลืออยู่ 75.37, 84.25, 74.29 และ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถ ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* และ *Enterococcus faecium* โดยสามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum*ได้ดีที่สุด สามารถส่งเสริมการเจริญได้ถึง 4.01, 3.56, 2.88 และ 2.85 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากหัวบีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง มันเทศสีม่วงเปลือกแดง และมันฝรั่ง ตามลำดับ

Table 4. Concentrations of carbohydrate composition in legume species.

Legume species	Starch	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Verbascose	Fiber[1]	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

Fiber[1]: รวม insoluble และ soluble carbohydrates

ที่มา: Hedley (2001)

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) ต่อมาสถาบันวิทยาศาสตร์แห่งชาติ (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 ธัญพืชชนิดต่างๆ และรำข้าว ซึ่งจะให้ปริมาณเส้นใยอาหารที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ดังแสดงใน Table 5

Table 5. Comparison of total dietary fiber content in cereal grains.

Cereals	**Total dietary fiber (%, 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 การบริโภคเส้นใยจากผลไม้ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งมากกว่าเส้นใยจากแหล่งอื่นๆ เช่น เส้นใยจากธัญพืช เส้นใยจากผัก โดยมีเหตุผลสนับสนุนว่า

เส้นใยจากผลไม้มีสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณเล็กน้อย (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 โดยพบว่าเส้นใยที่ละลายน้ำและเส้นใยที่มีความหนืดสูงจะเป็นตัวช่วยลดระดับกลูโคสและคอเลสเตอรอล หลังรับประทานอาหารได้ดี ส่วนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำมีผลต่อการยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสี เนื่องจากเส้นใยมีองค์ประกอบของไฟเทต (phytate) อยู่ด้วย ดังนั้นแนวทางแก้ปัญหาในส่วนนี้ทำได้โดยกำจัดไฟเทตออกจากเส้นใยอาหารในระหว่างกระบวนการแปรรูป ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายมีการดูดซึมธาตุเหล็ก สังกะสี และแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

4. การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก

การทำไมโครเอนแคปซูเลชั่นเป็นวิธีการที่ใช้ในการปกป้องเซลล์โปรไบโอติกจากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรียและเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน โดยการห่อหุ้มหรือการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการไว้ในวัสดุห่อหุ้ม สารที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เช่น calcium alginate, sodium alginate, carageenan, cellulose acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น เทคนิคที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก แบบไมโคร-เอนแคปซูเลชั่น ได้แก่ เทคนิคเอ็กทรูชั่น (droplet method) และเทคนิคอิมัลชั่น (two phase system) ดังแสดงใน Figure 6

การห่อหุ้มเซลล์แบบไมโครเอนแคปซูเลชั่น นอกจากจะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกในทางเดินอาหารแล้ว ยังช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียจาก bacteriophages ซึ่งจากการทดลองของ Steenson และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลของการห่อหุ้มเซลล์

S. lactis C2 และ *S. cremoris* HP ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต จากนั้นเติมเซลล์ดังกล่าวที่ถูกห่อหุ้มในนมหมัก พร้อมกับการเติม lytic phages พบว่า *S. lactis* C2 และ *S. cremoris* HP ยังสามารถเจริญได้ในนมหมัก นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ยังช่วยเพิ่มการรอดชีวิตระหว่างการทำ freeze drying และการแช่แข็ง (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

4.1 เทคนิคเอ็กทรูชั่น (droplet method)

เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันโดยทั่วไปในการทำเม็ดเจลด้วยไฮโดรคอลลอยด์ ทำได้โดยการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ เช่น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์, สารละลายโซเดียมคลอไรด์ แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมกัน และใช้วิธีการปล่อยสารแขวนลอยของเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยด ลงไปในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) เช่น cellulose acetate phthalate (Rao *et al*., 1989), chitosan (Groboillot *et al*., 1993), gelatin (Hyndman *et al*., 1993), alginate (Kim *et al*., 2008) ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้และความสูงของการหยดสารแขวนลอยของเซลล์ลงในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว วิธีการนี้เป็นวิธีได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสภาวะที่ไม่รุนแรง เซลล์แบคทีเรียจึงมีอัตราการรอดชีวิตได้สูง (Krasaekoopt *et al.,* 2003)

4.2 เทคนิคอิมัลชั่น (two phase system)

เทคนิคนี้ใช้การเติม suspension ของเชื้อในน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่าหรือน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ส่วนผสมจะถูกตีปั่นจนอยู่ในรูป water-in-oil emulsion จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) ลงไป ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น hardening solution ขนาดของเม็ดเจลที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่น โดยแคปซูลที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร (Krasaekoopt *et al.,* 2003)

เนื่องจากมีความนิยมในการเสริมโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกโดยการห่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นการป้องกันเซลล์ จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์และกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร Chandramoulia และคณะ (2004) ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะที่ถูกน้ำย่อย พบว่า *L. acidophilus* CSCC 2400 ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่ถูกน้ำย่อย และจากการศึกษาการทนต่อกรด เกลือน้ำดีและความร้อนของแบคทีเรีย

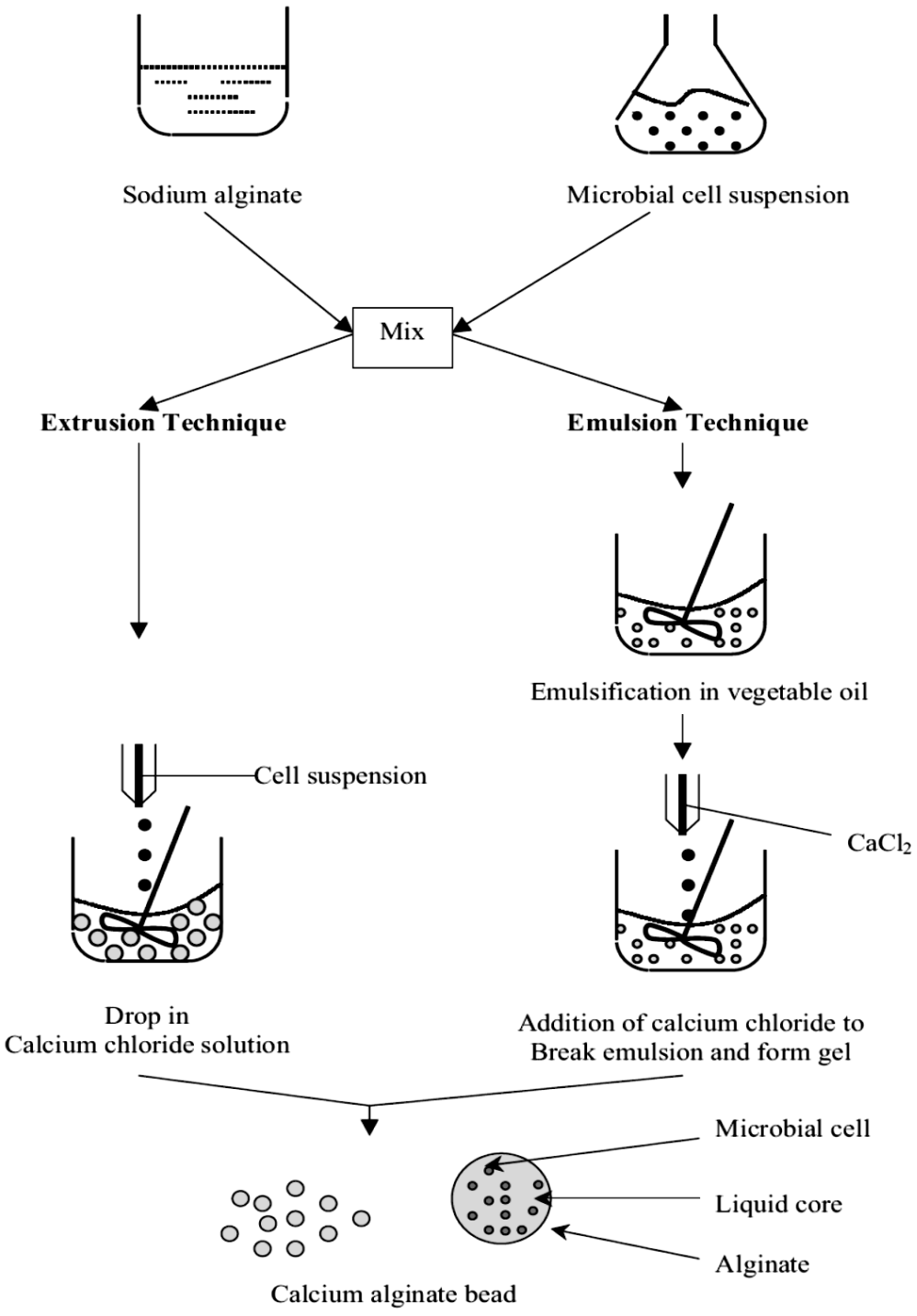


Figure 6. Microencapsulation (extrusion and emulsion).

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

โปรไบโอติก 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 พบว่าการห่อหุ้มเซลล์จะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะดังกล่าวได้ (Ding and Shah, 2007) นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับแหล่งคาร์บอนเช่นสารพรีไบโอติกสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียได้มากขึ้น จากการศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* สายพันธุ์ CSCC 2400 และ CSCC 2409 โดยการห่อหุ้มเซลล์ด้วย Hi-maize resistant starch พบว่าเซลล์ *L. acidophilus* ที่ถูกห่อหุ้มรอดชีวิตจากสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดี ได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วย Hi-maize resistant starch (Iyer and Kailasapathy, 2005)

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกเมื่อผ่านกระบวนการผลิต

การรอดชีวิตและกิจกรรมของโปรไบโอติกมีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรไบโอติก ต้องรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาซึ่งต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตน้อยที่สุด 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Ouwehand and Salminen, 1998) นอกจากนี้ต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารและต้องทนต่อการทำลายของเอนไซม์และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กซึ่งมีปัจจัยหลายด้านด้วยกันที่มีบทบาทต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก โดยสามารถสรุปได้ ดังนี้

4.3.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่างๆมีจำนวนมาก ทำให้ผู้บริโภคได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ การใช้ *S. thermophilus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ปริมาณออกซิเจนมาก จะช่วยป้องกัน ไบฟีโดแบคทีเรีย จากออกซิเจนในโยเกิร์ต (Lourens-Hattingh and Vilijoen, 2001) วิธีนี้มีประโยชน์ในการป้องกันการเป็นพิษของออกซิเจนในช่วงเริ่มต้นของการผลิตโยเกิร์ต

4.3.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นปัจจัยแรกที่ควรคำนึงถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นั้นสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว Bruno และ Shah (2002) ได้ศึกษาการเจริญ การรอดชีวิตและกิจกรรมของ *Bifidobacterium* spp. ในนมพร่องมันเนยที่มีส่วนประกอบของพรีไบโอติก โดยมีการใช้สารพรีไบโอติก 4 ชนิดเป็นองค์ประกอบคือ Hi-maize starch, lactulose, raftilose และ อินูลิน ในการหมักและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ นาน 4 สัปดาห์ พบว่า Hi-maize starch ส่งเสริมการเจริญและการรอดชีวิตดีที่สุด

Martenson และคณะ (2002) ศึกษาการเหลือรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus reutei* ATCC 55730, *L. acidophilus* DSM 20079 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 ในผลิตภัณฑ์ข้าวโอ๊ต (oat-based product) ซึ่งทำการหมักผลิตภัณฑ์ด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า *Lactobacillus reutei* ATCC 55730*, L. acidophilus* DSM 20079 และ *B. bifidum* DSM 20456 มีจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์ 10^8, 10^6 และ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Wang และคณะ (2002) ได้ศึกษาการเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ *Bifidobacterium infantis* CCRC14633, *B. longum* B6, *L. acidophilus* CCRC14079, *L. bulgaricus* CCRC14009 และ *Streptococcus thermophilus* CCR14085 ในน้ำนมถั่วเหลือง พบว่านมถั่วเหลืองส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* และ *S. thermophilus* และเมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงร่วมกัน 3 สายพันธุ์พบว่า เชื้อลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อหมักนมถั่วเหลืองที่ 25 องศาเซลเซียส และเมื่อเติมซูโครสลงไปเชื้อก็ลดลงอีก แต่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อเมื่อทำการหมักนมถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมซูโครสที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

4.3.3 พีเอช

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันก็ส่งผลให้เชื้อนั้นมีการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน Palmfeldt และ Hahn-Hagerdal (2000) ทำการเลี้ยง *L. reuteri* ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับก่อนทำแห้ง พบว่าที่ พีเอช 5.0 เซลล์มีการรอดชีวิตประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าที่พีเอช 6.0 ซึ่งรอดชีวิตประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

พีเอชที่ต่ำทำให้การรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกลดน้อยลง ในสภาวะที่เป็นกรด โปรไบโอติก 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 ซึ่งรอดชีวิตดีที่พีเอช 3.0 หรือมากกว่า และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่ม 3 ชั่วโมง แต่ *L. acidophilus* มีความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดมากกว่า *B. bifidum* และการเจริญของ *B. bifidum* จะช้าลงที่พีเอชประมาณ 5.0 แต่อย่างไรก็ตามการทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารของ *Bifidobacterium* นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

4.3.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงของเชื้อแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่า *Lactobacillus* มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญ 2-53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เซลล์ที่เจริญภายใต้อุณหภูมิไม่เหมาะสม จะทำให้เซลล์อ่อนแอ ความสามารถในการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์จะลดต่ำลงด้วย

4.3.5 ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเชื้อ

การเจริญของแบคทีเรียมี 4 ระยะ คือ log, lag, stationary และ death phase ซึ่งที่ระยะ stationary phase จะเกิดความหลากหลายทางกายภาพของเซลล์ โดยระยะที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ Corcoran และคณะ (2005) พบว่าที่ระยะ stationary phase เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง 31-50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระยะ log phase มีการรอดชีวิต 14 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะ lag phase เซลล์รอดชีวิตน้อยที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Mary และคณะ (1986) ซึ่งพบว่าเซลล์มีการรอดชีวิตสูงสุดที่ระยะ stationary phase และมีการรอดชีวิตของ *Sinorhizobium* และ *Bradyrhizobium* ที่เก็บตัวอย่างจากระยะ stationary phase มาทำแห้ง มีการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บจากระยะ log phase (Boumahdi *et al*., 1999)

4.3.6 สาร cryoprotectant

สาร cryoprotectant คือ วัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้เพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก สาร cryoprotectant ก็มีด้วยกันหลายชนิด ที่นิยมใช้ได้แก่ นมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ซูโครส เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้วัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์อย่างเหมาะสมจะทำให้โปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

Saarela และคณะ (2006) ศึกษาการใช้ ไฟเบอร์ของแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ต และอินูลิน เป็นตัวพยุงเซลล์ในการทำแห้งแบบ freeze-drying เปรียบเทียบกับการใช้ ซูโครสเป็นตัวพยุง พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* ที่ห่อหุ้มอยู่ในตัวพยุงที่เป็นไฟเบอร์ของข้าวโอ๊ตมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าตัวพยุงชนิดอื่น หลังจากผ่านการ freeze-drying

Michida และคณะ (2006) ได้มีการศึกษาการใช้ cereal extract และ cereal fiber ที่สกัดจากข้าวมอลต์และบาร์เล่ย์ มาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก เมื่อผ่านสภาวะในทางเดินอาหาร ผลปรากฏว่าเมื่อเซลล์อิสระ ผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 30 นาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร จะลดลงเหลือ 1.92 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับผล

ของเซลล์ที่มีการห่อหุ้มด้วยสารสกัดจากบาร์เล่ย์ 2 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะเดียวกันที่เวลา 180 นาที ปรากฏว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร จะลดลงเหลือ 6.5 log CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนผลการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ ในสภาวะน้ำดีนั้น เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 240 นาที ปรากฏว่าไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกให้เพิ่มมากขึ้น หรือลดจำนวนลง ส่วนเซลล์ที่มีการห่อหุ้มร่วมกับ barley extract 2 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะเดียวกันที่เวลา 240 นาที ปรากฏว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร จะเพิ่มขึ้นเป็น 7.72 log CFU ต่อมิลลิลิตร

Sultana และคณะ (2000) ได้ศึกษาการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้งข้าวโพด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก แล้วเติมลงในโยเกิร์ต หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปเซลล์อิสระจะมีลดลงประมาณ 1 log cycle ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีการห่อหุ้มมีจำนวนลดลงประมาณ 0.5 log cycle

4.3.7 อุณหภูมิและภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น และภาชนะที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์ มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์ โดยต้องไม่มีการแพร่ผ่านของออกซิเจนและความชื้น Dave และ Shah (1997) พบว่าการบรรจุโยเกิร์ตในขวดแก้วจะปรับปรุงการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* มากกว่า 35 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. acidophilus* ที่รอดชีวิตในโยเกิร์ตที่บรรจุในถ้วยพลาสติก ปริมาณออกซิเจนที่อยู่ในขวดแก้วจะต่ำ แต่ในขณะที่โยเกิร์ตในถ้วยพลาสติกจะมีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจน โดยปริมาณออกซิเจนที่ต่ำนำมาสู่การรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก

4.4 ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก

ปัจจัยในการห่อหุ้มที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก สามารถแบ่งออกได้หลายปัจจัยคือ

4.4.1 วิธีการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์แบ่งเป็น 2 วิธีคือ เทคนิคเอ็กทรูชั่น (extrusion technique) และ เทคนิคอิมัลชั่น (emulsion technique) นอกจากขั้นตอนในการทำของทั้งสองวิธีจะต่างกันแล้วยังพบข้อดีและข้อด้อยในการห่อหุ้มเซลล์ของทั้งสองวิธี ดังแสดงใน Table 6

Table 6. 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)

4.4.2 วัสดุตัวพยุง

วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น อัลจิเนต, cellulose acetate phthalate, gum arabic เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพยุงที่แตกต่างกันก็จะมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ต่างกัน Rao และคณะ (1989) ศึกษาการรอดชีวิตของ *B. pseudolongum* ที่ห่อหุ้มด้วย cellulose acetate phthalate โดยใช้เทคนิคอิมัลชั่นพบว่า *B. pseudolongum* ที่ถูกห่อหุ้มรอดชีวิตได้มากกว่าเซลล์อิสระที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วย cellulose acetate phthalate ในสภาวะที่มีน้ำย่อย นอกจากนี้การใช้อัลจิเนตมีความเหมาะสมในการห่อหุ้มแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactabacillus* ได้แก่ *L. acidophilus, L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. plantarum* เป็นต้น แบคทีเรีย *Bifidobacterium* ได้แก่ *B. longum* และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus* ได้แก่ *S. thermophillus*, *S. lactis* เป็นต้น วัสดุพยุงชนิดอื่นๆ เช่น แคปปา-คาราจีแนน เหมาะต่อการห่อหุ้มแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. thermophillus* และ *L. lactis, L. casei* เป็นต้น แต่การใช้แคปปา-คาราจีแนนเพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย *B. longum*

4.4.3 ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ใช้

ระดับความเข้มข้นของตัวพยุง เมื่อใช้อัลจิเนตในการห่อหุ้มแบคทีเรีย Lee และ Heo (2000) ที่ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *B. bifidum* ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตพบว่าเมื่อบ่มเม็ดเจลในสภาวะกรดในทางเดินอาหาร แบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเจลที่ใช้วัสดุตัวพยุงที่ความเข้มข้นสูงมีการรอดชีวิตได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ต่ำกว่า โดยพบว่าที่อัลจิเนตความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียภายในเม็ดเจลมีการรอดชีวิตได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเม็ดเจลมาบ่มในสภาวะกรดในทางเดินอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ความเข้มข้นของอัลจิเนตยังมีผลต่อขนาดของเม็ดเจล โดยถ้าอัลจิเนตมีความเข้มข้นมากเม็ดเจลจะมีขนาดที่เล็กลง

4.4.4 ขนาดของเม็ดเจล

จากการศึกษาความแตกต่างของขนาดเม็ดเจลต่อความสามารถในการรอดชีวิตของโปรไบโอติก พบว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตยังมีผลต่อขนาดของเม็ดเจลโดยถ้าอัลจิเนตมีความเข้มข้นมากเม็ดเจลจะมีขนาดที่เล็กลง จากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (2004) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* CSCC 2400 และ *L. acidophilus* CSCC 2409 โดยใช้อัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอช 6.9 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้เชื้อ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เตรียมเม็ดเจลให้มีขนาดต่างๆ กัน คือ 200, 450, 1000 ไมโครเมตร พบว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้น โดยเม็ดเจลขนาด 1000 ไมโครเมตร ทำให้เชื้อแบคทีเรียรอดชีวิตจากกรดที่มีพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมงได้มากที่สุดรองลงมาคือเม็ดเจลขนาด 450 และ 200 ไมโครเมตร ตามลำดับ

4.4.5 จำนวนเซลล์เริ่มต้น

จากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (2004) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* CSCC 2400 และ *L. acidophilus* CSCC 2409 โดยใช้อัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอช 6.9 และใช้เชื้อความเข้มข้นต่างๆ คือ 10^7, 10^8 และ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นที่ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ลดลงหลังจากบ่มในกรดพีเอช 2.0 เวลา 3 ชั่วโมง เป็น 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในขณะที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^7 และ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองต่ำเกินไปคือที่ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 7

Table 7. Effect of cell load on viability of encapsulated *L. acidophilus* CSCC 2400 bacteria in simulated gastric condition (pH 2 for 3 h at 37 °C).

Initial cell load	**simulated gastric condition**	
(CFU/ml)	**0 h**	**3 h**
10^7	$4.1\pm1.0 \times 10^7$	$1.2\pm1.8 \times 10^5$
10^8	$2.2\pm1.3 \times 10^8$	$7.8\pm2.4 \times 10^5$
10^9	$3.5\pm0.9 \times 10^9$	$6.1\pm1.1 \times 10^6$

ที่มา: Chandramouli และคณะ (2004)

4.4.6 เวลาในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นเป็นสารละลายที่ช่วยในการแข็งตัวหรือการขึ้นรูปเม็ดเจล ซึ่งจากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (2004) ได้ทดลองโดยแช่เม็ดเจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียในเม็ดเจลที่ทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เวลา 30 นาทีหรือมากกว่า 30 นาที มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 5 นาที ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้จากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

4.4.7 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

สายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการห่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาของ Grosso และ Fávaro-Trindade (2004) เมื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *B. lactis, S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่ผ่านการห่อหุ้มและเติมลงในโยเกิร์ตที่เก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 28 วัน *S. thermophilus* และ *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* สามารถมีชีวิตรอด 1.8×10^6 และ 8.7×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการรอดชีวิตของ *B. lactis* แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มีการรอดชีวิตแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์นั้นๆ ก่อนการห่อหุ้มเซลล์จึงควรศึกษาถึงลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่จะนำมาใช้ด้วย นอกจากนี้ควรเลือกวัสดุตัวพยุงให้เหมาะสมกับเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิตให้กับแบคทีเรียเช่นกัน และจากการศึกษาของ Ding และ Shah (2007) ได้ศึกษาการทนต่อกรด น้ำดีและความร้อน พบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มจะมีความสามารถในการทนต่อกรด น้ำดีและความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม

วัตถุประสงค์

1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ทนต่อสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารได้สูงสุด หลังการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น
2) เพื่อคัดเลือกเส้นใยจากพืชหัวที่ใช้ร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น แล้วส่งผลต่อการช่วยการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกเมื่อผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารได้สูงสุด
3) เพื่อศึกษาความสามารถของเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น ในการทนต่อสภาวะเลียนแบบกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่องที่ระยะเวลาต่างๆ
4) การศึกษาความสามารถของเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น ในการรอดชีวิตภายใต้สภาวะบางประการในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

2.1 แบคทีเรียโปรไบโอติก

2.1.1 *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

2.1.2 *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034

2.1.3 *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5

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

Lactobacillus plantarum CIF17 A5 ได้รับจาก ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งแยกมาจากอุจจาระของเด็กทารกเพศชายอายุ 5 เดือน

2.2 พืชที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดพรีไบโอติกและเส้นใย

2.2.1 มันเทศสีม่วงเปลือกแดง (*Ipomonea batatas* (Linn.) Poir)

2.2.2 บีทรูท (*Beta vulgris*)

2.2.3 มันฝรั่ง (*Solanum tubrosum* Linn.)

2.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
1. HCl 37%	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

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
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. Glacial acetic acid 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. Lactic acid	Fluka/ Analytical/ Germany
17. Citric acid	Fluka/ Analytical/ Germany
18. Sucrose	Ajex Finechem/ Analytical/ Australia
19. Skim milk	Fluka/ Analytical/ Germany

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
6. ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ	Scientific promotion/
7. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation)	Büchi Rotavapor® R-200/205, Switzerland
8. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy/ Japan
9. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo/ Thailand
10. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	LabMate/ USA
11. ไมโครปิเปต (ขนาด 1000ไมโครลิตร)	Gilson/ France

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
12. ไมโครปิเปต (ขนาด 1000ไมโครลิตร)	Gilson/ France
13. ไมโครปิเปต (20-200 ไมโครลิตร)	LabMate/ USA
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert/ USA
15. Peristaltic pump BT00-300T	China
16. กรวยกรอง	-
17. กระดาษกรองเบอร์ 4	Advantec/Japan

2.5 วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก

2.5.1.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์

นำแบคทีเรียแลกติกมาทำการเจือจางแบบ serial ten-fold dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยแบคทีเรียที่ผ่านกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้เจือจางจนได้ระดับความเข้มข้น 10^2 ถึง 10^4 และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านกรดให้เจือจางจนได้ระดับความเข้มข้น 10^6 ถึง 10^8 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยเทคนิคการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar หลอมเหลว ที่มีการเติม bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ รอจนอาหารแข็งตัว แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (นับจำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร

2.5.1.2 การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์

ชั่งเม็ดเจล 1 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 10 นาที จนกระทั่งมีการละลายของเม็ดเจลทั้งหมด แล้วเจือจาง suspension ของเซลล์ที่ได้แบบ serial ten-fold dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เจือจางจนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมนับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจล โดยเทคนิคการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar หลอมเหลว ที่มีการเติม bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ รอจนอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (นับจำนวนโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร

2.6 วิธีการวิจัย

2.6.1 คัดเลือกสายพันธุ์โปรไบโอติกที่ทนต่อสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารได้สูงสุดหลังการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น

2.6.1.1 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติกเริ่มต้น

นำแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ (*L. plantarum* TISTR 875, *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* CIF17 A5) จาก stock เชื้อ มา 0.1 มิลลิลิตรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน ถ่ายเชื้อ 5.0 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ นับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดย เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar หลอมเหลว รอจนอาหารแข็งตัว แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร

2.6.1.2 การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก

ห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Sultana และคณะ (2000) โดยเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ คือ *L. plantarum* TISTR 875, *L. acidophilus* TISTR และ *L. plantarum* CIF17 A5 โดยใช้ตะกอนเซลล์ที่เตรียมจากข้อ 2.6.1.1 ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอช 6.9 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาณเชื้อ 10^9-10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร (N_0) ทำการโฮโมจิไนซ์ให้อยู่ในรูป water-in-oil emulsion โดยการเติมน้ำมันปาล์มปริมาตร 125 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยเครื่องกวนโดยใช้ความเร็ว 800 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไปอย่างรวดเร็ว ยกลงจากเครื่องกวน วางพักไว้จนกระทั่งเม็ดเจลใน แคลเซียมคลอไรด์เกิดการแยกชั้น โดยที่น้ำมันลอยมาอยู่ชั้นบนสุด ชั้นแคลเซียมคลอไรด์และชั้นของเม็ดเจลอยู่ชั้นล่างสุด ดูดชั้นน้ำมันออก จากนั้นนำเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วนำตะกอนเม็ดเจลที่ได้มาล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกลืออยู่ 0.85 เปอร์เซ็นต์และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมีค่าพีเอช 7.0 แล้วเก็บเม็ดเจลในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกลืออยู่ 0.85

เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาในขั้นต่อไป ทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตโดยชั่งเม็ดเจล 1 กรัม มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยใช้ vortex จนกระทั่งได้เป็นสารละลายเป็นเนื้อเดียว เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar หลอมเหลว รอจนอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเม็ดเจล (N) ทำการคำนวณหา encapsulation yield (EY) ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการห่อหุ้มและการรอดชีวิตของเซลล์ระหว่างกระบวนการห่อหุ้มโดยใช้สูตร (Annan *et al*., 2008)

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

เมื่อ N คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายหลังกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)

N_0 คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นก่อนกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)

2.6.1.3 ผลของสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารต่อการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม

นำเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มในข้อ 2.6.1.2 และเซลล์อิสระ มาผ่านสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีเอนไซม์เปปซินอยู่ด้วย 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 2.0) นาน 0 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกเม็ดเจลออกจากสารละลายกรดโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนเม็ดเจลมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 โดยใช้ vortex แล้วนับจำนวนเซลล์ที่เหลือหลังการผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารเรียบร้อยแล้วโดยทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับการเจือจางที่เหมาะสมแล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar หลอมเหลว ที่มีการเติม 0.004 เปอร์เซ็นต์ bromocresol purple รอจนอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ให้ผลการรอดชีวิตสูงสุด เมื่อถูกห่อหุ้ม และผ่านกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 2.5.2 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการผ่านกรด (CFU ต่อมิลลิลิตร)}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น (CFU ต่อมิลลิลิตร)}} \times 100$$

2.6.1.4 การศึกษาขนาดของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกด้วย Masterzier 2000

นำเม็ดเจลที่ห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกมาศึกษาการกระจายขนาดของเม็ดเจล โดยใช้เครื่อง Mastersizer Hydro-2000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) ซึ่งเป็นเครื่องวิเคราะห์หาขนาดของอนุภาค โดยให้แสงเลเซอร์ส่องผ่านอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายตัวกลาง ความเข้มของแสงที่เกิดการเลี้ยวเบนมีความสัมพันธ์กับปริมาณของอนุภาคในแต่ละขนาด แต่มุมเลี้ยวเบนกลับเป็นสัดส่วนผกผันกับขนาดของอนุภาค โดยใช้เม็ดเจล 5 กรัม แขวนลอยอยู่ในน้ำบริสุทธิ์ 1000 ต่อมิลลิลิตร ส่งผ่านเข้าไปใน อนุภาคเม็ดเจลที่แขวนลอยอยู่จะถูกส่งผ่านโฟลเซลล์ (flow cell) ตัวอย่างจะถูกวัดและคำนวณผล พร้อมกับบันทึกผลการวัดโดยอัตโนมัติด้วยโปรแกรม Mastersizer-s รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของขนาดอนุภาค (% Distribution)

2.6.2 การใช้เส้นใยจากพืชหัวร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกเมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มและรอดชีวิตมากที่สุดเมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง จากการทดลองข้อที่ 2.6.1 โดยการนำเซลล์ที่คัดเลือกได้ มาทำการศึกษาผลของการใช้เส้นใยจากพืชหัวร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกเมื่อผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร

2.6.2.1 การเตรียมเส้นใยจากพืชหัว

นำพืชหัวทั้ง 3 ชนิด (มันเทศสีม่วงเปลือกแดง, บีทรูท และมันฝรั่ง) เลือกหัวที่ยังสดมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นลูกเต๋าชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการปั่นเนื้อพืชหัวสดที่หั่นได้ให้ละเอียดด้วยเครื่องบดด้วยกำลังสูงสุดนาน 10 นาที จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากการบดละเอียดมาทำการกรอง เอาน้ำที่ได้จากการกรองด้วยผ้าขาวบางหนา 6 ชั้น จะได้ของเหลวที่มีลักษณะข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.6.2.2 การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกร่วมกับเส้นใยจากพืชหัวด้วยเทคนิคอิมัลชั่น

นำแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกจากข้อ 2.6.1 มามาเลี้ยงเพื่อเตรียมเชื้อเริ่มต้นใช้ตะกอนเซลล์ที่เตรียมได้ตามข้อ 2.6.1.1 มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอช 6.9 ปริมาตร 25 ต่อมิลลิลิตร โดยให้มีปริมาณเชื้อ 10^{9}-10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วเติมน้ำมันปาล์มปริมาตร 125 ต่อมิลลิลิตร พร้อมกับเติมเส้นใยจากพืชหัวที่เตรียมจากข้อ 2.6.2.1 ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ต่อปริมาตร จากนั้นโฮโมจิไนซ์ให้อยู่ในรูป water-in-oil

emulsion ด้วยเครื่องกวนโดยใช้ความเร็ว 800 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เติมสารละลายแคลเซียม-คลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงไปอย่างรวดเร็ว ยกลงจากเครื่องกวน วางพักไว้จนกระทั่งเม็ดเจลในแคลเซียมคลอไรด์เกิดการแยกชั้น โดยที่น้ำมันลอยมาอยู่ชั้นบนสุด ชั้นแคลเซียมคลอไรด์และชั้นของเม็ดเจลอยู่ชั้นล่างสุด ดูดชั้นน้ำมันออก จากนั้นนำเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วนำตะกอนเม็ดเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกลืออยู่ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมีค่าพีเอช 7.0 ล้าง 2 ครั้ง ชั่งเม็ดเจล 1 กรัม มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 โดยใช้ vortex นับจำนวนเซลล์โดยการ pour plate บนอาหารแข็ง MRS agar หลอมเหลว ที่มีการเติม 0.004 เปอร์เซ็นต์ bromocresol purple รอจนอาหารแข็งตัว แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตภายหลังการห่อหุ้ม จากนั้นชั่งเม็ดเจลมา 1 กรัม และเซลล์อิสระมาผ่านสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ที่มีเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแยกเม็ดเจลออกจากสารละลายโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำเม็ดเจลมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 โดยใช้ vortex นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต โดยการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar หลอมเหลว ที่มีการเติม 0.004 เปอร์เซ็นต์ bromocresol purple รอจนอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะคัดเลือกชนิดของเส้นใยจากพืชหัวที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มรอดชีวิตมากที่สุดหลังการผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างเซลล์อิสระ กับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยพืชหัวหรือสารพรีไบโอติกฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มโดยไม่ใช้เส้นใยหรือสารพรีไบโอติก

2.6.3 ผลของปริมาณเส้นใยจากพืชหัวที่ใช้ร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกเมื่อผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร

จากการทดลองข้อที่ 2.6.1 และ 2.6.2 ซึ่งคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโปรไบโอติก, เส้นใยจากพืชหัวที่ทำให้เซลล์ที่ห่อหุ้มแล้วมีชีวิตรอดมากที่สุดหลังการผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร จากนั้นจะศึกษาผลของความเข้มข้นของพรีไบโอติกหรือเส้นใยจากพืชหัวต่อการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มหลังการผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร โดยเริ่มจากการเตรียมเซลล์เริ่มต้นเหมือนข้อ 2.6.1.1 ทำการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมเส้นใยจากพืชหัว หรือสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยมีวิธีทำเหมือนข้อ 2.6.2.2 โดยใช้เส้นใยจากพืชหัวที่ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ

สารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก จากนั้นนับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจลหลังการห่อหุ้มเซลล์เหมือนข้อ 2.6.1.2 และนำเม็ดเจลที่ได้มาผ่านสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ที่มีเอนไซม์เปปซินอยู่ด้วย 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 3 ชั่วโมง (ทำการทดลองควบคู่กับการทดลองที่ใช้เซลล์อิสระ) เหมือนข้อ 2.6.1.3 จากนั้นจะคัดเลือกเปอร์เซ็นต์ของเส้นใยจากพืชหัวที่ทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มรอดชีวิตมากที่สุดหลังการผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร และนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองข้อ 2.6.4 ต่อไป

2.6.4 การรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยจากพืชหัวด้วยเทคนิคอิมัลชั่นในการทนจากสภาวะเลียนแบบกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง

ทำการศึกษาผลของการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากพืชหัวในข้อ 2.6.3 ต่อการรอดชีวิตในสภาวะที่มีกรดสูง และเกลือน้ำดีแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มจากการเตรียมเซลล์เริ่มต้น (2.6.1.1) ทำการห่อหุ้มเซลล์แบบอิมัลชั่นโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจลหลังการห่อหุ้มเซลล์เหมือนข้อ 2.6.1.2 และนำเม็ดเจลที่ได้มาผ่านสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร เหมือนข้อ 2.6.1.3 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง มานับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีข้อ 2.5.1.2

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยนำเม็ดเจลที่ผ่านสภาวะเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารนาน 3 ชั่วโมงแล้ว มาผ่านเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเอนไซม์ pancreatin 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง มานับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีข้อ 2.5.1.2

2.6.5 ผลขององค์ประกอบในอาหารที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากพืชหัวในระหว่างการเก็บรักษา

ทำการศึกษาผลของการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากพืชหัวในข้อ 2.6.3 ต่อการรอดชีวิตในสภาวะสภาวะบางประการในกระบวนการผลิต โดยเริ่มจากการเตรียมเซลล์เริ่มต้น (2.6.1.1) ทำการห่อหุ้มเซลล์แบบอิมัลชั่นโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หรือสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ในเม็ดเจลหลังการห่อหุ้มเซลล์เหมือนข้อ 2.6.1.2

2.6.5.1 ผลของปริมาณเกลือต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นำเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร หรือเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม 1 กรัม ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือแกงโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 4, 7 และ 14 วัน นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีข้อ 2.5.1.2 โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างเซลล์อิสระ กับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยหรือพรีไบโอติกจากพืชหัว หรือสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิต่ำ

2.6.5.2 ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นำเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร หรือเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม 1 กรัม ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS มีการเติมน้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ให้มีความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 4, 7 และ 14 วัน นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีข้อ 2.5.1.2 โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างเซลล์อิสระ กับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยหรือพรีไบโอติกจากพืชหัว หรือสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

2.6.5.3 ผลของปริมาณ skim milk ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นำเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร หรือเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม 1 กรัม ถ่ายลงในอาหารเหลว skim milk ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 4, 7 และ 14 วัน นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีข้อ 2.5.1.2 โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างเซลล์อิสระ กับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยหรือพรีไบโอติกจากพืชหัว หรือสารพรีไบโอติก ฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์

2.6.5.4 การรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาในอาหารปรับกรดที่อุณหภูมิต่ำ

นำเซลล์อิสระ 1 มิลลิลิตร หรือเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม 1 กรัม ถ่ายลงในอาหารเหลวที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 4.5 ด้วยกรดชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl), กรดแลกติก

($C_3H_6O_3$), กรดอะซีติก ($C_2H_4O_2$), และกรดซิตริก ($C_6H_8O_7$), และอาหารเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการปรับค่าพีเอช เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 4, 7 และ 14 วัน นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตตามวิธีข้อ 2.5.1.2 โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยหรือพรีไบโอติกจากพืชหัว หรือสารพรีไบโอติกฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์

2.6.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ใช้การประมวลผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม SPSS (Statistical Packages for the Social Science) โดยข้อที่ 2.6.1-2.6.4 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 ผลได้จากกระบวนการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยอัลจิเนตโดยเทคนิคอิมัลชั่น

เมื่อนำแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 875, *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มเซลล์ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตโดยใช้เทคนิคอิมัลชั่น พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตภายหลังกระบวนการห่อหุ้ม หรือมีผลได้จากกระบวนการห่อหุ้มสูงสุดคือ 99.63 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 มี encapsulation yield ในการห่อหุ้มเท่ากับ 89.29 และ 87.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 8

Table 8. Encapsulation yield of probiotic cells encapsulated in alginate microspheres.

Probiotic strains	Log CFU/ml		Encapsulation yield
	Initial	After encapsulated	(%)
L. acidophilus TISTR 1034	9.38±0.03	8.37±0.02	89.29[b]
L. plantarum TISTR 875	9.55±0.06	8.39±0.02	87.86[c]
L. plantarum CIF17 A5	9.09±0.02	9.06±0.02	99.63[a]

Data were mean values of triplicate determination ± standard deviation

Mean within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p<0.05$)

3.2 ขนาดของเม็ดเจล ที่ได้จากการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ด้วยอัลจิเนตโดยเทคนิคอิมัลชั่น

ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น ดังแสดงใน Figure 7 พบเม็ดเจลขนาดเล็กกว่า 142.2 ไมโครเมตร มีอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 406.6 ไมโครเมตร มีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และอนุภาคที่เล็กกว่า 871.1 ไมโครเมตร มีอยู่ 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตร เท่ากับ 463.1 ไมโครเมตร

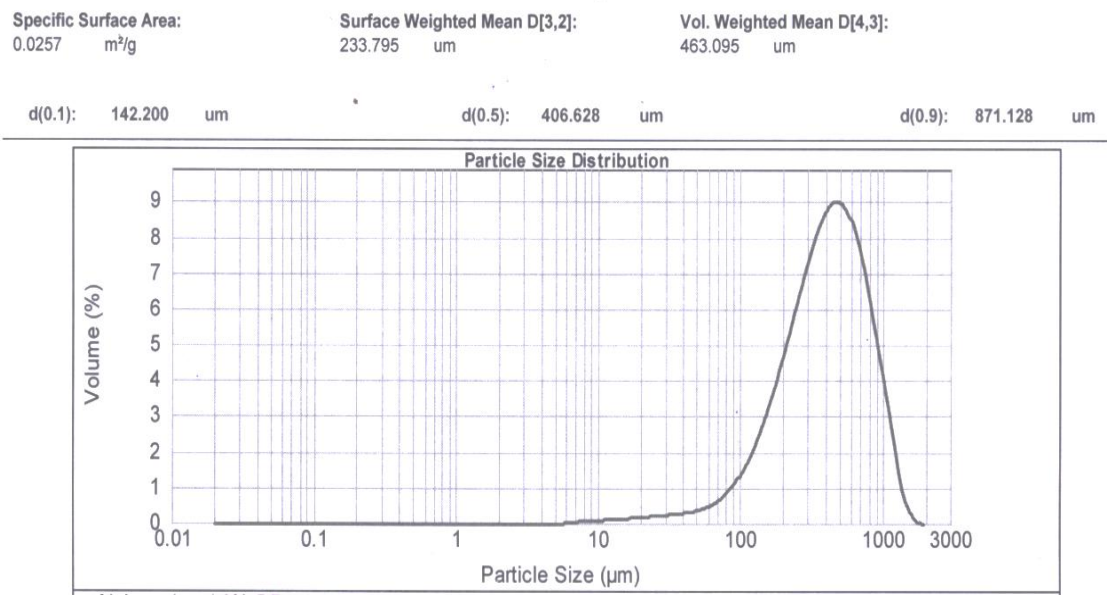


Figure 7. Particle size distribution of bead from encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5

3.3 การรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกหลังการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่นและผ่านสภาวะที่มีกรดสูง

เมื่อนำเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 875, *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* CIF17 A5 มาแช่ในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ผ่านการห่อหุ้มจะให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) คือ 83.57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *L. plantarum* TISTR 875 และ *L. acidophilus* TISIR 1034 รอดชีวิตเท่ากับ 74.79 และ 65.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีจำนวนเซลล์ที่เหลือรอด 7.94, 6.29 และ 5.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 9 ซึ่งการห่อหุ้มเซลล์ช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้เป็นอย่างมาก เมื่อเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งมีการรอดชีวิตเพียง 37.68, 35.76 และ 22.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chandramoulia และคณะ (2004) ทำการห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแล้วศึกษา การรอดชีวิตของเซลล์ผ่านสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดี พบว่าเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 9 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 6 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านสภาวะเดียวกัน

Table 9. Effect of alginate encapsulation on probiotics survival after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 ^{O}C.

Probiotic strains	Log CFU/ml		Survival (%)	
	Free cell	Encapsulated cell	Free cell	Encapsulated cell
L. acidophilus TISTR 1034	2.11±0.03	5.47±0.04	22.47±0.29	65.49±0.53^{c}
L. plantarum TISTR 875	3.44±0.09	6.29±0.02	35.76±0.94	74.79±0.99^{b}
L. plantarum CIF17 A5	3.48±0.01	7.94±0.03	37.68±0.10	83.57±0.28^{a}

Data were mean values of triplicate determination ± standard deviation

Mean within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p<0.05$)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยสนับสนุนว่า การห่อหุ้มเซลล์ส่งผลดีต่อการปกป้องเซลล์โปรไบโอติก เมื่อผ่านสภาวะเลียนแบบกรดภายในกระเพาะอาหารของมนุษย์ โดย Mandal และคณะ (2006) ห่อหุ้มเซลล์ *L. casei* NCDC-298 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และศึกษาการทนต่อกรดพีเอช 1.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *L. casei* NCDC-298 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์มีการรอดชีวิต 5.37 log CFU ต่อมิลลิลิตร ขณะที่เซลล์อิสระให้การรอดชีวิต 3.38 log CFU ต่อมิลลิลิตร Chavarri และคณะ (2010) ห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus gasseri* และ *Bifidobacterium bifidum* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วศึกษาการทนต่อสภาวะที่มีกรดสูง พีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ *L. gasseri* และ *B. bifidum* ที่ผ่านการห่อหุ้มมีมากกว่า 10^{7} log CFU ต่อมิลลิลิตร โดยที่เซลล์ *B. bifidum* ที่ผ่านการห่อหุ้มมีจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ เซลล์ *L. gasseri* ที่ผ่านการห่อหุ้มมีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไม่พบการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ *B. bifidum* เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที และไม่พบการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ *L. gasseri* เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ Su และคณะ (2011) ศึกษาห่อหุ้มเซลล์ *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 ด้วยอัลจิเนต ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าสามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของ *B. longum* BIOMA 5920 เมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง พีเอช 2.0 นาน 120 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ *B. longum* BIOMA 5920 ที่ผ่านการห่อหุ้มจะมีการลดลงของเซลล์ประมาณ 5 log CFU ต่อมิลลิลิตร (จาก 9.02 ลดลงถึง 3.77 log CFU ต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่เซลล์ *B. longum* BIOMA 5920 อิสระลดลงประมาณ 8 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านสภาวะเดียวกัน

ทั้งนี้การที่เซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระเมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูงที่พีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง เนื่องจากการใช้เทคนิคห่อหุ้มเซลล์แบบอิมัลชั่นเป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากการห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารไฮโดรคอลลอยด์ เช่น โซเดียมอัลจิเนต แคลเซียมอัลจิเนต แคปปา-คาราจีแนน เจแลนกัม หรือเจลาติน เป็นการทำให้เซลล์ถูกรักษาไว้ภายในวัสดุที่ห่อหุ้ม เพื่อลดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ ทำให้เซลล์ทนต่อกรดและน้ำดีในทางเดินอาหารได้ดีขึ้น มีรายงานว่าการห่อหุ้มเซลล์จะช่วยป้องกันเซลล์จากสภาวะที่มีออกซิเจนปริมาณสูง ช่วยป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง และป้องกันเซลล์ระหว่างการส่งผ่านเข้าไปในลำไส้ (Champagne and Cote, 1987) โดยเซลล์สามารถปรับตัวต่อสภาพที่เป็นกรดไม่สูงมากนัก ซึ่งจะมีการชักนำให้เซลล์สร้างโปรตีนที่เรียกว่า acid shock inducible proteins (Asps) ที่ช่วยป้องกันและซ่อมแซมสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของเซลล์ เซลล์ที่ปรับตัวจะทนต่อสภาพที่เป็นกรดสูงขึ้นหรือสภาพเครียดอื่นๆ ได้ดีขึ้น ซึ่งพบในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* (McDonald *et al*, 1990) และ *Salmonella* typhimurium (Foster and Hall, 1990)

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงสายพันธุ์ของเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองก็จะพบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้มาจากคนจะมีความสามารถในรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูงได้สูงกว่า *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้มาจากหนูและกะหล่ำปลีดอง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของคนมีสภาวะความเป็นกรดพีเอช 2.0-3.0 ในขณะที่ หนูและกะหล่ำปลีดองมีพีเอช 4.6-5.8 และ 3.8-4.1 ตามลำดับ เป็นสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ส่งผลให้ *L. plantarum* CIF17 A5 มีความสามารถรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูงได้ดีกว่า *L. acidophilus* TISTR 1034 และ *L. plantarum* TISTR 875

จากผลการทดลองที่ได้ในขั้นตอนนี้จึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* CIF17 A5 ไปศึกษาต่อในการทดลองต่อไป

3.4 การใช้เส้นใยจากพืชหัวร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 เมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง

เมื่อนำแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่คัดเลือกได้ตามข้อ 3.1 มาศึกษาผลของการใช้เส้นใยจากพืชหัวร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ ต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 เมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง โดยการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติมเส้นใย 2 เปอร์เซ็นต์ จากพืชหัวได้แก่ หัวบีทรูท มันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง และมันฝรั่ง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมสารพรีไบโอติก

ฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมสารพรีไบโอติก จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มมาแช่กรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าการรอดชีวิต พบว่าการใช้เส้นใยจากหัวบีทรูทร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) คือ 86.12 เปอร์เซ็นต์ (Figure 8a) โดยจำนวนเซลล์ลดลงจาก 9.68 เป็น 8.33 log CFU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Figure 8b ในขณะที่การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง และมันฝรั่ง ให้การรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะกรดเท่ากับ 81.08 และ 85.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 8a) นอกจากนี้ยังพบว่า การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูท ยังให้การรอดชีวิตสูงกว่าการเติมสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือการห่อหุ้มโดยไม่เติมเส้นใย หรือเซลล์อิสระเมื่อผ่านสภาวะเดียวกัน โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตเท่ากับ 82.22, 81.82 และ 37.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มเส้นใยจากหัวบีทรูท ในกระบวนการห่อหุ้มเซลล์สามารถช่วยป้องกันแบคทีเรีย จากสภาวะที่มีกรดสูงได้ โดยเส้นใยอาหารจะเข้าไปทำหน้าที่ในการเข้าไปปิด หรือลดขนาดรูพรุนของเม็ดเจลที่ได้จากการห่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไปในเม็ดเจลนั้นมีน้อยลง

ซึ่งจากการศึกษาของ Iyer และ Kailasapathy (2005) โดยห่อหุ้มแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 ร่วมกับสารพรีไบโอติก คือ Hi-maize™, Raftiline® และ Raftilose® พบว่าการห่อหุ้มโปรไบโอติก ร่วมกับ Hi-maize™ จะให้การรอดชีวิตสูงสุดเมื่อผ่านสภาวะเป็นกรดเนื่องจาก Hi-maize™ จะเข้าไปปิดรูพรุนของเม็ดเจลเอาไว้ ส่งผลให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไป ในเม็ดเจลได้ยาก ทำให้เซลล์โปรไบโอติกมีโอกาสสัมผัสกับกรดได้น้อย จึงมีการรอดชีวิตสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Michida และคณะ (2006) ได้ศึกษาการใช้สารสกัดจากธัญพืชและเส้นใยธัญพืชที่สกัดจากข้าวมอลต์และบาร์เล่ย์ มาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียกลุ่มโปรไบโอติก เมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง ผลปรากฏว่าเซลล์อิสระมีปริมาณเซลล์ลดลงจาก 7.24 log CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 1.92 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับการห่อหุ้มร่วมกับสารสกัดจากข้าวบาร์เลย์ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณแบคทีเรียลดลงเหลือ 6.5 log CFU ต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาของ Carlise และคณะ 2013 พบว่าการห่อหุ้ม *bifidobacterium* BB-12 ร่วมกับ reconstituted skim milk (RSM), การห่อหุ้ม *bifidobacterium* BB-12 ร่วมกับ RSM และอินูลิน, การห่อหุ้ม *bifidobacterium* BB-12 ร่วมกับ RSM โอลิโกแซคคาไรด์ และอินูลิน หรือการห่อหุ้ม *bifidobacterium* BB-12 ร่วมกับ RSM โอลิโกแซคคาไรด์ แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิต เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีกรดสูง พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ทุกแบบส่งผลดีเยี่ยม ในการปกป้องเซลล์จากสภาวะดังกล่าว โดยจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ

2 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระเมื่อผ่านสภาวะเดียวกัน จำนวนเซลล์จะลดลงประมาณ 4 log CFU ต่อมิลลิลิตร

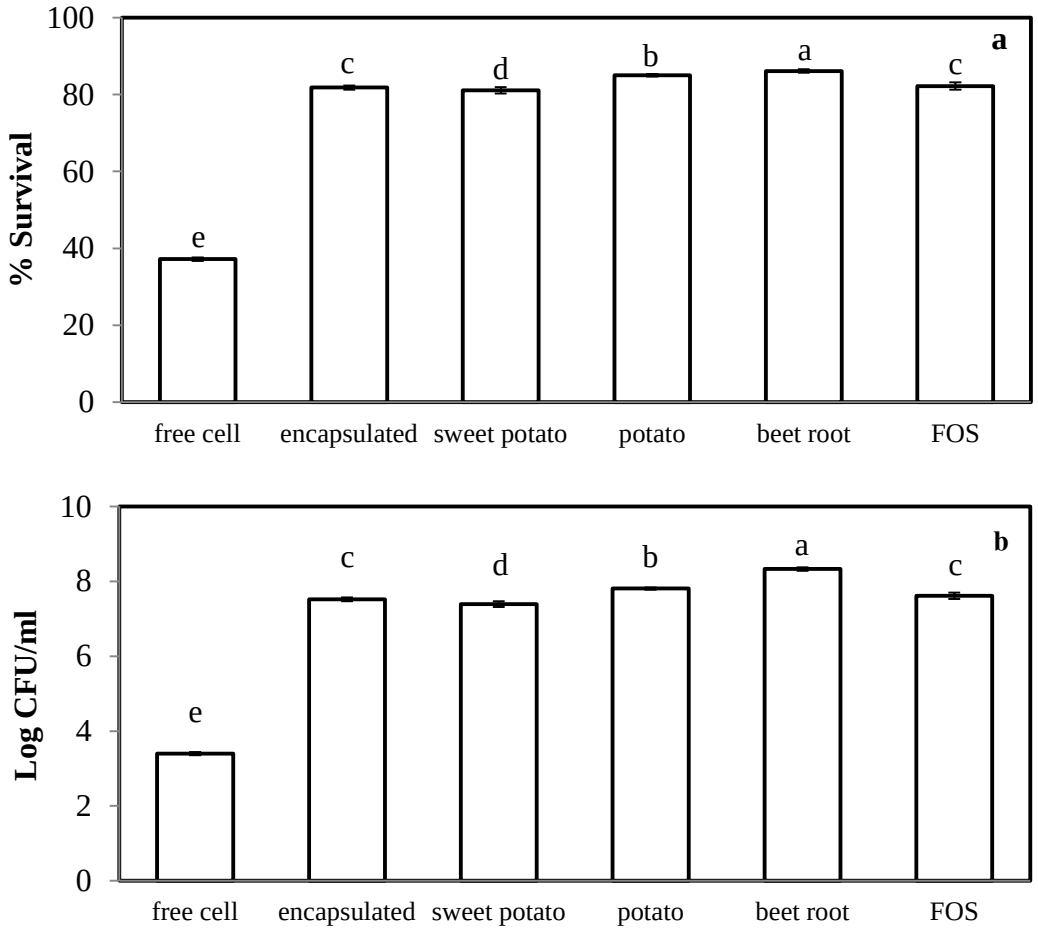


Figure 8. Effect of crude fibers from various root crops as co-encapsulant on a) survival and b) cell viability (log CFU/ml) of *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C.

เส้นใยอาหารจากพืชแต่ละชนิด จะมีปริมาณของเส้นใยที่แตกต่างกัน ซึ่งเส้นใยอาหารมีคุณสมบัติความเป็นรูพรุน ช่วยทำหน้าที่เป็นตัวพยุงและเป็นบริเวณยึดเกาะของเซลล์ เพื่อป้องกันเซลล์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสม การใช้เส้นใยอาหารร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ ยังช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกเมื่อผ่านสภาวะที่มีกรดสูง โดยจากการทดลองนี้พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท ช่วยให้เซลล์มีการรอดชีวิตได้สูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกเส้นใยจากหัวบีทรูทร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ไปศึกษาต่อในการทดลองต่อไป

3.3 ผลของความเข้มข้นของเส้นใยหัวบีทรูทต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มหลังผ่านสภาวะที่เป็นกรด

เมื่อนำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วย 3 เปอร์เซ็นต์โซเดียมอัลจิเนต ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท แล้วศึกษาผลของความเข้มข้นของเส้นใยจากหัวบีทรูทที่ใช้ร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์ โดยเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผ่านสภาวะที่มีกรดสูง พบว่าเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิตได้สูงสุด คือ 86.78 เปอร์เซ็นต์ (Figure 9a) โดยจำนวนเซลล์ลดลงจาก 9.85 เหลือ 8.54 log CFU ต่อมิลลิลิตร (Figure 9b) ในขณะที่การเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทเข้มข้น 0, 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิตเท่ากับ 81.22, 82.32 และ 82.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 9a) และยังพบว่า การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทยังให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าการห่อหุ้มร่วมกับฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์หรือเซลล์อิสระ ซึ่งพบการรอดชีวิตเท่ากับ 82.37 และ 37.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 9a) สอดคล้องกับการศึกษาของ Iyer และ Kailasaphathy (2005) ซึ่งห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต 1.8 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเติม Hi-maize™ starch ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ Hi-maize™ starch ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง และการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติม 1.5 เปอร์เซ็นต์ Hi-maize™ starch ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกับการเติม 2.0 เปอร์เซ็นต์ Hi-maize™ starch ทั้งนี้เนื่องจาก Hi-maize™ starch ความเข้มข้นสูงมากเกินไปจะขัดขวางการจับตัวของโซเดียมอัลจิเนต ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการปกป้อง *L. acidophilus* CSCC 2400 ลดลงในสภาวะที่เป็นกรด ในทำนองเดียวกันการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเติมเส้นใยจาก หัวบีทรูทที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตได้น้อยกว่าการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร หลังผ่านสภาวะที่มีกรดสูง

3.4 ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดีของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท

เมื่อนำ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ในกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง และเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยทดสอบแบบต่อเนื่อง พบว่า *L. plantarum* CIF17

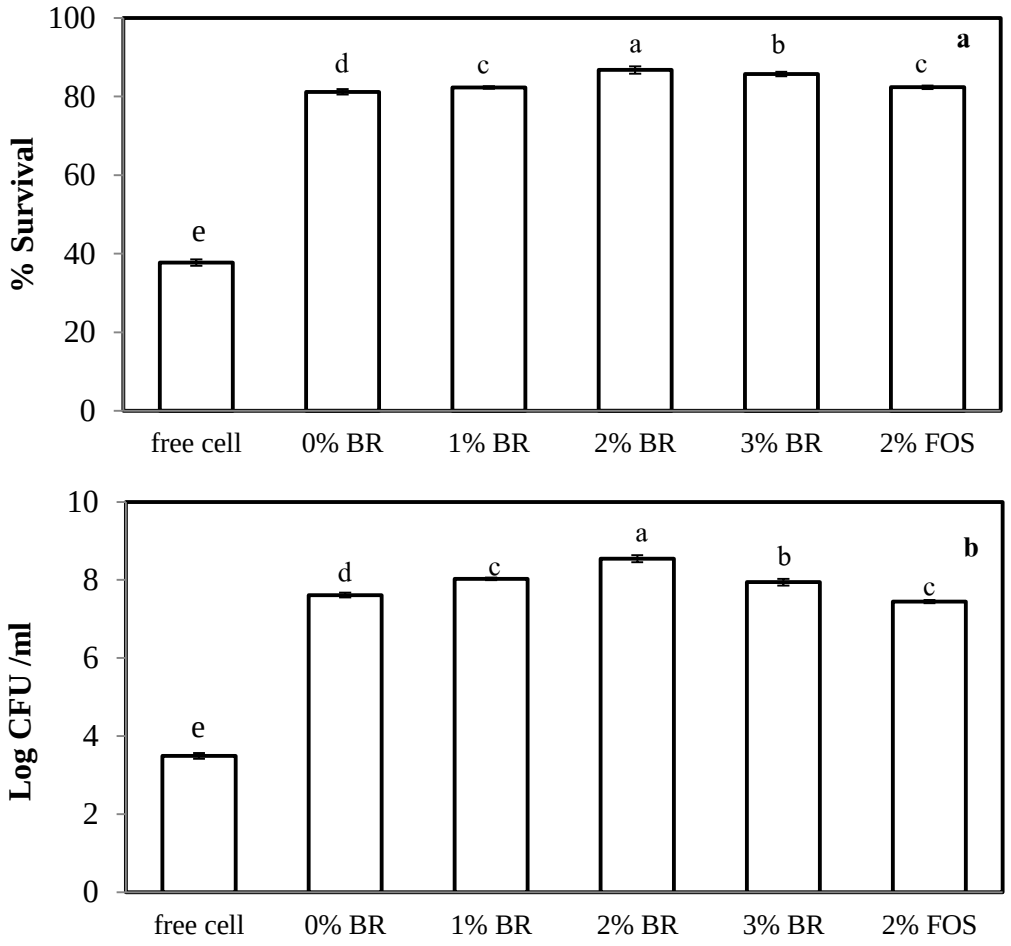


Figure 9. Effect of beetroot crude fiber concentration as co-encapsulant on a) survival and b) cell viability (log CFU/ml) *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C.

A5 ที่ผ่านการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) คือ 83.06 เปอร์เซ็นต์ (Figure 10a) โดยจำนวนเซลล์ลดลงจาก 9.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 8.33 log CFU ต่อมิลลิลิตร หลังผ่านกรด และเหลือ 7.98 log CFU ต่อมิลลิลิตร หลังผ่านกรดและเกลือน้ำดีแบบต่อเนื่อง (Figure 10b) เมื่อเทียบกับการห่อหุ้มเซลล์โดยไม่เติมเส้นใย ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 69.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านกรดและเกลือน้ำดีแบบต่อเนื่อง ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มร่วมกับสารพรีไบโอติกฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และเซลล์อิสระมีการรอดชีวิตเท่ากับ 75.96 และ 35.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 10a) เมื่อผ่านสภาวะเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูท สามารถช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อผ่านกรด และเกลือน้ำดีแบบต่อเนื่องได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mandal และคณะ

(2006) ศึกษาความสามารถของ *L. casei* NCDC-298 ในการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่าเมื่อเซลล์สัมผัสเกลือน้ำดี 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์มีการลดลงจาก 9.45 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 7.29 log CFU ต่อมิลลิลิตร และจาก 9.34 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 5.60 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อมีการห่อหุ้มเซลล์ *L. casei* NCDC-298 ด้วยอัลจิเนต 4 เปอร์เซ็นต์ พบการรอดชีวิตของเซลล์ มากกว่า 8 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านสภาวะเดียวกัน ในขณะที่ Nazzaro และคณะ (2009) ห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus acidophilus* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแซนแทนกัม 0.15 เปอร์เซ็นต์ หรืออินูลิน 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทดสอบความสามารถของเซลล์ ในการทนต่อสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดีแบบต่อเนื่อง พบว่าเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มร่วมกับแซนแทนกัม มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 5.59×10^{12} CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านสภาวะดังกล่าวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 5.21×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร (ลดลงประมาณ 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่เซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 4.47×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านสภาวะเดียวกันส่งผลให้จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 1.56×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร (ลดลงประมาณ 5 log CFU ต่อมิลลิลิตร)

จากการศึกษาทำให้มั่นใจได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิคอิมัลชั่น จะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก เมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารได้ โดยเมื่อเม็ดเจลตกลงสู่กระเพาะอาหาร เซลล์แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายในอัลจิเนต จะถูกปลดปล่อยออกมาจากเม็ดเจลได้น้อยมาก เนื่องจากอัลจิเนตที่ใช้ห่อหุ้มมีความคงตัวได้เป็นอย่างดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังมีเส้นใยอาหารมีคุณสมบัติไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน จะทำหน้าที่อุดรูพรุนบนเม็ดเจลขัดขวางการแพร่ผ่านของกรดไปสัมผัสกับเม็ดเจล และเม็ดเจลจะละลายเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางหรือด่าง (Annan *et al*., 2008) เมื่อเม็ดเจลตกลงไปอยู่ในลำไส้เล็กซึ่งมีสภาวะเป็นด่างอ่อน ทำให้เม็ดเจลค่อยๆ พองตัวปลดปล่อยเซลล์ออกมาโดยที่เส้นใยที่ใช้ห่อหุ้มร่วมกันยังทำหน้าที่เป็นสารพรีไบโอติก ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้อีกด้วย นอกจากนี้บริเวณลำไส้จะพบอาหารและสารอาหารที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้อีกด้วย (Charteris *et al.,* 1998) ทั้งนี้การห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับสารอื่นๆ (co-encapsulation) ที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โปรไบโอติก เช่น สารพรีไบโอติก นั้นจะช่วยปกป้องเซลล์เมื่ออยู่ในอาหาร หรือในระบบทางเดินอาหารได้ดี เนื่องจากมีการเอื้อประโยชน์ต่อกันแบบ synbiosis (Nazzaro *et al*., 2012)

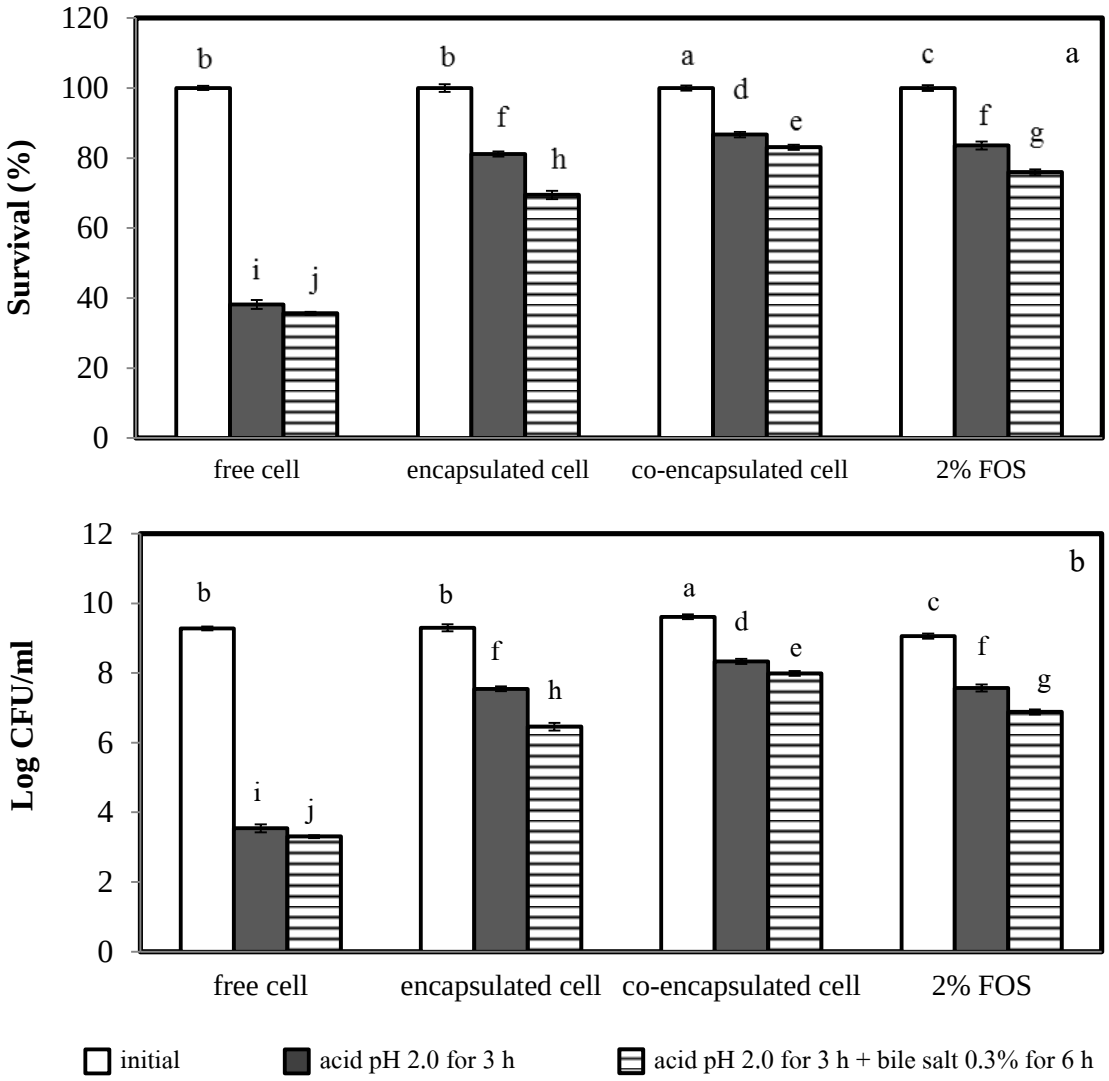


Figure 10. a) %Survival and b) cell viability (log CFU/ml) of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h) and bile salt conditions (bile salt 0.3% for 6 h).

3.5 ผลขององค์ประกอบในอาหารที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากพืชหัวในระหว่างการเก็บรักษา

โดยปกติแล้วเซลล์โปรไบโอติกจำเป็นต้องมีความสามารถในการคงทนต่อสภาวะต่างๆ ในขณะที่ผ่านกระบวนการเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพชนิดต่างๆ รวมไปถึงความสามารถในการรอดชีวิตเมื่อผ่านการเก็บรักษาอยู่ในอุณหภูมิต่ำ ซึ่งการที่เซลล์จะสามารถรอดชีวิตอยู่ได้นั้นมักขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ค่าความเป็นกรด-เบสของผลิตภัณฑ์ สารปรุงแต่งที่เติมอยู่ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ (Charteries *et al*., 1998) สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาจมีอยู่

ในผลิตภัณฑ์ (Collins *et al*., 1998) ตัวอย่างส่วนประกอบพื้นฐานในผลิตภัณฑ์ประเภทที่ทำจากนม เช่น โยเกิร์ต ชีส มักมีการเติม เกลือ น้ำตาล กรดอินทรีย์ เป็นต้น แม้กระทั่งสารที่เกิดจากการผลิตของเซลล์หัวเชื้อเอง เช่น การผลิตกรดแลกติก มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกที่เสริมเข้าไปในผลิตภัณฑ์ (Post, 1996 อ้างโดย Clevelan *et al*., 2001) ดังนั้นในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติก ที่จะใช้เป็นส่วนเสริมเข้าไปในผลิตภัณฑ์นั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก เมื่ออยู่ในสภาวะการเก็บรักษาที่ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์จริง (Vinderola *et al*., 2002) การศึกษาในหัวข้อนี้จึงเป็นการศึกษาความสามารถของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ผ่านการห่อหุ้ม ต่อการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อในผลิตภัณฑ์มีสารบางอย่างซึ่งส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก ได้แก่ สภาวะที่มีการเติมเกลือ (NaCl), น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$), skim milk, และสภาวะที่เป็นกรด เนื่องจากการเติมกรดชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl), กรดแลกติก ($C_3H_6O_3$), กรดอะซีติก ($C_2H_4O_2$), และกรดซิตริก ($C_6H_8O_7$) ซึ่งเป็นสารที่ปกติส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมอาหาร มักใช้เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์อยู่แล้ว

3.5.1 ผลของปริมาณเกลือต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

เมื่อนำเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่าเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 จะลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มสูงขึ้น และระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานมากขึ้น โดยพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท มีจำนวนเซลล์การรอดชีวิตเท่ากับ 6.56 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาในอาหารที่มีเกลือ 8 เปอร์เซ็นต์ นาน 14 วัน ดังแสดงใน Figure 11d ซึ่งสูงกว่าการห่อหุ้มร่วมกับสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และการห่อหุ้มเซลล์โดยไม่เติมเส้นใย โดยพบการรอดชีวิตเท่ากับ 6.54 และ 6.28 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน ดังแสดงใน Figure 11b และ 11c ในขณะที่เซลล์อิสระพบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเพียง 1.62 log CFU ต่อมิลลิลิตร (Figure 11a) นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ ยังช่วยให้เซลล์มีการรอดชีวิตได้สูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 2, 4 หรือ 6 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เช่นเดียวกัน จากผลการศึกษานี้ทำให้มั่นใจได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์สามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mirzaei และคณะ (2012)

ห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus acidophilus* La5 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรร่วมกับ Hi-maize เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ กับเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม เมื่อเก็บรักษาอยู่ภายใน Iranian white brined cheese ซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 182 วัน พบว่าเซลล์อิสระลดจำนวนลงมากกว่า 5 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มมีจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 4 log CFU ต่อกรัม

เกลือโซเดียมคลอไรด์ ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเป็นสารกันบูดและสารเพิ่มรสชาติของอาหารให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้เกลือโซเดียมคลอไรด์ ยังเป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการผลิตชีส (Reinheimer *et al*., 1997) ปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์จะส่งผลโดยตรงในการลดจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ (Gomes and Malcata, 1999) Guinee และคณะ (2002) พบว่ามีหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็น ปริมาณเกลือ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาในกระบวนการผลิตชีสที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *L. acidophilus* และ *bifidobacteria* ที่อยู่ในชีส Gomes และ Malcata (1998) พบว่าการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* ลดลงเมื่อมีปริมาณของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นมากกว่า 0.51 โมลต่อลิตร ซึ่งการที่ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำอิสระที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ (water activity) ลดน้อยลง ส่งผลต่อการลดจำนวนลงของเซลล์ระหว่างการเก็บรักษา

3.5.2 ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

เมื่อนำเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาในอาหารเหลว MRS ที่เติมน้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่าเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 จะลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นและระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานมากขึ้น โดยพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท มีจำนวนเซลล์การรอดชีวิตเท่ากับ 4.23 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาในอาหารที่มีน้ำตาล 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 14 วัน ดังแสดงใน Figure 12d ซึ่งสูงกว่าการห่อหุ้มร่วมกับสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และการห่อหุ้มเซลล์โดยไม่เติมเส้นใย โดยพบการรอดชีวิตเท่ากับ 4.15 และ 3.95 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 12b และ 12c เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน ในขณะที่เซลล์อิสระพบจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเพียง 1.70 log CFU ต่อมิลลิลิตร (Figure 12a) นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ ยังช่วยให้เซลล์มีการรอดชีวิตได้สูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 5, 10 หรือ 15 เปอร์เซ็นต์

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เช่นเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Zanjani และคณะ (2012) ห่อหุ้มเซลล์ *L. casei* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับ Starch แล้วทดสอบความสามารถในการรอดชีวิต เมื่ออยู่ใน cream-filled cake ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสประกอบอยู่ด้วย 33 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่าเซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ลดลง 8.09 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต หรือเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มร่วมกับ Hi-maize พบจำนวนเซลล์ที่ลดลงเพียง 4.55 และ 3.33 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Homayouni และคณะ (2008) เปรียบเทียบการรอดชีวิตระหว่างเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรร่วมกับ Hi-maize เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์สองชนิดคือ *Lactobacillus casei* (Lc-01) และ *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) เมื่ออยู่ในไอศกรีมซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนผสม 17 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน แล้วพบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดที่ผ่านการห่อหุ้มมีจำนวนเซลล์ลดลงไม่ถึง 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระทั้งสองชนิดมีจำนวนเซลล์ลดลงกว่า 3 log CFU ต่อมิลลิลิตร

หากพิจารณาในด้านจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติก ที่จะส่งผลต่อการก่อประโยชน์แก่ผู้บริโภค ซึ่งกำหนดไว้ว่าต้องมีจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งถึงวันบริโภค พบว่าเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ผ่านการห่อหุ้มสามารถเก็บรักษาในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 5, 10 หรือ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้มากกว่า 7 วัน แต่ไม่เกิน 14 วัน (Figure 12b, 12c และ 12d) ในขณะที่เซลล์อิสระสามารถเก็บรักษาได้น้อยกว่า 4 วัน เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน (Figure 12a) จากผลการศึกษานี้ทำให้มั่นใจได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์สามารถปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาวะที่มีน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้

3.5.3 ผลของปริมาณ skim milk ต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

เมื่อนำเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 มาห่อหุ้มด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาในอาหารเหลว skim milk ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่าความเข้มข้นของอาหาร skim milk ที่ต่างกันส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ไม่มากนัก โดยพบว่าเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยจากบีทรูท มีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บในอาหารเหลว skim milk ความเข้มข้นต่างๆ นาน 14 วัน ดังแสดงใน Figure 13d นอกจากนี้ยังพบว่า การห่อหุ้มเซลล์โดยไม่เติมเส้นใย และการห่อหุ้ม

เซลล์ร่วมกับสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน คือมีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน ดังแสดงใน Figure 13b และ 13c ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระก็สามารถให้ผลการรอดชีวิตที่ดีเช่นเดียวกัน คือมีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน ดังแสดงใน Figure 13a จากการทดลองพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ จะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว skim milk โดยที่ความเข้มข้นของ skim milk แตกต่างกัน ส่งผลต่อการรอดชีวิต ของเซลล์ไม่มากนัก ซึ่งจากรายงานของ Su และคณะ (2011) พบว่าเมื่อนำเซลล์อิสระ *B. longum* BIOMA 5920, เซลล์ *B. longum* BIOMA 5920 ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร หรือเซลล์ *B. longum* BIOMA 5920 ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ human-like collagen เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วเก็บรักษาในอาหารเหลว skim milk เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ พบว่าเซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ลดลงจาก 9.83 เป็น 5.96 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ เซลล์ *B. longum* BIOMA 5920 ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร หรือเซลล์ *B. longum* BIOMA 5920 ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ human-like collagen เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบการลดลงของจำนวนเซลล์จาก 9.07 เป็น 6.65 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ จาก 9.35 เป็น 7.38 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Sultana และคณะ (2000) ทดลองนำโปรไบโอติกสองชนิด ได้แก่ *L. acidophilus* และ *B. infantis* มาห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับ Hi-maize 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกเมื่อเก็บอยู่ในโยเกิร์ต ซึ่งมี skim milk เข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับ Hi-maize ช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดโดยมีจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 0.5 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่เซลล์อิสระทั้งสองชนิดมีจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 1 log CFU ต่อกรัม

3.5.4 การรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทเมื่อเก็บรักษาในอาหารปรับกรดที่อุณหภูมิต่ำ

เมื่อนำเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ มาเก็บรักษาในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วยกรดชนิดต่างๆ 4 ชนิด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดแลกติก ($C_3H_6O_3$) กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) และกรดซิตริก ($C_6H_8O_7$) พบว่าเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับเส้นใยจากบีทรูท มีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บในอาหารเหลว

MRS ที่มีการปรับกรด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ดังแสดงใน Figure 14d นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์โดยไม่เติมเส้นใย และการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับสารพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน คือมีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน ดังแสดงใน Figure 14b และ 14c ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระก็สามารถให้ผลการรอดชีวิตที่ดีเช่นเดียวกัน คือมีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยกว่า 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเดียวกัน ดังแสดงใน Figure 14a จากการทดลองพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ จะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับกรด นอกจากนี้ยังพบว่า การปรับกรดด้วยกรดต่างชนิดกัน ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ไม่มากนัก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sohail และคณะ (2012) ห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* NCFM หรือ *L. rhamnosus* GG ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาเมื่อใช้เซลล์ผสมลงในน้ำส้มซึ่งมีค่าพีเอช 3.95 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มสามารถช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตได้ไม่มากนัก เมื่อเทียบกับเซลล์อิสระ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน พบเซลล์ *L. acidophilus* NCFM อิสระ หรือเซลล์ *L. acidophilus* NCFM ที่ผ่านการห่อหุ้มมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.91 และ 4.08 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 28 วันไม่พบการรอดชีวิตของทั้งเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้ม ในขณะที่เซลล์ *L. rhamnosus* GG อิสระ หรือเซลล์ *L. rhamnosus* GG ที่ผ่านการห่อหุ้มมีจำนวนเซลล์ลดลงน้อยมาก (น้อยกว่า 0.5 log CFU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 35 วัน

กรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแลกติก กรดอะซีติก กรดซิตริก เป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือช่วยปรับกรด ให้ได้ปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์ตามต้องการ (Davidson *et al*., 2001) การลดลงของค่าพีเอชในอาหารมีอิทธิพลสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ การที่กรดมีผลต่อการลดจำนวนจุลินทรีย์ อาจเนื่องมาจากกรดที่แพร่เข้าไปในเซลล์ เกิดการแตกตัวทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลง ซึ่งเซลล์จะแบ่งพลังงานบางส่วนไปทำลายโปรตอนที่เข้ามา เป็นผลให้การเจริญของเซลล์ช้าลง โดยทั่วไปกรดแลกติกจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำกว่ากรดซอร์บิก กรดอะซีติก กรดโพรพิโอนิก และกรดเบนโซอิก (Baird-Parker, 1980) แต่สำหรับการเติมเซลล์โปรไบโอติกเข้าไปในผลิตภัณฑ์มีจุดประสงค์เพื่อให้เซลล์สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในปริมาณมากพอที่จะก่อประโยชน์ต่อสุขภาพผู้บริโภค (ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร หรือต่อกรัมอาหาร) การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกไว้ภายในไฮโดรคอลลอยด์ เป็นวิธีการที่จะช่วยปกป้องเซลล์โปรไบโอติกจากสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ เช่น สภาวะความเป็นกรดหรือด่างในระบบทางเดิน

อาหาร สภาวะที่มีออกซิเจน สภาวะที่อุณหภูมิสูง หรือในระหว่างการเก็บรักษาอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ (Nazzaro, *et al*., 2012) จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการนำเทคนิคห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* CIF17 A5 จะช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์ เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดค่าพีเอช 4.5 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

เมื่อพิจารณาทางด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์เสริมโปรไบโอติก ที่กำหนดให้มีจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกไม่น้อยกว่า 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งบริโภค ทำให้สามารถมั่นใจได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต จะช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เสริมโปรไบโอติก *L. plantarum* CIF17 A5 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำตาล skim milk ปริมาณสูง หรือสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 4.5 ได้นานกว่าเซลล์โปรไบโอติกที่ไม่ถูกห่อหุ้ม

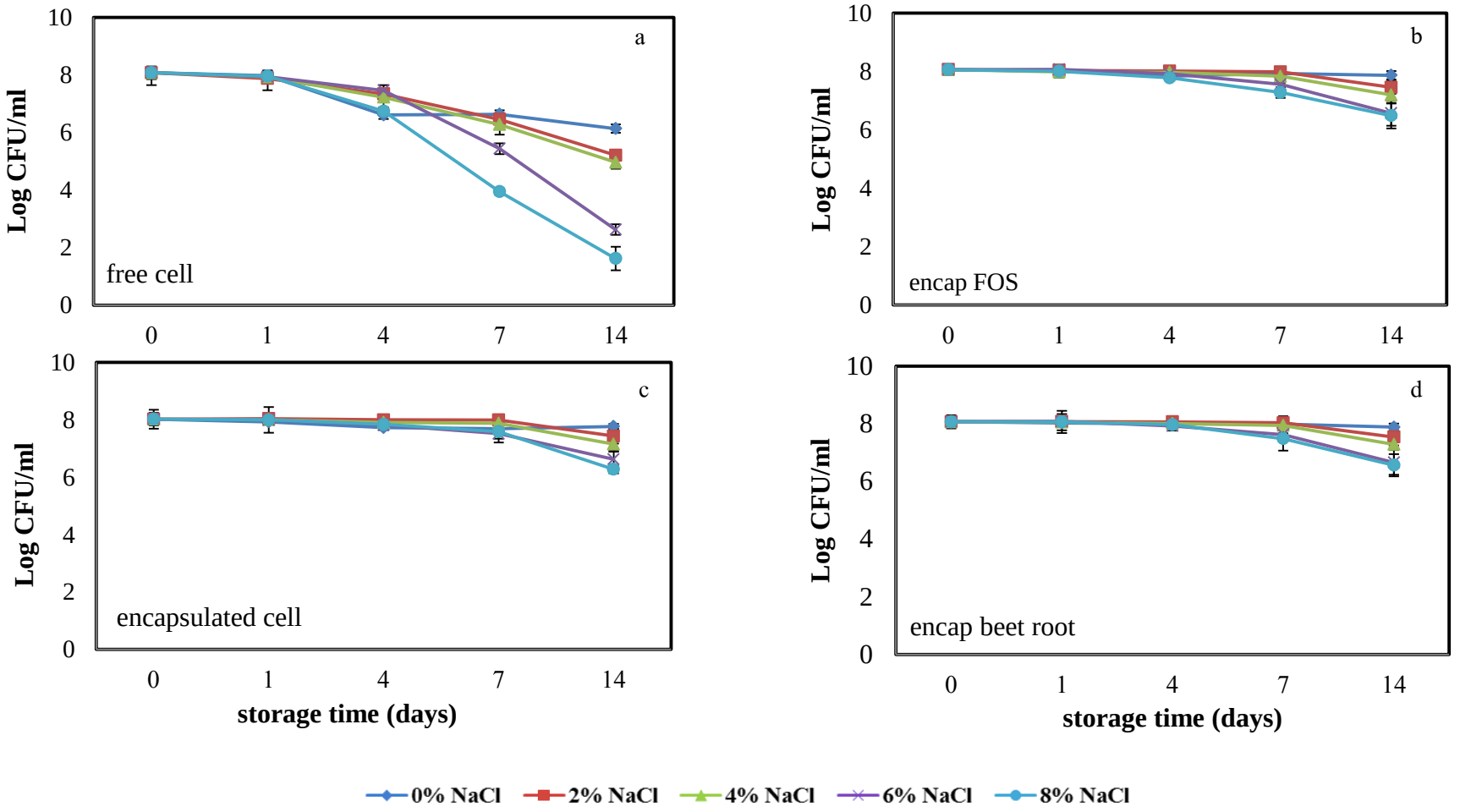


Figure 11. Effect of different percentage of sodium chloride (NaCl) on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C

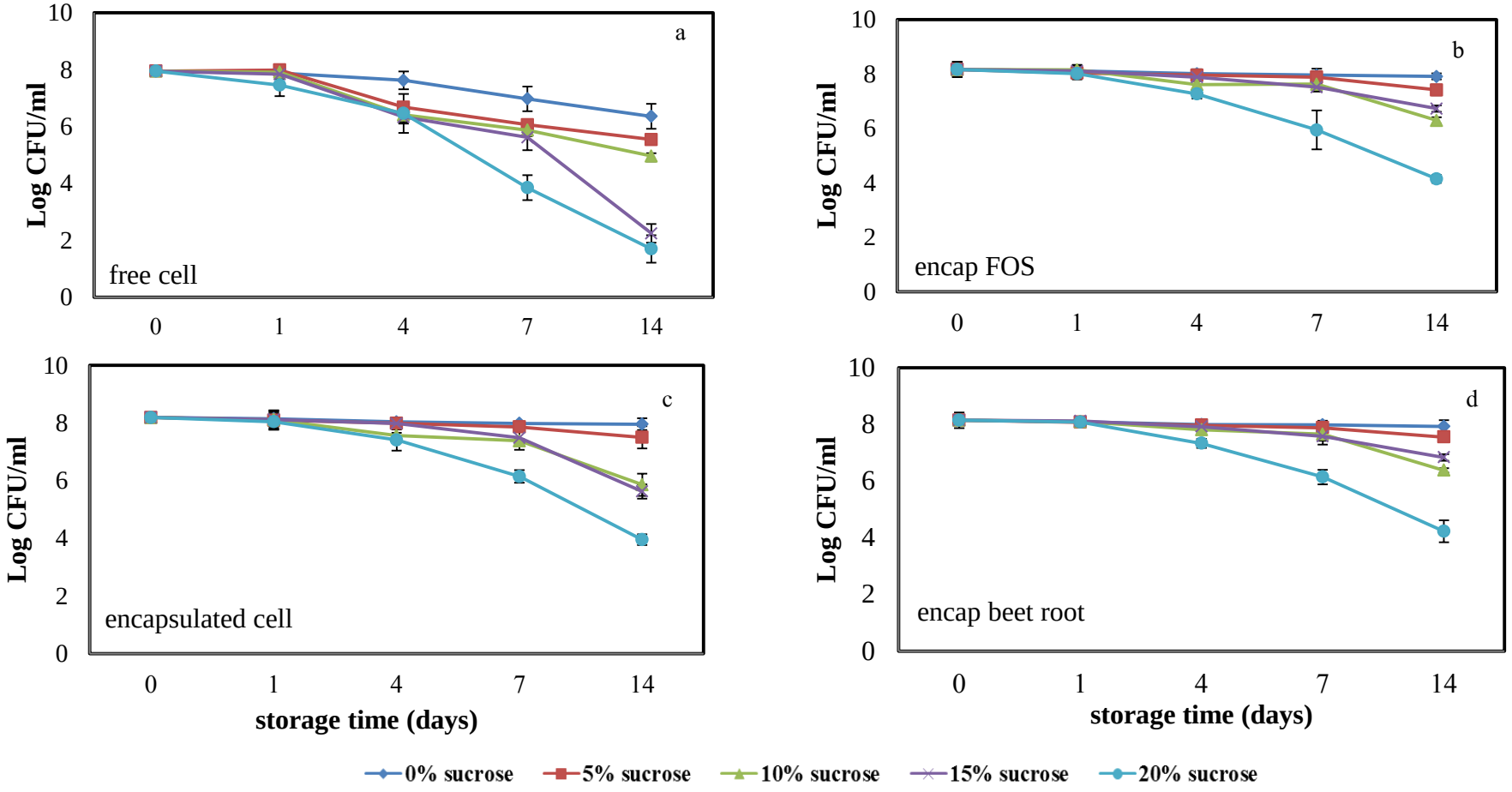


Figure 12. Effect of different percentage of sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C.

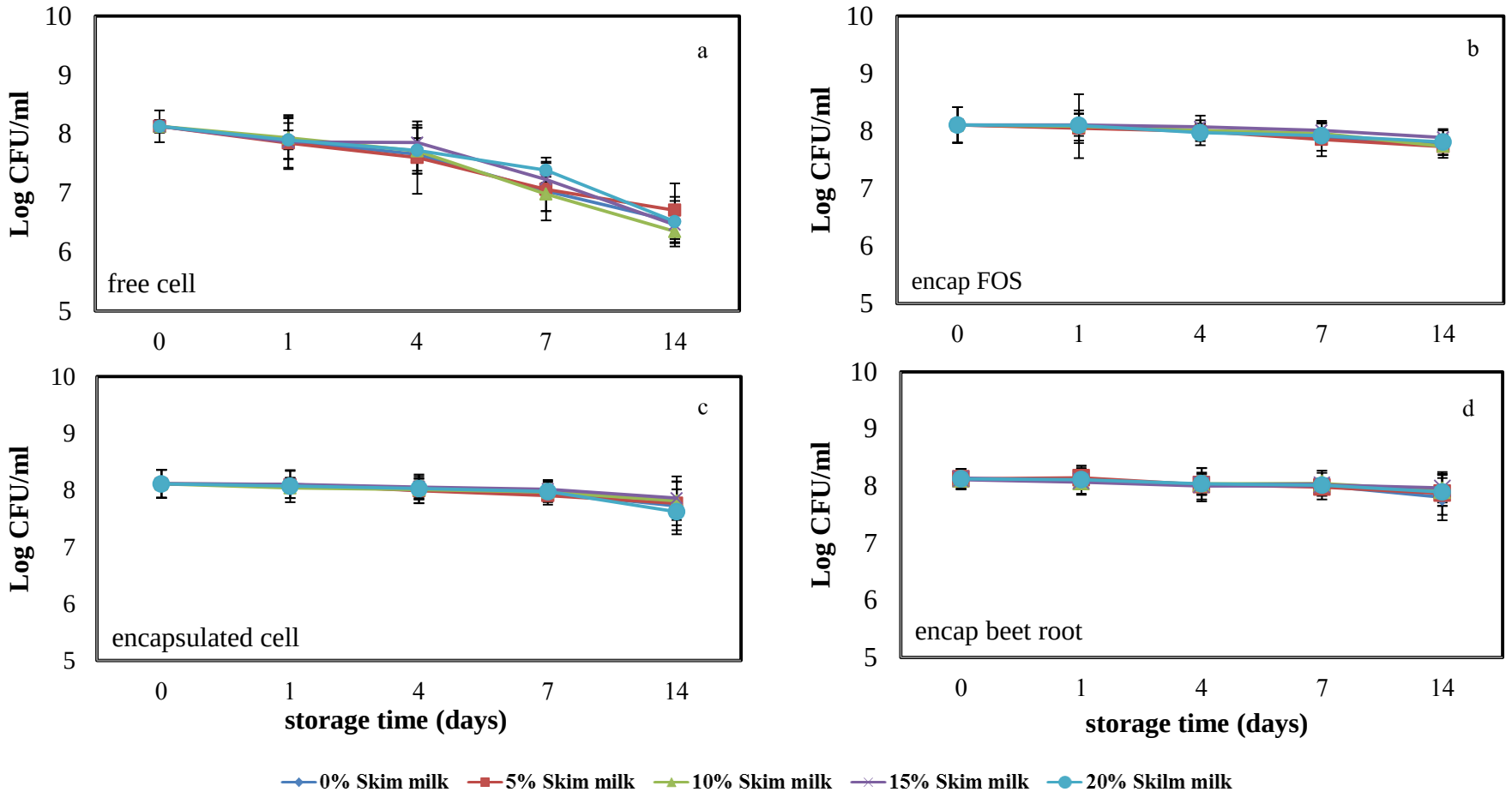


Figure 13. Effect of different percentage of skim milk on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C.

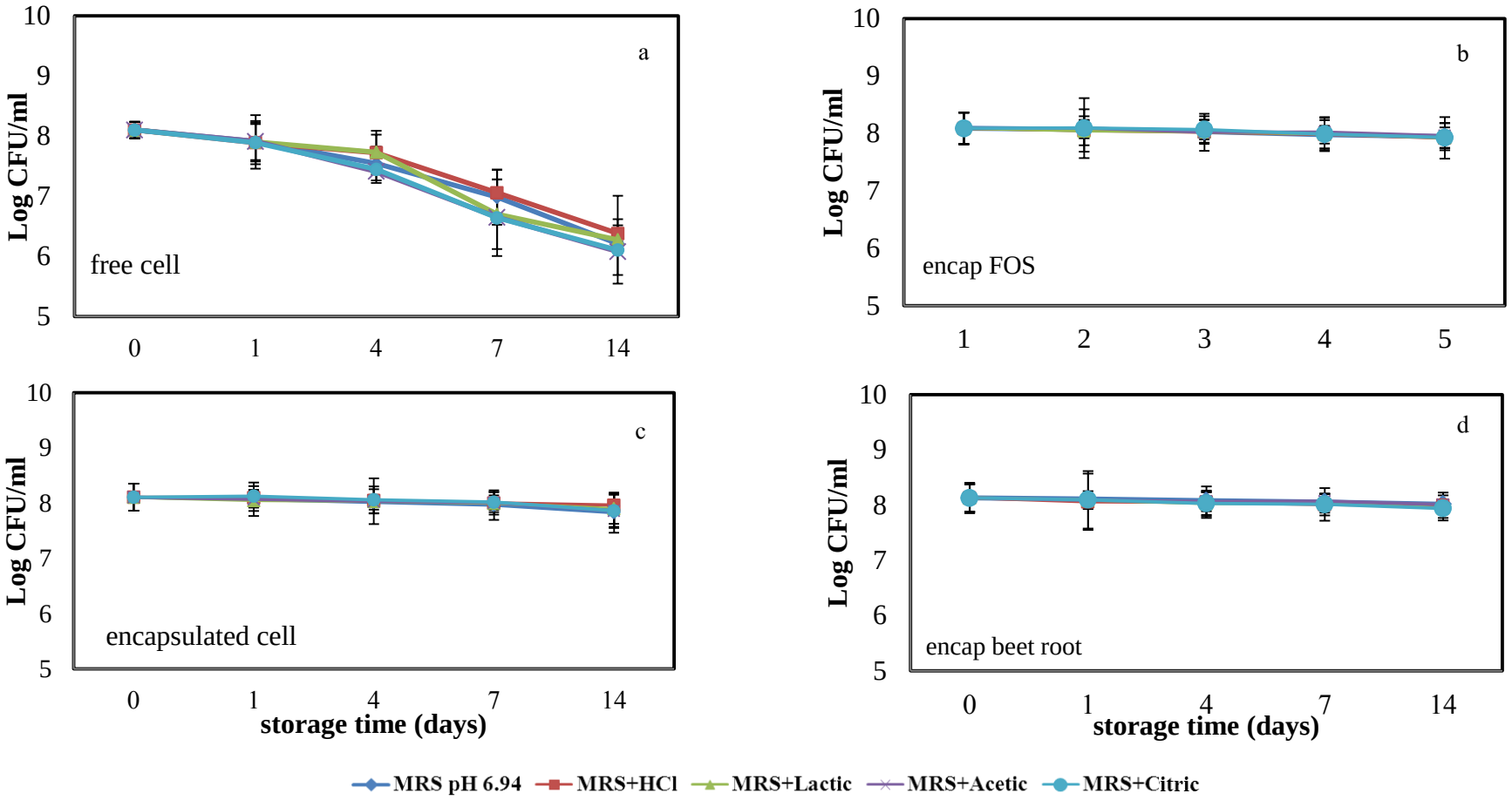


Figure 14. Effect of acidified MRS broth (pH 4.5) on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) a) free cell, b) encapsulated with 2% FOS c) encapsulated cell and d) encapsulated cell with 2% beet root crude fiber during 14 days of storage at 4 °C.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งได้แก่ *L. plantarum* CIF17 A5, *L. plantarum* TISTR 875 และ *L. acidophilus* TISTR 1034 ที่แยกมาจากคน หนูและอาหารหมัก ตามลำดับ และนำไปทดสอบการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น ให้ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสูงสุดคือ 99.63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ซึ่งแยกจากคนมีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 83.57 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *L. plantarum* TISTR 875 และ *L. acidophilus* TISTR 1034 ซึ่งแยกจากหนูและอาหารหมักให้การรอดชีวิต 74.79 และ 65.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากสภาวะที่มีกรดสูงได้มากกว่าเซลล์อิสระ

การทนต่อกรดของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมการเติมเส้นใยอาหารจากพืชหัว 3 ชนิด พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรมีการรอดชีวิตสูงสุดคือ 86.12 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) จากสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นเซลล์อิสระที่ไม่ถูกห่อหุ้ม และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมเส้นใยจากพืชให้การรอดชีวิตเท่ากับ 37.21 และ 81.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการใช้เส้นใยบีทรูทความเข้มข้นของ 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 จาก 37.75 เป็น 86.78 เปอร์เซ็นต์ โดยเส้นใยบีทรูทจะช่วยปิดรูพรุนบนเม็ดเจลทำให้กรดซึมผ่านไปสัมผัสกับโปรไบโอติกได้ยาก เมื่อนำเซลล์ที่ห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยบีทรูทมาผ่านสภาวะเป็นกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง และเกลือน้ำดีนาน 6 ชั่วโมง แบบต่อเนื่องพบว่ามีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 83.06 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมเส้นใยจากพืชหัวให้การรอดชีวิตเท่ากับ 35.59 และ 69.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตร่วมกับเส้นใยจากบีทรูท ช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของเซลล์จาก การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยพบการรอดชีวิตเท่ากับ 6.56 log CFU/ml ในขณะที่เซลล์อิสระและเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มโดยไม่มีการเติมเส้นใย มีการรอดชีวิตเท่ากับ 1.62 และ 6.28 log CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาในอาหาร MRS ที่

มีเกลือแกง 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานวัน 14 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าการห่อหุ้มเซลล์ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต มีการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อเก็บรักษาในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ อาหารเหลว skimmilk และในอาหาร MRS ที่มีการปรับกรดให้มีค่าพีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ์ ศิริพรรณพร. 2543. โยเกิร์ต อาหารเพื่อสุขภาพ. ว. อาหาร. 30: 292–297.

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. โปรไบโอติก. ว. แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. 53: 357–360.

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

นันทินา เชิญทอง. 2550. การคัดเลือก ลักษณะ และคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซ-โพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลกติกจากสัตว์ทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิรัญญา บุญติ้น. 2550. การคัดเลือกโปรไบโอติกจากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิณทิพย์ รัมภกาภรณ์ และ สุดสาย ตรีวาณิช. 2533. คุยกันฉันเพื่อนขอ bifidobacteria เป็นตัวเอก. ว. อุตสาหกรรมเกษตร 3: 61–66.

ภวัต สังขวัฒนะ. 2544. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรัลยา แพงไตร. 2540. การคัดเลือกเชื้อ lactobacilli ที่สร้าง bacteriocin จากอาหารประเภทปลาหมัก. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุพจน์ ใช้เทียมวงค์. 2542. จุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

Adams, M.R. and Moss, M. O. 1995. Food Microbiology. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.

Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery review. Trends Food Sci. Technol. 18: 240–251.

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.

Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. and Miki, T. 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. J. Food Sci. 63: 544–547.

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

Baird–Parker, A. C. 1980. Organic acids. *In* Microbial ecology of food: Factors affecting life and death of microorganisms. Vol. 1. (Silliker, J. H., Elliot, R. P. and Baird–Parker, A. C., eds.). p. 129–135. Academic Press. London.

Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I. and Spasov, Z. N. 2002. Pure cultures for making kefir. J. Food Microbiol. 19: 537–544.

Bixquert, J. M. 2009. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last? Rev. Esp. Enferm. Dig. 101: 553–564.

Braz de Oliveira, A. J., Gonçalves, R. A. C., Chierrito, T. P. C., Müller dos Santos, M., Mera de Souza, L., Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L. and Iacomini, M. 2011. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. Food Chem. 129: 305–311.

Bokhorst–van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, A. P., Kleerebezem, M. and Marco, L. M. 2001. short– and long–term adaptation to ethanol stress and its cross–protective consequences in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 77: 5247–5256.

Boumahdi, M., Mary, P. and Hornez, J. P. 1999. Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia. J. Appl. Microbiol. 87: 611–619.

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.

Buke, M. L. and Gilliland, E. S. 1990. 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.

Bxcommerce. 2001. What is inulin? (online). Available http://www.stonyfield.com (18 November 2009)

Cammarota, M., De Rosa, M., Stellavato, A., Lamberti, M., Marzaioli, I. and Giuliano, M. 2009. In vitro evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: Emphasis on innate immunity. Int. J. Food Microbiol. 135: 90–98.

Carlise, B. F., Elane, S. P., Stephanie, S. P., Isabella, B. M. and Renata, D. M. C. A. 2013. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB–12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. Food Sci. Technol. 50: 39–44.

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.

Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F., and Villaran, M. d. C. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate–chitosan capsules improves survival in simulated gastro–intestinal conditions. Int. J. Food Microbiol. 142: 185–189.

Champagne, C. P. and Cote, C. B. 1987. Cream fermentation by immobilized lactic acid bacteria. Biotechnol. Lett. 9: 329–332.

Choque, T. G., Wirla Cunha, M. Maróstica, M. R., Moreno, Y. M. F. and Pastore, M. G. 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. Food Res. Int. 44: 3167–3173.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 84: 759–768.

Cleveland, J., Montville, J. T., Nes, F. I. and Chikindas, L. M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71: 1–20.

Collins, J. K., Thornton, G. and Sullivan, G. D. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. Int. Dairy J. 8: 487–490.

Conway, P. L., Corback, S. L. and Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. J. Dairy Sci. 70: 1–12.

Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2005. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray–dried in the presence of prebiotic substances. J. Appl. Microbiol. 96: 1024–1039.

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. I., and Shah, N. P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter culture. Int. Dairy J. 7: 31–41.

Davidson, M. P., Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds Food microbiology. *In* Fundamentals and frontiers. p. 593–627. ASM press. Washington.

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.

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: M446–M450.

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.

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada. 30 April and 1 May 2002.

Fooks, L. J., Fuller, R. and Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53–61.

Foster, J. W. and Hall, H. K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* typhimurium. J. Bacteriol. 172: 771–778.

Fu, W. and Mathews, A. P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lacctobacillus plantarum* kinetic model and effect of pH, supstrate and oxygen. Bichem. Eng. J. 30: 163–170.

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

Gebara, C., Chaves, S. K., Ribeiro, E. M., Souza, N. F., Grosso, R. F. C. and Gigante, L. M. 2013. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Food Res. Int. 51: 872–878.

Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. J. Gastroenterol. Suppl. 18: 287–298.

Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. and Cumming, J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by FOS and inulin. J. Dairy Sci. 108: 975–982.

Gibson, G. R., Berry, O. P. and Rastall, R. A. 2000. Prebiotic: New Development in Functional Food. Chandos Publishing, Limited. Oxford.

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.

Gilliland, S. E. 1989. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. J. Dairy Sci. 72: 2483–2494.

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

Gomes, A. M. P. and Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and theraputical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci. Tech. 10: 139–157.

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. Brazil. J. Microbiol. 35: 151–156.

Guinee, T. P., Feeney, E. P., Auty, M. A. E. and Fox, P. F. 2002. Effect of pH and calcium concentration on textural and functional properties of mozzarella cheese. J. Dairy Sci. 85: 1655–1669.

Guzel–Seydim, Z., Seydım, A. C. and Greene, A. K. 2000. Organic acid and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. J. Dairy Sci. 83: 275–287.

Hayakawa, K., Mizutani, J., Wada, K., Masai, T., Yoshihara, I. and Mitsuoka, T. 1990. Effects of oligosaccharides on the human Faecal flora. Microb. Ecol. 3: 293–303.

Hayes, S. 1981. Dairy microbiology. National Dairy Council, London.

Hedley, C. L. 2001. Carbohydrates in Grain Legume Seeds: Improving Nutritional Quality and Agronomic Charecteristics. CABI publishing. Wallingford. UK.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S. and Razavi, S. H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem. 111: 50–55.

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.

Hougee, S., Vriesema, A. J. M., Wijering, S. C., Knippels, L. M. J., Folkerts, G., Nijkamp, F. P., Knol, J. and Garssen, J. 2010. Oral Treatment with Probiotics Reduces Allergic Symptoms in Ovalbumin–Sensitized Mice: A Bacterial Strain Comparative Study. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 151: 107–117.

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

Imeson, A., 1997. Thickening and gelling agent for food. *In* Chapter 2: Alginates. p23. Blackie: London. New York.

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: M18–M23.

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. Pediatr. Res. 32: 141–144.

Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT–Food Sci. Technol. 39: 1221–1227.

Karlsson, C., Ahrné, S., Molin, G., Berggren, A., Palmquist, I., Fredrikson, G. N. and Jeppsson, B. 2010. Probiotic therapy to men with incipient arteriosclerosis initiates increased bacterial diversity in colon: a randomized controlled trial. Atherosclerosis. 208: 228–233.

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

Kemp, L. T., Karim, N. M. and Linden, C. J. 1989. Response surface optimization of *Lactobacillus plantarum* batch growth. Biotechnol. Lett. 11: 817–820.

Kim, J. S., Cho, Y. S., Kim, H .S. Song, J. O., Shin, S., Cha, S. D. and Park, J. H. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT–Food Sci. Technol. 41: 493–500.

Kim, Y. and Wang, S. S. 2002. Physiochemical properties of inulin in baking as a fat substitute (online). Available http://www.confex.com. (15 July 2008).

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. Brit. J. Nutr. 87: S193–S197.

Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet, I. D., Wright, A. V., Poutanan, K. and Sandholm, T. M. 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.

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.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Int. Dairy J. 13: 3–13.

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.

Larsen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produce by *lactobacillus bavaricus* MI401. J. Appl. Bacteriol. 75: 113–122.

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.

Lee, H. W., Park, Y. W., Jung, J. S. and Shin, W. S. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacteria bifidium* and *Lactobacillus* sp. Food Microbiol. 8: 319–324.

Lei, V., Amoa–Awua, W. K. and Vrimer, L. 1999. Degradation of cyanoginic glycoside by *Lactobacillus plantarum* strans from spontaneous cassava fermentation and other microoganisms. Int. J. Food Microbiol. 53: 169–184.

Lindgren, S. E. and Pleje, M. 1983. Silage fermentation of fish or fish waste products with lactic acid bacteria. J. Food. Agric. 34: 1057–1067.

Lonnermark, E., Friman, V. and Lappas, G. 2010. Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. J. Clin. Gastroenterol. 44: 106–112.

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

Lourens–Hattingh, A. and Viljoen, B. C. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. Int. Dairy J. 11: 1–17.

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.

Martensson, O., Oste, R. and Holst, O. 2002. The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat–based, non–dairy product. Food Res. Int. 12: 173–182.

Martinez–Villaluenga, C., Frias, J., Gomez, R., Vidal–Valverde, C. 2006. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. Int. Dairy J. 16: 768–774.

Mary, P., Oching, D. and Tailliez, R. 1986. Growth status of rhizobia in reiation to their tolerance to low water activities and desiccation stresses. Soil. Biol. Biochem. 18: 179–184.

Mauguin, S. and Novel, G. 1994. Charecterization of lactic acid bacteria isolate from seafood. J. Appl. Bacteriol. 76: 616–625.

McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum.* Appl. Environ. Microbiol. 56: 2120–2124.

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.

Mirzaei, H., Pourjafar, H. and Homayouni, A. 2012. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. Food Chem. 132: 1966–1970.

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.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A. 1999. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. 39: 13–126.

Nazzaro, F., Fratiannia, F., Coppola, R., Sada, A. and Orlando, P. 2009. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. J. Funct. Foods 1: 319–323.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni1, F. and Coppola, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. Curr. Opinion Biotechnol. 23: 182–186**.**

Nissen, L., Chingwaru, W., Sgorbati, B., Biavati, B. and Cencic, A. 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: A functional study in the small intestinal cell model. Int. J. Food Microbiol. 135: 288–294.

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

Olano–Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. Brit. J. Nutr. 83: 247–255.

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.

Paul, B. 1997. Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine (online). Available http://medherb.com (20 November 2009).

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.

Penner, R., Richand, N. F. and Caren, L. M. 2005. Probiotic and nutraceutical: non medicinal treatment of gastrointestinal diseases. Curr. Opin. Pharmacol. 5: 596–603.

Post, R. C. 1996. Regulatory perspective of the USDA on the use of antimicrobials and inhibitors in foods. J. Food Prot. 1: 78–81.

Qin, H., Zhang, Z., Hang, X., and Jiang, Y. 2009. *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*–induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. BMC Microbiol. J. 63: 1–9.

Rao, A. V., Shiwnavain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolohgum* in simulated gastric and intestinal juiced. Cannda Ins. Food Sci. Technol. 22: 345–346.

Reinheimer, J. A., Quiberoni, A., Tailiez, P., Binetti, A. and Suarez, V. 1997. The lactic acid microflora of natural whey starters use in Argentina for hard cheese production. Int. Dairy J. 6: 869–879.

Renner, H. W. and Münzner, R. 1991. The possible role of probiotics as dietary antimutagens. Mutat. Res. Lett. 262: 239–245.

Rice, J. 2002. Probiotics and prebiotics for healthful benefits (online). Available on http://www.foodproductdesign.com/ archive/2002/0702AP.html. (17 May 2008).

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal Enterococcus faecium colonization. Vet. Microbiol. 92: 111–119.

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., Mättö, J. and Mattila–Sand–holm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197–215.

Schell, M. A., Kamirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Barger, B., Pessi, G., Zwanlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D. and Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Microbiology. 99: 14422–14427.

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

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

Shirota, M. 1962. *Lactobacillus* in health and disease. Yakult Honsha Co., Ltd. Japan.

Sohail, A., Turner, S. M., Prabawati, K. E., Coombes, G. A. A. and Bhandari, B. 2012. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. Int. J. Food Microbiol. 157: 162–166.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. and Ross, R. P. 1998. Probiotic Cheese. Int. Dairy J. 8: 491–496.

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

Steinkraus, K. H. 1995. Handbook of indigenous fermented foods. Marcel Dekker, Inc. New York.

Su, R., Zhu, X., Fan, D., Mi, Yu., Yang, C. and Jia, X. 2011, Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate–human–like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. Int. J. Biol. Macromol. 49: 979–984.

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.

Svensson, V. 1999. Probiotics a critical review. *In* Industrial perpective. (Tannock, G. W., ed). p. 57–64. Horizon Scientific Press. United Kingdom.

Swetwiwathana, A., Pilasombut, K. and Sethakul, J. 2009. An *in vitro* screening of isolated bacteriocin–producing lactic acid bacteria from Thai fermented meat for probiotic prospect. In the 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. 26–28 August 2009. Khon Kean, Thailand.

Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. 1985. Yogurt Science and Technology. 1st ed. Woodhead Publishing Limited. England.

Tanya, Z. 2002. The ecosystem in your gut: How prebiotic work? (online). Available http://www.Dietandbody.com (20 November 2009).

Terada, A., Hara, H., Kato, S., Kimura, T., Fujimori, I., Hara, K., Maruyama, T. and Mitsuoka, T. 1993. Effect of lactosucrose on faecal flora and faecal pulrefactive product of cats. J. Vet Med. Sci. 55: 291–295.

Toit, M. 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moistire content. J. Food Microbiol. 40: 93–104.

Uraipan, S. 2013. Screening of probiotic bacteria isolated from infant feces for development of synbiotic product. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.

Van, D. H., Schafasma, G., Muys, T. and Van, D. W. 1998. Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme–iron absorption in young healthy men. Am. J. Clin. Nutr. 67: 45–451.

Van Den Bergh, T. B. 1993. Lactic acid bacteria, the metabolic product and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 12: 221–238.

Vicki, K. 2002. Inulin. A prebiotic. (online). Available http://www.Stonyfield.com (18 November 2009).

Vinderola, C. G., Mocchiutti, P. and Reinheimer, J. A. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. J. Dairy Sci. 85: 721–729.

Wang, Y. C., Yu, R. C. and Chou, C. C. 2002. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of culture soymilk drinks. J. Food Microbiol. 19: 501–508.

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. p. 7–15. Blackie Academic and Professional. New York.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E. and Hang, Y. D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. LWT–Food Sci. Technol. 38: 73–75.

Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H. and Madanipour, M. M. 2012. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate–resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream–filled cake. Afr. J. Microbiol. Res. 6: 5511–5517.

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

ผลการทดลอง

Table 10. Comparative survival of free cell and encapsulated probiotic originated from human rat and sauerkraut after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C.

Probiotic strains	Viable cells (log CFU/ml)			
	Free cell		Encapsulated cell	
	Before	After	Before	After
L. plantarum CIF17 A5	9.11 ± 0.05	3.43 ± 0.07	9.05 ± 0.36	7.57 ± 0.04
L. acidophilus TISTR 1034	9.40 ± 0.13	2.11 ± 0.03	8.35 ± 0.24	5.47 ± 0.04
L. plantarum TISTR 875	9.61 ± 0.05	3.44 ± 0.09	8.41 ± 0.33	6.29 ± 0.08

Table 11. Effects of prebiotics and crude fibers as co-encapsulants on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C.

Prebiotics	Viable cells (log CFU/ml)	
	Before	After
free cell	9.13 ± 0.03	3.40 ± 0.47
encapsulated cell	9.14 ± 0.05	7.47 ± 0.52
co-encapsulated (sweet potato)	9.12 ± 0.02	7.39 ± 0.86
co-encapsulated (potato)	9.19 ± 0.05	7.81 ± 0.33
co-encapsulated (beet root)	9.68 ± 0.10	8.33 ± 0.47
co-encapsulated (FOS)	9.04 ± 0.03	7.43 ± 0.94

Table 12. Effects of different beet root crude fiber concentrations on survival of *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice pH 2.0 for 3 h at 37 °C.

Cell	**Viable cells (log CFU/ml)**	
	Before	**After**
free cell	9.25 ± 0.10	3.49 ± 0.08
encapsulated cell	9.37 ± 0.02	6.88 ± 0.02
co-encapsulated 1% beet root	9.75 ± 0.09	6.02 ±0.03
co-encapsulated 2% beet root	9.85 ± 0.04	8.65 ± 0.09
co-encapsulated 3% beet root	9.20 ± 0.14	7.94 ± 0.09
co-encapsulated 2% FOS	9.04 ± 0.04	7.44 ± 0.04

Table 13. %Survival and cell number (log CFU/ml) of encapsulated *L. plantarum* CIF17 A5 after exposure to simulated gastric juice (pH 2.0 for 3 h) and bile salt conditions (bile salt 0.3% for 6 h).

Incubation time (h)		Free cell		Encapsulated cell		Co-encap beet root		Co-encap FOS	
		Log CFU/ml	% Survival	Log CFU/ml	% Survival	Log CFU/ml	% Survival	Log CFU/ml	% Survival
exposure to acid	0	9.28±0.05	100.00±0.59	9.30±0.10	100.00±1.12	9.61±0.07	100.00±0.71	9.06±0.07	100.00±0.83
	1	7.48±0.11	80.60±1.16	8.89±0.04	95.57±0.40	9.15±0.10	95.17±1.08	8.78±0.05	96.95±0.55
	2	5.65±0.11	60.88±1.14	8.12±0.04	87.39±0.47	8.60±0.07	89.45±0.73	8.08±0.07	89.18±0.79
	3	3.54±0.12	38.17±1.14	7.54±0.07	81.15±0.75	8.33±0.07	86.70±0.76	7.57±0.10	83.60±1.12
exposure to bile	4	3.52±0.07	37.89±0.72	7.41±0.06	79.66±0.63	8.32±0.04	86.55±0.41	7.41±0.05	81.79±0.56
	5	3.52±0.03	37.92±0.37	7.30±0.07	78.48±0.74	8.20±0.07	85.29±0.74	7.25±0.09	80.00±1.01
	6	3.45±0.08	37.21±0.91	7.22±0.05	77.64±0.51	8.16±0.04	84.91±0.39	7.06±0.06	77.89±0.67
	7	3.38±0.04	36.47±0.44	6.98±0.17	75.12±1.82	8.10±0.13	84.31±1.32	7.04±0.09	77.75±1.01
	8	3.33±0.05	35.91±0.49	6.68±0.06	71.87±0.59	8.03±0.10	83.56±1.01	7.01±0.13	77.33±1.39
	9	3.30±0.04	35.59±0.46	6.45±0.11	69.42±1.19	7.98±0.07	83.06±0.71	6.88±0.07	75.96±0.82

Co-encap beet root; co-encapsulation with 2% beet root crude fiber.

Co-encap FOS; co-encapsulation with 2% fructooligosaccharide.

Table 14. Viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in various concentrations of salt.

Medium	Cell	Viable cells (log CFU/ml)				
		Storage period (days) at 4 °C				
		0	1	4	7	14
MRS	Free Cell	8.08±0.14	7.98±0.14	6.61±0.14	6.63±0.14	6.14±0.14
	Encapsulated	8.02±0.09	7.93±0.09	7.73±0.09	7.69±0.09	7.77±0.09
	Encap BR	8.07±0.14	8.03±0.14	8.00±0.14	7.99±0.14	7.88±0.14
	Encap FOS	8.06±0.12	8.01±0.12	7.84±0.12	7.93±0.12	7.87±0.12
2% Nacl	Free Cell	8.08±0.14	7.88±0.22	7.34±0.19	6.46±0.20	5.21±0.08
	Encapsulated	8.02±0.21	8.04±0.09	8.00±0.16	7.99±0.18	7.43±0.26
	Encap BR	8.07±0.17	8.07±0.14	8.06±0.09	8.03±0.23	7.54±0.30
	Encap FOS	8.06±0.16	8.04±0.10	8.02±0.12	7.98±0.09	7.46±0.22
4% Nacl	Free Cell	8.08±0.43	7.93±0.47	7.23±0.10	6.28±0.35	4.96±0.22
	Encapsulated	8.02±0.27	8.00±0.19	7.91±0.17	7.88±0.18	7.16±0.14
	Encap BR	8.07±0.12	8.05±0.28	8.01±0.21	7.94±0.27	7.28±0.14
	Encap FOS	8.06±0.19	7.99±0.12	7.97±0.12	7.84±0.22	7.20±0.29
6% Nacl	Free Cell	8.08±0.20	7.94±0.22	7.46±0.37	5.44±0.19	2.63±0.18
	Encapsulated	8.02±0.33	8.00±0.08	7.82±0.16	7.52±0.31	6.63±0.29
	Encap BR	8.07±0.13	8.08±0.10	7.92±0.16	7.62±0.22	6.66±0.43
	Encap FOS	8.06±0.26	8.07±0.22	7.92±0.17	7.56±0.31	6.57±0.25
8% Nacl	Free Cell	8.08±0.22	7.96±0.18	6.75±0.19	3.94±0.12	1.62±0.41
	Encapsulated	8.02±0.18	8.00±0.45	7.84±0.08	7.59±0.25	6.28±0.14
	Encap BR	8.07±0.23	8.06±0.39	7.96±0.10	7.48±0.41	6.56±0.38
	Encap FOS	8.06±0.18	8.01±0.22	7.78±0.07	7.28±0.18	6.49±0.44

Encap BR; co-encapsulation with 2% beet root crude fiber.

Encap FOS; co-encapsulation with 2% fructooligosaccharide.

Table 15. Viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in various concentrations of sucrose.

Medium	Cell	Viable cells (log CFU/ml)				
		Storage period (days) at 4 °C				
		0	1	4	7	14
MRS	Free Cell	7.95±0.10	7.88±0.20	7.62±0.31	6.97±0.44	6.36±0.44
	Encapsulated	8.19±0.08	8.15±0.23	8.04±0.15	7.99±0.06	7.96±0.21
	Encap BR	8.15±0.09	8.09±0.22	8.00±0.12	7.99±0.23	7.93±0.11
	Encap FOS	8.17±0.28	8.11±0.17	8.01±0.13	7.96±0.15	7.91±0.22
5% Sucrose	Free Cell	7.95±0.10	7.99±0.16	6.68±0.19	6.06±0.16	5.54±0.10
	Encapsulated	8.19±0.08	8.09±0.33	7.99±0.10	7.87±0.07	7.50±0.38
	Encap BR	8.15±0.09	8.08±0.14	7.97±0.14	7.88±0.08	7.55±0.17
	Encap FOS	8.17±0.28	8.04±0.24	7.96±0.22	7.88±0.22	7.42±0.20
10% Sucrose	Free Cell	7.95±0.10	7.91±0.23	6.41±0.31	5.87±0.22	4.96±0.19
	Encapsulated	8.19±0.08	8.11±0.18	7.56±0.27	7.38±0.10	5.86±0.23
	Encap BR	8.15±0.09	8.10±0.11	7.81±0.16	7.66±0.37	6.38±0.07
	Encap FOS	8.17±0.28	8.15±0.18	7.62±0.23	7.63±0.26	6.30±0.12
15% Sucrose	Free Cell	7.95±0.10	7.84±0.13	6.33±0.18	5.62±0.45	2.24±0.33
	Encapsulated	8.19±0.08	8.12±0.22	7.98±0.20	7.49±0.42	5.63±0.25
	Encap BR	8.15±0.09	8.12±0.15	7.92±0.27	7.58±0.16	6.84±0.11
	Encap FOS	8.17±0.28	8.11±0.28	7.89±0.27	7.52±0.12	6.73±0.27
20% Sucrose	Free Cell	7.95±0.10	7.46±0.39	6.46±0.68	3.85±0.44	1.70±0.48
	Encapsulated	8.19±0.08	8.04±0.21	7.41±0.37	6.14±0.22	3.95±0.18
	Encap BR	8.15±0.09	8.08±0.18	7.33±0.16	6.15±0.26	4.23±0.39
	Encap FOS	8.17±0.28	8.02±0.15	7.27±0.17	5.95±0.71	4.15±0.15

Encap BR; co-encapsulation with 2% beet root crude fiber.

Encap FOS; co-encapsulation with 2% fructooligosaccharide.

Table 16. Viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in various concentrations of skim milk.

Medium	Cell	Viable cells (log CFU/ml)				
		Storage period (days) at 4 °C				
		0	1	4	7	14
MRS	Free Cell	8.07±0.11	8.02±0.11	7.90±0.03	7.63±0.20	7.40±0.30
	Encapsulated	8.11±0.25	8.10±0.24	8.00±0.16	7.96±0.22	7.72±0.42
	Encap BR	8.12±0.17	8.10±0.26	8.03±0.18	8.01±0.07	7.80±0.40
	Encap FOS	8.11±0.31	8.06±0.23	8.01±0.13	7.89±0.26	7.78±0.15
5% skimmilk	Free Cell	8.07±0.11	8.04±0.20	7.88±0.23	7.59±0.23	7.21±0.18
	Encapsulated	8.11±0.25	8.09±0.11	7.99±0.22	7.90±0.02	7.77±0.38
	Encap BR	8.12±0.17	8.15±0.16	8.02±0.29	7.98±0.15	7.87±0.37
	Encap FOS	8.11±0.31	8.05±0.26	8.00±0.14	7.85±0.29	7.73±0.14
10% skimmilk	Free Cell	8.07±0.11	8.02±0.17	7.96±0.19	7.61±0.31	7.43±0.24
	Encapsulated	8.11±0.25	8.04±0.18	8.01±0.24	7.96±0.17	7.81±0.20
	Encap BR	8.12±0.17	8.08±0.13	8.04±0.27	8.04±0.19	7.92±0.27
	Encap FOS	8.11±0.31	8.09±0.55	8.01±0.26	7.96±0.19	7.74±0.20
15% skimmilk	Free Cell	8.07±0.11	8.07±0.29	7.94±0.19	7.71±0.33	6.96±0.46
	Encapsulated	8.11±0.25	8.10±0.18	8.05±0.32	8.02±0.18	7.86±0.23
	Encap BR	8.12±0.17	8.08±0.23	8.02±0.16	8.02±0.25	7.97±0.25
	Encap FOS	8.11±0.31	8.11±0.19	8.07±0.11	8.01±0.12	7.89±0.13
20% skimmilk	Free Cell	8.07±0.11	8.05±0.14	7.90±0.27	7.64±0.22	6.95±0.43
	Encapsulated	8.11±0.25	8.07±0.28	8.03±0.17	7.97±0.18	7.62±0.40
	Encap BR	8.12±0.17	8.11±0.24	8.04±0.20	8.01±0.08	7.90±0.24
	Encap FOS	8.11±0.31	8.10±0.26	7.97±0.15	7.92±0.26	7.81±0.23

Encap BR; co-encapsulation with 2% beet root crude fiber.

Encap FOS; co-encapsulation with 2% fructooligosaccharide.

Table17. Influence of acid on the viability of *L. plantarum* CIF17 A5 (log CFU/ml) in MRS adjusted to pH 4.5 with various kinds of organic acids.

Medium	Cell	Viable cells (log CFU/ml)				
		Storage period (days) at 4 °C				
		0	1	4	7	14
MRS	Free Cell	8.10±0.14	7.96±0.34	7.72±0.25	7.04±0.37	6.44±0.26
	Encapsulated	8.11±0.25	8.07±0.15	8.02±0.13	7.96±0.27	7.83±0.36
	Encap BR	8.13±0.25	8.11±0.22	8.08±0.25	8.06±0.19	8.01±0.38
	Encap FOS	8.09±0.27	8.07±0.16	8.03±0.20	7.98±0.15	7.94±0.24
MRS-HCl	Free Cell	8.10±0.14	7.89±0.31	7.73±0.36	7.06±0.39	6.38±0.24
	Encapsulated	8.11±0.25	8.10±0.15	8.04±0.26	8.00±0.17	7.96±0.31
	Encap BR	8.13±0.25	8.06±0.51	8.05±0.28	8.01±0.20	8.00±0.23
	Encap FOS	8.09±0.27	8.05±0.37	8.02±0.13	7.99±0.24	7.92±0.36
MRS-lactic	Free Cell	8.10±0.14	7.90±0.45	7.73±0.29	7.04±0.32	6.39±0.37
	Encapsulated	8.11±0.25	8.05±0.19	8.03±0.22	8.00±0.21	7.90±0.27
	Encap BR	8.13±0.25	8.09±0.16	8.03±0.20	8.03±0.17	7.95±0.23
	Encap FOS	8.09±0.27	8.05±0.25	8.03±0.21	7.99±0.28	7.93±0.18
MRS-acetic	Free Cell	8.10±0.14	7.91±0.31	7.75±0.07	6.98±0.46	6.41±0.36
	Encapsulated	8.11±0.25	8.07±0.30	8.03±0.41	8.01±0.13	7.86±0.31
	Encap BR	8.13±0.25	8.08±0.05	8.07±0.18	8.07±0.14	8.01±0.09
	Encap FOS	8.09±0.27	8.10±0.14	8.02±0.32	8.02±0.11	7.96±0.22
MRS-citric	Free Cell	8.10±0.14	7.89±0.36	7.78±0.36	6.97±0.44	6.44±0.26
	Encapsulated	8.11±0.25	8.13±0.18	8.06±0.24	8.02±0.18	7.86±0.29
	Encap BR	8.13±0.25	8.09±0.23	8.03±0.28	8.01±0.30	7.94±0.20
	Encap FOS	8.09±0.27	8.09±0.52	8.07±0.23	7.99±0.30	7.93±0.10

Encap BR; co-encapsulation with 2% beet root crude fiber.

Encap FOS; co-encapsulation with 2% fructooligosaccharide.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสิรสา สุมงคล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5111020050

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

-

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sirasa Sumongkhon and Tipparat Hongpattarakere. 2011. Survival enhancement of probiotic by co-encapsulation with root crop fiber. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Systems Biotechnology: Quality & Success”. Imperial Queen’s Park Hotel Bangkok, Thailand. 1-2 Fabuary 2011. pp. 155.