



การคัดเลือกและการห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการผลิต
ไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก

**Screening and Encapsulation of Probiotic Bacteria for the Production of
Probiotic Fortified Ice Cream**

ฮาเสีย อะยามา
Hasiah Ayama

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Food Science and Technology**

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การคัดเลือกและการห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการผลิต
ไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก

**Screening and Encapsulation of Probiotic Bacteria for the Production of
Probiotic Fortified Ice Cream**

ฮาเสีย อะยามา

Hasiah Ayama

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Food Science and Technology

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและการห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการผลิตไอศกรีม
 เสริมโพรไบโอติก

ผู้เขียน นางสาวฮาเสียะ อะยามา

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปณณาณี สัมภาวะผล)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณี วิทยานนท์)
กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปณณาณี สัมภาวะผล)
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)
กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณ ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
 ของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน
เกี่ยวข้องกับทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุณณานิ สัมภาวะผล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวฮาเสียะ อะยามา)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวฮาเสียะ อะยามา)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและการห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการผลิตไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก
ผู้เขียน	นางสาวฮาเสียะ อะยามา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากนมวัวและนมแพะจำนวน 108 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารที่พีเอช 3, 2 และ 1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ได้มากกว่าร้อยละ 50 จำนวน 48, 29 และ 8 ไอโซเลท ตามลำดับ ทั้งนี้มีแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ที่สามารถรอดชีวิตได้มากกว่าร้อยละ 50 ในสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แต่มีเพียง 7 ไอโซเลท ที่สามารถรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมงแบบต่อเนื่องได้มากกว่าร้อยละ 50 และแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลท มีความสามารถในการเกาะติดต่ำกว่าร้อยละ 20 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* และ *Listeria monocytogenes*) พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท (CM21, CM47 และ CM53) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบได้ การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถย่อยเกลือน้ำดีชนิด glycodeoxycholate ได้ และมีเพียง 2 ไอโซเลท (CM21 และ CM53) ที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีชนิด glycocholate ได้ เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท (CM21, CM47 และ CM53) มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16s rDNA พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99.17, 99.79 และ 98.91 ตามลำดับ จากนั้นนำ *Lactobacillus plantarum* CM53 มาศึกษาผลของการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตโดยวิธีอิมัลชัน, การห่อหุ้มด้วยเพคตินและคาร์ราจีแนนโดยวิธีเอกซ์ทรูชัน และผลของการเติมซูโครสลงในวัสดุห่อหุ้ม พบว่าการห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CM53 ด้วยอัลจิเนตร้อยละ 3 ที่ไม่เติมซูโครส และการห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคติน ร้อยละ 5 ร่วมกับการเติมซูโครส ร้อยละ 5 มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสูง สามารถปกป้องเซลล์ในสภาวะแช่เยือกแข็ง ไอศกรีมได้ สามารถปกป้องเซลล์ในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารได้ และสามารถปลดปล่อยเซลล์ได้สูงในสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กส่วนต้น จากนั้นทำการผลิตไอศกรีมวานิลลาเสริมโพรไบโอติก

Lactobacillus plantarum CM53 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยวัสดุพองที่คัดเลือกทั้ง 2 ชนิด และเซลล์อิสระ พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุดในสภาวะการผลิตและเก็บรักษาไอศกรีม โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา นาน 8 สัปดาห์ เมื่อนำมาทดสอบลักษณะทางกายภาพ ชีวภาพ และประสาทสัมผัสของไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก พบว่าไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินตมีค่าทางกายภาพไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ไอศกรีมเสริมเซลล์โพรไบโอติกแบบอิสระ) มีค่าทางชีวภาพไม่เกินค่ามาตรฐาน และผู้บริโภคให้การยอมรับไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินต

Thesis Title Screening and Encapsulation of Probiotic Bacteria for the Production of Probiotic Fortified Ice-Cream

Author Miss Hasiah Ayama

Major Program Food Science and Technology

Academic Year 2013

Abstract

Probiotic testing of 108 isolates of lactic acid bacteria (LAB) isolated from cow and goat milk showed that there were 48, 29 and 8 isolates could survive more than 50 percent in simulated gastric juice at pH 3, 2 and 1 at 37°C for 3 h, respectively. Moreover, all 8 isolates could survive more than 50 percent in simulate intestinal tract condition at 37°C for 4 h. However, only 7 isolates could survive more than 50 percent in continuous simulate gastrointestinal tract condition at 37°C for 7 h and showed less than 20 percent hydrophobicity. Among them, 3 isolates (CM21, CM47 and CM53) exhibited antimicrobial activity against all pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*). These LAB were able to hydrolyze glycodeoxycholate and only 2 of them (CM21 and CM53) were able to hydrolyze glycocholate. All 3 isolates (CM21, CM47 and CM53) were identified by 16S rDNA sequencing as *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* with similarity of 99.17, 99.79 and 98.91, respectively. Accordingly, *Lactobacillus plantarum* CM53 was selected to study the effect of encapsulation with alginate by emulsion technique, low-methoxy pectin and carrageenan by extrusion technique and the effect of addition of sucrose. The encapsulation with 3% alginate without sucrose and 5% low methoxy pectin with 5% sucrose showed high encapsulation efficiency, survival ability in the freezing condition of ice cream and gastrointestinal tract condition and releasing ability in simulated small intestine (jejunum) condition. Then the study of the production of probiotic fortified ice cream with *Lactobacillus plantarum* CM53 in 3 forms (free cells, cells encapsulated with 3% alginate without sucrose and cells encapsulated with 5% low methoxy pectin with 5% sucrose) were evaluated. It was found that cells encapsulated with 3% alginate showed the highest protection during production and storage of ice cream as the number of encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 was constant throughout the storage time for 8 weeks. The ice cream fortified with probiotic cells

encapsulated with alginate showed the physical characteristic not difference form the control (ice cream fortified with free cell). The microbiological quality of ice cream fortified with encapsulated cells does not excess the standard requirement. Moreover, the sensory test showed that the consumers accepted the ice cream fortified with probiotic cells encapsulated with alginate.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่านซึ่งไม่อาจจะนำมากล่าวได้ทั้งหมด ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่ข้าพเจ้าใคร่ขอกราบขอบพระคุณคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปยุตต์ วัฒนศิริ สัมภาษณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ท่านที่สอง คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะขุม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณี วิทยานนท์ และรองศาสตราจารย์ ดร. วรรณ ชูฤทธิ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครอบครัว ตลอดจนเพื่อนๆ และผู้มีพระคุณที่มีได้เอื้อนามไว้ ณ ที่นี้ทุกท่าน สำหรับกำลังใจที่มีให้ตลอดจนสำเร็จการศึกษา สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ข้าพเจ้าขอมอบส่วนที่ดีของวิทยานิพนธ์ให้แก่ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขออภัยและขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

สุดท้ายข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ และทุนการศึกษาระดับปริญญาโทจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนในการทำวิจัย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ฮาเสียะ อะยามา

เมษายน 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(5)
Abstract.....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(9)
สารบัญ.....	(10)
LIST OF TABELS.....	(14)
LIST OF FIGUES.....	(16)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	3
1. โพรไบโอติก.....	3
1.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก.....	3
1.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก.....	5
1.3 แหล่งของโพรไบโอติก.....	7
1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	9
2. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก.....	11
2.1 โครงสร้างของแคปซูลจากกระบวนการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก.....	12
2.2 วัตถุประสงค์ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก.....	12
2.3 วิธีการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก.....	14
2.4 วัสดุพุงที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก.....	15
2.5 ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก.....	20
3. ไอศกรีม.....	23
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม.....	23
4.1 ส่วนผสม.....	23
4.2 กระบวนการแช่เยือกแข็ง.....	24
4.3 กระบวนการเติมอากาศ.....	24
4.4 ระยะเวลาการเก็บรักษา.....	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 สายพันธุ์ของโพรไบโอติก.....	25
5. ผลของสารป้องกันความชื้นต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก.....	26
5.1 สารป้องกันความชื้นที่ใช้สำหรับโพรไบโอติก.....	26
5.2 ผลของการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับสารป้องกันความชื้น.....	27
วัตถุประสงค์.....	28
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ.....	29
วัสดุอุปกรณ์.....	29
1. วัสดุ.....	29
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3. สารเคมี.....	30
วิธีการ.....	31
1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติก.....	31
1.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากนม.....	31
1.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นในหลอดทดลอง (<i>in vitro</i>).....	32
1.3 การเทียบเคียงสายพันธุ์ลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.....	35
2. การศึกษาคัดเลือกวัสดุพุงที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่ คัดเลือกได้.....	35
2.1 ศึกษาความเข้มข้นของวัสดุพุงชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้ม เซลล์โพรไบโอติก.....	35
2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยกล่อง จุลทรรศน์แบบส่องกราด.....	38
2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก.....	38
2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในสภาวะแช่เยือกแข็ง ไอศกรีม.....	38
2.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ในสภาวะเลียนแบบ ทางเดินอาหารโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง.....	39
2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจล.....	40
3. ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในขั้นตอนการผลิตไอศกรีม.....	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกเริ่มต้น.....	40
3.2 การผลิตไอศกรีมวานิลลา.....	41
3.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกที่เติมในไอศกรีมเหลวก่อนการปั่นไอศกรีม.....	41
3.4 ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่เติมหลังการปั่นไอศกรีม.....	42
3.5 การตรวจสอบคุณภาพของไอศกรีม.....	42
4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	43
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์การทดลอง.....	44
1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.....	44
1.1 แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนม.....	44
1.2 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นในหลอดทดลอง (<i>In vitro</i>) ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้.....	46
2. สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกจากนมวัวที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.....	57
3. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้.....	63
3.1 ความเข้มข้นของวัสดุพุงที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้.....	63
3.2 ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มเซลล์ <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 โดยใช้วัสดุพุงแตกต่างกัน.....	67
3.3 ผลของชนิดวัสดุพุงต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก....	69
3.4 ผลของชนิดวัสดุพุงต่อประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในไอศกรีม-แช่แข็ง.....	70
3.5 ผลของชนิดวัสดุพุงต่อประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์โพรไบโอติกในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหาร.....	72
3.6 ผลของชนิดวัสดุพุงต่อความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์.....	75
4. ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในขั้นตอนการผลิตไอศกรีม.....	76
4.1 การรอดชีวิตของ <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 ที่เติมก่อนกระบวนการปั่นไอศกรีม.....	76
4.2 การรอดชีวิตของ <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 ที่เติมหลังกระบวนการปั่นไอศกรีม.....	79

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ลักษณะ โครงสร้างเจลของเม็ดเจลอัลจินตและเพคติน.....	81
4.4 คุณภาพของไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก.....	82
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	87
สรุปผลการทดลอง.....	88
ข้อเสนอแนะ.....	89
เอกสารอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก.....	102
ประวัติผู้เขียน.....	119

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Potential clinical targets of probiotic intervention.....	6
2. Examples of common probiotics.....	11
3. Encapsulation of probiotic bacteria by extrusion technique.....	14
4. Encapsulation of probiotic bacteria by emulsion technique.....	17
5. Positive and negative features of extrusion and emulsion.....	20
6. Concentration of sodium alginate and sucrose using as supporting material for encapsulation of probiotic.....	36
7. Concentration of pectin and sucrose using as supporting material for encapsulation of probiotic.....	37
8. Concentration of κ -carragenan and sucrose using as supporting material for encapsulation of probiotic.....	37
9. Ingredients of vanilla ice cream.....	39
10. Number of bacteria isolated from cow and goat milk	44
11. Number of lactic acid bacterial strains isolated from cow and goat milk	45
12. Inhibition of pathogenic bacteria by selected lactic acid bacterial strains using agar spot test.....	52
13. Bile salt hydrolase activity of selected lactic acid bacteria.....	57
14. The probiotic properties of selected lactic acid bacteria.....	59
15. Effect of encapsulation on the survival of <i>Lactobacillus. plantarum</i> CM53 during exposure to simulated gastrointestinal tract condition for 7 h.....	74
16. Effect of freezing and hardening on total viable count of <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 in ice cream	78
17. Effect of hardening on the total viable count of <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 added in ice cream after freezing.....	80
18. Physical characteristics of probiotic fortified ice cream	84
19. Total viable count, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Bacillus cereus</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> count in probiotic fortified ice cream.....	85
20. Sensory evaluation of beads fortified ice cream.....	86
21. Adhesion ability of selected lactic acid bacterial strains to n-hexadecane.....	111
22. Effect of supporting material on encapsulation efficiency of <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53.....	112

LIST OF TABELS (Cont.)

Table		Page
23.	Survival of encapsulated <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 during exposure to ice cream hardening at-20° for 48 h.....	113
24.	Releasing ability of <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 from 3% alginate and 5% low methoxy pectin beads in simulated small intestine condition (PBS pH 7.2 at 37°C) for 6 h.....	114
25.	Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 cells added to ice cream mixed before freezing.....	115
26.	Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 cells added to ice cream after freezing.....	116

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The numerically dominant microbial genera in the adult human gastrointestinal tract.....	8
2. Structure of capsule.....	12
3. The molecular structure of alginate.....	16
4. The molecular structure of pectin	18
5. Idealized structures of the three types of carrageenan.....	19
6. Survival rate of selected lactic acid bacteria isolates after exposure to simulated gastrointestinal tract condition at 37 °C.....	49
7. Adhesion ability of selected lactic acid bacterial strains to n-hexadecane.....	51
8. Inhibition of pathogenic bacteria by selected lactic acid bacterial strains using overlay assay.....	55
9. Neighbour-joining tree comprising 16S rRNA gene sequences of strain CM21 and related <i>Lactobacillus</i> sp.	60
10. Neighbour-joining tree comprising 16S rRNA gene sequences of strain CM47 and related <i>Lactobacillus</i> sp.	61
11. Neighbour-joining tree comprising 16S rRNA gene sequences of strain CM53 and related <i>Lactobacillus</i> sp.	62
12. Photographs showing the characteristics of 1 (A), 2 (B) and 3% (C) alginate with 2% Hi-maize beads and 0(a), 5(b) and 10% (c) sucrose by emulsion technique...	65
13. Photographs showing the characteristics of 5% low methoxy pectin (A) and 2.5% low methoxy pectin +2.5% high methoxy-pectin (B) beads and 0 (a), 5 (b) and 10% (c) sucrose by extrusion technique.....	66
14. Photographs showing the characteristics of 3% (a) and 4% (b) carrageenan and 10% sucrose by extrusion technique.....	67
15. Scanning electron microscopy picture of alginate containing 2% Hi-maize (A), pectin (B) and carrageenan containing 10% sucrose (C) beads	68
16. Structure of outer surface of 3% alginate (a) and 5% low methoxy pectin containing 5% sucrose (b) and 4% carrageenan beads (c)	68
17. Encapsulation efficiency of <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 by different supporting materials.	70
18. Survival rate of encapsulated <i>Lactobacillus plantarum</i> CM 53 during ice cream hardening (-20°C) for 48 h.	72

LIST OF FIGURES

Figure		Page
19.	Charecteristic of beads before exposure to simulated gastrointestinal tract condition (a); after expose simulated gastric juice (b) and after expose simulated small intes tine.....	73
20.	Releasing of <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 from alginate beads in simulated small intestine (PBS pH 7.2) at 37°C for 6 h.	76
21.	Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 cells added in ice cream before freezing.....	79
22.	Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated <i>Lactobacillus plantarum</i> CM53 cells fortified in ice cream were added after freezing	81
23.	Charecteristic ice cream fortified with free cells (a) and cells encapsulated with alginate (b) or pectin (c)	82

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

โพรไบโอติก (Probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ป้องกันความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร ลดการเกิดโรคลำไส้อักเสบ ลดการเกิดมะเร็ง ลดการแพ้ น้ำตาลแลคโตส ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ลดผลข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะที่มีต่อลำไส้ และช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น (พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522ก, 2554; Begley *et al.*, 2006; Fuller, 1989) จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติดังนี้ ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือแร่ในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติก ยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (อัจฉรา หนูเพชร, 2546)

ผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน โดยในปี 2554 มีมูลค่าการตลาดรวมมากกว่า 2 หมื่นล้านดอลลาร์ (Marketsandmarkets, 2013) อุตสาหกรรมอาหารมีการนำโพรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์นมและนมเปรี้ยวพร้อมดื่มประเภทพาสเจอร์ไรส์ โยเกิร์ต ชีส และผลิตภัณฑ์นมผง เป็นต้น (สยามธุรกิจ, 2556) ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเป็นผลิตภัณฑ์นมชนิดหนึ่ง มีค่าทางโภชนาการสูงมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน และเป็นแหล่งสำคัญของกรดอะมิโนทริปโตเฟนและไลซีน (พัชรินทร์ รักถาวร, 2542) นอกจากนี้ไอศกรีมถือเป็นของหวานที่มีความเป็นสากล ได้รับความนิยมจากคนทั่วโลก ตั้งแต่เด็กจนถึงผู้ใหญ่ ตลาดไอศกรีมปี 2555 มีมูลค่าสูงถึง 16,500 ล้านบาท และมีแนวโน้มการขยายตัวเพิ่มสูงขึ้น (ฐานเศรษฐกิจออนไลน์, 2555) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกลงไป (Homayouni *et al.*, 2008b)

อย่างไรก็ตามการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหาร มักประสบปัญหา เนื่องจากโพรไบโอติกที่เสริมลงไปเกิดการบาดเจ็บ หรือไม่สามารถรอดชีวิตได้ในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษา และเมื่อโพรไบโอติกเหล่านี้ผ่านเข้าสู่ร่างกาย ต้องผ่านระบบย่อยอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดและเอนไซม์เปปซินในกระเพาะอาหาร รวมทั้งสภาวะเป็นด่าง เกลือแร่ และเอนไซม์เพนกรีเอตินในลำไส้เล็ก ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลให้จำนวนโพรไบโอติกที่มีชีวิตลดจำนวนลง จนอาจไม่เพียงพอที่จะก่อประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ ตามข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุข ผลิตภัณฑ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ต้องมีจำนวนจุลินทรีย์

โพรไบโอติกที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 6 Log Colony Forming Unit (CFU) ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหาร (พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522ก, 2554) การห่อหุ้มโพรไบโอติก (Encapsulation) คือ กระบวนการที่เซลล์โพรไบโอติกถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลด้วยพอลิเมอร์เป็นชั้นบางๆ เกิดเป็นไมโครแคปซูลซึ่งมีขนาดเล็ก ชั้นพอลิเมอร์บางๆ ที่นำมาหุ้มจะเป็นตัวป้องกันเซลล์ไม่ให้สัมผัสกับสภาวะที่เป็นอันตราย และปลดปล่อยเซลล์ที่อยู่ภายในออกมาในสภาวะที่ต้องการ

งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากนมวัว และนมแพะ รวมทั้งศึกษาชนิด และความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ โดยสามารถป้องกัน และปลดปล่อยเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารได้ รวมทั้งสามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ในสภาวะการผลิต และเก็บรักษาไอศกรีม แล้วทำการผลิตไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม

การตรวจเอกสาร

1. โพรไบโอติก

โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต อาจมีเพียงสายพันธุ์เดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ จุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง (Freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมัก เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ให้สมดุล และส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เจ้าถิ่นที่มีประโยชน์ (พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522ก, 2554; Mohammadi *et al.*, 2011)

1.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

1.1.1 สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร

กระเพาะอาหารมีค่าพีเอชอยู่ที่ประมาณ 1-3 ซึ่งเกิดจากร่างกายหลั่งกรดไฮโดรคลอริก และเอนไซม์เปปซินถูกสร้างขึ้นเพื่อช่วยในการย่อยอาหาร ค่าพีเอชที่ต่ำและการทำลายแบคทีเรียของเอนไซม์เปปซิน มีผลต่อการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเมื่อผ่านกระเพาะไปถึงลำไส้ (Huang and Adams, 2004) โดยทั่วไปความสามารถในการต้านทานต่อกรด และพีเอชจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโพรไบโอติก โดย *Bifidobacteria* มีความสามารถในการทนต่อกรดหรือพีเอชน้อยกว่า *Lactobacillus* จากรายงานพบว่า *Lactobacillus acidophilus* เป็นสายพันธุ์ที่มีไซโทพลาสติกเมมเบรน (Cytoplasmic membran) มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์สูง (pH 3.72-7.74) ช่วยให้การทนต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอช และมีความคงตัวภายใต้สภาวะกรด นอกจากนี้อิทธิพลของเอนไซม์ โดยเฉพาะ H^+ -ATPase จะมีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะกรดด้วย (Mohammadi *et al.*, 2011)

1.1.2 สามารถทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt) ในลำไส้เล็ก

เกลือน้ำดี คือ โซเดียมไกลโคโคเลต (Sodium glycocholate) และ โซเดียมทอโรโคเลต (Sodium taurocholate) ถูกสร้างขึ้นมาจากโคเลสเตอรอลโดยตับ สารเหล่านี้จะถูกหลั่งเป็นน้ำดีโดยเซลล์ตับผ่านทางท่อน้ำดี (Bile duct) เข้าสู่ถุงน้ำดี (Gallbladder) ช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ (Taranto *et al.*, 1996) น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 1.5-2.0 ในช่วงโอม่งแรกของการย่อยอาหาร จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณร้อยละ 0.3 (Noriega *et al.*, 2004) จากรายงานของ Shirota (1962) อ้างโดย พัชรวรรณ รัตนอุบล, 2552) พบว่า *Lactobacillus* ที่มีสามารถทนเกลือน้ำดีสูง ได้แก่

Lactobacillus bulgaricus, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* โดยสามารถทนเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ

1.1.3 สามารถเกาะติดกับเยื่อผนังลำไส้

เมื่อโพรไบโอติกเข้าสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์จะสามารถก่อประโยชน์ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกาะติดกับเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้ (Printo *et al.*, 1983; Blay *et al.*, 2004) การเคลือบของโพรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารจะทำให้การย่อยอาหาร และการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ Gusils และคณะ (1999 อ้างโดย มงคล ธีรบุญยานนท์ และปิยะนุช เนียมทรัพย์, 2550) รายงานว่า *Lactobacillus animalis* และ *Lactobacillus fermentum* มีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์อพิทีเลียม (Epithelium) ของกระเพาะ ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ได้ โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพดี ต้องสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในเขี้ยวติดเกาะผนังลำไส้ โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ก่อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัว เพื่อให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (Segmentation) จากการศึกษาของ Rinkinen และคณะ (2003) พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Lactobacillus pentosus* UK1A, *Lactobacillus pentosus* SK2A, *Enterococcus faecium* M74 และ *Enterococcus faecium* SF273 สามารถแข่งขันกับ *Clostridium perfringens* ในการเข้าเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กได้ดี โดยสามารถลดอัตราการเกาะติดจากร้อยละ 79.1 เป็นร้อยละ 53.7 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Collado และคณะ (2007) ที่ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเกาะติดกับมูกัส (Mucus) ลำไส้เล็กของโพรไบโอติก 4 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* 99 และ *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS และ เชื้อก่อโรค 7 สายพันธุ์ คือ *Bacillus vulgates*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Eschirichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ *Listeria monocytogenes* โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบว่าความสามารถในการเกาะติดของเชื้อโพรไบโอติกและ เชื้อก่อโรคมักมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และการใช้โพรไบโอติก ร่วมกันทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์

1.1.4 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อก่อโรค

โพรไบโอติกสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อก่อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น Arihana และคณะ (1998) พบว่า *Lactobacillus gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่พบได้มากในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ สามารถลดการแพร่กระจายของ *Staphylococcus aureus*

และสร้าง enterotoxin ในระหว่างการหมักไส้กรอกได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ แบคทีเรียโอซินที่ถูกสร้างขึ้น จะทำให้เกิดสถานะที่ไม่เหมาะกับการเจริญของ *Staphylococcus aureus* (พัชรวรรณ รัตนอุบล, 2552) และ *Lactobacillus reuteri* สามารถผลิต รูทีริน (Reuterin) เป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว ได้ (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

1.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

บทบาทหลักของโพรไบโอติกต่อสุขภาพไม่ได้เป็นการรักษา แต่เป็นการป้องกัน ปัญหาสุขภาพต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ แบคทีเรียโพรไบโอติก เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด ซึ่งก่อประโยชน์ต่อร่างกาย (ชารารัตน์ สุภศิริ, 2542) เมื่อสัตว์ได้รับโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายแล้ว โพรไบโอติกจะผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหาร จะเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อทางเดินอาหาร และเพิ่มจำนวนบนเยื่อลำไส้ โดยเฉพาะผนังลำไส้เล็กทุกส่วน ซึ่งจะแทรกตัวอยู่ที่ร่องผนัง (Villi) จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มของเชื้อก่อโรค และทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากทางเดินอาหาร นอกจากนี้โพรไบโอติกจะอาศัยอาหารจากลำไส้ เพื่อใช้เจริญเติบโต ทำให้สภาวะแวดล้อมในลำไส้มีสภาพเป็นกรด ส่งผลให้เชื้อก่อโรคซึ่งมักไม่ทนกรดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และสามารถผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ แบคทีเรียโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารชนิดอื่น ๆ ช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้สามารถควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้ยังส่งผลดีต่อสุขภาพในด้านอื่นๆ เช่น ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ช่วยป้องกันการติดเชื้อและช่วยกระตุ้นหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งกลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เริ่มจากเมื่อโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายจะกลายเป็นสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย จึงกระตุ้นเม็ดเลือดขาว ชนิดโมโนไซต์ ที่ไหลเวียนตามหลอดเลือดให้เคลื่อนที่มายังตำแหน่งที่เชื้อโรครุกล้ำเข้ามาสู่ร่างกาย แล้วโมโนไซต์ก็เติบโตเป็นแมคโครฟาจเพื่อกินเชื้อโรคนั้น และสามารถผลิตสารเคมีคล้ายฮอร์โมนที่ทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อโรค เช่น ไซโตคายน์ ชนิดแกมมาโกลบูลิน เอ (Immunoglobulin A; IgA) อินเตอร์ลิวคิน (Inter-leukin) และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor Necrosis Factor; TNF- α) ทำให้การสื่อสารกับเนื้อเยื่อในชั้นใต้เยื่อลำไส้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้การสร้างสารป้องกันและกระตุ้นภูมิคุ้มกันเข้าสู่ภาวะสมดุล นำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบป้องกันมากกว่าการตอบสนองแบบก่อการอักเสบหรือภูมิแพ้ ทำให้เนื้อเยื่อที่อักเสบบรรเทาลง และ

ซ่อมแซมเซลล์ร่างกายที่บาดเจ็บให้ฟื้นตัวเร็วขึ้น (ไชยวัฒน์ ไชยสุด และ ศศิธร ศิริคุณ, 2553; Ouwehand *et al.*, 1999) ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง ในลำไส้ โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ เช่น อาจช่วยกวดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ลดสารเมแทบอลิต์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แอมโมเนีย อินโดลสแกโทล และลดปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง (Procarcinogenic enzyme) ในลำไส้ใหญ่ โพรไบโอติกยังอาจควบคุม หรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสารหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็งได้ และมีผลต่อการ เคลื่อนไหวหรือการบีบตัวของลำไส้ ทำให้กำจัดสารก่อการกลายพันธุ์ สารก่อมะเร็งให้ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น ช่วยลดอาการแพ้ น้ำตาลแลคโตส รวมทั้งช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหาร โดยช่วยให้ระบบย่อยอาหารให้ทำงานได้ดีขึ้น และช่วยยับยั้งการเคลื่อนที่ภายในระบบทางเดินอาหาร โพรไบโอติกไม่ได้จำกัดการใช้เฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้น อาจจะมีผลต่อระบบอื่น ๆ เช่น ทางเดินหายใจส่วนต้น ระบบปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น (ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2551; ไชยวัฒน์ ไชยสุด และ ศศิธร ศิริคุณ, 2553; Mohammadi *et al.*, 2011) ประโยชน์ของโพรไบโอติกโดยสรุปแสดงดัง Table 1

Table 1 Potential clinical targets of probiotic intervention

Effect	Potential mechanism	Potential risks
Nutritional management of acute diarrhoea	Reduction in the duration of rotavirus shedding, normalization of gut permeability and microbiota	Risk related to host and strain characteristics
Nutritional management of allergic disease Inflammatory bowel disease	Degradation/structural modification of enteral antigens, normalization of the properties of aberrant indigenous microbiota and of gut barrier functions, local and systemic inflammatory response, increase in the expression mucins	Strains with proinflammatory effects/adverse effects on innate immunity Translocation /infection
Reducing the risk of infectious disease	Increase in IgA-secreting cells against rotavirus, the expression of mucins	Risk related to host and strain characteristics
Reducing the risk of allergic /inflammatory disease	Promotion of gut barrier functions, anti-inflammatory potential, regulation of the secretion of inflammatory mediators, and promotion of development of the immune system	Directing the microbiota towards other adverse outcomes/directing the immune responder type to other adverse outcomes

Source: Isolauri *et al.* (2004)

1.3 แหล่งของโพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้นมีประโยชน์มากมายต่อสิ่งมีชีวิต แต่การที่จะได้มาซึ่งโพรไบโอติกที่ดี และมีประสิทธิภาพ จะต้องมีการคัดเลือก และศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติก เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพ แหล่งที่มาของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากโพรไบโอติกที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกันมีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน

1.3.1 มนุษย์

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มี 2 กลุ่ม ทั้งที่ก่อประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* และที่ก่อโทษต่อร่างกาย เช่น *Clostridia* และ *Staphylococci* ซึ่งการเจริญ และเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยถ้ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโทษมีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จะทำให้ร่างกายเกิดโรคต่าง ๆ เช่น ท้องเสีย ท้องร่วง โดยปกติกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โพรไบโอติกที่พบในมนุษย์ ส่วนใหญ่พบในบริเวณทางเดินอาหารซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยบริเวณดูโอดินัน (Duodenum) มีประมาณ 3-4 Log CFU/g ส่วนเจจูนัม (Jejunum) มีประมาณ 5-7 Log CFU /g และบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) พบประมาณ 7-8 Log CFU/g และในส่วนลำไส้ใหญ่จะมีจำนวนของจุลินทรีย์หนาแน่นที่สุด คือประมาณ 10-11 Log CFU /g แสดงดัง Figure 1 แต่ละบุคคลจะมีชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น วัย สุขภาพ วิถีชีวิต และรูปแบบการบริโภค เป็นต้น เช่น ทารกเมื่อแรกคลอดจะพบจุลินทรีย์ชนิดดี คือ *Lactobacilli* จำนวนมาก ต่อมาจะลดลงเมื่อทารกมีอายุเพิ่มขึ้น ทารกที่ดื่มนมแม่ในช่วง 7 วันแรก จะพบ *Bifidobacteria* ภายในลำไส้สูง โดยทารกที่ดื่มนมมารดา จะมีปริมาณของ *Bifidobacteria* อยู่มากกว่าทารกที่ดื่มนมผง ส่งผลให้ทารกกลุ่มนี้มีภูมิคุ้มกันที่ดี นอกจากนี้ น้ำนมแม่มีองค์ประกอบของ โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ชนิดกาแลคโต โอลิโกแซคคาไรด์ (Galactooligosaccharides) เป็นองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารโพรไบโอติก สามารถกระตุ้นการเจริญในแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacteria* ได้ (นริญญา บุญดิน, 2550)

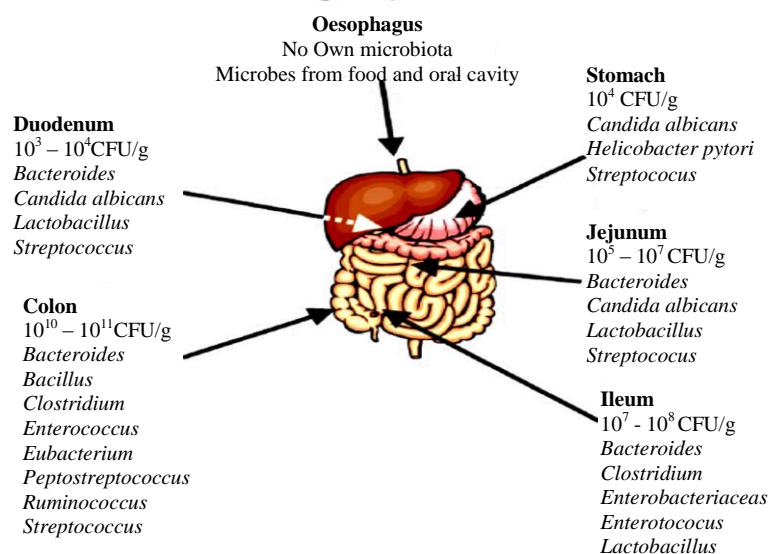


Figure 1 The numerically dominant microbial genera in the adult human gastrointestinal tract

Source: Isolauri *et al.* (2004)

1.3.2 สัตว์

ส่วนใหญ่แบคทีเรียโพรไบโอติกจะพบมากในบริเวณทางเดินอาหารของสัตว์ เนื่องจากบริเวณนี้มีสภาวะที่ส่งเสริมให้แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดี นิรัญญา บุญดี (2550) ได้แยก จุลินทรีย์โพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล ประกอบด้วย ปลา กุ้ง และปู รวม 20 ชนิด พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* APa4, *Pediococcus pentosaceus* Ala 1 และ *Enterococcus faecium* ARa1 โดยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้ ทักษิรัตน์ มุสิกสังข์ (2551) ได้แยกแบคทีเรียแลคติกที่เป็นโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทง อายุประมาณ 40-50 วัน และไก่พื้นเมืองอายุประมาณ 3-4 เดือน สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 548 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น และประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterococcus* sp., *Enterococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium* และ *Pideococcus pentosaceus*

1.3.3 ผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตภัณฑ์อาหารเป็นแหล่งธรรมชาติของโพรไบโอติก ส่วนใหญ่พบมากในผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต และนมดิบ Sieladie และคณะ (2011) ได้คัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากนมวัวดิบ 32 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทนกรดที่พีเอช 2 และ 3 และเกลือ น้ำดี ได้ร้อยละ 0.2 และ 0.4 (W/V) ได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท จากการศึกษาของ

Maragkoudakis และคณะ (2006) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์นมได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* Shirita ACA-DC 6002, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* ACA-CD 4037 และ *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 146 นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์นมแล้ว อาหารหมักก็ถือว่าเป็นแหล่งของโพรไบโอติกที่สำคัญเช่นเดียวกัน อัจฉราหนูเพชร (2546) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักจากพืชและสัตว์จำนวน 23 ชนิด พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 327 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้น และความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เป็นโพรไบโอติกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Pediococcus pentosaceus* (LA6), *Lactobacillus casei* (LA13), *Lactobacillus plantarum* (LA71), *Lactobacillus plantarum* (La102) และ *Lactobacillus delbrueckii* (LA198) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ จุไรรัตน์ ร่วมพันธ์ (2550) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 และมีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากอาหารหมักจากสัตว์ และพืชทั้งหมด 52 ตัวอย่าง และแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้

1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

จุลินทรีย์โพรไบโอติกนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย้อมดิสแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) มีทั้งชนิดที่เป็นรูปท่อน และรูปกลม โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติกอาศัยในแหล่งที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ เช่น เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมักคองต่างๆ เป็นต้น สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่นๆ ได้ และผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ออกมา จากชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เชื้อผลิตได้นี้สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มโฮโมเฟอริเมนเททีฟ (Homofermentative) สามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวได้สูงประมาณร้อยละ 95 ที่เหลืออีกร้อยละ 5 จะผลิตกรดแอสติก (Acetic acid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย และอีกหนึ่งคือ เฮเทอโรเฟอริเมนเททีฟ (Heterofermentative) ภายหลังจากการหมักย่อยน้ำตาลแล้ว จะผลิตกรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 และอีกร้อยละ 50 ผลิตกรดแอสติก กรดฟอร์มิก (Formic acid) รวมทั้งเอทานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) บางสายพันธุ์เป็นพวกไม่ต้องการอากาศอย่างยิ่ง (Strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงาน จากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน ต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อนและ

อุดมสมบูรณ์ (Complex and enrichment media) โดยใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเติบโตได้ในอาหารที่มีปัจจัยการเจริญ และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (Biotin) ริโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกเหนือจากความสามารถในการผลิตอาหารหมักที่มีรสเปรี้ยวหลายชนิดแล้ว สามารถใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเชื้อมาตรฐานในการวิเคราะห์วิตามินบางชนิด เช่น วิตามินบี 12 บางสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มนี้ยังสามารถใช้เป็นอาหารเสริมสัตว์แทนสารปฏิชีวนะ โดยสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ เช่น *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus pyogenes*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* และ *Yersinia pseudotuberculosis* เป็นต้น

อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียชนิดอื่น และยีสต์บางชนิดที่ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (de Vrese and Schrezenmeir, 2008) แสดงดัง Table 2 การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารส่วนใหญ่จะใช้ในผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต และนมเปรี้ยว เป็นต้น และในปัจจุบันมีการเพิ่มความหลากหลายโดยการเสริมโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น อาหารสำหรับทารก เนยแข็ง เครื่องดื่มเวย์ และซูปผลไม้ม เป็นต้น

Table 2 Examples of common probiotics

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus.</i>	<i>Saccharomyces</i>	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>S. salivarius.</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. diaacetylactis</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. brevis</i>			<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>			<i>Propionibacterium</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. longum</i>			<i>freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. thermophilum</i>			Homeostatic Soil
<i>L. curvatus</i>				Organisms (HSO's)
<i>L. fermentum</i>				
<i>L. gallinarum</i>				
<i>L. johnsonii</i>				
<i>L. lactis</i>				
<i>L. paracasei</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. sporogenes</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. rhamnosus</i>				

Source: Sekhon and Jairath (2010)

2. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

การนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์มีการพัฒนารูปแบบการใช้อย่างหลากหลาย เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด การเติมโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์นมซึ่งเป็นอาหารที่มนุษย์รับประทานกันในชีวิตประจำวัน จะทำให้มนุษย์ได้รับประโยชน์จากการทำงานและกิจกรรมของโพรไบโอติกได้ง่ายที่สุด แต่โพรไบโอติกส่วนใหญ่ที่เติมลงไปในการผลิตผลิตภัณฑ์นมไม่สามารถรอดชีวิตและมีกิจกรรมได้เพียงพอที่จะก่อประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะการก่อประโยชน์ในทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นระบบเป้าหมายที่ต้องการให้โพรไบโอติกเหล่านี้เจริญ ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารทำให้เซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตเกิดการบาดเจ็บ หรือลดจำนวนลงจนเมื่อไปถึงระบบทางเดินอาหารจึงไม่สามารถที่จะก่อประโยชน์ นอกจากนี้สภาวะทางเดินอาหารของมนุษย์ยังเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เซลล์โพรไบโอติกเหล่านี้ลดจำนวนลง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการที่สามารถเพิ่มการรอดชีวิต หรือปกป้องโพรไบโอติกจากการบาดเจ็บ เพื่อให้ได้โพรไบโอติกที่มีชีวิตจำนวนมากที่สุด และสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้

วิธีที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลาย คือ วิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุธรรมชาติ (ศุภศิลา ปิ มณีรัตน์, 2551) ซึ่งการห่อหุ้มเซลล์เป็นวิธีการใหม่ และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกได้

การห่อหุ้มเซลล์เป็นกระบวนการทางเคมีกายภาพ (Physical chemistry) หรือเชิงกล (Mechanical) ที่ของเหลวหรืออนุภาคถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลด้วยพอลิเมอร์เป็นชั้นบางๆ จนเกิดเป็นแคปซูลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่านาโนเมตรจนถึงต่ำกว่ามิลลิเมตร (Burgain *et al.*, 2010) ทำให้มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์มากมาย ได้แก่ ช่วยให้ง่ายต่อการนำไปใช้งาน ควบคุมการทำงานของสารให้มีการปลดปล่อยสารที่ถูกห่อหุ้มในบริเวณที่เหมาะสม และยังลดความสิ้นเปลืองในการใช้สาร

2.1 โครงสร้างของแคปซูลจากกระบวนการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

โดยทั่วไปแคปซูลหรือไมโครบีด (Microbead) ที่ได้จากกระบวนการห่อหุ้มเซลล์จะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนหลักๆ คือ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่บรรจุอยู่ภายในแคปซูล เรียกว่าคอร์ (Core) และวัสดุพองที่เป็นสารห่อหุ้มที่เคลือบอยู่รอบๆ เซลล์โพรไบโอติก เรียกว่า วอลล์ (Wall) แสดงดังใน Figure 2 ส่วนของวอลล์นั้นอาจเป็นสารเพียงชนิดเดียว หรือประกอบด้วยสารหลายชนิด วัสดุพองที่นิยมนำมาห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกนั้นจะเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น น้ำตาลกัม โปรตีน และ โพลีแซ็กคาไรด์ เป็นต้น

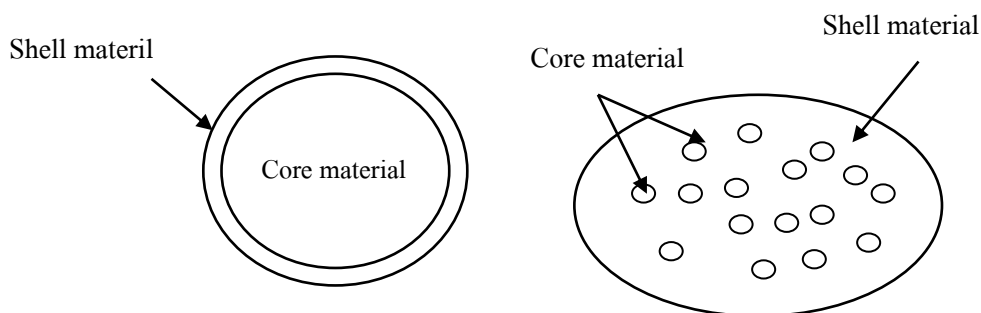


Figure 2 Structure of capsule

Source: Desai and Park (2005)

2.2 วัตถุประสงค์ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกนั้นมีวัตถุประสงค์หลักคือ การปกป้องเซลล์โพรไบโอติกจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตราย และช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในไอศกรีมได้ Hodayouni และคณะ (2008a) ได้ศึกษาผลของการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus casei* Lc-01 และ *Bifidobacterium lactis* Bb-12

โดยใช้แคลเซียม-อัลจินตเป็นวัสดุห่อหุ้ม และใช้วิธีอิมัลชันในการห่อหุ้มเซลล์ แล้วตรวจสอบจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตที่ถูกห่อหุ้ม และเซลล์อิสระ ระหว่างการเก็บรักษาที่-20 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน พบว่าจำนวน *Lactobacillus casei* และ *Bifidobacterium lactis* ที่เป็นเซลล์อิสระลดลงโดยเฉลี่ย 3.4 และ 2.9 Log CFU/ml ตามลำดับ สำหรับเซลล์ที่มีการห่อหุ้มลดลง 1.4 และ 0.7 Log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ของ Shah และ Ravula (2000) รายงานว่า การห่อหุ้มเซลล์ช่วยปรับปรุงจำนวนของ *Lactobacillus acidophilus* MJLA1 และ *Bifidobacterium* spp. BDBB2 ให้ดีขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มในของหวานประเภทนมแช่แข็ง เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 12 สัปดาห์

การห่อหุ้มสามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะทางเดินอาหารได้จากการศึกษาของ Michida และคณะ (2006) ได้ห่อหุ้มโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร พบว่าเมื่อเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยสารสกัดจากข้าวบาเลย์ (Barley extract) ร้อยละ 2 ในสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร นาน 180 นาที จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเหลือ 6.5 Log CFU/ml จากเซลล์เริ่มต้น 7.24 Log CFU/ml ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 30 นาที พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเหลือ 1.92 Log CFU/ml จากเซลล์เริ่มต้น 7.24 Log CFU/ml ต่อมาทำการทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะน้ำดีนาน 240 นาที พบว่าไม่มีการลดลงของจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่มีการห่อหุ้มด้วยสารสกัดจากข้าวบาเลย์ร้อยละ 2 ทดสอบที่สภาวะเดียวกันนาน 240 นาที พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลการศึกษานี้ได้สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ของ Ding และ Shah (2009) ซึ่งทำการห่อหุ้มแบคทีเรียโพรไบโอติกได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* type BI-04, *Bifidobacterium lactis* type Bi-07 และ *Bifidobacterium bifidum* HOWARU โดยใช้อัลจินต กัวกัม แชนแทนกัม โลคัสปีนกัม และคาร์ราจีแนนกัม เข้มข้นร้อยละ 3 (W/V) แล้วทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะกรดที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากสัมผัสกับสภาวะกรด นาน 2 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 3.04 Log CFU/ml ขณะที่เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยวัสดุพุงทุกชนิด พบว่าสามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 5.0 Log CFU/ml ที่สภาวะเดียวกัน เมื่อนำมาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีชนิด taurocholic acid ความเข้มข้นร้อยละ 3 (W/V) นาน 8 ชั่วโมง พบว่าเซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ย 4.17 Log CFU/ml ส่วนเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินต แชนแทนกัม และคาร์รา-

จีแนกัม มีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์ในสถานะที่มี taurocholic acid มากที่สุด มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเป็น 6.41, 6.47 และ 5.00 Log CFU/ml ตามลำดับ

2.3 วิธีการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

2.3.1 วิธีการเอกซ์ทรูชัน (Extrusion technique)

วิธีการเอกซ์ทรูชัน เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันโดยทั่วไป ในการทำเม็ดเจลด้วยไฮโดรคอลลอยด์ ทำได้โดยการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ เช่น คาร์ราจีแนน ไคโตซาน เจลาติน อัลจิเนต และเพคติน แล้วจึงเตรียมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมให้เข้ากัน และใช้วิธีการปล่อยเซลล์ชั้นของเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยดลงในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว เช่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาและความสูงการหยดเซลล์ลงในสารช่วยให้แข็งตัว วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสถานะที่ไม่รุนแรง เซลล์แบคทีเรียจึงมีการรอดชีวิตสูง (จุพาลักษณ์ ชูพรหม, 2553) ตัวอย่างการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยใช้เทคนิคเอกซ์ทรูชันแสดงดัง Table 3

Table 3 Encapsulation of probiotic bacteria by extrusion technique

Bacteria	Supports used	Special treatment	Diameter of bead (mm)	Application
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	1.875% alginate	N	2.5	Yoghurt
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	2% alginate	Coated with low MW chitosan	2	Biomass production
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.5% alginate	Added glycerol	2	Biomass production
<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gallinarum</i>	5% pectinate	Coated with chitosan (1%)	1	N

N, no treatment

Source: Krasaekoopt *et al.* (2003)

2.3.2 วิธีการอิมัลชัน (Emulsification technique)

อิมัลชันเป็นวิธีการทางเคมีที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิต และวัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเป็นไฮโดรคอลลอยด์ (อัลจิเนต, คาร์ราจีแนน และเพคติน) หลักการของวิธีการนี้อาศัยความสัมพันธ์ระหว่างเฟสไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous) และเฟสต่อเนื่อง (Continuous phases) การห่อหุ้มด้วยวิธีการนี้จำเป็นต้องมีอิมัลซิไฟเออร์ สารลดแรงตึงผิว และสารที่ทำให้แข็งตัวเติมลง

ในอิมัลชัน (Burgain *et al.*, 2010) ข้อดีของวิธีการนี้คือ เป็นวิธีที่ง่ายในการขยายขนาดการผลิต และมีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียสูง เม็ดเจลที่ได้มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อย แต่วิธีการนี้ก็มีข้อเสียคือ มีขนาดและรูปร่างไม่สม่ำเสมอ และควบคุมให้อยู่ในสถานะปลอดเชื้อได้ยาก ขั้นตอนที่ช่วยให้สามารถผลิตเม็ดเจลให้มีขนาดตรงตามความต้องการทำได้โดยการเพิ่มความเร็วในการกวน และอัตราส่วนของน้ำต่อน้ำมัน เม็ดเจลที่เติมลงในสารละลายโพลีเมอร์ขั้นที่สอง เพื่อสร้างเป็นชั้นผิวที่เคลือบ เพิ่มการป้องกันให้กับเซลล์ หรืออาจปรับปรุงคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส (Burgain *et al.*, 2010) วัสดุที่ใช้สำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยวิธีการอิมัลชันมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น โซเดียมอัลจิเนต คาร์ราจีแนน และเซลลูโลสอะซิเตตพลาเลตผสมกับเจลาติน เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพียงจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป สำหรับวัสดุที่นิยมนำมาห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิคอิมัลชันแสดงดัง Table 4

2.4 วัสดุพียงที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

วัสดุพียงที่นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มาจากธรรมชาติไม่มีความไวต่อสภาวะทางเดินอาหาร สภาวะการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ รวมทั้งวัสดุพียงชนิดที่เลือกต้องอนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ เพราะฉะนั้นในการเลือกวัสดุพียงต้องศึกษาข้อกำหนดทางกฎหมาย และวัตถุประสงค์การนำมาใช้งาน วัสดุพียงที่นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกมีดังนี้

2.4.1 อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตเป็น โพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ประกอบด้วย β -D-แมนนูโรนิก และ α -L-กลูโคโรนิก แอซิด จำนวนและลำดับที่จัดเรียงในสายโพลีเมอร์นั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของอัลจิเนต จำนวนและลำดับเหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ในการเป็นวัสดุพียงของอัลจิเนตดัง Figure 3

อัลจิเนตมีการใช้อย่างกว้างขวางในรูปโซเดียมอัลจิเนต แคลเซียมอัลจิเนต และโพแทสเซียมอัลจิเนต เป็นต้น แคลเซียมอัลจิเนตมีประสิทธิภาพสูงในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกมาก เพราะใช้ง่าย ไม่มีพิษ มีความเข้ากันทางชีวภาพกับแบคทีเรีย สภาวะในการเกิดเจลไม่รุนแรง และต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามอัลจิเนตยังมีข้อเสียในการใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก เช่น มีความไวต่อกรด ทำให้ไม่ทนกับสภาวะในกระเพาะอาหาร การขยายขนาดกระบวนการผลิตทำได้ยาก นอกจากนี้เม็ดเจลที่ได้มีรูพรุนมากจึงมีผลเสียต่อการห่อหุ้มเซลล์ แต่สามารถแก้ไขได้โดยการผสมอัลจิเนตกับสารประกอบโพลีเมอร์ หรือปรับโครงสร้างของอัลจิเนต โดยใช้สารเติมแต่งที่แตกต่างกัน เช่น ผสมอัลจิเนตกับแป้ง ซึ่งเป็นวิธีการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการห่อหุ้มโพรไบโอติกให้ดีขึ้น (Burgain *et al.*, 2010)

จากการศึกษาของ Mandal และคณะ (2006) ที่ทำการห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus casei* NCDC298 ในอัลจินตความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 2, 3 และ 4) ทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะพีเอชต่ำ (pH 1.5) เกลื่อน้ำเค็มเข้มข้น (ร้อยละ 1 และ 2) และการแปรรูปด้วยความร้อน (55, 60 หรือ 65 องศาเซลเซียส) พบว่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* NCDC298 ที่ผ่านการห่อหุ้มดีกว่าเซลล์อิสระในทุกสภาวะการทดสอบ และเมื่อความเข้มข้นของอัลจินตที่ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นด้วย เมื่อทดสอบการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชเลียนแบบลำไส้ (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์ที่ปลดปล่อยเพิ่มสูงขึ้นด้วย จำนวนเซลล์ที่ปลดปล่อยออกมาอยู่ระหว่าง 3.40 และ 3.70 Log CFU/g จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 9.40 Log CFU/g

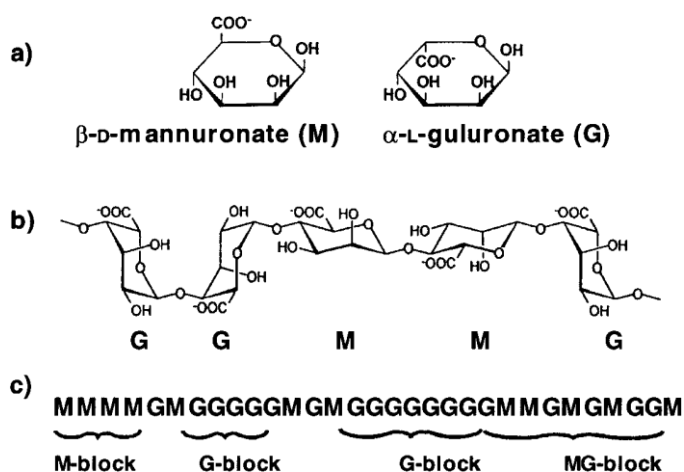


Figure 3 The molecular structure of alginate. Alginate molecules are linear block co-polymers of β -D-mannuronic (M) and α -L-guluronic acids (G) with a variation in composition and sequential arrangements: (a) alginate monomers, (b) chain conformation, (c) block distribution.

Source: de Vos *et al.* (2006)

Table 4 Encapsulation of probiotic bacteria by emulsion technique

Bacteria	Support used	Continuous phase	Special	Diameter of bead	Application
<i>Streptococcus thermophile</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	3% K-carragenan and locust bean gum (2:1)	Soy oil	N	0.5-2 mm	Yoghurt
<i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	3% K-carragenan and locust bean gum (2:1)	Soy oil	N	0.5-1 mm	—
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	3% alginate	Vegetable oil with 2% emulsifier	2% emulsifier added	—	Ice cream
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i>	3% K-carragenan and locust bean gum (11:1)	Vegetable oil	N	1-2 mm	Biomass production
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	3.6% alginate	Vegetable oil containing 0.2% Tween 80	6% glycerol or mannitol added	30 μ m	Frozen dessert
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	3% alginate	Vegetable oil containing 0.2% Tween 80	0.5% sodium lauryl sulphate added	25-35 μ m	Frozen ice milk
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	2% alginate	Canola oil	Coated with poly- L-lysine	50 μ m- 1 mm	Biomass production
<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	3% alginate	Orn oil containing 0.2% Tween80	Added glycerol	—	Ice cream

N, no treatment

—, no record

Source: Krasaekoopt *et al.* (2003)

2.4.2 แป้ง (Starch)

แป้งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยกลูโคสหลาย ๆ หน่วยมาต่อกันด้วยพันธะ α -ไกลโคซิดิก มีองค์ประกอบหลักเป็นอะไมโลส ซึ่งประกอบด้วยโพลิเมอร์หลักและกิ่งก้าน (Chain) สายตรงคือ D- กลูโคไพราโนสซึ่ง ต่อกันด้วยพันธะ α -1-4 ไกลโคซิดิก ส่วนกิ่งก้าน คือ อะไมโลเพคติน ประกอบด้วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α -1-4 และ α -1-6 ไกลโคซิดิก สำหรับ resistant starch เป็นแป้งที่เอนไซม์เพนกรีเอติน (Amylase) ในลำไส้เล็กไม่สามารถย่อยได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก โพรไบโอติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญในลำไส้ ทำให้สามารถเกิด

การหมักในลำไส้ใหญ่ รวมทั้งมีพื้นผิวเหมาะสมสำหรับยึดเกาะของโพรไบโอติก และสามารถเพิ่มการส่งผ่านโพรไบโอติกที่มีชีวิตไปยังลำไส้เล็ก (Burgain *et al.*, 2011) จากการศึกษาของ Sultana และคณะ (2000) ทำการห่อหุ้ม *Lactobacillus casei* ด้วยแคลเซียม-อัลจิเนต (ร้อยละ 2) ร่วมกับแป้งข้าวโพด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ 0, 1, 2 และ 4) พบว่า การเติมแป้งข้าวโพดร้อยละ 2 ผสมกับอัลจิเนต มีผลให้การคืนสภาพของเซลล์ (Recovery cell) ของ *Lb. casei* สูงกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตอย่างเดียว การใช้อัลจิเนตร่วมกับแป้งข้าวโพดร้อยละ 2 มีค่าการคืนสภาพเท่ากับ 3.1×10^{11} CFU/g ส่วนที่ไม่มีมีการเติมแป้งข้าวโพด (ร้อยละ 0) มีค่าการคืนสภาพเท่ากับ เท่ากับ 4.0×10^8 CFU/g ส่วนการเติมแป้งข้าวโพดสูงกว่าร้อยละ 4 ไม่มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มแบคทีเรีย โดยมีค่าการคืนสภาพเท่ากับ 2.9×10^9 CFU/g

2.4.3 เพคติน (Pectin)

เพคติน หมายถึง กลุ่มของพอลิแซคคาไรด์จากพืช โมเลกุลมีกรด D- กาแลคโทโร-ไพแรโนซิลยูนิท ต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-ไกลโคซิดิก บางส่วนของสายโซ่จะมีหมู่เมทอกซิลมาอินเทอร์ฟายด์ด้วย (วรรณภา ศุภชัย, 2549) (Figure 4) เพคตินเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อพืช พบได้ในผลไม้ทุกชนิดในส่วนของผนังเซลล์ และเนื้อเยื่อภายใน (Intercellular tissues) และมีคุณสมบัติเป็นใยอาหาร พบประมาณร้อยละ 15-20 เนื่องจากไม่สามารถย่อยได้ในระบบทางเดินอาหาร จึงช่วยให้การขับถ่ายดี ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และยังช่วยขัดขวางการดูดซึมไขมันไม่ให้เข้าสู่กระแสเลือดจึงป้องกันไม่ให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และหลอดเลือดสมองตีบ เพคตินมีคุณสมบัติพิเศษคือ เมื่อละลายน้ำจะพองตัวเป็นเจลในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มจึงนิยมใช้เพคตินเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยใช้เป็นสารทำให้เกิดเจล ในผลิตภัณฑ์แยม เยลลี่ และขนมหวาน รวมทั้งมีการใช้เพคตินใช้เป็นสารให้ความคงตัวในผลิตภัณฑ์นม และโยเกิร์ต

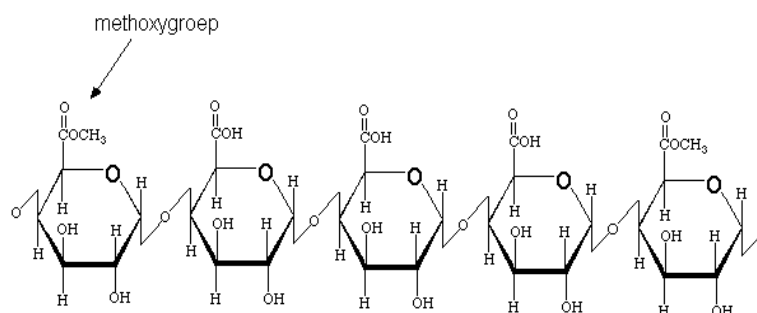


Figure 4 The molecular structure of pectin

Source: <http://www.gate2biotech.com/dictionary.php?word=177>

2.4.4 คาร์ราจีแนน (Carragenan)

คาร์ราจีแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง ประกอบด้วย β -D-กาแลกโทส และ 3,6-แอนไฮโดร D- กาแลกโทส จับกันด้วยพันธะ α -1,3 และ β -1,4 ไกลโคซิดิก และจะมีหมู่ซัลเฟตเป็นเอสเทอร์อยู่ จึงมีคุณสมบัติเป็นแอนไอออนิก คาร์ราจีแนนที่สำคัญมี 3 ชนิด ได้แก่ kappa (κ)-, iota (i)- และ lambda (λ)-คาร์ราจีแนน ดังแสดงใน Figure 5 โดยทั่วไปจะนิยมใช้ κ -คาร์ราจีแนน สามารถละลายได้ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส (วรรณิ ตูลยชัย, 2549) ที่ช่วงความเข้มข้นร้อยละ 2-5 สามารถเหนียวน้ำให้เกิดเจล การห่อหุ้มโพรไบโอติกด้วยคาร์ราจีแนน จะเติมเซลล์โพรไบโอติกลงในสารละลายคาร์ราจีแนน ปลอดเชื้อ (อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส) แล้วลดอุณหภูมิลงให้เท่ากับอุณหภูมิห้องทำให้เกิดเจลาติไนซ์เซชัน (Gelatinization) แล้วเติมไอออนโมโนวาเลนต์ (Monovalent ions) เช่น โปรตัสเซียมไอออนในรูปโปรตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทำให้เม็ดเจลมีความคงตัว อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า โปรตัสเซียมคลอไรด์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ได้ เช่น *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. แต่สามารถใช้ Rb^+ , Cs^+ และ NH_4^+ ions ทดแทนได้ และเม็ดเจลที่ได้มีความแข็งแรงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตัสเซียมไอออน (Mortazavian *et al.*, 2007)

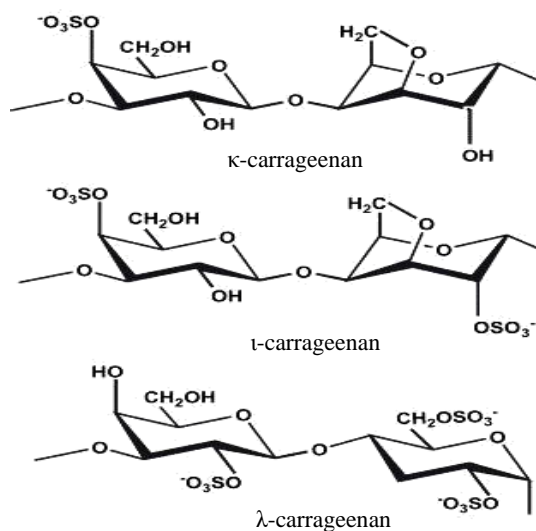


Figure 5 Idealized structures of the three types of carrageenan

Source: Relleve *et al.* (2005)

2.5 ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสามารถแบ่งออกได้หลายปัจจัย ดังนี้

2.5.1 วิธีการในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่นิยมนั้นมี 2 วิธี คือ วิธีการเอกซ์ทรูชัน และอิมัลชัน โดยโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ทั้งสองวิธีการสามารถรอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 80-95 (ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2551) และนอกจากขั้นตอนในการห่อหุ้มของทั้งสองวิธีจะแตกต่างกันข้อดีและข้อด้อยในการห่อหุ้มเซลล์ของทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันแสดงดัง Table 5

Table 5 Positive and negative features of extrusion and emulsion

Factor	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 μ m - 2 mm

Source: Musikasang (2008)

2.5.2 วัสดุพอง

โดยทั่วไปแล้ววัสดุที่จะนำมาห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกนั้น จะต้องป้องกันเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะกระเพาะอาหารได้ และสามารถปลดปล่อยเซลล์โพรไบโอติกออกมาเมื่อถึงลำไส้เล็ก ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นอัลจินเตจะสามารถเกิดเป็นเจลได้ต้องมีแคลเซียมไอออนเป็นตัวยึดระหว่างสายของอัลจินเต เพราะฉะนั้นหากใช้อัลจินเตเป็นวัสดุพองจะต้องหลีกเลี่ยงสภาวะที่เป็นกรดสูงและมีสารจับโลหะ เนื่องจากสภาวะเหล่านี้ส่งผลให้โครงสร้างเจลของอัลจินเตเกิดการสูญเสียแคลเซียมไอออน ทำให้เม็ดเจลสูญเสียคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์ แต่การใช้อัลจินเตร่วมกับ resistant starch จะทำให้เม็ดเจลที่ได้ ทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ และสภาวะกรดสูงได้ หากต้องการให้โพรไบโอติกรอดชีวิตจนถึงลำไส้เล็ก ควรคัดเลือกวัสดุพองที่มีความคงตัวต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร และเมื่ออยู่ในสภาวะลำไส้เล็ก เม็ดเจลต้องเปิดออกและปลดปล่อยเซลล์ออกมา แต่หากวัสดุพองสามารถทนทานต่อเอนไซม์เพนตรีเอตินและสภาวะลำไส้เล็กได้จนสามารถลงไปสู่ลำไส้ใหญ่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากกว่า เนื่องจากจะมีผลต่อระบบขับถ่ายโดยตรง และทำให้โพรไบโอติกสามารถคงตัวอยู่ในลำไส้ได้ดีขึ้น การคัดเลือกวัสดุพองชนิดที่มีคุณสมบัติดังกล่าวทำได้ยาก เนื่องจากข้อจำกัดเกี่ยวกับลักษณะทางเคมีของวัสดุห่อหุ้ม สำหรับ

ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความชื้นสูง ต้องเลือกใช้วัสดุพุงที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic)

2.5.3 ความเข้มข้นของวัสดุพุงที่ใช้

ความเข้มข้นของวัสดุพุงจะมีผลต่อขนาดของเม็ดเจลที่ได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์ เมื่อเม็ดเจลมีขนาดใหญ่ขึ้นประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และสภาวะร่างกายเพิ่มสูงขึ้นด้วย จากการศึกษาของหทัยรัตน์ มุสิกสังข์ (2551) ได้ศึกษาผลของความแตกต่างของขนาดเม็ดเจลต่อความสามารถในการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตในเม็ดเจลขนาด 200, 450 และ 1000 ไมโครเมตร แล้วทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่สภาวะกรด (pH 2) พบว่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 เพิ่มสูงขึ้นตามขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้น โดยเม็ดเจลขนาด 1000 ไมโครเมตร ทำให้เชื้อแบคทีเรียรอดชีวิตมากที่สุด รองลงมาคือ เม็ดเจลขนาด 450 และ 200 ไมโครเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ จุฬาลักษณ์ ชูพรหม (2553) ที่นำ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 มาห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร้อยละ 2 ในเม็ดเจลขนาด 1.80, 2.08, 2.10 และ 2.40 มิลลิเมตร เปรียบเทียบการรอดชีวิตในสภาวะกรด พีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการห่อหุ้มในเม็ดเจลขนาด 2.40 มิลลิเมตร ให้การรอดชีวิตสูงสุดคือร้อยละ 45.43 รองลงมาคือขนาด 2.10, 2.08 และ 1.80 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 37.64, 32.11 และ 30.87 ตามลำดับ และขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้นจะลดการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เพนตรีเอดิน แม้ว่าขนาดของเม็ดเจลที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้การรอดชีวิตของ โพรไบโอติกเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของเม็ดเจลต้องเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ เนื่องจากมีผลต่อความรู้สึกในปาก (Mouth-feel) และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์

2.3.4 สายพันธุ์ของโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ต่างๆ มีการรอดชีวิตแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ แบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่มีความเข้ากันทางชีวภาพกับวัสดุพุง จะส่งผลให้การรอดชีวิตลดลง เพราะฉะนั้นก่อนการห่อหุ้มเซลล์จึงควรศึกษาถึงลักษณะของแบคทีเรียที่นำมาใช้ จากการศึกษาของ Grosso และ Fávares-Trindade (2004) ที่เปรียบเทียบการรอดชีวิตของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* ที่ผ่านการห่อหุ้ม และเติมลงในโยเกิร์ตเก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 28 วัน *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* มีค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 6.25 และ 5.25 Log CFU/ml ตามลำดับ แต่ไม่พบการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium lactis* นอกจากสายพันธุ์ของโพรไบโอติกแล้ว จำนวนเซลล์

เริ่มต้นก่อนการห่อหุ้มเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญ หากจำนวนเซลล์เริ่มต้นสูง จะมีผลให้จำนวนเซลล์ในแต่ละเม็ดเจลสูง ทำให้การรอดชีวิตของโพรไบโอติกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้หากจำนวนเซลล์สูงจะทำให้เม็ดเจลมีความนุ่ม ซึ่งช่วยปรับปรุงความรู้สึกในปากให้ดีขึ้น

3. ไอศกรีม

ไอศกรีม คือ ของผสมแช่เยือกแข็งที่ประกอบด้วยนม สารให้ความหวาน สารให้ความคงตัว (Stabilizer) อิมัลซิไฟเออร์ และอาจเติมส่วนผสมอื่น ๆ เช่น ผลิภัณฑ์จากไข่ สี และสตาร์ชไฮโดรไลเสท (Starch hydrolysate) ของผสมนี้เรียกว่า มิกซ์ (Mix) จะนำไปผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization) และโฮโมจีไนซ์ (Homogenization) ก่อนนำไปแช่แข็ง ซึ่งเป็นการดึงความร้อนออกอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันมีการกวนเพื่อให้อากาศเข้าเนื้อผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเรียบเนียน และความนุ่มตามต้องการ (พัชรินทร์ รักถาวร, 2542)

ไอศกรีมคืออาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากปริมาณสารอาหาร มีพีเอชเป็นกลาง (pH 6-7) และมีระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนาน แม้ว่าไอศกรีมจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ และมีขั้นตอนการพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่มีอันตราย แต่พบว่ายังมีการระบาดของเชื้อก่อโรคในไอศกรีม ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคจากส่วนประกอบที่เติมลงไปหลังการพาสเจอร์ไรซ์ มีรายงานการตรวจพบเชื้อก่อโรคได้แก่ *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp. และ *Yersinia* sp. ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม จากรายงานพบว่าผลิตภัณฑ์นมทั้งหมดที่ผลิตกันทั่วโลก มีผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมากกว่าร้อยละ 5 ที่ตรวจพบ *Listeria monocytogenes* (Jo et al., 2007) และจากการศึกษาของ Jo และคณะ (2007) ที่ทำการตรวจสอบไอศกรีม 3 รสชาติ คือวานิลลา ช็อกโกแลต และสตอร์เบอร์รี่ ที่ผลิตจากบริษัทเดียวกันมีวางขายในท้องตลาดของประเทศเกาหลี ตรวจพบเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคือ *Listeria ivanovii*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium นอกจากนี้พบจำนวน Total aerobic bacteria ยีสต์และรา และโคลิฟอร์มในไอศกรีม อยู่ในช่วง 2 ถึง 3 Log CFU/g. ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ El-Sharef และคณะ (2006) ที่ได้ทำการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่วางขายในเมือง Tripoli ประเทศลิเบีย พบ Total bacteria count (TBC) อยู่ในช่วง 3×10^1 ถึง 5×10^8 CFU/ml ค่า MPN ของโคลิฟอร์มอยู่ระหว่าง 0.0 และ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร สำหรับเชื้อก่อโรคที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบคือ *Escherichia coli* ร้อยละ 6 (ประกอบด้วย 2 serogroup O157), *Salmonella* spp. ร้อยละ 5, *Aeromonas* spp. ร้อยละ 19, *Staphylococcus aureus* ร้อยละ 38 และ *Listeria monocytogenes* ร้อยละ 4 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้มี

มากกว่าร้อยละ 80 ที่สามารถทนยาปฏิชีวนะได้หนึ่งชนิด และ ร้อยละ 25 สามารถทนยาปฏิชีวนะได้สามชนิด (Multiple-drug resistance)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารเป็นข้อกำหนดสำคัญในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ส่วนใหญ่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในไอศกรีมที่มีการใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน เช่น ผสมบริสุทธิ์ในรูปแบบลำเชื้อ หรือเติมนมหมักที่มีโพรไบโอติกผสมอยู่เพื่อควบคุมพีเอชของไอศกรีม ซึ่งการสูญเสียจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตส่วนใหญ่เกิดขึ้นในขั้นตอนการผลิตและระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การละลายของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการบริโภคอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์โพรไบโอติกได้ ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม เซลล์โพรไบโอติกจะอยู่ภายใต้ความเครียดที่แตกต่างกันประกอบไปด้วย อันตรายทางเคมีจากส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ (พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด และ ปริมาณน้ำตาล) การบาดเจ็บจากการแช่แข็ง การปฏิบัติเชิงกล และความเป็นพิษจากออกซิเจน ซึ่งปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในไอศกรีม มีดังนี้

4.1 ส่วนผสม

น้ำตาล (แลคโตส และซูโครส) ที่ใช้เป็นส่วนประกอบหลักในไอศกรีม มีผลต่อจำนวนของโพรไบโอติกที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม โดยจะลดการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเนื่องจากทำให้เกิดความเครียดออสโมซิส (Osmotic stress) แต่อาจทำให้โพรไบโอติกบางสายพันธุ์รอดชีวิตเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant) ซึ่งผลกระทบของน้ำตาลที่มีต่อเซลล์โพรไบโอติก ขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาล สายพันธุ์ของโพรไบโอติก อุณหภูมิ อัตราการแช่แข็ง เทคโนโลยีที่ใช้แช่แข็ง และระยะเวลาในการเก็บรักษา จากผลการทดลองของ Akin และคณะ (2007) ที่ได้ทำการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium lactis*) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแตกต่างกัน (ร้อยละ 15, 18 และ 21) แล้วทำการตรวจสอบ Total viable count (TVC) ของโพรไบโอติก พบว่าในไอศกรีมที่มีน้ำตาลร้อยละ 18 มี TVC สูงสุด และเมื่อมีการเติมอินนูลิน ในอัตราส่วนร้อยละ 2 พีเอช 5.9 พบว่า การรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium lactis* ดีขึ้น ซึ่งหากระดับของอินนูลินเพิ่มขึ้น จำนวนของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium lactis* จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เนื่องจากอินนูลินมีคุณสมบัติเป็นสารโพรไบโอติก จะช่วยส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกได้

4.2 กระบวนการปั่นไอศกรีม (Freezing process)

ระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีม ไอศกรีม เชลล์โพรไบโอติกมีโอกาสเสียดสีกับผนังของถังปั่น และใบพัดที่ใช้กวนผสม ทำให้ผนังเชลล์และเยื่อหุ้มเชลล์เกิดการบาดเจ็บอย่างรุนแรง และการแช่เยือกแข็งทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายนอกและภายในเชลล์ มีผลทำให้ตัวถูกละลายทั้งภายนอกและภายในเชลล์เข้มข้นขึ้น หรือเกิดการสูญเสียน้ำภายในเชลล์ ทำให้กิจกรรมการเผาผลาญพลังงานภายในเชลล์ลดลง และอุณหภูมิที่ลดลงอย่างรวดเร็วมีผลทำให้เชลล์เกิดการบาดเจ็บ และเกิดการช็อกเนื่องจากความเย็นได้ อย่างไรก็ตาม การแช่เยือกแข็งไอศกรีมแบบรวดเร็ว หลังจากเติมโพรไบโอติกลงไปจะช่วยรักษาจำนวนของเชลล์ที่มีชีวิตไว้ได้ Magariños และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* La-5 ลงในไอศกรีมที่มีปริมาณไขมันร้อยละ 8 และอัตราการเติมอากาศ (Overrun) ร้อยละ 108 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* La-5 อยู่ที่ร้อยละ 91.3 (ประมาณ 6.0 Log cycle) ผลการทดลองที่ได้คล้ายกับผลของ Hekmat และ McMahon (1992) พบว่าไอศกรีมที่มีปริมาณไขมันร้อยละ 12 และอัตราการเติมอากาศร้อยละ 106 จำนวน *Lactobacillus acidophilus* ที่มีชีวิตลดลง 1 Log cycle และ *Bifidobacterium lactis* มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 90.1 พบว่าหลังจากการผลิตไอศกรีม จำนวน *Bifidobacteria* ลดลงร้อยละ 10 จากจำนวนเริ่มต้น

4.3 กระบวนการเติมอากาศ (Overrun process)

กระบวนการเติมอากาศ เป็นการเติมอากาศผสมลงในไอศกรีมทำให้ปริมาตรของไอศกรีมเพิ่มขึ้น กระบวนการนี้มีผลให้โพรไบโอติกที่มีชีวิตลดลง เนื่องจากปริมาณออกซิเจนและความต่างศักย์ (Redox potential) (เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของออกซิเจน) มีอิทธิพลต่อโพรไบโอติกที่มีชีวิตในระหว่างการแปรรูป และการเก็บรักษา โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Microaerophilic) หรือกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobic) ดังนั้นออกซิเจนที่มีค่าความต่างศักย์สูง จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับแบคทีเรียในกลุ่มนี้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้แตกต่างจากจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ออกซิเจนไปเป็นน้ำได้อย่างสมบูรณ์ แต่สำหรับ *Bifidobacteria* ระบบการดูดซับออกซิเจนมีน้อยหรือไม่มีเลย เป็นผลให้การลดออกซิเจนไม่สมบูรณ์เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์-คะตะเลส ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่จำเป็นสำหรับทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงนำไปสู่การสะสมสารพิษ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเรดิคัล (Superoxide anion radical; O₂⁻) และไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ภายในเชลล์ทำให้เชลล์ตายในที่สุด จากการศึกษาของหลายๆงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าอัตราการเติมอากาศร้อยละ 106 -108 ทำให้จำนวนโพรไบโอติกที่มีชีวิตลดลง (*Lactobacillus*

acidophilus และ *Bifidobacterium lactis*) น้อยกว่าร้อยละ 10 หลังจากการแช่เยือกแข็งและการทำให้แข็ง (Mohammadi *et al.*, 2011) และจากการศึกษาของ Akalin และ Erisir (2008) ผลิตไอศกรีม โพรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus* La-5 และ *B. animalis* Bb-12) มีอัตราการเติมอากาศ ร้อยละ 27.6, 31.7 และ 50. พบว่า จำนวนของโพรไบโอติกที่มีชีวิตไม่มีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4.4 ระยะเวลาการเก็บรักษา

โดยทั่วไปโพรไบโอติกในไอศกรีมสามารถรอดชีวิตได้ตลอดอายุการเก็บรักษา ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้วว่า การรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ส่วนผสม ของผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีการผลิต อุณหภูมิการเก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษา Salen และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติก โดยการผสมนมหมักที่มี โพรไบโอติก (ไอศกรีมผสม) แล้วนำมาแช่เยือกแข็งเป็นไอศกรีม แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 12 สัปดาห์ พบว่าจำนวนของ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus gasser*, *Lactobacillus rhamnosus* และ *Bifidobacterium bifidum* ที่มีชีวิต ลดลง 2.23, 1.68, 1.54, 1.23 และ 1.77 Log CFU/g ตามลำดับ แม้ว่าจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มี ชีวิตลดลง แต่ไอศกรีมยังคงเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติก เนื่องจากจำนวนมีจำนวนเซลล์ที่มี ชีวิตสูงกว่า 6 Log CFU/g ซึ่งเป็นจำนวนต่ำสุดที่ควรจะมีตามข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุข Fávares-Trindade และคณะ (2007) ได้ศึกษาไอศกรีม yellow mombin (*Spondias mombin*) ถูกผลิต โดยใช้กล้าเชื้อแตกต่างกันคือ *Lactobacillus acidophilus* 74-2, *Lactobacillus acidophilus* LAC4 และกล้าเชื้อโยเกิร์ต มีค่าพีเอชแตกต่างกัน (4.5 และ 5.0) และความเข้มข้นของครีมที่เติมลงไป แตกต่างกัน (ร้อยละ 5 และ 10) ทำการแช่แข็งส่วนผสม และเก็บรักษาที่ -18 องศาเซลเซียส นาน 105 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จากจำนวนเชื้อ เริ่มต้นที่อยู่ในช่วง 7-9 Log CFU/g มีการลดลงอยู่ในช่วง 6.0-3.0 Log cycle อย่างไรก็ตามทุก ตัวอย่างที่ทดสอบยังคงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า 6 Log CFU/g

4.5 สายพันธุ์ของโพรไบโอติก

การคัดเลือกโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม เป็นสิ่งจำเป็น โดยต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการผลิต และการเก็บรักษาไอศกรีม รวมทั้ง สภาวะทางเดินอาหารของมนุษย์ มีงานวิจัยที่ได้ชี้ให้เห็นว่าระหว่างการแช่แข็งไอศกรีม จะเกิดการ สูญเสียเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตสูงสุด เนื่องจากความเป็นพิษของออกซิเจน และการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิต่ำ ซึ่ง *Lactobacillus* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานอันตรายได้สูงกว่า *Bifidobacteria* ใน ผลิตภัณฑ์แช่แข็ง จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus johnsonii* La-1 สามารถมีชีวิตได้ในไอศกรีมที่

มีปริมาณน้ำตาลสูง และทนต่อการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็ง ไอศกรีม มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า 7 Log CFU/g อย่างน้อย 10 สัปดาห์ของการเก็บรักษา (Mohammadi *et al.*, 2011)

5. ผลของสารป้องกันความเย็นต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

สารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant) เป็นวัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก โดยช่วยลดค่าออสโมติกที่แตกต่างกันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ และสารป้องกันความเย็นจะทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กลงระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยขณะที่อุณหภูมิลดลงจนกระทั่งน้ำเริ่มเปลี่ยนสถานะกลายเป็นน้ำแข็ง จุลินทรีย์จำนวนหนึ่งจะได้รับผลกระทบและเกิดอาการ cold shock ซึ่งจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีลักษณะเป็นรูพรุนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic pores) เป็นผลให้ห่อหุ้มประกอบของเซลล์รั่วออกไปสู่ภายนอก เพิ่มการซึมของสายดีเอ็นเอ รวมทั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเพาะกับสภาวะของ cold shock ด้วย เมื่อน้ำเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งทั้งหมด จะทำให้จุลินทรีย์ตายและบาดเจ็บเพิ่มมากขึ้น น้ำแข็งที่เกิดขึ้นในระยะแรกนั้นจะกลายเป็นน้ำแข็งเคลือบอยู่ภายนอกเซลล์ ต่อมาน้ำภายในเซลล์จะเกิดการแข็งตัว ซึ่งจะมีผลทำลายเซลล์ และเกิดแรงดันออสโมติกขึ้นภายนอกเซลล์ เป็นผลให้เซลล์ขาดน้ำ เกิดการเปลี่ยนแปลงออสโมติกและพีเอชขึ้นในเซลล์ส่วนที่เป็นน้ำ โครงสร้างและหน้าที่ขององค์ประกอบภายในเซลล์ และสาร-โมเลกุลใหญ่ถูกทำลายไป เป็นผลให้จุลินทรีย์ตาย (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549) นอกจากนี้สารป้องกันความเย็นยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ โดยการจับกับน้ำทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายลดลง เกิดการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในปริมาณต่ำ ช่วยลดความเสียหายที่เกิดกับเซลล์ สารป้องกันความเย็นมีด้วยกันหลายชนิด ที่นิยมใช้ ได้แก่ นมพร่องมันเนย แลคโตส กลีเซอรอล ซูโครส และกลูโคส เป็นต้น

5.1 สารป้องกันความเย็นที่ใช้สำหรับโพรไบโอติก

สารหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเย็น ซึ่งสารเหล่านี้ต้องมีความสามารถในการซึมผ่านผนังเมมเบรน และละลายน้ำได้ดี โดยในแต่ละโมเลกุลของสารป้องกันความเย็นจะสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ และมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ต่ำ สารที่มีคุณสมบัติข้างต้น ได้แก่ สารประเภทคาร์โบไฮเดรต พอลิแอลกอฮอล์ หรือพอลิแอลกอฮอล์ (Polyalcohol) และกรดไฮดรอกซีโมโนคาร์บอกซิลิก (Hydroxy monocarboxylic acid) (จุฬาลักษณ์เพรชพลอย, 2549)

ซูโครส (Sucrose) ซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรต ประเภทไดแซ็กคาไรด์ หรือที่รู้จักโดยทั่วไปว่า น้ำตาลทราย (Table sugar) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{12}H_{22}O_{11}$ โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุล คือกลูโคส (Glucose) และฟรุกโทส (Fructose) Siaterlis และคณะ (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันความเย็นของน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ ซูโครส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล ในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง *Lactobacillus rhamnosus* GG พบว่าซูโครสมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ได้ดีกว่าทรีฮาโลส และซอร์บิทอล ซึ่งการใช้ซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 ทำให้ *Lactobacillus rhamnosus* GG สามารถรอดชีวิตได้หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งร้อยละ 90 และ 60 ตามลำดับ ที่สภาวะการเก็บรักษา -20 องศาเซลเซียส และการใช้ซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 มีประสิทธิภาพในการป้องกันความเย็นได้ดีกว่ากลีเซอรอล

5.2 ผลของการห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับสารป้องกันความเย็น

การใช้วัสดุหลายชนิดร่วมกันจะช่วยให้การรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกเพิ่มขึ้น สำหรับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกระบวนการผลิตที่ใช้อุณหภูมิต่ำจนเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งขึ้น รวมทั้งมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การนำสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเย็นมาใช้เป็นวัสดุพองร่วมด้วยจะช่วยเพิ่มให้การรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาของจุฬาลักษณ์ ชูพรหม (2553) ได้ทำการห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* GIF17 A5 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตร่วมกับการเติมเส้นใยถั่วเหลืองร้อยละ 3 และเคลือบด้วยสารละลายโคโคซาน แล้วนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยสารป้องกันความเย็น 3 ชนิด ได้แก่ นมพร่องมันเนย ซูโครส และเส้นใยถั่วเหลือง ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) พบว่า การใช้ซูโครสหรือนมพร่องมันเนยช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* GIF17 A5 มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งสูงที่สุด โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 73.58 และ 74.69 ตามลำดับ ต่อมาทำการศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสม สำหรับช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* GIF17 A5 ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุด โดยความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้ได้แก่ ร้อยละ 0, 5, 10, 15 และ 20 จากการทดลองพบว่าการใช้ซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 15 และ 20 ช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* GIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตสูงสุดหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและมีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้การรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 77.62 และ 78.78

จากการศึกษาของ Sultana และคณะ (2000) ได้ทำการห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus casei* ด้วยอัลจิเนตร้อยละ 2 ร่วมกับการเติมแป้งข้าวโพดร้อยละ 2 และใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันความเย็น โดยใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 และร้อยละ 20 เปรียบเทียบกับ

อัลจินตร้อยละ 2 และการใช้อัลจินตร้อยละ 2 ร่วมกับแป้งข้าวโพดร้อยละ 2 โดยใช้วิธีการอิมัลชัน ต่อมา นำเมล็ดเจลที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตก่อนและ หลังการแช่แข็ง จากการทดลองพบว่าการใช้กลีเซอรอลร่วมกับอัลจินตและแป้งข้าวโพดเป็นวัสดุ พยุง มีผลให้ *Lactobacillus casei* ที่ห่อหุ้มรอดชีวิตหลังการแช่เยือกแข็งสูงกว่าการใช้ อัลจินต และการใช้อัลจินตร่วมกับแป้งข้าวโพด เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นการรอด ชีวิตของ *Lactobacillus casei* ที่ห่อหุ้มรอดชีวิตหลังการแช่เยือกแข็งสูงขึ้น โดยการใช้อัลจินต แป้งข้าวโพดและกลีเซอรอลร้อยละ 20 เป็นวัสดุห่อหุ้มให้ค่าการรอดชีวิตสูงสุด รองลงมาคือการ ใช้อัลจินต แป้งข้าวโพด และกลีเซอรอลร้อยละ 15 การใช้อัลจินต และอัลจินตร่วมกับแป้ง- ข้าวโพด โดยให้ค่าการรอดชีวิตร้อยละ 93.31, 68.72, 66.79 และ 66.02 ตามลำดับ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติกจากนมวัว และ นมแพะ
2. เพื่อศึกษาวัสดุพุงที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาผลของวิธีการเติมและการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มในผลิตภัณฑ์ ไอศกรีม
4. เพื่อศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุ

- 1.1. นมแพะ จากฟาร์มในจังหวัดสงขลา จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 1.2. นมวัว จากฟาร์มในจังหวัดสงขลา จำนวน 10 ตัวอย่าง
- 1.3. แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Salmonellas typhimurium* DMST 562, *Listeria monocytogenes* DMST 1327 และ *Staphylococcus aureus* DMST 8840 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย โดยแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าตรวจพบในผลิตภัณฑ์ในไอศกรีม
- 1.4. น้ำมันถั่วเหลือง (Food grade, Thailand)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
2.1 Agar	Difco/ USA
2.2 Barid parker	Difco/ USA
2.3 Bismuth sulfite agar	Difco/ USA
2.4 Brain heart infusion	Difco/ USA
2.5 Eosin methylene blue broth	Difco/ USA
2.6 de man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth	Himedia/India
2.7 Lactose broth	Difco/ USA
2.8 Lauryl sulphate broth	Difco/ USA
2.9 Lysine iron agar (LIA)	Difco/ USA
2.10 Nutrient broth	Himedia/India
2.11 Plate count agar (PDA)	Difco/ USA
2.12 Peptone	Difco/ USA
2.13 Salmonella shigella agar (SSA)	Difco/ USA
2.14 Selenite cysteine broth (SCB)	Difco/ USA
2.15 Triple sugar iron (TSI)	Difco/ USA
2.16 Tryticases soy broth	Difco/ USA
2.17 Xylose lysine desaxycholate (XLD) agar	Difco/ USA

3. สารเคมี

สารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
3.1 Bile salt	Analytical	Himedia/India
3.2 Calcium carbonate (CaCO ₃)	Analytical	Finechem/Australia
3.3 Calcium cholride (CaCl ₂)	Analytical	Ajax/Australia
3.4 Glycerol	Analytical	VWR International, England
3.5 Hydrogenperoxide (H ₂ O ₂)	Analytical	วิทยาสรร/ประเทศไทย
3.6 n-hexadecane	Analytical	Merk/Germany
3.7 Pancreatin from porcine pancreas	Analytical	Sigma/USA
3.9 Pectin	Food	Ajax/Australia
3.10 Pepsin form porcine stomach mucosa (600 unit/mg)	Analytical	Sigma/USA
3.11 Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Analytical	Rankem/India
3.12 Sodium alginate	Food	Fluka/USA
3.13 Sodium cholride (NaCl)	Analytical	J.T. Baker/USA
3.14 κ-carrageenan	Food	Ajax/Australia
3.15 Sodium taurocholate (TC) hydrate	Analytical	Sigma/Germany
3.16 Sodium taurodeoxycholate (TDC) hydrate	Analytical	Sigma/Germany
3.17 Sodium glycocholate (GC) hydrate	Analytical	Sigma/Germany
3.18 Sodium Glycodeoxycholate (GDC) hadrate	Analytical	Sigma/Germany

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
4.1 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CX-21	Olympus/Japan
4.2 เครื่องเขย่าให้อากาศแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VS-848OSR-L	LMS/Japan
4.3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Sartorius/Thailand
4.4 เครื่องตีปั่นผสมอาหาร รุ่น 400 CIRCULATOR	Seward/England
4.5 เครื่องปั่นผสม รุ่น G-56OE	Scientific/USA
4.6 เครื่องปั่นไอศกรีม รุ่น 104-40	Taylor/USA
4.7 เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti-JE centrifuge	Backman Coulter/USA
4.8 ตู้บ่มเชื้อ รุ่น 854 Schwabach	Memmert/Germany
4.9 ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น FD53	Binder/Germany
4.10 พีเอชมิเตอร์ รุ่น Cyberscan PH 510	Cyberscan/USA
4.11 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ รุ่น SS-325	Tomy/Japan
4.12 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy; SEM) รุ่น FEI Quanta 400	FEI company/USA
4.13 เครื่องทำเนื้อเยื่อแห้ง (Critical point dryer; CPD) รุ่น Polaron CPD 7501	Quorum Technologies/ UK
4.14 เข็มฉีดยา เบอร์ 24G×1"	Nipro/Thailand

วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

1.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากนม

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากนมแพะจำนวน 10 ตัวอย่าง และ นมวัวจำนวน 10 ตัวอย่าง จากฟาร์มในจังหวัดสงขลาโดยนำตัวอย่าง 25 กรัม มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อแบบ ten-fold series dilution แล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากความเข้มข้นที่เหมาะสมมาทำการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมเกลือน้ำดีร้อยละ 0.1 และแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีวงใสล้อมรอบ และมีลักษณะแตกต่างกันจากงานเพาะเลี้ยง มาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีด (Streak) บนอาหารแข็ง MRS จนได้โคโลนีเดี่ยวที่

บริสุทธิ์ จากนั้นทำการข้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการข้อมแกรม เพื่อศึกษารูปร่างได้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์อะคะเลส โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเลส และเก็บเชื้อที่แยกได้ในกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเอียง (Slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

1.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นในหลอดทดลอง (*in vitro*)

1.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

ถ่ายเชื้อที่แยกได้ในข้อ 1.1 ที่เก็บในกลีเซอรอลร้อยละ 20 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำสองครั้ง เพื่อคืนสภาพเซลล์ แล้วนำมาข้อมบนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นลดเซลล์จำนวนลง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ล้างตัวเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 สองครั้ง จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ดังนี้

1.2.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน

การทดสอบการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน เป็นการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียในสถานะเลียนแบบสถานะของกระเพาะอาหารที่เป็นกรดและมีเอนไซม์เปปซิน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Wang และคณะ (2010) เติมสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่ปรับค่าพีเอชด้วย 1 M HCl ให้มีพีเอช 3 และ 2 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เอนไซม์เปปซิน 1800 unit/ml) ของตัวอย่าง ลงในแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 1.2.1 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง โดยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คำนวณค่าการรอดชีวิตโดยใช้สมการที่ 1 แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่าการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 50 ไปทดสอบในขั้นต่อไป

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\log\text{CFU/ml at 3 hr}}{\log\text{CFU/ml at 0 hr}} \times 100 \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

1.2.3 การทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีและเอนไซม์เพนทรีเอติน

การทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีและเอนไซม์เพนทรีเอติน เป็นการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียในสภาวะที่เลียนแบบสภาวะของลำไส้เล็กที่มีเกลือน้ำดีและเอนไซม์เพนทรีเอติน โดยคัดแปลงจากวิธีการของ Wang และคณะ (2010) เติมสารละลาย PBS ที่ปรับค่าพีเอชด้วย 1 M NaOH ให้มีพีเอช 8.0 เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 และเอนไซม์เพนทรีเอตินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.2 ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ดังข้อ 1.2.1 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แล้วตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง โดยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คำนวณค่าการรอดชีวิตโดยใช้สมการที่ 2 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 50 ไปทดสอบในขั้นต่อไป

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\log\text{CFU/ml at 4 hr}}{\log\text{CFU/ml at 0 hr}} \times 100 \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

1.2.4 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง

การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มจากทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด แล้วนำมาทดสอบต่อในสภาวะเกลือน้ำดี โดยเติมสารละลาย PBS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยด้วย 1 M HCl ให้มีพีเอช 2 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.3 ผ่านการเตรียมเซลล์ดังข้อ 1.2.1 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที แล้วแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง โดยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คำนวณค่าการรอดชีวิตโดยใช้สมการที่ 1 และส่วนที่ 2 เติมสารละลาย PBS ที่ปรับค่าพีเอชด้วย 1 M NaOH ให้มีพีเอช 8.0 เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 1 และเอนไซม์เพนทรีเอตินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เวลา 4 ชั่วโมง โดยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คำนวณค่าการรอดชีวิตโดยใช้สมการที่ 3 แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่มีการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 50 ไปทดสอบในขั้นต่อไป

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\log\text{CFU/ml at 7 hr}}{\log\text{CFU/ml at 0 hr}} \times 100 \dots\dots\dots \text{สมการที่ 3}$$

1.2.5 การทดสอบ cell hydrophobicity (Ocana *et al.*, 1999)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.4 มาเตรียมเซลล์ตามวิธีในข้อ 1.2.1 แล้วเติมสารละลาย PBS ที่ปรับค่าพีเอชด้วย 1 M HCl และ 1 M NaOH ให้มีพีเอช 7.2 ลงไป นำไปวัดค่าความความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยควบคุมค่าความขุ่นให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 แล้วเติม n-hexadecane ในอัตราส่วนเซลล์ซัสเพนชันต่อ n-hexadecane เป็น 4:1 จากนั้นเขย่า นาน 3 นาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เพื่อให้สารแขวนลอยของเชื้อแยกออกเป็นสองส่วน แยกเอาส่วนน้ำออกมา (ส่วนล่าง) นำไปวัดความความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (หากแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติ hydrophobicity ค่าความขุ่นควรลดลง) แล้วทำการคำนวณหา hydrophobicity โดยใช้สูตรดังสมการที่ 4 แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่า hydrophobicity สูงกว่าร้อยละ 50 ไปทดสอบขั้นต่อไป

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = \frac{(\text{O.D.}_{\text{before added n-hexadecane}} - \text{O.D.}_{\text{after added n-hexadecane}})}{\text{O.D.}_{\text{before added n-hexadecane}}} \times 100 \dots \text{สมการที่ 3}$$

1.2.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ดัดแปลงจากวิธีของ Şimşek และคณะ (2006) โดยใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Salmonellas typhimurium* DMST 562, *Listeria monocytogenes* DMST 1327 และ *Staphylococcus aureus* DMST 8840 โดยวิธี agar spot นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.5 ที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spot (Drop) บนอาหารแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง (มีเชื้อประมาณ 6 Log CFU/ml) จากนั้นนำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาแขวนลอยในอาหาร BHI soft agar (0.75% agar) แล้วนำไปเททับบนอาหารแข็ง MRS ที่มีแบคทีเรียแลกดิกเจริญอยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ จะเกิดวงใส (Inhibition zone) รอบ ๆ cell spot วัดขนาดของวงใสรอบ ๆ cell spot (จากขอบนอก cell spot ถึงขอบนอกวงใส) คัดเลือกแบคทีเรียแลกดิกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ

นำแบคทีเรียแลกดิกไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ มายืนยันผลความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี overlay (Overlay method) ดัดแปลงจากวิธีการของ Prema (2013) โดยนำแบคทีเรียแลกดิก ซึ่งเจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จำนวน 1 หลูป มาขีดเส้นยาว 2 เซนติเมตร บนอาหารแข็ง MRS แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้ว overlay ด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI (0.75% agar) ที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มีเชื้อประมาณ 6 Log CFU/ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หากเกิดวงใส รอบ ๆ เส้นที่ขีดไว้ วัดขนาดของวงใส รอบ ๆ แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

1.2.7 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี (Bile salt hydrolase)

ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี ตามวิธีของ Taranto และคณะ (1996) เตรียมอาหาร MRS soft agar ที่เติม TC, TDC, GC และ GDC ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกจากข้อ 1.2.7 ที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา drop ลงบน MRS soft agar ที่เติมเกลือน้ำดีแล้วนำจานเพาะเชื้อไปป้อนในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แบคทีเรียแลคติกที่มีตะกอน (Opaque halo) ของกรดเกลือน้ำดีรอบ ๆ แสดงว่าสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดีได้

1.3 การเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1.2.7 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น มาเทียบเคียงสายพันธุ์ โดยส่งวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA นำลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank database โดยใช้โปรแกรม BLAST

2. การศึกษาคัดเลือกวัสดุพืงที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้

2.1 ศึกษาความเข้มข้นของวัสดุพืงชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

2.1.1 อัลจิเนตร่วมกับแป้งข้าวโพดโดยวิธีอิมัลชัน

การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนตร่วมกับแป้งข้าวโพดด้วยวิธีอิมัลชัน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Homayouni และคณะ (2008a) ซึ่งอัลจิเนต แป้งข้าวโพด และซูโครส ปริมาณความเข้มข้นแสดงดัง Table 6 ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ลดอุณหภูมิของผสมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้มีอุณหภูมิ 40–45 องศาเซลเซียส เติมเชื้อโพรไบโอติกที่เตรียมดังข้อ 2.1 ร้อยละ 0.1 ของสารละลายอัลจิเนต-แป้งข้าวโพด-ซูโครสลงไป จากนั้นเติมน้ำมันพืชที่ผสมเลซิทินที่ปลอดเชื้อร้อยละ 0.2 ในอัตราส่วน 2:1 ของสารละลายอัลจิเนต ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จนเกิดอิมัลชันที่สมบูรณ์ หลังจากนั้นเติม 0.1 M CaCl₂ ที่ปลอดเชื้อ ในอัตราส่วน 2:1 ของ

สารละลายอัลจินต แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียว พักทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนเกิดเป็นเม็ดเจลออกมา แยกน้ำมันออกโดยใช้ผ้าขาวบางที่ปลอดเชื้อ ล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.9 ที่ผสมกลีเซอรอลร้อยละ 5 ปลอดเชื้อ เก็บรักษาเม็ดเจลที่ในขวดแก้วปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

Table 6 Concentration of sodium alginate and sucrose used as supporting material for encapsulation of probiotic

Treatments	Concentration of supporting material (%)		
	Sodium-alginate	Hi-maize	Sucrose
A1-0	1	2	0
A2-0	2	2	0
A3-0	3	2	0
A1-5	1	2	5
A2-5	2	2	5
A3-5	3	2	5
A1-10	1	2	10
A2-10	2	2	10
A3-10	3	2	10

Note: A = alginate

2.1.2 เพกตินโดยวิธีเอกซทรูชัน

การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยเพกติน ใช้เทคนิคเอกซทรูชัน ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Voo และคณะ (2008) โดยชั่งเพกติน และซูโครสในปริมาณความเข้มข้นแสดงดัง Table 7 ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำของผสมที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ลดอุณหภูมิลงให้เป็น 40-45 องศาเซลเซียส แล้วเติมเชื้อโพรไบโอติกที่ได้จากข้อ 2.1 ในปริมาณร้อยละ 0.1 ลงในสารละลายเพกติน-ซูโครส แล้วผสมให้เข้ากันด้วยความเร็ว 500 รอบต่อ นาที นาน 5 นาที ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24G ความยาวเข็ม 1 นิ้ว ดูดสารละลายหยดลงใน 0.1 M CaCl₂ ที่ปลอดเชื้อ เพื่อผลิตเป็นเม็ดเจล แยกเม็ดเจลที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.9 ที่ผสม กลีเซอรอลร้อยละ 5 ปลอดเชื้อ เก็บรักษาเม็ดเจลที่ในขวดแก้วปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

2.1.3 คาร์ราจีแนนโดยวิธีเอกซทรูชัน

การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยคาร์ราจีแนน โดยเทคนิคเอกซทรูชัน ดัดแปลงจากวิธีของ Tsen และคณะ (2004) ชั่ง κ-คาร์ราจีแนน และซูโครสในปริมาณความเข้มข้นแสดงดัง Table 8 ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำของผสมที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ลดอุณหภูมิลงให้เป็น 40-45 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย

แขวนลอยของโพรไบโอติกที่ได้จากข้อ 2.1 ลงในสารละลายคาร์ราจีแนนในอัตราส่วน 1:1 แล้วใช้ เจ็มนิดยาเบอร์ 24G ความยาวเข็ม 1 นิ้ว ดูดสารละลายหยดลงใน 0.5 M potassium chloride (KCl) ปลอดเชื้อ เพื่อผลิตเป็นเม็ดเจล แช่เม็ดเจลที่ได้ไว้ในสารละลาย KCl แล้วเขย่าที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แยกเม็ดเจลออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.9 ที่ผสมกลีเซอรอลร้อยละ 5 ปลอดเชื้อ เก็บรักษาเม็ดเจลที่ในขวดแก้วปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

Table 7 Concentration of pectin and sucrose used as supporting material for encapsulation of probiotic

Treatments	Concentration of supporting material (%)		
	Low methoxy pectin	High methoxy pectin	Sucrose
LP-0	5	0	0
LP-5	5	0	5
LP-10	5	0	10
HP-0	0	5	0
HP-5	0	5	5
HP-10	0	5	10
MixP-0	2.5	2.5	0
MixP-5	2.5	2.5	5
MixP-10	2.5	2.5	10

Note: LP = 5%low methoxy pectin, HP = 5%high methoxy pectin, Mix P = 2.5% low methoxy pectin + 2.5%high methoxy pectin

Table 8 Concentration of κ -carrageenan and sucrose used as supporting material for encapsulation of probiotic

Treatments	Concentration of supporting material (%)	
	Carrageenan	Sucrose
C3-0	3	0
C3-5	3	5
C3-10	3	10
C4-0	4	0
C4-5	4	5
C4-10	4	10

Note: C = carrageenan

2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy; SEM)

นำเม็ดเจลที่ห่อหุ้มเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.2 มาศึกษาลักษณะโครงสร้างของเม็ดเจล และลักษณะของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในเม็ดเจล โดยตัดแปลงจากวิธีของ Allan-Wojas และคณะ (2007) โดยนำเม็ดเจลจำนวน 1 กรัม มาตรึง (Fix) ด้วยสารละลาย 0.1 M PBS พีเอช 5.0 ที่มี glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (v/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างเม็ดเจล 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.1 M PBS pH 5.0 (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) แล้วนำมากำจัดน้ำ (Dehydration) ด้วย ethanol series เริ่มจากความเข้มข้นร้อยละ 50 (15 นาที), 70 (15 นาที), 90 (15 นาที) และ absolute ethanol (3 × 15 นาที) จากนั้นนำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยเครื่อง Critical point drying นำเม็ดเจลที่ผ่านการทำให้แห้งมาติดบนแท่นวางตัวอย่าง (Stub) แล้วนำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater หลังจากนั้นนำเม็ดเจลไปดูรูปร่างด้วยเครื่อง SEM Quanta โดยใช้ AV 12.50 และ 20 kV

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

ประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกของวัสดุผงแต่ละชนิดตัดแปลงจากวิธีการของ Sandova-Castilla และคณะ (2010) ซึ่งเม็ดเจลจากข้อ 2.2 มา 1 กรัม เติมนลงในสารละลาย PBS พีเอช 7.2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 10 นาที เพื่อให้เม็ดเจลแตก แล้วทำการเจือจางแบบ ten-fold dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น Log CFU/g นำมาคำนวณหาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency) ดังสมการที่ 5 คัดเลือกวัสดุผงที่มีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงสุด เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{X_f}{X_0} \times 100 \dots \dots \dots \text{สมการที่ 5}$$

กำหนดให้ X_0 เป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตก่อนการห่อหุ้ม

X_f เป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังการห่อหุ้ม

2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในสภาวะการปั่นไอศกรีม

ทำการผลิตไอศกรีมวานิลลาสูตรพื้นฐาน โดยใช้ส่วนผสมไอศกรีมตามรายละเอียดดัง Table 9 และมีขั้นตอนการผลิตดังนี้คือ ผสมส่วนผสมแห้งทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำส่วนผสมที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำและครีมไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้ว

เทส่วนผสมแห้งลงไปกวนตลอดเวลา ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 30 วินาที ตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำเย็นจัดจนอุณหภูมิลดลงเป็น 15 องศาเซลเซียส แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้เป็นส่วนผสมไอศกรีมเหลว (Ice cream mixed) ต่อมานำไอศกรีมเหลวไปแช่เยือกแข็ง ด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม นาน 10 นาที จากนั้นนำไปบรรจุลงในถ้วยพลาสติกที่มีเม็ดเจลที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.4 (2 กรัม) ปริมาณ 20 กรัม ต่อมานำไอศกรีมออกเป็นสองชุดทดสอบ ชุดที่ 1 นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 (X_0) ส่วนชุดที่สองนำไปแช่แข็ง (Hardening) ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 (X_t) แล้วนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพการรอดชีวิต ดังสมการที่ 6 คัดเลือกวัสดุพุงที่โพรไบโอติกมีค่าการรอดชีวิตสูง เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

$$\text{Survival (\%)} = \frac{X_f}{X_0} \times 100 \dots\dots\dots \text{สมการที่ 6}$$

กำหนดให้ X_0 เป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตก่อนการแช่แข็ง

X_t เป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Table 9 Ingredients of vanilla ice cream

Ingredients	Ratio (%)
Cream (35%)	25.6
Skimmed milk powder	10.2
Sugar	12.0
Carboxymethyl cellulose (CMC)	0.8
Water	51.4
Modified with vanilla and cream aroma	-

Source: สมจิตร สุรพัฒน์ (2544)

2.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง

ซึ่งเม็ดเจลจากข้อ 2.2 จำนวน 1 กรัม แช่ในสารละลาย PBS พีเอช 2 ที่มีเอนไซม์เปปซิน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงแยกเม็ดเจลด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นแบ่งออกเป็น

สองส่วน ส่วนแรก คือ ส่วนที่ไม่ผ่านสภาวะเกลือน้ำดีจะนำมานับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดด้วยวิธีการ pour plate และส่วนที่สองนำเม็ดเจลเติมลงในสารละลาย PBS บัพเฟอร์ที่ปรับพีเอชเป็น 8.0 และมีเกลือน้ำดีเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 มีเอนไซม์เพนทรีเอตินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตด้วยวิธีการ pour plate จำนวนค่าการรอดชีวิตดังสมการที่ 3 คัดเลือกวัสดุพุงที่เซลล์สามารถรอดชีวิตได้สูง เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจล

นำเม็ดเจลที่เตรียมจากวัสดุพุงที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5 และ 2.6 มา 1 กรัม เติมลงขวดแก้ว ขนาดประมาณ 20 มิลลิลิตร เติมสารละลาย PBS พีเอช 7.2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ และบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง (0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6) ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโพรไบโอติกด้วยวิธีการ pour plate (Sheu และ Marshall, 1993) จำนวนร้อยละการปลดปล่อยเซลล์ โดยใช้สมการที่ 7 คัดเลือกวัสดุพุงที่สามารถปลดปล่อยเซลล์โพรไบโอติกได้สูง เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

$$\text{Release (\%)} = \frac{\text{Released bacteria count difference time (log CFU/ml)}}{\text{Initial bacteria count (log CFU/ml)}} \times 100 \dots \dots \dots \text{สมการที่ 7}$$

3. ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในขั้นตอนการผลิตไอศกรีม

3.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกเริ่มต้น

3.1.1 เซลล์โพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม (Free cell)

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 1 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เหยี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตัวเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นความเข้มข้นร้อยละ 0.85 สองครั้ง นำตัวเซลล์ไปแช่เพนชันในนมยูเอชทีแช่เย็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ (เก็บไว้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง) (ดัดแปลงจาก Nousia *et al.*, 2011) ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโพรไบโอติกที่แช่เพนชันอยู่ในนมยูเอชที โดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 รายงานผลเป็น Log CFU/ml

3.1.2 เซลล์โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม (Encapsulated cell)

นำเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 1 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยวัสดุพอง และวิธีการที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 2 มาทำซัสเพนชันในนมยูเอชทีแช่เย็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ (เก็บไว้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง) ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของโพรไบโอติกที่ซัสเพนชันในนมยูเอชที โดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 รายงานผลเป็น Log CFU/ml

3.2 การผลิตไอศกรีมวานิลลา

ทำการผลิตไอศกรีมวานิลลาสูตรพื้นฐาน โดยใช้ส่วนผสมไอศกรีมตามรายละเอียดดัง Table 9 และมีขั้นตอนการผลิตดังนี้คือ ผสมส่วนผสมแห้งทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำส่วนผสมที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำและครีมไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนผสมแห้งลงไปกวนตลอดเวลา ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 30 วินาที ตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำเย็นจัดจนอุณหภูมิลดลงเป็น 15 องศาเซลเซียส แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้เป็นส่วนผสมไอศกรีมเหลว หลังจากนั้นนำแช่เยือกแข็ง ด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม บรรจุไอศกรีมในถ้วยพลาสติก ปิดฝา แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส (สมจิตรสุรพัฒน์, 2544) เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

3.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกที่เติมในไอศกรีมเหลวก่อนการปั่นไอศกรีม

หลังจากพาสเจอร์ไรส์ส่วนผสมไอศกรีม เติมเซลล์โพรไบโอติกที่เป็นเซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) ได้จากข้อ 3.1.1 หรือ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มเตรียมได้จากข้อ 3.1.2 ลงไป โดยควบคุมจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตเริ่มต้นประมาณ 8-10 Log CFU/g ของไอศกรีม ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตในไอศกรีมเหลว ต่อมนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม นาน 10 นาที ขั้นตอนการปั่นไอศกรีมจะมีการตีอากาศเข้าไปในเนื้อไอศกรีม ทำให้ปริมาตรของไอศกรีมเพิ่มขึ้น ต่อมนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตหลังจากแช่เยือกแข็ง บรรจุไอศกรีมลงในถ้วยพลาสติก ปิดฝา นำไปแช่แข็งที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตหลังขั้นตอนการแช่แข็ง นำไอศกรีมที่บรรจุอยู่ในถ้วยพลาสติกไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างไอศกรีมเพื่อตรวจสอบจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตทุก ๆ สัปดาห์

3.4 ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่เติมหลังการปั่นไอศกรีม (After Freezing)

ทำการผลิตไอศกรีมตามข้อ 3.2 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไอศกรีมนาน 10 นาที จากนั้นเติมเซลล์โพรไบโอติกที่เป็นเซลล์อิสระ ที่ได้จากข้อ 3.1.1 หรือ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.2 ลงไป โดยควบคุมจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตเริ่มต้นประมาณ 8-10 Log CFU/g ของไอศกรีม บรรจุไอศกรีมลงในถ้วยพลาสติก ปิดฝา นำไปแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตหลังขั้นตอนการแช่แข็ง นำไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่บรรจุในถ้วยพลาสติกไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างตรวจสอบจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตทุก ๆ สัปดาห์

3.5 การตรวจสอบคุณภาพของไอศกรีม

นำไอศกรีมโพรไบโอติกจากข้อ 3.3 และ 3.4 มาตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพชีวภาพ และประสาทสัมผัส

3.5.1 การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

3.5.1.1. ค่าสี

วัดค่าสีระบบ Hunter Lab และแสดงผลเป็น L*, a* และ b* ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Hunter Lab Colorimeter)

3.5.1.2. อัตราการขึ้นฟู

การวัดอัตราการขึ้นฟูตามวิธีการของ Akin และคณะ (1990 อ้างโดย Akin *et al.*, 2007) และคำนวณหาอัตราการขึ้นฟู (overrun) ตามสมการที่ 8

$$\text{Overrun (\%)} = \frac{(\text{weight of unit mix} - \text{weight of equal volume of ice cream})}{\text{weight of equal volum of ice cream}} \times 100 \dots \dots \dots \text{สมการที่ 8}$$

3.5.1.3. การวัดอัตราการละลาย

การวัดอัตราการละลายดัดแปลงจากวิธีของ Garcia และคณะ (1995) โดยนำไอศกรีมที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งบรรจุอยู่ในถ้วยพลาสติก นำเนื้อไอศกรีมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนวางบนตะแกรงสเตนเลสที่รองรับด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เริ่มจับเวลาอัตราการละลาย เมื่อไอศกรีมหยดลงในบีกเกอร์หยดแรก ชั่งน้ำหนักไอศกรีมที่ละลายทุก ๆ 5 นาที ข้อมูลที่ได้นำไปหาร้อยละการละลายที่เวลา 15 และ 35 นาที โดยใช้สมการที่ 9

$$\text{Melting (\%)} = \frac{\text{weight of melted ice cream}}{\text{weight of ice cream at initial time}} \times 100 \dots \dots \dots \text{สมการที่ 9}$$

3.5.2 การตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน ไอศกรีม (พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522ค, 2544)

3.6.2.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

3.6.2.2 ปริมาณแบคทีเรียแลกติก

3.6.2.3 ตรวจสอบจุลินทรีย์ก่อโรค

- *Escherichia coli* ตามวิธีการของ AOAC (2000)

- *Staphylococcus aureus* ตามวิธีการของ AOAC (2000)

- *Salmonella* sp. ตามวิธีการของ AOAC (2000)

- *Bacillus cereus* ตามวิธีการของ BAM (2002)

- *Listeria monocytogenes* ตามวิธีการของ BAM (2002)

3.5.3 การตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านการยอมรับของผู้บริโภค ด้วยวิธี Hedonic scale 9 score โดยผู้ทดสอบที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝนจำนวน 30 คน ปัจจัยที่ทดสอบ ได้แก่ ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น สี รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomize Complete Block Design)

4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ SPSS (Statistical Packages for the Social Science) version 11.5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

1.1 แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนม

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนมวัว และนมแพะ จากฟาร์มในพื้นที่จังหวัดสงขลา จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียทั้งหมด 190 ไอโซเลท ดังแสดงใน Table 10 จากตารางพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากนมวัว นมแพะแตกต่างกัน โดยองค์ประกอบของนมวัวและนมแพะมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียสร้างกรด เนื่องจากองค์ประกอบในนมวัวและนมแพะแตกต่างกัน โดยนมวัวมีน้ำตาลสูงกว่านมแพะ (Bosworth and Van Slyke, 1916) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ceballos และคณะ (2009) ที่พบว่าปริมาณน้ำตาลแลคโตสในนมวัวสูงกว่านมแพะ โดยมีปริมาณแลคโตสเท่ากับร้อยละ 4.47 และ 4.11 ตามลำดับ น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรด เมื่อปริมาณน้ำตาลในนมวัวสูงกว่านมแพะ จึงทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียสร้างกรดได้มากกว่า นอกจากนี้แหล่งของนมดิบ อาหารที่สัตว์บริโภค และอายุของแม่วัวหรือแพะ จะส่งผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ดั้งเดิมในลำไส้ที่แตกต่างกัน

Table 10 Number of bacteria isolated from cow and goat milk

Samples	Source of sample	Number of sample	Number of isolated	Total isolates
Cow milk	Sadao	4	50	100
	Hatyai	3	20	
	Chana	3	30	
Goat milk	Sadao	6	60	90
	Hatyai	2	20	
	Chana	2	10	

นำแบคทีเรียที่สร้างกรดทั้ง 190 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ การทดสอบทางสัณฐานวิทยา (การย้อมสีแบบแกรมดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์) และการสร้างเอนไซม์อะมิเลส โดยแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลม หรือท่อน (บุษกร อุตรชาติ, 2548) และไม่สร้างเอนไซม์อะมิเลส เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดสารไซโตโครม (Cytochromes) และฟอริไฟลิน (Phophylin) จึงให้ผลอะมิเลสเป็นลบ (สุเมธนา วัฒนสินธุ์, 2549) จากการศึกษาพบว่าสามารถ

คัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 108 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีเรียรูปกลม (Cocci) และ รูปท่อน (Rod) ทั้งหมด 44 และ 64 ไอโซเลท ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 11 จากตารางแสดงให้ เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนมวัวเป็นรูปท่อนมากกว่ารูปกลม และแบคทีเรียแลคติกที่แยก ได้จากนมแพะเป็นรูปกลมมากกว่ารูปท่อน

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Espeche และคณะ (2012) ซึ่งทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากนมวัว จากฟาร์มในประเทศอาร์เจนตินาจำนวน 51 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 33 ตัวอย่าง โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกอยู่ ระหว่าง $5.62 \times 10^2 \pm 4.10 \times 10^2$ CFU/ml ต่อตัวอย่าง และการศึกษาของ Badis และคณะ (2004) ซึ่งทำ การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 725 สายพันธุ์ จากนมแพะดิบในประเทศอัลจีเรีย พบว่า แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ประกอบด้วย *Lactobacillus* (ร้อยละ 31.6), *Lactococcus* (ร้อยละ 28.4), *Leuconostoc* (ร้อยละ 22.2), *Streptococcus* (ร้อยละ 13.7) และ *Pediococcus* (ร้อยละ 4.1) Delavenne และคณะ (2012) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากนมวัว นมแพะ และนมแกะใน ประเทศฝรั่งเศส จำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากนมวัว และนมแพะมี จำนวนสูงกว่านมแกะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) แสดงให้เห็นว่าในนมวัวและนมแพะ เป็นแหล่งของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้อาจมีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติก ที่จะช่วยก่อ ประโยชน์แก่สุขภาพของมนุษย์ได้ จึงนำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 108 ไอโซเลท ไปทดสอบ คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นในหลอดทดลอง

Table 11 Number of lactic acid bacterial strains isolated from cow and goat milk

Samples	Number of LAB strains		
	Cocci	Rod	Total strains
Cow milk (CM)	1	53	54
Goat milk (GM)	43	11	54
Total strains	44	64	108

1.2 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นในหลอดทดลอง (*In vitro*) ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

1.2.1 ความสามารถในการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน

ในกระเพาะอาหารของมนุษย์ มีเอนไซม์เปปซิน เป็นองค์ประกอบหลัก ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนหรือเปปไทด์ (Peptides) ให้เป็นเปปไทด์สายสั้น หรือกรดอะมิโน โดยในแต่ละวันผู้ใหญ่จะหลั่งเอนไซม์เปปซินออกมา 20,000-30,000 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity unit) หรือเทียบเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อวัน (Hur *et al.*, 2006) โดยเฉลี่ยเอนไซม์เปปซินจะถูกหลั่งออกมาประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหาร (หากรับประทานอาหาร 3 มื้อต่อวัน) และพีเอชที่เหมาะสม (pH optimum) สำหรับการทำงานของเอนไซม์เปปซินเท่ากับ 1.6-3.2 (Ganong, 2001) ค่าพีเอชในกระเพาะอาหารจะเริ่มจาก 1 แล้วเพิ่มเป็น 4.5 อย่างรวดเร็วหลังจากรับประทาน และโดยเฉลี่ยอาหารที่รับประทานเข้าไปจะอยู่ในกระเพาะอาหารประมาณ 3 ชั่วโมง (Guo *et al.*, 2009)

การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเอนไซม์เปปซิน พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 108 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการทนต่อสภาวะกรดที่พีเอช 1, 2 และ 3 ที่มีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตได้มากกว่าร้อยละ 50 ที่พีเอช 3, 2 และ 1 จำนวน 48, 29 และ 8 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนกรดที่พีเอช 1 ประกอบด้วย GM41 และ GM52 ซึ่งคัดแยกได้จากนมแพะ และ CM7, CM15, CM21, CM46, CM47 และ CM53 ซึ่งคัดแยกได้จากนมวัว โดยมีค่าการรอดชีวิตแสดงดัง Figure 6 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Maragkoudakis และคณะ (2006) ซึ่งนำ *Lactobacillus* จำนวน 29 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม 9 ชนิด ประกอบด้วย นมวัวสด, Yakult, Actimel (Danone), Feta brine, Feta cheese, Cheddar cheese, Kaseri cheese และ Galotyri cheese มาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะกรดที่พีเอช 1 และ 3 โดยที่พีเอช 3 พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นหลังจากบ่มนาน 3 ชั่วโมง แต่เมื่อทดสอบที่สภาวะพีเอช 1 หลังจากบ่มนาน 3 ชั่วโมง พบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus* sp. ACA-C 108 และ *Lactobacillus* sp. ACA-DC 109 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากนมวัวสดเท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตได้ นอกจากนี้ Cebeci และ Cürakan (2003) ทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดในอาหาร MRS broth ที่พีเอช 3.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่ามี *Lactobacillus* sp. จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญเติบโตได้จากทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรีย ต้องอาศัยกลไกในการ

รักษาระดับพีเอชคือ การปล่อยโปรตอนออกจากไฮโดรพลาสม์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์- H^+ -ATPase และต้องใช้พลังงาน ATP ในการขับโปรตอนออก (McDonald *et al.*, 1990)

1.2.2 ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่มีเอนไซม์เพนทรีเอติน

หลังจากอาหารผ่านกระเพาะอาหารจะเข้าสู่ลำไส้เล็ก อาหารจะอยู่ในลำไส้เล็กประมาณ 4 ชั่วโมง ลำไส้เล็กของมนุษย์มีเอนไซม์ที่ถูกหลั่งมาจากตับอ่อน (Pancreatic juice) มีสิ่งเหลือๆ มีฤทธิ์เป็นเบสอ่อนๆ และมีพีเอชประมาณ 7-8 โดยเอนไซม์จากตับอ่อนมีหลายชนิดชนิดหลักๆ ประกอบด้วย เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์ ได้แก่ ทริปซิน (Trypsin) และไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) เอนไซม์ที่ย่อยแป้งและน้ำตาลที่ย่อยในปากไม่หมด ได้แก่ อะไมเลส (Amylase) และเอนไซม์ย่อยไขมันหลังจากไขมันถูกทำให้แตกตัวด้วยน้ำดีที่หลั่งออกจากตับ ได้แก่ ไลเปส (Lipase) (เชวาน์ ซิโนร์กซ์ และ พรธณี ซิโนร์กซ์, 2540; ปรีชา สุวรรณพินิจ และ นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2551)

การทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่มีเอนไซม์เพนทรีเอติน ในสถานะเลียนแบบลำไส้เล็กของมนุษย์ โดยใช้เอนไซม์เพนทรีเอตินที่ประกอบด้วย เอนไซม์ย่อยโปรตีน อะไมเลส และไลเปส พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้ข้างต้น (สามารถทนกรดที่พีเอช 1 ในสถานะที่มีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) สามารถรอดชีวิตที่พีเอช 8.0 ในสถานะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 1 และ 2 และมีเอนไซม์เพนทรีเอตินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ และมีค่าการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 50 ดังแสดงใน Figure 6 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sieladie และคณะ (2011) ซึ่งทำการคัดเลือกแบคทีเรีย *Lactobacilli* ที่ทนกรดจำนวน 15 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacilli* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบสามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าร้อยละ 50 ในสถานะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง Zego และคณะ (2011) นำ *Lactobacillus plantarum* ที่คัดแยกได้จาก Italian และ Argentinean cheeses จำนวน 98 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.1 และ 0.3% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยประมาณร้อยละ 40 โดยมีค่าการรอดชีวิตต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับร้อยละ 12.21 และ 95.98 ตามลำดับ

แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเกลือน้ำดีที่จับกับกรดอะมิโน (Conjugated bile salt) ได้เป็นเกลือน้ำดีอิสระ (Unconjugated bile salt) ทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถทนต่อการทำลายของเกลือน้ำดีได้ Hofmann และ Eckmann (2006) รายงานว่าเกลือน้ำดีอิสระยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่า

เมื่อเปรียบเทียบกับเกลือ น้ำดีที่จับกับกรดอะมิโน และเกลือ น้ำดีอิสระจะสูญเสียคุณสมบัติการเป็นไฮโดรโฟบิก และไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic) ส่งผลให้การละลายน้ำลดลง ทำให้การซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียลดลง

1.2.3 ความสามารถในการทนต่อสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร โดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง เริ่มจากนำเซลล์แบคทีเรียมาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารที่พีเอช 2 ในสภาวะที่มีเอนไซม์เปปซิน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มต่อที่สภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กที่พีเอช 8 มีเกลือ น้ำดีร้อยละ 1 และเอนไซม์เพนทรีเอดิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าที่สภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารแบคทีเรียแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าร้อยละ 50 แต่เมื่อนำไปทดสอบในสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องพบว่า มีเพียง 7 ไอโซเลท (GM41, CM7, CM15, CM21, CM46, CM47 และ CM53) ที่สามารถรอดชีวิตได้มากกว่าร้อยละ 50 และแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ GM52 มีค่าการรอดชีวิตต่ำกว่าร้อยละ 50 โดยค่าการรอดชีวิตดังแสดงใน Figure 6

เมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับสภาวะในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีพีเอชต่ำและมีเอนไซม์เปปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน จะทำให้แบคทีเรียเกิดการบาดเจ็บ เมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับสภาวะในลำไส้เล็กที่ประกอบด้วยเกลือ น้ำดีที่ความเข้มข้นสูง ที่สามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็วเป็นเหตุให้โปรตีนที่แทรกอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Integral membrane protein) แยกออกมา ส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาและเป็นเหตุให้เซลล์ตายไปในที่สุด (Huang and Adams, 2004; Begley *et al.*, 2005)

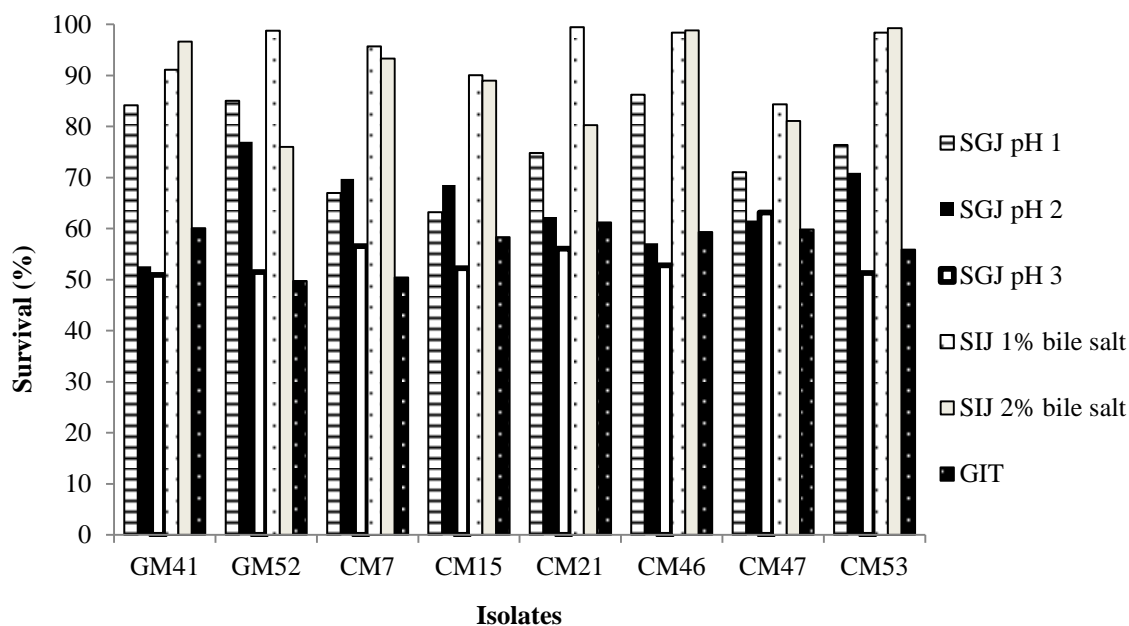


Figure 6 Survival rate of selected lactic acid bacteria isolates after exposure to simulated gastrointestinal tract condition at 37 °C.

SGJ = simulated gastric juice containing 3 mg/ml pepsin for 3 h.; SIJ = simulated small intestine containing 3 mg/mi pcreatin at pH 8.0 for 4 h; GIT = simulated gastrointestinal tract condition (gastric juice containing 3 mg/ml pepsin for 3 h and small intestine containing 3 mg/mi pancreatin at pH 8.0 for 4 h)

1.2.4 ความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ (Cell hydrophobicity)

การเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านเป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับการก่อก่อประโยชน์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยแบคทีเรียจะใช้ส่วนปลายของฟิไล (Pili) ที่อยู่บนผิวเซลล์ในการเข้าเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน โดยฟิไลชนิดที่ใช้ในการยึดเกาะเซลล์เรียกว่า fimbriae นอกจากนี้แบคทีเรียโพรไบโอติกอาจใช้องค์ประกอบของโครงสร้างที่อยู่บนผิวเซลล์ เช่น แคปซูล (Capsule) หรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ได้แก่ ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) หรือ ไกลโคลิปิด ในการเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน หรือรีเซพเตอร์ (Receptor) โดยจะจับกับ โมเลกุลของน้ำตาลที่รีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์ อย่างไรก็ตามรีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์จะมีความจำเพาะกับแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, 2555)

Hydrophobicity เป็นคุณสมบัติสำคัญสำหรับแบคทีเรียเพื่อใช้ในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อทางเดินอาหาร และส่งเสริมสุขภาพของร่างกาย แบคทีเรียที่สามารถเกาะติดลำไส้ได้จะเป็นตัวขับเคลื่อนสำคัญให้ร่างกายของมนุษย์เกิดกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ

ร่างกาย โดยเฉพาะในลำไส้ที่มีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าร้อยละ 80 จึงถือว่าระบบทางเดินอาหารเป็นส่วนมีบทบาทสูงต่อสุขภาพของมนุษย์ (ไชยวัฒน์ ไชยสุด และ ศศิธร ศิริคุณ, 2553)

การวัดค่า hydrophobic บริเวณผิวเซลล์แบคทีเรีย สามารถวัดได้โดยตรง เช่น contact angle (CAM) และวิธีทางอ้อม เช่น Microbial adhesion to hexadecane (MATH) assay ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ วิธีการนี้จะวัดความสามารถของแบคทีเรียในการเกาะติดกับ n-hexadecane โดยอาศัยแรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic force) ความสามารถในการเกาะติดกับ n-hexadecane สัมพันธ์กับความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อผนังลำไส้เล็ก จากการทดลองของ Deepika และคณะ (2009) ได้นำแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus rhammusus* GG มาทดสอบผลของอายุของโพรไบโอติกต่อความสามารถในการเกาะติดกับ n-hexadecane (pH 3.0) และ Caco-2 ECACC 8601202 cell line พบว่าเมื่ออายุของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 8 และ 13 ชั่วโมง ค่าร้อยละการเกาะติดกับ n-hexadecane จะเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้นเป็น 26 ชั่วโมง ความสามารถในการเกาะติดกับ n-hexadecane จะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการเกาะติดกับ Caco-2 ECACC 8601202 cell line

จากการการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท มีค่า hydrophobicity ต่ำกว่าร้อยละ 50 ดังแสดงใน Figure 7 โดยทุกไอโซเลทที่ทดสอบ มีค่า hydrophobicity ต่ำกว่าร้อยละ 20 ไอโซเลทที่มีค่า hydrophobicity สูงสุดคือ CM21 และ CM41 โดยมีค่า hydrophobicity เท่ากับร้อยละ 14.96 ± 4.69 และ 14.19 ± 0.42 ตามลำดับ รองลงมาคือ CM15, CM7, CM53, CM46 และ CM47 ซึ่งมีค่า hydrophobicity ร้อยละ 11.93 ± 0.02 , 10.24 ± 0.55 , 8.32 ± 1.36 , 8.25 ± 0.22 และ 2.02 ± 0.08 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Maldonado และคณะ (2012) ซึ่งนำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 96 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพื้นและไส้ตรงของลูกสุกรสุขภาพดี มาทดสอบคุณสมบัติการเกาะติดกับ n-hexadecane พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ส่วนใหญ่มีค่า hydrophobicity อยู่ในระดับต่ำ (ร้อยละ 0-30) มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้น ที่แสดงค่า hydrophobicity สูงกว่าร้อยละ 60 โดยความสามารถในการเกาะติดของแบคทีเรียแลคติกขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของผนังเซลล์ แบคทีเรียแลคติกซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกผนังเซลล์จะประกอบไปด้วย thick peptidoglycan layer ซึ่งมีพื้นผิวหลายชนิด ประกอบด้วย (lipo)-teichoic acid, polysaccharides, covalently bound proteins และ S-layer protein มีหลายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบเหล่านี้มีบทบาทต่อการเกาะติดกับผนังเซลล์ลำไส้เล็ก คุณสมบัติพื้นผิวเซลล์ของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะและระยะเวลาที่เจริญ (Deepika *et al.*, 2009) และจากรายงานของนักวิจัยหลายท่านแสดงให้เห็นว่า

คุณสมบัติ hydrophobicity เป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งความสามารถในการเกาะติดกับผิวของลำไส้เล็กสัมพันธ์กับการผลิต exopolysaccharides ซึ่งเป็นแคปซูลชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่พบได้น้อยมากในแบคทีเรีย (Maldonado *et al.*, 2012) แคปซูลเป็นองค์ประกอบที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด มีลักษณะเป็นสารเหนียว เป็นเมือกคล้ายวุ้น ไม่ติดสีแกรม (Gram staining) มีหน้าที่สำคัญคือ ช่วยให้แบคทีเรียเกาะติดกับพื้นผิว และยึดติดกับโฮสต์ได้ (พิมพ์เพ็ญพรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์)

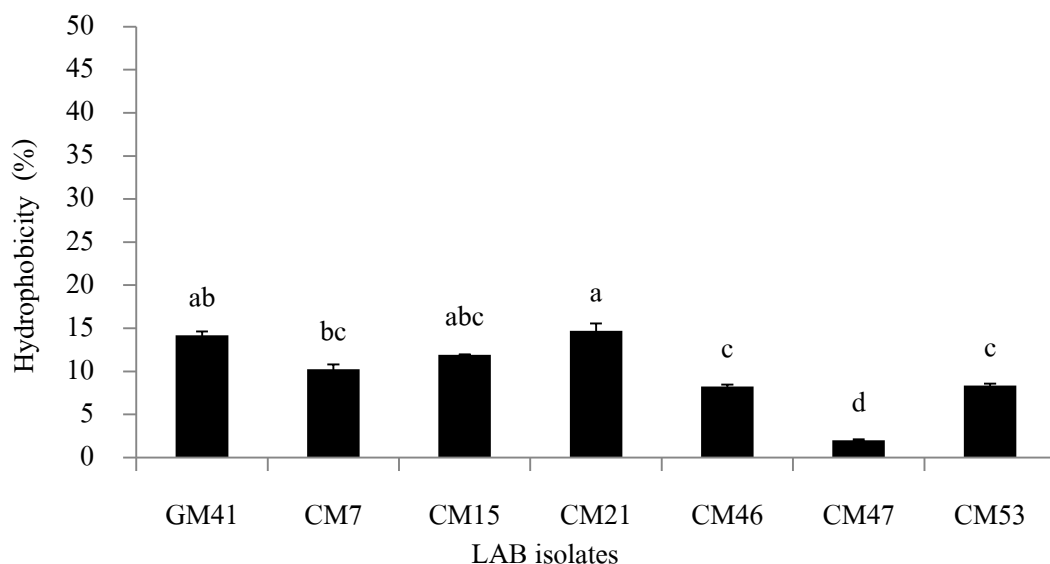


Figure 7 Adhesion ability of selected lactic acid bacterial strains to n-hexadecane. The bacteria cultures were suspended in 1 M PBS pH 7.2. The error bars represent standard deviation^{a-d} Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

1.2.5 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี agar spot test จากการทดลองพบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย CM21, CM47 และ CM53 แสดงดัง Table 12 จากตารางพบว่า CM53 มีความสามารถในการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ CM21 และ CM47 ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ CM21 และ CM47 ($P > 0.05$) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* พบว่า CM47, CM21 และ CM53 มีรัศมีของการยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (> 0.05) และมีรัศมีวงใสเฉลี่ยเป็น 3.6, 3.4 และ 3.1 มิลลิเมตร ตามลำดับผลที่ได้สอดคล้องกับ

ผลการทดลองของ Şimşek และคณะ (2006) ซึ่งนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จาก sourdough จำนวน 20 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนาน 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี agar spot test พบว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวน 9, 17, 16, 4, 11 และ 9 ไอโซเลท แสดงความสามารถในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* Li6, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Bacillus licheniformis* NRRL-B1264, *Escherichia coli* ATCC39403, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Clostridium perfringens* 4TTK ตามลำดับ นอกจากนี้ Sumathi และ Reetha (2012) นำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากนมดิบ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี agar spot พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 10 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ และมีแบคทีเรียแลคติก 9 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้ และแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8, 7 และ 4 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* และ *Shigella* sp. ได้ตามลำดับ

Table 12 Inhibition of pathogenic bacteria by selected lactic acid bacterial strains using agar spot test

Isolate	Mean ± SD of radian of inhibition zone (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria momocytogenes</i>
GF41	5.7 ± 0.4 ^b	–	2.5 ± 0.2 ^c	–
CM7	4.1 ± 0.5 ^b	–	–	–
CM15	6.3 ± 1.2 ^b	–	2.5 ± 0.5 ^c	–
CM21	6.4 ± 0.9 ^b	3.5 ± 0.4 ^b	5.2 ± 0.3 ^b	3.4 ± 0.9 ^a
CM46	5.2 ± 1.2 ^b	–	2.4 ± 0.2 ^c	1.2 ± 0.3 ^c
CM47	8.6 ± 0.3 ^b	5.4 ± 0.1 ^a	4.6 ± 0.7 ^b	3.7 ± 0.0 ^a
CM53	9.7 ± 0.8 ^a	5.1 ± 0.0 ^a	7.6 ± 0.2 ^a	3.1 ± 0.0 ^{ab}

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$)

- No inhibition zone detected

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต คือ CM21, CM47 และ CM53 มายืนยันผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ด้วยวิธี overlay พบว่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้วิธี agar spot โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต แสดงกิจกรรมยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* โดยสังเกตได้จากวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ รอยขีด ดังแสดงใน Figure 8 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Espeche และคณะ(2012) ที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากนมวัวดิบจำนวน 9 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus dysgalactiae* ได้โดยการผลิตแบคทีเรียอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ และสอดคล้องกับ Sieladie และคณะ (2011) ซึ่งนำแบคทีเรีย Lactobacilli จำนวน 15 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้จากนมวัวสด มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumonia* พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ และจากรายงานของ Sumathi และ Reetha (2012) พบว่านมดิบเป็นแหล่งสำคัญที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียอินทรีย์

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกเกิดจากกรดอินทรีย์ (Organic acid) ที่ถูกผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต โดยเฉพาะกรดแลกติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เป็นสาเหตุให้พีเอชลดต่ำลง จนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด กรดแลกติกเป็นกรดอ่อนที่อยู่ในรูปโมเลกุลไม่แตกตัว มีคุณสมบัติเป็น lipophilic ทำให้สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในได้โดยอิสระ และเกิดการแตกตัวให้โปรตอนออกมาจึงมีแนวโน้มที่จะทำให้ออกซิเจนในเซลล์มีสถานะเป็นกรดและทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ เซลล์จะพยายามรักษาสภาวะพีเอชที่เป็นกลาง (ภายในเซลล์ปกติมีพีเอชเป็นกลาง ประมาณ 7.5) โดยการขับโปรตอนออกไปจากเซลล์ กลไกนี้มีผลให้เซลล์เจริญเติบโตช้าลง เนื่องจากต้องใช้พลังงานบางส่วนขับไล่โปรตอนออกไป และส่งผลทำให้ electrochemical proton gradient ของเซลล์เสียหาย หรือเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ส่งผลให้ระบบการขนส่ง substrate ผิดปกติ เป็นสาเหตุให้แบคทีเรียหยุดการเจริญ (Bacteriostasis) และทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตกรดอะซีติก และกรดโพรพิโอนิก (Probiotic acid) ทำให้ภายนอกเซลล์มีตัวรับอิเล็กตรอน (Electron acceptors) ในปริมาณสูงแม้ว่ากรดที่ผลิตออกมาจะมีปริมาณน้อย แต่กรดทั้งคู่มีค่า pKa สูงกว่ากรดแลกติก ดังนั้นจึงมีส่วนของกรดที่อยู่ในรูปโมเลกุลไม่แตกตัวสูงกว่าที่สภาวะพีเอชค่าเดียวกัน กลไกการทำลายของกรดอะซีติก และโพรพิโอนิกคล้ายกับกรดแลกติก โดยจะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยการทำลาย electrochemical proton กรดอินทรีย์สามารถ

ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อกรดมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์บางกว่าแกรมบวก จึงทำให้กรดอินทรีย์สามารถซึมผ่านเข้าไปทำลายเซลล์ได้มากกว่า สอดคล้องกับผลการทดลองใน Table 12 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกทุกไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ แต่อย่างไรก็มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ได้ เนื่องจากสายพันธุ์นี้มีความต้านทานต่อกรดได้สูงจึงถูกยับยั้งได้ยากกว่า นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน เป็นสารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีน สร้างจากแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินคือ ไปยับยั้งการสร้าง peptidoglycan จึงส่งผลให้เกิดการหยุดสร้างผนังเซลล์หรือสร้างได้ไม่สมบูรณ์แบคทีเรียจะตายได้ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียแลกติกจึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ได้ และแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในสภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกไม่มีเอนไซม์คะตะเลส เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ จึงทำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำปฏิกิริยากับแสงสว่างหรือออกซิเจน เกิดสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น hydroxyl radicle ซึ่งเป็นสารออกซิแดนซ์ที่รุนแรง สามารถทำลายกรดนิวคลีอิก โปรตีนและชีวโมเลกุลอื่น ๆ ของสิ่งมีชีวิตได้ จึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ (สุกสีลปี มณรัตน์, 2551; สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549; Schnürer and Magnusson, 2005; de Vuyst and Vandamme, 1994; Juven and Pierson, 1996; Ocana *et al.*, 1999; Schnürer and Magnusson, 2005; Lewus *et al.*, 1991)

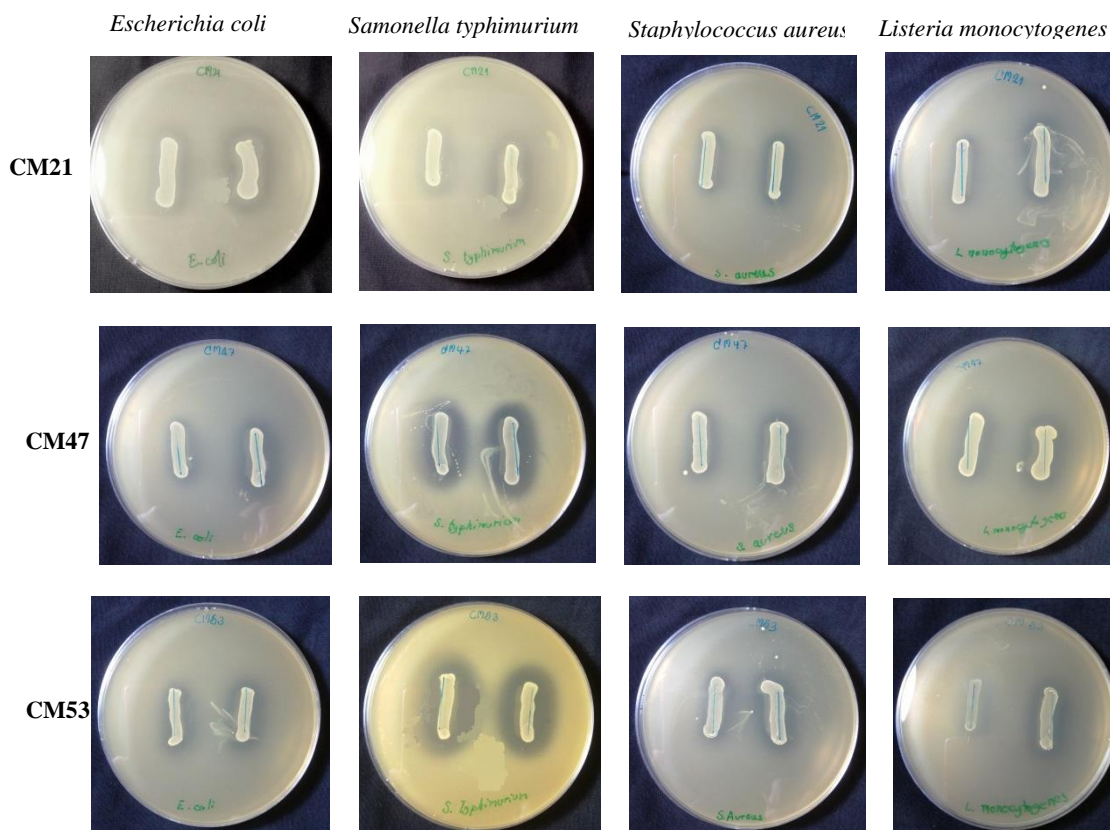


Figure 8 Inhibition of pathogenic bacteria by selected lactic acid bacterial strains using overlay assay

1.2.6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยกลีโคโนอิก

น้ำดีเป็นของเหลวสีเหลืองอมเขียวที่ประกอบด้วย กรดน้ำดี โคลเลสเตอรอล ฟอสฟอรัลปีด และ สารสี biliverdin ซึ่งกรดน้ำดีแบ่งออกเป็น 2 แบบดังนี้ กรดน้ำดีขั้นต้น คือ cholic และ chenodeoxycholic acid ซึ่งถูกสังเคราะห์จากโคลเลสเตอรอลโดยตับ จากนั้นหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl) ของกรดน้ำดีจะสร้างพันธะเอไมด์ (Amide bond) กับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ไกลซีน (Glycine) หรือทอรีน (Taurine) ทำให้สามารถละลายน้ำได้ ได้น้อยกว่า (Oomen *et al.*, 2004) จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท คือ CM21, CM47 และ CM53 ผลิตเอนไซม์ย่อยกลีโคโนอิกชนิด GDC ได้ นอกจากนี้ CM21 และ CM53 สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยกลีโคโนอิกชนิด GC ได้ และแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่สามารถย่อยกลีโคโนอิกชนิด TC และ TDC ได้ดังแสดงใน Table 13 สอดคล้องกับการศึกษาของ Cebeci และ Cürakan (2003) ซึ่งนำ *Lactobacillus* sp. จำนวน 7 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยกลีโคโนอิกชนิด TDC, TC, GDC และ GC พบว่า ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยกลีโคโนอิกชนิด GDC ได้ และมีเพียง 5 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยกลีโคโนอิกชนิด TC ได้ และไม่มีสายพันธุ์ใด

สามารถย่อยเกลือน้ำดีชนิด GC และ TDC ได้ และ Zago และคณะ (2011) ได้นำแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ที่คัดแยกได้จาก Italian และ Argentinean cheses จำนวน 98 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการย่อยเกลือน้ำดีชนิด TDC และ GDC (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5) พบว่ามีเพียง 27 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยเกลือที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีทั้ง 2 ชนิดได้ โดยมีตะกอนขุ่นของ sodium taurodeoxycholate และ sodium glycodeoxycholate รอบ ๆ โคโลนิเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดีสามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเกลือน้ำดีที่จับกับกรดอะมิโน (Conjugated bile salt) โดยเข้าไปทำลายสายเปปไทด์ (Peptide linkage) ของกรดน้ำดี ทำให้กรดอะมิโน หลุดออกได้เป็นเกลือน้ำดีอิสระ (Unconjugated bile acid) เกลือน้ำดีในรูปอิสระสามารถละลายได้น้อยกว่าเกลือน้ำดีที่จับกับกรดอะมิโน และเกิดการตกตะกอนที่พืเศษดำ การมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยเกลือน้ำดี สัมพันธ์กับความสามารถในการทนเกลือน้ำดี เนื่องจากเมื่อน้ำดีถูกย่อยส่งผลให้ความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ลดลง แบคทีเรียจึงทนต่อเกลือน้ำดีได้ (Erkkilä and Petäjä, 2000) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตย่อยเกลือน้ำดี สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ เนื่องจากโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เกลือน้ำดี โพรไบโอติกที่สามารถสร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยเกลือน้ำดีได้ จะทำให้เกลือน้ำดีที่ถูกย่อยแล้วเป็นเกลือน้ำดีอิสระ (Deconjugated bile salt) ถูกขับออกทางอุจจาระได้ดี ทำให้ร่างกายใช้โคเลสเตอรอลมาสังเคราะห์เป็นเกลือน้ำดีทดแทน จึงส่งผลให้ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ (Pinto *et al.*, 2006) นอกจากนี้หากโพรไบโอติกสามารถนำโคเลสเตอรอลไปใช้ในการสร้างเซลล์ (Cholesterol assimilation) โดยการดึงโคเลสเตอรอลไปใช้ในการสร้างเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) ใช้ในการเจริญของเซลล์ในขณะที่แบคทีเรียกำลังอยู่ในช่วงเจริญ และเซลล์เมมเบรนของโพรไบโอติกอาจสามารถจับกับโคเลสเตอรอลได้ (Cholesterol removal) ส่งผลให้ปริมาณโคเลสเตอรอลที่อยู่ในเลือดลดลง (ไชวัฒน์ ไชยสุด และศศิธร ศิริสุน, 2553)

Table 13 Bile salt hydrolase activity of selected lactic acid bacteria

Isolates	Bile salt hydrolase activity*			
	GC	GDC	TC	TCD
CM21	+	+	-	-
CM47	-	+	-	-
CM53	+	+	-	-

*The formation of opaque granular white colonies/ the formation of precipitate halos around colonies.

GC: glycocholic acid sodium salt; GDC: glycodeoxycholic acid sodium salt; TC: taurocholic acid sodium salt; TDC: taurodeoxycholic acid sodium salt; +: indicates bile salt hydrolase activity; -: indicates the absence of bile salt hydrolase activity.

2. สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกจากนมวัวที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ CM21, CM47 และ CM53 ที่คัดแยกได้จากนมวัว และมีรูปร่างท่อน มาทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16s rDNA พบว่าเมื่อนำลำดับเบสของ CM21, CM47 และ CM53 จำนวน 506, 496 และ 495 bp ตามลำดับ ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank database โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับเบสของ 16s rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CM21, CM47 และ CM53 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^T มากที่สุด (ATCC: American Type Culture Collections, ^T: สายพันธุ์อ้างอิง และเป็นสายพันธุ์แรกที่ค้นพบ) โดย CM21, CM47 และ CM53 มีความเหมือน (Homology) กับ *Lactobacillus plantarum* เท่ากับร้อยละ 99.17, 99.79 และ 98.91 ตามลำดับ แสดงดัง Figure 9, 10 และ 11 จึงจัดจำแนกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sieladie และคณะ (2011) ซึ่งระบุว่า *Lactobacillus plantarum* ที่คัดแยกจากจากนมวัวสดมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ทนต่อสภาวะกรดและเกลือ น้ำดี ผลิตเอนไซม์ย่อยเกลือ น้ำดี ย่อยโคเลสเตอรอล (Cholesterol assimilation) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

Argyri และคณะ (2012) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากมะกอกหมัก พบว่าสามารถคัดแยก *Lactobacillus plantarum* ที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก โดยเป็นสายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตในสภาวะพีเอชต่ำ สภาวะที่มีเกลือ น้ำดี สูงกว่าร้อยละ 80 และสามารถเกาะติดกับ *Caco-2 cells* นอกจากนี้ Maragkoudakis และคณะ (2006) ทำการศึกษาความสามารถในการเกาะติดกับ

Caco-2 cells ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกจากผลิตภัณฑ์นม พบว่า *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 146 มีค่าการเกาะติดสูงสุดเท่ากับร้อยละ 25.5

Lactobacillus plantarum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic) ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถรอดชีวิตในทางเดินอาหารได้สูง เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ยิ่งลึกลงไปยิ่งมีปริมาณอากาศที่เบาบางหรือไม่มีอากาศเลย (ไชยวัฒน์ ไชยสุด และศศิธร ศิริสุน, 2553) และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค *Lactobacillus plantarum* สามารถพบได้ใน น้ำลาย และระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ใช้ทั่วไปในการหมักอาหาร เช่น โยเกิร์ต ชีส กระหล่ำปลี และ กิมจิ เป็นต้น สามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก และแอลกอฮอล์ ซึ่งกรดแลคติกที่ผลิตได้อยู่ในรูป D- และ L- isomer และเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะใช้เป็นโพรไบโอติก เนื่องจากสามารถทนต่อพีเอชต่ำในกระเพาะอาหาร และสามารถทนทานต่อกรดน้ำดีในลำไส้เล็ก สามารถจับกับเยื่อทางเดินอาหารได้ และใช้รักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ จากการศึกษาของ Qin และคณะ (2009) พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถปกป้องเซลล์เยื่อทางเดินอาหาร จากการทำลายของ *Escherichia coli* โดยป้องกันไม่ให้สัญญาณวิทยาของเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell morphology) เปลี่ยนแปลง ลดการเกิดแผล และต้านทานการซึมผ่านของสารโมเลกุลใหญ่ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการเผาผลาญพลังงานของเซลล์ลำไส้ และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Adlerberth *et al.*, 1996) มีรายงานวิจัยพบว่า กระบวนการหมักธัญพืชด้วย *Lactobacillus plantarum* สามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญต่างๆ (Bioactive compounds) รวมทั้งสารอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และเยื่อใย มีรายงานว่า การหมักข้าวสาลีด้วย *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus rossiae* สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ การหมักข้าวโพดด้วย *Lactobacillus plantarum* สามารถเพิ่มปริมาณไขมัน โปรตีน และลดปริมาณคาร์โบไฮเดรต และการถั่วเหลืองและงาคั่วด้วย *Lactobacillus plantarum* มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเยื่อใยเพิ่มสูงขึ้น และช่วยลดปริมาณคาร์โบไฮเดรต (วรัมพร วงศ์สุทิน และคณะ, 2553)

de Vries และคณะ (2006) รายงานว่า *Lactobacillus plantarum* เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการทน (High tolerance) ต่อกรดไฮโดรคลอริก (pH 2) และเกลือน้ำดี เป็นสายพันธุ์ที่พบได้มาก เจริญเติบโตได้ง่าย และเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในมนุษย์ และมีหลายสายพันธุ์ที่ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการก่อประโยชน์ต่อสุขภาพ การก่อประโยชน์ขึ้นอยู่กับปริมาณการบริโภค *Lactobacillus plantarum* ที่มีชีวิตเข้าไป จากการวิจัยพบว่า ผู้ที่บริโภค *Lactobacillus plantarum* 299v ทุกวัน ต่อเนื่องนาน 3 สัปดาห์ ในอุจจาระมีปริมาณกรดคาร์บอกซิลิก (จาก 83 เพิ่มขึ้นเป็น 113 mmol/g อุจจาระ), กรดอะซีติก (จาก 48 เพิ่มขึ้นเป็น 64 mmol/g อุจจาระ)

และ กรดโพรพิโอนิก (จาก 11 เพิ่มเป็น 17 mmol/g อุจจาระ) เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และจากการทดลองของ Johansson และคณะ (1998) ซึ่งให้ผู้บริโภคนาน 58 คน รับประทาน *Lactobacillus plantarum* ปริมาณ (Dose) 2.0×10^{10} CFU ต่อวัน นาน 3 สัปดาห์ พบว่าในอุจจาระมีปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acid) เพิ่มขึ้น และ Bukowska และคณะ (1998) ได้ให้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน รับประทาน *Lactobacillus plantarum* ปริมาณ 10^{10} CFU ต่อวัน ต่อเนื่องนาน 6 สัปดาห์ สามารถลดปริมาณโคเลสเตอรอลชนิด LDL ได้ร้อยละ 9.6 และ fibrinogen ได้ร้อยละ 13.5 สอดคล้องกับการศึกษาของ Naruszewicz และคณะ (2002) นำผู้ทดสอบจำนวน 36 คน มารับประทาน *Lactobacillus plantarum* ปริมาณ 2.0×10^{10} CFU ต่อวัน ต่อเนื่องนาน 6 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดปริมาณโคเลสเตอรอลชนิด LDL ได้ร้อยละ 11.7 และ fibrinogen ได้ร้อยละ 21.0 นอกจากนี้ *Lactobacillus plantarum* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติได้ จากการศึกษาของ Cunningham-Rundles และคณะ (2000) ได้ให้เด็กที่ติดเชื้อ HIV จำนวน 18 คน รับประทาน *Lactobacillus plantarum* เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าการตอบสนองของภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติเพิ่มขึ้น

จากการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุดได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท และเป็นสายพันธุ์เดียวกัน คือ *Lactobacillus plantarum* CM21, *Lactobacillus plantarum* CM47 และ *Lactobacillus plantarum* CM53 แต่ในการศึกษาในตอนต่อไป ต้องการคัดเลือกเพียงสายพันธุ์เดียว จากผลการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้นดังแสดงใน Table 14 พบว่า *Lactobacillus plantarum* CM47 มีค่า Hydrophobicity ต่ำ และไม่สามารถย่อยเกลือน้ำดีชนิด GC จึงสรุปได้ว่ามีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกดีกว่าอีกสองสายพันธุ์ และ *Lactobacillus plantarum* CM53 มีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่า *Lactobacillus plantarum* CM21 จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาผลของการห่อหุ้ม และเสริมลงในไอศกรีม

Table 14 The probiotic properties of selected lactic acid bacteria

Isolates	Probiotic properties									
	Survival at GIT (%)	Hydrophobicity (%)	Antimicrobial activity				BHS activity			
			Radian of inhibition (mm)				GDC	GC	TDC	TC
CM21	61.2	14.961	EC	ST	SA	LM				
CM47	59.8	2.013	5.2	5.4	4.6	3.7	+	-	-	-
CM53	55.9	8.317	9.7	5.1	7.6	3.1	+	+	-	-

EC: *Escherichia coli*, ST: *Salmonella typhimurium*, SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*

GC: glycocholic acid sodium salt; GDC: glycodeoxycholic acid sodium salt; TC: taurocholic acid sodium salt; TDC: taurodeoxycholic acid sodium salt

+: indicates bile salt hydrolase activity; -: indicates the absence of bile salt hydrolase activity

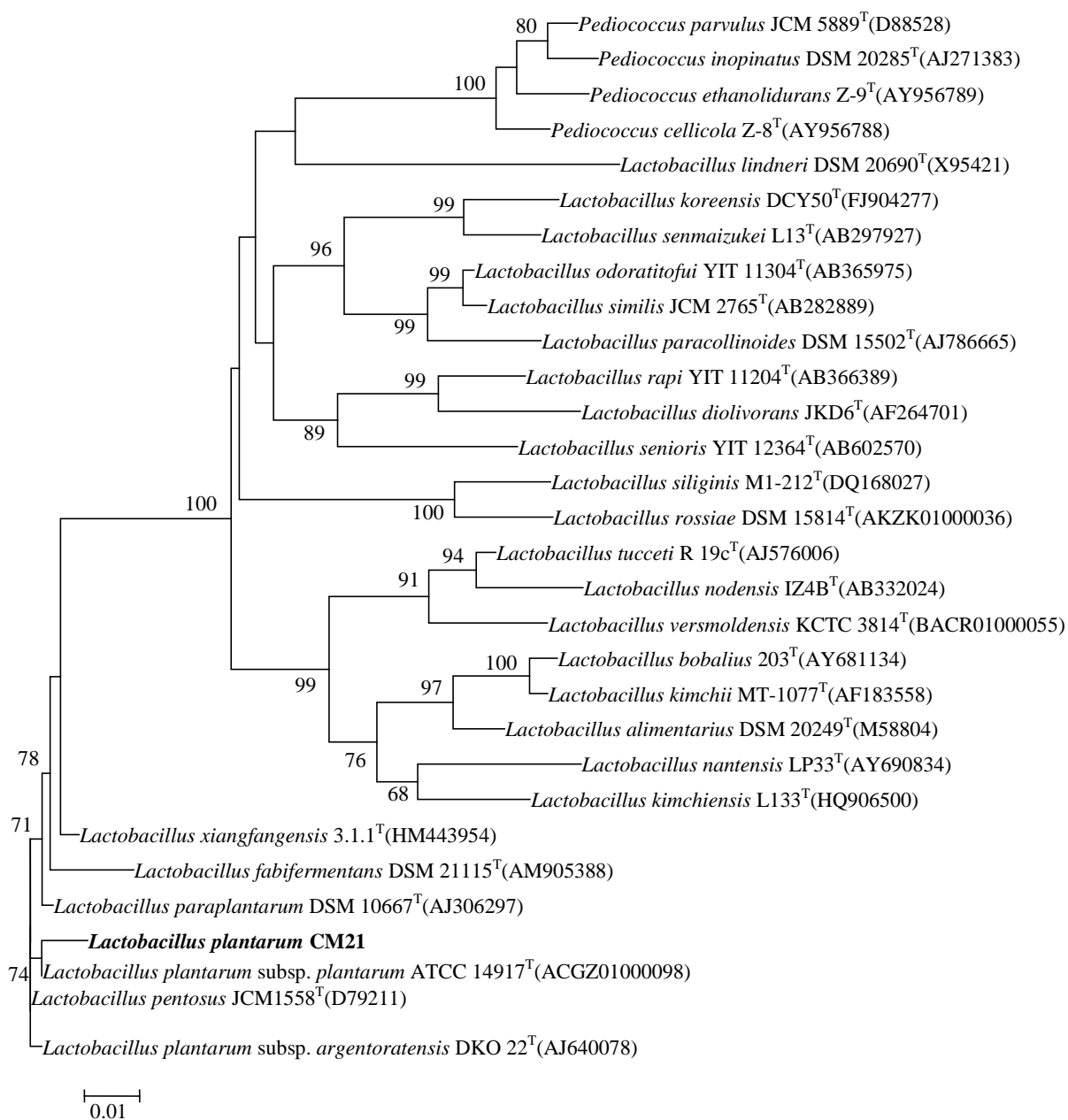


Figure 9 Neighbour-joining tree comprising 16S rRNA gene sequences of strain CM21 and related *Lactobacillus* sp. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications (greater than 60% are shown at the branch points). Bar, 0.01 substitution per nucleotide position

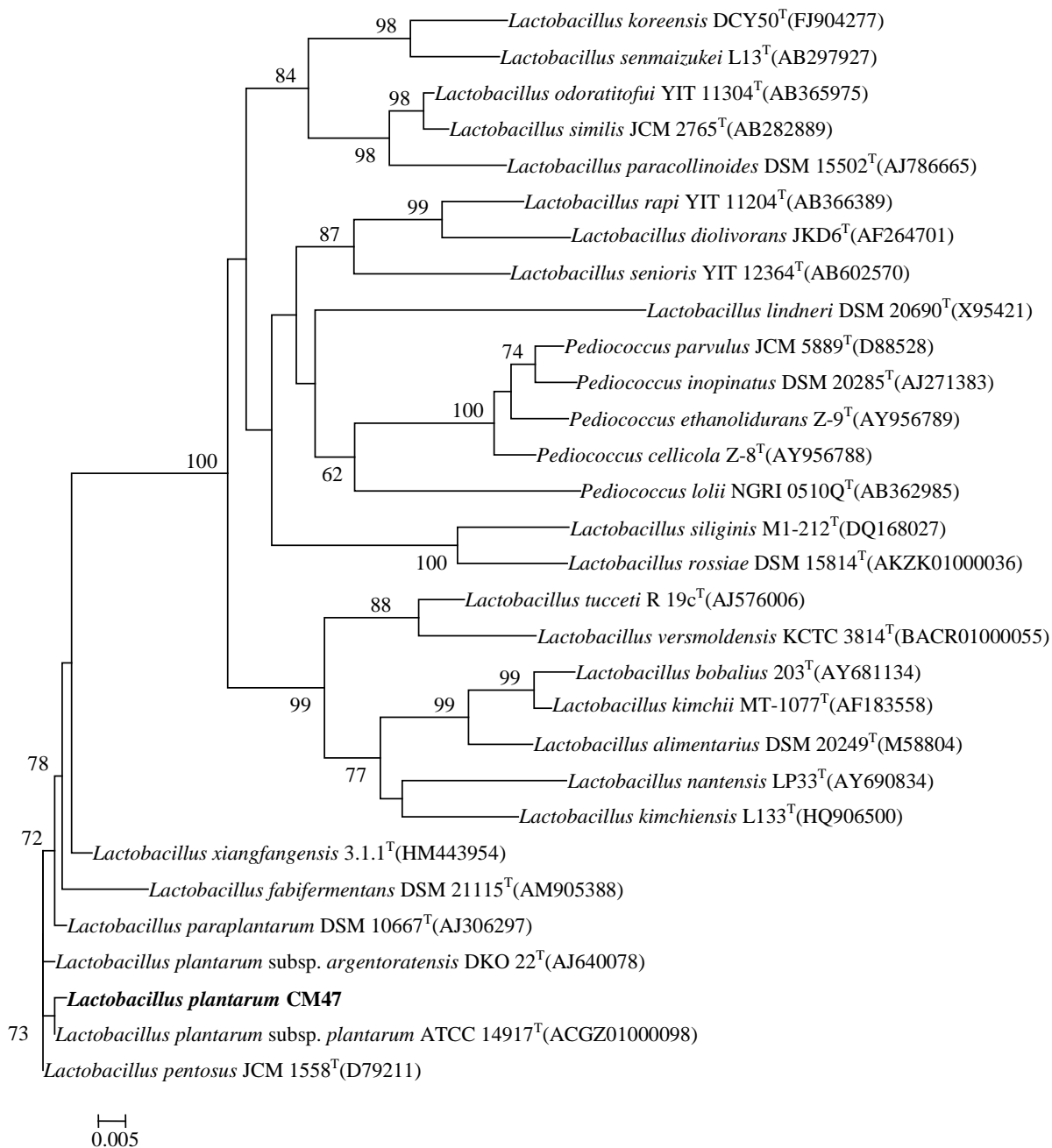


Figure 10 Neighbour-joining tree comprising 16S rRNA gene sequences of strain CM47 and related *Lactobacillus* sp. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications (greater than 60% are shown at the branch points). Bar, 0.01 substitution per nucleotide position.

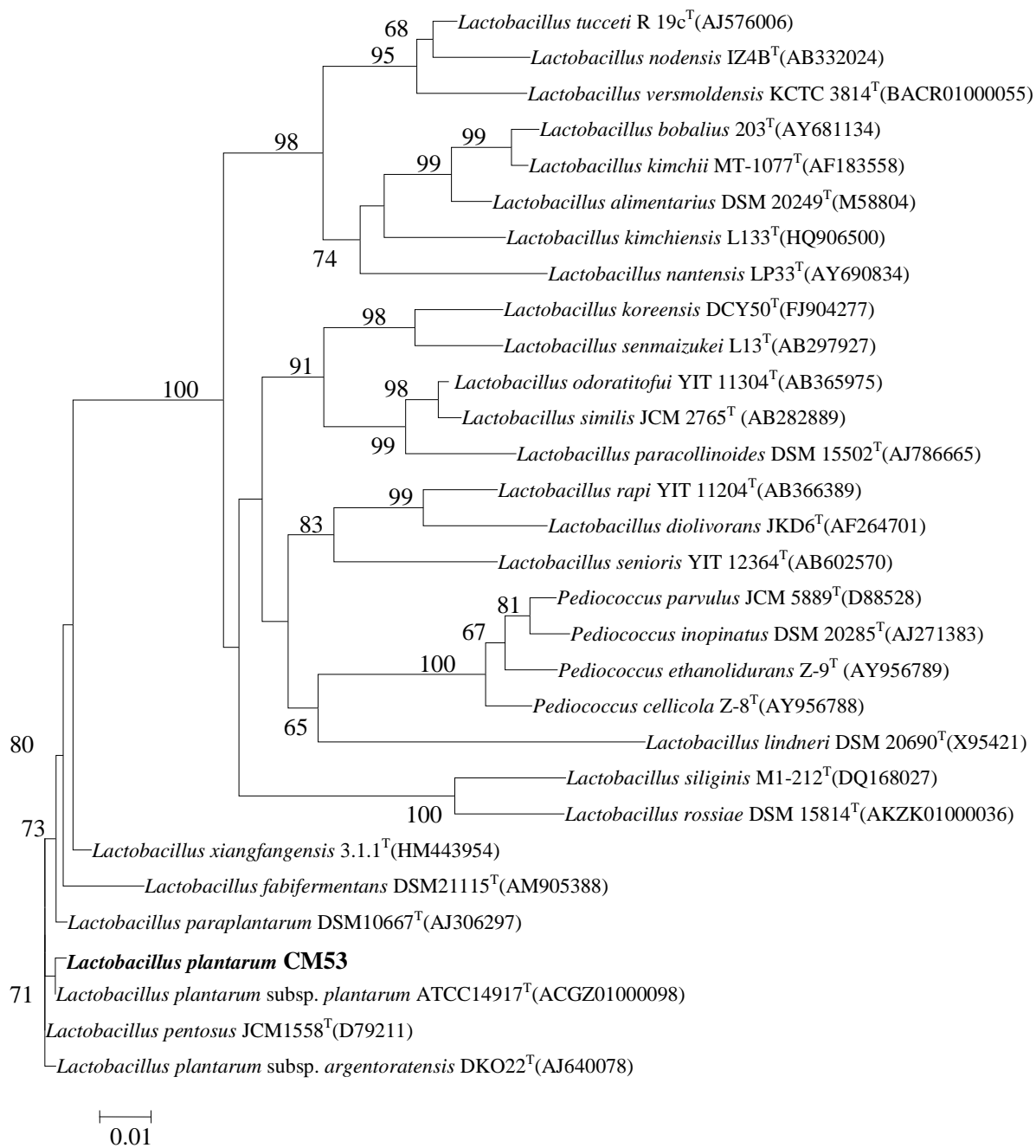


Figure 11 Neighbour-joining tree comprising 16S rRNA gene sequences of strain CM53 and related *Lactobacillus* sp. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications (greater than 60% are shown at the branch points). Bar, 0.01 substitution per nucleotide position.

3. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้

3.1 ความเข้มข้นของวัสดุพุงที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่คัดเลือกได้

การศึกษาครั้งนี้ต้องการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้เสริมลงในไอศกรีม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านสภาวะการผลิตที่รุนแรง เช่น การปั่นเพื่อแช่เยือกแข็ง ด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม ในถังปั่น ไอศกรีมที่มีใบพัด ทำหน้าที่ดีอากาศเข้าไปในเนื้อ ไอศกรีม กระบวนการแช่แข็ง และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สภาวะเหล่านี้จะทำให้เซลล์โพรไบโอติกบาดเจ็บ และเมื่อผู้บริโภครับประทานโพรไบโอติกเข้าไป เซลล์ที่บาดเจ็บจะสัมผัสกับสภาวะย่อยอาหารของมนุษย์ ส่งผลให้เซลล์ตาย จนไม่สามารถก่อประโยชน์ต่อสุขภาพได้ แต่การห่อหุ้มโพรไบโอติก จะช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์สัมผัสกับสภาวะที่เป็นอันตราย ส่งผลให้เซลล์ไม่บาดเจ็บ เมื่อผู้บริโภครับประทานเข้าไป จึงมีเซลล์ที่มีชีวิตเพียงพอที่จะก่อประโยชน์ต่อสุขภาพได้

3.1.1 อัลจินตร่วมกับแป้งข้าวโพด

เมื่อนำ *Lactobacillus plantarum* CM53 มาห่อหุ้มด้วย อัลจินตร้อยละ 1, 2 และ 3 ร่วมกับ Hi-maize ร้อยละ 2 และซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 โดยใช้วิธีอิมัลชัน ที่เป็นระบบน้ำมัน น้ำใน (Water in oil) น้ำในที่นี้คือ สารผสมอัลจินต โดยเซลล์โพรไบโอติกเป็นเฟสไม่ต่อเนื่องจะกระจายเป็นอนุภาคเล็ก ๆ ในน้ำมันที่เป็นเฟสต่อเนื่อง เมื่อเติม CaCl_2 สารที่ช่วยให้แข็งตัว (Hardening agent) อนุภาคเล็ก ๆ ของอัลจินตจะเกิดการแข็งตัว และแยกตัวออกจากเฟสของน้ำมัน จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตเพิ่มสูงขึ้น จากร้อยละ 1 เป็น ร้อยละ 3 ขนาดของเม็ดเจลที่ได้จะใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน (Figure 12) โดยที่อัลจินตร้อยละ 1 เม็ดเจลมีขนาดที่สม่ำเสมอว่าอัลจินตร้อยละ 2 และ 3 และเมื่อปริมาณของซูโครสเพิ่มสูงขึ้นพบว่าขนาดของเม็ดเจลโตขึ้น และไม่มีความสม่ำเสมอสังเกตได้จาก Figure 12 Aa เมื่อไม่มีการเติมซูโครสลงไปเม็ดเจลที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอว่า ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 (Figure 12 Ab) และร้อยละ 10 (Figure 12 Ac) โดยทั่วไปขนาดเม็ดเจลของอัลจินตเพิ่มขึ้นตามความหนืดของสารละลายอัลจินต หากความเข้มข้นของอัลจินตสูงขึ้นไปจะส่งผลให้ความหนืดของสารละลายอัลจินตเพิ่มสูงขึ้น (Anal and Singh, 2007) นอกจากนี้ปริมาณซูโครสที่เติมลงไป จะส่งผลให้สารละลายอัลจินตมีความหนืดมากขึ้น เม็ดเจลที่ได้จึงมีขนาดใหญ่ขึ้น จากรายงานการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้เทคนิคอิมัลชันจะทำให้ได้เม็ดเจลที่มีขนาด 0.2-5,000 ไมโครเมตร (Zuidum and Shimon, 2010)

อย่างไรก็ตาม Anal และ Singh (2007) รายงานว่าหากเม็ดเจลอัลจินตมีขนาดใหญ่กว่า 1 มิลลิเมตร จะส่งผลให้เนื้อสัมผัสของอาหารที่ได้ไม่ดี แต่หากมีขนาดต่ำกว่า 100 ไมโครเมตร ความสามารถในการป้องกันเซลล์แบคทีเรียในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารไม่แตกต่างกับ

เซลล์อิสระ แสดงว่าขนาดของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มแบคทีเรียต้องมีขนาดที่เหมาะสม จากรายงานของ Morch (2008) ขนาดเม็ดเจลที่เหมาะสมคือ ประมาณ 400 ไมโครเมตร แต่ในด้านการใช้งาน เม็ดเจลมีขนาดใหญ่ สามารถใช้งานได้ง่ายกว่าขนาดเล็ก จากการทดลองพบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร้อยละ 2 เดิมชูโครสร้อยละ 10 และ อัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 3 เดิมชูโครสร้อยละ 5 และ 10 มีขนาดเม็ดเจลเฉลี่ยมากกว่า 3 มิลลิเมตร ดังแสดงใน Figure 12 Bc, Cb และ Cc ขนาดเม็ดเจลที่ใหญ่จะทำให้เนื้อสัมผัสของไอศกรีมหยاب ความรู้สึกในปากค่อยลง โดยทั่วไปแล้วไอศกรีมที่ดีจะต้องมีผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กกว่า 50 ไมครอน จะทำให้ได้เนื้อสัมผัสที่เรียบเนียน แต่ถ้าขนาดผลึกน้ำแข็งใหญ่กว่า 50 ไมครอน จะได้ไอศกรีมที่มีเนื้อสัมผัสหยاب ไม่น่ารับประทาน (หทัยทิพย์ รื่องคำ, 2552) ดังนั้นเม็ดเจลที่ได้จากอัลจิเนตร้อยละ 2 เดิมชูโครสร้อยละ 10 และอัลจิเนตร้อยละ 3 เดิมชูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในไอศกรีม เนื่องจากจะทำให้ได้ไอศกรีมมีผลึกน้ำแข็งที่ใหญ่เกินไป ส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

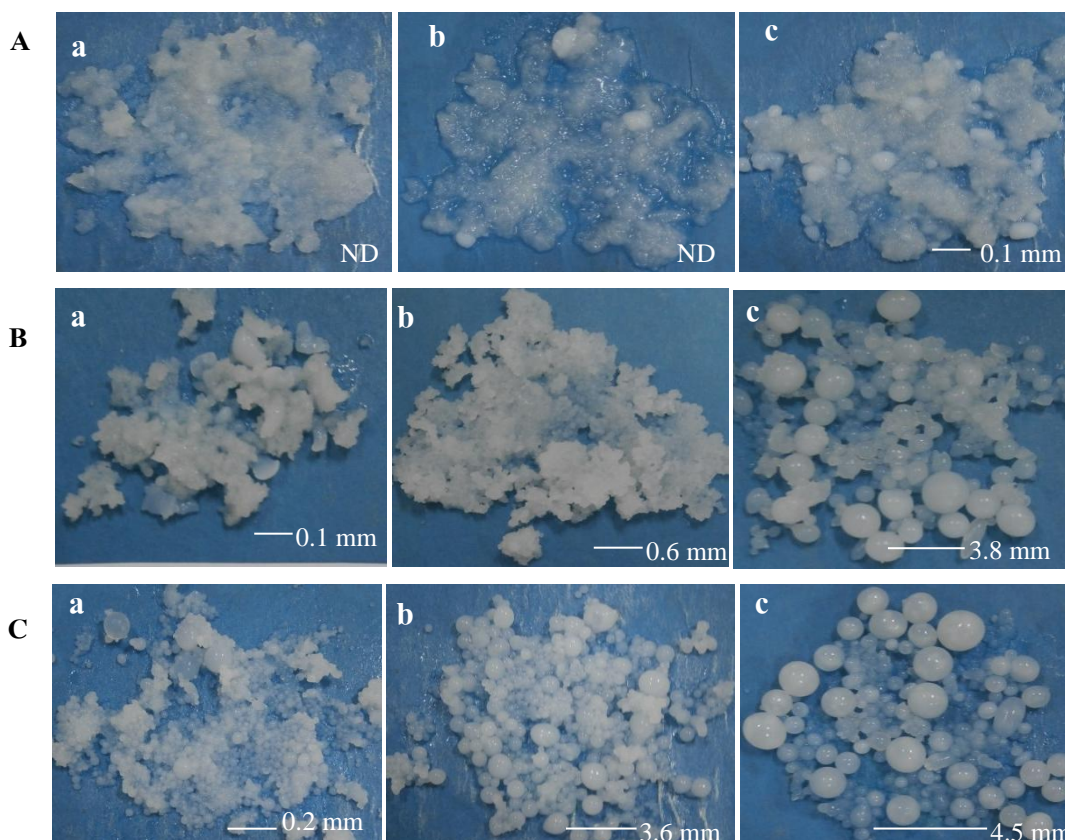


Figure 12 Photographs showing the characteristics of 1 (A), 2 (B) and 3% (C) alginate with 2% Hi-maize beads and 0 (a), 5 (b) and 10% (c) sucrose by emulsion technique

การห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ด้วยอัลจิเนตร้อยละ 1 เดิมชูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 อัลจิเนตร้อยละ 2 เดิมชูโครสร้อยละ 0 และ 5 และ อัลจิเนตร้อยละ 3 ที่

ไม่มีการเติมซูโครส สามารถผลิตเม็ดเจลขนาดเล็กและค่อนข้างสม่ำเสมอจึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้มต่อไป

3.1.2 เพคติน

เมื่อห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CM53 ด้วยเพคตินทั้ง 3 แบบ คือ การห่อหุ้มด้วย high methoxy เพคตินร้อยละ 5, low methoxy เพคตินร้อยละ 5 และ low methoxy เพคตินร้อยละ 2.5 ผสมกับ high methoxy เพคติน ร้อยละ 2.5 ด้วยวิธีเอกซ์ทรูชัน โดยหยดสารละลายเพคตินที่ผสมกับเซลล์แบคทีเรียลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดเป็นเม็ดเจล จากการทดลองพบว่า การห่อหุ้มด้วย high methoxy เพคตินไม่สามารถที่ผลิตเม็ดเจลออกมาได้ เนื่องจากการเกิดเจลของเพคตินชนิดนี้จะต้องมีองค์ประกอบที่เหมาะสมคือ ปริมาณน้ำตาลร้อยละ 55-65 และค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 2.9-3.1 (Rolin and de Vries, 1990; Oakenfull, 1991) แต่ในการทดลองครั้งนี้ปริมาณน้ำตาล และพีเอชไม่เหมาะสม จึงไม่สามารถขึ้นรูปเม็ดเจล เนื่องจากการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงส่งผลให้สารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นสูงกว่าภายในเซลล์ ทำให้แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ของสารละลายภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ น้ำจากภายในเซลล์จะไหลออกสู่ภายนอกทำให้เซลล์เหี่ยว นอกจากนี้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ที่น้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 50-70 (นงลักษณ์ สุวรรณพิณี และ ปรีชา สุวรรณพิณี, 2554) เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่า high methoxy เพคติน ไม่เหมาะสมที่จะนำมาห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก แต่การห่อหุ้มเซลล์ด้วย low methoxy เพคติน และ low methoxy เพคตินผสมกับ high methoxy เพคติน สามารถผลิตเม็ดเจลรูปร่างกลม มีขนาดสม่ำเสมอ สีเม็ดเจลไม่แตกต่างกัน เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และการเติมซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกันไม่ส่งผลต่อขนาดของเม็ดเจล ดังแสดงใน Figure 13 การห่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธีเอกซ์ทรูชันสามารถผลิตเม็ดเจลที่มีขนาดสม่ำเสมอ เนื่องจากขนาดของเม็ดเจลขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีด

เม็ดเจลของ low methoxy เพคติน ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ low methoxy เพคตินร้อยละ 2.5 และ high methoxy เพคตินร้อยละ 2.5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเจลเฉลี่ยเท่ากับ 2 มิลลิเมตร ขนาดเม็ดเจลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sohali และคณะ (2011) ซึ่งได้ผลิตเม็ดเจลอัลจินตด้วยวิธีเอกซ์ทรูชัน ที่มีขนาดเฉลี่ย 1.9 มิลลิเมตร และ Motazavian และคณะ (2007) รายงานว่า โดยทั่วไปแล้วขนาดของเม็ดเจลที่ผลิตโดยวิธีเอกซ์ทรูชัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 มิลลิเมตร จากการทดลองเม็ดเจลเพคตินทั้ง 2 ชุดทดสอบ มีขนาดที่ไม่ใหญ่เกินไป และสม่ำเสมอ ในทุกชุดทดสอบ จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์ต่อไป

3.1.3 คาร์ราจีแนน

เมื่อนำ *Lactobacillus plantarum* CM53 มาห่อหุ้มด้วยคาร์ราจีแนนความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 ร่วมกับซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 พบว่าการห่อหุ้มด้วยคาร์ราจีแนนร้อยละ 3 และ 4 เติมซูโครสร้อยละ 10 เท่านั้นที่สามารถผลิตเม็ดเจลได้ เม็ดเจลคาร์ราจีแนนไม่เป็นรูปกลม แต่มีรูปร่างที่ไม่เป็นรูปทรง แตกต่างจากการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และเพคติน ขนาดเม็ดเจลไม่มีความสม่ำเสมอดังแสดงใน Figure 14 จึงคัดเลือกเฉพาะคาร์ราจีแนนความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 ที่เติมซูโครสร้อยละ 10 เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้มต่อไป

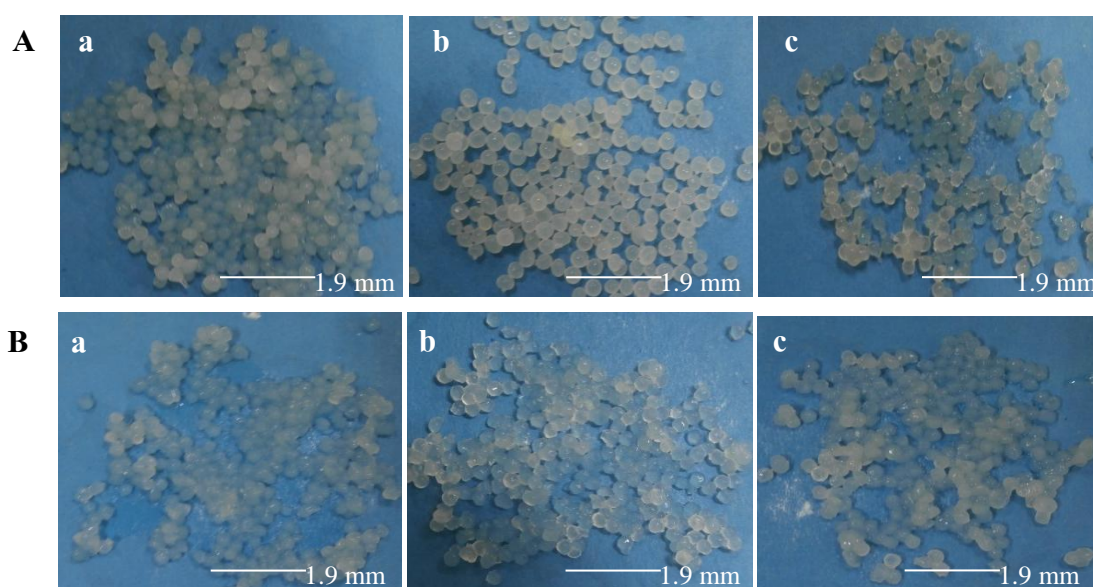


Figure 13 Photographs showing the characteristics of 5% low methoxy pectin (A) and 2.5% low methoxy pectin +2.5% high methoxy pectin (B) beads with 0 (a), 5 (b) and 10% (c) sucrose by extrusion technique

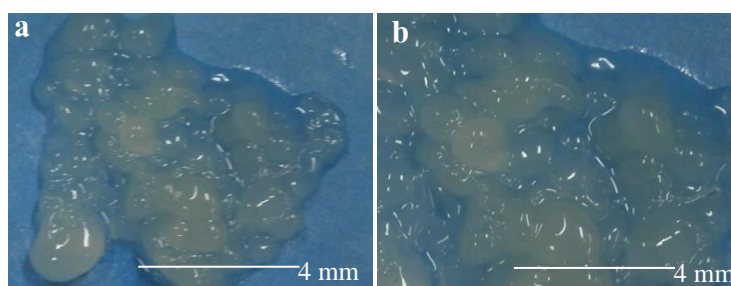


Figure 14 Photographs showing the characteristics of 3 (a) and 4% (b) carrageenan and 10% sucrose by extrusion technique

3.2 ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของเม็ดเจลที่ห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 โดยใช้วัสดุพองแตกต่างกัน

จากการทดลองในข้อที่ 3.1 พบว่าเม็ดเจลจากวิธีอิมัลชัน และเอกซ์ทรูชันมีขนาดแตกต่างกัน โดยขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากเทคนิคเอกซ์ทรูชันมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเจลที่ได้จากเทคนิคอิมัลชัน สอดคล้องกับรายงานของ Motazavian และคณะ (2007) รายงานว่าโดยทั่วไปแล้วขนาดของเม็ดเจลที่ผลิตโดยวิธีเอกซ์ทรูชันจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า (ประมาณ 2-5 มิลลิเมตร) เม็ดเจลที่ผลิตด้วยวิธีอิมัลชัน (ประมาณ 25 ไมโครเมตร -2 มิลลิเมตร) และเมื่อนำเม็ดเจลของอัลจินตที่ผลิตด้วยวิธีอิมัลชัน และเม็ดเจลของเพคติน และคาร์ราจีแนนที่ผลิตด้วยวิธีเอกซ์ทรูชันมาดูลักษณะ โครงสร้างจุลภาคของเม็ดเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเม็ดเจลผลิตได้จากอัลจินต (Figure 15 Aa) และเพคติน (Figure 15 Ba) มีลักษณะเป็นทรงกลม (Spherical) มีพื้นผิวเรียบ (Smooth) และสม่ำเสมอ ในขณะที่เม็ดเจลของคาร์ราจีแนนมีลักษณะแบน มีผิวที่ขรุขระ ไม่สม่ำเสมอ และมีรูปร่างไม่ปกติ (Irregular) ดังแสดงใน Figure 15 Ca สอดคล้องกับรายงานของ Nag (2011) ซึ่งรายงานว่ารูปร่างของเม็ดเจล อาจมีรูปร่างที่ไม่ปกติหรือทรงกลมที่มีพื้นผิวที่เรียบหรือขรุขระได้ ซึ่งขนาด รูปร่าง และพื้นผิวของเม็ดเจลขึ้นอยู่กับวิธีการ และวัสดุที่ใช้ในการผลิตเม็ดเจล โดยขนาด รูปร่าง และพื้นผิวของเม็ดเจลจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม หากพื้นผิวของเม็ดเจลมีรูพรุนจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและความสามารถในการป้องกันเซลล์ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ลดลง (Motazavian *et al.*, 2007)

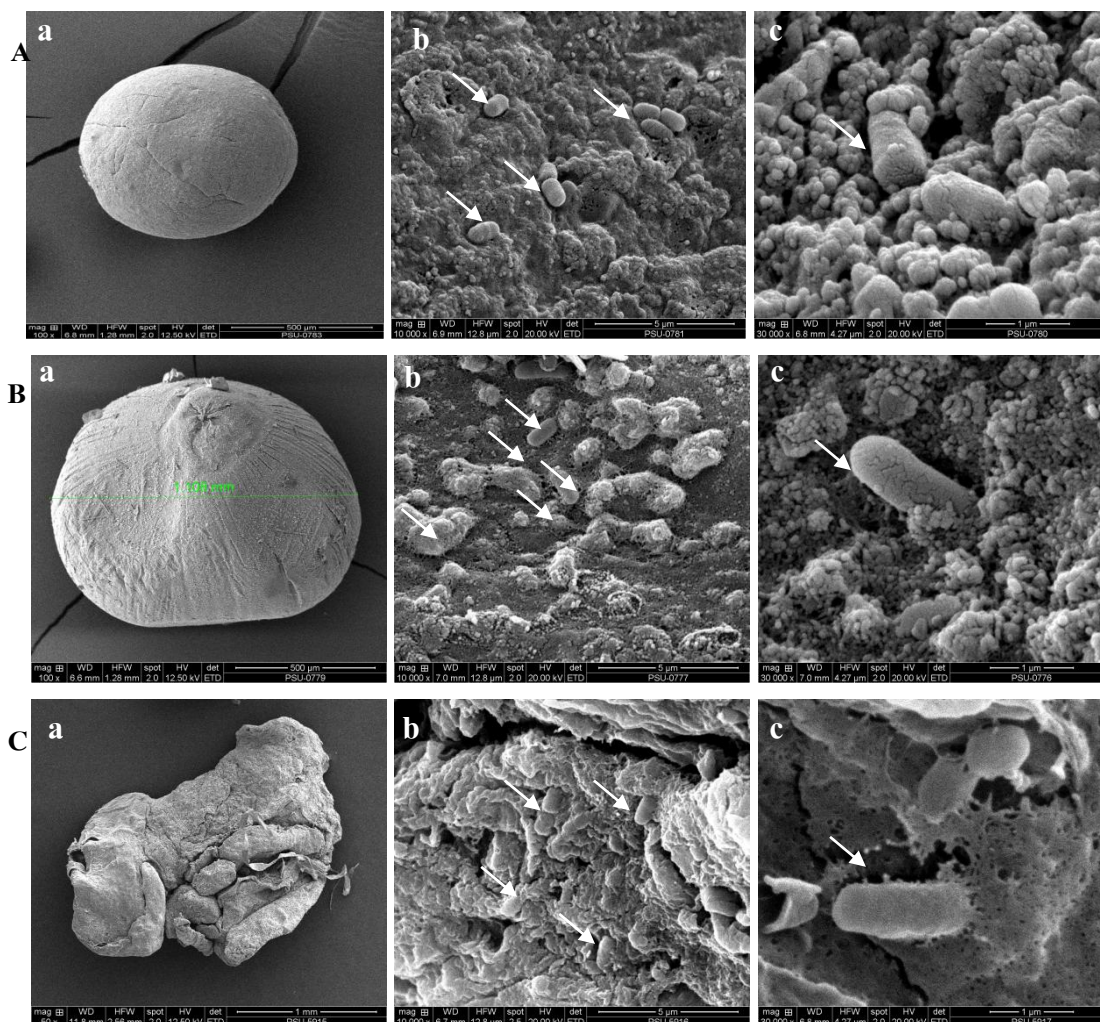


Figure 15 Scanning electron microscopy pictures of alginate containing 2% Hi-maize (A), pectin (B) and carrageenan containing 10% sucrose (C) beads. Morphology of bead at a magnification 100x (a), bead loaded with *Lactobacillus plantarum* CM53 at a magnification 10,000x (b) and higher magnification view of encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 at a magnification 30,000x (c).

↓ *Lactobacillus plantarum* CM53 cell

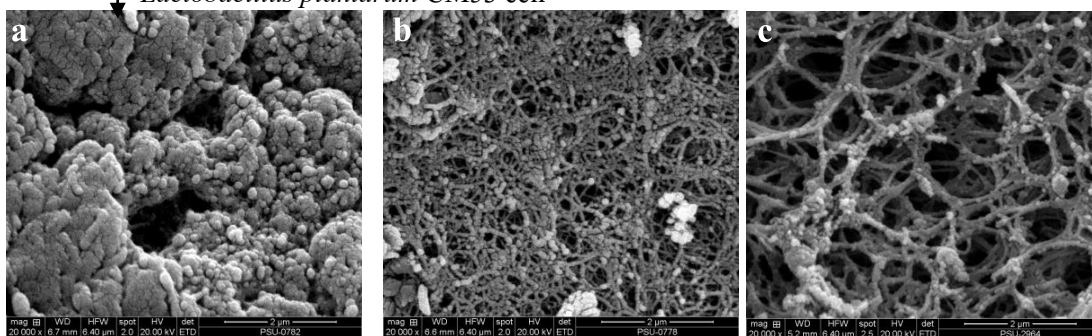


Figure 16 Structure of outer surface of 3% alginate (a) and 5% LM- pectin containing 5% sucrose (b) and 4% carrageenan beads (c). Magnification of all pictures is 20,000x.

3.3 ผลของชนิดวัสดุพองต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

จากการนำเม็ดเจลที่ผลิตได้จากวัสดุพองที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3 ประกอบด้วย อัลจินตเข้มข้นร้อยละ 1 เดิมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 จำนวน 3 ชุดทดสอบ, อัลจินตเข้มข้นร้อยละ 2 เดิมซูโครสร้อยละ 0 และ 5 จำนวน 2 ชุดทดสอบ, low methoxy เพคตินเข้มข้นร้อยละ 5 เดิมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 จำนวน 3 ชุดทดสอบ, low methoxy เพคตินเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับกับ high methoxy เพคตินเข้มข้นร้อยละ 2.5 เดิมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 จำนวน 3 ชุดทดสอบ และคาร์ราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 เดิมซูโครสร้อยละ 10 จำนวน 2 ชุดทดสอบ มาทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้มเพื่อจะคัดเลือกวัสดุพองที่มีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงสุด ผลที่ได้แสดงใน Figure 17

จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการห่อหุ้มจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การห่อหุ้มเซลล์ ด้วยอัลจินตร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (ร้อยละ 74.89 ± 0.1) ต่ำกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 2 และ 3 (ร้อยละ 87.22 ± 0.77 และ 93.60 ± 5.72) จากการทดลองพบว่า การห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 มีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงสุด และสอดคล้องกับการศึกษาของ สิริสา สุมงคล (2556) ที่ห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CIE17A5 ด้วยอัลจินตความเข้มข้นร้อยละ 3 ด้วยวิธีอิมัลชัน พบว่ามีประสิทธิภาพการห่อหุ้มเท่ากับร้อยละ 93.63 การเติมซูโครสผสมกับอัลจินตเพื่อใช้ในการห่อหุ้มไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการห่อหุ้มได้ การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินตความเข้มข้นร้อยละ 1 เดิมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มต่ำ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

สำหรับการห่อหุ้มด้วยเพคติน พบว่าชนิดของเพคติน และความเข้มข้นซูโครสที่เติมลงไปไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม โดยทุกชุดทดสอบมีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงกว่าร้อยละ 85 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Figure 17

การห่อหุ้มด้วยคาร์ราจีแนน พบว่าการห่อหุ้มด้วยคาร์ราจีแนนที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 มีประสิทธิภาพการห่อหุ้มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) และเท่ากับร้อยละ 68.88 ± 1.37 และ 68.62 ± 0.66 ตามลำดับ คาร์ราจีแนนมีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มต่ำสุดเปรียบเทียบกับอัลจินตและเพคติน เนื่องจากในระหว่างการผลิตเม็ดเจล ต้องละลายคาร์ราจีแนนที่อุณหภูมิ 75 ± 5 องศาเซลเซียส และเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเกิดเป็นเจลทันที ด้วยเหตุนี้ในระหว่างการผลิตเม็ดเจลจึงควบคุมอุณหภูมิของสารละลายคาร์ราจีแนนระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของ Anal และคณะ (2007) ได้กล่าวว่าการละลายคาร์ราจีแนนความเข้มข้นร้อยละ 2-5 ต้องใช้อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส แล้วเติมเซลล์ลงในสารละลายคาร์ราจีแนนที่

อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิสูงระหว่างผลิตเม็ดเจลทำให้เซลล์ที่กระจายตัวแทรกอยู่ในสารละลายคาร์ราจีแนนเกิดการบาดเจ็บ และตายได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการห่อหุ้มกว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินเนตและเพคติน จึงสรุปได้ว่าคาร์ราจีแนนไม่เหมาะสมสำหรับนำมาห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

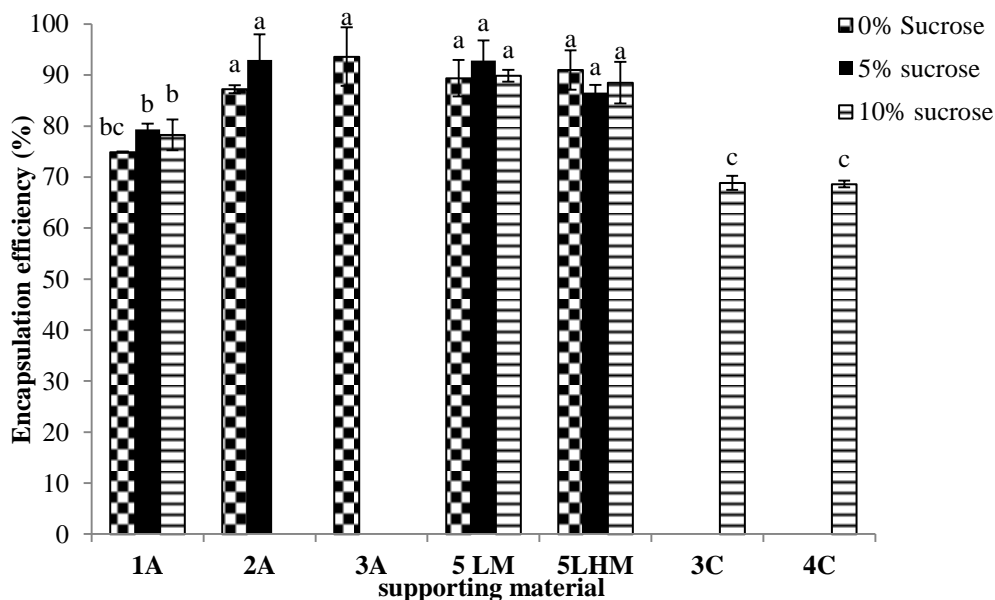


Figure 17 Encapsulation efficiency of *Lactobacillus plantarum* CM53 by different supporting materials. 1% alginate (1A), 2% alginate (2A), 3% alginate (3A), 5% low methoxy pectin (5LM), 2.5% low methoxy pectin + 2.5% high methoxy pectin (5LHM), 3% carrageenan (3C) and 4% carrageenan (4C).

^{a-d} Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

จากการลองพบว่าทั้งความเข้มข้นและชนิดของวัสดุพวงมีผลต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม วัสดุพวงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ อัลจินเนตเข้มข้นร้อยละ 2 ที่เติมซูโครสร้อยละ 0 และ 5, อัลจินเนตเข้มข้นร้อยละ 3 ที่ไม่เติมซูโครส, low methoxy เพคตินเข้มข้นร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10, low methoxy เพคตินเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับกับ high methoxy เพคตินเข้มข้นร้อยละ 2.5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 โดยมีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ด้วยเหตุนี้วัสดุพวงทั้ง 9 ชุดทดสอบ ถูกเลือกเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ในไอศกรีมแช่แข็ง

3.4 ผลของชนิดวัสดุพวงต่อประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในไอศกรีมแช่แข็ง

เมื่อนำเม็ดเจลที่ผลิตจากวัสดุพวงที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 มาทดสอบความสามารถในการปกป้องเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM 53 ในสภาวะแช่แข็งไอศกรีม โดยผลิตไอศกรีม

วานิลลาสูตรพื้นฐาน แล้วเติมเม็ดเจลที่ห่อหุ้มเซลล์ลงไป จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ± 5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกวัสดุพุงที่ช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* CM 53 มีค่าการรอดชีวิตสูง ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงใน Figure 18

การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินตร้อยละ 2, อัลจินตร้อยละ 3, low methoxy เพคติน และ low methoxy เพคติน ร่วมกับ low methoxy เพคตินเดิมซูโครสร้อยละ 10 สามารถปกป้องเซลล์ได้สูงสุด โดยมีค่าการรอดชีวิตของเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM 53 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) มีค่าการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 90

การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินต และ low methoxy เพคติน ปริมาณซูโครสที่เติมลงไปไม่มีผลต่อความสามารถในการปกป้องเซลล์ เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 5 ความสามารถในการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากกลไกในการเกิดเจลของอัลจินต และ low methoxy เพคติน เกิดจากสายของอัลจินต และ low methoxy เพคตินสร้างพันธะกับแคลเซียมไอออน แต่การห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคติน ร่วมกับ high methoxy เพคติน ความเข้มข้นซูโครสมีผลต่อความสามารถในการปกป้องเซลล์ จาก Figure 15 เห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 0 และ 5 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM 53 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) แต่เมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 10 พบว่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM 53 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยค่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM 53 ที่ความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 เท่ากับ 54.45 ± 2.88 , 55.66 ± 3.87 และ 97.94 ± 2.00 ตามลำดับ พบว่าการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 40 เนื่องจาก HM-เพคติน ต้องใช้น้ำตาลในการเกิดเจล เมื่อน้ำตาลมีความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้เกิดเจลได้ดีขึ้น ส่งผลให้โครงสร้างเจลแข็งแรงขึ้นจึงปกป้องเซลล์ได้ดีขึ้นด้วยเหตุนี้จึงสรุปได้ว่าการใช้ low methoxy เพคติน ผสมกับ high methoxy เพคติน ไม่เหมาะสมที่จะนำมาห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 เพื่อเสริมในไอศกรีม

วัสดุพุงที่ใช้ห่อหุ้มทุกชนิดถูกเติมซูโครสลงไปด้วย เพื่อที่จะทำหน้าที่เป็นสารป้องกันความเย็นในสถานะแช่แข็ง ไอศกรีม แต่จากการทดลองพบว่าการเติมซูโครสไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ เมื่อห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินต และ low methoxy เพคติน

จากการทดสอบประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในสถานะแช่แข็งไอศกรีม สามารถคัดเลือกวัสดุพุงได้ทั้งหมด 7 ชุดทดสอบ ดังนี้ อัลจินตร้อยละ 2 เดิมซูโครสร้อยละ 0 และ 5, อัลจินตร้อยละ 3, low methoxy เพคตินร้อยละ 5 เดิมซูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 และ low methoxy เพคติน ร่วมกับ high methoxy เพคติน ที่เติมซูโครสร้อยละ 10 เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการปกป้องเซลล์ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหาร

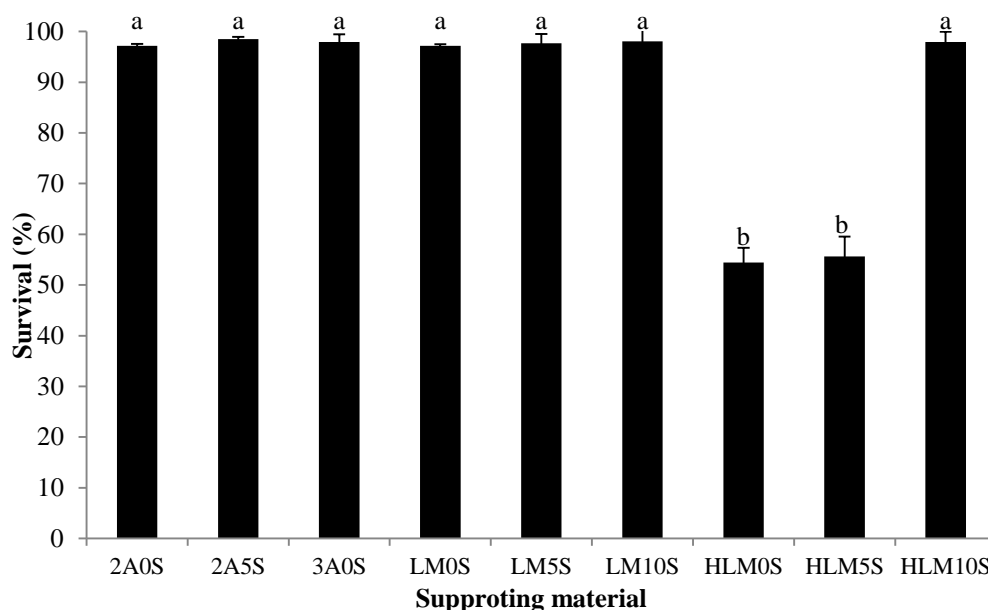


Figure 18 Survival rate of encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM 53 during ice cream hardening (-20 °C) for 48 h., 2%alginate containing 0 and 5% sucrose (2A0S and 2A5S respectively), 3% alginate (3A0S), 5% low methoxy pectin containing 0, 5 and 10% sucrose (LM0S, LM5S and LM10S respectively) and 2.5% high methoxy pectin with 2.5% low methoxy pectin containing 0, 5 and 10% sucrose (HLM0S, HLM5S and HLM10S respectively)

^{a-d} Different superscripts indicate significant difference ($P<0.05$).

3.5 ผลของชนิดวัสดุพยุต่อประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร

การทดสอบประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร เริ่มจากนำเม็ดเจลที่เตรียมได้จากวัสดุพยุที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 สภาวะเม็ดเจลเริ่มต้นจะมีลักษณะกลม (Figure 19a) เมื่อเม็ดเจลสัมผัสกับสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร (pH 2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เม็ดเจลยังคงมีรูปร่างกลม เกิดการพองตัวเล็กน้อย (Figure 19b) แสดงว่าวัสดุพยุมีความคงตัวในสภาวะกรด แต่เมื่อเม็ดเจลสัมผัสกับสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็ก ซึ่งมีเกลือ น้ำดี (pH 8) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง พบว่าเม็ดเจลละลายและไม่สามารถคงรูปร่างได้ ดังแสดงใน Figure 19c แสดงว่าเม็ดเจลไม่มีความคงตัวในสภาวะลำไส้เล็ก ทำให้สามารถปลดปล่อยเซลล์โพรไบโอติกออกจากเม็ดเจล ในการทดลองครั้งนี้ได้คัดเลือกโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่สามารถทนสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กได้ จึงทำให้สามารถรอดชีวิตเพียงพอที่จะก่อประโยชน์ต่อสุขภาพได้



Figure 19 Characteristic of beads before exposure to simulated gastrointestinal tract condition (a); after expose simulated gastric juice (b) and after expose simulated small intestine

เมื่อนำเม็ดเจลที่ผลิตจากวัสดุพองที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาทดสอบประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ผลการทดลองดังแสดงใน Table 15 จากการทดลองพบว่าชนิดของวัสดุพองมีผลต่อประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหาร

เมื่อห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ด้วยอัลจินเตพบว่า การรอดชีวิต *Lactobacillus plantarum* CM53 สูงกว่าเซลล์อิสระ และเมื่อความเข้มข้นของอัลจินเตเพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 2 เป็นร้อยละ 3 ค่าการรอดชีวิต *Lactobacillus plantarum* CM53 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ค่าการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ, เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 2 และร้อยละ 3 ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหารเท่ากับ ร้อยละ 69.17 ± 0.11 , 89.07 ± 0.49 และ 91.13 ± 1.38 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ ฉวีพัฒน์ เสาะสมบูรณ์ (2554) ได้ทดสอบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus salivarius* L5-4 ในสถานะเลียนแบบกระเพาะอาหาร ในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 1.5, 2, 2.5 และ 3 พบว่า ค่าการรอดชีวิตของเซลล์อิสระต่ำสุด รองลงคือเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 1.5, 2, 2.5 และ 3 มีค่าการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 64.11, 76.24 79.57, 79.66 และ 80.04 ตามลำดับ และผลการทดลองของ Annan และคณะ (2008) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium adolescentis* 15703T ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเจลาตินร้อยละ 3 และเคลือบด้วยอัลจินตร้อยละ 1 ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง พบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มรอดชีวิต ($7.35-7.57$ Log CFU/ml) ได้สูงกว่าเซลล์อิสระ ($6.41-6.71$ Log CFU/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้พบว่าเมื่อห่อหุ้มด้วยอัลจินเตปริมาณซูโครสที่เติมลงไปไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM53 ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหาร

เมื่อห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ด้วย low methoxy เพคติน ร้อยละ 5 เติมนูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 พบว่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM53 ในสถานะเลียนแบบกระเพาะอาหารไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่เมื่อนำไปทดสอบต่อในสถานะเลียนแบบลำไส้เล็กโดยการทดสอบแบบต่อเนื่อง พบว่าการห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคติน

ร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 ค่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM53 สูงกว่าเติมซูโครสร้อยละ 0 และ 10 และการห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคติน สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อทดสอบในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหาร การห่อหุ้มเซลล์ด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 2.5 ร่วมกับ high methoxy เพคตินร้อยละ 2.5 เติมซูโครสร้อยละ 10 ค่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM53 ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหารไม่แตกต่างกับเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าไม่เหมาะสมที่จะนำมาห่อหุ้มเซลล์เพื่อเสริมลงในไอศกรีม

จากการทดสอบประสิทธิภาพการปกป้องเซลล์ในสถานะเลียนแบบทางเดินอาหาร พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ด้วยอัลจินตร้อยละ 3 และ low methoxy-เพคตินร้อยละ 5 เติมซูโครสร้อยละ 5 สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุด จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยต่อไป

Table15 Effect of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* CM53 during exposure to simulated gastrointestinal tract condition for 7 h

Encapsulating material	Sucrose (%)	Survival (%)	
		SGJ	SIJ
2% alginate	0	89.61 ± 0.15 ^c	89.07 ± 0.49 ^b
	5	89.22 ± 0.60 ^c	87.06 ± 0.76 ^c
3% alginate	0	92.99 ± 1.24 ^{ab}	91.13 ± 1.38 ^a
	0	96.23 ± 4.84 ^a	86.07 ± 0.36 ^c
5% LM-pectin	5	96.40 ± 1.94 ^a	89.76 ± 0.64 ^{ab}
	10	94.86 ± 0.48 ^a	86.17 ± 1.97 ^c
2.5% low methoxy pectin+ 2.5% high methoxy pectin	10	69.55 ± 0.23 ^d	69.85 ± 0.95 ^d
	0	69.82 ± 1.26 ^d	69.17 ± 0.11 ^d

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c}Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$)

SGJ: simulated gastric juice (pH 2.0 containing 3mg/ml pepsin); SIJ: simulated small intestine (1% bile salt containing 3mg/ml pancreatin, pH8.0).

3.6 ผลของชนิดวัสดุพยางค์ต่อความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์

การศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลดทำการศึกษาที่สถานะเลียนแบบลำไส้เล็กส่วนต้น (PBS พีเอช 7.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ของเหลวจากตับอ่อนและน้ำดีจากตับมาเปิดเข้า และเป็นตำแหน่งที่มีการย่อยเกิดขึ้นมากที่สุด แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ถูกปลดปล่อยออกมาทุก 1 ชั่วโมง นาน 6 ชั่วโมง พบว่าเม็ดเจลดของวัสดุพยางค์ทั้งสองชนิดสามารถปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลดได้ และเมื่อระยะเวลาในการสัมผัสสถานะเลียนแบบลำไส้เล็กเพิ่มขึ้น ความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อบ่มเม็ดเจลดนาน 6 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่ลดจำนวนลงดังแสดงใน Figure 20 จากภาพเห็นได้ว่าเมื่อบ่มเม็ดเจลดนาน 1 และ 2 ชั่วโมง เม็ดเจลดอัลจินตสามารถปลดปล่อยเซลล์ได้สูงกว่าเม็ดเจลดเพคตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเวลาบ่มนาน 3 ชั่วโมง เม็ดเจลดเพคตินสามารถปลดปล่อยเซลล์ได้สูงกว่าเม็ดเจลดอัลจินต ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาบ่มเพิ่มเป็น 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์ของเม็ดเจลดทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

โดยธรรมชาติแล้วอัลจินตประกอบไปด้วยสายกรดแมนนูโรนิก และ กรดกลูโคโรนิก แอซิด มีค่า pKa เท่ากับ 3.38 และ 3.65 ตามลำดับ (Morch, 2008) เมื่ออยู่ในสถานะเลียนแบบลำไส้เล็กที่มีพีเอชเป็น 7.2 ซึ่งสูงกว่าค่า pKa ของอัลจินตทำให้ประจุรวมของอัลจินตเป็นลบมากขึ้น ส่งผลให้สายของอัลจินตเกิดการผลักกัน จนทำให้สูญเสียความสามารถในการเกิดเจล Draget และคณะ (1997) รายงานว่าอัลจินตสามารถเกิดเจลได้ที่พีเอชต่ำกว่า pKa แต่เมื่อพีเอชประมาณ 7 เจลของอัลจินตจะเกิดการแตกสลาย เนื่องจากค่าพีเอชที่สูงกว่า ค่า pKa ของอัลจินตจะไปปรับประจุรวมของโครงสร้างอัลจินตเป็นลบ ทำให้สายโพลิเมอร์ของอัลจินตเกิดการผลักกัน ส่งผลให้อัลจินตสูญเสียความสามารถในการเกิดเจล จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลด สอดคล้องกับผลการศึกษาของ จุฬาลักษณ์ ชูพรหม (2553) ที่ทำการห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ด้วยอัลจินตร้อยละ 2 ร่วมกับเส้นใยถั่วเหลืองร้อยละ 3 แล้วนำมาทดสอบการปลดปล่อยเซลล์ที่พีเอช 5, 6, 7 และ 8 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า การปลดปล่อยเซลล์ที่พีเอช 5 และ 6 เท่ากับร้อยละ 47.48 และ 52.17 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าที่พีเอช 7 และ 8 ที่สามารถปลดปล่อยได้สูงถึงร้อยละ 99.00 และ 99.67 ตามลำดับ Annan และคณะ (2008) ได้ห่อหุ้ม *Bifidobacterium adolescentis* 15703T ด้วยอัลจินตและเคลือบด้วยเจลาติน พบว่าในสถานะกรด เม็ดเจลดจะคงตัว แต่ในสถานะที่เป็นด่างเม็ดเจลดละลายอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ Hou และคณะ (1999) ได้รายงานค่า pKa ของ low methoxy เพคตินอยู่ในช่วง 3.55-4.10 การเกิดเจลของ low methoxy

เพคติน เกิดตรงหมู่คาร์บอกซิลของเพคติน ที่พีเอช 6.5 และ 7.0 เป็นพีเอชที่สูงกว่าค่า pKa ทำให้เกิดการแตกสลายของเจล และเกิดการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลเพคติน

จากการทดสอบประสิทธิภาพการปลดปล่อยเซลล์ พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินต ร้อยละ 3 ที่ไม่เติมซูโครส และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 สามารถปลดปล่อยได้ไม่แตกต่างกันจึงคัดเลือกวัสดุพวงทั้งสองชนิด เพื่อนำไปเสริมลงในไอศกรีมวานิลลา

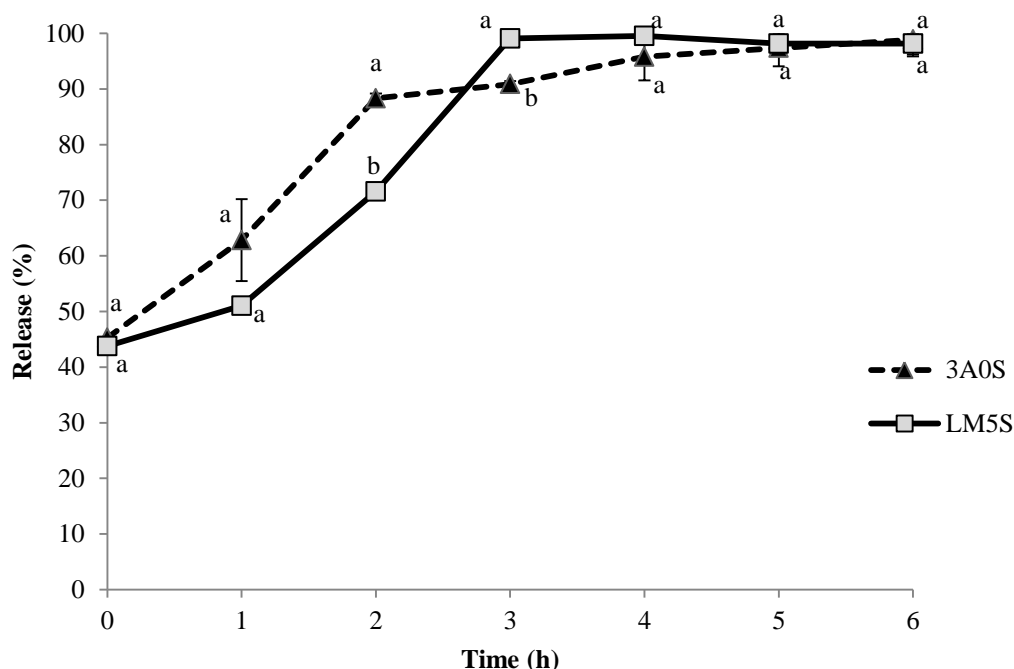


Figure 20 Releasing of *Lactobacillus plantarum* CM53 from alginate beads in simulated small intestine (PBS pH 7.2.) at 37°C for 6 h, 3% alginate (3A0S) and 5% low-methoxy pectin containing 5% sucrose (LM5S)

^{a-d} Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

4. ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในขั้นตอนการผลิตไอศกรีม

4.1 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่เติมก่อนกระบวนการปั่นไอศกรีม

เมื่อนำไอศกรีม *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่เติมในรูปแบบเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 (เม็ดเจลอัลจินต) และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครส ร้อยละ 5 (เม็ดเจลเพคติน) ลงในไอศกรีมเหลวที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์เรียบร้อยแล้ว แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น หลังจากนั้นนำไปปั่นให้เป็นเนื้อไอศกรีม ด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังกระบวนการปั่นไอศกรีม แล้ว

นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นของไอศกรีมทั้ง 3 ชุดทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) แต่หลังจากกระบวนการแช่แข็งพบว่า การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินเตร้อยละ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด ($P < 0.05$) ส่วนการห่อหุ้มเซลล์ด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 เดิมซูโครสร้อยละ 5 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างจากเซลล์อิสระ ($P \geq 0.05$) และเมื่อนำไอศกรีมผ่านกระบวนการแช่แข็ง เซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินเตร้อยละ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด รองลงมาคือเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่มีซูโครสร้อยละ 5 และเซลล์อิสระ ดังแสดงใน Table 16

เมื่อผลิตไอศกรีมเสริม *Lactobacillus plantarum* CM53 โดยเติมเซลล์ลงในไอศกรีมเหลวก่อนกระบวนการปั่นไอศกรีม พบว่ากระบวนการผลิตไอศกรีมมีผลต่อการจำนวน *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่มีชีวิต ดังแสดงใน Table 16 จากตารางพบว่าเมื่อผลิตไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกเซลล์อิสระ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงหลังจากผ่านกระบวนการปั่นไอศกรีม และแช่แข็งไอศกรีม ($P < 0.05$) แต่เมื่อห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินเตร้อยละ 3 พบว่าหลังจากกระบวนการปั่นไอศกรีม จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น ($P \geq 0.05$) แต่เมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 เดิมซูโครสร้อยละ 5 พบว่าหลังกระบวนการปั่นไอศกรีม และแช่แข็งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังผ่านกระบวนการผลิตทั้งสองขั้นตอน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการปั่นไอศกรีม และแช่แข็งมีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยกระบวนการเหล่านี้ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง แต่อย่างไรก็ตาม การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินเตร้อยละ 3 และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ จากรายงานของ Akalin และ Erisir (2008) ระหว่างการแช่เยือกแข็งไอศกรีมเซลล์โพรไบโอติกจะเกิดการเสียดสีกับใบพัด และผนังของถังปั่น รวมทั้งในระหว่างการแช่เยือกแข็งมีการเติมอากาศเข้าไป เพื่อให้เนื้อไอศกรีมขึ้นฟู ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้มเกิดการบาดเจ็บ เมื่อนำไปแช่เยือกแข็งทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตาย

Table 16 Effect of freezing and hardening on total viable count of *Lactobacillus plantarum* CM53 in ice cream

Ice cream	Total viable count (Log CFU/g)		
	Initial cell	After freezing	After hardening
Control	8.68 ± 0.14 ^{aA}	8.19 ± 0.10 ^{bB}	7.46 ± 0.32 ^{cC}
3% alginate beads	8.82 ± 0.20 ^{aA}	8.71 ± 0.20 ^{aA}	8.57 ± 0.11 ^{aB}
5% low methoxy pectin with 5% sucrose beads	8.68 ± 0.12 ^{aA}	8.25 ± 0.04 ^{bB}	8.25 ± 0.02 ^{bB}

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

^{A-C} Different superscripts in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$).

เมื่อนำไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่เติมเซลล์หลังกระบวนการปั่นไอศกรีม มาทดสอบการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 เติมนูโครสร้อยละ 5 สามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังแสดงใน Figure 21 เมื่อเก็บรักษาไอศกรีมนาน 8 สัปดาห์ การห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด รองลงมาคือเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 เติมนูโครสร้อยละ 5 และเซลล์อิสระ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 8.17, 7.74 และ 6.16 Log CFU/g ตามลำดับ (จำนวนเซลล์เริ่มต้นของทุกชุดทดสอบประมาณ 8 Log CFU/g) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และสูงกว่าการห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 เติมนูโครสร้อยละ 5 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงประมาณ 1 Log CFU/g ในขณะที่เซลล์อิสระลดลงประมาณ 2 Log CFU/g สอดคล้องกับผลการทดลองของ Krasaekoopt และคณะ (2004) ได้ห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus acidophilus* 547, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1994 และ *Lactobacillus casei* 01 ด้วยอัลจินตที่เคลือบด้วยไคโตซาน แล้วเติมลงในโยเกิร์ต เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการรอดชีวิตโดยเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มสามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าเซลล์อิสระ 1 Log cycle และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตลอดระยะเวลาการเก็บรักษามีประมาณ 7 Log CFU/g และ Akin และคณะ (2007) ได้ทำการผลิตไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium lactis* ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม แล้ว

เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 7 Log CFU/g เป็น 5 Log CEU/g

แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่า *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่เป็นเซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ยังคงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 6 Log CFU/g เป็นจำนวนที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

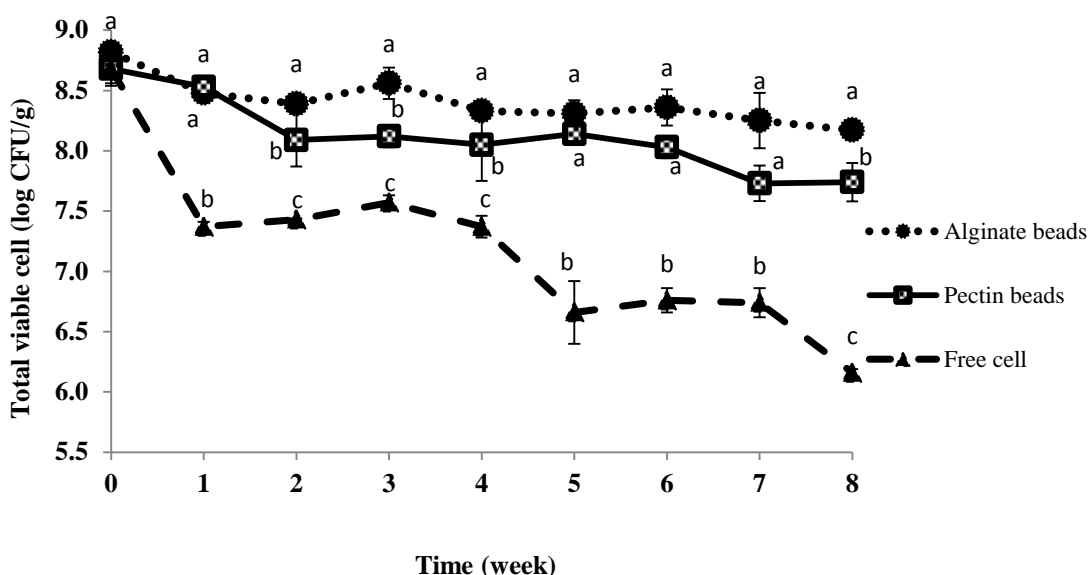


Figure 21 Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 cells added in ice cream before freezing.

^{a-c} Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

4.2 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่เติมหลังกระบวนการปั่นไอศกรีม

ผลการเสริม *Lactobacillus plantarum* CM53 ในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 ในไอศกรีมหลังการปั่นไอศกรีม ไอศกรีม ด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นของไอศกรีมทั้ง 3 ชุดทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) แต่หลังจากการแช่แข็งพบว่า การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินตร้อยละ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด สอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.1 รองลงมาคือเซลล์อิสระ เซลล์ที่ห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 ตามลำดับ โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแต่ละชุด-ทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงใน Table 17

จากการทดลองพบว่า กระบวนการปั่นไอศกรีม ไอศกรีมมีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น และหลังแช่เยือกแข็งมีจำนวนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.1 แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการแช่แข็งไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตก่อนและหลังแช่เยือกแข็งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เนื่องมาจากการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินตใช้เทคนิคอิมัลชันในการห่อหุ้ม ซึ่งมีน้ำมันเป็นส่วนผสมในการห่อหุ้ม น้ำมันอาจจะไปเคลือบรอบๆ รอบเม็ดเจล ทำให้บริเวณโดยรอบไม่มีน้ำจึงทำให้การเกิดผลึกน้ำแข็งน้อยกว่า ขณะที่การห่อหุ้มด้วยเพคตินที่ใช้เทคนิคเอกซ์ทรูชัน อาจจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งมากกว่าจึงส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง

Table 17 Effect of hardening on the total viable count of *Lactobacillus plantarum* CM53 in added ice cream after freezing

Ice cream	Total viable count (Log CFU/g)	
	Initial cell	After hardening
Control	8.81 ± 0.20 ^{aA}	8.17 ± 0.09 ^{bB}
3% alginate beads	8.92 ± 0.96 ^{aA}	8.66 ± 0.76 ^{aA}
5% low methoxy pectin with 5% sucrose beads	8.78 ± 0.05 ^{aA}	8.04 ± 0.22 ^{cB}

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$)

^{A-C} Different superscripts in the same raw indicate significant difference ($P < 0.05$)

เมื่อเก็บรักษาไอศกรีมเสริม *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่ถูกเติมหลังการแช่เยือกแข็งไอศกรีม ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองที่ได้แสดงดัง Figure 18 จากการทดลองพบว่า การห่อหุ้มเซลล์สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกได้ดีกว่าเซลล์อิสระตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาไอศกรีม เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด รองลงมาคือเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วย low methoxy-เพคติน ร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 และเซลล์อิสระ โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 8.28, 7.72 และ 6.63 Log CFU/g ตามลำดับ (จำนวนเซลล์เริ่มต้นของทุกชุดทดสอบประมาณ 8 Log CFU/g) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และส่วนจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าการห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงประมาณ

1 Log CFU/g ในขณะที่เซลล์อิสระลดลงประมาณ 2 Log CFU/g เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.1

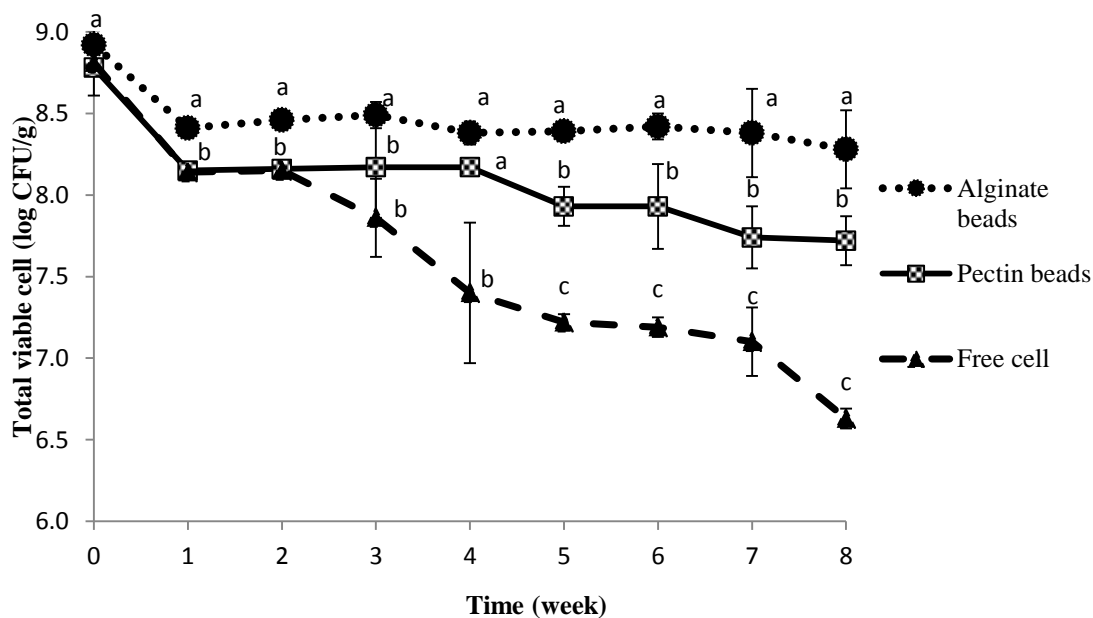


Figure 22 Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 cells added in ice cream after freezing

^{a-c} Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$).

4.3 ลักษณะโครงสร้างเจลของเม็ดเจลอัลจินตและเพคติน

จากการทดลองผลของสภาวะการผลิตและการเก็บรักษาไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 ด้วยเทคนิคอิมัลชัน และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 ด้วยเทคนิคเอกซ์ทรูชัน พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตสามารถปกป้องเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ได้ดีกว่าเพคติน ซึ่งเมื่อนำเม็ดเจลของอัลจินตและเพคติน มาศึกษาลักษณะของโครงสร้างเจลที่ห่อหุ้มเซลล์ไว้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดังแสดงใน Figure 16 พบว่าโครงสร้างเจลของอัลจินตมีความหนาแน่นมากกว่า และมีรูพรุนน้อยกว่า (16a) เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของ low methoxy เพคติน (16b) จึงช่วยปกป้องเซลล์ไม่ให้สัมผัสกับสภาวะที่เป็นอันตราย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บน้อยกว่า

4.4 คุณภาพของไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก

4.4.1 คุณลักษณะทางกายภาพ

เมื่อนำไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดทดสอบประกอบด้วย ไอศกรีมเสริม *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่เป็นเซลล์อิสระ (ควบคุม) เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร้อยละ 3 และ low methoxy เพคตินร้อยละ 5 ที่เติมซูโครสร้อยละ 5 เดิมเม็ดเจลดร้อยละ 2 ของน้ำหนักไอศกรีม (w/w) ลักษณะของไอศกรีมทั้ง 3 ชุดทดสอบดังแสดง Figure 23 จากรูปเห็นได้ว่าไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกชุดควบคุม (23a) ลักษณะเนื้อไอศกรีมมีความเรียบเนียนกว่าไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลด และไอศกรีมที่เสริมด้วยเม็ดเจลดอัลจิเนต (23b) เนื้อไอศกรีมเรียบเนียนกว่าที่เสริมด้วยเม็ดเจลดเพคติน (23c) เนื่องจากขนาดของเม็ดเจลดของอัลจิเนตมีขนาดประมาณ 187.4 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับเม็ดเจลดเพคตินที่มีขนาดประมาณ 2,000 ไมโครเมตร

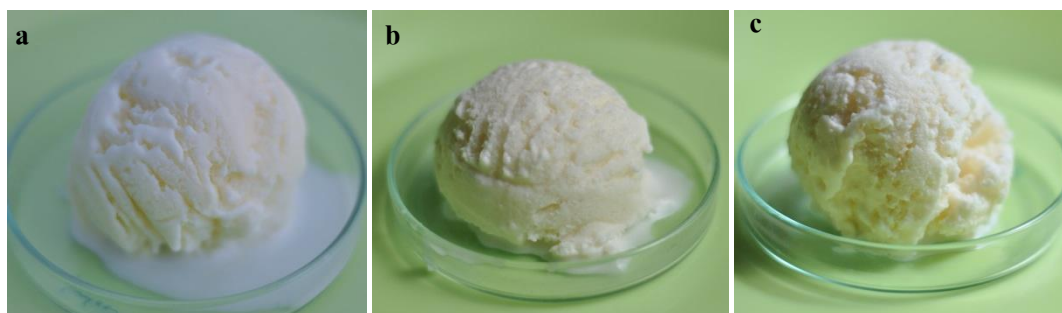


Figure 23 Characteristic ice cream supplemented with free cells (a) and cells encapsulated with alginate (b) or pectin (c).

เมื่อนำไอศกรีมที่เสริมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดทดสอบที่มีการเติมเซลล์โพรไบโอติกลงไป 2 แบบ แบบที่ 1 คือเติมหลังกระบวนการปั่นไอศกรีม ไอศกรีม และแบบที่ 2 คือ เติมลงในไอศกรีมเหลวก่อนการปั่น ไอศกรีมนำมาตรวจสอบค่าทางกายภาพ โดยวัดค่าสีโดยใช้ระบบ L^* , a^* และ b^* จากการทดลองพบว่า การเติมเม็ดเจลดลงไปส่งผลต่อ L^* ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความสว่างของไอศกรีม ดังแสดงใน Table 19 โดยไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกชุดควบคุม (Control 1 และ Control 2) มีค่า L^* เท่ากับ 94.53 ± 0.41 และ 94.80 ± 0.53 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าไอศกรีมเสริมด้วยเม็ดเจลดอัลจิเนต (Alginate 1 และ Alginate 2) และเพคติน (Pectin 1 และ Pectin 2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไอศกรีมเสริมเม็ดเจลดอัลจิเนตและเพคตินมีค่า L^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยไอศกรีมเสริมเม็ดเจลดอัลจิเนต Alginate 1 และ Alginate 2 มีค่า L^* เท่ากับ 88.44 ± 1.93 และ 89.33 ± 2.40 ตามลำดับ ส่วนไอศกรีมเสริมเม็ดเจลดเพคติน Pectin 1 และ Pectin 2 มีค่า L^* เท่ากับ 87.91 ± 1.90 และ 87.99 ± 2.12 ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการเติมเม็ดเจลดลงในไอศกรีมมีผลต่อความสว่างของไอศกรีม แต่วิธีการเติมโพรไบโอติกลงในไอศกรีม

ก่อนหรือหลังการปั่นไม่ส่งผลต่อความสว่างของไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกทั้งที่อยู่ในรูปของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม

ส่วนค่า a^* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสีของไอศกรีม หากมีค่าเป็นลบ จะเป็นสีเขียว แต่หากมีค่าเป็นบวกจะเป็นสีแดง จากการทดลอง พบว่าไอศกรีมชุดควบคุม (Control 1 และ Control 2) และที่เสริมเม็ดเจลาติน (Alginate 1 และ Alginate 2) ให้ค่า a^* เป็นลบเหมือนกัน แสดงว่าไอศกรีมทั้ง 2 ชุดทดสอบให้ค่าเป็นสีเขียว แต่ไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลาตินมีค่า a^* เป็นบวก แสดงว่าเป็นสีแดง ดังแสดงใน Table 19 นอกจากนี้พบว่าวิธีการเติมโพรไบโอติกก่อนหรือหลังการปั่นไม่มีผลต่อค่า a^* โดยไอศกรีมที่เสริมโพรไบโอติกชุดควบคุม Control 1 และ Control 2 มีค่า a^* เท่ากับ -0.25 ± 0.06 และ -0.39 ± 0.16 ตามลำดับ ส่วนไอศกรีมเสริมด้วยเม็ดเจลาติน ให้ค่า a^* เท่ากับ -0.94 ± 0.36 และ -1.58 ± 0.48 ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการเสริมโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินต และเพคติน ค่า a^* ของไอศกรีมแตกต่างกัน เนื่องจากสีของเม็ดเจลาตินมีสีขาวขุ่น ส่วนเม็ดเจลาตินมีสีโทนเหลืองอ่อน (Figure 12 และ 13) ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลต่อค่า a^*

เมื่อพิจารณาในส่วนของค่า b^* หากค่าเป็นบวกจะแสดงสีเหลือง และหากเป็นลบจะแสดงสีน้ำเงิน จากการทดลองดังแสดง Table 18 พบว่าไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกทุกชุดทดสอบให้ค่า b^* เป็นบวก ซึ่งแสดงว่าไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกมีสีเหลือง ไอศกรีมเสริมเม็ดเจลาตินให้ค่า b^* สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไอศกรีมเสริมเม็ดเจลาตินที่เติมหลังการปั่น (Pectin 1) และเซลล์อิสระ ซึ่งไอศกรีมทั้งสองชุดทดสอบมีค่า b^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ส่วนวิธีการเติมโพรไบโอติกก่อนหรือหลังการปั่น ไอศกรีม ไม่มีผลต่อค่า b^* ทั้งไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกชุดควบคุม C1 และ C2 มีค่า b^* เท่ากับ 10.78 ± 0.48 และ 11.39 ± 0.90 ตามลำดับ และไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลาติน Alginate 1 และ Alginate 2 มีค่า b^* เท่ากับ 13.10 ± 0.72 และ 13.78 ± 0.50 ตามลำดับ แต่ไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลาตินพบว่า วิธีการเติมเม็ดเจลาตินโพรไบโอติกลงในไอศกรีมมีผลต่อค่า b^* โดยการเติมเม็ดเจลาตินไปก่อนการปั่น (Pectin 2) มีค่า b^* เท่ากับ 13.67 ± 0.60 มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเติมหลังการปั่น (Pectin 1) ซึ่งมีค่า b^* เท่ากับ 10.44 ± 1.16

เมื่อนำไอศกรีมมาทดสอบร้อยละการขึ้นฟู (Overrun) พบว่าร้อยละการขึ้นฟูของไอศกรีมทุกชุดทดสอบอยู่ในช่วงร้อยละ 32 -37 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงใน Table 19 ค่าร้อยละการขึ้นฟูสอดคล้องกับผลของ Akalin และ Erisir (2008) ได้ผลิตไอศกรีมโพรไบโอติก คือ *Lactobacillus acidophilus* La-5 และ *Bifidobacterium animalis* Bb-12 พบว่ามีอัตราการขึ้นฟูร้อยละ 27.6 -50 ซึ่งการเติมและวิธีการเติมเม็ดเจลาตินไม่มีผลต่ออัตราการขึ้นฟู

ด้วยเช่นกัน การขึ้นฟูของไอศกรีมเกิดจากการอัดอากาศเข้าไปในไอศกรีมเหลวในระหว่างการการปั่นไอศกรีม ส่งผลให้ปริมาตรของไอศกรีมเพิ่มขึ้น จากรายงานพบว่า สารให้ความคงตัว (Stabilizer) มีผลต่อการขึ้นฟู โดยจะช่วยสร้างลักษณะโครงสร้างของเจลในน้ำและช่วยจับน้ำไว้ จึงเป็นการช่วยเพิ่มความหนืดให้ส่วนผสมของไอศกรีม ซึ่งความหนืดที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้อากาศแทรกตัวได้มากขึ้น (Marshall and Arbuckle, 1996) ในการทดลองครั้งนี้ทำการควบคุมปริมาณสารคงตัวให้เท่ากัน จึงส่งผลให้การขึ้นฟูของไอศกรีมไม่แตกต่างกัน

เมื่อนำไอศกรีมมาทดสอบอัตราการละลายที่อุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส โดยการชั่งน้ำหนักไอศกรีมที่ละลายออกมา แล้วนำไปเทียบกับน้ำหนักไอศกรีมเริ่มต้น นำมาคำนวณหาร้อยละอัตราการละลายที่เวลา 15 และ 35 นาที จากการทดลองพบว่าที่เวลา 15 นาที อัตราการละลายของทุกชุดทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\geq 0.05$) แต่เมื่อเวลาเพิ่มเป็น 35 นาที อัตราการละลายของไอศกรีมเสริมเม็ดเจลเพคติน (Pectin1 และ Pectin2) สูงสุด รองลงมาไอศกรีมเสริมเม็ดเจลอัลจินต และไอศกรีมชุดควบคุม ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 18 อัตราการละลายขึ้นอยู่กับขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในไอศกรีม โดยผลึกที่มีขนาดเล็กจะมีการหลอมละลายต่ำกว่าผลึกขนาดใหญ่ (Akalin and Erisir, 2008) แสดงว่าไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลเพคตินมีผลึกน้ำแข็งใหญ่กว่าไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลอัลจินต และชุดควบคุม

Table 18 Physical characteristics of probiotic fortified ice cream

Treatments	Overrun (%)	Color			Melting rate (%)	
		L*	a*	b*	15 min	35 min
Control(1)	32.73±4.99 ^{ns}	94.53±0.41 ^a	-0.25±0.06 ^{ab}	10.78±0.48 ^b	13.34±4.17 ^{ns}	21.24±2.75 ^b
Control(2)	37.00±9.11 ^{ns}	94.80±0.53 ^a	-0.39±0.16 ^b	11.39±0.90 ^b	13.72±3.22 ^{ns}	21.88±2.02 ^b
Alginate(1)	33.65±7.91 ^{ns}	88.44±1.93 ^b	-0.94±0.36 ^c	13.10±0.72 ^a	14.83±3.03 ^{ns}	28.17±0.80 ^{ab}
Alginate(2)	37.66±9.56 ^{ns}	89.33±2.40 ^b	-1.58±0.48 ^d	13.78±0.50 ^a	13.68±1.82 ^{ns}	23.87±1.84 ^b
Pectin(1)	35.83±4.06 ^{ns}	87.91±1.90 ^b	0.19±0.13 ^a	10.44±1.16 ^b	19.85±5.00 ^{ns}	34.50±7.99 ^a
Pectin(2)	33.79±4.71 ^{ns}	87.99±2.12 ^b	0.30±0.37 ^a	13.67±0.60 ^a	19.72±2.50 ^{ns}	31.95±2.52 ^a

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c}Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

^{ns}Different superscripts in the same column indicate not significant difference ($P\geq 0.05$).

Control: free cells; Alginate: cells encapsulated with alginate; Pectin: cells encapsulated with pectin

(1): *Lactobacillus plantarum* were added to ice cream after freezing; (2): *Lactobacillus plantarum* were added before freezing

4.4.2 คุณลักษณะทางชีวภาพ

เมื่อนำไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกมาตรวจสอบค่าทางชีวภาพตามมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข โดยการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียก่อโรคดังนี้ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes* พบว่าค่าทางชีวภาพของไอศกรีมทั้งหมดที่ทดสอบไม่เกินค่ามาตรฐานที่กำหนด (Table 19) แสดงว่าไอศกรีมโพรไบโอติกที่ผลิตได้มีคุณภาพดีเหมาะสมสำหรับบริโภค

Table 19 Total viable count (TVC), *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA), *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* (BC) and *Listeria monocytogenes* (LM) count in probiotic fortified ice cream

Ice cream	TVC (CFU/g)	EC	(SA)	<i>Salmonella</i> spp.	(BC)	(LM)
Control(1)	3.7×10^2	ND	ND	ND	ND	ND
Control(2)	2.5×10^2	ND	ND	ND	ND	ND
Alginate(1)	3.2×10^2	ND	ND	ND	ND	ND
Alginate(2)	3.5×10^2	ND	ND	ND	ND	ND
Pectin(1)	2.7×10^2	ND	ND	ND	ND	ND
Pectin(2)	4.7×10^2	ND	ND	ND	ND	ND

Values are given as mean \pm SD from triplicate determination.

Control: free cells; Alginate: cells encapsulated with alginate; Pectin: cells encapsulated with pectin (1): *Lactobacillus plantarum* were added to ice cream after freezing; (2): *Lactobacillus plantarum* were added before freezing; ND: not detected.

4.4.3 ลักษณะทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมเสริมโพรไบโอติก

เมื่อนำไอศกรีมทั้ง 3 ชุดทดสอบ ประกอบด้วย ไอศกรีมช็อควาคม, เสริมด้วยเม็ดเจลอัลจินตและเพคติน ไปทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคทั้งหมด 30 คน ด้วยวิธี 9-point hedonic scale โดยการทดสอบความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี เนื้อสัมผัส รสชาติ กลิ่นรส และความชอบรวม พบว่าคะแนนความชอบของลักษณะปรากฏ, เนื้อสัมผัส, กลิ่นรส, รสชาติ และความชอบรวมของไอศกรีมช็อควาคมสูงกว่า ไอศกรีมเสริมเม็ดเจลอัลจินต และ เพคตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ขณะที่ความชอบในด้านสีของไอศกรีมทั้ง 3 ชุดทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ส่วนคะแนนความชอบของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสทุกด้านที่ทดสอบในไอศกรีมที่เสริมเม็ดเจลทั้งสองสูตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ดังแสดงใน Table 20

จากผลการทดลองพบว่าเม็ดเจลที่ถูกเติมลงในไอศกรีมมีผลให้ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส รสชาติ และความชอบรวมของไอศกรีมลดลง แต่ไม่ส่งผลต่อสีของไอศกรีม แต่

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าไอศกรีมเสริมเม็ดเจลมีคะแนนความชอบต่ำกว่าไอศกรีมไม่เสริมเม็ดเจล แต่คะแนนความชอบยังอยู่ในระดับ 6 แสดงว่าผู้ทดสอบมีความชอบเล็กน้อย และยิ่งกว่านั้น คะแนนความชอบรวมของไอศกรีมเสริมเม็ดเจลอัลจินตอยู่ในระดับ 7.17 สูงกว่าไอศกรีมเสริมเม็ดเจล-เพคติน (6.83) เกิดจากเม็ดเจลอัลจินตใช้วิธีอัดในการผลิตจึงมีขนาดเล็กกว่าเพคตินที่ใช้วิธีเอกซ์-ทรูชัน ขนาดของเม็ดเจลจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัสไอศกรีม โดยทั่วไปแล้วไอศกรีมที่ดีต้องมีผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กกว่า 50 ไมครอน จึงจะได้เนื้อสัมผัสที่เรียบเนียน แต่ถ้าขนาดผลึกน้ำแข็งใหญ่กว่า 50 ไมครอน จะได้ไอศกรีมที่มีเนื้อสัมผัสหยาบ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้บริโภคยอมรับไอศกรีมเสริมเม็ดเจลอัลจินตมากกว่าเพคติน

Table 20 Sensory evaluation of beads fortified ice cream

Ice cream	Appearance	Color	Texture	Flavor	Taste	Overall acceptance
Control	7.80 ± 0.81 ^a	7.70 ± 0.65 ^{ns}	8.03 ± 0.72 ^a	7.83 ± 0.65 ^a	7.83 ± 0.65 ^a	7.93 ± 0.69 ^a
Alginate beads	6.63 ± 1.25 ^b	7.33 ± 0.92 ^{ns}	6.40 ± 1.13 ^b	7.13 ± 0.94 ^b	7.17 ± 0.83 ^b	7.17 ± 0.59 ^b
LM-Pectin beads	6.07 ± 1.53 ^b	7.33 ± 0.66 ^{ns}	6.47 ± 1.28 ^b	7.10 ± 0.80 ^b	7.17 ± 0.95 ^b	6.83 ± 0.70 ^b

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c}Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

^{ns}Different superscripts in the same column indicate not significant difference ($P \geq 0.05$).

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากนมวัว และนมแพะ จำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 108 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากนมวัว จำนวน 54 ไอโซเลท และ นมแพะ จำนวน 54 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการทนกรดที่พีเอช 3, 2 และ 1 และมีเอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตได้สูงกว่าร้อยละ 50 มีจำนวน 48, 19 และ 8 ไอโซเลท ตามลำดับ และเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการทนเกลือแร่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 มีเอนไซม์เพนทรีเอตินความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสภาวะต่างพีเอช 8.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าร้อยละ 70 เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่ทนสภาวะกรดและเกลือแร่ทั้ง 8 ไอโซเลท มาทดสอบการทนต่อสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร ประกอบด้วยสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารที่พีเอช 2 มีเอนไซม์เพนทรีเอติน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบต่อในสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กที่มีเกลือแร่ร้อยละ 1 มีเอนไซม์เพนทรีเอติน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะต่างที่พีเอช 8.0 นาน 4 ชั่วโมง พบว่ามีเพียง 7 ไอโซเลท เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าร้อยละ 50 เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการเกาะติดกับ n-hexadecane พบว่าทุกไอโซเลทที่ทดสอบมีค่าการเกาะติดในระดับต่ำกว่าร้อยละ 20 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypimurium* และ *Listeria monocytogenes* พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท ได้แก่ CM21, CM47 และ CM53 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนมวัว ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ จากนั้นนำ CM21, CM47 และ CM53 ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเกลือแร่ พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถย่อยเกลือแร่ชนิด GDC และมีเพียง 2 ไอโซเลท คือ CM47 และ CM53 เท่านั้น ที่สามารถย่อยเกลือแร่ชนิด GC ได้ เมื่อกัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพเป็นโพรไบโอติกที่ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ CM21, CM47 และ CM53 นำมาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16s rDNA พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์เป็น *Lactobacillus- plantarum* subsp. *plantarum* และมีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99.17, 99.79 และ

98.91 ตามลำดับ เนื่องจาก *Lactobacillus plantarum* CM53 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ดีที่สุด จึงได้คัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาผลของการห่อหุ้ม

เมื่อนำ *Lactobacillus plantarum* CM53 มาห่อหุ้มด้วยวัสดุพุง 3 ชนิด ดังนี้ อัลจินตร้อยละ 1, 2 และ 3 ร่วมกับ Hi-maize ร้อยละ 2 ด้วยวิธีอิมัลชัน, low methoxy เพคติน เข้มข้น ร้อยละ 5, low methoxy เพคติน ร้อยละ 2.5 และ high methoxy เพคติน ร้อยละ 2.5 และคาร์ราจีแนน ร้อยละ 3 และ 4 ด้วยวิธีเอกซ์ทรูชัน วัสดุพุงทุกชุดทดสอบเติมชูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 2 ที่เติมชูโครสร้อยละ 10 และ อัลจินตร้อยละ 3 ที่เติมชูโครสร้อยละ 5 และ 10 มีขนาดเม็ดเจลเฉลี่ยมากกว่า 3 มิลลิเมตร จึงไม่เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในไอศกรีม เมื่อนำเม็ด-เจลที่ผลิตจากวัสดุพุงทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่อง-กราด พบว่า เม็ดเจลของอัลจินต และเพคตินมีลักษณะเป็นทรงกลม ส่วนเม็ดเจลคาร์ราจีแนนมีลักษณะแบนและมีรูปร่างผิดปกติ เมื่อนำเม็ดเจลที่คัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพการห่อหุ้ม พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 2 ที่เติมชูโครสร้อยละ 0 และ 5, อัลจินตร้อยละ 3 เติมชูโครสร้อยละ 0, low methoxy เพคติน ร้อยละ 5 ที่เติมชูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 และ low methoxy เพคติน ร้อยละ 2.5 และ high methoxy เพคติน ร้อยละ 2.5 เติมชูโครสร้อยละ 0, 5 และ 10 มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสูงสุด จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ในสภาวะแช่แข็ง ไอศกรีม นาน 48 ชั่วโมง และสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 ร่วมกับชูโครสร้อยละ 2 และ low methoxy เพคติน ร้อยละ 5 เติมชูโครสร้อยละ 5 เป็นวัสดุพุงที่สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุด และเมื่อนำวัสดุพุงที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการปลดปล่อยในสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็ก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง พบว่าวัสดุพุงทั้ง 2 ชนิด ความสามารถในการปลดปล่อยเซลล์ได้สูงกว่าร้อยละ 90 จึงได้คัดเลือกเพื่อนำมาห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 สำหรับเสริมลงในไอศกรีม

เมื่อผลิตไอศกรีมวานิลลาเสริมเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยวัสดุพุงที่คัดเลือกทั้ง 2 ชนิด และเซลล์อิสระอิสระ แล้วทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ *Lactobacillus plantarum* CM53 ในระหว่างการผลิตและเก็บรักษา ไอศกรีมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์พบว่า การห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุด และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และเมื่อนำมาทดสอบลักษณะทางกายภาพ จีวภาพ และประสาทสัมผัสโดยใช้ 9-point hedonic scale พบว่าไอศกรีมเสริมเซลล์อิสระมีเนื้อเนียนเนียนกว่าไอศกรีมที่เสริมด้วยเซลล์ด้วยห่อหุ้ม ส่วนค่าสีด้วยระบบ L*, a* และ b* พบว่าค่า L* ของไอศกรีมที่เสริมเซลล์อิสระสูงกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม ส่วนค่า a* พบว่าไอศกรีมที่เสริมเซลล์อิสระ และที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินตให้ค่า a* เป็นลบ แต่ไอศกรีมเสริมเซลล์ที่ถูก

ห่อหุ้มด้วย low methoxy เพคตินให้ค่า a* เป็นบวก ส่วน ค่า b* พบว่าทั้งไอศกรีมทุกชุดทดสอบให้ค่า b* เป็นบวก เมื่อทดสอบอัตราการละลาย พบว่า ที่เวลา 15 นาที อัตราการละลายของทุกชุดทดสอบไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเวลาเพิ่มเป็น 35 นาที อัตราการหลอมละลายของไอศกรีมที่เสริมเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยเพคตินมีอัตราการหลอมละลายสูงสุด รองลงมาเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินต และเซลล์อิสระ ตามลำดับ ส่วนคุณภาพทางจุลินทรีย์ พบว่าไอศกรีมทุกชุดทดสอบมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่เกินค่ามาตรฐาน และเมื่อนำไปทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคจำนวน 30 คน พบว่าคะแนนความชอบทางด้านลักษณะปรากฏ, เนื้อสัมผัส, กลิ่นรส, รสชาติ และความชอบรวมของไอศกรีมที่เสริมเซลล์อิสระสูงกว่าเซลล์ที่ห่อหุ้ม ส่วนคุณลักษณะทางด้านสีไม่แตกต่างกัน แต่ไอศกรีมเสริมเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจินตร้อยละ 3 มีคะแนนความชอบรวมเท่ากับ 7.17 ซึ่งเท่ากับชอบปานกลาง จึงสรุปได้ว่าไอศกรีมที่เสริมด้วยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มอัลจินตร้อยละ 3 ด้วยวิธีอิมัลชัน มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถปกป้องเซลล์ได้ในระหว่างขั้นตอนการผลิตและเก็บรักษาไอศกรีมได้ดีที่สุด โดยที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มคงที่ แต่อย่างไรก็ตามคะแนนทางประสาทสัมผัสต่ำกว่าชุดควบคุม จึงควรที่จะนำไปพัฒนาต่อ เพื่อให้ได้ไอศกรีมที่มีคุณค่าทางโภชนาการ และนำรับประทาน

ข้อเสนอแนะ

1. วิธีการห่อหุ้มโพรไบโอติกด้วยอัลจินต โดยวิธีอิมัลชันสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารได้ ควรที่จะนำไปศึกษาในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม
2. วิธีการห่อหุ้มด้วยวิธีอิมัลชันมีขนาดเม็ดเจลที่ไม่สม่ำเสมอ ควรที่จะทำการพัฒนาปรับปรุงวิธีการห่อหุ้ม เพื่อให้สามารถผลิตเม็ดเจลที่มีขนาดสม่ำเสมอ
3. ไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มมีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคต่ำกว่าไอศกรีมเสริมโพรไบโอติกที่เป็นเซลล์อิสระ ควรที่จะนำมาพัฒนาต่อ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคไม่แตกต่างจากเซลล์อิสระ

เอกสารอ้างอิง

- จุไรรัตน์ ร่วมพันธ์. 2550. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จุฬาลักษณ์ ชูพรหม. 2553. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติก และศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรด และเกลือแร่ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เชาวน์ ชิโนรักษ์ และ พรรณี ชิโนรักษ์. 2541. ระบบย่อยอาหาร ใน ชีวิตวิทยา 1. พิมพ์ครั้งที่ 4. หน้า 405-463. สำนักพิมพ์ศิลปาบรรณาคาร. กรุงเทพฯ.
- ไชยวัฒน์ ไชยสุด และ ศศิธร ศิริสุน. 2553. โพรไบโอติก: จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ. ว. สำนักการแพทย์ทางเลือก. 3(3): 4-16 (ฉบับ กันยายน-ธันวาคม).
- ฐานเศรษฐกิจออนไลน์ เรื่อง ตลาดไอศกรีมปี 2555(ออนไลน์). 2554. สืบค้นจาก: <http://www.thannews.th.com>. (15 กันยายน 2554)
- ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์. 2554. การประเมินสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอสซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธารรัตน์ สุกศิริ. 2542. Probiotic. ว. แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. 53: 357-360.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2554. แรงดันออสโมติก (osmotic pressure). ใน จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 9 (กนิษฐา กิตติคุณ, บรรณาธิการ). หน้า 92-94. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- นริญญา บุญดิน. 2550. การคัดเลือกโพรไบโอติกจากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- บุษกร อุตระชาติ. 2548. บทความวิชาการเรื่อง มารูจัก แบคทีเรียแลคติก กันเถอะ. ว. วิทยาศาสตร์ ทักษิณ. 2(2): 18-33.
- ปรีชา สุวรรณพินิจ และ นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2551. การย่อยอาหาร ใน ชีวิตวิทยา 1. (กนิษฐา กิตติคุณ, บรรณาธิการ). หน้า 258-281. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522ก เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. 2554. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 128 ตอนพิเศษ 86 ง. 21-25.

- พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522ข เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค. 2552.
 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 41 ง.
- พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522ค เรื่อง ไอศกรีม. 2544. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 222.
 พัชรวรรณ รัตนอุบล. 2552. การรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยใช้สารพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์ซัน
 ไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พัชรินทร์ รักถาวร. 2542. การผลิตและปรับปรุงคุณภาพไอศกรีมกระต๊อบไขมัน. วิทยานิพนธ์
 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนปานนท์. 2557. Capsule/แคปซูล (ออนไลน์). สืบค้นจาก:
<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3704/capsule> (20 เมษายน 2557).
- มงคล ธีรบุญยานนท์ และ ปิยะนุช เนียมทรัพย์. 2550. การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์
 Caco-2 เพื่อคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่สามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้และยับยั้ง
 เชื้อก่อโรค. รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- วรรณมา ตูลยชัย. 2549. เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต. ใน พอลิแซ็กคาไรด์: คุณสมบัติและ
 โครงสร้าง. พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 99-104. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
 กรุงเทพฯ.
- วรัมพร วงศ์สุทิน, ัญญา เลาหกุลจิต และ อรพิน เกิดชูชื่น. 2553. การเปลี่ยนแปลงสารอาหารของ
 ชีวพิฆเนฆักด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum*. ว. วิทย. กษ. 41(3/1) (พิเศษ): 705-708.
- ศุภศิลป์ มณีรัตน์. 2551. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นโปรไบโอติกแบคทีเรีย
 แลกติกจากไก่กระทงและไก่พื้นเมือง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมจิตร สุรพัฒน์. 2544. ไอศกรีมและผลิตภัณฑ์. สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
 กรุงเทพฯ.
- สยามธุรกิจ. 2556. ธุรกิจขายตรง. สยามธุรกิจ (ออนไลน์) ฉบับที่ 1385 ประจำวันที่ 13 มีนาคม 2556
 ถึง 15 มีนาคม 2556
- สิริสา สุมงคล. 2556. การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้น
 ไยจากพืชหัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งธรรมศาสตร์.
 กรุงเทพฯ.

- หทัยทิพย์ ร้อยคำ. 2552. ผลของสารทดแทนไขมันแบบผสมของไอศกรีมวานิลลาลดไขมันและลดพลังงาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เป็น โปรไบโอติกในไก่และเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อ โดยการห่อหุ้ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อัจฉรา หนูเพชร. 2546. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. 2555. การเข้าเกาะ (Adherence) ใน จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค. หน้า 59-60. จรัสสินทวงศ์การพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- Adlerberth, I, Ahrne, S., Johansson, M. L. Molin, G. R. Hanson, L. A. and Wold, A. E. 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. Appl. Environ. Microbiol. 62(7): 2244-2251.
- A.O.A.C. 2000. Official methods of analysis of AOAC international. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland.
- Akalin, A. S. and Erisir, D. 2008. Effect of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and Probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. J. Food Sci. (online). DOI: 10.1111/j.1750.2008.00728.x.
- Akin, M. B., Akin, M. S. and Kirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. Food Chem. 104: 93-99.
- Allan-Wojtas, P., Hansen, L. T. and Paulson A. T. 2008. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT-Food Sci. Tech. 41, 101-108.
- Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Sci. Tech.18: 240-251.
- Annan, N. T., Borza, A. D. and Hensen, L. T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal condition. Food Res. Int. 41: 184-193.

- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z. and Tassou, C. C. 2012. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. Food Microbiol. DOI: 10.1016/j.fm.2012.10.005.
- 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.
- Bacteriological Analytical Manual (BAM) (online). 2002. Available online: <http://www.fda.gov>. (15 June 2011).
- Badis, A., Guetarni, D. Moussa Boudjema, M., Henni, D. E. and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiol. 21: 579-588.
- Begley, M., G.M.G. Cormac and C. Hill. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol. Rev. 29: 625-651.
- Blay, L. G., Fliss, I. and Lacroix, C. 2004. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cell with ELISA radioactivity and plate count methods. J. Microbiol. Methods. 59: 211-221.
- Bosworth, A. W. and Van Slyke, L. L. 1916. A comparison of the composition of cow's, goat's milk and human milk. J. Biol. Chem. 24:187-189.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. 2010. Encapsulation of probiotic living cell: techniques and industrial applications in the food field. J. Food Eng. (online). DOI: 10.1016/j.jfoodeng 2010.12.
- Bukowska, H., Pieczul-Mroz, J., Jastrzebska, M., Chelstowski, K. and Naruszewicz, M. 1998. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. Atherosclerosis. 137(2): 437-438.
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., Adarve, G. T., Castro, J., Mart'ines, L. P. and Sampelayo, M. R. S. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. J. Food Composition Anal. 22: 322-329.
- Cebeci, A. and C'urakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol. 20: 511-518.

- Collado, M. C., Meriluoto, J. and Salminen, S. 2007. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *J. Food Res. Int.* 40: 629-636.
- Cunningham-Rundles, S., Ahrne, S., Bengmark, S., Johann-Liang, R., Marshall, F., Metakis, L., Califano, C., Dunn, A. M. Grasse, C., Hinds, G. and Gervia, C. 2000. Probiotics and immune response. *American J. Gastroenterol.* 95(1): 22–25.
- Dasechel, M. A. and Klaenhammer, T. R. 1989. Association of a 13.6 magadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1538-1541.
- de Vos, P., Faas, M. M. and Calafiore, R. 2006. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials.* 27 (32): 5603-5617.
- de Vrese, M. and Schrezenmeir, J. 2008. Probiotics prebiotics and synbiotics (online). *Adv. Biochem Eng. Biotechnol.* 111: 1-66.
- de Vries, M. C., Vaughan, E. E. Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. 2006. Review: *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.* 16: 1018-1028.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* 138: 571-578.
- Deepika, G., Green, R. J., Frazier, R. A. and Charalampopoulos, D. 2009. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1230–1240.
- Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G. and Le Blay, G. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 155: 185-190.
- Desai, H. and Park, H. J. 2005. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan–tripolyphosphate microspheres by spray drying. *J. Drug Dev. Res.* 64: 114-128.
- Ding, W. K. and Shah, N. P. 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J. Food Sci.* (online). DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01067.x.
- Draget, K. I., K-Braek, G. S. and Smidsrød, O. 1997. Alginate based new materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 21: 47-55.

- El-Sharef, N., Ghenghesh, K. S., Abognah, Y. S., Gnan, S.O. and Rahouma, A. 2006. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli-Libya. *J. Food Control*. 11: 637-641.
- Erkkilä, S. and E. Petäjä. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci*. 55: 297-300.
- Espeche, M. C., Pellegrino, C., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C. and Fátima Nader-Macías, M. E. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. 18: 103-109.
- Fávaro-Trindade, C. S., Balieiro, J. C. C., Dias, P. F., Sanino, F. A. and Boschini, C. 2007. Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin* L) ice creams. *J. Food Sci. Tech. Int.* 13: 285-291.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Ganong, W. F. 2001. Section V. Gastrointestinal Function; Digestion and Absorption. *In Review of Medical Physiology* 20th Ed. (Foltin, J., Nogueira, I., Ransom, J. and Sheinis, L. A. eds.). p. 387. Lange Medical. New York.
- Garcia, R. S., Marshall, R. T. and Heymann, H. 1995. Low fat ice cream from freeze-concentrated versus heat-concentrated nonfat milk solid. *J. Dairy Sci.* 78(11): 2345-2351.
- Gate2Biotech. Biotech Dictionary: Pectin (online). 2014. Available online: <http://www.gate2biotech.com/dictionary.php?word=177> (20 December 2013).
- 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 yogurt. *Braz. J. Microbiol.* 35: 151-156.
- Gusils, C., Gonzalez, S. N. and Oliver, G. 1999. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. *J. Microbiol.* 45: 981-987.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W, Liu, X. and Zhang, H. 2009. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT-Food Sci. Tech.* 42: 1540-1646.
- Hekmat, S. and McMahon, D. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *J. Dairy Sci.* 75: 1415-1422.

- Hofman, A. F. and Eckmann, L. 2006. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. In Proceeding of National Academy of Sciences (PNAS) USA. 21 March 2006. P. 4333-4334.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsami, M. R., Yarmand, M. S. and Razavi, S. H. 2008a. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *J. Food Chem.* 11: 50-55.
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H. and Yarmand, M. S. 2008b. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream condition. *J. Appl. Sci.* 8: 379 - 382.
- Hou, W. C., Chanf, W. H. and Jiang, C. H. 1999. Qualitative distinction of carboxyl group distributions in pectin with ruthenium red. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 115-119.
- Huang, Y. and Adams, M. C. 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 253-260.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. 2011. In vitro human digestion models for food applications (Review). *Food Chem.* 125: 1-12.
- Isolauri, E., Seppo Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Probiotics. *Best Pract. Res. Cl. GA.* 18: 299-313.
- Jo, C., Kim, H. J., Kim, D. H., Lee, W. K., Ham, J. S. and Byun, M. W. 2007. Radiation sensitivity of selected pathogens in ice cream. *J. Food control.* 18: 859-865.
- Johansson, M. L., Nobaek, S., Berggren, A., Nyman, M., Björck, I., Ahrne, S., Jeppsson, B. and Molin, G. 1998. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843(299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 29-38.
- Juven, B. J. and Pieson, M. D. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Protect.* 59: 1233-1241.
- Knarreborg, A., Jensen, S. K. and Engberg, R. M. 2003. Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured in vitro and in vivo. *J. Nutr. Biochem.* 14: 259-265.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *J. Int. Dairy.* 13: 3-13.

- Lewus, C. B., Kaiser, A. and Montvillei, T. J. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(6): 1683-1688.
- Magariños, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M. and Pizarro, O. 2007. Viability of probiotic microorganisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis Bb-12) in ice cream. *J. Int. Dairy Tech.* 60: 128-134.
- Maldonado, N. C., de Ruiz, C. S., Otero, M. C., Sesma, F. and Nader-MaCías, M. E. 2012. Lactic acid bacteria isolated from young calves-Characterization and potential as probiotics. *Res. Vet. Sci.* 92: 342-349.
- Mandal, S., Puniya, A. K. and Singh, K. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *J. Int. Dairy.* 16: 1990-1995.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16:189-199.
- Marketsandmarkets. 2556. ตลาดโพรไบโอติก (ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://pilgrimspublications.com/?p=16169> (11 กุมภาพันธ์ 2557).
- Marshall, R. T. and Arbuckle, R. C. 1996. Ice cream. 5th ed. pp. 72-349. International Thomson Publishing, New York.
- 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 condition. *J. Biochem. Eng.* 28: 73-78.
- Mohammadi, A., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R. and da Cruz, A. G. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic and sensory properties. *Ann Microbiol.* 61: 411-424.
- Mørch, Ý. A. 2008. Novel alginate microcapsules for cell Therapy: A study of the structure-function relationships in native and structurally engineered alginates. Thesis degree of doktor ingeniør in Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology.
- Mortazavian, A., Razavi, H. S., ehsani, M. R. and Sohrabvandi, S. 2007. Principles and method of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran. J. Food Biotech.* 5: 1-18.

- Musikasang, H. 2008. Screening of lactic acid bacteria as probiotic in chicken and enhancement of bacterial survival by microencapsulation. Thesis Master of Science in Biotrechnology. Prince of Songkla University.
- Nag, A. 2011. Development of microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a protein-polysaccharide complex. Thesis Master of Technology in Food Technology. Massey University.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A. and Reyes-Gavilan, C. G. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. Int. J. Food Microbiol. 92: 79-86.
- Nousia, F. G. Androulakis, P. I. and Fletouris, D. J. 2011. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. J. Dairy Tech. (online). DOI: 10.1111/j.1471-0307.2010.00645.x.
- Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V and Charalampopoulos, D. 2013. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. Food Res. Int. 53: 304-311.
- Naruszewicz, M., Johansson, M. L., Zapolska-Downar, D. and Bukowska, H. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. American J. for Clinic. Nutri. 76(6): 1249-01255.
- Oakenfull, D. G. 1991. The Chemistry of High Methoxy Pectin. In The Chemistry and Technology of Pectin. (Walter, R. H., Ed.). p. 87-106. New York.
- Ocana, V. S., Bru, E., de Ruiz Holgado, A. P. and Nader-Macias, M. E. 1999. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. J. General Appl. Microbiol. 45: 203-212.
- Oomen, A. G., Rompelberg, J. M., De Kamp, V. E., Pereboom, K. H., De Zwart, L .L. and Sips, A. M. 2004. Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46: 183-188.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. Int Dairy J. 9: 43-52.

- Pinto, M. G. V., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U. and Holzapfe, W. H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 205–214.
- Printo, M., Robineleon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simonassmann, P., Haffen, K., Fogh, J. and Zweibaum, A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. *J. Biol. Cell.* 47: 323-330.
- Qin, H., Zhang, Z. and Hang X. 2009. *Lactobacillus plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction protein changes in intestinal epithelial cells. *BMC. Microbiol. J.* 9: 63.
- Relleve, L., Nagasawa, N., Luan, L. Q., Yagi, T., Aranilla, C., Abad, L., Kume, T., Yoshii, F. and dela Rosa, A. 2005. Degradation of carrageenan by radiation. *Polym. Degrad. Stabil.* 87: 403-410.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogen : a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. *Vet. Microbiol.* 92: 111-119.
- Rolin, C. and De. Vries, J. D, 1990. Pectin. *In* Food Gels. (Harris, P., ed.). p. 401-434. Elsevier Applied Sci. London.
- Salen, M. M. F., Fathi, F. A., and Awad, R. A. 2005. Production of probiotic ice-cream. *Polish. J. Food Sci. Nutr.* 3: 267–271.
- Salminen, S. and Wright, A. A. 1993. Lactic Acid Bacteria. (Fennema, O. R., Karel, M., Sanderson, G. W., Tannenbaum, S. R., Walstra, P. and Whitaker, J. R., Eds.). p. 442. Marcel Dekker Inc. NewYork.
- Sandova-Castilla, O., Laba to-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J. and Vernon-Carter, E. J. 2010. Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped. *Food Res. Int.* 43: 111-117.
- Schnürer, J. and Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopresevatives. *Trend Food Sci. Tech.* 16: 70-78.
- Sekhon, B. and Jairath, S. 2010. Prebiotics probiotic and synbiotic: an overview. *J. Pharm Educ. Res.* 1:2.

- Shah, N. P. and Ravula, R. R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Aust. J. Dairy Tech.* 55 : 139–144.
- Sheu, T. Y. and Masshall, R. T. 1993. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gel. *J. Food Sci.* 54: 557-561.
- Shirota, M. 1962. *Lactobacillus* in health and disease. Yakult Honsha CO., Ltd. Japan.
- Siaterlis, A., Deepika, G. and Charalampopoulos, D. 2009. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters Appli. Microbiol.* ISSN 0266-8254 . DOI : 10.1111/j.1472-765X.2008.02529.x.
- Sieladie, D. V., Zambou, N. F., Kaktcham, P. M., Crescl, A. and Fontef, F. 2011. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovat. Rom. Food Biotechnol.* 9:12-28.
- Şimşek, O., Çon, A. H. and Tulumoğlu, Ş. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control.* 17: 263-270.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T. and Bhandari, B. 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 162-168.
- 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.
- Sumathi, V. and reetha, D. 2012. Screening of lactic acid bacteria for their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Int. J. Pham. Biolo. Archives.* 3(4): 802-808.
- Taranto, M. P., Perez-Martinez, G. and. De Valdez, G.F. 1996. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res. Microbiol.* 157: 720-725.
- Tsen, J. H., Lin, Y. P. and King, V. A. 2004. Fermentation of banana media by using κ-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 215-200.
- Voo, W. P., Ravindra, P. Tey, B. T. and Chan, E. S. 2008. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. *J. Biosci. Bioeng.* 111: 294-299.

- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C. and Shyu, Y. T. 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the faces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *J. Anaerobe*. 16: 578-58
- Zuidam, N. J. and Shimoni, E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *In Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. (Zuidam, N. J. and Nedović, V. A., eds). DOI: 10.1007/978-1-4419-1008-0_2.
- Zago ,M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P. , Suàrez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. and Giraffa, G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*. 28: 1033-1040.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์

1 M Phosphate-buffered saline (PBS) pH 1, 2, 3.0, 7.2 และ 8.0 (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008)

1. Sodium chloride	9 กรัม
2. Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	9 กรัม
3. KH ₂ PO	1.5 กรัม

นำสารในข้อ 1, 2 และ 3 มาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ปรับพีเอชให้เป็น 1, 2, 3.0, 7.2 และ 8.0 ด้วยไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 MRS (de Man Rogosa and Sharp)

Dextrose	20 กรัม
Proteose peptone	10 กรัม
Beef extract	10 กรัม
Sodium acetate	5 กรัม
Yeast extracts	5 กรัม
Dipotassium phosphate	2 กรัม
Tween 80	1 กรัม
Ammonium citrate	2 กรัม
Magnesium sulfate	0.10 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม ละลายกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น 15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนิ่งมาเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 Brain Heart Infusion broth (BHI)

Calf brain, infusion from	200 กรัม
Beef heart, infusion from	250 กรัม
Proteose peptone	10 กรัม
Dextrose	2 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม

ซึ่งอาหารสำเร็จรูป 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ้าเป็น soft agar ใช้วุ้น 7.5 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3. Nutrient broth

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม

ซึ่งส่วนผสมตามสูตร ละลาย ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น 15 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.วิธีการวิเคราะห์

3.1 การนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม

นำแบคทีเรียแลคติกมาทำการเจือจางแบบ ten-fold dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยแบคทีเรียที่ผ่านกรดพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^2 ถึง 10^4 และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านกรด ให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^6 ถึง 10^8 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (นับโคโลนีที่เกิดวงใส) รายงานผลเป็น log CFU/ml

3.2 การนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการห่อหุ้ม

ซึ่งเม็ดเจล 1 กรัม เติม PBS pH 7.2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 10 นาที เพื่อให้เม็ดเจลแตก แล้วทำการเจือจางซัสเพนชันของเซลล์แบบ ten-fold dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 น้ำหนักต่อปริมาตร จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยวิธีการ pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (นับโคโลนีที่เกิดวงใส) รายงานผลเป็น Log CFU/ml

3.3 การวิเคราะห์ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN ตามวิธีของ AOAC (2000)

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

1. สารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulphate broth
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue (EMB) agar
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth

3.3.2 วิธีวิเคราะห์

(1) การเตรียมตัวอย่าง

(1.1) ชั่งตัวอย่างไอศกรีมมา 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลายเปปโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร

(1.2) เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน คูดตัวอย่างไอศกรีมที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้อาหารที่เจือจาง 1: 100 หรือ (10^{-2})

(2) การวิเคราะห์แบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *E. coli*

(2.1) คูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ระดับเจือจางต่างๆ ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Sulphate Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและหลอดดักก๊าซ จำนวน 3 ชุด ชุดละ 3 หลอด

ชุดที่ 1 ปิเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

ชุดที่ 2 ปิเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

ชุดที่ 3 ปิเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด

(2.2) บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง หากหลอดทดลองใดมีก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (Positive) ซึ่งคาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดทดลองเลยแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Negative) และไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดโคลิฟอร์มเจริญอยู่ในตัวอย่าง

(2.3) ใช้เข็มเข็มเชื้อ (Needle) เข็มเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) จากการทดสอบ แบคทีเรียที่คาดว่าจะ เป็น โคลิฟอร์มลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

(2.4) บ่มหลอดเลี้ยงเชื้อลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2.5) หลอดทดลองที่มีก๊าซเกิดขึ้นหรือให้ผลบวก (Positive) แสดงว่ามีแบคทีเรียที่คาดว่าจะ เป็น *Escherichia coli* ให้ทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *E. coli*

3.3.3 การวิเคราะห์เพื่อยืนยัน *Escherichia coli*

(1) เข็มเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลบวก (Positive) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar ในจานเพาะเชื้อ

(2) บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

(3) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *Escherichia coli* ซึ่งมีสีน้ำตาลอมดำตรงกลางมันเลื่อมอมเขียวสะท้อนแสง 5 โคโลนีต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยเขี่ยครั้งละ 1 โคโลนี ลงใน Tryptone broth แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 44.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(4) ถ่ายเชื้อจากโคโลนีต้องสงสัยนำไปทดสอบ IMVic test เพื่อยืนยันผลการทดสอบ ดังนี้

(4.1) Indole test โดยหยด Kovac'Reagent 5 หยด ลงใน tryptone broth เขย่าหลอดเบา ๆ 2-3 ครั้ง สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวโดยถ้าเป็น *E. coli* จะเกิดวงแหวนสีแดงที่ผิว (red ring)

(4.2) Methy red test โดยหยด Methy red test reagent 5 หยด ลงใน tryptone broth สังเกตการเปลี่ยนสีอาหาร โดยถ้าเป็น *E. coli* อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

(4.3) Voges-Proskauer test โดยนำเชื้อที่ต้องสงสัยลงใน MR/VP broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยด naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 6 หยดแล้วเขย่า แล้วหยด potassium hydroxide ความเข้มข้นร้อยละ 4 ลงไป 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10-15 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเป็น *E. coli* อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

(4.4) Citrate test นำเชื้อที่ต้องสงสัย streak บนผิวของ Simmon's Citrate agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ

อาหารและการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าเป็น *E. coli* จะมีแบคทีเรียขึ้น และอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

(5) รายงานผลการทดสอบที่ได้เป็นค่า MPN ของ *E. coli* ในตัวอย่างไอศกรีม 0.01 กรัม

3.4 การวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ AOAC (2000)

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- (1) สารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1
- (2) Trypticases soy broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (TSB-NaCl 10%)
- (3) Baird parker agar ที่เติม egg yolk tellurite ความเข้มข้นร้อยละ 5
- (4) BHI broth

3.4.2 วิธีวิเคราะห์

- (1) ชั่งตัวอย่างไอศกรีม 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลายเปปโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร
- (2) คูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1: 10 หรือ (10^{-1}) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- (3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วนำมาฉีดบนอาหาร Baird parker Medium ที่เติม egg yolk tellurite ความเข้มข้นร้อยละ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
- (4) สังเกตโคโลนีที่มีสีดำ กลมมนูน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 2 - 3 มิลลิเมตร มีวงแหวนขาวนูนล้อมรอบ ซึ่งมีวงแหวนใสๆ ล้อมรอบอีกชั้นหนึ่ง
- (5) ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะดังข้อ 4 ลงใน BHI broth ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
- (6) ทดสอบ Coagulase test โดยการปิเปต plasma จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร BHI broth ที่มีเชื้ออยู่เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบการแข็งตัวของ plasma หลังการบ่มเขื่อนาน 2, 4 และ 24 ชั่วโมง การรายงานผล ถ้าผลการทดสอบ coagulase เป็นบวก ให้รายงานว่าพบเชื้อ *S. aureus* ต่อตัวอย่างไอศกรีม 0.1 กรัม ถ้าไม่มีเชื้อที่มีลักษณะ

ดัชนี 4 หรือผลการทดสอบ coagulase test negative ให้รายงานว่าไม่พบเชื้อ *S. aureus* ต่อตัวอย่างไอศกรีม 0.1 กรัม

3.5 การวิเคราะห์หา *Salmonella* sp. โดยวิธีของ AOAC (2000)

3.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- (1) Lactose broth (LB) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5
- (2) Selenite cysteine broth (SCB)
- (3) Salmonella shigella agar (SSA)
- (4) Bismuth sulfite agar (BSA)
- (5) Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar
- (6) Triple sugar iron (TSI) agar
- (7) Lysine iron agar (LIA)

3.5.2 วิธีการ

(1) Pre-enrichment

- (1.1) ชั่งตัวอย่างไอศกรีมมา 25 กรัม เติม LB ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- (1.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) การตรวจนับ *Salmonella* sp.

(2.1) Selective enrichment

(2.1.1) ปิเปิดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากขั้นตอน Pre-enrichment ลงใน SCB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

(2.1.2) นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2.2) การเพาะเชื้อใน selective agar

(2.2.1) Streak เชื้อจากขั้นตอน selective enrichment medium มาเพาะลงบน SSA, BSA และ XLD agar

(2.2.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

(2.3) ตรวจลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นดังนี้

(2.3.1) อาหาร SSA: โคโลนีของ *Salmonella* sp. คือ ไม่มีสี หรือชมพูอ่อน บางโคโลนีมีสีดำตรงกลาง

(2.3.2) อาหาร BSA: โคโลนี *Salmonellae* sp. จะมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ บางครั้งอาจมีโคโลนีสะท้อนแสง อาหารรอบ ๆ โคโลนีมีสีน้ำตาล

(2.3.3) อาหาร XLD agar: โคลินี่ของ *Salmonella* sp. คือ จะมีสีชมพู บาง โคลินี่มีสีดำตรงกลาง

3.5.3 การจำแนกและการทดสอบทางชีวเคมี

(1) เลือกเฉพาะ โคลินี่ที่คาดว่า เป็น *Salmonellae* sp. จากอาหาร SSA, BSA และ XLD agar ถ่ายลงใน TSI และ LIA agar โดย streak ลงบนผิวหน้า (slant) และ stab จนถึงก้นหลอด

(2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

(3) ลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* sp. ดังนี้

(3.1) TSI agar: จะพบสีแดงที่ slant (สภาพเป็นด่าง) และพบสีเหลือง butt (เป็นกรด) อาจจะมีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วย โดยสังเกตสีดําของ butt ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Salmonellae*

(3.2) LIA: จะพบเชื้อเจริญได้ทั้งบริเวณผิวและตามรอยแทง อาจจะมีสีม่วงทั่วหลอด ถ้ามีไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเห็นเป็นสีดำ

3.6 การวิเคราะห์หา *Bacillus cereus* (BAM, 2002)

3.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

(1) Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar

(2) สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์

3.6.2 การเตรียมตัวอย่าง

(1) ชั่งตัวอย่าง ละเอียด 25 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 30 นาที

(2) ทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์

3.6.3 การตรวจนับ *Bacillus cereus*

(1) เตรียม MYP agar เทลงหลอด จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread บน MYP agar

(2) นำไปบ่มที่ 30 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตลักษณะรอบ ๆ โคลินี่จะขุ่น โดยโคลินี่มีสีชมพู บนที่กผล พร้อมกับนำมาทดสอบขั้นต่อไป

(3) เชี่ย โคลินี่ที่สงสัยจากข้อ 2 จำนวน 5 โคลินี่ต่อตัวอย่าง ลงใน Nutrient agar slant เลี้ยงเชื้อโดยเข้าสู่บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโดยการย้อมสีแกรมเพื่อคุณลักษณะ โดย *B. cereus* ต้องเป็นแกรมบวก รูปท่อนสั้นหรือยาวเรียงต่อกันเป็นโซ่

(4) เตรียมหลอดซึ่งบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วย vortex ทดสอบขั้นยืนยันโดยใช้ Nitrate broth, Phenol red glucose และ Modifide VP medium

3.7 การตรวจสอบเชื้อ *Listeria monocytogenes* (BAM, 2002)

3.7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(1) Demi Half Fraser Broth

(2) ALOA

3.7.1 วิธีการตรวจสอบ

(1) ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ใน 225 มิลลิลิตร Demi Half Fraser Broth ผสมตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher 30 วินาที บ่มเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นนาน 24 ชั่วโมง

(2) ปิเปิดตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร ที่บ่มแล้วในข้อ 1 มา Spread บนอาหาร ALOA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

(3) การอ่านผล *Listeria monocytogenes* จะเกิดโคโลนีสีน้ำตาลอมเขียว และเกิดวงสีขาวขุ่น (Plaque) ล้อมรอบโคโลนี (ALOA One Day^R Method)

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก และกรรมวิธีการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก
ที่เหมาะสม

Table 21 Adhesion ability of selected lactic acid bacterial strains to n-hexadecane

Isolate	Adhesion to n-hexadecane (%)
GM41	14.194±0.423
GM52	0.759±0.405
CM7	10.237±0.552
CM15	11.925±0.022
CM21	14.961±4.693
CM46	8.248±0.224
CM47	2.013±0.080
CM53	8.317±1.364

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

GM: Isolats obtained from goat milk; CM: Isolate obtained from cow milk.

Table 22 Effect of supporting material on encapsulation efficiency of *Lactobacillus plantarum*-CM53

Supporting material	Sucrose (%)	LogCFU/g		EE (%)
		Initial cell	After encapsulation	
1% alginate	0	10.80 ± 0.02	8.08 ± 0.01	74.89 ± 0.11 ^{bc}
	5	10.96 ± 0.16	8.69 ± 0.01	79.34 ± 1.14 ^b
	10	11.57 ± 0.18	9.05 ± 0.25	78.29 ± 3.02 ^b
2% alginate	0	11.33 ± 0.12	9.88 ± 0.02	87.22 ± 0.77 ^a
	5	11.78 ± 0.13	10.95 ± 0.63	92.94 ± 5.02 ^a
3% alginate	0	11.53 ± 0.03	10.75 ± 1.10	93.60 ± 5.72 ^a
5% low methoxy pectin	0	12.14 ± 0.40	10.95 ± 0.50	89.37 ± 3.58 ^a
	5	11.80 ± 0.04	10.95 ± 0.50	92.85 ± 3.92 ^a
	10	11.45 ± 0.13	10.28 ± 0.02	89.86 ± 1.17 ^a
2.5% low methoxy+ 2.5% high methoxy pectin	0	13.00 ± 0.55	11.84 ± 0.05	90.99 ± 3.87 ^a
	5	12.59 ± 0.20	10.99 ± 0.08	86.50 ± 4.09 ^a
	10	13.03 ± 0.56	11.51 ± 0.06	88.88 ± 1.37 ^a
3% carrageenan	10	11.37 ± 0.17	7.83 ± 0.04	68.88 ± 1.37 ^c
4% carrageenan	10	11.60 ± 0.09	7.96 ± 0.03	68.62 ± 0.66 ^c

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 23 Survival of encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 during exposure to ice- cream hardening at-20° for 48 h

Treatments		Log CFU/ml		Survival (%)
Supporting material	Sucrose (%)	Before Freeze	After Freeze	
2% alginate	0	8.30 ± 0.06	8.06 ± 0.04	97.18 ± 0.38 ^a
	5	8.05 ± 0.03	7.93 ± 0.01	98.49 ± 0.45 ^a
3% alginate	0	7.77 ± 0.11	7.61 ± 0.08	97.94 ± 1.47 ^a
	5	7.70 ± 0.06	7.48 ± 0.07	97.17 ± 0.29 ^a
5% low methoxy pectin	5	7.75 ± 0.10	7.57 ± 0.05	97.69 ± 1.79 ^a
	10	8.10 ± 0.09	7.94 ± 0.20	98.03 ± 3.17 ^a
	0	7.51 ± 0.01	4.08 ± 0.22	54.42 ± 2.88 ^b
2.5% low methoxy + 2.5% high methoxy pectin	5	7.60 ± 0.01	4.23 ± 0.22	55.66 ± 3.87 ^b
	10	8.60 ± 0.01	7.90 ± 0.18	97.94 ± 1.99 ^a
	0	7.51 ± 0.01	4.08 ± 0.22	54.42 ± 2.88 ^b

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 24 Releasing ability of *Lactobacillus plantarum* CM53 from 3% alginate and 5% low methoxy pectin beads in simulated small intestine condition (PBS pH 7.2 at 37°C) for 6 h

Supporting material	Release (%)					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
3% alginate	62.83±7.37 ^a	88.34±0.84 ^a	90.86±0.58 ^a	95.78±4.23 ^a	97.36±3.29 ^a	98.88±3.04 ^a
5% low methoxy pectin with 5% sucrose	51.02±1.24 ^b	71.56±0.59 ^b	99.07±0.63 ^b	99.52±0.70 ^a	98.16±1.98 ^a	98.16±1.98 ^a

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

Table 25 Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 cells added to ice cream mixed before freezing

Treatment	Storage time -20 ± 2 °C (week)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Free cell	8.68±0.14 ^a	7.37±0.04 ^c	7.43±0.08 ^c	7.57±0.25 ^c	7.37±0.09 ^c	6.66±0.26 ^b	6.76±0.10 ^b	6.74±0.10 ^b	6.16±0.03 ^c
Alginate beads	8.82±0.02 ^a	8.48±0.00 ^a	8.39±0.03 ^a	8.56±0.13 ^a	8.33±0.06 ^a	8.31±0.11 ^a	8.36±0.15 ^a	8.25±0.23 ^a	8.17±0.04 ^a
Pectin beads	8.68±0.12 ^a	8.53±0.04 ^b	8.09±0.22 ^b	8.12±0.01 ^b	8.05±0.11 ^b	8.14±0.43 ^a	8.03±0.26 ^a	7.73±0.47 ^a	7.74±0.16 ^b

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 26 Effect of frozen storage (-20°C) for 8 weeks on the total viable cell of free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* CM53 cells added to ice cream after freezing

Treatment	Storage time -20 ± 2 °C (week)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Free cell	8.81±0.20 ^a	8.14±0.04 ^b	8.15±0.04 ^b	7.86±0.24 ^b	7.40±0.43 ^b	7.22±0.05 ^c	7.19±0.06 ^c	7.10±0.21 ^c	6.63±0.07 ^c
Alginate beads	8.92±0.10 ^a	8.41±0.02 ^a	8.46±0.03 ^a	8.49±0.08 ^a	8.39±0.04 ^a	8.39±0.04 ^a	8.42±0.08 ^a	8.38±0.27 ^a	8.28±0.24 ^a
Pectin beads	8.84±0.05 ^a	8.15±0.02 ^b	8.16±0.02 ^b	8.17±0.31 ^b	7.93±0.12 ^a	7.93±0.12 ^b	7.93±0.26 ^b	7.74±0.19 ^b	7.72±0.15 ^b

Values are given as mean±SD from triplicate determination.

^{a-c} Different superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

ภาคผนวก ก

มาตรฐานไอศกรีม

มาตรฐานไอศกรีมตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข (พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ไอศกรีม, 2544) มีดังต่อไปนี้

1. ไอศกรีมนม ต้องมีมันเนยเป็นส่วนผสมไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนัก และมีธาตุน้ำนมไม่รวมมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 7.5 ของน้ำหนัก
2. ไอศกรีมคัดแปลง ต้องมีไขมันทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนัก
3. ไอศกรีมผสม ต้องมีมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1 หรือ 2 แล้วแต่กรณี ทั้งนี้โดยไม่นับรวมน้ำหนักของผลไม้หรือวัตถุที่เป็นอาหารอื่นผสมอยู่
4. ไอศกรีมหวานเย็นและไอศกรีมตามข้อ 1, 2 หรือ 3 ต้อง
 - 4.1 ไม่มีกลิ่นหืน
 - 4.2 ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลหรือใช้ร่วมกับน้ำตาล นอกจากการใช้น้ำตาลได้ โดยให้ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลได้ตามมาตรฐานอาหาร Joint FAO/WHO Codex
 - 4.3 ไม่มีวัตถุกันเสีย
 - 4.4 มีแบคทีเรียได้ไม่เกิน 100,000 ในอาหาร 1 กรัม
 - 4.5 ตรวจไม่พบแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในอาหาร 0.01 กรัม
 - 4.6 ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค, 2552) ดังนี้
 - 4.6.1 *Salmonella* spp. ไม่พบใน 25 กรัม
 - 4.6.2 *Staphylococcus aureus* ไม่พบใน 0.1 กรัม
 - 4.6.3 *Bacillus cereus* ไม่เกิน 100 ใน 1 กรัม
 - 4.6.4 *Listeria monocytogenes* ไม่พบใน 25 กรัม

ภาคผนวก ง

ใบรายงานการทดสอบการให้คะแนนความชอบ

ผลิตภัณฑ์ ไอศกรีมวนิลลาเสริมโพรไบโอติก

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่ทดสอบ.....เวลา.....

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้ทีละตัวอย่างแล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

- 9 = ชอบมากที่สุด 6 = ชอบน้อยที่สุด 3 = ไม่ชอบปานกลาง
 8 = ชอบมาก 5 = ไม่สามารถบอกได้ว่าชอบ หรือไม่ชอบ 2 = ไม่ชอบมาก
 7 = ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนความชอบ		
	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
ลักษณะปรากฏ			
สี			
เนื้อสัมผัส			
กลิ่นรส รสชาติ			
รสชาติ			
ความชอบโดยรวม			

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

.....

.....

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวฮาเสียะ	อะยามา
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5311020053	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2552

ทุนการศึกษา

ทุนวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ และทุนการศึกษาระดับปริญญาโทจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Ayama, H., Sumpavapol, P. and Chanthachum, S. 2013. Effect of encapsulation of selected probiotic lactic acid bacteria on survival in simulated gastrointestinal tract condition. In Proceeding of the 15th Food Innovation ASIA Conference, Thailand. 13-14 May 2013. P.38.

Ayama, H., Sumpavapol, P. and Chanthachum, S. 2014. Effect of encapsulation of selected probiotic lactic acid bacteria on survival in simulated gastrointestinal tract condition. Songklanakarin J. Sci. Technol. 36 (3): 291-299.