ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

นางสาว สุพิชชา วัฒนะประเสริฐ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMUM CONDITION FOR THE PRODUCTION OF PROBIOTIC BACTERIA POWDER USING SPRAY DRYING PROCESS.

Miss Supichar Wattanaprasert

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้วยกระบวนการท แห้งแบบพ่นฝอย
โดย	นางสาว สุพิชชา วัฒนะประเสริฐ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรารัตน์ ทัตติยกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

สุพิชชา วัฒนะประเสริฐ: ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้ว
กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (OPTIMUM CONDITION FOR THE PRODUCTIO
OF PROBIOTIC BACTERIA POWDER USING SPRAY DRYING PROCES
อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. สุทธิศัก
สุขในศิลป์, 61 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยน
แลกติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 12 สายพันธุ์ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโล
แห่งประเทศไทยมาคัดเลือกสมบัติโพรไบโอติก พบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือ
จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 *L. casei* TISTR 047 แล
L. casei TISTR 108 โดย *L. acidophilus* TISTR 450 สามารถผลิตกรดได้สูงสุด ทำให้เหมาะสมใ
การนำมาใช้เป็นหัวเชื้อนมเปรี้ยว ในการทำแห้งได้กำหนดอุณหภูมิลมเข้า 160°C อัตราการป้อ
วัตถุดิบ 34 mL/min อุณหภูมิลมออก 85±3°C และใช้เซลล์ *L. acidophilus* TISTR 450 (ความชื้
70%) 10% ของปริมาตรทั้งหมดร่วมกับสารปกป้องเซลล์ คือนมผงปราศจากไขมันความเข้มข้
10% 17.5% และ 25%(w/v) พบว่านมผงปราศจากไขมัน 10% ช่วยปกป้อง *L. acidophilus* TIST
450 รอดชีวิตสูงสุด คือ 90.73±0.67% เมื่อนำแซนแทนกัมมาใช้ร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน โด
แทนที่นมผงปราศจากไขมันในปริมาณ 0.25% 0.5% 0.75% 1.0% 1.5% และ 2.0% ของนมผ
ปราศจากไขมัน และควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v) พบว่าเมื่
ใช้แซนแทนกัมแทนที่ในปริมาณ 0.5% ของผงนมปราศจากไขมัน ทำให้ *L. acidophilus* TISTR 45
รอดชีวิตสูงที่สุดคือ 98.05±0.68% อายุการเก็บรักษาในถุงลามิเนต (PP/PE/Alu/PE/PP) ที่ปิ
ผนึกแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ พบว่าที่ 4°C จุลินทรี
รอดชีวิตสูงกว่า 30°C โดยมีจำนวน *L. acidophilus* TISTR 450 สุดท้ายเหลืออยู่ 83.39%±1.0
และ 70.74%±1.63 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.... ลายมือชื่อนิสิต.....สุพิชชา วัฒนะประเสริฐ.....
ปีการศึกษา.....2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772531523: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: SPRAY DRYING / PROBIOTIC BACTERIA

SUPICHAR WATTANAPRASERT: OPTIMUM CONDITION FOR THE PRODUCTION OF PROBIOTIC BACTERIA POWDER USING SPRAY DRYING PROCESS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR ASST.PROF. SUTTISAK SUKNAISILP,M.Sc. 61 pp.

The aim of this research was to produce probiotic bacteria powder by spray drying. Twelve probiotic bacteria from Thailand Institute of Science and Technological Research were screened for probiotic properties. *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450, *Lactobacillus casei* TISTR 047 and *Lactobacillus casei* TISTR 108, were found to have the probiotic properties. *L. acidophilus* TISTR 450 was selected for the best acid production among them. The spray drying condition was set at 160 °C inlet air temperature 34 mL/min flow rate and 85±3°C outlet air temperature. Feed in solution was the suspension of *L. acidophilus* TISTR 450 (70% Moisture) at 10% by volume with 10% 17.5% and 25% (w/v) milk non fat (MNF) as protectant. It was found that the solution of 10% MNF provided dried product with 90.73±0.67% cell survival rate. Xanthan gum was introduced to improve the survival of *L. acidophilus* TISTR 450. The MNF was substituted at the concentration of 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%, 1.5% and 2.0% while the total concentration of cell protectant was kept at 10% (w/v). The substitution of xanthan gum at 0.5% showed the highest survival at 98.05±0.68%. The dried cells were vacuum packed in laminated bag (PP/PE/Alu/PE/PP) and stored at 4°C and 30°C. After 15 weeks, it was found that the products which were stored at 4°C and 30°C contained 83.39%±1.01 and 70.74%±1.63 cell survival rate, respectively.

Field of study..... Biotechnology..... Student's signature.....SUPICHAR WATTANAPRASERT

Academic year.....2007..... Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรารัตน์ ทัตติยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาแนะนำและชี้แนะแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงวิทยานิพนธ์เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนด้านทุนวิจัย โดยเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย “การผลิตหัวเชื้อนมเปรี้ยวผง” ซึ่งสนับสนุนทุนวิจัยฝ่ายงบประมาณแผ่นดิน ปี 2548

ขอบคุณพี่ๆปริญญาโทภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและเพื่อนๆสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำงานตลอดการวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ต่างๆ เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบคุณ คุณพ่อคุณแม่ที่คอยสนับสนุนในทุกๆด้านและคอยให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ ขอบคุณคุณตาและญาติๆ ที่คอยส่งแรงใจให้เสมอ ขอบคุณพี่ชายที่เป็นแรงบันดาลใจในการเรียนรู้และเป็นกำลังใจให้จนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ฎ
1.บทนำ 1
2.วารสารปริทัศน์..... 3
2.1 ชนิดของนมเปรี้ยว..... 3
2.2 แลคติคแอซิดแบคทีเรียในนมเปรี้ยว..... 4
2.2.1 ลักษณะของ *L. acidophilus* 4
2.2.2 ลักษณะของ *L. casei*..... 5
2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)..... 5
2.3.1 หลักของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก..... 7
2.4 การทำแห้งจุลินทรีย์แบบพ่นฝอย (Spray drying)..... 7
2.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 8
2.5.1 อายุของจุลินทรีย์..... 8
2.5.2 จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้ง..... 8
2.5.3 ชนิดของสารปกป้องเซลล์..... 9
2.5.3.1 แซนแทนกัม (Xanthan gum) ที่ใช้เป็นสารร่วมในการปกป้องเซลล์..... 9
2.5.4 ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์..... 11
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ผงในระหว่างการเก็บรักษา..... 12
2.6.1 อุณหภูมิการเก็บรักษา..... 12
2.6.2 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้..... 12

บทที่ หน้า

3.วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 13

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 13

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 14

3.3 เก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง..... 15

3.4 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติกและสร้างกรดได้ปริมาณมาก..... 15

3.4.1 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี..... 15

3.4.2 ความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร..... 16

3.4.3 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*..... 16

3.4.3.1 แยกเซลล์แลคติคแอซิดแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 16

3.4.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ *E. coli* และ *S. aureus*..... 16

3.4.3.3 การทดสอบชนิดของสารยับยั้งการเจริญที่สร้างโดยแลคติคแอซิดแบคทีเรีย..... 17

3.4.4 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ปริมาณมาก..... 18

3.5 การคัดเลือกความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมในการปกป้องเซลล์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 18

3.5.1 ขั้นตอนการเตรียมจุลินทรีย์..... 18

3.5.2 การเตรียมสารละลายนมผงปราศจากไขมันใช้ผสมร่วมกับจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 19

3.5.2.1 ศึกษาความหนืดของการแปรความเข้มข้นนมผงปราศจากไขมัน..... 19

3.5.2.2 ศึกษาแรงตึงผิวของการแปรความเข้มข้นนมผงปราศจากไขมัน..... 19

3.5.2.3 ความเข้มข้นสารละลายนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมในการเป็นสารปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 19

3.6 อิทธิพลแซนแทนกัมร่วมกับนมผงปราศจากไขมันต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 20

3.7 ศึกษาอายุการเก็บรักษาแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 21

บทที่ หน้า

4.ผลการทดลองและวิจารณ์ผล..... 22
4.1 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติกและสร้างกรดได้ปริมาณมาก..... 22
4.1.1 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี..... 22
4.1.2 ความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร..... 24
4.1.3 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*..... 26
4.1.4 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ปริมาณมาก..... 28
4.2 ความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมต่อ *L. acidophilus* TISTR 450 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 29
4.3 อิทธิพลของความเข้มข้นแซนแทนกัมร่วมกับนมผงปราศจากไขมันต่อการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 33
4.4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาจุลินทรีย์หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย..... 38
5.สรุปผลการทดลอง..... 43
รายการอ้างอิง..... 44
ภาคผนวก..... 51
ภาคผนวก ก..... 52
ภาคผนวก ข..... 57
ภาคผนวก ค..... 59
ภาคผนวก ง..... 60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 การเจริญของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ในอาหาร MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3% บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 23

4.2 สมบัติการสร้างสารยับยั้งของแลคติคแอซิดแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ ต่อเชื้อทดสอบ *S. aureus* และ *E. coli*..... 27

4.3 ผลของนมผงปราศจากไขมันที่ความเข้มข้น 10% 17.5% และ 25% ต่อการรอดชีวิต ของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย ความหนืดของ Feed in solution และสมบัติทางกายภาพของอนุภาคผง..... 30

4.4 ผลของการแทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วยแซนแทนกัมในระดับต่างๆ ต่อความหนืด และแรงตึงผิวของ Feed in solution ขนาดอนุภาคผง และการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้ง..... 35

1-ง ผลของการแทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วยแซนแทนกัมในระดับต่างๆ ต่อปริมาณความชื้น ค่า a_w ขนาดอนุภาคผง และการรอดชีวิตของ*L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้ง..... 60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างแซนแทนกัม..... 10

3.1 การทดสอบชนิดของสารที่แลคติคแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้นและส่งผลยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*..... 17

4.1 การเจริญของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอช เป็น 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล และอาหารเหลว MRS พีเอช 6.6 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 25

4.2 ผลการสร้างกรดของ *Lactobacillus* sp.จำนวน 3 สายพันธุ์ในการหมักนมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C..... 28

4.3 SEM micrograph กำลังขยาย 200 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 ที่แปรความเข้มข้นนมผงปราศจากไขมัน นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) นมผงปราศจากไขมัน 17.5% (รูป b) และ นมผงปราศจากไขมัน 25% (รูป c)..... 31

4.4 SEM micrograph กำลังขยาย 1,000 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 ที่แปรความเข้มข้นนมผงปราศจากไขมัน นมผงปราศจากไขมัน 10 % (รูป a) นมผงปราศจากไขมัน 17.5 % (รูป b) และ นมผงปราศจากไขมัน 25 % (รูปc)..... 32

4.5 SEM micrograph กำลังขยาย 200 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) (ตัวควบคุม) แทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วย แซนแทนกัมในปริมาณ 0.25% (รูป b) 0.5% (รูป c) 0.75% (รูป d) 1.0% (รูป e) 1.5% (รูป f) และ 2.0% (รูป g) และควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้าย ของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v)..... 36

4.6 SEM micrograph กำลังขยาย 1,000 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus*TISTR 450 นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) (ตัวควบคุม) แทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วย แซนแทนกัมในปริมาณ 0.25% (รูป b) 0.5% (รูป c) 0.75% (รูป d) 1.0% (รูป e) 1.5% (รูป f) และ 2.0% (รูป g) และควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้าย ของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v)..... 37

4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตกับเวลาเก็บของเชื้อผง ที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ในถุง Laminated aluminium foil..... 40

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตกับเวลาเก็บของเชื้อผง ที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน เมื่อเก็บรักษาที่ 30°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ในถุง Laminated aluminium foil..... 40

4.9 ปริมาณความชื้นของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C 15 สัปดาห์ ในถุง Laminated aluminium foil..... 41

4.10 ปริมาณความชื้นของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน ร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน เมื่อเก็บรักษาที่ 30°C 15 สัปดาห์ ในถุงLaminated aluminium foil..... 41

4.11ค่า a_w ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอยโดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจาก-ไขมัน 10%และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจาก-ไขมัน เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C 15 สัปดาห์ ในถุง Laminated aluminium foil..... 42

4.12 ค่า a_w ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอยโดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจาก-ไขมัน 10%และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจาก-ไขมัน เมื่อเก็บรักษาที่ 30°C 15 สัปดาห์ ในถุง Laminated aluminium foil..... 42

1-ก ตัวอย่างรูปหยดของเหลวเมื่อผ่านหัวเข็มที่แสดงในจอภาพเครื่อง Goniometer……. 53

2-ก เครื่องมือวิเคราะห์ค่า Water activity (a_w analyzer)..... 55

3-ก เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer)..... 56

1-ข เครื่องหมักเชื้อ (Fermenter)..... 58

บทที่ 1

บทนำ

เนื่องจากในปัจจุบันมนุษย์หันมาใส่ใจในสุขภาพมากขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลาย เพราะนมเปรี้ยวมีประโยชน์ในการช่วยให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรด ทำให้สามารถย่อยและดูดซึมอาหารได้ดีขึ้น รวมทั้งจุลินทรีย์โพรไบโอติกในนมเปรี้ยวนั้นจะช่วยในการปรับสมดุลของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร และสร้างสารขึ้นมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระบบทางเดินอาหาร ทั้งยังช่วยให้ระบบขับถ่ายเป็นปกติ แต่การผลิตนมเปรี้ยวมักมีข้อจำกัดอยู่เฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการผลิตในระดับครัวเรือนมักประสบปัญหาด้านคุณภาพของหัวเชื้อนมเปรี้ยว เพราะหัวเชื้อที่ใช้ผลิตส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบหัวเชื้อสด ทำให้ยากต่อการควบคุมคุณภาพของหัวเชื้อ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบผง โดยใช้เทคโนโลยีการทำแห้งแบบพ่นฝอย เริ่มจากการคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติก เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตนมเปรี้ยวที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ พร้อมทั้งศึกษาชนิด องค์ประกอบ และความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อผงให้สูงขึ้น สามารถเก็บรักษาได้นาน สะดวกต่อการขนส่งและการนำไปใช้งาน ทั้งนี้เพื่อช่วยส่งเสริมการผลิตนมเปรี้ยวในระดับครัวเรือน และส่งเสริมการนำน้ำนมดิบมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้แพร่หลายมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกและสร้างกรดมาก
2. ศึกษาความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแลคติคแอซิด-แบคทีเรียผง
3. ศึกษาอิทธิพลของการใช้แซนแทนกัมร่วมกับนมผงปราศจากไขมันต่อการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียผง
4. ศึกษาอายุการเก็บรักษาแลคติคแอซิดแบคทีเรียผงหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยนี้ไปประยุกต์ใช้ เพื่อวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบผงทำให้สะดวกต่อการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมและครัวเรือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ชนิดของนมเปรี้ยว

ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว (Cultured milk) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเติมเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ หรือ รา ลงในน้ำนม ซึ่งอาจเป็นน้ำนมที่มีไขมันครบส่วนหรือหางนม จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้น้ำตาลในนมทำให้เกิดกระบวนการหมักและได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดมีรสเปรี้ยว (Bckles, 1973) ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว สามารถแบ่งตามชนิดของกระบวนการหมักได้เป็น 2 ประเภท ดังต่อไปนี้ (Lampert, 1974) คือ ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่เกิดจากกระบวนการหมักและให้กรดแลคติคเป็นส่วนใหญ่ (Acid Type) ได้แก่ Yogurt Acidophilus milk Bulgarian butter milk และผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่เกิดจากกระบวนการหมักให้กรดแลคติคและก๊าซ หรืออาจเกิดแอลกอฮอล์ในปริมาณต่ำ (Kefir type) ได้แก่ Kumiss Kefir เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักนมเปรี้ยวแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบความร้อนปานกลาง 10-40 $^{\circ}$C (Mesophilic microorganisms) พบใน Scandinavian milks Cultured buttermilk กลุ่มที่ 2 จุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง 35-55 $^{\circ}$C (Thermophilic microorganisms) พบในโยเกิร์ต และ Bulgarian buttermilk และกลุ่มที่ 3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทางการแพทย์ (Therapeutic microorganisms) พบใน Acidophilus milk Yakult® Kefir และ Kumiss เป็นต้น (Robinson and Tamine, 1990) การผลิตนมเปรี้ยวมีความนิยมสูงในประเทศยุโรปและสหรัฐอเมริกา โดยอาศัยจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) ที่ทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติก (Probiotic) สามารถพบจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ในทางเดินของลำไส้เล็กตอนล่างและลำไส้ใหญ่ Kanbe (1991) ได้รายงานว่า *L. acidophilus* สามารถยับยั้งเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคเกี่ยวกับลำไส้ รวมทั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ด้วย

นมเปรี้ยวเป็นอาหารที่ย่อยง่าย โดยแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อจะใช้น้ำตาลแลกโตสและสร้างกรดขึ้น ซึ่งส่งผลดีต่อผู้บริโภคเพราะนมเปรี้ยวจะทำให้ลำไส้มีภาวะเป็นกรดสูงขึ้น ทำให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเจริญได้ (ประกาย จิตรกร, 2526) ในปัจจุบันมีมาตรฐานเกี่ยวกับนมเปรี้ยว ซึ่งได้กำหนดเป็นกฎหมายที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับที่ 46 (พ.ศ. 2522) โดยกระทรวงสาธารณสุข กำหนดให้นมเปรี้ยวเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ กล่าวว่านมเปรี้ยว หมายถึง ผลิตภัณฑ์นมที่หมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรคหรือไม่ทำให้เกิดพิษ และมีจุลินทรีย์ดังกล่าวที่มีชีวิตคงเหลือจากกิจกรรมวิธีการหมัก หรืออาจมีการเติมวัตถุอื่นที่จำเป็นต่อการผลิต เช่น ปรุงแต่งสี กลิ่น รส โดยยังคงมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

- มีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.5 ของน้ำหนัก
- ตรวจไม่พบบักเตรีชนิด *E. coli* ในอาหาร 0.1 กรัม
- ไม่ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาล
- ไม่มีวัตถุกันเสีย
- ไม่มีจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค
- ไม่มีสารพิษจากจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

นมเปรี้ยวจะต้องเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิไม่เกิน 10°C และระยะเวลาที่จำหน่ายต้องไม่เกิน 7 วัน นับตั้งแต่วันที่บรรจุในภาชนะบรรจุ (เสถียร วิชัยลักษณ์ และ สืบวงศ์ วิชัยลักษณ์, 2523)

2.2 แลคติคแอซิดแบคทีเรียในนมเปรี้ยว

แลคติคแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์มีทั้งรูปร่างเป็นแท่ง ทรงกลม หรือรูปไข่ เคลื่อนที่ไม่ได้ มีความสามารถในการหมักน้ำตาลและได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติค แลคติคแอซิดแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 Homofermentative แลคติคแอซิดแบคทีเรียซึ่งสามารถหมักน้ำตาลได้ผลิตภัณฑ์กรดแลคติค 85%-95% และกลุ่มที่ 2 Heterofermentative สามารถหมักน้ำตาลให้ได้ผลิตภัณฑ์กรดแลคติคประมาณ 50% และได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทธานอล กรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ (Lawrence and Terence, 1979)

Hove, Andersen และ Mortensen (1994) กล่าวว่าในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว และโยเกริต์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตนอกจาก *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) *Streptococcus thermophilus* (*St. thermophilus*) แล้วยังมีเชื้ออื่นที่นิยมใช้ เช่น *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) และ *Lactobacillus casei* (*L. casei*)

2.2.1 ลักษณะของ *L. acidophilus*

L. acidophilus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งเดี่ยวๆ หรือเซลล์คู่เป็นสายสั้นๆ ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.6-0.9 μm ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ เคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถหมักน้ำตาล Fructose Glucose Lactose Maltose Mannose Sucrose (Nahaisi, 1986; Kunz, 1994) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 35-40°C แต่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง 45°C ทนกรดตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.3%–1.9% พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 5.5-6.0 (Gomes and Malcata, 1999) *L. acidophilus* ส่วนใหญ่สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารของมนุษย์ได้ แต่เมื่อผ่านเข้าสู่บริเวณ Duodenum บริเวณลำไส้เล็กตอนต้น *L. acidophilus*

บางสายพันธุ์อาจไม่ทนต่อเกลือน้ำดีทำให้มีจำนวนลดลง (Kilara, 1982) *L. acidophilus* ต้องการสารอาหารที่มีความจำเพาะต่อการเจริญ อาหารที่ใช้ ได้แก่ อาหารสูตรน้ำมะเขือเทศ ซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาล วิตามินบีรวม สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีเทียบเท่ากับสารอาหารจากนมผง-ปราศจากไขมัน โดยจะหมักน้ำตาลในนมทำให้เกิดเป็นกรด ทำให้พีเอชของอาหารลดลง (Babu *et al*., 1992)

ความสามารถของ *L. acidophilus* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคมีรายงานการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน เช่น Vakil และ Shahani (1965) ได้แยกแลคติคแอซิดแบคทีเรียจากนมเปรี้ยว acidophilus milk ที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคชนิด Acidophilin ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่นเดียวกับ Hamdan and Mikolajeik (1975) ก็พบว่า *L. acidophilus* สายพันธุ์ 2181 สามารถสร้างสาร Acidophilin ได้เช่นกัน Acidophilin จัดเป็นสารประเภทแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhymurium เป็นต้น (Vincent *et al*., 1955; Andenson, 1986; Dahiya and Speck, 1986; Gilliland and Speck, 1977b)

2.2.2 ลักษณะของ *L. casei*

L. casei มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดกว้างประมาณ 0.7 µm ยาวประมาณ 1.5-5.0 µm ย้อมติดสีแกรมบวกเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศปริมาณจำกัด สามารถหมักน้ำตาลได้หลายชนิด เช่น Fructose Glucose Lactose Maltose Mannose Sucrose (Shirota, 1962)

Shirota (1962) รายงานการมีชีวิตรอดของ *L. casei* สายพันธุ์ Shirota ที่สามารถทนความเป็นกรดในกระเพาะที่มีพีเอชต่ำช่วง 4.2-5.1 และทนต่อเกลือน้ำดีของตับอ่อนบริเวณลำไส้-เล็ก ซึ่งมีพีเอชสูงอยู่ในช่วง 6.2-8.0 ดังนั้นจึงสามารถผ่านกระเพาะไปเกาะที่บริเวณลำไส้ได้

2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)

โพรไบโอติกมาจากภาษากรีก แปลว่า เพื่อชีวิต (For life) โดยมี Metchnikoff (1907) เป็นผู้ให้คำจำกัดความคำว่าโพรไบโอติกคนแรก จากนั้นมีผู้ให้คำจำกัดความแตกต่างกันดังต่อไปนี้ คำจำกัดความคือ สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสร้างและขับออกมา ส่งผลช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งการทำงานของโพรไบโอติกให้ผลตรงข้ามกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) ที่ทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด (Lilly and Stillwell, 1965) จุลินทรีย์และสารที่ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Parker, 1974) จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมในอาหารและให้ประโยชน์แก่เจ้าบ้าน (Host) โดยช่วยเสริมจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ให้อยู่ในสภาพ

สมดุล (Fuller, 1989) แบคทีเรียที่ดีและถูกจัดเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus Enterocossus faecalis Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กหรือลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ ตั้งแต่แรกเกิด ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหาร ทำให้ได้สารอาหารที่มีประโยชน์ให้กับมนุษย์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติค พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมีสมบัติทนต่อภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ทนต่อน้ำดี และสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Gilliland and Speck, 1977a) โดยสารยับยั้งเชื้อก่อโรค มีดังต่อไปนี้

- กรดแลคติค (Lactic acid)

เมื่อเกิดการสะสมของกรดในอาหารซึ่งเกิดจากกระบวนการหมัก ทำให้อาหารมีค่าพีเอชลดลง ส่งผลยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่ทนกรด เช่น *E. coli Pseudomonas* sp. เป็นต้น กรดนี้มีกลไกการยับยั้ง คือ กรดแลคติคที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการสะสมของกรดในไซโตพลาสซึม ส่งผลให้กระบวนการเมแทบลิซึมของจุลินทรีย์ที่ยับยั้งเสียไป (Harrigan and Bark, 1991)

- กรดอะซิติก (Acetic acid)

แลคติคแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative จะสามารถผลิตกรดอะซิติกได้ ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีกว่ากรดแลคติค จึงนิยมใช้สำหรับการถนอมอาหาร (Harvey and Collins, 1963)

- ไดอะเซตทิล (Diacetyl)

Lactobacillus lactis สามารถสร้างสารไดอะเซตทิล (Lee,1996) โดยไดอะเซตทิลเข้มข้น 200 µg/mL สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 300 µg/mL สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ แต่ไม่นิยมใช้ไดอะเซตทิลในการถนอมอาหาร เพราะถ้าใช้ในปริมาณมากจะให้กลิ่นที่แรง จึงมีการนำไดอะเซตทิลมาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ (Disinfectant) ในการทำความสะอาดเครื่องมือ เนื่องจากระเหยง่าย (Seppo and Atte, 1993)

- แบคทีริโอซิน (Bacteriocin)

สารแบคทีริโอซินจัดอยู่ในกลุ่มสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial substance) เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วยโปรตีน หรือ โปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต สารแบคทีริโอซินสร้างจากแลคติคแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์ มีผลยับยั้งแบคทีเรียที่มีพันธุศาสตร์ใกล้เคียงกัน (Harvey and Collins, 1963) ต่อมา Hammes และ Tichazeak (1991) รายงานการใช้ประโยชน์จากสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย *S. aureus* มีการคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคทีริโอซิน มาเป็นหัวเชื้อในการหมักเพื่อผลิตสารถนอมอาหารชนิดไนซิน

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

การเจริญของแลคติคแอซิดแบคทีเรียในสภาพที่มีอากาศ จะพบการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระหว่างการเจริญแบบใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เนื่องจากแลคติคแอซิดแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์ Catalase ทำให้มีสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมอยู่ในอาหารของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ (Seppo and Atte, 1993)

2.3.1 **หลักของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก** (Gilliland, 1979; Fuller, 1989; Nousiainen and Setela, 1992) **ดังต่อไปนี้**

-ต้องไม่ก่อโรค และมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านสามารถอยู่รอดได้ในภาวะที่เป็นกรดสูงที่บริเวณกระเพาะอาหาร รวมถึงการทนต่อเกลือน้ำดีที่ตับอ่อน
-สามารถเพิ่มจำนวนและมีเมตาบอลิซึมในระบบทางเดินอาหารได้
-สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการเข้ายึดเกาะที่เยื่อบุทางเดินอาหารได้
-ผลิตกรดอินทรีย์และสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคได้
-มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเจ้าบ้าน ทำให้สร้างแอนติบอดีมากขึ้น
-เลี้ยงง่ายเพิ่มจำนวนได้เร็ว มีการรอดชีวิตสูงเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน

2.4 **การทำแห้งจุลินทรีย์แบบพ่นฝอย** (Spray drying)

การทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นวิธีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะมีราคาถูกและสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับสารประกอบอื่นๆ ได้หลายชนิด ทำให้สะดวกต่อการเพิ่มผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นผง (Dziezak, 1988)

วัตถุประสงค์การทำแห้งจุลินทรีย์ คือต้องการเก็บรักษาเชื้อให้คงสภาพดีโดยไม่เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเชื้อ ระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นวิธีการทำแห้งโดยฉีดพ่นของเหลวให้เป็นหยดละออง โดยใช้ลมร้อนเพื่อทำให้หยดอนุภาคแห้งและกลายเป็นผงในเวลารวดเร็ว จากรายงานของ Kim และ Bhowmik (1990) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* จะลดลงเมื่ออุณหภูมิลมออก (Outlet air temperature) เพิ่มสูงขึ้น โดยจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมากกว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าอุณหภูมิลมเข้า (Inlet air temperature) และค่า Atomizing air pressure นอกจากนี้ Gardiner *et al*. (2000) ได้ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยกับจุลินทรีย์ *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 ที่อุณหภูมิลมเข้า 170°C และแปรอุณหภูมิลมออกตั้งแต่ 70°C-120°C พบว่าที่อุณหภูมิ-

ลมออก 80°C-85°C ทำให้ *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 รอดชีวิตมากที่สุด โดยผลิตภัณฑ์ผงมีความชื้นเหมาะสม คือ 4.1% นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของค่าอุณหภูมิลมออก ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ และค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์ผง คือเมื่ออุณหภูมิลมออกสูงขึ้นการรอดชีวิตของเชื้อและความชื้นจะลดลง

2.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย

2.5.1 อายุของเชื้อจุลินทรีย์

Foster (1962) พบว่าเซลล์ของเชื้อที่เจริญอยู่ในช่วงต้น Stationary phase จะสามารถคงกิจกรรมไว้ได้สูงหลังการทำแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับ Heckly (1978) ที่รายงานว่าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่จะรอดชีวิตจากการทำแห้งสูงกว่าเชื้อที่มีอายุ 3-7 ชั่วโมง Espina และ Packard (1979) ได้ศึกษาการผลิตจุลินทรีย์แลคติคแอซิดแบคทีเรียด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าหัวเชื้อที่ใช้ในการทำแห้งต้องมีสภาพเป็นกลาง (Neutralization) และอายุที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งจะอยู่ในระยะ Stationary phase เชื้อผงที่ผลิตได้จะยังคงมีกิจกรรมต่างๆเหมือนเดิมและพบว่าเชื้อที่มีอายุในระยะนี้มีความทนทานต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ดีกว่าระยะอื่นๆ

Teixeira และคณะ (1995a) ได้ศึกษาการทำแห้งเชื้อ *L. bulgaricus* แบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมเข้า (Inlet air temperature) 200°C และ อุณหภูมิลมออก (Outlet air temperature) 80°C พบว่าเซลล์ระยะ Stationary phase มีความทนทานต่อกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ดีกว่าเซลล์ระยะ Exponential phase นอกจากนี้ยังพบว่าการทำ Heat shock กับเชื้อที่อยู่ในช่วง Exponential phase จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อให้สูงขึ้นกว่าเชื้อที่ไม่ถูก Heat shock แต่การทำ Heat shock กับเชื้อที่อยู่ในระยะ Stationary phase จะไม่มีผลต่อการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้น

2.5.2 จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนทำแห้ง

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนการทำแห้งนั้นมีผลต่อการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง โดย Kilara และคณะ (1976) ทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *L. bulgaricus* ก่อนการทำแห้ง มีจำนวนเชื้อ $6x10^5$ CFU/mL กับ $7x10^4$ CFU/mL เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งจะมีการรอดชีวิต 75% และ 10% ตามลำดับ ส่วน *L. acidophilus* มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1.6x10^5$ CFU/mL กับ $2.6x10^4$ CFU/mL เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งพบว่ามีการรอดชีวิต 63% และ 19% ตามลำดับ และ *St. thermophilus* ที่มีเชื้อเริ่มต้นเป็น $7.3x10^5$ CFU/mL กับ $2.5x10^4$ CFU/mL

เมื่อผ่านการทำแห้งมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 11% และ 1% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fu และ Etzel (1995) ที่รายงานว่าจำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนการทำแห้งมากทำให้มีเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณที่ต่ำ

2.5.3 ชนิดของสารปกป้องเซลล์

เนื่องจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยเชื้อจะต้องผ่านกระบวนการผลิตที่มีปัจจัยของอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้อง เชื้ออาจถูกทำลายโดยอุณหภูมิสูงได้ ดังนั้นควรคัดเลือกสารปกป้องเซลล์ที่ใช้ร่วมในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่เหมาะสม และสามารถคืนรูปได้ดีหลังการทำแห้ง (Brennan *et al*., 1983) Sinha และคณะ (1974) พบว่าการใช้นมผงปราศจากไขมันเป็นสารปกป้องเซลล์ในการทำแห้งแบบพ่นฝอยจะทำให้การรอดชีวิตของ *Streptococcus faecalis* และ *Streptococcus diacetylactis* สูงถึง 80%-100% ตามลำดับ

ส่วน Champagne และคณะ (1991) ใช้สารปกป้องเซลล์ประเภทโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) คือโพลีเอทธิลีนไกลคอล (Polyethyleneglycol-PEG) มาเติมในการปกป้องเซลล์ของ *St. thermophilus* โดยใช้ร่วมกับนมผงปราศจากไขมันพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ Streptococci ได้ 10%-20% และมีปริมาณความชื้นเหลือ 1.1%-1.7%

Gardiner และคณะ (2000) รายงานการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิลมเข้า 170°C และอุณหภูมิลมออก 85°C โดยใช้นมผงปราศจากไขมันเป็นสารปกป้องเซลล์ พบว่าจุลินทรีย์ *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 และจุลินทรีย์ *Lactobacillus salivarius* UCC 118 รอดชีวิต 97% และ 11% ตามลำดับ การที่นมผงปราศจากไขมันสามารถปกป้องเซลล์ได้ก็เนื่องจากนมผงปราศจากไขมันสามารถป้องกัน Cytoplasmic membrane ให้มีสภาพคงเดิมได้หลังผ่านการทำแห้ง เพราะเมื่อนำผลิตภัณฑ์ผงมาทดสอบความไวต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยวัดการเจริญพบว่าไม่แตกต่างจากเซลล์ก่อนการทำแห้ง

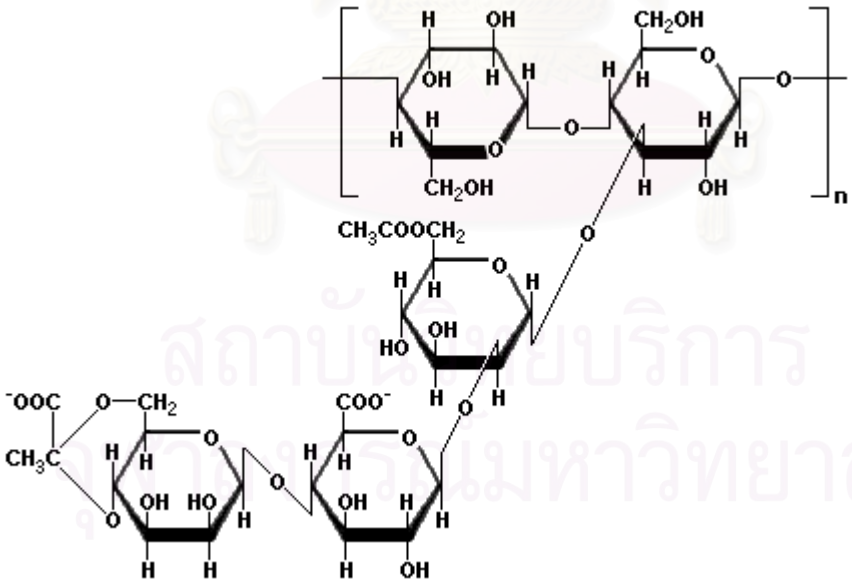
2.5.3.1 แซนแทนกัม (Xanthan gum) ที่ใช้เป็นสารร่วมในการปกป้องเซลล์

Rogovin และคณะ (1961) พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกัมชื่อทางเคมีว่าสารโพลีแซคคาไรด์ B-1459 โดยการหมักของ *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ต่อมารู้จักกันในชื่อแซนแทนกัม ซึ่งเป็นสารชนิดเฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharide)

สมบัติของแซนแทนกัมที่พิเศษต่างจากสารจำพวกคอลลอยด์ละลายน้ำชนิดอื่น คือสารละลายแซนแทนกัมสามารถรักษาความหนืดให้คงที่ได้ แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับพีเอช จึงมีการใช้แซนแทนกัมในอุตสาหกรรมอาหารสูงขึ้น (Rocks, 1971)

จนในปีค.ศ.1971 สำนักงานอาหารและยา (Food and Drug Adminiatration) ได้ออกประกาศอนุญาตให้ใช้แซนแทนกัมเติมในอาหารและยาได้ (Betz, 1979) ด้วยประโยชน์ของแซนแทนกัมดังกล่าว ปัจจุบันจึงได้มีการนำแซนแทนกัมมาใช้ในอาหารและยามากมาย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำสลัด น้ำซอส ผลิตภัณฑ์เนยและเนยแข็ง พุดดิ้ง เบียร์ เป็นต้น

แซนแทนกัมที่ผลิตจาก *Xanthomonas campestris* จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $2x10^6$-$5x10^7$ g/mol ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส และกรดกลูโคโรนิกในอัตราส่วน 2:2:1 และมีหมู่ไพรูวิคกับอะซิติกประมาณ 4% ซึ่งน้ำตาลกลูโคสทั้ง 2 หน่วย ทำหน้าที่เป็นแกนหลักของโครงสร้าง โดยต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 glycosidic ดังรูปที่ 2.1 ส่วนน้ำตาลแมนโนสและกรดกลูโคโรนิกทำหน้าที่เป็นกิ่งก้านของโครงสร้าง โดยน้ำตาลแมนโนสตัวแรกจะต่อเข้ากับน้ำตาลกลูโคสของแกนหลักด้วยพันธะแอลฟา-1,3 glycosidic และที่ตำแหน่ง C-6 ของแมนโนสจะมีหมู่อะซิติลเกาะอยู่ ส่วนกรดกลูโคโรนิกนั้นจะจับกับน้ำตาลแมนโนสตัวแรกด้วยพันธะเบต้า-1,2 glycosidic จากนั้นน้ำตาลแมนโนสตัวที่สองจะเข้าจับกับกรดกลูโคโรนิกนี้ด้วยพันธะเบต้า-1,4 glycosidic โดยที่ตำแหน่ง C-4 และ C-6 ของน้ำตาลแมนโนสนี้จะมีหมู่ไพรูวิลเกาะอยู่ โดยมีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ 0%-4.5% ตามภาวะและชนิดของเชื้อที่ใช้ในการผลิต (Jansson *et al*., 1975) โดยทั่วไปโมเลกุลของแซนแทนกัมมักมีหมู่ไพรูวิลเกาะอยู่ที่น้ำตาลแมนโนสตัวที่สองของกิ่งประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำตาลแมนโนสตัวที่สองที่มีในโมเลกุลทั้งหมด



รูปที่ 2.1 โครงสร้างแซนแทนกัม

ที่มา: Zamora (2005)

Brange (2000) พบว่าโปรตีนมีการเสียสภาพในระหว่างสัมผัสกับความร้อนเมื่อเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ดังนั้นการใช้สารที่ช่วยเพิ่มความเสถียรของโปรตีนจะทำให้โปรตีนสามารถทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ Bryant และ McClements (2000) ได้ทดสอบการผสมระหว่างแซนแทนกัม 0.1% ของโปรตีนเมื่อถูกบ่มด้วยความร้อน พบว่าแซนแทนกัมสามารถทำให้โปรตีนเสถียรมากขึ้น

Fakultat (2003) รายงานเปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเมื่อใช้สารตัวกลางในการปกป้องเซลล์ชนิดเดี่ยวๆ ได้แก่ สารประเภทกัม Gelatin หรือสารประเภทโปรตีน พบว่าให้จำนวนการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ผงหลังทำแห้งน้อยกว่าการใช้สารที่ผสมระหว่างกัมร่วมกับโปรตีน นอกจากนี้การใช้สารประกอบประเภทกัมร่วมกับโปรตีนยังให้ผลการรอดชีวิตของจุลินทรีย์สูงหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 4 ถึง 15 สัปดาห์

Elversson และคณะ (2003) กล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่ออนุภาคผงหลังทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ ขนาดและการกระจายของหยดอนุภาค ซึ่งบอกถึงพฤติกรรมการไหลของของเหลวเมื่อผ่าน Atomization สอดคล้องกับ Harrison และคณะ (1999) ที่ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการกระจายของหยดอนุภาคที่ไหลผ่าน Atomization เมื่อใช้สารละลายแซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.025% 0.1% และ 0.15% พบว่าที่ความเข้มข้น 0.025% มีการกระจายของหยดอนุภาคสูงที่สุด และให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่มีสมบัติ Newtonian บางชนิด

Benichou และคณะ (2007) รายงานถึงการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีน 4%-10% และแซนแทนกัม 0.5% สามารถเพิ่มความคงตัวของหยด ทั้งยังเพิ่มสมบัติทางด้าน Rheological surface properties และพฤติกรรมการกระจาย (Diffusion behavior) ของสารผสมซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้โปรตีนหรือแซนแทนกัมเพียงชนิดเดียว

2.5.4 ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์

Espina และ Packard (1979) ใช้นมผงปราศจากไขมันเป็นสารปกป้องเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 25% และ 40% ในภาวะอุณหภูมิลมเข้า 170°C และแปรอุณหภูมิลมออกเป็น 75°C 80°C และ 85°C พบว่าที่อุณหภูมิลมเข้า 170°C และอุณหภูมิลมออก 75°C ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ 25% ให้ผลการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* สูงกว่าที่ความเข้มข้น 40% เพราะการใช้ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่สูง ทำให้เกิดหยดของอนุภาคที่โต ทำให้เชื้อมีโอกาสถูกทำลายด้วยความร้อนได้มากกว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากอนุภาคขนาดใหญ่จะใช้ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับความร้อนนานกว่า

2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ผงในระหว่างการเก็บรักษา

2.6.1 อุณหภูมิการเก็บรักษา

อุณหภูมิการเก็บรักษาเป็นปัจจัยที่สำคัญต่ออายุการเก็บรักษาเชื้อผงให้มีชีวิตนานขึ้น Teixeira และคณะ (1995b) กล่าวถึงการเก็บรักษาจุลินทรีย์ *Lactobacilus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ที่อยู่ในรูปผงหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิต่ำจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจะสูงกว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิสูงที่ 30°C เนื่องจากที่ 30°C นี้เป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิ 37°C ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทำให้มีกิจกรรมเกิดขึ้นในเซลล์มากกว่าอุณหภูมิต่ำ

2.6.2 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้

ถุงลามิเนตมีส่วนประกอบของ PP/PE/Alu/PE/LL ซึ่งประกอบด้วยชั้น Polypropylene (PP) มีสมบัติเด่น คือ มีความใส และป้องกันความชื้นได้ดีแต่การป้องกันอากาศซึมผ่านของ PP ยังไม่ดีเท่าพลาสติกบางชนิด เนื่องจากช่วงอุณหภูมิในการหลอมละลายมีช่วงอุณหภูมิสั้นทำให้ PP เชื่อมติดได้ยาก (ปุ่น คงเจริญเกียรติ และ สมพร คงเจริญเกียรติ, 2528) ส่วนชั้น Low-density polyethylene (PE) เป็นโพลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ โดยโครงสร้างจะสามารถป้องกันความชื้นได้พอสมควร แต่ข้อเสีย คือ สามารถปล่อยให้ไขมันและอากาศซึมผ่านได้ง่าย ทำให้มีความไวต่ออากาศ คุณภาพการเก็บอาหารแปรเปลี่ยนเพียงเวลาไม่กี่วัน ส่วนชั้นของอะลูมิเนียม (Alu) มีน้ำหนักเบา ป้องกันการซึมผ่านของอากาศ ก๊าซ แสงและกลิ่นรสได้ดี ส่วนชั้นของ Linear low density polyethylene (LL) นิยมใช้เป็นชั้นป้องกันความชื้น (Anonymous, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) model CH30FF200 บริษัท OLYMPUS ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) model V-530 บริษัท JASCO ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องวัด pH (pH meter) model Cyberscan pH1000 บริษัท EUTECH ประเทศสิงคโปร์
- เครื่องหมักเชื้อ (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร บริษัท BIOSTAT- B ประเทศเยอรมนี
- เครื่องวัดความหนืด (Rheometer) model C-VOR บริษัท BOHLIN ประเทศอังกฤษ
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Goniometer) model FTA100 บริษัท First Ten Angstorm ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวิเคราะห์ภาพถ่าย (Image analizer) model Image 4.5 บริษัท MEDIA CYBERNATIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องเขย่า (Shaker) Model gyrotory บริษัท NEW BRUNSWICK ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) model DV- 2 บริษัท NIRO ประเทศเยอรมนี
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) model JSM-5410LV บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Model pb8001 บริษัท METLER ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Model A200S บริษัท SATORIUS ประเทศเยอรมนี
- เครื่องปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศ (Vacuum sealer) บริษัท Wabomatic model Easy Pack
- Microwave Model KOR-63D7 บริษัท DAEWOO ประเทศมาเลเซีย
- Stirrer บริษัท SELECTA model agimatic-N ประเทศเยอรมนี
- Vortex mixer model 37600 mixer บริษัท THERMOLYNE ประเทศเยอรมนี
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) model E350 ยี่ห้อ MEMMERT ประเทศเยอรมนี
- เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) model Royanta Centrifugen บริษัท HETTICH ประเทศเยอรมนี
- เครื่องวัดค่า a_w (a_w analyzer) model series3 บริษัท DECAGON DEVICE model series 3 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) model B30 บริษัท MEMMERT ประเทศเยอรมนี

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อควบคุมความดัน (Autoclave) model MLS-2400 บริษัท LABO ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) model E53 บริษัท WTC BINDER ประเทศเยอรมนี
- กระดาษ Whatman ขนาด 6 mm เกรด AA-DISCS บริษัท Maidstore ประเทศอังกฤษ

3.2 **สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

- น้ำมะพร้าวแก่จากร้านขายมะพร้าวตลาดสดซอยรามคำแหง 2 แขวงดอกไม้ เขตประเวศ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
- นมผงปราศจากไขมัน (Milk Non Fat: MNF) ตรามิซชัน ประเทศไทย
- บรรจุภัณฑ์ชนิด Laminated aluminium foil (PP/PE/Alu/PE/LL) บริษัทเจนจรัสซัพพลายด์ ประเทศไทย
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth Lab grade ยี่ห้อ HI MEDIA ประเทศอินเดีย
- โพแทสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต Lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรฟอสเฟต Lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- โซเดียมอะซิเตท Lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- แอมโมเนียมซิเตรท Lab grade ยี่ห้อ FLUKA ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- ยีสต์สกัด Lab grade ยี่ห้อ HI MEDIA ประเทศอินเดีย
- เปปโตน Lab grade ยี่ห้อ MERCK ประเทศเยอรมนี
- โซเดียมคลอไรด์ Lab grade ยี่ห้อ UNIVAR ประเทศนิวซีแลนด์
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก Lab grade ยี่ห้อ FISHER CHEMICALS ประเทศอังกฤษ
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ Lab grade ยี่ห้อ MERCK ประเทศเยอรมนี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 เก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง

นำแลคติคแอซิดแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 12 สายพันธุ์ ดังต่อไปนี้

Lactobacillus acidophilus TISTR 450	*Lactobacillus casei* TISTR 390
Lactobacillus acidophilus TISTR 1034	*Lactobacillus casei* TISTR 453
Lactobacillus acidophilus TISTR 1338	*Lactobacillus casei* TISTR 1340
Lactobacillus casei TISTR 047	*Lactobacillus casei* TISTR 1341
Lactobacillus casei TISTR 108	*Lactobacillus casei* TISTR 1463
Lactobacillus casei TISTR 389	*Lactobacillus casei* TISTR 1500

ใช้เข็มเขี่ยจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์นำมา Streak บนอาหารวุ้นเอียง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดลอง Subculture จุลินทรีย์ทุก 2 สัปดาห์

3.4 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติกและสร้างกรดปริมาณมาก

3.4.1 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี

ทดสอบความสามารถทนเกลือน้ำดีของแลคติคแอซิดแบคทีเรียตามวิธีของ Du Toit และคณะ (1998) โดยนำแลคติคแอซิดแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ มา Streak ลงบนอาหารวุ้น MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3% และใช้อาหารวุ้น MRS ที่ไม่ได้เติมเกลือน้ำดีสำหรับเป็นตัวควบคุมบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนอาหาร โดยทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร MRS ที่เติมเกลือน้ำดี 0.3% นำไปทดสอบความสามารถในการทนกรดต่อไป

3.4.2 ความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร

ทดสอบแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ทนกรดในกระเพาะอาหารตามวิธีของ Du Toit และคณะ (1998) โดยเขี่ยแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ทนเกลือน้ำดีจากข้อ 3.4.1 ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งปรับพีเอชของอาหารด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ให้ได้พีเอชเท่ากับ 3 และใช้อาหาร MRS พีเอช 6.6 เป็นตัวควบคุม บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm ทดลอง 3 ซ้ำ เลือกจุลินทรีย์ที่เจริญ เพื่อใช้ในการคัดเลือกสมบัติการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบต่อไป

3.4.3 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

3.4.3.1 แยกเซลล์แลคติคแอซิดแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

เขี่ยแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.4.2 แต่ละสายพันธุ์ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 mL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง Centrifuge ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000xg ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ที่แลคติคแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้น เพื่อใช้ในการทดสอบข้อ 3.4.3.3

3.4.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ *E. coli* และ *S. aureus*

เลี้ยง *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเหลว (NB) ปริมาตร 50 mL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 0.1 mL ลงในอาหารวุ้น (NA) ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันแล้ว Pour plate นำกระดาษกรอง Filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 4 แผ่น เพื่อใช้ทดสอบต่อในข้อ 3.4.3.3

3.4.3.3 การทดสอบชนิดของสารยับยั้งการเจริญที่สร้างโดยแลคติคแอซิดแบคทีเรีย ทำการทดสอบตามวิธีของ Tagg, Dajani และ Wanamaker (1976) ดังรูปที่ 3.1

รูปที่ 3.1 การทดสอบชนิดของสารที่แลคติคแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้นและยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

โดยคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ไปใช้ในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.4 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ปริมาณมาก

แลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.4.3 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 mL เวลา 24 ชั่วโมง บ่มที่ 37°C ถ่ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ 2% (มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^9 CFU/g) ลงในนมสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบ Ultra High Temperature (UHT) ปริมาตร 100 mL ผสมกล้าเชื้อกับน้ำนมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C แล้วสุ่มตัวอย่างมาปริมาตร 3 mL ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ฟีนอฟทาลีน 1-2 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ ทำการไทเทรตตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล คำนวณเปอร์เซ็นต์กรดตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-5 คัดเลือกโพรไบโอติกที่สร้างกรดได้ปริมาณมาก 1 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5 การคัดเลือกความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมในการปกป้องเซลล์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

3.5.1 ขั้นตอนการเตรียมจุลินทรีย์

เขี่ยแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.4.4 ซึ่งเก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง MRS ลงในอาหารน้ำมะพร้าวปริมาตร 10 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่ได้จากงานวิจัยของ เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ (2524) แสดงไว้ในภาคผนวก ข-3) จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตแลคติคแอซิดแบคทีเรียปริมาณ 2% (w/v) ลงในสูตรอาหารน้ำมะพร้าวปริมาตร 100 mL บ่มที่ 37°C จนแลคติคแอซิดแบคทีเรียเจริญถึงระยะ Exponential phase จากนั้นนำแลคติคแอซิดแบคทีเรียมา 2% ถ่ายลงในสูตรอาหารน้ำมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 L หมักในถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 L ที่อุณหภูมิ 37°C ควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.25-6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มอล และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ควบคุมความเร็วใบพัดกวน 100 รอบต่อนาที จนแลคติคแอซิดแบคทีเรียเจริญถึงระยะ Stationary phase ทำการถ่ายเชื้อลงหลอด Centrifuge เพื่อนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 4°C ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 4,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 เพื่อนำ Cell paste ที่มี Total solids 10% ไปใช้ในการทดลองข้อ 3.5.2.3 และ 3.6 ต่อไป

3.5.2 การเตรียมสารละลายนมผงปราศจากไขมันใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

3.5.2.1 ศึกษาความหนืดของนมผงปราศจากไขมัน

เตรียมนมผงปราศจากไขมันความเข้มข้น 10% 17.5% และ 25% (w/v) นำมาวัดค่าความหนืดโดยเครื่อง Rheometer ใช้หัววัดชนิด Cone and plate เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm 1 องศา ควบคุมอุณหภูมิตัวอย่างให้เท่ากับ 25°C ตั้งค่า Shear rate เท่ากับ 944 s^{-1} และค่า Gap เท่ากับ 30 μm จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 2 mL ลงในที่รองรับภายในเครื่องวัดความหนืด เริ่มการวัดและบันทึกค่าโดยกำหนดเวลา 5 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

3.5.2.2 ศึกษาแรงตึงผิวของนมผงปราศจากไขมัน

เตรียมนมผงปราศจากไขมันความเข้มข้น 10% 17.5% และ 25% (w/v) นำมาวัดค่าแรงตึงผิวโดยเครื่อง Goniometer บรรจุตัวอย่างลงหลอด Syringe ขนาด 3 mL และใช้เข็มปลายตัดขนาด 22 Gauge จากนั้นควบคุมการหยดของตัวอย่างด้วย Pump โดยใช้โปรแกรม First ten angstrom ในการคำนวณค่าแรงตึงผิวขณะที่หยดตัวอย่างตกพอดี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

3.5.2.3 ความเข้มข้นสารละลายนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

เตรียมนมผงปราศจากไขมันความเข้มข้น 10% 17.5% และ 25% (w/v) แล้วเติม Cell paste ของแลคติคแอซิดแบคทีเรียจากข้อ 3.5.1 ที่มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{10}-10^{11}CFU/g ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic stirrer จากนั้นป้อนตัวอย่างเข้าเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยควบคุมภาวะอุณหภูมิลมเข้าที่ 160°C อัตราการป้อน 34 mL/min ตามวิธีของ Gardiner และคณะ (2000) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากได้ผลิตภัณฑ์ผงในแต่ละตัวอย่าง นำมาตรวจการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยนำผงเชื้อที่ได้ไปนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตบนอาหารวุ้น MRS นำอนุภาคผงไปวัดค่า Moisture content

(ภาคผนวก ก-1) Water activity (a_w) (ภาคผนวก ก-8) หาขนาดของอนุภาคผงด้วยโปรแกรม Image analizer (ภาคผนวก ก-6) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และศึกษาลักษณะของอนุภาคผงด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (ภาคผนวก ก-7) ตามลำดับ เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมไปใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยในขั้นตอนต่อไป

3.6 อิทธิพลแซนแทนกัมร่วมกับนมผงปราศจากไขมันต่อการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

เตรียมสารละลายเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ โดยใช้แซนแทนกัมทดแทนนมผงปราศจากไขมันในระดับ 0% 0.25% 0.5% 0.75% 1% 1.5% และ 2% และควบคุมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.5 จากนั้นเติม Cell paste ของจุลินทรีย์จากข้อ 3.5.1 ซึ่งมีเซลล์เริ่มต้นอยู่ประมาณ 10^{10}-10^{11} CFU/g ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic stirrer นำแต่ละตัวอย่างไปศึกษาค่าความหนืดและค่าแรงตึงผิวของสารละลายตามวิธีในข้อ 3.5.2.1 และ 3.5.2.2 พร้อมทั้งนับจำนวนแลคติคแอซิดแบคทีเรียเริ่มต้นโดยใช้วิธี Pour plate กับอาหารวุ้น MRS จากนั้นป้อนตัวอย่างเข้าเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยควบคุมภาวะอุณหภูมิลมเข้าที่ 160°C อัตราการป้อน 34 mL ต่อนาทีตามวิธีของ Gardiner และคณะ (2000) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากได้ผลิตภัณฑ์ผงในแต่ละตัวอย่าง นำมาตรวจการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยตามวิธีข้อ 3.5.2.3 นำอนุภาคผงไปวัดค่า Moisture content (ภาคผนวก ก-1) Water activity (a_w) (ภาคผนวก ก-8) หาขนาดของอนุภาคผงด้วยโปรแกรม Image analizer (ภาคผนวกก-6) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และศึกษาลักษณะของอนุภาคผงด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (ภาคผนวก ก-7) ตามลำดับ เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นแซนแทนกัมที่ผสมร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน ที่ทำให้แลคติคแอซิดแบคทีเรียรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงที่สุดเพื่อใช้ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงในขั้นตอนต่อไป

3.7 ศึกษาอายุการเก็บรักษาแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

นำผลิตภัณฑ์ผงที่มีส่วนประกอบของนมผงปราศจากไขมัน และแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5 มาศึกษาอายุการเก็บรักษา เพื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ผงที่มีส่วนผสมของแซนแทนกัมกับนมผงปราศจากไขมันที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6 โดยนำผลิตภัณฑ์ผงที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกแล้วจึงบรรจุในถุงลามิเนตซึ่งประกอบด้วยชั้น PP/PE/Alu/PE/LL ภาวะสุญญากาศเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ นับจำนวนแลคติคแอซิดแบคทีเรียแต่ละสัปดาห์ โดยการ pour plate ในอาหารวุ้น MRS บ่มที่ 37°C เวลา 48 ชั่วโมง นับเซลล์แสดงในรูปแบบ CFU/g และรายงานการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียหลังการทำแห้งเป็น log CFU/g และนำผลิตภัณฑ์ผงไปวัดค่าความชื้น (Moisture content) (ภาคผนวก ก-1) และ Water activity (a_w) (ภาคผนวก ก-8) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติกและสร้างกรดได้ปริมาณมาก

4.1.1 ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี

สมบัติการทนเกลือน้ำดีเป็นสมบัติหนึ่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องจากเกลือน้ำดีพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีหน้าที่ขับสิ่งตกค้างในร่างกาย เช่น ยาหรือแร่ธาตุบางชนิด ผลคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียจากสมบัติการทนเกลือน้ำดีที่ 0.3% ซึ่งเป็นภาวะที่ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในร่างกายมนุษย์ (Collins, Thornton and Sullivian, 1998) จากผลการทดลองแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ทนเกลือน้ำดี 0.3% มีจำนวน 7 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* TISTR 450 *L. acidophilus* TISTR 1338 *L. casei* TISTR 047 *L. casei* TISTR 108 *L. casei* TISTR 1340 *L. casei* TISTR 1341 และ *L. casei* TISTR 1500 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ทนเกลือน้ำดีได้ แสดงว่าสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมในลำไส้ได้ด้วย (Chou and Weimer 1999) จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brennan และคณะ (1983); Lankaputha และ Shah (1995); Llong และ Shah (2005) ซึ่งทดสอบความสามารถทนเกลือน้ำดีของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย พบว่า *L. acidophilus* และ *L. casei* ส่วนใหญ่จะสามารถทนเกลือน้ำดีได้ แต่ความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีนั้นมีมากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ โดย *L. acidophilus* (ADH) *L. casei* สายพันธุ์ E5 และ N19 และ *L. acidophilus* ATCC 33200 สามารถทนเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3% ได้ แต่ *L. casei* ASCC 1521 *L. casei* ASCC 279 และ *L. casei* ASCC 290 ไม่สามารถทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3%

จากผลการทดลองแลคติคแอซิดแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่ทนเกลือน้ำดีได้ไปทดสอบสมบัติอื่นๆของโพรไบโอติกต่อไป

ตารางที่ 4.1 การเจริญของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ในอาหาร MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3% บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดของจุลินทรีย์	**ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี** (n=3)
1. *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450	+
2. *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034	-
3. *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338	+
4. *Lactobacillus casei* TISTR 047	+
5. *Lactobacillus casei* TISTR 108	+
6. *Lactobacillus casei* TISTR 453	-
7. *Lactobacillus casei* TISTR 1340	+
8. *Lactobacillus casei* TISTR 1341	+
9. *Lactobacillus casei* TISTR 1463	-
10. *Lactobacillus casei* TISTR 1500	+
11. *Lactobacillus casei* TISTR 389	-
12. *Lactobacillus casei* TISTR 390	-

หมายเหตุ + = สามารถเจริญในอาหาร MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3%

\- = ไม่เจริญในอาหาร MRS ที่มีเกลือน้ำดี 0.3%

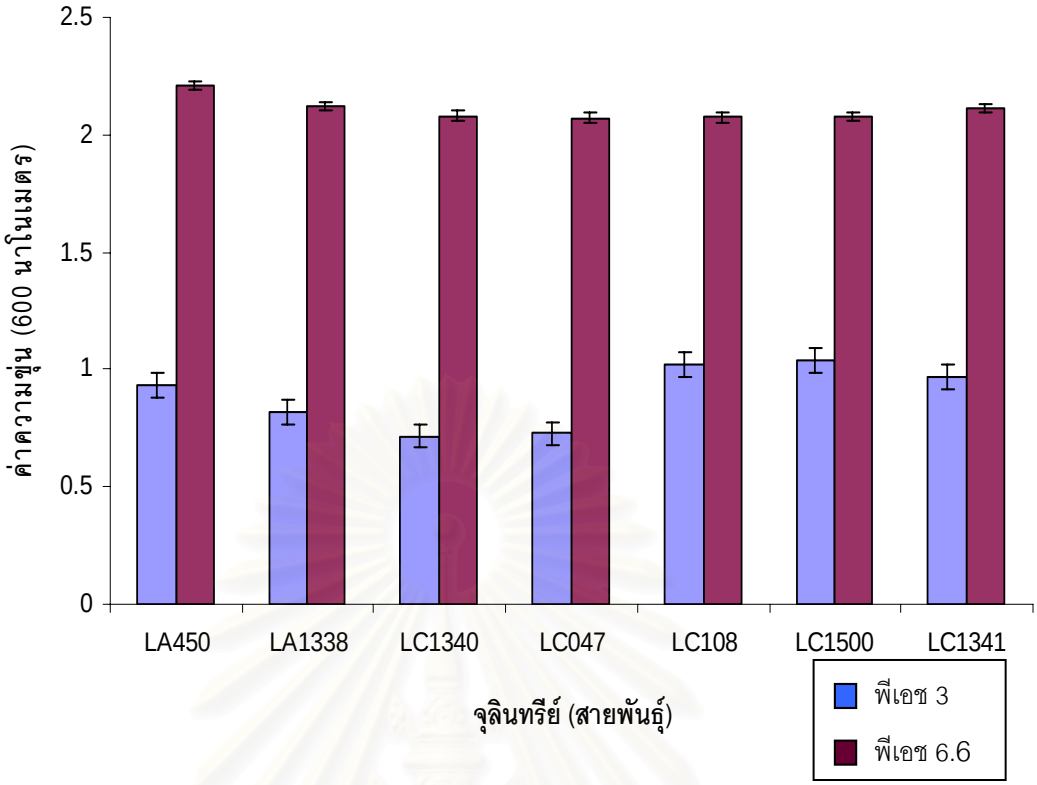
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 ความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหาร

จากผลทดลองพบการรอดชีวิตของแลคติคแอซิดแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 450 *L. acidophilus* TISTR 1338 *L. casei* TISTR 047 *L. casei* TISTR 108 *L. casei* TISTR 1340 *L. casei* TISTR 1341 และ *L. casei* TISTR 1500 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ปรับพีเอชให้เป็น 3 ซึ่งเป็นพีเอชที่พบในกระเพาะอาหารของมนุษย์ (Chou and Weimer, 1999) ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อระดับพีเอชในอาหารลดลงมีค่าเท่ากับ 3 แลคติคแอซิดแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ มีการเจริญโดยวัดจากค่าความขุ่นลดลง แต่ยังสามารถเจริญได้อยู่ ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Conway และคณะ (1987) ที่พบว่า *L. acidophilus* (ADH) และ *L. gasari* สามารถทนกรดได้ที่พีเอช 1.5 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วน Hood และ Zottola (1988) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* ในช่วงพีเอชระหว่าง 2 ถึง 4 พบว่าการเจริญลดลงที่พีเอช 2 แต่ที่พีเอช 4 เจริญได้ไม่แตกต่างจากการเจริญในภาวะปกติ และจากรายงานของ Llong และ Shah (2005) ได้ศึกษาการทนกรดของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย โดยปรับพีเอชของอาหาร MRS ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล จนอาหารมีพีเอชเท่ากับ 2 พบว่า *L. acidophilus* 1 สายพันธุ์ และ *L. casei* 7 สายพันธุ์ ทนกรดได้ทั้งหมดแต่ความสามารถในการทนกรดได้ไม่เท่ากัน โดยจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ATCC 4962 *L. casei* ASCC 290 และ *L. casei* ASCC 292 ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถทนกรดได้ดีหลังบ่มในอาหารที่ปรับพีเอชเท่ากับ 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีจำนวนการรอดชีวิตสูงกว่า *L. casei* ASCC 1520 *L. casei* ASCC 1521 *L. casei* ASCC 279 *L. casei* ASCC 15820 และ *L. casei* ASCC 2607 และพบว่า *L. acidophilus* สามารถทนกรดได้ดีกว่า *L. casei*

จากผลคัดเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 7 สายพันธุ์สามารถทนกรดที่พีเอช 3 ได้ เพื่อนำจุลินทรีย์นี้ไปใช้คัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 การเจริญของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล และอาหารเหลว MRS พีเอช 6.6 (ใช้เป็นตัวควบคุม) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

ผลการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนใสของอาหาร MRS ที่จุลินทรีย์เจริญทั้ง 7 สายพันธุ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* พบว่ามีจำนวน 3 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี คือ *L. acidophilus* TISTR 450 *L. casei* TISTR 047 และ *L. casei* TISTR 108 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยนำ Supernatant (CFF) ที่ผ่านการกรองมาทดสอบ ถ้าให้ผลยับยั้งอาจเกิดจากสารยับยั้งที่มีฤทธิ์เป็นกรดไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ หรือสารแบคทีริโอซินก็ได้ แต่ถ้าใช้ Supernatant ที่ผ่านการกรองแล้วปรับพีเอชให้เป็นกลาง (CFPH) ผลยับยั้งได้อาจเกิดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือสารแบคทีริโอซิน ถ้ายับยั้งไม่ได้ แสดงว่าการยับยั้งเกิดจากกรด และเมื่อนำส่วนของ Supernatant ที่ผ่านการกรองแล้วปรับพีเอชมาบ่มกับเอนไซม์ Catalase (CFB) ถ้ายับยั้งได้ แสดงว่าการยับยั้งเกิดจากสารแบคทีริโอซิน แต่ถ้ายับยั้งไม่ได้แสดงว่าการยับยั้งเกิดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยผลของสารยับยั้งมีดังต่อไปนี้

L. acidophilus TISTR 450 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *E. coli* และ *S. aureus* ได้โดยสร้างสารชนิดแบคทีริโอซิน ดังรายงานของ Klaenhammer และ Kleenman (1981) กล่าวว่าแบคทีริโอซินเป็นสารโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว โดยรายงานว่า *L. acidophilus* มักสร้างสารได้แก่ Acidophilin และ Lactocidin เป็นแบคทีริโอซินที่ยับยั้ง *S. aureus* แบคทีเรียแกรมบวกที่เป็น Enteropathogen ได้ (Wood and Hodge, 1985)

L. casei TISTR 108 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยความเป็นกรดของสารทดสอบ เนื่องจากเมื่อสะเทินความเป็นกรดแล้วพบว่า Supernatant ของจุลินทรีย์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้

L. casei TISTR 047 ยับยั้งเชื้อทดสอบ *E. coli* เป็นผลมาจากความเป็นกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเมื่อสะเทินแล้ว ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ส่วนการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* พบว่าเกิดจากสารไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ เนื่องจากเมื่อทดสอบในภาวะเป็นกรดส่วนใสสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ และเมื่อขจัดอิทธิพลของกรดออก จุลินทรีย์ยังสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เช่นเดิม ยืนยันผลโดยขจัดสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออก โดยนำส่วนใส่บ่มร่วมกับเอนไซม์ catalase พบว่าส่วนใสไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* ได้ แสดงว่าผลการยับยั้งเกิดจากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผลดัง-ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สมบัติการสร้างสารยับยั้งของแลคติคแอซิดแบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ต่อเชื้อทดสอบ *S. aureus* และ *E. coli*

สายพันธุ์แลคติคแอซิด-แบคทีเรีย	*S. aureus*				*E. coli*			
	CFF	CFPH	CFB	CFC	CFF	CFPH	CFB	CFC
1. *L. acidophilus* TISTR 450	+	+	+	-	++	+	+	-
2. *L. acidophilus* TISTR 1338	+	+	-	-	-	-	-	-
3. *L. casei* TISTR 1340	-	-	-	-	-	-	-	-
4. *L. casei* TISTR 108	+	-	-	-	+	-	-	-
5. *L. casei* TISTR 047	+	+	-	-	+	-	-	-
6. *L. casei* TISTR 1500	+	-	-	-	-	-	-	-
7. *L. casei* TISTR 1341	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ CFF หมายถึง Supernatant ที่ผ่านการกรอง

CFPH หมายถึง Supernatant ที่ผ่านการกรองและปรับพีเอชในช่วง 6.5-7.0

CFB หมายถึง Supernatant ที่ผ่านการกรองและปรับพีเอชในช่วง 6.5-7.0 และเติมเอนไซม์ catalase

CFC หมายถึง Supernatant ที่ผ่านการกรองและปรับพีเอชในช่วง 6.5-7.0 ให้ความร้อนที่ 100°C 10 นาที (ตัวควบคุม)

\+ = สร้าง Clear zone ขนาด 8-10 mm

++ = สร้าง Clear zone ขนาด 11-15 mm

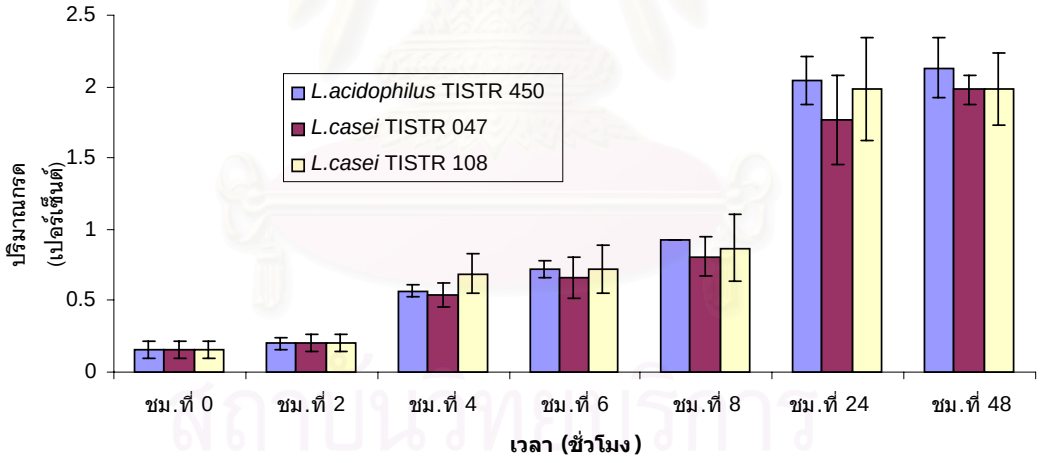
\- = ไม่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ

ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร คือ *S. aureus* และ *E. coli* มีจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดย *L. acidophilus* TISTR 450 ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด รองลงมาคือ *L. casei* TISTR 047 และ *L. casei* TISTR 108 ตามลำดับ

4.1.4 การคัดเลือกแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ปริมาณมาก

นำแลคติคแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบจากข้อ 4.1.3 เมื่อนำแต่ละสายพันธุ์มาหมักในน้ำนม พบว่าการสร้างกรด ช่วง 0-2 ชั่วโมงแรก แลคติคแอซิดแบคทีเรียใช้สารอาหารจากนมเพื่อการเจริญเติบโต ทำให้เห็นว่าช่วงแรกการสร้างกรดไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง จนกระทั่งเมื่อชั่วโมงที่ 8 แลคติคแอซิดแบคทีเรียเริ่มเปลี่ยนน้ำตาลในนมเป็นกรดแลคติคโดย *L. acidophilus* TISTR 450 สามารถหมักและสร้างกรดได้เร็วที่สุดในชั่วโมงที่ 8 มีปริมาณกรดเฉลี่ย 0.93% ในชั่วโมงที่ 24 กรดที่แลคติคแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้นสูงกว่า 1% ในชั่วโมงที่ 48 *L. acidophilus* TISTR 450 *L. casei* TISTR 108 และ *L. casei* TISTR 047 สร้างกรดได้ 2.13% 1.98% และ 1.98% ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.2 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดยกรดเริ่มคงที่เมื่อหมักได้ 48 ชั่วโมง

จากผลการทดสอบ *L. acidophilus* TISTR 450 สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด และสามารถสร้างกรดได้ปริมาณมากจึงเลือก *L. acidophilus* TISTR 450 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.2 ผลการสร้างกรดของ *Lactobacillus* sp.จำนวน 3 สายพันธุ์ในการหมักนมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C

4.2 ความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่เหมาะสมต่อ *L. acidophilus* TISTR 450 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

เนื่องจากการรอดชีวิตของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ของ Total solids ที่ใช้ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย ตามรายงานของ Espina และ Packard (1979) ที่แสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* เมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน 25% (w/v) มีจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตสูงกว่าการใช้นมผงปราศจากไขมัน 40% และรายงานของ Lian, Hsiao และ Chou (2002) ที่ศึกษาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย 3 ชนิด (เจลาติน กัมอาราบิก และ สารละลายแป้ง) และแปรความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเป็น 2% 10% 20% และ 30% เพื่อปกป้อง *Bifidobacterium longum* B6 จากการทำแห้ง พบว่าความเข้มข้นของสาร (เจลาติน กัมอาราบิก และ สารละลายแป้ง) 10% ทำให้เชื้อรอดชีวิตสูงสุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาที่ความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันที่ 10% 17.5% และ 25% ที่ทำให้ *L. acidophilus* TISTR 450 รอดชีวิตสูงที่สุดหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

จากผลการทดลองพบว่านมผงปราศจากไขมัน 10% มีการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 สูงสุด ($P \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.3 การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 เมื่อทำแห้งร่วมกับนมผงปราศจากไขมันความเข้มข้นต่างๆเป็น 90.73%±0.67 88.36%±0.37 และ 81.69%±0.7 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาขนาดของอนุภาคผลิตภัณฑ์ผงที่ได้ พบว่าขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันในสารละลาย Feed in solution สูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3 ซึ่งขนาดของอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นอาจเป็นสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของความหนืดในสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้ขนาดของอนุภาคที่ออกจาก atomizer มีขนาดใหญ่การระเหยน้ำจึงต้องใช้เวลานานขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Elizondo และ Labuza (1974) ซึ่งรายงานว่า อนุภาคผงที่มีขนาดใหญ่จะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรในการระบายน้ำออกได้น้อยกว่าอนุภาคผงที่มีขนาดเล็ก จึงต้องใช้เวลาในการดึงน้ำออกจากหยดอนุภาคนานกว่า ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ลดลง เพราะจุลินทรีย์ใช้เวลาในการสัมผัสกับความร้อนระหว่างกระบวนการทำแห้งนานกว่า ทำให้มีโอกาสเกิดความเสียหายเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของนมผงปราศจากไขมันทำให้ผนังของอนุภาคที่หนาขึ้น (รูปที่ 4.4) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Boza และคณะ (2004) กล่าวว่าเมื่อความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผนังของอนุภาค (Shell) มีความหนาขึ้นทำให้การระบายความร้อนออกช้ากว่าอนุภาคที่มีผนังบางจุลินทรีย์จึงถูกทำลายจากความร้อนได้มากกว่า ดังนั้นการเลือกใช้ความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญต่อขนาดของผนังอนุภาคที่เหมาะสมเพื่อการปกป้องเซลล์จากความร้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lian, Hsiao and Chou, 2002) จึงเป็นสาเหตุให้นมผงปราศจาก-

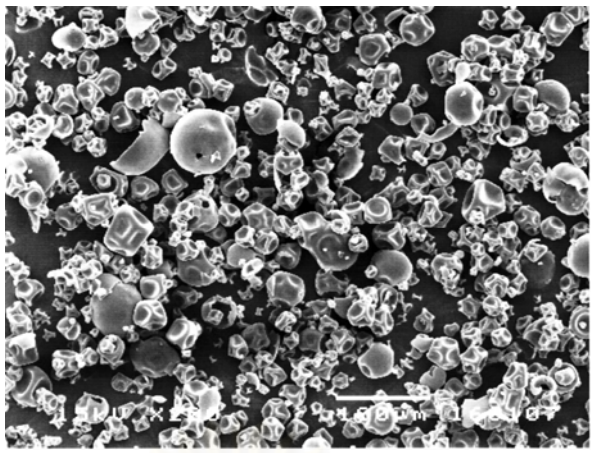
ไขมันที่ความเข้มข้น 10% มีจำนวนการรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังการทำแห้งสูงที่สุด ซึ่งเหมาะสมในการใช้เป็นเกณฑ์เพื่อพัฒนาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังการทำแห้งและศึกษาการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลของนมผงปราศจากไขมันที่ความเข้มข้น 10% 17.5% และ 25% ต่อการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย ความหนืดของ Feed in solution และสมบัติทางกายภาพของอนุภาคผง

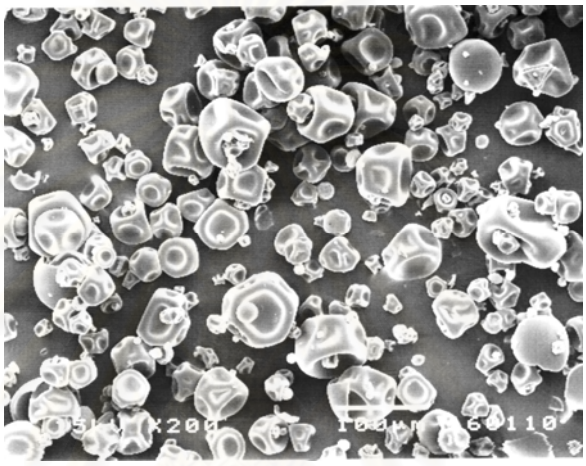
ความเข้มข้นของสารละลายนมผงปราศจากไขมัน (%)	**ค่าความหนืด (cP) ที่ Shear rate 944 s^{-1}**	**เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคผง (μm)**	**ความชื้น (%)**	Water activity^{ns} (a_w)	**การรอดชีวิต (%)**
10	3.50^{c}±0.05	12.32^{c}±0.07	3.07^{c}±0.06	0.21±0.01	90.73^{a}±0.67
17.5	4.76^{b}±0.04	16.17^{b}±0.13	3.2^{b}±0.02	0.22±0.02	88.36^{b}±0.37
25	6.1^{a}±0.02	20.17^{a}±0.11	3.36^{a}±0.05	0.24±0.02	81.69^{c}±0.7

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c ตัวอักษรกำกับที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

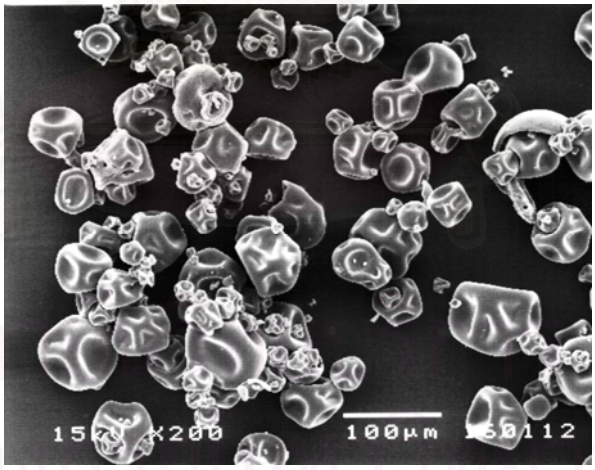
ตัวอักษร ns ในคอลัมน์เดียวกันหมายความว่าไม่แตกกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)



(a)

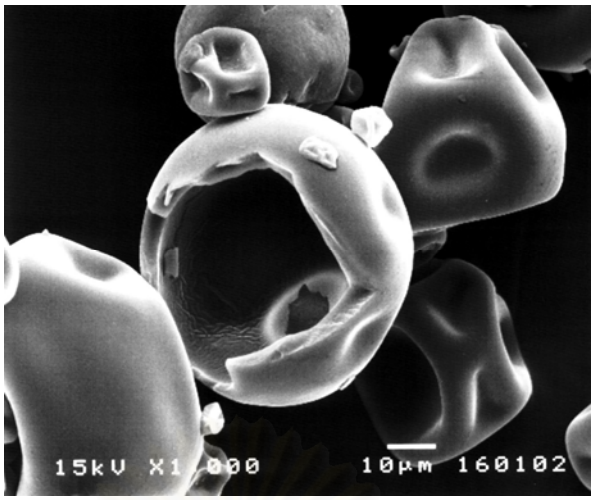


(b)

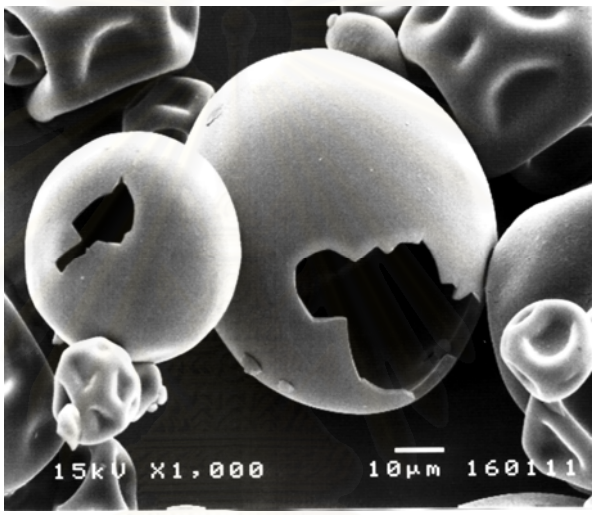


(c)

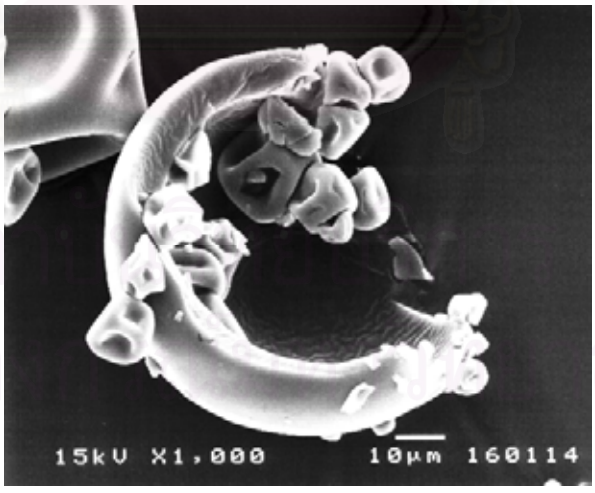
รูปที่ 4.3 SEM micrograph ที่กำลังขยาย 200 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 ที่แปรความเข้มข้นนมผงปราศจากไขมัน นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) นมผงปราศจากไขมัน 17.5% (รูป b) และ นมผงปราศจากไขมัน 25% (รูป c)



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 4.4 SEM micrograph ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 ที่แปรความเข้มข้นนมผงปราศจากไขมัน นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) นมผงปราศจากไขมัน 17.5% (รูป b) และ นมผงปราศจากไขมัน 25% (รูป c)

4.3 อิทธิพลของความเข้มข้นแซนแทนกัมร่วมกับนมผงปราศจากไขมันต่อการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

เนื่องจากนมผงปราศจากไขมันที่ใช้เป็นสารปกป้องเซลล์มีส่วนประกอบของโปรตีนเป็นหลัก ดังนั้นเมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย ความร้อนในระหว่างกระบวนการอาจส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้ประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ลดลง (Brange, 2000) จึงเลือกใช้สารประกอบแซนแทนกัม ซึ่งเป็นสารที่มีประจุสามารถจับกับประจุในโปรตีนทำให้เกิดร่างแหขึ้น อาจทำให้โปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีต่อการปกป้องเซลล์ ดังรายงานของ Fakultat (2003) ที่พบว่าการใช้สารประเภทกัมร่วมกับโปรตีนทำให้การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* หลังการทำแห้งดีกว่าการใช้สารประกอบโปรตีนเพียงชนิดเดียว

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v) ใน Feed in solution ทำให้การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 สูงที่สุด ($P \leq 0.05$) คือ 98.05%±0.68 ดังตารางที่ 4.4 และพบว่าขนาดของอนุภาคผงมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กที่สุด (รูปที่ 4.5 และ รูปที่ 4.6) คือ 8.18±1.02 μm สอดคล้องกับค่าความหนืดที่มีค่าน้อยที่สุด คือ 2.67±0.18 cP ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับค่าแรงตึงผิวของนมผงปราศจากไขมันเพียงชนิดเดียว ค่าความหนืดที่น้อยที่สุดนี้ทำให้เกิดหยดอนุภาคมีขนาดเล็กแขวนลอยอยู่ในอากาศ ซึ่งหยดที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรในการระเหยน้ำออกจากผิวหน้าของหยดสูง (Elizondo and Labuza, 1974) ทำให้ใช้ระยะเวลาในการทำแห้งน้อย ส่งผลให้การรอดชีวิตจุลินทรีย์สูง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแซนแทนกัมตั้งแต่ 0.75%-2% ของนมผงปราศจากไขมันที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v) พบว่าค่าความหนืดเพิ่มสูงขึ้นเป็นสาเหตุให้เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคผงมีขนาดใหญ่ขึ้น เพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสกับความร้อน ส่งผลให้การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้งลดลง

ผลการใช้แซนแทนกัมที่ความเข้มข้นต่ำ 0.25%-0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน ทำให้ค่าความหนืดของสารละลายลดลงเมื่อเทียบกับความหนืดของนมผงปราศจากไขมัน 10% เพราะแซนแทนกัมความเข้มข้นต่ำจะแสดงสมบัติการเป็น Pseudoplastic สูง แต่ถ้าความเข้มข้นของแซนแทนกัมเพิ่มเป็น 0.75%-2.0% เป็นผลทำให้ประจุลบของแซนแทนกัมเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งทั้งแซนแทนกัมและโปรตีนเคซีนในนมผงปราศจากไขมันมีประจุเป็นลบเหมือนกัน จึงเกิดการผลักกัน ประจุที่เหลือของแซนแทนกัมสามารถจับกับพันธะไฮโดรเจนของน้ำ ทำให้สมบัติด้านความหนืดของแซนแทนกัมเพิ่มสูงขึ้น (Hemar *et al*., 2001)

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าแรงตึงผิวของสารละลายแซนแทนกัมในปริมาณ 0.25%-0.75% ของนมผงปราศจากไขมันที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v)

มีค่าแรงตึงผิวที่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) และเมื่อพิจารณาผนังของอนุภาค ดังรูปที่ 4.6 พบว่าแซนแทนกัมในปริมาณ 0.25%-1% ของนมผงปราศจากไขมันที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v) มีการแตกของผนังอนุภาคน้อยกว่าผนังอนุภาคที่มีส่วนของนมผงปราศจากไขมันเพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้น สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังทำแห้งที่สูงขึ้น ทั้งนี้แซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ได้อนุภาคขนาดเล็กที่สุดทำให้การระเหยน้ำได้เร็ว โดยมีผนังเซลล์ที่ยังมีสภาพดีสามารถปกป้องเซลล์ *L. acidophilus* TISTR 450 ให้มีการรอดชีวิตสูงที่สุด จึงเหมาะสมสำหรับนำไปศึกษาอายุการเก็บรักษาของจุลินทรีย์หลังการทำแห้งต่อไป

ส่วนผลของปริมาณความชื้นและค่า a_w ของผลิตภัณฑ์ผงหลังทำแห้ง (ตารางที่ 1-ง ภาคผนวก) พบว่าเป็นผลจากอิทธิพลของสารปกป้องเซลล์ เนื่องจากมีการควบคุมให้อัตราการ-ป้อนของ Feed in solution ให้เท่ากันตลอดการทดลอง (อัตราการป้อนเป็น 34 mL/min) พบว่ามีปริมาณความชื้นที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.28-5.47% และค่า a_w ที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.21-0.33 โดยเมื่อใช้สารปกป้องเซลล์ คือ แซนแทนกัม 0.05% ของนมผงปราศจากไขมันมีค่าความชื้นน้อยกว่าการใช้นมผงปราศจากไขมัน 10% อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลคือ 2.28% และ 2.95% ตามลำดับ โดยอาจเกิดจากอิทธิพลของขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าเมื่อควบคุมให้ภาวะของการทำแห้งคงที่ อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าจึงสามารถระเหยน้ำออกจากอนุภาคได้สูงกว่าเป็นสาเหตุให้มีค่าความชื้นเหลืออยู่ในอนุภาคผงน้อยกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ทั้งนี้ผลของค่า a_w ของสารปกป้องเซลล์ทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ผลคือ 0.24 และ 0.21 ตามลำดับ แสดงว่าอนุภาคผงมีน้ำที่เป็นส่วนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้ไม่แตกต่างกันซึ่งอาจเป็นผลดีต่อการศึกษาอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ผงต่อไปได้

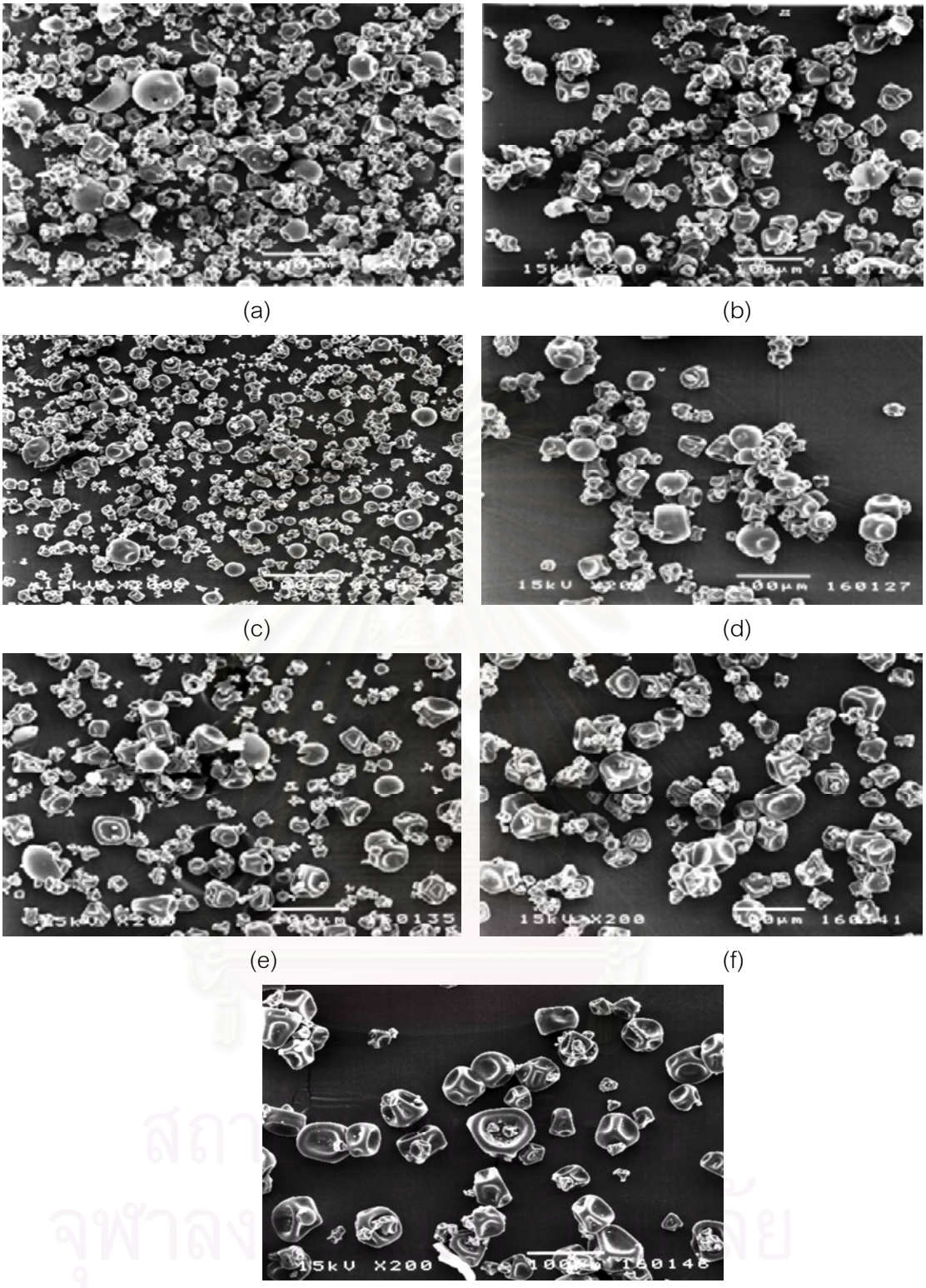
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ผลของการแทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วยแซนแทนกัมในระดับต่างๆ ต่อความหนืดและแรงตึงผิวของ Feed in solution ขนาดอนุภาคผง และการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้ง

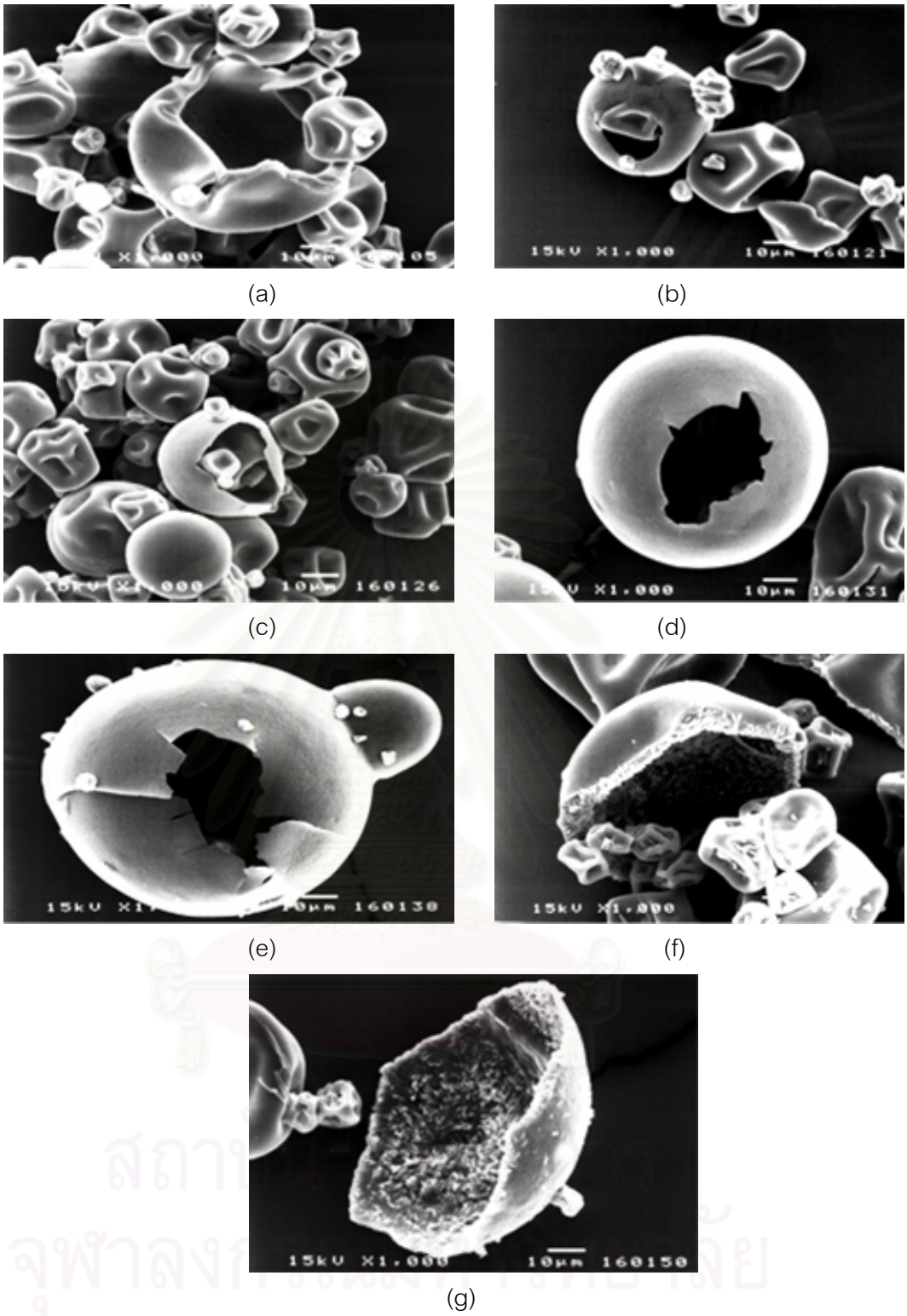
สารปกป้องเซลล์ที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (w/v)	**ค่าความหนืด cP ที่ Shear rate 944 s^{-1}**	**ค่าแรงตึงผิว dynes/cm**	**เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคผง (μm)**	**การรอดชีวิต (%)**
10% นมผงปราศจากไขมัน+ 0% แซนแทนกัม	3.09^{d}±0.01	51.78^{a}±1.25	12.86^{a}±1.44	90.65^{c}±0.37
แซนแทนกัมในปริมาณ 0.25% ของนมผงปราศจากไขมัน	2.84^{e}±0.26	51.21^{a}±0.47	8.94^{b}±0.47	95.38^{b}±0.3
แซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน	2.67^{e}±0.18	51.34^{a}±1.69	8.18^{b}±1.02	98.05^{a}±0.68
แซนแทนกัมในปริมาณ 0.75% ของนมผงปราศจากไขมัน	3.66^{c}±0.15	51.86^{a}±0.24	9.09^{b}±0.20	93.65^{b}±2.21
แซนแทนกัมในปริมาณ 1.0% ของนมผงปราศจากไขมัน	3.49^{c}±0.15	49.52^{b}±0.41	9.98^{b}±2.21	94.30^{b}±0.87
แซนแทนกัมในปริมาณ 1.5% ของนมผงปราศจากไขมัน	4.09^{b}±0.10	49.10^{b}±0.6	12.22^{a}±2.22	93.81^{b}±0.53
แซนแทนกัมในปริมาณ 2.0% ของนมผงปราศจากไขมัน	5.99^{a}±0.37	48.88^{b}±0.82	12.13^{a}±0.87	93.08^{b}±0.76

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c ตัวอักษรกำกับที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 SEM micrograph กำลังขยาย 200 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 เมื่อใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) (ตัวควบคุม) แทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.25% (รูป b) 0.5% (รูป c) 0.75% (รูป d) 1.0% (รูป e) 1.5% (รูป f) และ 2.0% (รูป g) และ ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v)



(a) (b)

(c) (d)

(e) (f)

(g)

รูปที่ 4.6 SEM micrograph กำลังขยาย 1,000 เท่า ของอนุภาคผง *L. acidophilus* TISTR 450 เมื่อใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% (รูป a) (ตัวควบคุม) แทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.25% (รูป b) 0.5% (รูป c) 0.75% (รูป d) 1.0% (รูป e) 1.5% (รูป f) และ 2.0% (รูป g) และ ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v)

4.4 ศึกษาอายุการเก็บรักษา *L. acidophilus* TISTR 450 ผงหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

นำ *L. acidophilus* TISTR 450 ผงที่ประกอบด้วยนมผงปราศจากไขมัน 10% ที่ได้จากการทดลองที่ 4.2 และผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจาก-ไขมันที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v) ที่ได้จากการทดลองที่ 4.3 มาศึกษาอายุการเก็บรักษาในถุงลามิเนตบรรจุแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ ความชื้นและค่า a_w

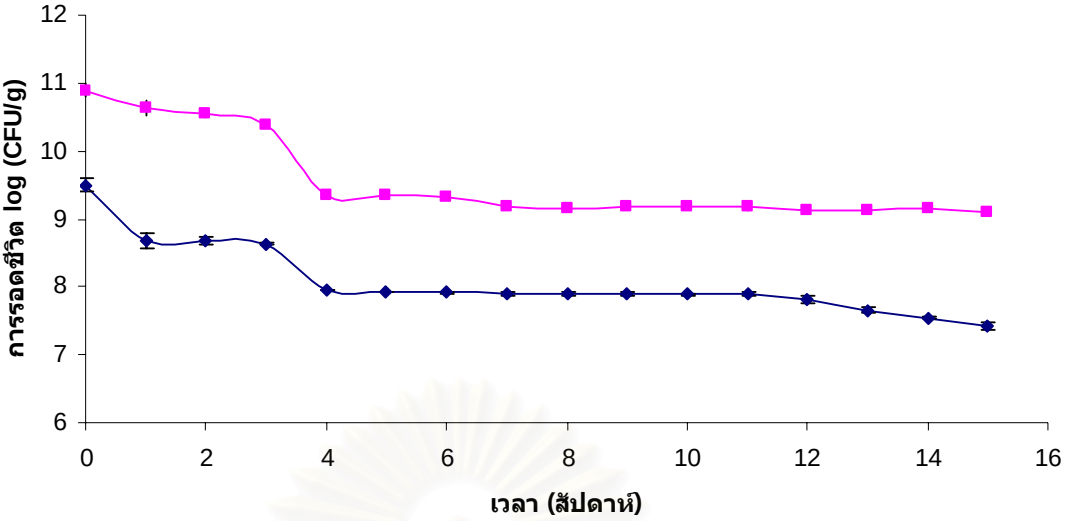
การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 ผง ที่ 4°C และ 30°C (Room temperature) แสดงดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงนานขึ้นการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 มีแนวโน้มลดลง โดยที่ผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยนมผง-ปราศจากไขมัน 10% มีเชื้อเริ่มต้น 9.49±0.39 log CFU/g เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C มีเชื้อเหลือ 7.43±0.07 log CFU/g และ ที่ 30°C มีเชื้อเหลือ 5.90±0.05 log CFU/g ผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน มีเชื้อเริ่มต้น 10.89±0.09 log CFU/g เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C มีเชื้อเหลือ 9.08±0.05 log CFU/g และที่ 30°C มีเชื้อเหลือ 7.70±0.20 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่รอดชีวิต พบว่าผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน มีจำนวน *L. acidophilus* TISTR 450 ลดลงน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยนมผงปราศจากไขมัน 10 % ทั้งในการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ 30 °C แต่การรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 ที่ได้ยังคงสูงกว่าระดับมาตรฐานอุตสาหกรรมยอมรับคือควรสูงกว่า 5 log CFU/g (WHO/FAO 2002) พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน เป็นเวลา 15 สัปดาห์ที่ 4°C ให้ผลการรอดชีวิตของจุลินทรีย์สูงที่สุด

ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์ผงเมื่อเก็บรักษาที่ 4°C และ 30°C แสดงดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงนานขึ้นความชื้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยที่ผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยนมผงปราศจากไขมัน 10% มีความชื้นเริ่มต้น 2.97% เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C มีความชื้นเพิ่มเป็น 3.6% และที่ 30°C มีความชื้นเพิ่มเป็น 3.43% และผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน มีความชื้นเริ่มต้น 2.16% เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C มีความชื้นเพิ่มเป็น 2.82% และที่ 30°C มีความชื้นเพิ่มเป็น 3.06% เมื่อเปรียบเทียบความชื้นที่สัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C และ 30°C ผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยนมผงปราศจากไขมัน 10% มีความชื้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน ค่า Water activity ของผลิตภัณฑ์ผงเมื่อเก็บรักษาที่ 4°C และ 30°C แสดงดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงนานขึ้นค่า a_w มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยที่ผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยนมผงปราศจากไขมัน 10% มีค่า a_w

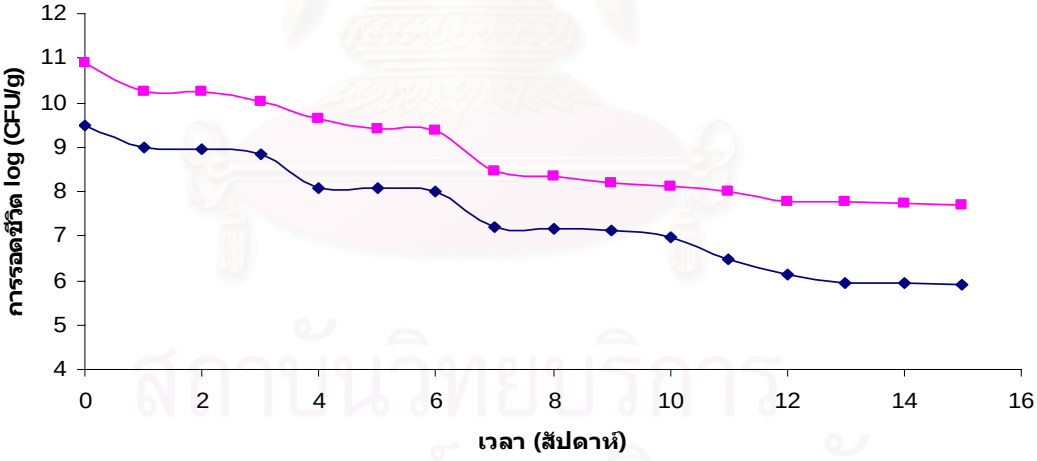
เริ่มต้น 0.21 เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C มีค่า a_w เพิ่มเป็น 0.39 และที่ 30°C มีค่า a_w เพิ่มเป็น 0.61 และผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันมีค่า a_w เริ่มต้น 0.23 เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C มีค่า a_w เพิ่มเป็น 0.37 และที่ 30°C เป็น 0.53 เมื่อเปรียบเทียบความชื้นที่สัปดาห์ที่ 15 ที่ 4°C และ 30°C ผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยนม-ผงปราศจากไขมัน 10% มีค่า a_w สูงกว่าผลิตภัณฑ์ผงที่ประกอบด้วยแซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปกป้องเซลล์เป็น 10% (w/v)

จากค่าความชื้นและค่า a_w เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์นานขึ้นทั้งที่ 4°C และ 30°C อาจเป็นสาเหตุจากขั้นตอนการบรรจุผลิตภัณฑ์ผง โดยในขั้นตอนการบรรจุผลิตภัณฑ์ผง การเพิ่มขึ้นของค่าความชื้นและค่า a_w อาจเกิดจากผลิตภัณฑ์ผงดูดความชื้นในอากาศที่อยู่ในถุงพลาสติกที่กระทำในภาวะปกติ ก่อนการบรรจุลงถุงลามิเนต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

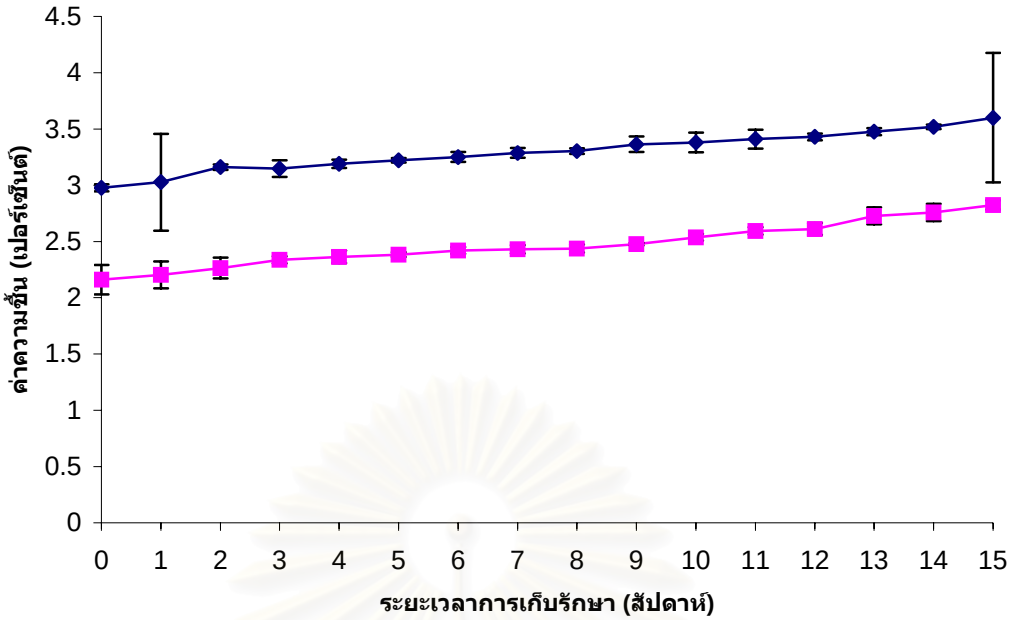


รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตกับเวลาเก็บของเชื้อผง ที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% (◆) และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน (■) เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ในถุง Laminated aluminium foil

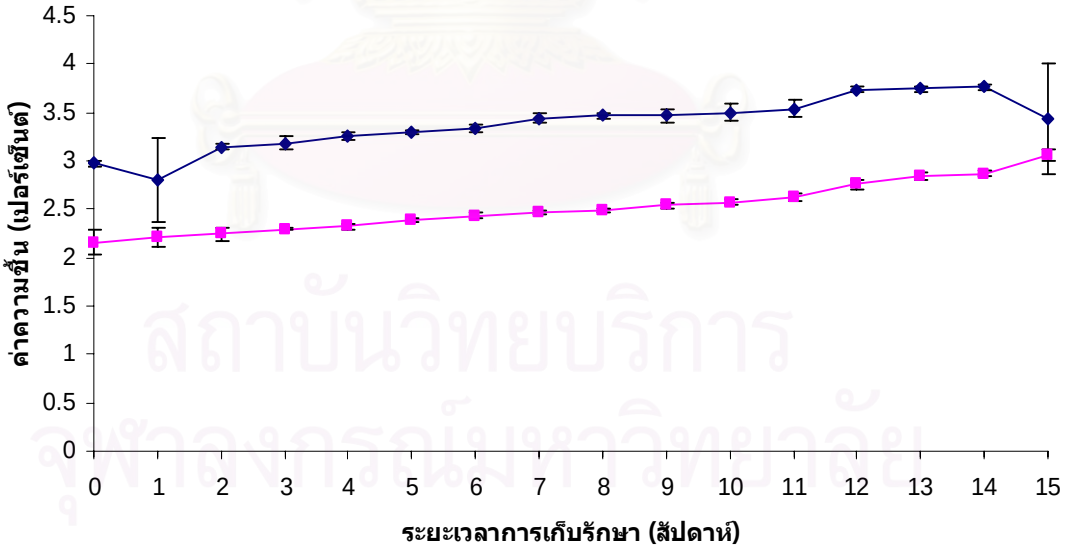


รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตกับเวลาเก็บของเชื้อผง ที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% (◆) และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน (■) เมื่อเก็บรักษาที่ 30°C เป็นเวลา 15 สัปดาห์ในถุง Laminated aluminium foil

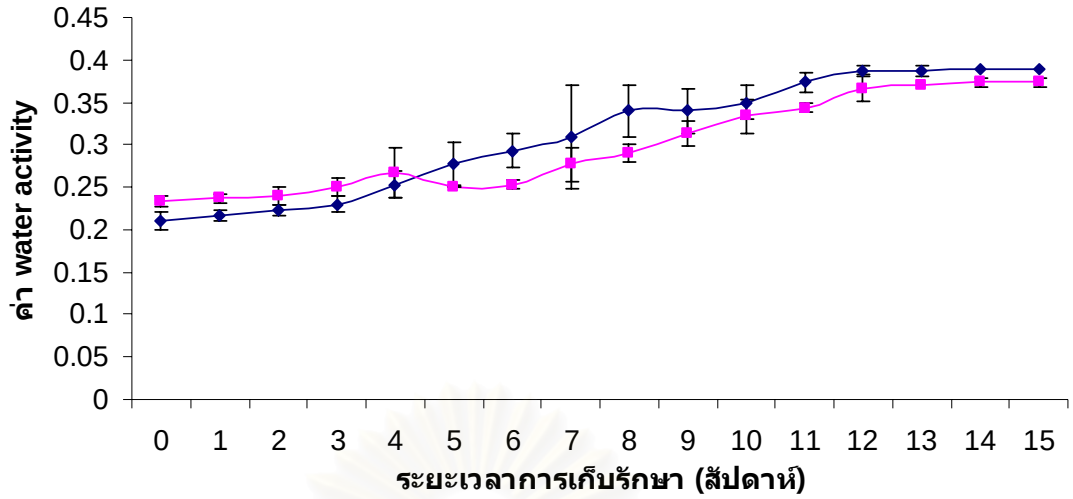
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



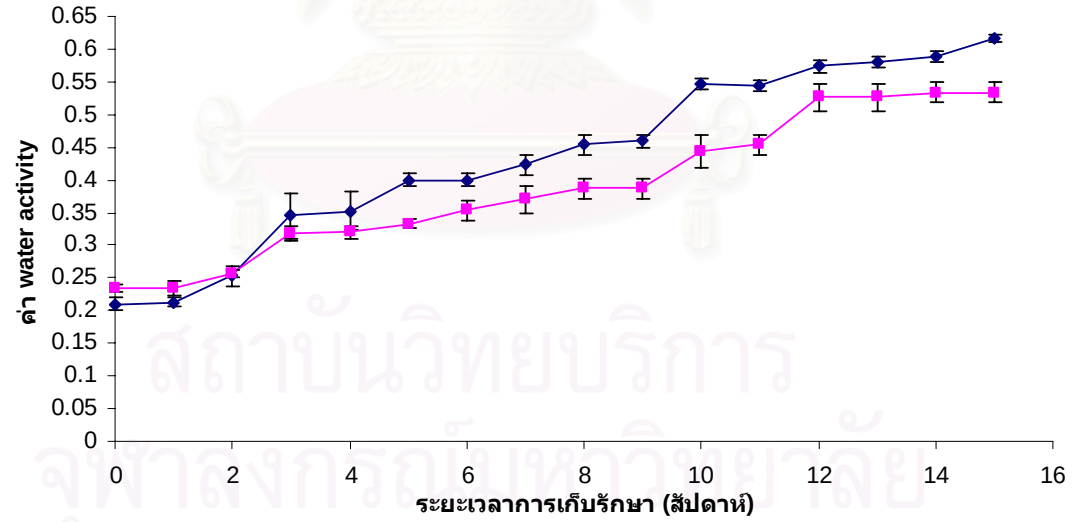
รูปที่ 4.9 ปริมาณความชื้นของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10%( ) และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน) เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C 15 สัปดาห์ ในถุง Laminated aluminium foil



รูปที่ 4.10 ปริมาณความชื้นของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอย โดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% ( ) และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน ( ) เมื่อเก็บรักษาที่ 30°C 15 สัปดาห์ ใน ถุง Laminated aluminium foil



รูปที่ 4.11 ค่า a_w ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอยโดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% (◆) และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน (■) เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C 15 สัปดาห์ ในถุง Laminated aluminium foil



รูปที่ 4.12 ค่า a_w ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นฝอยโดยใช้สารปกป้องเซลล์ คือ นมผงปราศจากไขมัน 10% (◆) และแซนแทนกัม 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน (■) เมื่อเก็บ รักษาที่ 30°C 15 สัปดาห์ ในถุง Laminated aluminium foil

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จุลินทรีย์ *L. acidophilus* TISTR 450 ที่ผ่านการคัดเลือกจากแลคติคแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 12 สายพันธุ์ พบว่าสามารถทนเกลือน้ำดี ทนกรดในกระเพาะอาหาร รวมถึงการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีและสร้างกรดปริมาณมาก ซึ่งเป็นสมบัติที่พบในจุลินทรีย์โพรไบโอติก ทำให้เหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อหมักนมเปรี้ยว จึงนำจุลินทรีย์นี้มาเก็บรักษาด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าเมื่อใช้นมผงปราศจากไขมัน 10% เพื่อทำหน้าที่ในการปกป้องเซลล์ ทำให้ผลการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังทำแห้งสูงที่สุด คือ 90.73±0.67% เมื่อเปรียบเทียบกับนมผงปราศจากไขมันความเข้มข้น 17.5% และ 25% จึงใช้ความเข้มข้นของ Total solids ที่ 10% (w/v) นี้เป็นเกณฑ์สำหรับพัฒนาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ ผลจากการใช้แซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมันที่ควบคุมความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (w/v) ใน Feed in solution พบว่าการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 สูงถึง 98.05±0.68% และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ผงที่ได้มาเก็บรักษา พบว่าจากเซลล์เริ่มต้น10.89 log CFU/g เมื่อเก็บถึงสัปดาห์ที่ 15 ที่อุณหภูมิ 4°C มีเซลล์เหลือ 9.08 log CFU/g ซึ่งสูงกว่าสัปดาห์ที่ 15 ที่อุณหภูมิ 30°C มีเซลล์เหลือ 7.70 log CFU/g โดยที่จำนวนการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 ในสัปดาห์ที่ 15 นี้ยังคงสูงกว่ามาตรฐานอุตสาหกรรม คือ ควรมีเซลล์สูงกว่า 5 log CFU/g เมื่อต้องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกร่วมกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (WHO/FAO, 2002) ทั้งนี้สามารถนำความรู้จากการใช้แซนแทนกัมปริมาณ 0.5% ร่วมกับนมผงปราศจากไขมัน 9.95% เป็นสารปกป้องเซลล์เพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2531. ผลของนมสดต่างชนิดและนมคืนรูปต่อคุณภาพ ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวเข้มข้น (ยแมร์). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประกาย จิตรกร. 2526. นมและผลิตภัณฑ์นม. กรุงเทพมหานคร: สมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย.

ปุ่น คงเจริญเกียรติ และ สมพร คงเจริญเกียรติ. 2528. Packaging Information Sources in Thailand 1985 กรุงเทพ: แพคเมทส์.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2524. การผลิตและการเก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสถียร วิชัยลักษณ์ และ สืบวงศ์ วิชัยลักษณ์ 2523. นิติเวช พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 27:231-250

ภาษาอังกฤษ

A.O.A.C. 1995. Offical Methods of Analysis. 16th ed. Vol.2. Washington, D. C.: Association of Official Analytical Chemist.

Anonymous, L. 1991. Packaging of food Products Indian Institute of Packaging, Bombay 15: 241-244.

Andenson, R. 1986. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum.* International Journal of Food Microbiology. 3: 149-160.

Babu, V., Mital, B. K., and Garg, S. K. 1992. Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*. International Journal of Food Microbiology. 17: 67-70.

Bckles, C. H., (1973). Milk and Milk Products. 4th ed. New York: Mcgraw-Hill Book.

Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., and Garti, N. 2007. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. Journal of Food Hydrocolloids. 21: 379–391.

Betz, D. A. 1979. Xanthan gum a biosynthetic polysaccharide for the food industry. Journal of Food Technology. 31(1): 11-16.

Boza, Y., Barbin, D., and Scamparini, A. R. P. 2004. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. Process Biochemistry. 39: 1275-1284.

Brennan, M., Wanismail, B., and Ray, B. 1983. Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. Journal of Food Protection. 46: 887-892.

Brange, J. 2000. Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. In Frokjaer, S. and Hovgard, L.(ed), Physical stability of proteins, pp. 35-39 Philadelphia: Taylor & Francis Group.

Bryant, C. M., and McClements, D. J. 2000. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. Journal of Food Hydrocolloids. 14: 383–390.

Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E., and Beaulieu, Y. 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria. Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology. 24: 118-128.

Chou, L. S., and Weimer, B. 1999. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strain of *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science.82: 23-31.

Collins, J. K., Thornton, G., and Sullivian, G. O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. Journal of Dairy. 8: 487-490.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science 70: 1-12.

Dahiya, R. S., and Speck, M. L. 1986. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Science. 51: 1568-1572.

Du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., and Holzapfel, W. H. 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary mini pig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. Journal of Food Microbiology. 40: 93-104.

Dziezak, J. D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. Journal of Food Technology. 42: 136-151.

Elizondo, H, and Labuza, T. P. V. 1974. Death kinetics of yeast in spray drying. Journal of Biotechnology and Bioengineer. 16: 1245-1259.

Elversson, J. 2005. Spray-dried powders for Inhalation. Doctoral dissertation. Faculty of pharmacy, University of Uppsala Sweden.

Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G., and Elofsson, U. 2003. Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. Journal of Pharmaceutical Sciences. 92: 900–910.

Espina, F., and Packard, V. S. 1979. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in spray drying process. Journal of Food Protection. 42: 149-152.

Fakultat, H. L. 2003. Influence of different capsule materials on the physiological properties of Microencapsulation *L. acidophilus*. Doctoral dissertation. Department of Food Technology, University of Bonn Germany.

Foster, E. M. 1962. Culture preservation, Symposium on lactic starter culture. Journal of Dairy Science. 45: 1290-1294.

Fu, W. Y., and Etzel, M. R. 1995. Spray drying of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* C2 and cellular injury. Journal of Food Science. 60: 195-200.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.

Gardiner, G. E., Sullivan, O. E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Ross, R. P., and Stanton, J. 2000. Comparative survival rates of Human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Applied and Environmental Microbiology. 66: 2605-2612.

Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human : candidate microorganism for use or dietary adjuct. Journal of Food Protection. 42: 164-167.

Gilliland, S. E., and Speck, M. L. 1977a. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. Journal of Food Protection. 40: 760-762.

Gilliland, S. E., and Speck, M. L. 1977b. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-born pathogens in association culture. Journal of Food Protection. 40: 823-829.

Gomes, A. M. P., and Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology. 10: 139-157.

Hamdan, I. Y., and Mikolajeik, E. M. 1975. Growth, viability and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* Journal of Dairy Science. 56: 638.

Hammes, O. W., and Tichazeak, K. P. 1991. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. Zeitschift Fur. Lebensmittel-Unters Uchung Und Froscheng. 198(3): 193-201.

Harrigan, E. W., and Bark, Y. W. 1991. Making safe food a management guide for microbiological quality. pp.35-42. San Diego: Academic Press.

Harrison, G., Franks, G. V., Tirtaatmadja, V., and Boger, D. V. 1999. Suspensions and polymers: Common links in rheology. Journal Korea-Australia of Rheology. 11: 197-218.

Harvey, O. R., and Collins, P. B. 1963. Roles of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetilactis* Journal of Bacteriology. 86: 1301-1307.

Heckly, R. J. 1978. Preservation of Microorganisms. Applied of Microbiology 24 : 1-53

Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A,. and Singh, H. 2001. Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. Journal Food Hydrocolloids. 15: 565-574.

Hove, H., Andersen, N. I., and Mortensen, B. P. 1994. Effect of lactic acid bacteria on the intestine production of lactate and short-chain fatty-acids and the absorption of lactose. American Journal of Clinical Nutrition. 59(1): 74-49.

Hood, S. K., and Zottola, E. A. 1988. Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. Journal of Food Science. 53: 15-24.

Jansson, P. E., Kenne, L., and Lindenberg, B. 1975. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research. 45: 275–282.

Kanbe, M. 1991. Use of intestinal lactic acid bacteria and health. In: Nakazawa, Y. and Hosono, A., (ed.), Function of Fermented Milk, pp.103-126 London: Elsevier United Kingdom.

Klaenhammer, T. R., and Kleenman, E. G. 1981 Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. Applied Environmental Microbiology. 41: 1461-1467.

Kilara, A. 1982. Use of Lactobacilli in foods -- Unique benefits. Journal of Industrial Microbiology 25:125-138.

Kilara, A., Shahani, K. M., and Das, N. K. 1976. Effect of cryoprotective agents on freeze drying and storage on lactic cultures Journal of Cultured Dairy Products. 11(3): 8-17

Kim, S. S., and Bhowmik, S. R. 1990. Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. Journal of Food Science. 55(4): 1008-1010, 1048.

Kunz, B. 1994. (ed.) Grundri. der Lebensmittelmikrobiologie (2. Aufl.). Hamburg: Behr`s Verlag.

Lampert, L. M., (1974). Milk and dairy products. 2nd ed. Westport: Chemical Pubblishing.

Lankaputha, W. E. V., and Shah, N. P. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. Journal Cultured Dairy Products. 30:2-7.

Lawrence, S., and Terence, F. 1979. D-Lactic acidosis due to abnormal gut flora. The New England Journal of Medicine. 306(22): 1344-1348

Lee, Y. K., and Salminen, S. 1996. The coming of age of probiotics. Journal of Food Science. 6: 241-245.

Llong, M. T., and Shah, N. P. 2005. Acid and Bile Tolerance and cholesterol Removal Ability of Lactobacilli strains Journal of Dairy Science. 88: 55-66.

Lian, W. C., Hsiao, H. C., and Chou, C. C. 2002 Survival of *bifidobacteria* after spray drying. Journal of food Microbiology. 74, 79-86.

Lilly, D. M., and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting facters produced by microorganism. Journal of Dairy Science. 147: 744-748.

Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life. In Fuller, R., (ed.), Probiotics the scientific basis, pp. 112-134 London: Chapman & Hall.

Nahaisi, M. H. 1986. *Lactobacillus acidophilus*: Therapeutic properties, products and enumeration. In Robinson, R. K., (ed.), Developments in Food Microbiology, pp.153-178 London: Elsevier Applied Science Publishers.

Nousiainen, R. J., and Setela, A. T. 1992. Lactic acid bacteria as animal probiotic. In Wood, B. J., (ed.), Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, pp. 300 London: Elevier applied science.

Parker, R. B. 1974. Probiotic, the other half of the antibiotic story. Journal of Nutrition, Health and Aging 29: 4-8.

Potschke, P., Pionteck, J., and Stutz, H. 2002. Surface tension, interfacial tension, and morphology in blends of thermoplastic polyurethanes and polyolefins Part I. Surface tension of melts of TPU model substances and polyolefins. Polymer 43: 69-72.

Robinson, R. K., and Tamine, A. Y. 1990. Microbiology of fermented milks. In Dairy Microbiology Robinson, R. K., 2nd ed. The Microbiology of Milk Products, pp. 73-82. London: Elsevier Applied Science Publication.

Rocks, J. K. 1971. Xanthan gum. Food Technology 25(5): 22-31.

Rogovin, S. P., Anderson, R. F., and Cadmus, M. C. 1961. Production of Polysaccharide with *Xanthamonas campestris*. Journal of Biochemistry 3 :51-63.

Seppo, S., and Atte, W., eds (1993). Lactic acid bacteria. New York: John Willey & Son Press.

Shirota, M., 1962. The alteration of the constitution of intestinal flora by oral administration of *L. acidophilus* strain shirota to healthy Infants. Study on Microflora of Human intestine 1: 274-283

Sinha, R. N., Dudani, A. T., and Ranganathan, B. 1974. A Researoh note: Protective effect of fortified skimmilk as suspending medium of freeze drying of difference lactic acid bacteria. Journal of Food Science. 39: 641-642.

Tagg, J. R., Dajanii, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol Review 40: 722-756.

Teixeria, P., Castro, H., and Kirby, R. 1995a. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgalicus*. Journal Applied Bacteriol. 78: 456-462.

Teixeria, P., Castro, H., and Kirby, R. 1995b. Survival of *Lactobacilus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* following spray-drying. Journal of Dairy Science. 78: 1025 -1031.

Vakil, J. R., and Shahani, K. M. 1965. Partial purification of antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus*. Bacteriology Processing. 9: 91-99.

Vincent, J. G., Veomett, R. C., and Riley, R. F. 1955. Relation of the indigenous flora of the small intestine of the rat to post-irradiation bacteremia. Journal of Bacteriology. 69: 38-44.

WHO/FAO Joint Working Group. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [Online]. Available from: http://www.moh.govt.nz/foodandnutrition [4 March 2550]

Wood, B. J. B., and Hodge, M. M. 1985. Yeast-lactic acid bacteria interactions and their contribution to fermented foodstuffs. Microbiology of Fermented Foods. 1: 263-293.

Zamora, A., 2005. Carbohydrates and Chemical Structure [Online]. Available from: http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates [2 October 2550]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์และทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ใช้วิธีวิเคราะห์ตาม (A.O.A.C., 1995)

1.1 อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก

1.2 ทำข้อ 1.1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

1.3 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-3 กรัม ใส่ในภาชนะที่หาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

1.4 นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105°C นาน 4-5 ชั่วโมง

1.5 นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นหลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก

1.6 อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาทีและกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

1.7 คำนวณปริมาณความชื้นดังสมการ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

หมายเหตุ

ปริมาณความชื้นของเชื้อสดที่ได้จากการหมักเซลล์ 71.05%±2.16

2. การรอดชีวิต (%)

การรอดชีวิต (%) $= (\log N / \log N_0) \times 100$

กำหนด N = จำนวนเชื้อหลังทำแห้ง (CFU/g)

N_0 = จำนวนเชื้อก่อนทำแห้ง (CFU/g)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว

ใช้วิธีวิเคราะห์โดยดัดแปลงจาก (Potschke, Pionteek and Stutz, 2002)

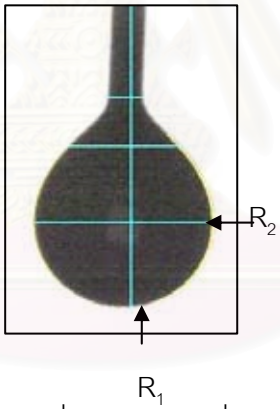
การวัดค่าแรงตึงผิวในการทดลองนี้เป็นการใช้เทคนิค Pendant drop วัดด้วยเครื่อง Goniometer ประกอบด้วยอุปกรณ์ดังนี้คือ ฐานวางกล้องเพื่อปรับระยะ (Optical bench), กล้องถ่าย Video (Video camera), อุปกรณ์ติดตั้ง Syringe (Syringe attachment) และจอรับภาพ (Monitor) เริ่มจากตัวอย่างที่อยู่ใน Syringe จะถูก pump ผ่านหัวเข็มเกิดเป็นหยด กล้อง Video บันทึกภาพเกิดเป็นหยดจนกระทั่งหยดตกจากปลายเข็ม เลือกภาพขณะที่หยดตก พอดี โปรแกรม First Ten Angstorms จะคำนวณค่าแรงตึงผิวจากลักษณะหยดดังสมการ Laplace equation

สมการ laplace $P = \gamma (1/R_1+1/R2)$

กำหนด p = แรงดันที่ผิวของหยด

γ = แรงตึงผิว

R_1, R_2 = รัศมีของตำแหน่งที่ 1 และ 2 ดังรูปที่ 1-ก



รูปที่ 1-ก ตัวอย่างรูปหยดของเหลวเมื่อผ่านหัวเข้มที่แสดงในจอภาพเครื่อง Goniometer

4. สมการ Kim-mashall

สมการ Kim-mashall รายงานโดย Elversson (2005)

สมการ Kim-mashall $D = 5356(\sigma^{0.4}\eta^{0.32}/(V_{rel}^{2}\rho_a)^{0.57}A^{0.36}\rho_l^{0.16})+((\eta^2/\rho_l\sigma)^{0.17}*B)$

กำหนด σ = ค่าแรงตึงผิว

η = ค่าความหนืด

ρ = ค่าความหนาแน่น

V_{rel} = ค่า relative velocity ระหว่างอากาศและสารละลายใน atomizer

A, B = ค่าคงที่ของ atomizer

5. **การหาปริมาณกรด** ตามงานวิจัยของ บวรศักดิ์ ลีนานนท์ (2531)

สารเคมี

- สารละลายฟีนอฟธาลีน (Phenolphthalein indicator) เตรียมโดยละลายฟีนอฟธาลีน 1 g ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 100 mL
  เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 mL
- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ส่วนที่ไม่ตกตะกอน ใช้สารละลายส่วนใสมาเตรียมสารละลายมาตราฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล โดยใช้ Stock solution ประมาณ 8 mL ต่อน้ำกลั่น 1 L ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโปรตัสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (Potassium hydrogen phthalate)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างนมหมัก 3 mL เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (โดยอุ่นน้ำกลั่นให้มีอุณหภูมิประมาณ 60°C) 3 mL ต่อตัวอย่าง
2. เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 1-2 หยด
3. ไตเตรดด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติ ซึ่งจะได้สีชมพูอ่อน
4. คำนวณหากรดในรูปกรดแลกติกตามสูตร

$$\text{ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{N \times V \times 90.08 \times 100}{1{,}000 \times Wt}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตร (mL) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

Wt = น้ำหนัก (mL) ของนมเปรี้ยว

6. **การวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคผง**

นำอนุภาคผงมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคด้วยเครื่อง Image Analizer

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. **ศึกษาลักษณะของอนุภาคผงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด**
ตามงานวิจัยของ Gardiner และคณะ (2000)

นำตัวอย่างอนุภาคผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย มาทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อทดสอบลักษณะปรากฏโดยรวมของอนุภาคผง โดยการนำตัวอย่างผงแต่ละตัวอย่างมาตรึงที่แทนและเททับด้วย (Carbon paper และ Gold plated) แสดงภาพด้วยกระแสไฟฟ้า 15 kV ที่กำลังขยาย 200 และ 1000 เท่า

8. **การวิเคราะห์ค่า** Water activity

นำตัวอย่างอนุภาคผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย มาวัดค่า Water activity คือการหาค่าของโมเลกุลน้ำที่พร้อมจะเปลี่ยนสภาวะจากของเหลวไปเป็นไอ เป็นส่วนของน้ำอิสระเท่านั้น วิเคราะห์ค่า Water activity โดยใช้เครื่องวัด Water activity model series 3 บริษัท DECAGON DEVICE ประเทศสหรัฐอเมริกา ดังรูปที่ 2-ก

รูปที่ 2-ก เครื่องมือวิเคราะห์ค่า Water activity (a_w analyzer)

9. การทำแห้งแบบพ่นฝอย

เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) model DV- 2 บริษัท NIRO ประเทศเยอรมนี

ข้อมูลประกอบ

Component type คือ Mobile minor

Component size คือ 0.8

Identification NO. คือ 3163

Year of manufacture คือ 2001

ภาวะที่ใช้อุณหภูมิลมเข้า 160°C และ อุณหภูมิลมออก 85±3°C

Feed rate 34 มิลลิลิตรต่อนาที ดังรูปที่ 3-ก

รูปที่ 3-ก เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer)

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS medium ปริมาตร 1000 mL

Peptone	1 %
Beef extract	1 %
Yeast extract	0.5 %
Glucose	2 %
Tween 80®	0.1 %
K_2HPO_4	0.2 %
Sodium acetate	0.5 %
Tri-ammonium citrate	0.2 %
$MgSO_4.7H_2O$	0.02 %
$MnSO_4.4H_2O$	0.02 %
น้ำกลั่น	1000 mL

หากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเติม agar 1.5 % (w/v)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient media ปริมาตร 1000 mL

Peptone	0.5 %
Beef extract	0.3 %
น้ำกลั่น	1000 mL

หากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเติม agar 1.5 % (w/v)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **สูตรอาหารน้ำมะพร้าว** ปริมาตร 1000 mL

สูตรอาหารน้ำมะพร้าวนำมาจากงานวิจัยของ (เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, 2524)

เตรียมน้ำมะพร้าวโดยนำภาชนะรองรับน้ำมะพร้าวจากลูกมะพร้าวโดยตรง แล้วใช้ผ้าขาวบางกรองสิ่งสกปรกออกไป หลังจากจากนั้นนำน้ำมะพร้าวไปต้มจนเดือดประมาณ 5 นาที ทิ้งให้เย็น นำใส่ภาชนะที่สะอาดเข้าแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ใช้งาน

สูตรอาหารน้ำมะพร้าว

Peptone	1 %
Sodium acetate	0.5 %
Yeast extract	0.5 %
Ammonium citrate	0.2 %
Tween 80®	0.1 %

น้ำมะพร้าว 1000 mL

นำใส่เครื่องหมักเชื้อขนาด 5 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ดังรูปที่ 1-ข

รูปที่ 1-ข เครื่องหมักเชื้อ (Fermenter)

ภาคผนวก ค

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3. NaOH 2 N ปริมาตร 500 mL

NaOH	40 g
น้ำกลั่น	

ละลาย sodium hydroxide ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 500 mL

4. HCl 0.1 N ปริมาตร 500 mL

HCl	4.95 mL
น้ำกลั่น	495.05 mL

5.บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้างเซลล์เพื่อปรับพีเอชเซลล์ให้เป็นกลางในช่วง 6.5-7.0

K_2HPO_4	0.174	g	ในน้ำกลั่น 100 mL
KH_2PO_4	0.68	g	ในน้ำกลั่น 100 mL
NaCl	0.87	g	ในน้ำกลั่น 100 mL

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ 1-ง ผลของการแทนที่นมผงปราศจากไขมันด้วยแซนแทนกัมในระดับต่างๆ ต่อปริมาณความชื้น ค่าa_w ขนาดอนุภาคผง และการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 450 หลังการทำแห้ง

สารปกป้องเซลล์ที่ควบคุมให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (w/v)	ค่าความชื้น (%)	Water activity (a_w)	เส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคผง (μm)	การรอดชีวิต (%)
10% นมผงปราศจากไขมัน+ 0% แซนแทนกัม	2.95^{c}±0.24	0.21^{b}±0.02	12.86^{a}±1.44	90.65^{c}±0.37
แซนแทนกัมในปริมาณ 0.25% ของนมผงปราศจากไขมัน	2.40^{d}±0.08	0.23^{b}±0.01	8.94^{b}±0.47	95.38^{b}±0.3
แซนแทนกัมในปริมาณ 0.5% ของนมผงปราศจากไขมัน	2.28^{d}±0.21	0.24^{b}±0.02	8.18^{b}±1.02	98.05^{a}±0.68
แซนแทนกัมในปริมาณ 0.75% ของนมผงปราศจากไขมัน	3.27^{c}±0.36	0.24^{b}±0.01	9.09^{b}±0.20	93.65^{b}±2.21
แซนแทนกัมในปริมาณ 1.0% ของนมผงปราศจากไขมัน	3.12^{c}±0.38	0.28^{a}±0.00	9.98^{b}±2.21	94.30^{b}±0.87
แซนแทนกัมในปริมาณ 1.5% ของนมผงปราศจากไขมัน	4.93^{b}±0.21	0.29^{a}±0.04	12.22^{a}±2.22	93.81^{b}±0.53
แซนแทนกัมในปริมาณ 2.0% ของนมผงปราศจากไขมัน	5.47^{a}±0.07	0.33^{a}±0.29	12.13^{a}±0.87	93.08^{b}±0.76

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c ตัวอักษรกำกับที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงค่าที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุพิชชา วัฒนะประเสริฐ เกิดวันที่ 17 มิถุนายน 2525 ที่จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย