ผลของกระบวนการทำให้แห้งต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในไมโครแคปซูล

นาย ณรงค์ กิตติโชคอนันต์ 513 65400 33
นาย ณรงค์ พุทธสัง 513 65417 33

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตร์บัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

Effect of drying process on viability of*Lactobacillus* spp. loaded microcapsules

Mister Narong Kittichokanan	513 65400 33
Mister Narong Puttasung	513 65417 33

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

โครงการลำดับที่……
วันที่……

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : ผลของกระบวนการทำให้แห้งต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในไมโครแคปซูล

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Effect of drying process on viability of *Lactobacillus* spp. loaded microcapsules

หัวหน้าโครงการ : นายณรงค์ กิตติโชคอนันต์ 513 65400 33

ผู้ร่วมโครงการ : นายณรงค์ พุทธสัง 513 65417 33

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ : อ.ภญ.ดร.พรรณเพ็ญ วัฒนาอาษากิจ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อ.ภญ.ดร.นฤพร สุตัณฑวิบูลย์

ศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

ภาควิชา : วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทำให้แห้ง ได้แก่ การพ่นแห้ง (Spray drying) และการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying) ที่มีต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ซึ่งถูกบรรจุใน alginate microcapsule เนื่องจากรูปแบบแห้งเป็นรูปแบบที่สะดวกต่อการเก็บรักษา การเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป และสะดวกในการขนส่ง ดังนั้นจึงต้องมีการนำผลิตภัณฑ์มาผ่านกระบวนการทำให้แห้ง กระบวนการทำให้แห้งเป็นขั้นตอนที่เชื้อโพรไบโอติกต้องสัมผัสกับสภาวะที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลให้เกิดการตายของเชื้อได้ งานวิจัยนี้จึงได้นำเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ซึ่งจัดเป็นโพรไบโอติกโดยบรรจุลงใน alginate microcapsule มาผ่านกระบวนการทำให้แห้งดังกล่าว เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูล ปริมาณความชื้น (moisture content) และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำให้แห้ง ลักษณะของไมโครแคปซูลที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยกระบวนการพ่นแห้ง ณ สภาวะ Inlet air temperature 170°C และ Outlet air temperature 85-95°C มีลักษณะส่วนใหญ่เป็นทรงกลม ผิวเรียบ ขนาดเล็กกว่า 10 μm บางอนุภาคมีลักษณะเว้าไม่สมมาตร อนุภาคมีปริมาณความชื้น 15.04% และ 14.74% สำหรับไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อและไม่บรรจุเชื้อตามลำดับ สำหรับไมโครแคปซูลที่เตรียมโดยวิธีไอออนิกเจลเลชันและทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ณ สภาวะ freezing temperature -30°C primary drying time ที่ 18 ชั่วโมง และความดัน 600 mTorr มีลักษณะส่วนใหญ่เป็นทรงกลม พื้นผิวอนุภาคย่นเป็นริ้ว เมื่อตัดตามขวางอนุภาคมีลักษณะเป็นแคปซูลเห็นขอบเปลือกชัดเจน ภายในเป็นช่องว่าง อนุภาคที่บรรจุเชื้อมีขนาด 1.496 mm ปริมาณความชื้น 2.00% และอนุภาคที่ไม่บรรจุเชื้อมีขนาด 1.507 mm ปริมาณความชื้น 1.91% สำหรับอัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งไม่สามารถหาค่าได้ เนื่องจากเครื่องพ่นแห้งที่ใช้ไม่ใช่ชนิด aseptic spray dryer จึงทำให้เกิดการปนเปื้อน ส่วนอัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง พบว่าปริมาณเชื้อลดลงจาก 5.914×10^{10} CFU เป็น 1.466×10^{8} CFU

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

……
อาจารย์ที่ปรึกษา

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอผลการวิจัยหัวข้อเรื่องผลของกระบวนการทำให้แห้งต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในไมโครแคปซูล ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555

ทางคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการทำให้แห้ง เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ในไมโครแคปซูลต่อไปในอนาคต หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พรรณเพ็ญ วัฒนาอาษากิจ อาจารย์ที่ปรึกษา และศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และอาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.นฤพร สุตัณฑวิบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษานี้ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม ที่สนับสนุนทางด้านอุปกรณ์และสารเคมี เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้ สุดท้ายขอขอบคุณนิสิตปริญญาโทที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือในการวิจัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์ ..... ง

คำนำ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัยและตัวแปรสำคัญในการศึกษา 3

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

2 ปริทรรศน์วรรณกรรม 6

2.1 โพรไบโอติก 6

2.2 ไมโครเอนแคปซูลเลชัน 7

2.3 การพ่นแห้ง)Spray drying(..... 10

2.4 การทำให้แห้งเยือกแข็ง)Freeze drying(..... 12

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

3 วิธีการวิจัย 14

3.1 การเตรียมเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 suspension 14

3.2 การไมโครเอนแคปซูเลชันเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 และทำให้แห้งด้วยกระบวนการพ่นแห้ง 15

3.3 การไมโครเอนแคปซูเลชันเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ด้วยวิธีไอออนิกเจลเลชันและทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง 16

3.4 การประเมินผลไมโครแคปซูล 17

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด)scanning electron microscope, SEM(..... 17

3.4.2 การศึกษาปริมาณความชื้น)moisture content) ของไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ 18

3.4.3 การศึกษาขนาดของอนุภาค)Particle size) ของไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ..... **Error! Bookmark not defined.**

3.4.4 การหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี pour plate 19

4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย 20

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด)Scanning electron microscope, SEM(..... 20

4.2 ผลการศึกษาปริมาณความชื้น)moisture contentของไมโครแคปซูลที่ผ่านการทำให้ (วิธี 2 แห้งทั้ง 24

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
	4.3 อัตราการรอดชีวิตของ เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ภายหลังกระบวนการทำให้แห้ง	25
5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	29
	5.1 สรุปผลการวิจัย	29
	5.2 ข้อเสนอแนะ	30
รายการอ้างอิง		31
ภาคผนวก.		35

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลที่ไม่มีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง 36

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลที่มีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ..... **Error! Bookmark not defined.**

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น)moisture content(ของไมโครแคปซูลที่ไม่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง.....40

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น)moisture content(ของไมโครแคปซูลที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง.....40

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น)moisture content(ของไมโครแคปซูลที่ไม่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้ง.....41

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น)moisture content(ของไมโครแคปซูลที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้ง.....41

ตารางที่ 7 แสดงค่าผลการทดสอบทางสถิติ)independent t-test(ของไมโครแคปซูลที่ไม่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแต่ละวิธี 42

ตารางที่ 8 แสดงค่าผลการทดสอบทางสถิติ)independent t-test(ของไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อหลัง ผ่านกระบวนการทำแห้งแต่ละวิธี 44

ตารางที่ 9 แสดงผลการนับจำนวน Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการพ่นแห้ง.....46

ตารางที่ 10 แสดงผลการนับจำนวน Colony เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการพ่นแห้ง.....49

ตารางที่ 11 แสดงผลการนับจำนวน Colony เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง...52

ตารางที่ 12 แสดงผลการนับจำนวน Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง 55

ตารางที่ 13 แสดงผลการนับจำนวน Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ของสารละลาย $CaCl_2$..58

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงวิธีการทำไมโครเอนแคปซูเลชันแบบต่างๆ ..... **Error! Bookmark not defined.**

รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบของเครื่องพ่นแห้ง..... **Error! Bookmark not defined.**

รูปที่ 3 แสดงเครื่องพ่นแห้งรุ่น BÜCHI Mini Spray Dryer B-290..... 15

รูปที่ 4 แสดงเครื่องทำแห้งเยือกแข็งรุ่น 17

รูปที่ 5 แสดงเครื่องวัดความชื้นแบบหลอดฮาโลเจนชื่อทางการค้า Mettler Toledo รุ่น HR83Halogen..... 18

รูปที่ 6 แสดงลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 21

รูปที่ 7 แสดงลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 22

รูปที่ 8 แสดงลักษณะพื้นผิวภายในของไมโครแคปซูลที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด 23

รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 24

รูปที่ แสดง 10Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการพ่นแห้ง..... 47

รูปที่ 11 แสดง Colony เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการพ่นแห้ง..... 50

รูปที่ 12 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง 53

รูปที่ 13 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง..... 56

รูปที่ 14 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ของสารละลาย $CaCl_2$..... 59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในทางเดินอาหารของมนุษย์มีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากกว่า 50 ชนิดแบคทีเรียเหล่านี้มีทั้งที่มีประโยชน์และไม่มีประโยชน์ต่อร่างกายหรือทั้งสองอย่าง โดยถ้าสมดุลของแบคทีเรียเหล่านี้เปลี่ยนไปก็อาจก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้นได้ โพรไบโอติกจัดเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายได้ถ้ามีปริมาณมากเพียงพอ โพรไบโอติกที่นิยมใช้ในทางการค้า ได้แก่ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* *Lactobacillus* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ไม่สร้างเอนไซน์คะตาเลส ไม่เคลื่อนที่ สามารถหมักน้ำตาลได้กรดแลคติกและอาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีรายงานประโยชน์ของโพรไบโอติกที่มีต่อร่างกายของมนุษย์ Johnston BC และคณะ พบว่าโพรไบโอติกช่วยป้องกันโรคท้องร่วงในผู้ป่วยสูงอายุที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ Giralt J และคณะ พบว่าโพรไบโอติกช่วยป้องกันโรคท้องร่วงของผู้ป่วยที่เข้ารับการฉายรังสี Allen SJ และคณะ พบว่าโพรไบโอติกช่วยลดระยะเวลาการในการแป็นโรคท้องร่วง Jimenez MB พบว่าโพรไบโอติกช่วยรักษา Irritable bowel syndrome แต่ปัญหาที่สำคัญของโพรไบโอติกคือโพรไบโอติกจะต้องมีชีวิตไปจนถึงจุดที่เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์จึงจะมีประโยชน์ต่อร่างกายโฮส ในทางตรงกันข้ามมีงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียหลาย strain มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อผ่านสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และสภาวะความเป็นด่างในลำไส้ การทำไมโครเอนแคปซูเลชัน เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกจากการถูกทำลายจากภาวะในทางเดินอาหารจำลองและยังช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาได้ ทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ alginate เป็นโพลิเมอร์ในการทำไมโครเอนแคปซูเลชันเนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัย ราคาถูก ได้รับอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารโดย FDA สามารถ

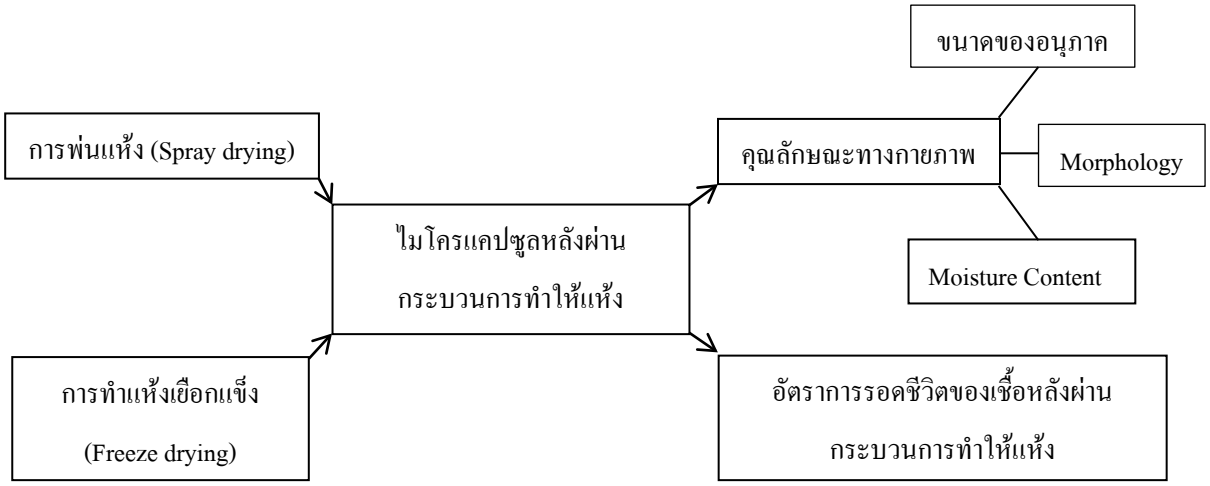
เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารประเภทต่างๆได้ และช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในสภาวะทางเดินอาหารจำลองได้

ผลิตภัณฑ์รูปแบบแห้งเป็นรูปแบบที่ได้รับความนิยมมากกว่ารูปแบบเปียก เนื่องจากรูปแบบแห้งเป็นรูปแบบที่สะดวกต่อการเก็บรักษา การเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป เช่น การทำยาเม็ด ยาบรรจุผงและแคปซูล เป็นต้น และสะดวกในการขนส่ง ดังนั้นจึงต้องมีการนำผลิตภัณฑ์มาผ่านกระบวนการทำให้แห้ง โดยกระบวนการทำให้แห้งที่จะผู้วิจัยสนใจทำการศึกษานี้ได้แก่ การพ่นแห้ง (Spray drying) เป็นกระบวนการทำให้แห้งที่มีการสัมผัสกับความร้อนเป็นเวลาสั้นๆ สามารถทำได้ต่อเนื่อง และทำได้ปริมาณมาก แต่มีการสูญเสียผลิตภัณฑ์ระหว่างการผลิตจำนวนมาก อีกกระบวนการหนึ่งคือ การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นกระบวนการที่ใช้ความเย็นและความดันต่ำทำให้เกิดการระเหิดของน้ำ มีการสูญเสียผลิตภัณฑ์ระหว่างการผลิตน้อย แต่เป็นกระบวนการที่ไม่สามารถทำต่อเนื่อง และต้องใช้ระยะเวลาในการทำนาน กระบวนการทำให้แห้งทั้งสองกระบวนการทำให้แบคทีเรียสัมผัสกับสภาวะไม่เหมาะสม มีผลทำให้เชื้อบางส่วนตายลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษากระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ ที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อภายหลังกระบวนการทำให้แห้งตลอดจนลักษณะทางกายภาพและปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูล ปริมาณความชื้น (Moisture content) และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้ง (Spray drying) และกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying)

1.3 ขอบเขตของการวิจัยและตัวแปรสำคัญในการศึกษา



ตัวแปรที่ศึกษา (Conceptual Variable)	ตัวแปรที่วัดค่าได้ (Operational variable)	คุณลักษณะของตัวแปร
ตัวแปรต้น 1. กระบวนการทำให้แห้ง	ประเภทของกระบวนการทำให้แห้งได้แก่ การพ่นแห้ง (Spray drying) การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying)	Nominal scale
ตัวแปรตาม 1. อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* sp SL4-1.ในไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการทำให้แห้ง	% Viability	Ratio scale
2. ปริมาณความชื้น	% Moisture content	Ratio scale
3. ขนาดของอนุภาค	Diameter of microcapsule	Ratio scale
4. ลักษณะทางกายภาพ	Morphology	Ordinal scale

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 suspension

เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 โดยใช้ GYPB media และ centrifuge เก็บเซลล์ของเชื้อที่ 7,000 rpm อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วย 0.9% sterile NaCl 1 ครั้ง แล้วนำไป centrifuge ที่สภาวะเดิมอีกครั้งแล้วหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี pour plate บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 37° C แล้วจึงนับปริมาณเชื้อ

การไมโครเอนแคปซูเลชันและทำให้แห้งด้วยกระบวนการพ่นแห้ง

ทำการพ่นแห้งสารผสมของ 2% sterile alginate กับเชื้อโดยใช้สภาวะดังนี้

Inlet air temperature:	170˚C
Outlet air temperature:	85-95˚C
Aspirator:	65%
Pump rate:	20%
Q-flow:	30%

การไมโครเอนแคปซูเลชันด้วยวิธีไอออนิกเจลเลชันและทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

เตรียมไมโครแคปซูลภายใต้ laminar airflow โดยหยดสารผสมของ 2% sterile alginate กับ เชื้อผ่านหัวเข็มขนาด 0.6 mm ลงในสารละลาย 0.1M sterile calcium chloride โดยระยะห่างระหว่างหัวเข็มและระดับผิวของ สารละลาย 0.1M sterile calcium chloride อยู่ที่ 20 cm แล้วปล่อยให้ไมโครแคปซูลแข็งตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำไปทำแห้งเยือกแข็งโดยใช้สภาวะดังนี้ freezing temperature -30°C primary drying time ที่ 18 ชั่วโมง ความดัน 600 mTorr

การประเมินคุณภาพของไมโครแคปซูลที่ได้ในหัวข้อต่างๆดังนี้

1. ปริมาณความชื้น (moisture content)
2. ลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)
3. ขนาดของอนุภาค (Particle size)
4. การหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี pour plate

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำไปพัฒนากระบวนการทำให้แห้ง เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus* sp.SL4-1ในไมโครแคปซูล

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 โพรไบโอติก

แต่เดิมโพรไบโอติกเป็นคำที่มีความหมายว่า “สำหรับชีวิต” ต่อมาได้มีผู้ให้คำนิยามอีกหลายท่านซึ่งสามารถสรุปได้เป็น 2 ประเด็นดังนี้ ประเด็นแรกคำว่าโพรไบโอติกจะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็นองค์ประกอบ ประเด็นที่สองโพรไบโอติกต้องมีปริมาณของเชื้อมากเพียงพอจึงจะมีประโยชน์ต่อร่างกายของโฮส โพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากคุณสมบัติ Colonization resistance ซึ่งเป็นกลไกของแบคทีเรียในทางเดินอาหารที่จะป้องกันตัวเองภายใต้สภาวะแวดล้อมเพื่อไม่ให้เชื้ออื่น เช่น เชื้อก่อโรค เจริญขึ้นมาได้

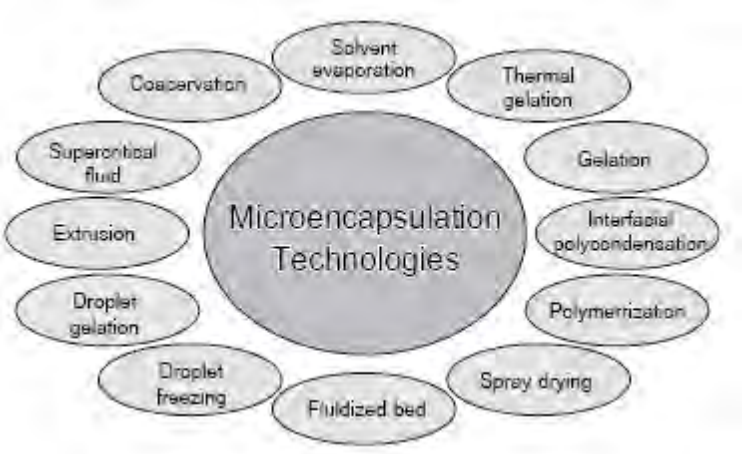
แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้สามารถแบ่งได้เป็นสามกลุ่มตามลักษณะการเมทาบอลิซึม ได้แก่ กลุ่ม Lactic acid bacteria ประกอบด้วย *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* กลุ่ม Putrefactive bacteria ประกอบด้วย *Clostridium* spp. , *Bacteroides*, *Escherichia coli*, *Stapphylococcus* และ *Pseudomonas auroginosa* และสุดท้ายกลุ่มอื่นๆประกอบด้วย *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Candida* และอื่นๆ Lactic acid bacteria เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* จัดเป็นโพรไบโอติกโดยเชื้อจะผลิตกรดแลคติคขึ้นจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ไม่ผลิตสารที่มีพิษต่อเซลล์และยังมีผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยมีผล mitogenic activity, adjuvant activity, macropharge activation, antibody production enhancement, interferon production และ antitumor effect ส่วนแบคทีเรียที่ก่อโรคจะผลิต Putrefactive substances เช่น แอมโมเนีย แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟล์ เอมีน ฟีนอลด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ลำไส้เกิดอาการบาดเจ็บ นอกจากนี้ยังถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายสามารถก่อให้เกิดโรคได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบแข็ง ภาวะความดันโลหิตสูง และส่งผลเสียต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย

แบคทีเรียจะมีปริมาณแตกต่างกันไปตามบริเวณ ทางเดินอาหาร กระเพาะอาหารจะไม่มีเชื้อแบคทีเรียอาศัยอยู่ แต่หลังจากกินอาหารเข้าไปทันทีจะสามารถพบแบคทีเรีย 10^5 bacteria/ml โดยแบคทีเรียที่พบก็คือ *Streptococci*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* และ*Bifidobacteria* บริแวณดูโอดินัมและเจจูนัมพบแบคทีเรีย *Streptococci*, *Lactobacilli*, *Veillonellae* เป็นหลักโดยพบในปริมาณ 10^4 bacteria/ml หรือน้อยกว่า บริเวณอิลเรียมพบ *Escherichia coli* และแอนแอโรบแบคทีเรียเป็นหลักในลำไส้ใหญ่บริเวณซีคัมสามารถพบเชื้อได้ถึง 10^{11} bacteria/g

2.2 ไมโครเอนแคปซูลเลชัน

ไมโครเอนแคปซูเลชันคือกระบวนการที่ทำให้อนุภาคของเหลวและอนุภาคของแข็งถูกห่อหุ้มด้วยสารประเภทพอลิเมอร์เป็นชั้นบางๆเรียกว่า capsule โดยจะมีขนาดอยู่ในช่วง 1μm – 1,000 μm สำหรับประโยชน์ในการทำไมโครเอนแคปซูเลชันเช่น ป้องกันการระเหยของสารหอมระเหย ช่วยควบคุมการทำงานของสารแกน ป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสภาวะภายนอก และช่วยให้ง่ายต่อการนำไปใช้งาน เป็นต้น

ขั้นตอนสำคัญๆ ทางเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน คือ 1. ทำให้เกิดฟิล์มบางๆ รอบอนุภาค หรือทำให้เกิดเป็นอิมัลชัน 2.ทำให้ฟิล์มนั้นแข็งแรง 3. แยกแคปซูลและทำให้แห้ง โดยวิธีการในการทำไมโครเอนแคปซูเลชันนั้น มีด้วยกันหลายวิธี แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงวิธีการทำไมโครเอนแคปซูเลชันแบบต่างๆ

ในที่นี้จะอธิบายวิธีการทำไมโครเอนแคปซูเลชันที่ได้ทำการศึกษา

1. Coacervation

เป็นกระบวนการที่อาศัยหลักการเคมี โดยเป็นการ encapsulation ของเหลวหรืออนุภาคขนาดเล็กที่มีลักษณะ oil in water ซึ่งมี 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นแรกกระจายสารที่ต้องการเคลือบหรือสารแกน (core) ในสารละลายพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเคลือบ ขั้นที่สองแยกวัฏภาคของพอลิเมอร์ออกจากตัวทำละลาย เพื่อให้พอลิเมอร์ไปเคลือบสารแกน และขั้นตอนสุดท้ายคือทำให้พอลิเมอร์ที่เคลือบสารแกนอยู่นั้นแข็งแรงขึ้นโดยอาศัยอุณหภูมิหรือสารเพิ่มความแข็งแรง เช่น calcium chloride ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ sodium alginate ได้เป็นสารประกอบ calcium alginate ซึ่งมีลักษณะเป็นฟิล์มแข็ง

2. การพ่นแห้ง (Spray drying)

เป็นวิธีที่นิมกันมากในอุตสาหกรรมอาหาร โดยวิธีการคือเป็นการนำสารแกนผสมลงในสารละลายที่ต้องการเคลือบ แล้วบรรจุเข้าเครื่องพ่นแห้ง สารละลายจะถูกฉีดผ่านออกมาทางหัวพ่น ได้เป็นละอองฝอยเล็กๆ จากนั้นจะมีลมร้อนปะทะกับละอองฝอยเหล่านั้นทำให้มีการระเหยของน้ำออกจากละอองฝอยไปอย่างรวดเร็ว จนได้อนุภาคที่แห้ง และอนุภาคเหล่านั้นจะถูกลม cyclone พาไปเก็บยัง collecting chamber

3. ไอออนิกเจลเลชัน (Droplet gelation)

เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน วิธีการคือนำสารแกนที่ต้องการเคลือบผสมกับพอลิเมอร์ที่ใช้เคลือบสารแกน เช่น sodium alginate จากนั้นนำไปบรรจุลงในกระบอกฉีดยา แล้วหยดผ่านหัวเข็มขนาดเล็กได้เป็น หยดลงไปใน calcium chloride bath จะทำให้เกิดการ cross link ระหว่าง sodium alginate และ calcium chloride ได้เป็น calcium alginate ทำให้ผิวของหยดด้านนอกแข็งตัวกลายเป็นแคปซูล

การทำไมโครเอนแคปซูเลชัน เพื่อบรรจุโพรไบโอติกมีงานวิจัยพบว่า สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและ shelf life ของเชื้อโพรไบโอติกในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น ความเย็นในอาหารแช่แข็ง ความเป็นกรดในโยเกิร์ต โดยเมื่อเปรียบเทียบกับโพรไบโอติก ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันพบว่า เชื้อโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันสามารถอยู่รอดชีวิตได้นานถึง 8 เดือนซึ่งมากกว่าเชื้อโพรไบโอติกที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน

นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันนั้นสามารถรอดชีวิตจากสภาวะความเป็นกรดของทางเดินอาหารส่วนต้นได้ เพื่อให้โพรไบโอติกเดินทางไปถึงบริเวณลำไส้เล็กซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถออกฤทธิ์ได้และเป็นการช่วยให้ขนส่งผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้นกว่าเก็บในรูป สารแขวนตะกอน และยังพบว่าการทำ ไมโครแคปซูลสามารถทราบจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่ถูก entrap ไว้ในแต่ละไมโครแคปซูลได้ ทำให้ควบคุมปริมาณเชื้อได้แน่นอนในแต่ละรูปแบบผลิตภัณฑ์ พอลิเมอร์ที่ใช้ในการทำไมโครเอนแคปซูเลชันนั้นมีหลากหลาย alginate เป็นหนึ่งในพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมในการทำไมโครแคปซูลโดย alginate เป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่เมื่อทำปฏิกิริยา Divalent cations เช่น calcium จะได้เป็นสารประกอบ calcium alginate เป็นฟิล์มที่แข็งแรงให้กับไมโครแคปซูล และยังพบว่า calcium alginate ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย , biocompatibility, ราคาถูก นอกจากนี้ไมโครแคปซูลจาก calcium alginate สามารถละลายได้ดีในสภาวะด่างของลำไส้จึงสามารถปลดปล่อยโพรไบโอติกได้ดี

2.3 การพ่นแห้ง (Spray drying)

การพ่นแห้งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเหลวให้เป็นอนุภาคแห้งโดยพ่นสารที่ป้อนเข้าในตัวกลางที่ร้อนและแห้ง โดยสารที่ป้อนอาจเป็นสารละลาย สารแขวนตะกอน หรือเป็นอิมัลชัน ผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้จะอยู่ในรูปผง แกรนูล หรือเกาะกลุ่มกันขึ้นกับคุณสมบัติของสารที่ป้อนเข้าไป การพ่นแห้งใช้อยู่ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถผลิตวัตถุดิบได้ในปริมาณมาก ในขณะที่มีต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze drying) และยังเป็นกระบวนการที่สามารถทำอย่างต่อเนื่องได้

กระบวนการพ่นแห้งจะประกอบด้วยกระบวนการ 4 กระบวนการดังนี้

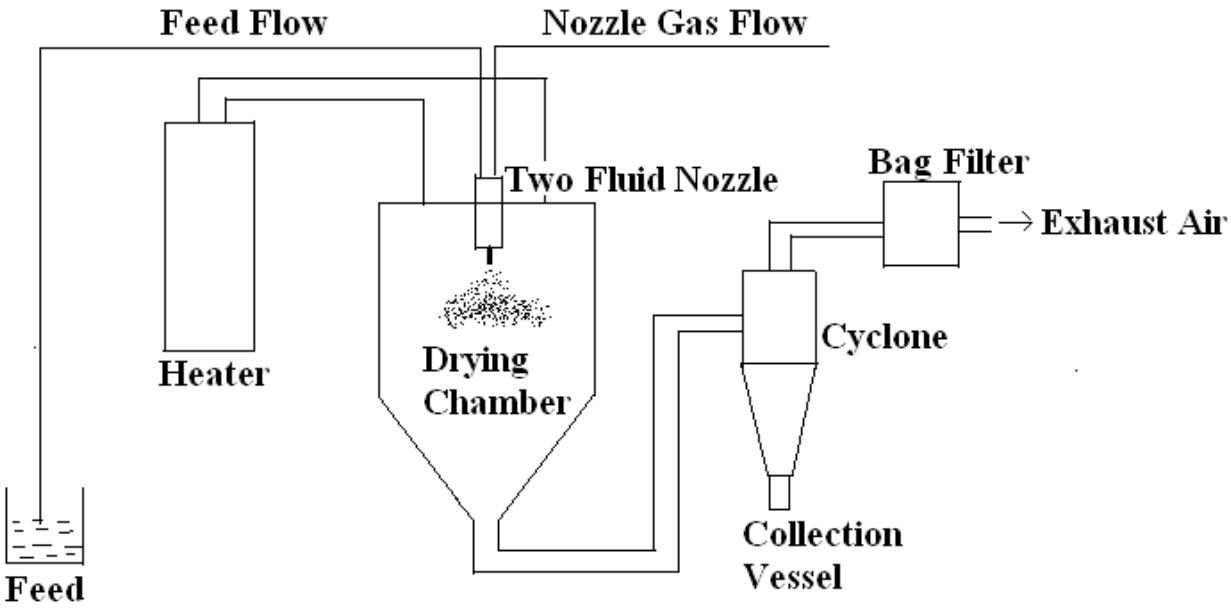
1. การกระจายสารที่ป้อนให้เป็นสเปรย์ (Atomization) ซึ่งระบบการกระจายสารให้เป็นสเปรย์แบ่งตามลักษณะหัวฉีดได้เป็น แบบหมุน (Rotary) แบบแรงดัน (Pressure) และแบบแรงลม (Pneumatic)

2. การปะทะกันระหว่างสเปรย์และอากาศที่ร้อน (Spray-air contact) อากาศร้อนอาจมีอุณหภูมิสูงถึง 200°C ซึ่งลักษณะการไหลของอากาศแบ่งได้ 3 แบบได้แก่ Co-current flow อากาศร้อนและสเปรย์จะไหลผ่าน chamber ไปในทิศทางเดียวกัน Counter- current flow อากาศร้อนและสเปรย์จะไหลในทิศทางตรงกันข้ามกัน โดยสเปรย์จะไหลจากทางด้านบนลงล่าง อากาศร้อนจะไหลจากทางด้านล่างขึ้นบนและ Mixed flow เป็นรูปแบบผสมของแบบ Co-current flow และ Counter- current flow การไหลแบบนี้จะติดตั้งสเปรย์ทางด้านล่าง และผ่านอากศร้อนมาทางด้านบน

3. การแห้งของสเปรย์ (Spray drying) ในขั้นนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นแรกจะเกิดการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็วที่ผิวอนุภาคที่ความเร็วคง เนื่องจากน้ำที่อยู่ภายในสามารถมาแทนที่น้ำที่ระเหยไปได้ทัน ขั้นที่สองจะเกิดเกิดเป็นเปลือกขึ้นที่พื้นผิวโดยรอบ เนื่องจากน้ำที่อยู่ภายในไม่สามารถแทนที่น้ำที่ระเหยได้ทัน และการระเหยของน้ำจะขึ้นกับอัตราการแพร่ของน้ำผ่านเปลือก

4. การแยกผลิตภัณฑ์แห้งจากอากาศ (Product separation) อนุภาคแห้งที่มีน้ำหนักเหมาะสมจะถูกไซโคลนดูดลงไปเก็บในที่เก็บผลิตภัณฑ์ ส่วนอนุภาคที่ไม่เหมาะสมจะถูกแยกออกไปเก็บที่อื่นหรือถูกกรองออกไป



รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบของเครื่องพ่นแห้ง

2.4 การทำให้แห้งเยือกแข็ง (Freeze drying)

การทำแห้งเยือกแข็งเป็นกระบวนการทำให้แห้งจากสารที่เปียก โดยการทำให้สารนั้นแข็งแล้วระเหิดน้ำที่แข็งนั้นออกไป มักนิยมใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำให้แห้งแต่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง และผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการทำให้แห้งเยือกแข็งจะไม่สูญเสียคุณสมบัติเดิมของสารนั้นๆ ลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ทำให้น้ำหนักของผลิตภัณฑ์ลดลงแต่ปริมาตรไม่เปลี่ยนแปลงส่งผลให้สะดวกและประหยัดต่อการขนส่ง นอกจากนี้ยังสามารถกลับมาละลายน้ำใหม่(reconstitute)ได้ง่าย

สำหรับกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งมีด้วยกัน 3 กระบวนการ

1. Freezing

   เป็นการเปลี่ยนสถานะของน้ำจากของเหลวกลายเป็นของแข็ง โดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องลงไปจนต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

2. Primary drying

   เป็นการลดความดันลงเพื่อให้น้ำที่อยู่ในรูปผลึกสามารถระเหิดออกไปได้

3. Secondary drying

   เป็นการไล่ความชื้นที่ยังคงเหลืออยู่จากกระบวนการ primary drying โดยการให้ความร้อนเพียงเล็กน้อยภายใต้สุญญากาศ

การทำแห้งเยือกแข็งในโพรไบโอติก นั้น เป็นวิธีการทำให้แห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้เชื้อมี shelf life นานขึ้น และการทำแห้งเยือกแข็ง เป็นวิธีที่เหมาะกับ biological materials เนื่องจากเป็นการทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำจึงลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีและลดการถูกทำลายด้วยความร้อน นอกจากนี้การทำให้แห้งง่ายสะดวกต่อการขนส่งอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1 GYPB media

2 GYPB agar

3 0.9% sterile NaCl

4 2% sterile alginate

5 0.1M sterile calcium chloride

6 *Lactobacillus* sp. SL4-1 suspension

7 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

8 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)

9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

10 เครื่องพ่นแห้ง BÜCHI Mini Spray Dryer B-290

11 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze dryer)

12 Laminar air flow

13 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

14 เครื่องวัดปริมาณความชื้นยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่นHR83Halogen

15 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope)

3.1 การเตรียมเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 suspension

3.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYPB ปริมาณ 500 ml ตามสูตร

Glucose	5 g
Yeast extract	2.5 g
Peptone	2.5g
Beef extract	1 g
Sodium acetate	1 g
TWEEN 80	0.125 g
Salt solution	2.5 ml

ปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 500 ml จากนั้นนำอาหารที่เตรียมได้ไปปรับ pH ให้ได้ 6.8-7.0 ด้วย pH meter เมื่อได้ pH ที่กำหนดจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

3.1.2 ใส่เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ซึ่งสกัดได้จากหญ้าหมักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยต้องรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณอุณหภูมิห้อง โดยใช้ aseptic technique และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

3.1.3 ทำการเก็บเชื้อโดยการ centrifuge ใช้อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 7,000 rpm และล้างด้วย 0.9% sterile NaCl 1 ครั้ง แล้วบรรจุในหลอด centrifuge ชนิดฝาเกลียวที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

3.2 การไมโครเอนแคปซูเลชันเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 และทำให้แห้งด้วยกระบวนการพ่นแห้ง

3.2.1 นำ 2% sterile alginate ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีรม ethylene oxide gas ไปกระจายตัวใน Sterile purified water 350 ml ภายใต้ laminar airflow แล้วปล่อยให้ 2% sterile alginate พองตัวเต็มที่ จากนั้นจึงเติมเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 4 ml ลงไปผสมให้เข้ากัน

3.2.2 ทำการพ่นแห้งสารแขวนตะกอนของ 2% alginate กับเชื้อ โดยใช้เครื่องพ่นแห้งรุ่น BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 ดังรูปที่ 3

รูปที่ 3 แสดงเครื่องพ่นแห้งรุ่น BÜCHI Mini Spray Dryer B-290

ที่สภาวะดังนี้

Inlet air temperature:	170˚C
Outlet air temperature:	85-95˚C
Aspirator:	65%

Pump rate:	20%
Q-flow:	30%

3.2.3 เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ลงขวดแก้วที่ผ่านการชั่งน้ำหนักและทำให้ปราศจากเชื้อเรียบร้อยแล้วภายใต้ laminar airflow แล้วนำไมโครแคปซูลไปประเมินผล

3.3 การไมโครเอนแคปซูเลชันเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ด้วยวิธีไอออนิกเจลเลชันและทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

3.3.1 นำ 2% sterile alginate ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีรม ethylene oxide gas ไปกระจายตัวใน sterile purified water 80 ml ภายใต้ laminar airflow แล้วปล่อยให้ 2% sterile alginate พองตัวเต็มที่ จากนั้นจึงเติมเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 4 ml ลงไปผสมให้เข้ากัน

3.3.2 เตรียมไมโครแคปซูลภายใต้ laminar airflow โดยหยดสารแขวนตะกอนของ 2% alginate กับเชื้อผ่านหัวเข็มขนาด 0.6 mm ลงในสารละลาย 0.1M sterile calcium chloride โดยระยะห่างระหว่างหัวเข็มและระดับผิวของ สารละลาย 0.1M sterile calcium chloride อยู่ที่ 20 cm แล้วหยดสารผสมจนหมด จากนั้นปล่อยให้ไมโครแคปซูลแข็งตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

3.3.3 บรรจุไมโครแคปซูลที่แข็งตัวแล้วลงขวดแก้วสำหรับการทำแห้งเยือกแข็งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้วภายใต้ laminar airflow

3.3.4 ทำการ Freeze drying โดยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 แสดงเครื่องทำแห้งเยือกแข็งรุ่น

ที่สถาวะ freezing temperature -30°C primary drying time ที่ 18 ชั่วโมง และความดัน 600 mTorr

3.3.5 นำไมโครแคปซูลที่ได้ไปประเมินผล

3.4 การประเมินผลไมโครแคปซูล

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

3.4.1.1 นำตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยวางบน stab ที่ติดด้วย two-sided adhesive tape แล้วนำตัวอย่างเข้าเครื่องสำหรับเคลือบทองคำ และวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM

3.4.2 การศึกษาปริมาณความชื้น (moisture content) ของไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ

3.4.2.1 นำตัวอย่าง 0.1 g วางบนถาดอะลูมิเนียมแล้ววัดปริมาณความชื้นที่อุณหภูมิ 102˚C โดยใช้เครื่องวัดความชื้นแบบหลอดฮาโลเจนชื่อทางการค้า Mettler Toledo รุ่น HR83Halogen ดังรูปที่ 5

รูปที่ 5 แสดงเครื่องวัดความชื้นแบบหลอดฮาโลเจนชื่อทางการค้า Mettler Toledo รุ่นHR83Halogen

3.4.3 การศึกษาขนาดของอนุภาค (Particle size) ของไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ

3.4.3.1 นำตัวอย่างของกระบวนการพ่นแห้งปริมาณเล็กน้อยใส่ลงบนแผ่นสไลด์แล้วปิดทับด้วย cover glass แล้ววัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

3.4.3.2 นำตัวอย่างของกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งวัดขนาดโดยใช้ไม้บรรทัด

3.4.4 การหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี pour plate

3.4.4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYPB ปริมาณ 2 L ตามสูตรดังนี้

Glucose	20 g
Yeast extract	10 g
Peptone	10 g
Beef extract	4 g
Sodium acetate	4 g
TWEEN 80	0.5 g
Salt solution	10 ml
Calcium carbonate	6 g
Agar	30 g

นำอาหารที่เตรียมได้ไปปรับ pH ให้ได้ 6.8-7.0 ด้วย pH meter เมื่อได้ pH ที่กำหนดจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค(autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

3.4.4.2 นำตัวอย่างมาเจือจางด้วย 0.9% sterile NaCl เป็น serial dilution จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเชื้อต่างๆกัน แต่ละ dilution จะถูกดูดมา 1 ml แล้วนำไปใส่ sterile plate แล้วเท GYPB agar หลอมเหลวตามลงไปผสมให้เข้ากัน ละรอให้ agar แข็งตัว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน

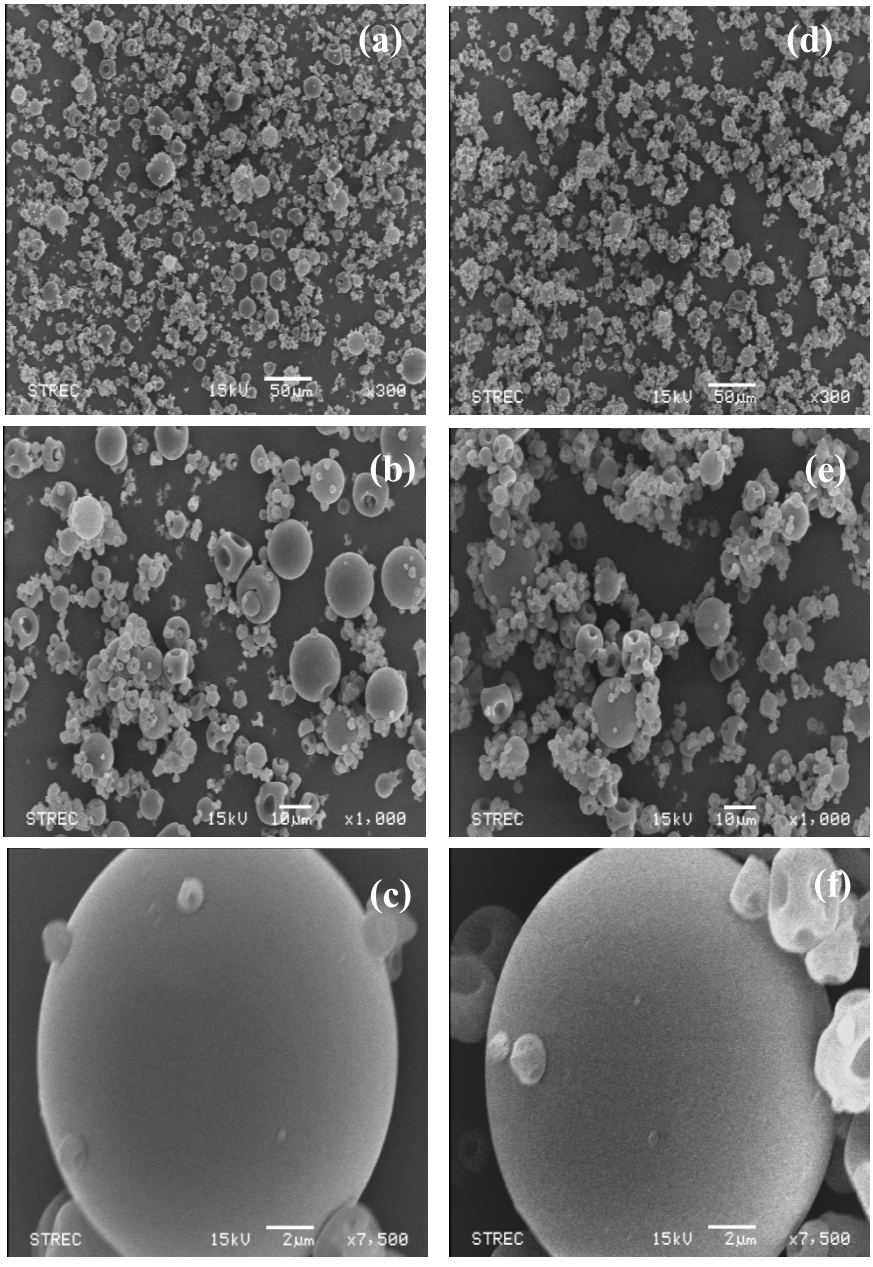
3.4.4.3 นับจำนวน colony ใน plate ที่มีจำนวน colony 30 – 300 CFU ต่อ plate และคำนวณหาปริมาณเชื้อตามสูตร

ปริมาณเชื้อต่อ 1 ml = จำนวน colony ต่อ plate x dilution factor (CFU/ml)

บทที่ 4

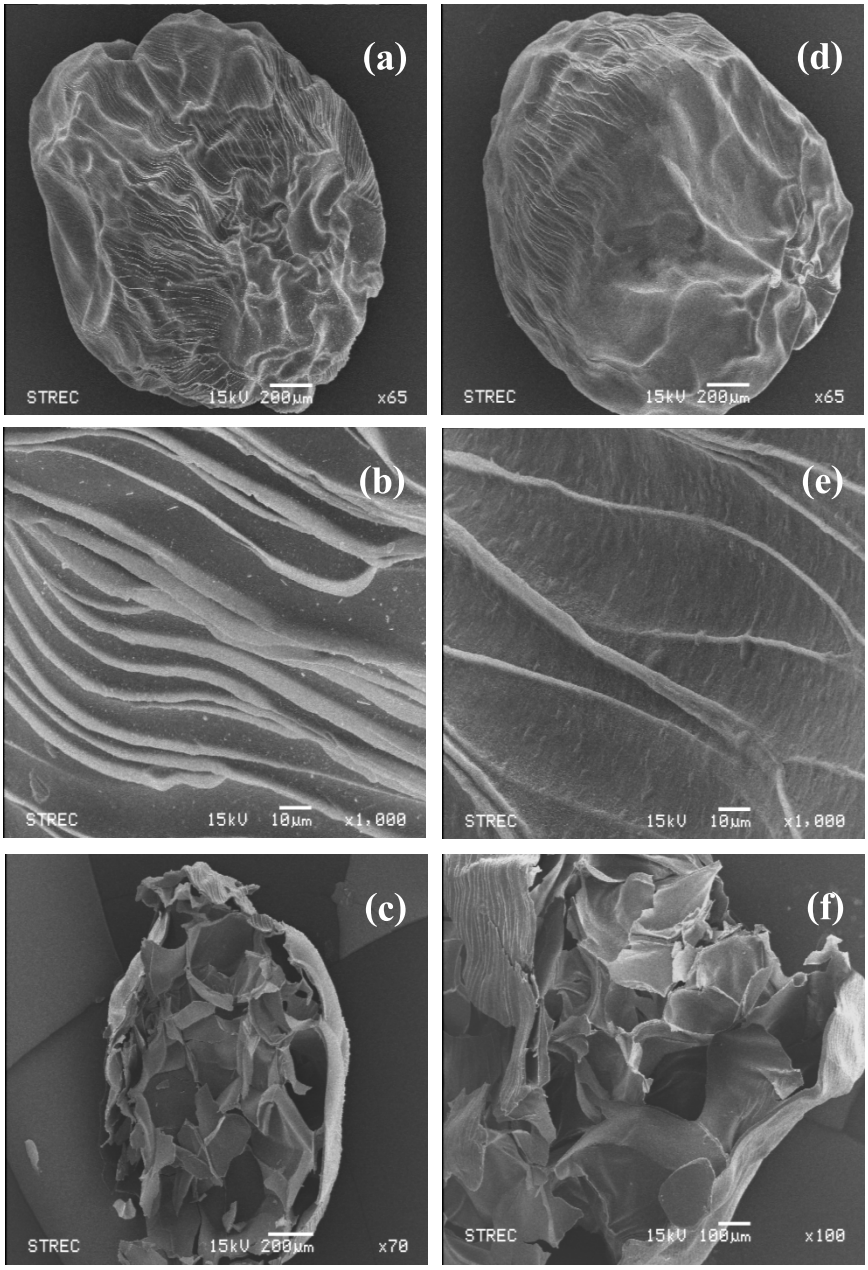
ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 300, 1,000 และ 7,500
ภาพซ้าย (a),(b),(c) แสดงถึงไมโครแคปซูลที่ไม่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1
ภาพขวา (d),(e),(f) แสดงถึงไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1

จากรูปที่ 6 พบว่าอนุภาคที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 และไม่มีการบรรจุเชื้อมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยอนุภาคมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นทรงกลม ผิวเรียบ ไม่เกาะกลุ่มกัน ขนาดเล็กกว่า 10 μm บางอนุภาคมีลักษณะเว้าไม่สมมาตร ลักษณะที่เว้านั้นอาจมีสาเหตุมาจากการให้ความร้อนที่ไม่สม่ำเสมอระหว่างการพ่นแห้งทำให้พื้นผิวการไหลของของเหลว การขยายตัวของอากาศ และการระเหยของน้ำภายในอนุภาคไม่สม่ำเสมอจึงเกิดการหดตัวขึ้น

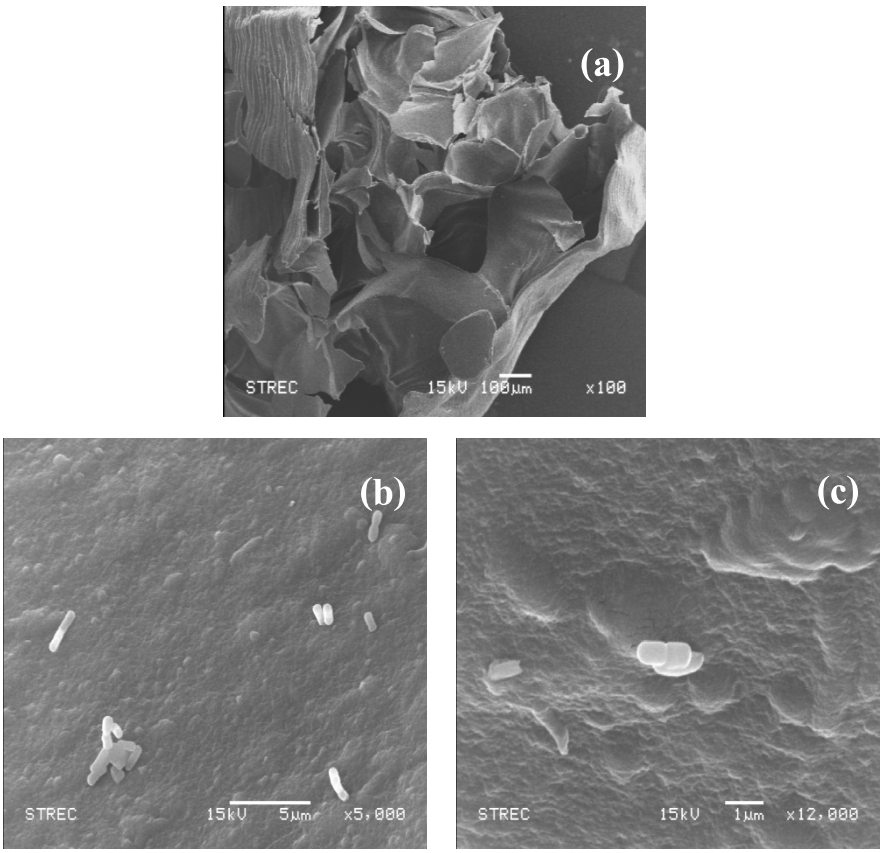


รูปที่ 7 แสดงลักษณะทางกายภาพของไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ภาพซ้าย (a), (b) , (c) แสดงถึงไมโครแคปซูลที่ไม่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ลักษณะรอยย่นของผิว และภาพตัดขวางของไมโครแคปซูลหลังการทำแห้งเยือกแข็งตามลำดับ

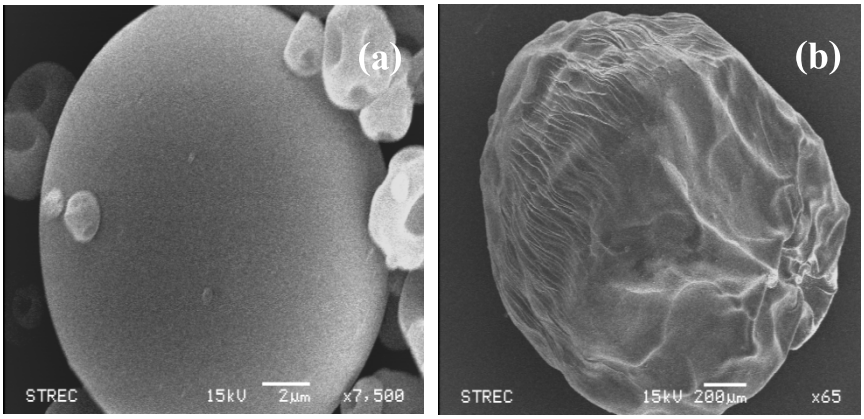
ภาพขวา (d), (e), (f) แสดงถึงไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ลักษณะรอยย่นของผิว และภาพตัดขวางของไมโครแคปซูลหลังการทำแห้งเยือกแข็งตามลำดับ

จากรูปที่ 7 พบว่าอนุภาคที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 และไม่มีการบรรจุเชื้อมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นทรงกลม ผิวย่นเป็นริ้วเนื่องมาจากการทำให้แห้งจนอนุภาคเหี่ยว อนุภาคไม่เกาะกลุ่ม ปริมาตรของอนุภาคลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อตัดตามขวางดูลักษณะภายในของอนุภาคพบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นแคปซูล เห็นขอบเปลือกชัดเจน ภายในเป็นช่องว่าง ขนาดของอนุภาคไมโครแคปซูลที่ไม่มีการบรรจุเชื้อ คือ 1.496 mm ส่วนขนาดของอนุภาคที่มีการบรรจุเชื้อคือ 1.507 mm



รูปที่ 8 แสดงลักษณะพื้นผิวภายในของไมโครแคปซูลที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด
(a) ภาพตัดขวางของไมโครแคปซูลหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง
(b),(c) ภาพเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่อยู่บริเวณผิวภายในไมโครแคปซูล

จากรูปที่ 8 พบว่ามีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 เกาะตามผิวภายในไมโครแคปซูล ลักษณะเชื้อที่พบมีรูปร่างเป็นท่อนเดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้น ไม่มีการเคลื่อนที่ มีขนาด 1 μm



รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1
(a) ไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้ง
(b) ไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการแห้งเยือกแข็ง

จากรูปที่ 9 พบว่าอนุภาคไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 วิธีมีลักษณะเป็นทรงกลม ลักษณะผิวของไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้งจะมีผิวเรียบ แต่บางอนุภาคมีลักษณะเว้า ซึ่งแตกต่างจากไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการแห้งเยือกแข็งที่มีผิวขรุขระเป็นรอยย่น ไม่มีการเว้า และไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้งมีขนาดเล็กกว่าไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการแห้งเยือกแข็ง

4.2 ผลการศึกษาปริมาณความชื้น (moisture content) ของไมโครแคปซูลที่ผ่านการทำให้แห้งทั้ง 2 วิธี

จากงานวิจัยของ Robert และคณะ (2009) ได้ทดลองกระบวนการพ่นแห้งเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. พบว่าปริมาณความชื้นที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์แห้งคือ 3.79%-4.10% ถ้าปริมาณความชื้นของไมโครแคปซูลมีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่าช่วงที่เหมาะสม อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่าไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้งและไม่บรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 มีปริมาณความชื้น 15.05% ส่วนไมโคร

แคปซูลที่บรรจุเชื้อมีปริมาณความชื้น14.74% ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นความชื้นที่ได้มีค่าสูงกว่า 4.10% มาก แต่อัตราการรอดชีวิตไม่สามารถหาค่าได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการทดลอง

จากงานวิจัยของ Zayed และคณะ (2004) ได้ทดลองกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งเชื้อ *Lactobacillus salivarius* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. พบว่าปริมาณความชื้นเหมาะสมที่ให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อสูงสุดคือ 2.8%-5.6% ถ้าปริมาณความชื้นค่ามากกว่าหรือน้อยกว่าช่วงที่เหมาะสมจะส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลง และจะไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อที่ปริมาณความชื้น 16.2% เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่าไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งและไม่บรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 มีปริมาณความชื้น 1.91% ส่วนไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อมีปริมาณความชื้น 2.00% ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นความชื้นที่ได้มีค่าน้อยกว่า 2.8% และปริมาณของเชื้อลดลงจาก 5.194×10^{10} CFU เหลือ 1.466×10^{8} CFU

ในงานวิจัยนี้กระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ ได้แก่ การพ่นแห้งและการทำแห้งเยือกแข็งทำให้ไมโครแคปซูลที่ไม่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแต่ละวิธีมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสำหรับไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแต่ละวิธีมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งมีปริมาณความชื้นมากกว่าช่วงที่เหมาะสม อาจส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อลดลง ดังนั้นควรลดปริมาณความชื้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ 3.79%-4.10% ส่วนไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณความชื้นน้อยกว่าช่วงที่เหมาะสมเล็กน้อย พบปริมาณของเชื้อลดลงจาก 5.194×10^{10} CFU เหลือ 1.466×10^{8} CFU โดยสาเหตุที่ปริมาณเชื้อลดลงในกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งอาจเกิดจากน้ำได้แก่ free water, intermediate water และ structured water ได้ถูกกำจัดออกไป ส่งผลให้โปรตีนในเซลล์ถูกทำลายเชื้อจึงตายลงในที่สุด[11]

4.3 อัตราการรอดชีวิตของ เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ภายหลังกระบวนการทำให้แห้ง

การทำให้แห้งด้วยกระบวนการพ่นแห้งเกิดการปนเปื้อนขึ้นทำให้ไม่สามารถหาปริมาณเชื้อภายหลังกระบวนการทำให้แห้งได้ ซึ่งสาเหตุของการปนเปื้อนอาจเกิดได้หลายสาเหตุดังนี้

1. ปนเปื้อนจาก alginate ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ เนื่องจากโพลิเมอร์ alginate ทนความร้อนได้ที่ 70°C ดังนั้นเมื่อนำไป autoclave ที่ 121°Cจะพบว่าความหนืดลดลง

เนื่องจากพอลิเมอร์เกิดการสลายตัวเมื่อโดนความร้อนสูงจึงไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ และเมื่อนำสารละลาย alginate ไปกรองผ่าน Disc filter ขนาด 0.22 และ 0.45 micrometers พบว่ากรองได้ยากเนื่องจากสารละลายมีความหนืดสูง จึงเป็นไปได้ยากที่จะกรองในปริมาณมาก จึงเลือกใช้วิธีการรมผง alginate ด้วย ethylene oxide gas ในการทำให้ปราศจากเชื้อแทน

2. ปนเปื้อนจากขั้นตอนการเตรียมเชื้อ ในขั้นตอนนี้สามารถเกิดการปนเปื้อนได้ตั้งแต่ stock ของเชื้อที่ใช้แต่ที่ทำทดลองไม่พบการปนเปื้อนจากจุดนี้ มักเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้นานจนเกิดการปนเปื้อนมากกว่า การแก้ไขในขั้นตอนนี้คือใช้ aseptic technique และเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่มาใช้
3. ปนเปื้อนจากขั้นตอนการเก็บเชื้อ เนื่องจากขั้นตอนต้องใช้เวลานานและต้องมีการสมดุลน้ำหนักของหลอด centrifuge จึงมีโอกาศที่สปอร์ของราจะปลิวเข้ามาปนเปื้อนได้ จึงใช้ aseptic technique และทำการเก็บเชื้อภายใต้ laminar air flow
4. ปนเปื้อนจากเครื่องพ่นแห้ง เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องที่ไม่ใช่ชนิด aseptic spray dryer ทำให้การคุมภาวะปราศจากเชื้อเป็นไปได้ยาก กล่าวคืออุปกรณ์ของเครื่อง เช่น chamber เป็นต้นมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะเอาเข้าตู้อบได้จึงทำได้เพียงนำส่วนของ collector เข้าอบก่อนใช้ อากาศที่หมุนเวียนภายในเครื่องถูกปั๊มดูดเข้ามาโดยไม่ได้ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อก่อน และสภาวะแวดล้อมบริเวณเครื่องพ่นแห้งไม่เหมาะสม

จากสาเหตุดังกล่าวทั้งหมดข้างต้นพบว่าสาเหตุที่คาดว่าทำให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นนั้นมาจากสาเหตุจากเครื่องพ่นแห้ง ดังนั้นในการแก้ไขการปนเปื้อนในอนาคตอาจทำได้โดยใช้ aseptic spray dryer

การทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 มีจำนวนลดลงภายหลังกระบวนการทำให้แห้ง โดยมีปริมาณของเชื้อรอดชีวิตเท่ากับ 1.466×10^{8} CFU จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูลเท่ากับ 5.194×10^{10} CFU ดังนั้นอัตราการลดลงของเชื้อ

คิดเป็น 2 log โดยปริมาณเชื้อที่ลดลงอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย, ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียหรือความเข้มข้นของเซลล์, freezing rate, การเติม Cryoprotectants, และ process parameters อื่นๆ นอกจากนี้อาจเกิด osmotic shock, membrane injury, intracellular ice formation และ recrystallization ในระหว่างกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งทำให้เชื้อตายลงได้

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อหลังกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งกับรายงานการวิจัยอื่นพบว่า การทำไมโครแคปซูลก่อนกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ไม่ช่วยให้เพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อแตกต่างจากกรณีของเชื้อที่ไม่ได้ทำไมโครแคปซูล

งานวิจัยของ Damjanovic และคณะ (1967) ได้ทำการทดลองทำแห้งเยือกแข็ง *Lactobacillus bifidus* โดยปริมาณเชื้อก่อนการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณ 1×10^{7} – $1x10^{8}$CFU/mL โดยมี sucrose 8% และ skim milk 5% ทำหน้าที่ Cryoprotectant พบว่าภายหลังการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณเชื้อเหลือ 1.2×10^{7} CFU/mL งานวิจัยของ Otero และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองทำแห้งเยือกแข็ง *Lactobacillus gasseri* โดยปริมาณเชื้อก่อนการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณ 3.2×10^{10} CFU/mL ภายหลังการทำแห้งเยือกแข็งโดยไม่มีการเติม Cryoprotectant พบว่ามีปริมาณเชื้อเหลือ 3×10^{8} CFU/mL งานวิจัยของ Nualkaekul และคณะ(2012) ได้ทำการทำแห้งเยือกแข็งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* โดยปริมาณเชื้อก่อนการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณ 3×10^{10} CFU/mL ภายหลังการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณเชื้อเหลือ 6×10^{7} CFU/mL งานวิจัยของ Chen และคณะ (2012) ได้ทำการทดลองทำแห้งเยือกแข็ง *Lactobacillus acidophilus* โดยปริมาณเชื้อก่อนการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณ 1.0-3.0x10^{9} CFU/ml โดยมี trehalose 5% และ sucrose 5% ทำหน้าที่ Cryoprotectant พบว่าภายหลังการทำแห้งเยือกแข็งมีปริมาณเชื้อเหลือ 2-3×10^{8} CFU/mL

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. ก่อนการทำแห้งเยือกแข็งมีจำนวน 10^{8}-10^{10} CFU/mL และเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งพบว่ามีปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. เหลือ 10^{7}-10^{8} CFU/mL นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม Cryoprotectant สามารถช่วยลดอัตราการตายของเชื้อลง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ที่มีปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ลดลงภายหลัง

กระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง โดยปริมาณเชื้อลดลงจาก 5.194 x10^{10} CFU เหลือ 1.466 x10^{8} CFU แสดงให้เห็นว่าการทำไมโครแคปซูลจะไม่ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกในการทำแห้งเยือกแข็งแต่การทำไมโครแคปซูลมีประโยชน์ต่อการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น อาหารแช่แข็ง ความเป็นกรดในโยเกิร์ต และสภาวะความเป็นกรดและด่างของทางเดินอาหาร เป็นต้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อโพรไบโอติกมีอายุในการเก็บรักษาได้นานขึ้นและมีปริมาณเชื้อไปถึงบริเวณลำไส้ได้มากขึ้น ดังนั้นอาจมีการเติม Cryoprotectant เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โดยภาพรวมไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งทั้ง 2 กระบวนการ มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกัน กล่าวคือไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งและกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งมีลักษณะกลม และไม่เกาะกลุ่มกัน แต่อนุภาคหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งจะมีผิวเรียบบางอนุภาคมีลักษณะเว้า ส่วนอนุภาคหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งผิวอนุภาคย่นเป็นริ้ว ไม่มีลักษณะเว้า ขนาดอนุภาคหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งมีขนาดเล็กกว่าอนุภาคหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง และปริมาณความชื้นจากกระบวนการพ่นแห้งมีค่าแตกต่างจากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกระบวนการพ่นแห้งมีปริมาณความชื้นมากกว่ากระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

อัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งไม่สามารถหาค่าได้ เนื่องจากเครื่องพ่นแห้งที่ใช้ไม่ใช่ชนิด aseptic spray dryer จึงทำให้เกิดการปนเปื้อน ส่วนอัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งพบว่าปริมาณเชื้อลดลงจาก 5.914×10^{10} CFU เป็น 1.466×10^{8} CFU

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การแก้ไขการปนเปื้อนในอนาคตอาจทำได้โดยใช้ aseptic spray dryer

2. ปริมาณความชื้นไมโครแคปซูลหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งยังมีค่ามากกว่าช่วงที่เหมาะสมที่แนะนำ โดย Robert และคณะ (2009) ดังนั้นอาจมีการศึกษาค่าพารามิเตอร์กระบวนการพ่นแห้งเพื่อให้ได้ปริมาณความชื้นที่เหมาะสม

3. อาจมีการเติม cryoprotectant ลงไประหว่างกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต

รายการอ้างอิง

เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. Microencapsulation: เทคโนโลยีจิ๋วแต่แจ๋ว. Technology Promotion Mag. 2009 Sep; 36(20): 36-42.

ฉันทรา พูนศิริ. เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี: 57-60.

Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000046. [online]. Available from: http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153769.htm [Update2000 Sep; 2012 Feb]

Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhea. Cochrane Database of Systematic Reviews 2010. 2010; 11.

Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science & Technology. 2007; 18: 240-251.

Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. Journal of Microbiological Methods. 2004; 56: 27-35.

Chen M, Mustapha A. Survival of freeze-dried microcapsules of a-galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. Food Microbiology. 2012; 30: 68-73.

Chen MJ, Chen KN. Encapsulation of Probiotics in Alginate Systems. CRS Delivering Bioactives Newsletter. 2008; 25(2): 7-9

Damjanovic V, Radulovic D. Survival of *Lactobacillus bifidus* after Freeze drying. Cryobiology. 1967; 1(1): 30-32.

Giralt J, Perez RJ, Romero J, Verges R, Biete A, Arenas A, Cobo J, Guarner F. Double-Blind, Multicenter, Randomized, Placebo-controlled Nutritional Trial of the Efficacy of Fermented Milk With the Probiotic *Lactobacillus Casei* Dn-114001 in Preventing Radiation-Induced Diarrhea in Patients With Gynecologic Cancer Treated With Pelvic Radiotherapy; 48: S129.

GPO.org [homepage on the Internet]. Freeze Drying[cited 2012 Dec 21]. Available from: http://www.gpo.or.th/rdi/html/t34-t35-g35-g38b.html

GPO.org [homepage on the Internet]. เทคโนโลยี Freeze-Drying[cited 2012 Dec 21]. Available from: http://www.gpo.or.th/rdi/html/freeze-drying.html

Jimenez MB. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last. 2009; 101(8): 553-564.

Johnston BC, Goldenberg JZ, Vadvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. Cochrane database of systematic 2011 review. 2011; 11.

Larsen AG, Vogensen FK, Josephen J.1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs:purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produce by *Lactobacillus bavaricus*MI 401. Journal of applied microbiologgy.1993; 75(2):113-122.

Lee KY, Heo TR. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66(2): 869-873.

Michael TC, George T, Dimitris C, Vitaliy VK. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of controlled release. 2012; 162:56-67.

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservative of micro-organisms by drying; a review. Journal of microbiological methods. 2006 May 2;66(2):183-193

Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian journal of biotechnology. 2007; 5(1): 1-18.

Nualkaekul S, Deepika G, Charalampopouls D. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. Food Research International. 2012; 48: 627-633.

Otero MC, Espeche MC, Nader-Macias ME. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. Process Biochemistry. 2007; 42: 1406-1411.

Patel RP, Patel MP, Suthar AM. Spray drying technology : an overview. Indian journal of science and technology. 2009 Oct; 2(10):44-7

Robert EOS, Knorr D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. International Dairy Journal. 2009; 19: 209-214.

Saarela M, Virkajarvi I, Alakomi HL, Mattila PS, Matto J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. International Dairy Journal. 2006; 16: 1477-1482.

Schoug A, Olsson J, Carlfors J, Schnurer J, Hakansson S. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3—effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. Cryobiology. 2006; 53: 119-127.

Sheu TY, Rosenberg M. Microstructure of microcapsule consisting of whey proteins and carbohydrates. Journal of Food Science. 63(3): 491-494.

Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswany R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology. 2000; 62: 47-55.

Zayed G, Roos YH. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. Process Biochemistry. 2004; 39: 1081-1086.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลที่ไม่มีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)	อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)	อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)
1	1.0	23	2.0	45	1.5
2	1.0	24	1.8	46	1.5
3	1.0	25	1.2	47	1.5
4	1.2	26	1.2	48	1.2
5	1.5	27	1.2	49	1.5
6	2.0	28	1.5	50	1.5
7	1.5	29	2.0	51	1.0
8	1.5	30	1.2	52	1.5
9	1.5	31	2.0	53	1.5
10	1.5	32	2.0	54	1.0
11	1.2	33	1.5	55	1.2
12	1.2	34	1.5	56	1.5
13	2.0	35	2.0	57	1.0
14	1.1	36	2.0	58	1.0
15	1.0	37	2.0	59	1.2
16	1.5	38	1.2	60	1.2
17	1.5	39	1.0	61	1.2
18	1.1	40	1.2	62	1.1
19	1.5	41	1.5	63	1.5
20	2.0	42	1.8	64	1.5
21	1.8	43	2.0	65	1.2
22	1.5	44	1.1	66	1.5

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลที่ไม่มีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง(ต่อ)

อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)	อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)
67	1.5	84	2.0
68	2.0	85	2.0
69	1.2	86	2.0
70	1.5	87	1.5
71	1.0	88	1.0
72	1.5	89	1.5
73	1.0	90	1.8
74	1.2	91	2.0
75	2.0	92	2.0
76	1.5	93	2.0
77	1.5	94	1.5
78	1.5	95	1.2
79	2.0	96	1.2
80	2.0	97	1.2
81	2.0	98	1.2
82	2.0	99	1.5
83	2.0	100	1.8

ขนาดอนุภาคเฉลี่ยมีค่า 1.496 mm

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.348

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลที่มีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)	อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)	อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค(mm)
1	1.0	23	1.2	45	2.0
2	1.5	24	2.0	46	2.0
3	2.0	25	1.5	47	2.1
4	2.0	26	1.1	48	1.2
5	1.0	27	2.0	49	1.2
6	1.0	28	1.0	50	2.1
7	1.0	29	1.5	51	1.2
8	1.2	30	1.2	52	1.5
9	1.2	31	1.5	53	1.5
10	1.5	32	1.5	54	2.0
11	2.0	33	2.0	55	2.0
12	2.0	34	2.0	56	2.0
13	2.0	35	1.0	57	1.5
14	1.5	36	2.0	58	1.2
15	2	37	1.0	59	1.2
16	1.1	38	1.5	60	2.2
17	1.2	39	1.5	61	2.0
18	1.5	40	1.2	62	2.0
19	1.5	41	1.0	63	2.0
20	1.2	42	1.0	64	2.0
21	2.0	43	1.5	65	1.2
22	1.2	44	1.2	66	2.2

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลที่มีเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง(ต่อ)

อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค (mm)	อนุภาคที่	ขนาดอนุภาค (mm)
67	2.0	84	1.2
68	1.2	85	1.2
69	1.5	86	2.0
70	1.2	87	2.0
71	2.0	88	1.5
72	2.0	89	1.5
73	1.2	90	2.0
74	1.2	91	1.2
75	1.5	92	1.1
76	1.2	93	1.0
77	2.0	94	1.0
78	1.2	95	1.2
79	1.0	96	1.5
80	1.0	97	1.2
81	1.0	98	1.4
82	1.5	99	1.5
83	1.2	100	2.0

ขนาดอนุภาคเฉลี่ยมีค่า 1.507 mm

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.394

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น (moisture content) ของไมโครแคปซูลที่ไม่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

ตัวอย่างที่	%moisture content
1	1.96
2	1.98
3	2.05
เฉลี่ย	2.00
SD	0.05

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น (moisture content) ของไมโครแคปซูลที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

ตัวอย่างที่	%moisture content
1	1.94
2	1.91
3	1.88
เฉลี่ย	1.91
SD	0.03

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น (moisture content) ของไมโครแคปซูลที่ไม่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้ง

ตัวอย่างที่	%moisture content
1	14.95
2	15.79
3	14.42
เฉลี่ย	15.05
SD	0.70

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาปริมาณความชื้น (moisture content) ของไมโครแคปซูลที่มีการบรรจุเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้ง

ตัวอย่างที่	%moisture content
1	16.01
2	14.56
3	13.64
เฉลี่ย	14.74
SD	1.12

ตารางที่ 7 แสดงค่าผลการทดสอบทางสถิติ (independent t-test) ของไมโครแคปซูลที่ไม่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแต่ละวิธี

Group Statistics

	Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Moisture	Freeze	3	1.9967	.04726	.02728
	Spray	3	15.0533	.69082	.39885

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
Moisture	Equal variances assumed	5.377	.081	-32.660	4
	Equal variances not assumed			-32.660	2.019

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Moisture	Equal variances assumed	.000	-13.05667	.39978
	Equal variances not assumed	.001	-13.05667	.39978

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Moisture	Equal variances assumed	-14.16663	-11.94671
	Equal variances not assumed	-14.76158	-11.35176

ตารางที่ 8 แสดงค่าผลการทดสอบทางสถิติ (independent t-test) ของไมโครแคปซูลที่บรรจุเชื้อหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแต่ละวิธี

Group Statistics

	Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Moisture	Freeze	3	.9100	.03000	.01732
	Spray	3	14.7367	1.19484	.68984

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
Moisture	Equal variances assumed	5.940	.071	-20.037	4
	Equal variances not assumed			-20.037	2.003

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Moisture	Equal variances assumed	.000	-13.82667	.69006
	Equal variances not assumed	.002	-13.82667	.69006

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
Moisture	Equal variances assumed	-15.74257	-11.91076
	Equal variances not assumed	-16.79216	-10.86117

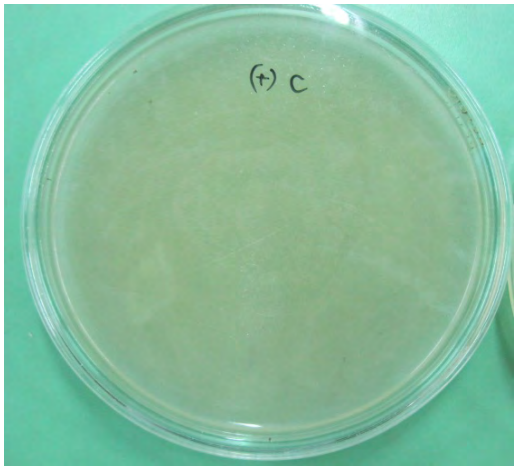
ตารางที่ 9 แสดงผลการนับจำนวน Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการพ่นแห้ง

Dilution ที่	ลักษณะความขุ่นใส	จำนวน Colony plate 1	จำนวน Colony plate 2	จำนวน Colony plate 3	จำนวน Colony เฉลี่ย
10^{-1}	ขุ่น	NA	NA	NA	NA
10^{-2}	ขุ่น	NA	NA	NA	NA
10^{-3}	ใส	>300	>300	NA	>300
10^{-4}	ใส	>300	>300	NA	>300
10^{-5}	ใส	>300	>300	NA	>300
10^{-6}	ใส	>300	>300	NA	>300
10^{-7}	ใส	268	280	281	276
10^{-8}	ใส	25	36	37	32
10^{-9}	ใส	0	0	1	0
10^{-10}	ใส	2	4	1	2
10^{-11}	ใส	0	0	0	0
10^{-12}	ใส	0	0	0	0
10^{-13}	ใส	0	0	0	0
10^{-14}	ใส	0	0	0	0
10^{-15}	ใส	0	0	0	0
Negative control	NA	0	0	0	0
Positive control	ขุ่น	>300	>300	>300	>300

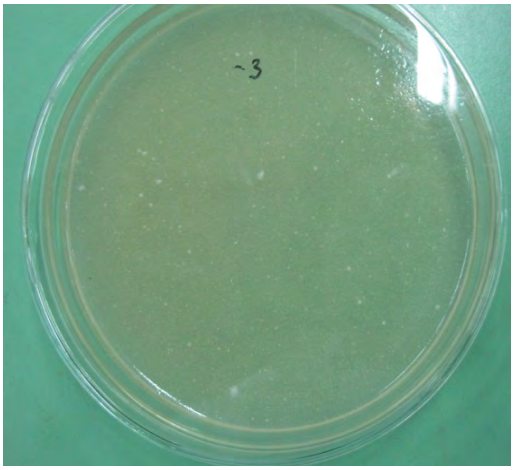
หมายเหตุ : NA = ไม่ได้ทำการทดลอง

รูปที่ 10 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการพ่นแห้ง

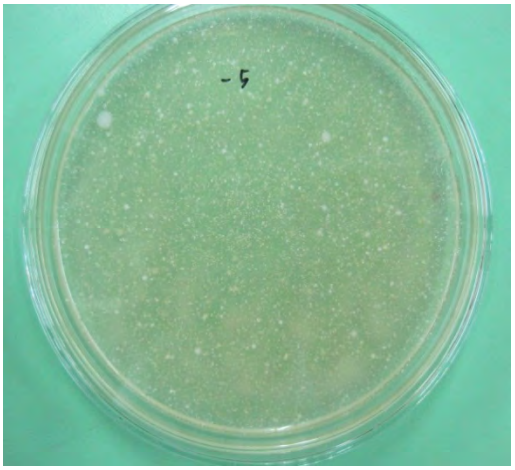
Positive control



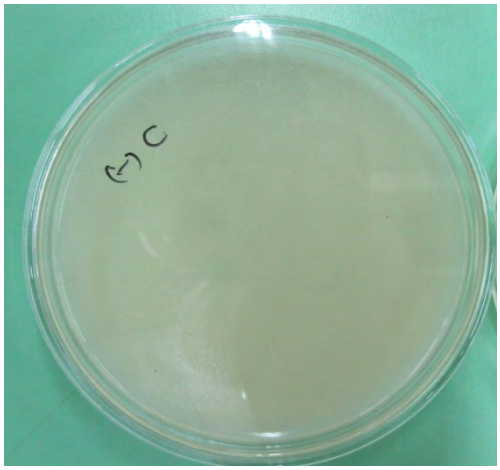
10^{-3}



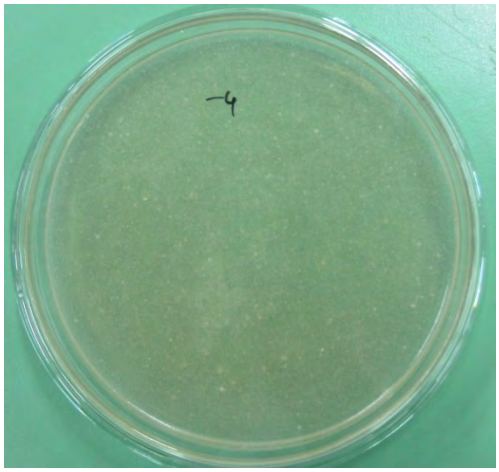
10^{-5}



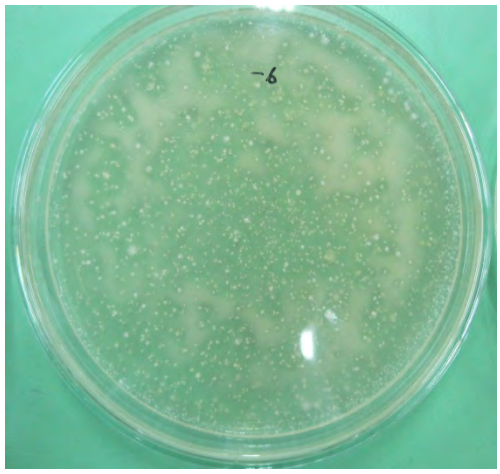
Negative control



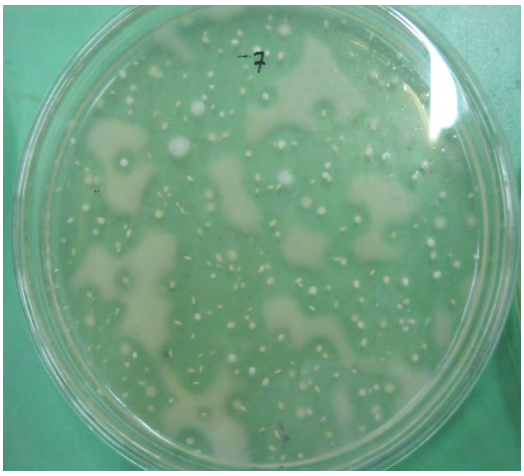
10^{-4}



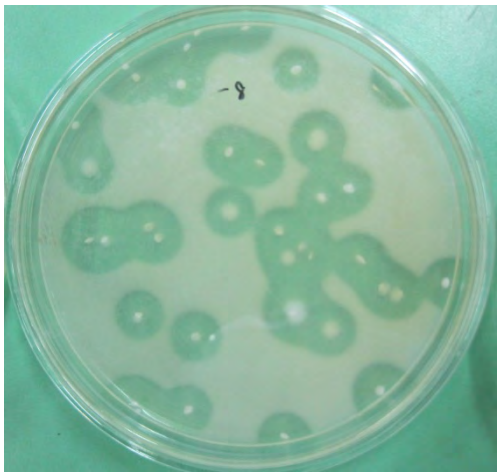
10^{-6}



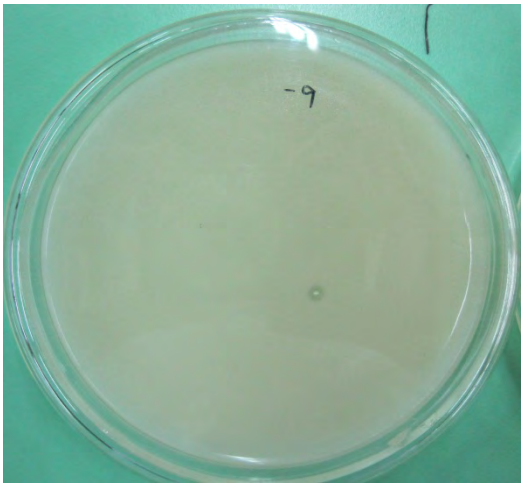
10^{-7}



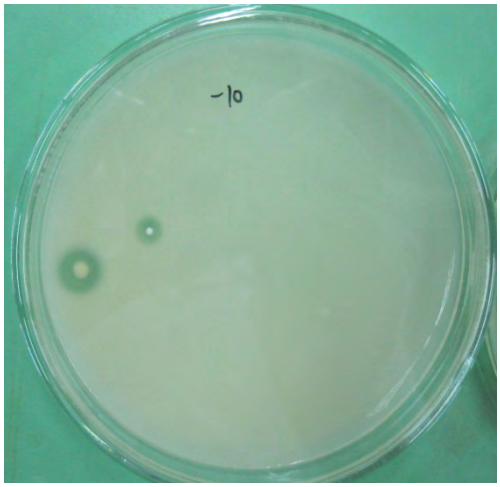
10^{-8}



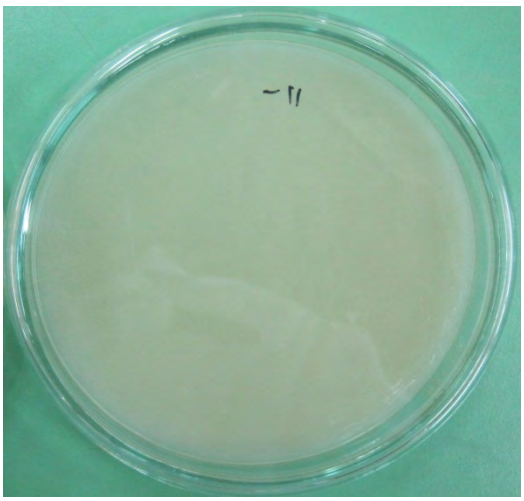
10^{-9}



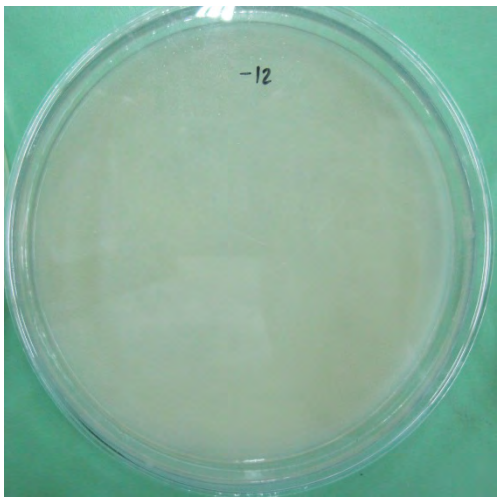
10^{-10}



10^{-11}



10^{-12}



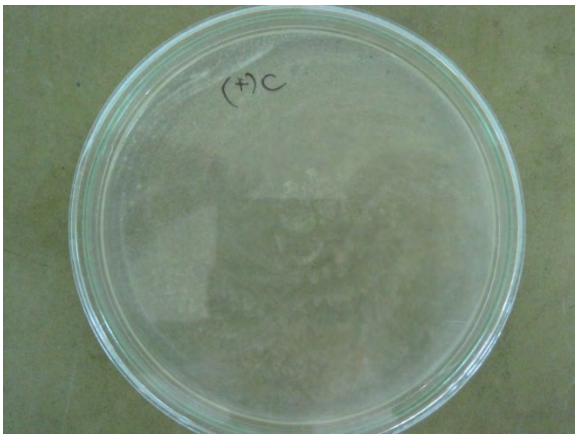
ตารางที่ 10 แสดงผลการนับจำนวน Colony เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการพ่นแห้ง

Dilution ที่	ลักษณะความขุ่นใส	จำนวน Colony plate 1	จำนวน Colony plate 2	จำนวน Colony plate 3	จำนวน Colony เฉลี่ย
10^{-1}	ขุ่น	NA	NA	NA	NA
10^{-2}	ใส	NA	NA	NA	NA
10^{-3}	ใส	Con	Con	Con	Con
10^{-4}	ใส	Con	Con	Con	Con
10^{-5}	ใส	Con	Con	Con	Con
10^{-6}	ใส	Con	Con	Con	Con
10^{-7}	ใส	Con	Con	Con	Con
10^{-8}	ใส	Con	Con	Con	Con
10^{-9}	ใส	0	0	0	0
10^{-10}	ใส	0	0	0	0
10^{-11}	ใส	0	0	0	0
10^{-12}	ใส	0	0	0	0
10^{-13}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-14}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-15}	NA	NA	NA	NA	NA
Negative control	NA	0	0	0	0
Positive control	ขุ่น	>300	>300	>300	>300

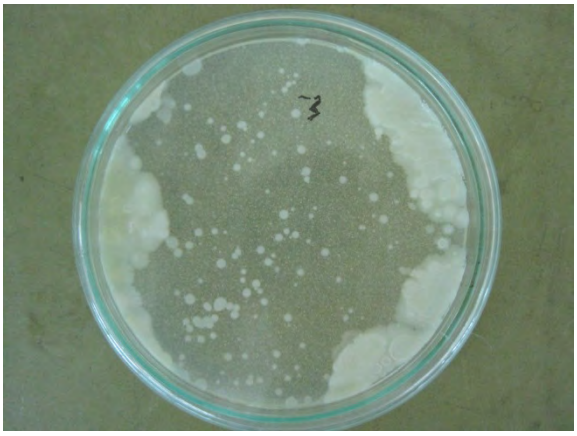
หมายเหตุ : Con = Contamination, NA = ไม่ได้ทำการทดลอง

รูปที่ 11 แสดง Colony เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการพ่นแห้ง

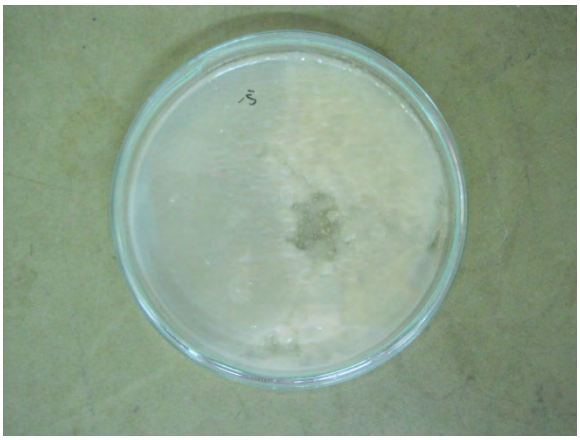
Positive control



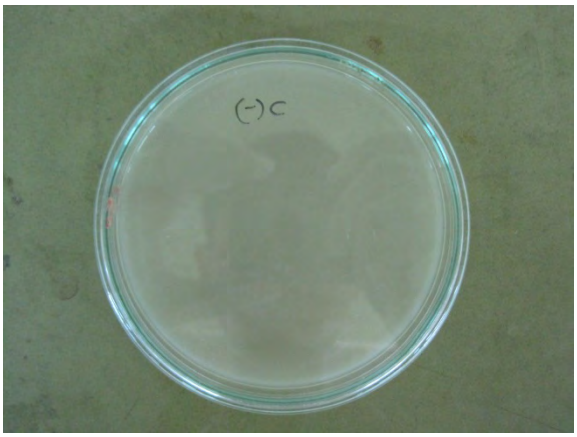
10^{-3}



10^{-5}

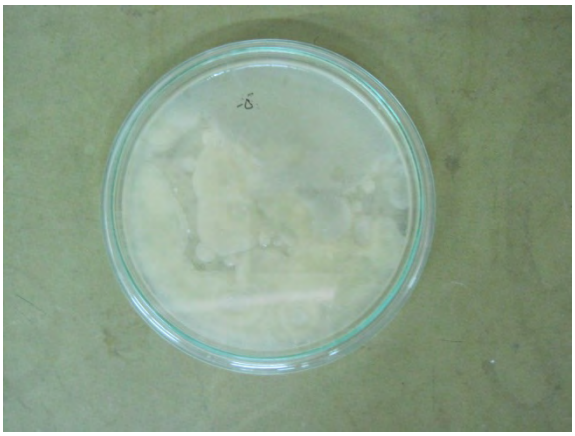


Negative control

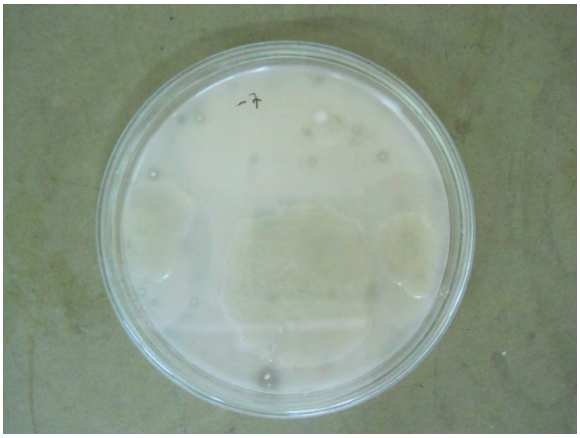


10^{-4}

10^{-6}



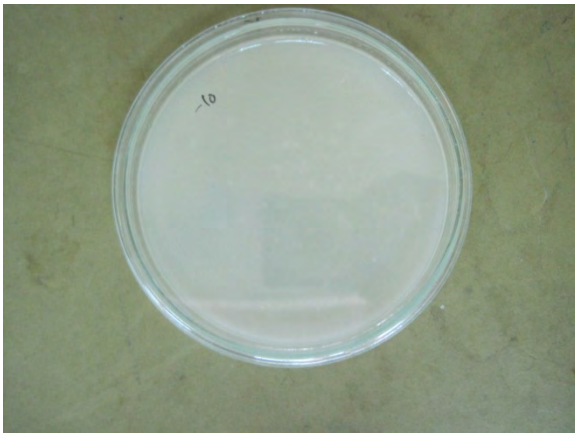
10^{-7}



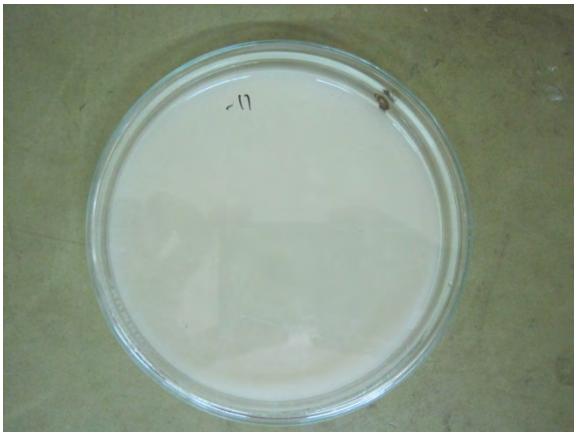
10^{-8}

10^{-9}

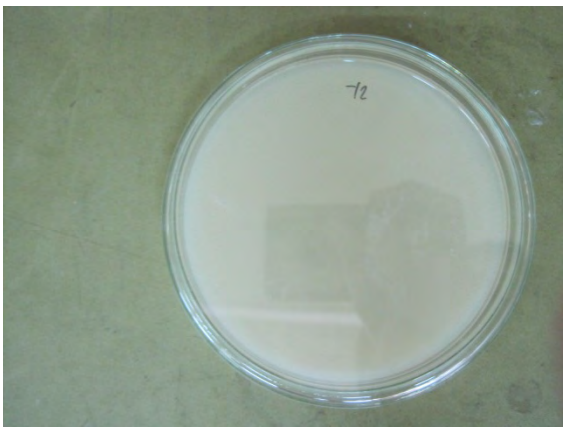
10^{-10}



10^{-11}



10^{-12}



ตารางที่ 11 แสดงผลการนับจำนวน Colony เชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง

Dilution ที่	ลักษณะความขุ่นใส	จำนวน Colony plate 1	จำนวน Colony plate 2	จำนวน Colony plate 3	จำนวน Colony เฉลี่ย
10^{-1}	ขุ่น	NA	NA	NA	NA
10^{-2}	ขุ่น	NA	NA	NA	NA
10^{-3}	ใส	NA	NA	NA	NA
10^{-4}	ใส	NA	NA	NA	NA
10^{-5}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-6}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-7}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-8}	ใส	81	196	103	126
10^{-9}	ใส	10	0	0	3
10^{-10}	ใส	4	3	2	3
10^{-11}	ใส	0	0	0	0
10^{-12}	ใส	0	0	0	0
10^{-13}	ใส	0	0	0	0
10^{-14}	ใส	0	0	0	0
10^{-15}	ใส	0	0	0	0
Negative control	NA	0	0	0	0
Positive control	ขุ่น	>300	>300	>300	>300

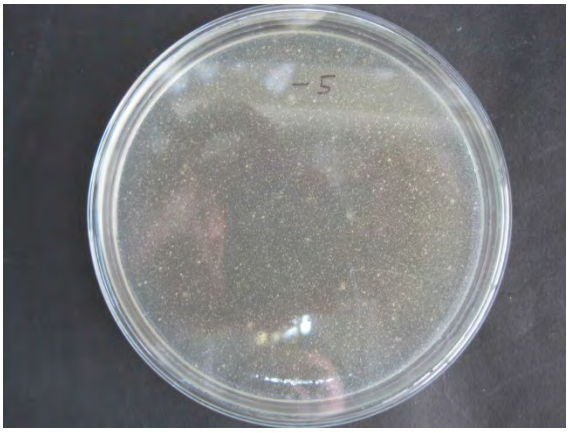
หมายเหตุ : NA = ไม่ได้ทำการทดลอง

รูปที่ 12 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง

Positive control

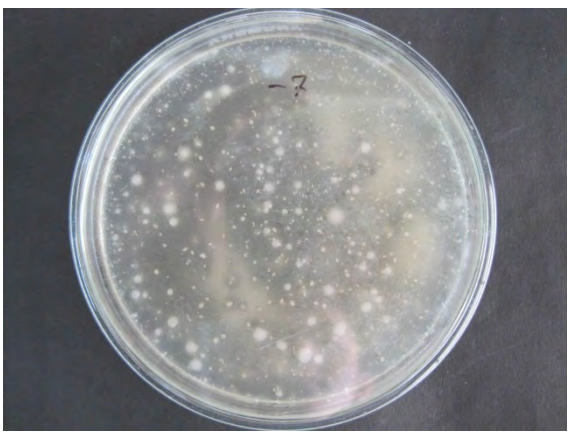
Negative control

10^{-5}

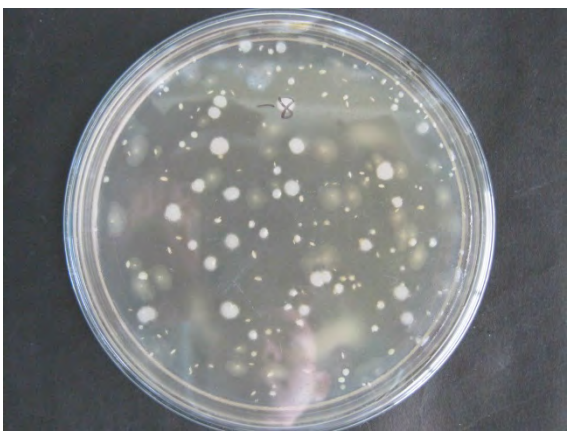


10^{-6}

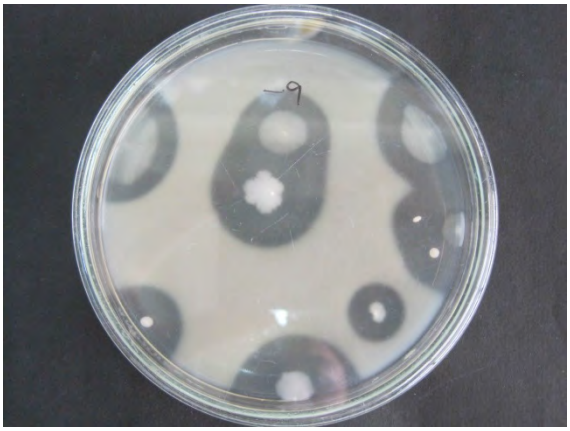
10^{-7}



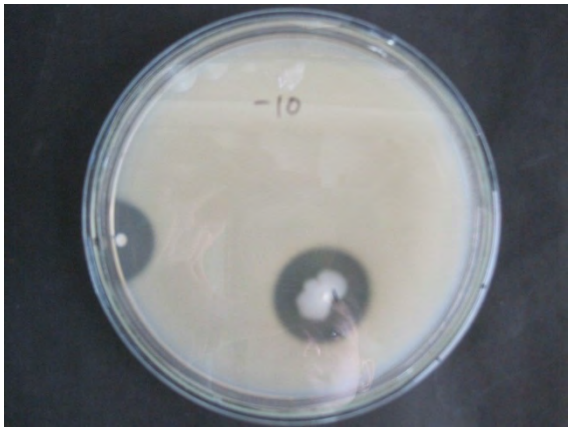
10^{-8}



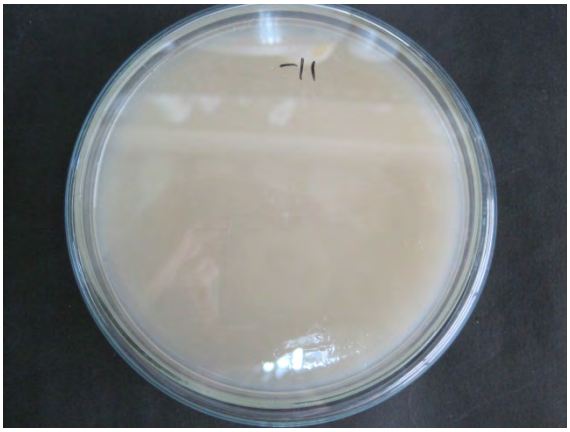
10^{-9}



10^{-10}



10^{-11}



10^{-12}

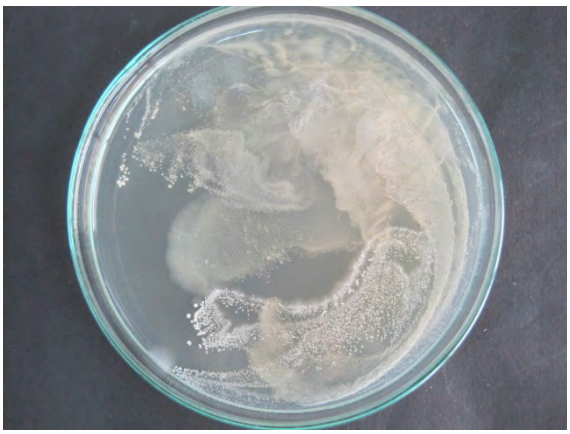
ตารางที่ 12 แสดงผลการนับจำนวน Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง

Dilution ที่	ลักษณะความขุ่นใส	จำนวน Colony plate 1	จำนวน Colony plate 2	จำนวน Colony plate 3	จำนวน Colony เฉลี่ย
10^{-1}	ขุ่น	>300	>300	>300	>300
10^{-2}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-3}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-4}	ใส	73	87	74	78
10^{-5}	ใส	10	8	6	8
10^{-6}	ใส	2	0	0	1
10^{-7}	ใส	0	0	0	0
10^{-8}	ใส	0	0	0	0
10^{-9}	ใส	0	0	0	0
10^{-10}	ใส	0	0	0	0
10^{-11}	ใส	0	0	0	0
10^{-12}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-13}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-14}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-15}	NA	NA	NA	NA	NA
Negative control	NA	0	0	0	0
Positive control	ขุ่น	>300	>300	>300	>300

หมายเหตุ : NA = ไม่ได้ทำการทดลอง

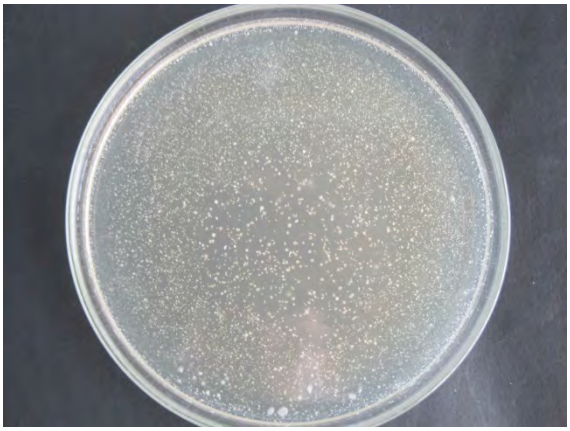
รูปที่ 13 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง

Positive control

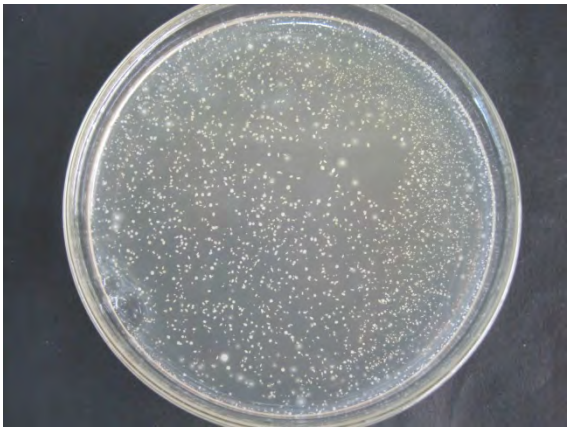


Negative control

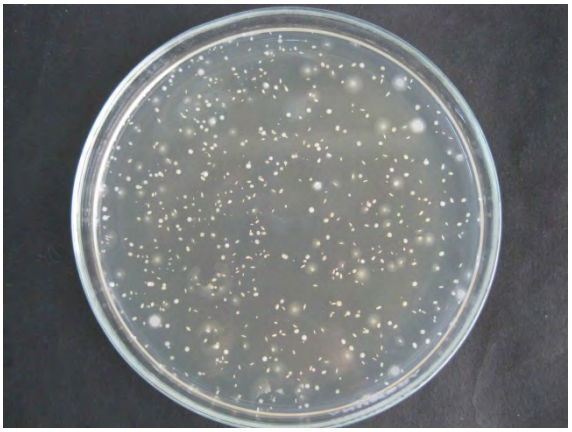
10^{-1}



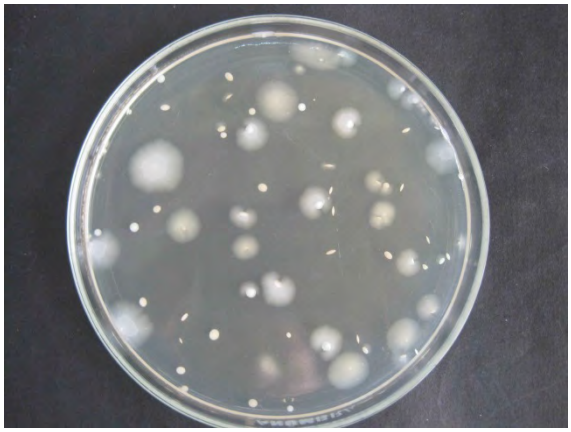
10^{-2}



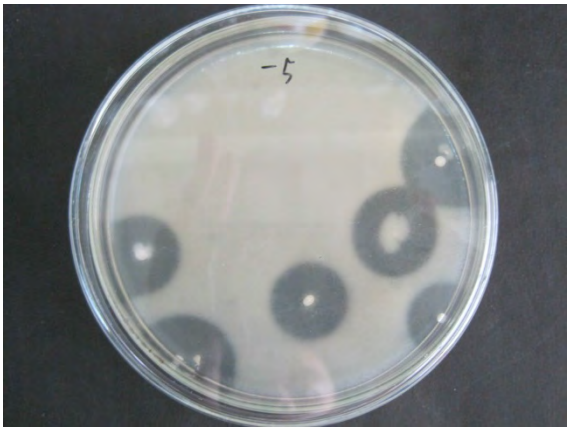
10^{-3}



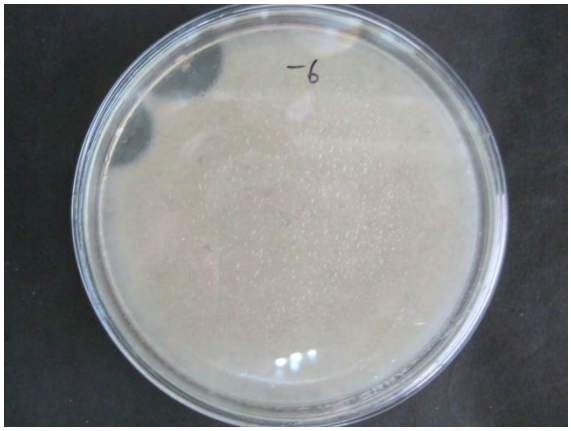
10^{-4}



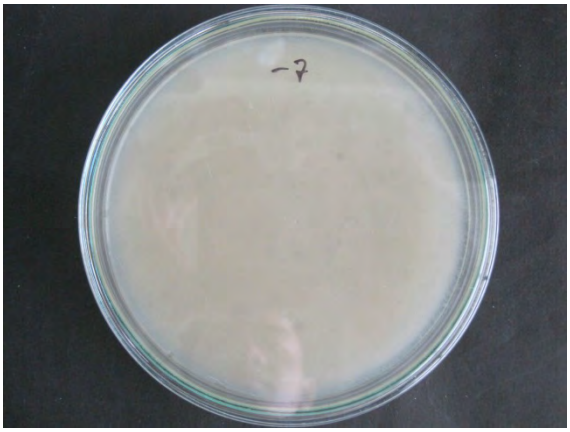
10^{-5}



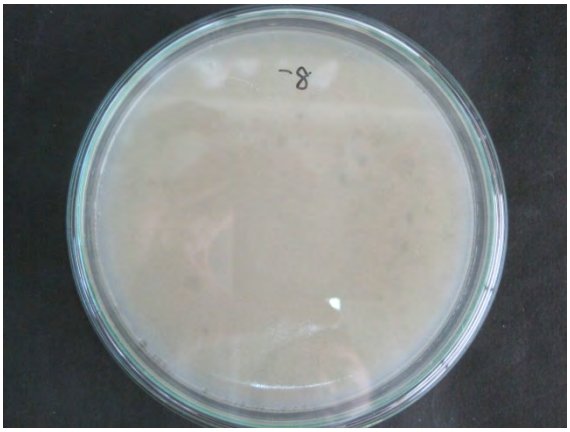
10^{-6}



10^{-7}



10^{-8}



10^{-9}

10^{-10}

ตารางที่ 13 แสดงผลการนับจำนวน Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ของสารละลาย $CaCl_2$

Dilution ที่	ลักษณะความขุ่นใส	จำนวน Colony plate 1	จำนวน Colony plate 2	จำนวน Colony plate 3	จำนวน Colony เฉลี่ย
10^{-1}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-2}	ใส	>300	>300	>300	>300
10^{-3}	ใส	98	145	121	121
10^{-4}	ใส	21	19	18	19
10^{-5}	ใส	2	1	1	1
10^{-6}	ใส	1	0	0	0
10^{-7}	ใส	1	0	0	0
10^{-8}	ใส	0	0	0	0
10^{-9}	ใส	0	0	0	0
10^{-10}	ใส	0	0	0	0
10^{-11}	ใส	0	0	0	0
10^{-12}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-13}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-14}	NA	NA	NA	NA	NA
10^{-15}	NA	NA	NA	NA	NA
Negative control	NA	0	0	0	0
Positive control	ขุ่น	>300	>300	>300	>300

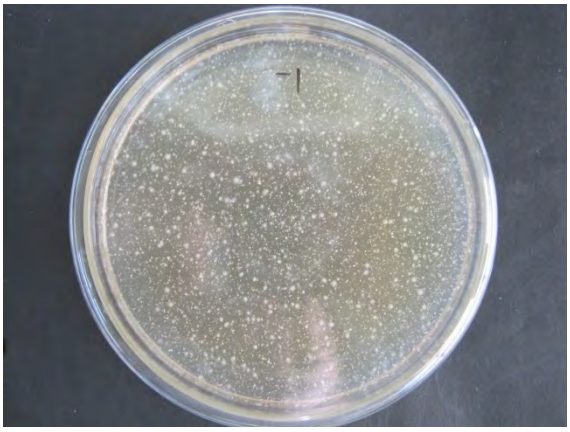
หมายเหตุ : NA = ไม่ได้ทำการทดลอง

รูปที่ 14 แสดง Colony ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 ของสารละลาย $CaCl_2$

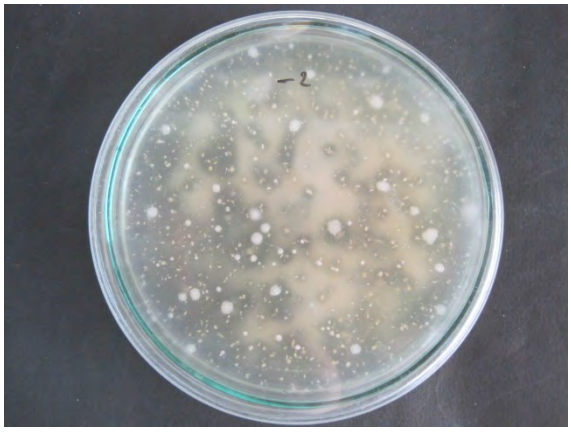
Positive control

Negative control

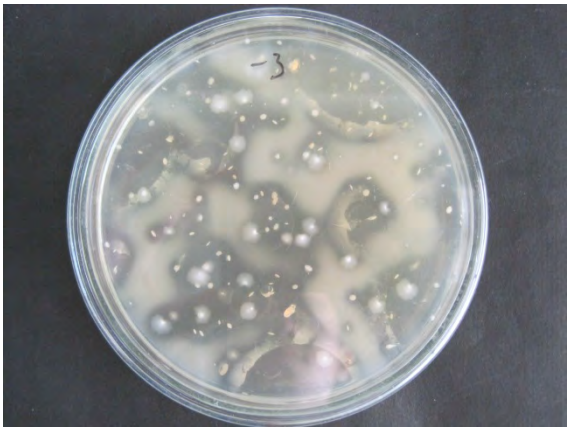
10^{-1}



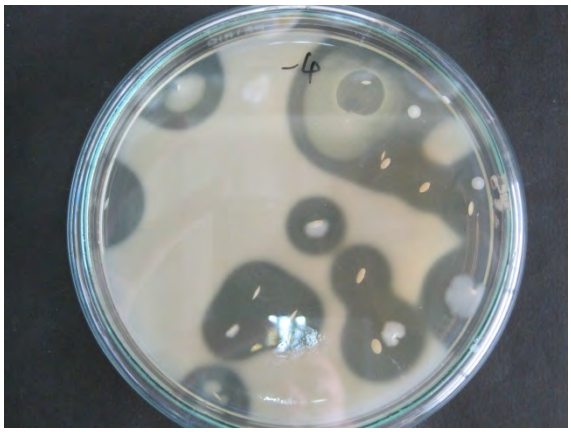
10^{-2}



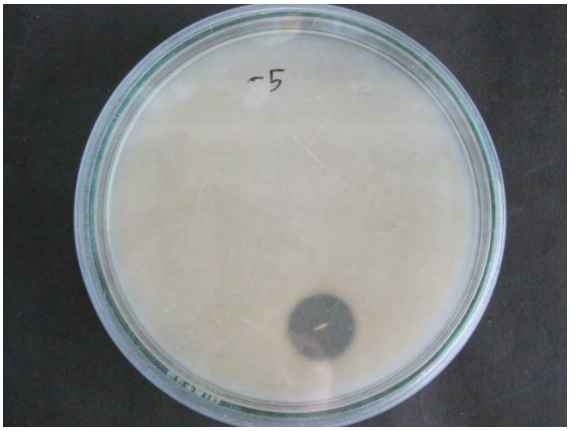
10^{-3}



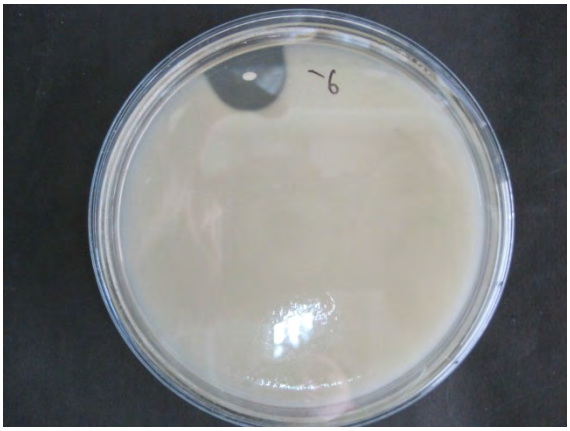
10^{-4}



10^{-5}



10^{-6}



10^{-7}

10^{-8}

10^{-9}

10^{10}

การคำนวณปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1

1. กระบวนการพ่นแห้ง

1.1 ก่อนการพ่นแห้ง

1 ปริมาณเชื้อต่อml = [(268+280+281)/3]x10^7 CFU/ml

= 276x10^7 CFU/ml

= 2.8 x10^9 CFU/ml

แต่ suspension ของ conc. *Lactobacillus* sp. SL4-1 มีปริมาตร = 4 ml

เพราะฉะนั้นปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 เริ่มต้น = 1.1 x10^{10} CFU

1.2 หลังการพ่นแห้ง

เกิดการปนเปื้อนไม่สามารถหาปริมาณเชื้อได้

2. กระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

2.1 ก่อนการทำแห้งเยือกแข็ง

ปริมาณเชื้อต่อ 1ml = $[(81+196+103)/3]x10^{8}$ CFU/ml

= $127x10^{8}$ CFU/ml

= $1.3\ x10^{10}$ CFU/ml

แต่ suspension ของ conc. *Lactobacillus* sp. SL4-1 มีปริมาตร = 4 ml

เพราะฉะนั้นปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sp. SL4-1 เริ่มต้น = $5.2\ x10^{10}$ CFU

2.2 ปริมาณเชื้อ Lactobacillus sp. SL4-1 ที่ถูก entrap ภายในไมโครแคปซูล

ปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ภายใน$CaCl_2$bathต่อ1 ml = $[(98+145+121)/3]\ x10^{3}$ CFU/ml

= $121.33\ x10^{3}$ CFU/ml

= $1.21\ x10^{5}$ CFU/ml

แต่มีสารละลาย $CaCl_2$ อยู่ 500 ml

เพราะฉะนั้นปริมาณเชื้อ SL4-1 ที่เหลืออยู่ภายใน $CaCl_2$ bath= $6\ x10^{7}$ CFU

ดังนั้นปริมาณเชื้อ SL4-1 ที่ถูก entrap ภายในไมโครแคปซูล = $(5200-6)\ x10^{7}$ CFU

= $5194\ x10^{7}$ CFU

= $5.194\ x10^{10}$ CFU

2.3 หลังการทำแห้งเยือกแข็ง

ปริมาณเชื้อหลังจากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งต่อ 1 ml

$= [(74+87+73)/3] \times 10^4$ CFU/ml

$= 7.8 \times 10^4$ CFU/ml

แต่ suspension ของเชื้อ SL4-1 หลังการละลายไมโครแคปซูล 0.1g มีปริมาตร = 10ml

เพราะฉะนั้นไมโครแคปซูล 0.1g มีปริมาณเชื้อ SL4-1 $= 78 \times 10^5$ CFU/0.1g

แต่น้ำหนักของไมโครแคปซูลที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งทั้งหมด

หนัก = 1.879 g

เพราะฉะนั้นมีปริมาณเชื้อ SL4-1 ที่รอดชีวิตทั้งหมด $= 1{,}465.62 \times 10^5$ CFU

$= 1.466 \times 10^8$ CFU