โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของโพรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
ชื่อนิสิต	นายกฤษ ชัชวารี นางสาวเบญจรัตน์ เหมือนวิหาร
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา	2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของโพรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

โดย

นาย กฤษ ชัชวารี

นางสาว เบญจรัตน์ เหมือนวิหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

ดร.ปิติ อ่ำพายัพ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประจำปีการศึกษา 2561

EFFECT OF PREBIOTICS ON GROWTH AND SURVIVAL OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

Krit Chatchavari

Benjarat Muanwiharn

Project Advisor

Chanprapa Imjongjirak, Associate Professor, Ph.D.

Piti Amparyup, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

หัวข้องานวิจัย การศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

โดย นายกฤษ ชัชวารี
นางสาวเบญจรัตน์ เหมือนวิหาร
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
ปีการศึกษา 2561

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประจำปีการศึกษา 2561

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของโพรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

โดย นายกฤษ ชัชวารี

นางสาวเบญจรัตน์ เหมือนวิหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. ปิติ อ่ำพายัพ

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตเมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray-drying) และระหว่างการเก็บรักษาของเชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของกุ้งขาว สำหรับนำไปใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหารเลี้ยงกุ้งขาวเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้มากขึ้น ในการทดลองนี้มีพรีไบโอติกที่สนใจศึกษา 2 ชนิด ได้แก่ อินนูลิน (Inulin) และ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharides; FOS) ทำการศึกษาโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีและไม่มีการเติมพรีไบโอติก เมื่อทำการการตรวจนับเชื้อทุกชั่วโมงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอินนูลินไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเชื้อโพรไบโอติอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) เมื่อทำการศึกษาผลของพรีไบโอติกต่อการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่ผ่านทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยนำเชื้อโพรไบโอติกมาผสมกับสารป้องกันเซลล์และนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยกำหนดอุณหภูมิลมร้อนขาเข้า 185 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมร้อนขาออก 85±5 องศาเซลเซียส อัตราป้อนคงที่ที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจนับเชื้อก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth, MRS broth + Inulin และ MRS broth + FOS เท่ากับ 92.28, 92.40 และ 92.40% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก และทำการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติกในถุงลามิเนตที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ โดยเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยแต่ละสัปดาห์จะวัดค่า a_w, %MC และตรวจนับเชื้อ พบว่าค่า a_w และ %MC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิดและไม่มีการเติมพรีไบโอติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิดช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

Project Title Effect of prebiotics on growth and survival of probiotic lactic acid bacteria

Student Krit Chatchavari

Benjarat Muanwiharn

Study Program Bachelor of Science in Food Technology

Advisor Chanprapa Imjongjirak, Associate Professor, Ph.D.

Co-advisor Piti Amparyup, Ph.D.

Academic Year 2018

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of prebiotics on growth and survival rates after spray-dying and during the storage of probiotics *Lactobacillus plantarum*, which is a shrimp probiotics. Two prebiotics, Inulin (3% w/w) and Fructooligosaccharides (FOS) (3% w/w) were used in this study. Following the FOS addition, it was found that growth level of probiotic *L. plantarum* was significantly stimulated compared to control group ($P \leq 0.05$). However, following the inulin treatments, there was no significant change in total probiotic numbers. Probiotic *L. plantarum* was subsequently spray-dried at 185 °C inbound hot air and 85±5 °C in the presence of the cell protection substance at 20 ml/min flow rate. It was found that the survival rate following spray-drying was 92.28% for control MRS, 92.40 for inulin, and 92.40% for FOS. The results indicated that the concentration of prebiotics had no effect on the survival rate of the probiotic as compared with controls without prebiotics. The powders of probiotics were vacuum sealed in a laminated bag kept at 4 °C and room temperature (25 °C) for 4 weeks. The aw, %MC, and probiotics count were analysed. it was found that there were no significant changes in aw, %MC and the survival rate of probiotics, stored at 4 °C. However, holding the dried probiotic cultivated in both prebiotics in the laminated bag enabled probiotic *L. plantarum* to exhibit a higher percentage of survival than in the control group, stored at room temperature (25 °C). The data indicate that two prebiotics, Innulin and FOS have applications in the protection of probiotic *L. plantarum* during storage at room temperature (25 °C).

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในระดับปริญญาบัณฑิตของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับเงินทุนอุดหนุนจากงบประมาณของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ปีการศึกษา 2561 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับงานวิจัยนี้ได้รับความเมตตา และความช่วยเหลืออย่างดีจากอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และ ดร. ปิติ อ่ำพายัพ ที่ให้ทั้งความรู้ ความเข้าใจ คำแนะนำ และคำปรึกษาต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ถ่ายทอดวิชาความรู้ด้านต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้

ยิ่งไปกว่านั้นคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนให้ได้รับการศึกษา ให้คณะผู้วิจัยได้มีความรู้ความสามารถในการประกอบวิชาชีพในอนาคต และเป็นกำลังใจสำคัญที่ทำให้คณะผู้วิจัยดำเนินชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณอำไพ เขตสาลี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางอาหาร คุณฑสร บุญยะกาญจน และคุณมณฑา ชัยปัญญา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางเคมีอาหาร คุณสราวุฒิ แถลงกิจ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกระบวนการผลิตอาหารและปฏิบัติการเฉพาะหน่วย คุณจุฑาทิพย์ พุ่มเจริญ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประกันคุณภาพอาหารและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คุณสุธินี หะริณธนาวุฒิ และคุณวิจิตรา ศรีเจริญ พี่ปริญญาโทที่ค่อยช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีทางอาหาร รวมถึงเพื่อนนิสิตร่วมชั้นปีที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และการอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆ ตลอดการทำงานวิจัยนี้ และคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์เพื่อการวิจัยและพัฒนาต่อไปในอนาคต รวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

นายกฤษ ชัชวารี

นางสาวเบญจรัตน์ เหมือนวิหาร

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่นำไปสู่การวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ขอบเขตหรือกรอบแนวคิดของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	**3**
2.1 โพรไบโอติก (Probiotics)	3
2.1.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก	3
2.1.2 *Lactobacillus Plantarum (L. plantarum)*	4
2.2 พรีไบโอติก (Prebiotics)	5
2.2.1 อินนูลิน (Inulin)	5
2.2.2 ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides; FOS)	6
2.3 เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อ	7
2.3.1 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying)	7
2.4 ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก	8
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย	8
2.5.1 ชนิดของโพรไบโอติก	8
2.5.2 สารป้องกันเซลล์	8
2.5.2.1 มอลโตเดกซ์ตริน (Maltodextrin; MD)	9
2.5.2.2 โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG)	9

2.5.3 อุณหภูมิลมขาเข้าและอุณหภูมิลมขาออก 9

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระหว่างการการเก็บรักษา 10

2.6.1 อุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษา 10

2.6.2 บรรจุผลิตภัณฑ์และสภาวะในระหว่างการเก็บรักษา 10

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and methods) 11

3.1 จุลินทรีย์ สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย 11

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 11

3.1.2 สารเคมี 11

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจนับ *L. plantarum* 11

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเชื้อสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย 11

3.1.3 อุปกรณ์ 12

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย 16

3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 16

3.2.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar 16

3.2.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 16

3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก *L. plantarum* 16

3.2.3 การเตรียมสารละลายป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย 16

3.2.3.1 สารละลาย Maltodextrin 10 %W/W + MSG 10 %W/W 16

3.2.4 การศึกษาผลของพรีไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. plantarum* เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย 17

3.2.5 การศึกษาอายุการเก็บรักษาของผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* 17

3.2.5.1 การศึกษาสภาวะการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* 17

3.2.5.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษา 17

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 18

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล (Results and discussion) 19

4.1 ผลของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก *L. plantarum* 19

4.2 ผลของพรีไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. plantarum* 21

4.3 ผลของพรีไบโอติกต่ออายุการเก็บรักษาของโพรไบโอติก *L. plantarum* 22

4.3.1 ศึกษาสภาวะการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* 22

4.3.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษา 24

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 27

5.1 สรุปผลการทดลอง 27

5.2 ข้อเสนอแนะ 27

บรรณานุกรม 28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงรายชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ถูกจัดเป็นโพรไบโอติก	4
2	แสดงรายการวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	12
3	แสดงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด	16
4	ผลของพรีไบโอติกอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	20
5	จำนวนเชื้อก่อนและหลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย และการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก	22
6	แสดงปริมาณความชื้นและค่า water activity ของผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C) บรรจุแบบสุญญากาศในถุง Laminated aluminium foil เป็นเวลา 4 สัปดาห์	23
7.1	เปรียบเทียบจำนวนเชื้อในผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C) ในแต่ละทรีทเมนท์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	25
7.2	เปรียบเทียบจำนวนเชื้อในผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C) ในแต่ละสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	26

สารบัญภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของอินนูลิน (Inulin)	5
2	โครงสร้างของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides)	6
3	เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) รุ่น SS 316L	7

สารบัญกราฟ

กราฟที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติมพรีไบโอติกที่เวลาต่างๆ	21
2	การรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย	22
3	ปริมาณความชื้นและค่า water activity ของผงโพรไบโอติกแต่ละชนิดที่เก็บรักษาไว้ที่เวลาต่างๆ	24
4	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อในผงเชื้อโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C และอุณหภูมิห้อง (25°C) และระยะเวลาต่างๆ	26

ภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก ก. ขั้นตอนการทดลอง 33

ก.1 การตรวจนับจำนวนเชื้อโดย Spread Plate Technique 33

ก.2 การหาปริมาณความชื้น (moisture content) 34

ก.3 การวัดค่า Water Activity (a_w) 34

ภาคผนวก ข. ข้อมูลผลการทดลอง 35

ภาคผนวก ค. ประวัติผู้วิจัย 38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่นำไปสู่การวิจัย

โพรไบโอติก (probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ซึ่งอาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตอื่นและเมื่อมีจำนวนที่เหมาะสมจะสามารถให้คุณประโยชน์ต่อร่างกายของผู้ให้อาศัยได้ โพรไบโอติกสามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และสร้างโมเลกุลที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้ กลุ่มของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นิยมนำมาเสริมลงในผลิตภัณฑ์อาหารคือแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria ; LAB) เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลกติกได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารหมัก (fermented food) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ชีส คีเฟอร์ เทมเป้ และกิมจิ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำ (aquatic animal feed) ตัวอย่างเช่น อาหารเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งกุ้งขาวจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจของไทยที่มีการส่งออกในปริมาณมากและสร้างรายได้ต่อปีเป็นจำนวนมาก การเสริมโพรไบโอติกลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับจุดประสงค์ในการช่วยเพิ่มผลผลิตและลดการเกิดโรคในกุ้งขาว โดยที่แบคทีเรียโพรไบโอติกจะช่วยไปยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร จึงเป็นการช่วยเพิ่มภูมิต้านทานต่อเชื้อก่อโรค และช่วยให้ระบบการย่อยและดูดซึมอาหารของกุ้งขาวดีขึ้น ดังนั้นการใช้อาหารเลี้ยงกุ้งขาวเสริมโพรไบโอติกจึงเป็นทางเลือก เพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะในการเลี้ยง และยังช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาว เป็นการลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงให้กับเกษตรกร การเก็บรักษาเชื้อโพรไบโอติกก่อนนำไปผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว อาจใช้วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เนื่องจากเป็นวิธีการทำแห้งที่ใช้พลังงานในการผลิตต่ำและยังคงสภาพของเชื้อไว้ได้ เนื่องจากเป็นการทำแห้งที่ระเหยน้ำออกอย่างรวดเร็ว ทำให้การเสียสภาพจากอุณหภูมิเกิดขึ้นน้อยลง เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ข้อจำกัดของการทำแห้งแบบพ่นฝอยคือ เมื่อทำแห้งเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อน้อยและมีอายุการเก็บรักษาที่สั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำแห้งแบบแช่เยื่อกแข็ง (lyophilization)

พรีไบโอติก (prebiotics) เป็นเส้นใยอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible carbohydrates) เช่น Lactosucrose, Lactulose, Inulin,Galactooligosaccharid และ Fructooligosaccharides เป็นต้น แต่สามารถถูกย่อยได้ด้วยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งช่วยส่งเสริมการทำงานและเพิ่มการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก ทำให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ส่งผลให้ผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทที่ส่งเสริมให้เชื้อโพรไบโอติกสามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้

ดังนั้นเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตและอายุการเก็บรักษาเชื้อโพรไบโอติกให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สำหรับการนำไปเสริมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลของพรีไบโอติกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตเมื่อผ่านทำแห้งแบบพ่นฝอยและระหว่างการเก็บรักษาของเชื้อโพรไบโอติก

1.2 <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. เพื่อศึกษาผลของพรีไบโอติกต่อการเจริญของโพรไบโอติก
2. เพื่อศึกษาผลของการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก
3. เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาของโพรไบโอติก

1.3 <u>ขอบเขตหรือกรอบแนวคิดของงานวิจัย</u>

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งค้นพบและแยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแปซิฟิก *Litopenaeus vannamei* มีส่วนช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยทำการศึกษาผลของพรีไบโอติกที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก ศึกษาผลของวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการรอดชีวิตของเชื้อ รวมทั้งศึกษาอายุการเก็บรักษา

1.4 <u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย</u>

ได้ทราบข้อมูลของพรีไบโอติกที่มีผลต่อการเจริญเติบต่อและการรอดชีวิตของโพรไบโอติก เพื่อให้สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตและการเก็บรักษาเชื้อโพรไบโอติกหลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สำหรับการนำเชื้อโพรไบโอติกไปเสริมลงในผลิตภัณฑ์อาหารเลี้ยงกุ้ง เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะในการเลี้ยงและเพิ่มผลผลิตให้เกษตรกร

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในสิ่งมีชีวิตอื่นและเมื่อมีจำนวนที่เหมาะสมจะให้คุณประโยชน์ต่อร่างกายแก่ผู้ให้อาศัย (Hill et al., 2014). กิจกรรมของโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ รวมถึงการปรับตัวของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่และระบบภูมิคุ้มกัน มีการตอบสนองโดยการสร้างสารบางชนิดที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพให้แก่โฮสต์ (Pranckute et al., 2016) กิจกรรมของโพรไบโอติกส่งผลต่อประโยชน์ด้านสุขภาพมากมาย เช่น การกำจัดคอเรสเตอรอล การบรรเทาอาการแพ้แลคโทส การต่อต้านจุลทรีย์ก่อโรค การต่อต้านเซลล์กลายพันธุ์และเซลล์มะเร็ง (Kumar et al., 2012) นอกจากนี้กระบวนการเมตาบอลิซึมของโพรไบโอติกในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) ยังส่งผลดีต่อประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติ เนื้อสัมผัส และยังช่วยยืดอายุให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร (Yusuf & Hamid, 2013)

2.1.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

สำหรับสายพันธุ์ของโพรไบโอติกที่มีศักยภาพและมีประโยชน์ต่อร่างกายจะต้องสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในร่างกายของโฮสต์ ดังนั้นโพรไบโอติกจึงต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมบางประการ โดยในปัจจุบันได้มีการทดสอบ เพื่อเป็นตัวชี้วัดว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก เช่น

- ทนต่อกรดและน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์
- สามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกและผนังลำไส้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญต่อการปรับตัวเพื่ออยู่รอดและการแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้
- ต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค
- สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย

(Saarela et al., 2000) (Mercenier et al., 2008)

<u>ตารางที่ 1</u> รายชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ถูกจัดเป็นโพรไบโอติก (Holzapfel et al., 2001)

Microorganisms considered as probiotics	
Lactobacillus species	**Bifidobacterium species**
L. acidophilus	*B. adolescentis*
L. casei	*B. animalis*
L. crispatus	*B. bifidum*
L. gallinarum	*B. breve*
L. gasseri	*B. infantis*
L. johnsonii	*B. lactis*
L. paracasei	*B. longum*
L. plantarum	
L. reuteri	
L. rhamnosus	
Other lactic acid bacteria	**Nonlactic acid bacteria**
Enterococcus faecalis	*Bacillus cereus var. toyoi*
Enterococcus faecium	*Escherichia coli*
Lactococcus lactis	*Propionibacterium freudenreichii*
Leuconostoc mesenteroides	*Saccharomyces cerevisiae*
Pediococcus acidilactici	*S. boulardii*
Streptococcus thermophiles	

2.1.2 *<u>Lactobacillus plantarum</u>*

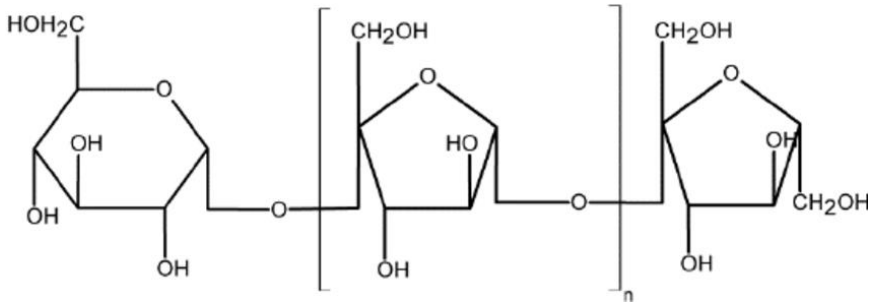
L. plantarum เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะเกิดการหมักแล้วได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด (heterofermentative) พบได้ทั่วไปในเนื้อสัตว์ ผัก ปลา และผลิตภัณฑ์จากนม (Aquilanti et al., 2007) *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะ *L. plantarum* บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อโพรไบโอติก และยังเป็นจุลินทรีย์ที่มีส่วนสำคัญทั้งในวงการอุตสาหกรรมอาหารและยา (Bove et al., 2012) เช่นเดียวกับแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย *L. plantarum* สามารถยึดเกาะบริเวณพื้นผิวของเยื่อเมือกและผนังลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตและให้ประโยชน์แก่โฮสต์ได้ (Arena et al., 2017)

2.2 พรีไบโอติก (Prebiotics)

เป็นสารอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร แต่สามารถเป็นสารอาหารสำหรับกระบวนการเมตาบอริซึมเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้ส่วนท้ายซึ่งเป็นบริเวณที่มีปริมาณกลูโคสต่ำ พรีไบโอติกที่ใช้กันในปัจจุบันมักเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถย่อยได้ (indigestible carbohydrates) ตัวอย่างเช่น disaccharides, fructooligosaccharides, oligosaccharides และ polysaccharides (Kontula et al., 1999) สำหรับพรีไบโอติกจากธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น Inulin และ fructooligosaccharide ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้กับแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli และ Bifidobacteria เนื่องจากสามารถพิสูจน์ได้ว่า ช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ในบริเวณที่มี pH ต่ำได้ (Adebola et al., 2014)

2.2.1 อินนูลิน (Inulin)

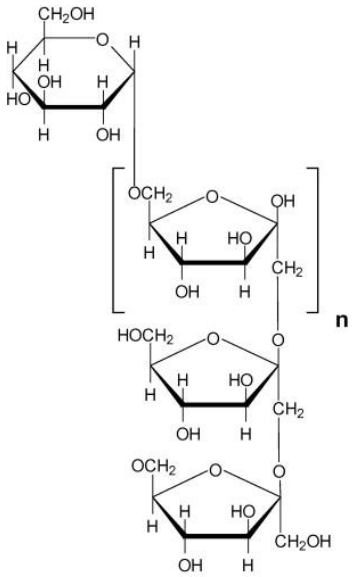
อินนูลิน หรือ α-D-glucopyranosyl-[β-D-fructofuranosyl] (n-1)-D-fructofuranoside เป็นโพลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่จัดเป็นใยอาหาร และมักถูกใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร (Franck, 2002) อินนูลินยังสามารถใช้เป็นพรีไบโอติกได้ เนื่องจากคุณสมบัติทางโครงสร้างของอินนูลินที่ไม่สามารถถูกย่อยและดูดซึมได้ในลำไส้เล็ก แต่สามารถถูกหมักได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ (Adebola et al., 2014) ในแง่ของการเป็นพรีไบโอติกของอินูลิน มีการศึกษาพบว่าเป็นสารที่ช่วยต้านการเกิดเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้อินนูลินยังถูกใช้เป็นสารทดแทนไขมันแต่สามารถละลายน้ำได้ เพราะสมบัติทางเคมีที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่มาก จึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำ ทำให้อินนูลินเกิดเป็นเจลที่เสถียรได้ที่ความเข้มข้นประมาณ 13-50% (Castelli et al., 2008)



รูปที่ 1 โครงสร้างของอินนูลิน (Inulin) (Fachri, 2015)

2.2.2 <u>ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides; FOS)</u>

ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ประเภทหนึ่งที่สามารถพบได้ในพืชตามธรรมชาติ เช่น หัวหอม ชิโครี กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง กล้วย อาร์ติโชก เป็นต้น ซึ่งโครงสร้างของ FOS ประกอบด้วยโมเลกุลของฟรุกโตสต่อกันเป็นสายโซ่ยาว ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า (1-2) โดยจำนวนหน่วยย่อยของฟรุกโตสจะมีความยาวประมาณ 2-60 หน่วย และที่ปลายสายโซ่มักจะมีโมเลกุลของกลูโคส (Duarte et al., 2010) FOS นั้นไม่สามารถถูกไฮโดรไลส์โดยเอนไซน์ไกลโคซิเดสในลำไส้เล็กจนถึงลำไส้ใหญ่ส่วนต้น แต่จะถูกย่อยได้โดยแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ และจะเปลี่ยนรูปเป็นสารต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์สายสั้น แอล-แลคเตส คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน เป็นต้น FOS มีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายอย่างประการเช่น เป็นสารให้ความหวานเล็กน้อย ไม่ให้พลังงาน และเป็นเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ FOS ยังมีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพเช่น เป็นสารต้านมะเร็ง มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุเข้าสู่ร่างกาย รวมถึงช่วยลดระดับปริมาณโคเรสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิปิด เป็นต้น (Larque, 2009)



<u>รูปที่ 2</u> โครงสร้างของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides) (Arildo José, 2011)

2.3 เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อ

2.3.1 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying)

การทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นวิธีที่ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงละเอียดที่รวดเร็วและมีต้นทุนการผลิตต่ำ นอกจากนี้ Spray drying ยังเป็นวิธีที่สามารถใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์โดยการทำให้เป็นผงแห้ง อย่างไรก็ตามในระหว่างกระบวนการผลิต จุลินทรีย์สามารถนำมาทำแห้งได้อย่างแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ก็อาจได้รับความเสียหายจากสภาวะเครียดอย่างรุนแรง เนื่องจากจะต้องผ่านอากาศที่มีความร้อนสูง และเกิดการสูญเสียน้ำอย่างกระทันหัน (Fu et al., 2011)

หนึ่งในวิธีที่ใช้ป้องกันความเสียหายต่อเซลล์จุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต คือการใช้สารป้องกัน สารเคลือบผิวที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ กลไกในการป้องกันความเสียหายต่อเซลล์จุลินทรีย์ของสารป้องกันโดยทั่วไปมีอยู่ด้วยกัน 3 แบบ ได้แก่ เพิ่มการแสดงลักษณะบางอย่างที่ช่วยให้จุลินทรีย์ทนต่อแรงเครียดได้สูงขึ้น ให้เกราะป้องกันภายนอกเซลล์จากแรงทางกายภาพ และช่วยให้มีจลนพลศาสตร์การทำแห้งดียิ่งขึ้น ไม่นานมานี้มีการศึกษาต่างๆได้รายงานว่ามีการ Spray drying แลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยใช้สารป้องกันแบบที่ให้เกราะป้องจากแรงทางกายภาพ (Guerin et al., 2017)

รูปที่ 3 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) รุ่น SS 316L (Hemraj Enterprises. 2018)

2.4 ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก

ปัจจุบันมีการนำเอาโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารหลากหลายประเภท อาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น นมเปรี้ยว นัตโต มิโสะ และเทมเป้ของประเทศญี่ปุ่น โยเกิร์ตและคีเฟอร์ของประเทศแถบยุโรป นมแพะหมักของอินเดีย ชีสด้า ซาวเคราท์ ซึ่งเป็นกะหล่ำปลีหมักของเยอรมันนี แบคทีเรียโพรไบโอติกนอกจากในรูปแบบที่เป็นส่วนที่ผสมอยู่ในอาหารแล้ว ในปัจจุบันยังมีอีกหลายรูปแบบ เช่น แคปซูล ผงผสมกับเครื่องดื่ม ลูกอม หรือแม้แต่เครื่องดื่มหลากหลายประเภทที่มีการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกเข้าไป นอกจากนี้หากต้องการได้รับประโยชน์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกสูงสุดแล้ว ควรรับประทานอาหารที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกซึ่งเป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยในร่างกายคนเรา แต่จะเป็นอาหารที่ช่วยให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีการเจริญเติบโตและทำหน้าที่อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย อาหารที่เป็นแหล่งของพรีไบโอติก เช่น ธัญพืชต่างๆ ถั่วเขียวถั่วเหลืองถั่วแดง ถั่วดำ หน่อไม้ฝรั่ง กล้วย กระเทียม เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในภาคการเกษตร ในกลุ่มสัตว์น้ำ เช่น การเลี้ยงปลาและเลี้ยงกุ้ง โดยการนำโพรไบโอติกมาเสริมลงในอาหารสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นการช่วยรักษาระดับความสมดุลของจำนวนแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ทำให้สัตว์น้ำมีอัตราการรอดชีวิต และมีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น มีการรายงานเกี่ยวกับการนำเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. มาใช้เป็นโพรไบโอติก เนื่องมาจากมีโครงสร้างของสปอร์ทนความร้อนได้ดี สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ดีชนิดอื่น รวมทั้งผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเติบโต และยังพบอีกว่าจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกที่มีผลดีต่อการเจริญเติบโต การเพิ่มน้ำหนักและเพิ่มอัตราการรอดตายจากเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้งขาวแวนนาไม (Villamil et al., 2003)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย

2.5.1 ชนิดของโพรไบโอติก

เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และเจริญเติบได้ในร่างกาย สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์และสภาวะเครียด (stress conditions) ต่างๆในร่างกาย จากงานวิจัยพบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ (Hernandez et al., 2013)

2.5.2 สารป้องกันเซลล์

สารห่อหุ้มที่นิยมใช้กับโพรไบโอติก คือสารกลุ่มโปรตีนและสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต มีรายงานว่าสารกลุ่มโปรตีนสามารถปกป้องจุลินทรีย์ในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยและการเก็บรักษาทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง ส่วนสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตมีคุณสมบัติลด osmotic stress ในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยทำให้มีอัตราการรอดของจุลินทรีย์ (Muhammad, et al., 2017)

2.5.2.1 <u>มอลโตเดกซ์ตริน (Maltodextrin; MD)</u>

มอลโตเดกซ์ตริน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งสามารถผลิตได้จากการไฮโดรไลซ์สตาร์ชที่ได้จากพืช ปกติแล้วเมื่อสตาร์ชที่ละลายอยู่ในน้ำได้รับความร้อนจะทำให้ส่วนที่เป็นผลึกในเม็ดสตาร์ชถูกทำลายและทำให้เม็ดสตาร์ชแตกสลายอย่างถาวร ด้วยปรากฏการณ์นี้เองทำให้เราสามารถใช้เอ็นไซม์หรือกรดในการย่อยสลายสตาร์ชได้ (BeMiller & Whistler, 2009) หลังจากที่ผ่านการย่อยแล้ว พันธะ α-1,4-glycosidic จะแตกออก ทำให้สายโซ่ของ D-glucose มีความยาวและลักษณะปรากฏแตกต่างกัน โดยความยาวสายโซ่ในโมเลกุลของ MD ที่แตกต่างกันสามารถบอกได้ด้วยค่าที่เรียกว่า dextrose equivalency (DE) (Takeiti et al., 2010) MD และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆบางชนิด อาจช่วยให้การทำแห้งแบบพ่นฝอยแบคทีเรียมีเสถียรภาพมากขึ้น ในหลายๆด้านเช่น ค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) ปริมาณความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการดูดความชื้นจากบรรยากาศ เป็นองค์ประกอบทางโภชนาการ Glass transition temperature (T_g) สี และสภาพการไหล (Sosa et al., 2016)

2.5.2.2 <u>โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG)</u>

โมโนโซเดียมกลูตาเมต หรือมักถูกเรียกว่าผงชูรส มีลักษณะเป็นผงผลึกสีใส มีคุณสมบัติในการเป็นสารเพิ่มรสชาติอาหาร ทำให้อาหารมีรสชาติโดยรวมดีขึ้น มีความสามารถในการละลายน้ำสูงซึ่งจะแตกตัวได้โซเดียม และกลูตาเมตหรือกรดกลูตามิก (glutamic acid) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน สามารถพบได้ในอาหารเกือบทุกประเภทรวมถึง เนื้อสัตว์ ผัก หอย สัตว์ปีกและปลา รวมถึงสามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกาย ทั้งนี้มีการนำ MSG มาใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องความสามารถในการป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากความร้อนในระหว่างการทำแห้ง (Teixeira et al., 1995)

2.5.3 <u>อุณหภูมิลมขาเข้าและอุณหภูมิลมขาออก</u>

อุณหภูมิความร้อนในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและปริมาณความชื้น โดยมีรายงานเกี่ยวกับอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ควรมีความชื้นอยู่ที่ประมาณ 4% และค่า water activity ประมาณ 0.2 โดยอัตราการรอดชีวิตจะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิขาออก โดยที่เมื่ออุณหภูมิขาออกเพิ่มขึ้นอัตราการรอดชีวิตจะลดลง (Huebner & Surawicz, 2006)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระหว่างการการเก็บรักษา

2.6.1 อุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษา

อุณหภูมิมีความสำคัญในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถเก็บผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น จากงานวิจัยรายงานว่าการเก็บผง *Lactobacillus plantarum* KMITNB *53.4* ที่อุณหภูมิ 4°C มีการรอดชีวิตสูงกว่าผง *Lactobacillus plantarum* KMITNB 53.4 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 37°C (วรรณทิชา ลาภศิริ, 2552)

2.6.2 บรรจุภัณฑ์และสภาวะในระหว่างการเก็บรักษา

บรรจุภัณฑ์และสภาวะการเก็บรักษามีความสำคัญในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก โดยบรรจุภัณฑ์ที่ใช้จะต้องไม่มีการแพร่ผ่านของออกซิเจนและความชื้น เช่น ถุงลามิเนต จากงานวิจัยรายงานว่าการเก็บผง *Lactobacillus plantarum* KMITNB 53.4 ในถุง foil บรรจุแบบสุญญากาศมีการรอดชีวิตสูงกว่าผง *Lactobacillus plantarum* KMITNB 53.4 ที่ไม่ได้บรรจุแบบสุญญากาศ (วรรณทิชา ลาภศิริ, 2552)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and methods)

3.1 จุลินทรีย์ สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

Lactobacillus plantarum (L. plantarum)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจนับ *L. plantarum*

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (บริษัท HIMEDIA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (บริษัท HIMEDIA)

Distilled water

Inulin

Fructooligosaccharides; FOS

Phosphate Buffered Saline; PBS

Sodium chloride; NaCI

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเชื้อสำหรับกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

Maltodextrin

Monosodium glutamate; MSG

Distilled water

บรรจุภัณฑ์ชนิด laminate aluminium foil (PET/AL/NY/PE)

3.1.3 **อุปกรณ์**

ตารางที่ 2 แสดงรายการวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	ภาพประกอบ
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง	
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง	
เครื่องฆ่าเชื้อ (Autoclave)	
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Absorption Spectrophotometer)	

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	
เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dryer)	
ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)	
ตู้บ่มเชื้อที่ (Incubator)	

ตู้เย็น (Refrigerator)	
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Thermostatically controlled incubators)	
เครื่องเขย่าสาร (Vortex)	
เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water activity meter)	

เครื่องวัดวิเคราะห์ความชื้น (Moisture Analyzer)	
ไมโครเวฟ (Microwave)	
เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (Vacuum Sealing Machine)	

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar 26.84 กรัม ลงในขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปใส่ใน autoclave ตั้งค่าอุณหภูมิฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที รออุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือต่ำกว่า 50 °C จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ จะได้เป็น MRS agar plate หากอาหารเลี้ยงเชื้อจับตัวกันจนแข็ง ให้นำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟก่อนนำไปเทลงจานเพาะเชื้อ

3.2.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 22.06 กรัม สำหรับทรีเมนต์ 1, MRS broth 22.06 กรัม+อินนูลิน 6 กรัมสำหรับ 2 และ MRS broth 22.06 กรัม+อินนูลิน 6 กรัมสำหรับทรีเมนต์ 3 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นเนื้อเดียวกันและปิดปากขวดด้วยสำลีหุ้มฟอยล์ จากนั้นนำไปใส่ใน autoclave ตั้งค่าอุณหภูมิฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

ทรีทเมนต์ (treatment)	อาหารเลี้ยงเชื้อ
control	MRS broth
1	MRS broth + อินนูลิน 3%
2	MRS broth + ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 3%

3.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก *L. plantarum*

1. ปิเปตเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 °C จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงใน MRS broth 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 18 ชั่วโมง

2. ปิเปตเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 95 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อด้วย Spread plate Technique ตามภาคพนวกข้อ **ก.1** ทุกชั่วโมง จบครบ 6 ชั่วโมง

3.2.3 การเตรียมสารละลายป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

3.2.3.1 สารละลาย Maltodextrin 10 %W/W + MSG 10 %W/W

ชั่ง maltodextrin 65 กรัม MSG 65 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 650 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวด Duran ขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปใส่ใน autoclave ตั้งค่าอุณหภูมิฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

3.2.4 <u>การศึกษาผลของพรีไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. plantarum* เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย</u>

1. ปิเปตเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงใน MRS broth 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 18 ชั่วโมง

2. ปิเปตเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมง จำนวน 10 มิลลิตร ลงใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ละชนิดปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4 ชั่วโมง

3. เมื่อบ่มเชื้อครบ 4 ชั่วโมง ให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้ง และเก็บเฉพาะส่วนตะกอน

4. ล้างตะกอนที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ด้วยสารละลาย PBS 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 rpm 15 นาที อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำ 2 ครั้ง

5. นำตะกอนที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ผ่านการล้างแล้ว ไปใส่ลงสารละลายป้องกันเซลล์ (Maltodextrin 10 %W/W + MSG 10 %W/W) 200 มิลลิลิตร ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วย Spread plate Technique ตามภาคผนวกข้อ ก.1

6. นำสารละลายป้องกันเซลล์ที่มีเชื้อโพรไบโอติก มาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยควบคุมอุณหภูมิลมขาเข้าที่ 185 °C อุณหภูมิลมขาออกที่ 85±5°C และกำหนดอัตราป้อนคงที่ที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที

7. นำผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยมา 1 กรัม ละลายด้วยสารละลาย PBS มิลลิลิตร ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วย Spread plate Technique ตามภาคผนวกข้อ ก.1

3.2.5 <u>การศึกษาอายุการเก็บรักษาของผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum*</u>

นำผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* จากข้อ 3.2.4 ในแต่ละชนิดมาแบ่งใส่ถุง Laminated aluminium foil และบรรจุแบบสุญญากาศทั้งหมด 8 ถุง โดยแบ่งเป็นการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4°C 4 ถุงและที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) 4 ถุง สำหรับระยะเวลาการเก็บรักษา 4 สัปดาห์

3.2.5.1 <u>การศึกษาสภาวะการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum*</u>

นำผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่เก็บในถุง Laminated aluminium foil ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิห้อง (25°C) มาวัดปริมาณความชื้นตามภาคผนวกที่ ก.2 และวัดค่า water activity ตามภาคผนวกข้อ ก.2 ทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์

3.2.5.2 <u>ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษา</u>

ชั่งผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่เก็บในถุง Laminated aluminium foil ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิห้อง (25°C) มา 1 กรัม ละลายด้วยสารละลาย PBS มิลลิลิตร ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อด้วย Spread plate Technique ตามภาคผนวกข้อ ก.1 ทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์

3.2.6.<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยการใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA : Analysis of variance) ด้วย Duncan's multiple range tests เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ย โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติ IBM SPSS Statistics 23

บทที่ 4

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผล (Results and discussion)

4.1 ผลของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก *L. plantarum*

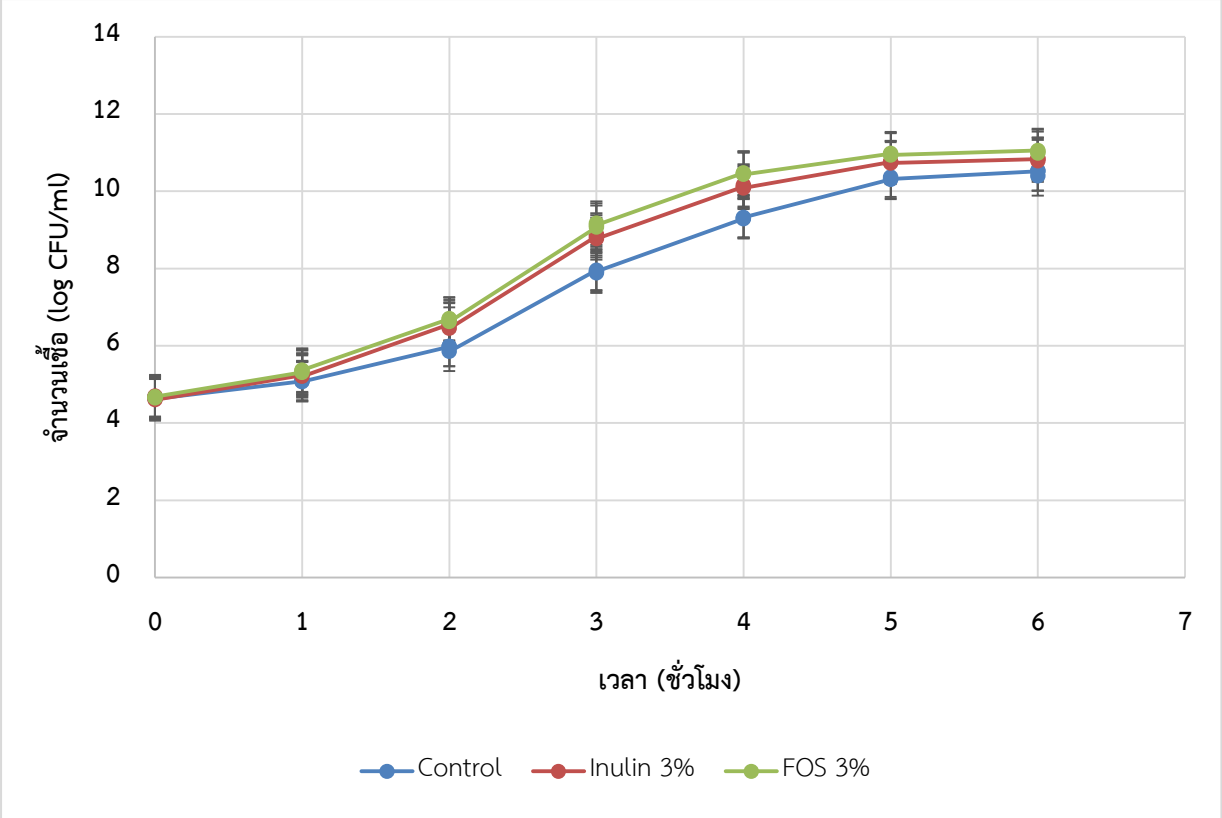
จากการติดตามการเพิ่มจำนวนของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมพรีไบโอติกอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ลงไป และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก พบว่าที่เริ่มต้นอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีจำนวนเชื้อโพรไบโอติกเท่ากัน ($P > 0.05$) และเมื่อเวลาในการบ่มครบ 6 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอินนูลินมีจำนวนเชื้อโพรไบโอติกเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมพรีไบโอติก ($P > 0.05$) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์มีจำนวนเชื้อโพรไบโอติกมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมพรีไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ส่งผลต่อเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกที่เพิ่มขึ้น

ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ (Su, et al., 2007) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้พรีไบโอติกเพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้พรีไบโอติกฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย ($OD_{600} \approx 3.5$) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($OD_{600} \approx 0.5$)

<u>ตารางที่ 4</u> ผลของพรีไบโอติกอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	**จำนวนเชื้อ (log CFU/ml)**		
	Control	**Inulin 3%**	**FOS 3%**
0	4.655 ± 0.03[a]	4.648 ± 0.04[a]	4.662 ± 0.02[a]
1	5.082 ± 0.02[a]	5.235 ± 0.03[a]	5.340 ± 0.03[a]
2	5.936 ± 0.07[a]	6.528 ± 0.07[b]	6.668 ± 0.04[b]
3	7.918 ± 0.04[a]	8.828 ± 0.05[b]	9.120 ± 0.05[b]
4	9.303 ± 0.02[a]	10.117 ± 0.03[b]	10.454 ± 0.02[b]
5	10.330 ± 0.03[a]	10.746 ± 0.02[b]	10.954 ± 0.02[b]
6	10.483 ± 0.07[a]	10.821 ± 0.03[ab]	11.021 ± 0.03[b]

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b เป็นค่าสถิติตามแถวแนวนอนที่แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P≤0.05); n=3 , ± หมายถึง ± ค่า SD



<u>กราฟที่ 1</u> ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการเติมพรีไบโอติกที่เวลาต่างๆ

4.2 <u>ผลของพรีไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. plantarum*</u>

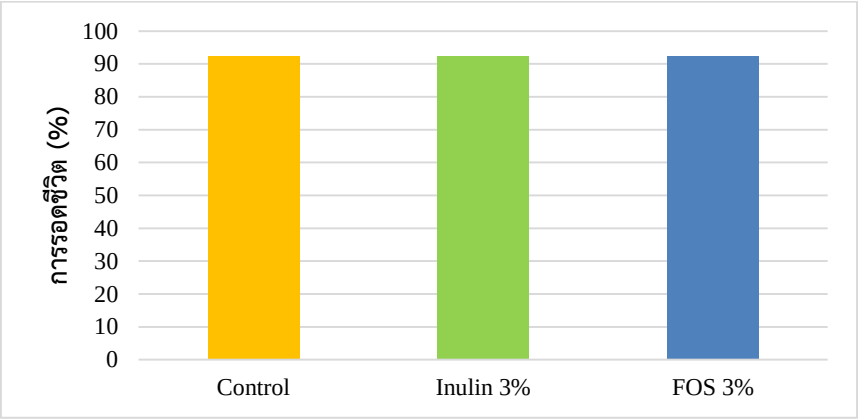
เมื่อนำเชื้อโพรไบโอติกติก *L. plantarum* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth, MRS broth ที่เติมอินนูลิน และ MRS broth ที่เติมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C จนครบ 4 ชั่วโมงและปั่นแยกตะกอนกอนเซลล์ออกมา ผสมกับสารละลายมอลโตเดกซ์ตริน 10% w/w + MSG 10% w/w ซึ่งใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ แล้วนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อก่อนผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อวัดประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกติก พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยส่งผลให้เชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิด ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกทั้งสองชนิดไม่ได้มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตให้กับเชื้อโพรไบโอติก

จากผลการทดลอง การเก็บรักษาเชื้อโพรไบโอติกด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย อาจทำให้เชื้อโพรไบโอติกเกิดการตายไปบางส่วน การลดความเสียหายที่เกิดขึ้นสามารถทำได้โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อโพรไบโอติกที่ทนต่อสภาวะความเครียดต่างๆได้ดี และการใช้สารป้องกันเซลล์เพื่อป้องกันความเสียทางกายภาพโดยการทำแห้งแบบพ่นฝอยมักทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตประมาณ 90-98% (สุพิชชา วัฒนะประเสริฐ, 2550)

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อก่อนและหลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย และการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก

	ก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (log CFU/ml)	หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย (log CFU/ml)	การรอดชีวิต (%)
Control	10.584 ± 0.06[a]	9.767 ± 0.04[b]	92.28
Inulin 3%	10.628 ± 0.06[a]	9.820 ± 0.04[b]	92.40
FOS 3%	10.686 ± 0.04[a]	9.874 ± 0.05[b]	92.40

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b เป็นค่าสถิติตามแถวแนวนอนที่แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P≤0.05); n=3 , ± หมายถึง ± ค่า SD



กราฟที่ 2 การรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน หลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย

4.3 ผลของพรีไบโอติกต่ออายุการเก็บรักษาของโพรไบโอติก *L. plantarum*

4.3.1 ศึกษาสภาวะการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum*

ทำการวัดปริมาณความชื้นด้วยเครื่อง Moisture Analyzer HB43-S และวัดค่า water activity (a_w) ด้วยเครื่อง water activity Meter ของผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่ได้จากวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยและทำการบรรจุแบบสุญญากาศในถุง Laminated aluminium foil เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาสองสภาวะคือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิห้อง (25°C) พบว่าทั้งปริมาณความชื้นและค่า water activity ของผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และที่

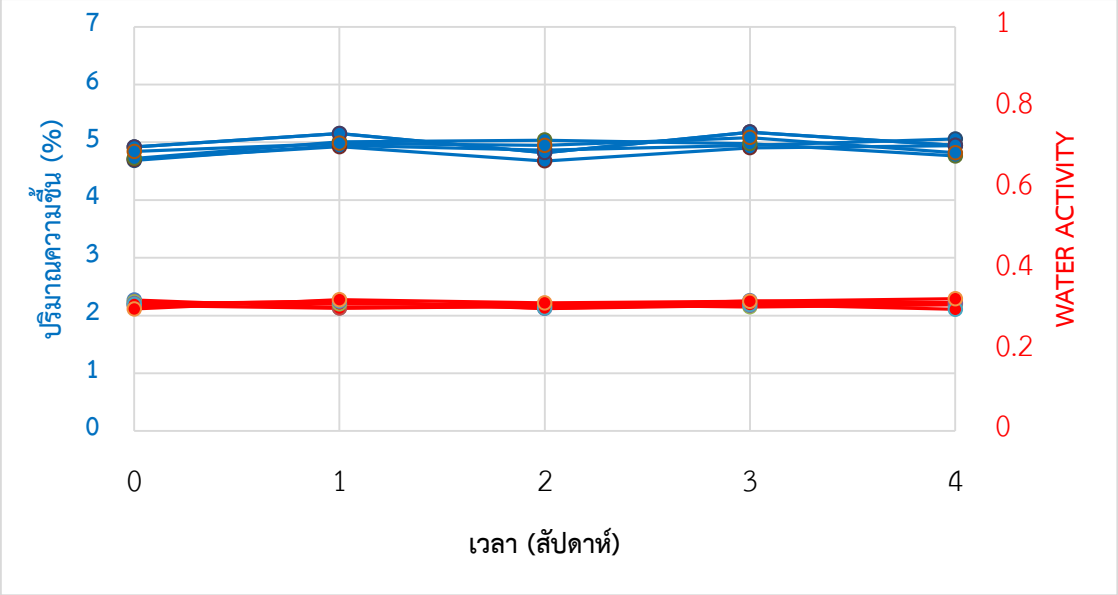
อุณหภูมิขาเข้าและอัตราการป้อนเข้าส่งผลโดยตรงต่อปริมาณความชื้น และค่า water activity ของผงเชื้อโพรไบโอติกที่ได้ โดยลักษณะของผงเชื้อโพรไบโอติกหลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ดี ควรมีความสามารถในการไหลสูง ความหนืดและการจับตัวกันต่ำ มีจำนวนเชื้อโพรไบโอติกที่รอดชีวิตสูง รวมทั้งควร

มีปริมาณความชื้นอยู่ที่ช่วงประมาณ 4-5 % (Jobbehdar, et al., 2013) และค่า water activity อยู่ที่ค่าประมาณ 2.5 (Fazilah, et al., 2019) ทั้งนี้ในการทดลองนี้อาจมีค่า a_w ที่สูงกว่าค่าที่เคยมีรายงานไว้ อาจเป็นผลมาจากการกำหนดอัตราการป้อนเข้าที่สูงเกินไป ทำให้มีปริมาณน้ำอิสระที่หลงหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์อยู่มาก

<u>ตารางที่ 6</u> แสดงปริมาณความชื้นและค่า water activity ของผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C) บรรจุแบบสุญญากาศในถุง Laminated aluminium foil เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เวลา (สัปดาห์)	**เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C**					
	ปริมาณความชื้น(%)			**water activity**		
	Control^{ns}	Inulin 3%^{ns}	FOS 3%^{ns}	Control^{ns}	Inulin 3%^{ns}	FOS 3%^{ns}
0	4.684	4.707	4.722	0.324	0.311	0.319
1	4.945	4.924	5.011	0.305	0.304	0.314
2	4.865	4.677	5.037	0.308	0.308	0.313
3	4.947	4.903	4.975	0.322	0.317	0.307
4	5.057	4.942	4.762	0.318	0.316	0.312
	เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25°C)					
0	5.037	4.919	4.841	0.315	0.313	0.302
1	5.072	5.152	4.982	0.321	0.322	0.325
2	4.749	4.821	4.945	0.303	0.304	0.317
3	4.871	5.175	5.083	0.311	0.313	0.321
4	4.934	4.947	4.819	0.316	0.301	0.327

หมายเหตุ ตัวอักษร ns เป็นค่าสถิติตามแนวคอลัมน์ที่แสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05)



<u>กราฟที่ 3</u> ปริมาณความชื้นและค่า water activity ของผงโพรไบโอติกแต่ละชนิดที่เก็บรักษาไว้ที่เวลาต่างๆ

4.3.2 <u>ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษา</u>

นำผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum* ที่ได้จากวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยมาตรวจวัดจำนวนเชื้อ โดยการละลายผงเชื้อโพรไบโอติกด้วยสารละลาย PBS และควบคุมความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายให้เท่ากับ 20% w/w ทำการ serial dilution และเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ทำการตรวจนับจำนวนเชื้อทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในผงเชื้อโพรไบโอติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ในทุกสัปดาห์ เมื่อเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4°C จำนวนเชื้อในผงโพรไบโอติกทั้งสามชนิด ลดลงด้วยอัตราที่เท่ากันในแต่ละสัปดาห์ ($P > 0.05$) และเมื่อเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติกที่อุณหภูมิห้อง (25°C) จำนวนเชื้อในผงโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ผสมอินนูลิน และ MRS broth ผสมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ลดลงด้วยอัตราที่เท่ากัน ($P > 0.05$) และลดลงด้วยอัตราที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ไม่มีการผสมพรีไบโอติก จึงสรุปได้ว่าพรีไบโอติกอินนูลิน และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีประสิทธิภาพในการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาสำหรับผงโพรไบโอติกที่ผลิตด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

มีการรายงานเกี่ยวกับอายุการเก็บรักษาของผงเชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum 44a* ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยสำหรับการผสมลงในอาหารสัตว์ โดยการเก็บรักษาผงเชื้อโพรไบโอติกไว้ในบรรจุภัณฑ์ที่บรรจุแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 4°C และ 25 °C พบว่าจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในเดือนแรกของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C มีจำนวนเชื้อประมาณ 8 log CFU/g และที่อุณหภูมิ 25°C มีจำนวนเชื้อประมาณ 6-7 log CFU/g (Bucio, et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ของงานวิจัยนี้

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นการเก็บรักษาเชื้อโดยการทำให้โพรไบโอติกในอยู่สภาวะแห้ง ซึ่งทำให้กิจกรรมทางชีวเคมีภายในเซลล์ของโพรไบโอติกลดลง แต่การทำแห้งส่งผลให้เชื้อโพรไบโอติกต้องสัมผัสกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมและทำให้เกิดการตายได้ สาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อเชื้อโพรไบโอติกตายในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะแห้งคือ ความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ซึ่งเกิดจากความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ซึ่งทำให้โมเลกุลของน้ำภายในเซลล์แพร่ออกสู่ภายนอก ในระหว่างทำแห้งแบบพ่นฝอย ทำให้เกิดการสูญเสียโมเลกุลน้ำบางส่วนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียไป ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนสถานะจากของไหลเป็นสถานะเจล เป็นผลให้สภาพการไหลลดลง ทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการแพร่เข้าออกของสารได้และตายในที่สุด (Crowe et al., 1998) มีงานวิจัยรายงานการเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันในฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *L. plantarum ST-III* เมื่อใช้โอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทำให้กรดไขมันในฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์มีสายโซ่ที่สั้นลง ซึ่งเป็นผลให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำลดลง ลดการแทรกตัวของโปรตีนและไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้หมู่เอซิลอิสระที่ปลายโซ่ของฟอสโฟลิปิดเคลื่อนไหวได้มากขึ้น จึงทำให้ความสามารถในการไหลของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น (Wu et al., 2012) (Cao-Hoang et al., 2008) ดังนั้นการผสมพรีไบโอติกอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ลงไปในอาหารเลี้ยง จึงส่งผลให้ผนังเซลล์ของเชื้อโพรไบโอติกมีสภาพการไหลที่มากขึ้นและสามารถคงสภาพเดิมไว้ได้แม้ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งช่วยลดอัตราการตายและยืดอายุการเก็บรักษาของผงเชื้อโพรไบโอติกให้มากขึ้น

<u>ตารางที่ 7.1</u> เปรียบเทียบจำนวนเชื้อในผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C) ในแต่ละทรีทเมนท์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

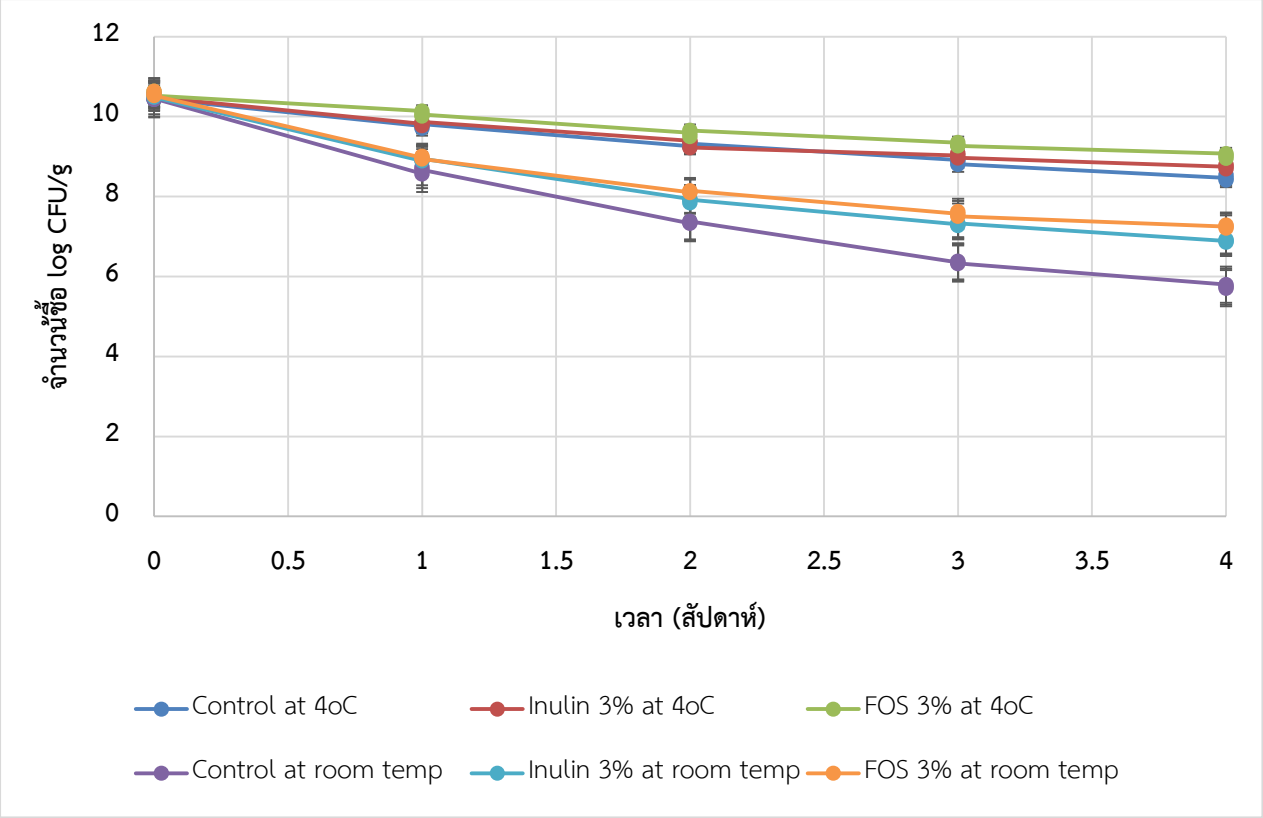
เวลา (สัปดาห์)	ที่อุณหภูมิ 4°C (log CFU/g)			ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) (log CFU/g)		
	Control	Inulin 3%	FOS 3%	Control	Inulin 3%	FOS 3%
0	10.466 ± 0.04^{A}	10.519 ± 0.04^{A}	10.573 ± 0.05^{A}	10.466 ± 0.04^{A}	10.519 ± 0.04^{A}	10.573 ± 0.05^{A}
1	9.761 ± 0.05^{B}	9.832 ± 0.03^{B}	10.069 ± 0.06^{B}	8.654 ± 0.08^{B}	8.918 ± 0.03^{B}	8.972 ± 0.03^{B}
2	9.276 ± 0.04^{C}	9.329 ± 0.09^{C}	9.583 ± 0.07^{C}	7.354 ± 0.02^{C}	7.901 ± 0.05^{C}	8.121 ± 0.02^{C}
3	8.874 ± 0.06^{D}	9.028 ± 0.06^{D}	9.300 ± 0.04^{C}	6.351 ± 0.03^{D}	7.302 ± 0.04^{D}	7.565 ± 0.06^{D}
4	8.474 ± 0.06^{E}	8.746 ± 0.05^{E}	9.017 ± 0.06^{E}	5.751 ± 0.05^{E}	6.892 ± 0.09^{E}	7.248 ± 0.04^{E}

หมายเหตุ ตัวอักษร A, B, C, D และ E เป็นค่าสถิติตามแนวคอลัมน์ที่แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$); n=3 , ± หมายถึง ± ค่า SD

ตารางที่ 7.2 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อในผงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C)ในแต่ละสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เวลา (สัปดาห์)	ที่อุณหภูมิ 4°C (log CFU/g)			ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) (log CFU/g)		
	Control	Inulin 3%	FOS 3%	Control	Inulin 3%	FOS 3%
0	10.466 ± 0.04^{a}	10.519 ± 0.04^{a}	10.573 ± 0.05^{a}	10.466 ± 0.04^{a}	10.519 ± 0.04^{a}	10.573 ± 0.05^{a}
1	9.761 ± 0.05^{a}	9.832 ± 0.03^{a}	10.069 ± 0.06^{a}	8.654 ± 0.08^{b}	8.918 ± 0.03^{b}	8.972 ± 0.03^{b}
2	9.276 ± 0.04^{a}	9.329 ± 0.09^{a}	9.583 ± 0.07^{a}	7.354 ± 0.02^{b}	7.901 ± 0.05^{c}	8.121 ± 0.02^{c}
3	8.874 ± 0.06^{a}	9.028 ± 0.06^{a}	9.300 ± 0.04^{a}	6.351 ± 0.03^{b}	7.302 ± 0.04^{c}	7.565 ± 0.06^{c}
4	8.474 ± 0.06^{a}	8.746 ± 0.05^{a}	9.017 ± 0.06^{a}	5.751 ± 0.05^{b}	6.892 ± 0.09^{c}	7.248 ± 0.04^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b เป็นค่าสถิติตามแถวแนวนอนที่แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P≤0.05); n=3 , ± หมายถึง ± ค่า SD



กราฟที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อในผงเชื้อโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง (25°C) กับระยะเวลาต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก *L. plantarum* โดยการติดตามวัดจำนวนเชื้อโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชั่วโมงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอินนูลินไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเชื้อโพรไบโอติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) จากการศึกษาประสิทธิภาพของพรีไบโอติกต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. plantarum* โดยทำการตรวจนับจำนวนเชื้อก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth, MRS broth + Inulin และ MRS broth + FOS เท่ากับ 92.28, 92.40 และ 92.40% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก และจากการศึกษาผลของพรีไบโอติกต่ออายุการเก็บรักษาของโพรไบโอติก โดยทำการวัดค่า a_w , %MC และตรวจนับจำนวนเชื้อโพรไบโอติก พบว่า a_w และ %MC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมพรีไบโอติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิดช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันมีการค้นพบพรีไบโอติกในธรรมชาติหลากหลายชนิด นอกเหนือจากอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เช่น กาแลกโตโอลิโกแซคคาไรด์ และไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งสามารถนำมาศึกษาต่อยอดได้โดยใช้แนวทางตามการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับเทคนิคการทำแห้งแบบอื่นเพิ่มเติม รวมถึงการทำซินไบโอติกไมโครเอนแคปซูล (Sybiotic microencapsulation) ซึ่งเป็นการทำแห้งโพรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติก นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นผงเชื้อโพรไบโอติก สามารถศึกษาต่อยอดได้โดยการนำไปทดลองผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวและศึกษาผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นต่อไป เพื่อให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับประสิทธิภาพของพรีไบโอติกที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและรอดชีวิตของโพรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้มากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

วรรณทิชา ลาภศิริ. (2552). การทำแห้งแบบพ่นฝอยและความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา *Lactobacillus plantarum KMITNB 53.4*. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร.

สุพิชชา วัฒนะประเสริฐ. (2550). ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกผงด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะวิทยาศาสตร์, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.

Adebola, O. O., Corcoran, O., Morgan W. A. (2014). The impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of Functional Foods*, 10.

Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi, F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal Food Microbiol*, 120 (1-2), 136-45.

Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G., Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2641–2657.

BeMiller, J. N. & Whistler R. L. (2009). Starch. *Chemistry and Technology London Academic Hiya Digital*, 11, 1-51.

Bove, P., Gallone, A., Russo, P., Capozi, V., Albenzio, M., Spano, G., Fiocco, D. (2012). Probiotic feature of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 431-441.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J., Verreth, J., Rombouts, F. M. (2005). Survival of *Lactobacillus plantarum 44a* after sprayingand drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *Journal of General and Applied Microbiology,* 51, 221–227.

Cao-Hoang, L., Marechal, P., Le-Thanh, M., Gervais, P., Wache, Y. (2008). Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Microbiol Biotechnol*, 890–903.

Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Ottimo, S., Pitarresi, G., Tripodo, G. (2008). Differential scanning calorimetry study on drug release from an inulin-based hydrogel and its

interaction with a biomembrane model pH and loading effect. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35(1), 76–85.

Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M., (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 73-103.

Duarte, P. M., Goncalves, M. F., Teixeira J. A., Rodrigues, L. R., (2010). Galactooligosaccharides production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety,* 438-454.

Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S287–S291.

Fu, N. & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes, *Food Research International*, 44, 1127–1149.

Fazilah, NF., Hamidon N.H., Ariff A. B., Wasoh H., Halim M. (2019). Microencapsulation of *Lactococcus lactis Gh1* with gum arabic and *Synsepalum dulcificum* via spray drying for potential inclusion in functional yogurt. *Molecules,* 24(7).

Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., Desobry, S., Gaiani, C. (2017). Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying milk proteins clotting control to produce innovative matrice. *Journal Food Engineering*, 193, 10–19.

Hernandez, R., Parrilla, E., Mendoza, J., Rubio, A., De la Rosa, L. A., Wall, A. (2013). Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Food Science and Food Safety*, 12(6).

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. (2014). The International scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Expert consensus document*, 11, 506–514.

Holzapfel, W. H., Habere, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365S–373S.

Huebner, E. S., & Surawicz, C. M. (2006). Treatment of recurrent Clostridium difficile diarrhea. *Gastroenterology & Hepatology*, 2(3), 203-208.

Justin, L., Jennifer, M., Beate, B., Joanne, L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current Developments in Nutrition*, 2(3), 5.

Jobbehdar, S. B., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk L. (2013). Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus NCIMB 701748*. *Journal of Drying Technology*, 31(11), 1274-1283.

Kontula, P., Suihko, M. L., Von, Wright, A., Mattila-Sandholm, T. (1999). The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 249-56.

Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Marotta, F., Yadav H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 14.

Larque, E., Torrella, F., Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(3), 315–328.

Mercenier, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M. E. (2018). Physiological and functional properties of probiotics. *International Dairy Federation*, 429, 2–6.

Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., Bian, X. (2017). Integration of polysaccharide thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food Hydrocolloids*, 66, 286-295.

Pranckute, R., Kaunietis, A., Kuisiene, N., & Čitavičius, D. J. (2016). Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 669–676.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto J., Mattila T. (2000). Probiotic bacteria safety functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215.

Sosa, N., Gerbino, E., Golowczyc, M. A., Schebor, C., Gómez, A., Tymczyszyn, E.E. (2016). Effect of galacto-oligosaccharides maltodextrin matrices on the recovery of *Lactobacillus plantarum* after spray-drying. *Frontiers in Microbiology*, 7, 584.

Su, P., Henriksson, A., Mitchella H. (2007). Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Food Microbiology*, 13 (3-4), 134-139.

Teixeira P., Castro H., Malcata F. X., Kirby R. M., (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray-drying. *Journal of Dairy Science*, 78, 1025–1031.

Vesterlund, S., Salminen, K., Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus GG* in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 319–321.

Viernstein, H., Raffalt, J., Polheim, D. (2005). Stabilisation of probiotic microorganisms. *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, 439-453.

Villamil, L., Figueras, A., Toranzo, A. E., Planas, M., Novoa, B. (2003). Isolation of a highly pathogenic Vibrio pelagius strain associated with mass mortalities of turbot Scophthalmus maximus (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases*, 26, 293-303.

Wu, C., Zhang, J., Wang, M., Du, G., Chen, J. (2012). *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 1031–1039.

Yusuf, M. A. & Hamid, T. (2013). Lactic acid bacteria: Bacteriocin producer. A mini review IOSR *Journal of Pharmacy*, 3(4), 44–50.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
ขั้นตอนการทดลอง

ก.1 การตรวจนับจำนวนเชื้อโดย Spread Plate Technique

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar
2. แอลกอฮอล์เข้มข้น 95%
3. สารละลาย NaCl 0.85%
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. ไมโครปิเปต 100 µl และ 1000 µl
6. จานเพาะเชื้อ
7. แท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader)
8. หลอดทดลอง
9. ขวด duran

วิธีการวิเคราะห์

ทำการเจือจางแบบ serial dilutions

1. ปิเปตตัวอย่างที่มีเชื้อโพรไบโอติก L. Plantarum ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย NaCl 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตรด้วย Aseptic Technique เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นสารละลายเจือจาง 10^1 เท่า
2. ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย NaCl 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตรด้วย Aseptic Technique เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นสารละลายเจือจาง 10^2 เท่า
3. ทำการทดลองแบบเดิมซ้ำเหมือนกับข้อ 1 และ 2 เพื่อเจือจางสารละลายตัวอย่างจนกว่าจะได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

เทคนิคการ Spread plate และการตรวจนับจำนวนเชื้อ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากการเจือจางแบบ serial dilutions ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ทำ 3 ซ้ำ
2. ทำการฆ่าเชื้อแท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) โดยนำไปจุ่มในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% แล้วนำไปเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด และรอให้ spreader เย็น
3. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อแท่งแก้วรูปตัวแอลซ้ำแบบข้อ 2 แล้วนำไปเกลี่ยเชื้อในจานเพาะเชื้อที่เหลือ

4. กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24-48 ชั่วโมง
5. เมื่อผ่านการบ่ม 24-48 ชั่วโมง ให้นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนี (colony) ซึ่งค่าที่ได้มีหน่วยเป็น colony forming unit (CFU) แล้วนำไปคำนวนกลับเพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย CFU/ml และCFU/g จาก number of colonies x dilution factor
6. คำนวนหา %survival หลังจากเชื้อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยจาก

$$\%\text{survival} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต } (\log \text{ cfu/g})}{\text{จำนวนเซลล์ที่ใส่ลงไปทั้งหมด } (\log \text{ cfu/g})}$$

ก.2 การหาปริมาณความชื้น (moisture content)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Moisture analyzer)

วิธีการวิเคราะห์

1.เปิดเครื่อง moisture content ชั่งน้ำหนักผงโพรไบโอติก *L. plantarum* ประมาณ 0.5 g. ปิดฝาเครื่อง moisture content ให้เครื่องอ่านค่า moisture analyzer

ก.3 การวัดค่า Water Activity (a_w)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องวัด Water Activity (a_w)

วิธีการวิเคราะห์

1. เปิดเครื่อง Water Activity ทิ้งไว้ก่อน 15–30 นาที เพื่อให้เครื่องพร้อมทำงาน
2. นำผงโพรไบโอติก *L. plantarum* มาใส่ถ้วยพลาสติก หมุนให้เครื่องอ่านค่า Water Activity

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

การคำนวน ANOVA : อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	371.454[a]	19	19.550	1042.640	.000
Intercept	4100.740	1	4100.740	218698.334	.000
trt	371.454	19	19.550	1042.640	.000
Error	.806	43	.019		
Total	4445.083	63			
Corrected Total	372.260	62			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

การคำนวน ANOVA : อัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.000[a]	5	.600	245.185	.000
Intercept	1882.484	1	1882.484	769250.382	.000
trt	3.000	5	.600	245.185	.000
Error	.029	12	.002		
Total	1885.513	18			
Corrected Total	3.029	17			

a. R Squared = .990 (Adjusted R Squared = .986)

การคำนวน ANOVA : %MC ของผงเชื้อ *L. plantarum* ที่อุณหภูมิ 4°C

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Survival

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.186[a]	4	.046	4.978	.018
Intercept	352.915	1	352.915	37806.122	.000
trt2	.186	4	.046	4.978	.018
Error	.093	10	.009		
Total	353.194	15			
Corrected Total	.279	14			

a. R Squared = .666 (Adjusted R Squared = .532)

การคำนวน ANOVA : %MC ของผงเชื้อ *L. plantarum* ที่อุณหภูมิห้อง (25°C)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Survival

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.113[a]	4	.028	2.528	.107
Intercept	368.498	1	368.498	32862.328	.000
trt2	.113	4	.028	2.528	.107
Error	.112	10	.011		
Total	368.724	15			
Corrected Total	.226	14			

a. R Squared = .503 (Adjusted R Squared = .304)

การคำนวน ANOVA : a_w ของผงเชื้อ *L. plantarum* ที่อุณหภูมิ 4°C

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Survival

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.000[a]	4	5.643E-5	1.890	.189
Intercept	1.471	1	1.471	49266.080	.000
trt2	.000	4	5.643E-5	1.890	.189
Error	.000	10	2.987E-5		
Total	1.472	15			
Corrected Total	.001	14			

a. R Squared = .430 (Adjusted R Squared = .203)

การคำนวน ANOVA : a_w ของผงเชื้อ *L. plantarum* ที่อุณหภูมิห้อง (25°C)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Survival

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.000[a]	4	9.640E-5	1.542	.263
Intercept	1.480	1	1.480	23660.470	.000
trt2	.000	4	9.640E-5	1.542	.263
Error	.001	10	6.253E-5		
Total	1.481	15			
Corrected Total	.001	14			

a. R Squared = .381 (Adjusted R Squared = .134)

การคำนวน ANOVA : การรอดชีวิตของเชื้อ *L. plantarum* ในระหว่างการเก็บรักษา

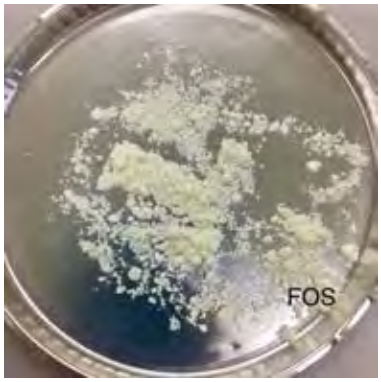
Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: logCFU

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	154.117[a]	29	5.314	2057.060	.000
Intercept	7045.025	1	7045.025	2726954.119	.000
trt	154.117	29	5.314	2057.060	.000
Error	.155	60	.003		
Total	7199.297	90			
Corrected Total	154.272	89			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .999)

รูปตัวอย่างผงเชื้อโพรไบโอติก *L. plantarum*



ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายกฤษ ชัชวารี
ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท. บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2561
โทรศัพท์	083-7116333
E-mail	krizz3330@gmail.com

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวเบญจรัตน์ เหมือนวิหาร

ตำแหน่ง ผู้ร่วมวิจัย

วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท. บ.)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จการศึกษา 2561

โทรศัพท์ 094-6295444

E-mail mind_tt63@hotmail.com